



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
ESCUELA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES**

**TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR PREVIO A LA OBTENCIÓN
DEL TÍTULO DE INGENIERA ZOOTECNISTA**

**EVALUACIÓN IN VITRO DEL EXTRACTO DE ROMERO (*Salvia rosmarinus*)
Y EUCALIPTO (*Eucalyptus globulus*) SOBRE CEPAS DE *Staphylococcus aureus*
AISLADAS DE BOVINOS CON MASTITIS.**

KARLA FERNANDA POZO MENESES

TUTOR: RUBÉN DEL TORO DENIZ

IBARRA – ECUADOR

AGOSTO, 2025

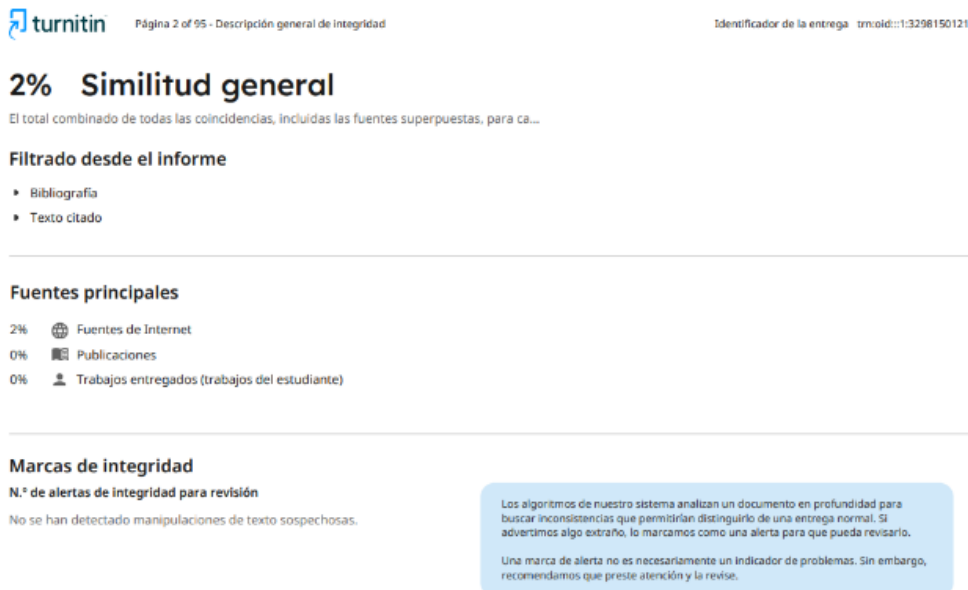
Ibarra, 18 de julio de 2025

CERTIFICACIÓN TUTOR

En mi calidad de Tutor del Trabajo de integración curricular titulado: “Evaluación in vitro del extracto de Romero (*Salvia rosmarinus*) y Eucalipto (*Eucalyptus globulus*) sobre cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de bovinos con mastitis”, presentado por el estudiante Karla Fernanda Pozo Meneses con cédula de ciudadanía N° 0401963681, para obtener el Título de Ingeniero Zootecnista.

Certifico que el trabajo cumple con todos los parámetros establecidos, mediante el cual el estudiante demuestra el desarrollo de competencias en el campo de conocimiento de su profesión con un nivel de argumentación coherente, para ser sometido a la evaluación por parte de los lectores.

Adicionalmente, se adjunta el certificado de porcentaje de originalidad de TURNITIN.



turnitin Página 2 of 95 - Descripción general de integridad Identificador de la entrega: trnoid::1:3298150121

2% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe

- Bibliografía
- Texto citado

Fuentes principales

- 2% Fuentes de Internet
- 0% Publicaciones
- 0% Trabajos entregados (trabajos del estudiante)


Marcas de integridad

N.º de alertas de integridad para revisión

No se han detectado manipulaciones de texto sospechosas.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

(f): 
PhD. RUBÉN DEL TORO DENIZ
TUTOR DE TRABAJO
C.C.: 1757544471

PÁGINA DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

El tribunal examinador, aprueba el presente trabajo en nombre de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Ibarra:

(f): 

PhD. Rubén del Toro Deniz

C.C.: 1757544471

(f): 

Msc. Maritza de los Ángeles Mier Quiroz

C.C.: 1002878286

(f): 

Msc. Santiago Xavier Mafla Andrade

C.C.: 1002658399

Ibarra, 19 de julio de 2025

ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS

Yo, *Karla Fernanda Pozo Meneses*, declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 165 del Código Orgánico de Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, que manifiesta textualmente: “Se reconoce facultad de los autores y demás titulares de derechos de disponer de sus derechos o autorizar las utilidades de sus obras o prestaciones a título gratuito y oneroso, según las condiciones que determinen. Esta facultad podrá ejercerse mediante licencias libres, abiertas y otros modelos alternativos de licenciamiento o la renuncia”.

(f):  _____

Karla Fernanda Pozo Meneses

C.C.: 0401963681

AUTORIA

Yo, *Karla Fernanda Pozo Meneses*, portadora de la cedula de ciudadanía N° 0401963681, declaro que el presente trabajo de investigación es de total responsabilidad de la autora, y eximo expresamente a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Ibarra de posibles reclamos o acciones legales.



(f):

Karla Fernanda Pozo Meneses

C.C.: 0401963681

DEDICATORIA

A mis padres, soportes vitales de mi camino, y a quienes acompañaron mi formación:

A mi madre, Fernanda, cuyo esfuerzo incansable y sacrificios constantes hicieron posible que hoy esté culminando esta etapa académica.

A mi padre, Carlos, cuyas palabras de aliento y sabiduría fueron mi refugio en los momentos de mayor desafío.

A mi hermano, Said, compañero incondicional que estuvo presente en cada paso de este camino.

Y, con profundo cariño, a la memoria de Humberto, mi querido gato, cuyo amor silencioso me acompañó durante gran parte de este recorrido académico.

Karla Pozo

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi más sincera gratitud a mi familia: padres, hermano, abuelos y a cada uno de mis tíos y tías, cuyo apoyo incondicional y acompañamiento fueron el pilar que me permitió superar cada obstáculo durante este proceso académico. Su respaldo emocional y práctico en cada etapa hicieron posible este logro.

A mis profesores y mentores, quienes con su conocimiento, paciencia y guía enriquecieron mi formación profesional y me alentaron a continuar.

Finalmente, a mis amigos y compañeros, que con sus palabras de ánimo hicieron más ligero este camino.

Karla Pozo

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN TUTOR	ii
PÁGINA DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL	iii
ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS	iv
AUTORIA	v
DEDICATORIA	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
RESUMEN	14
ABSTRACT	15
CAPÍTULO I	16
INTRODUCCIÓN	16
CAPÍTULO II	18
OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo General.....	18
2.2 Objetivos Específicos	18
2.3 Hipótesis	18
CAPÍTULO III	19
ESTADO DEL ARTE	19
3.1 Mastitis Bovina.....	19
3.1.1 Etiología e Impacto Productivo	19
3.1.2 Factores de Riesgo	20
3.1.3 Diagnóstico y Clasificación	21
3.1.4 Prevalencia e Incidencia en Ecuador	22
3.1.5 Impacto Económico	23
3.2 <i>Staphylococcus aureus</i> como Agente Causal	24
3.2.1 Rol en Casos de Mastitis Bovina	24
3.2.2 Mecanismos de Patogenicidad y Colonización Crónica.....	25
3.2.3 Resistencia Antimicrobiana	26
3.3 Uso de Alternativas Naturales	28
3.3.1 Fundamento del Uso de Alternativas Naturales.....	28

3.3.2 Aplicación de Alternativas Naturales en el Tratamiento Animal	29
3.4 Potencial Terapéutico de <i>Eucalyptus globulus</i> y <i>Salvia rosmarinus</i>	30
3.4.1 Propiedades Medicinales de <i>Eucalyptus globulus</i>	30
3.4.2 Mecanismo de Acción del Principio Activo: 1-8, cineol	31
3.4.3 Mecanismo de Acción de 1,8-Cineol Sobre <i>S. aureus</i>	32
3.4.4 Propiedades Medicinales de <i>Salvia rosmarinus</i>	33
3.4.5 Mecanismo de Acción del Principio Activo: Ácido Carnósico	34
3.4.6 Mecanismo de Acción de Ácido Carnósico Sobre <i>S. aureus</i>	34
CAPÍTULO IV.....	36
MATERIALES Y MÉTODOS	36
4.1 Materiales	36
4.1.1 Máquinas.....	36
4.1.2 Reactivos.....	36
4.1.3 Material Biológico	36
4.1.4 Materiales de Laboratorio	36
4.2 Zona de Estudio	37
4.2.1 Fase de Campo	37
4.2.2 Fase de Laboratorio.....	38
4.3 Variables	39
4.3.1 Variable Independiente	39
4.3.2 Variable Dependiente.....	39
4.4 Análisis Estadístico.....	39
4.4.1 Diseño Experimental.....	39
4.4.2 Repeticiones	40
4.4.3 Unidades Experimentales.....	40
4.4.4 Tamaño de Unidad Experimental	40
4.4.5 Tratamientos	40
4.4.6 Esquema del Análisis de Varianza.....	41
4.4.7 Análisis Funcional	42
4.5 Manejo Específico del Experimento.....	42
4.5.1 Recolección de Plantas	42
4.5.2 Extracción de Compuestos Bioactivos de <i>Eucalyptus globulus</i> y <i>Salvia rosmarinus</i>	43
4.5.3 Aislamiento de <i>Staphylococcus aureus</i>	44
4.5.4 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) Mediante Diluciones Seriadas de Extractos Totales de <i>Eucalyptus globulus</i> y <i>Salvia rosmarinus</i>	

.....	47
CAPÍTULO V	50
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
5.1 Resultados y Discusión.....	50
5.1.1 Caracterización Microbiológica de <i>S. aureus</i>	50
5.1.2 Pruebas Bioquímicas.....	50
5.1.3 Identificación molecular de <i>S. aureus</i>	51
5.1.4 Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilks y Homogeneidad de Varianzas de Levene.....	53
5.1.5 Variable Dependiente de Porcentaje de Crecimiento Bacteriano	53
5.1.5.1 Análisis de Varianza de la Variable Porcentaje de Crecimiento Bacteriano Mediante Aplicación de Dosis de Extracto Total de Eucalipto (<i>Eucalyptus globulus</i>).	53
5.1.5.2 Comparación Múltiple de Promedio de la Variable Porcentaje de Crecimiento Bacteriano Mediante la Utilización de Extracto Total de <i>Eucalyptus globulus</i> Sobre la Bacteria <i>S. aureus</i> , Aislada de Bovinos con Mastitis.	54
5.1.5.3 Análisis de Varianza de la Variable Porcentaje de Crecimiento Bacteriano Mediante Aplicación de Dosis de Extracto Total de Romero (<i>Salvia rosmarinus</i>)..	57
5.1.5.4 Comparación Múltiple de Promedio de la Variable Porcentaje de Crecimiento Bacteriano Mediante la Utilización de Extracto Total de Romero (<i>Salvia rosmarinus</i>) Sobre la Bacteria <i>S. aureus</i> , Aislada de Bovinos con Mastitis.	58
5.1.6 Variable Dependiente de Inhibición Bacteriana	60
5.1.6.1 Análisis de Varianza de la Variable Porcentaje de Inhibición Bacteriana Mediante Aplicación de Dosis de Extracto Total de Eucalipto (<i>Eucalyptus globulus</i>).	60
5.1.6.2 Comparación Múltiple de Promedio de la Variable Porcentaje de Inhibición Bacteriana Mediante la Utilización de Extracto Total de <i>Eucalyptus globulus</i> Sobre la Bacteria <i>S. aureus</i> , Aislada de Bovinos con Mastitis.	61
5.1.6.3 Análisis de Varianza de la Variable Porcentaje de Inhibición Bacteriana Mediante Aplicación de Dosis de Extracto Total de Romero (<i>Salvia rosmarinus</i>)..	62
5.1.6.4 Comparación Múltiple de Promedio de la Variable Porcentaje Inhibición Bacteriana Mediante la Utilización de Extracto Total de <i>Salvia rosmarinus</i> Sobre la Bacteria <i>S. aureus</i> , Aislada de Bovinos de Leche con Mastitis.	63
5.1.7 Uso de Etanol como Solvente para Extracción y Diluciones Seriadas	64
CAPÍTULO VI.....	65
CONCLUSIONES	65
CAPÍTULO VII.....	66
RECOMENDACIONES	66
CAPÍTULO VIII.....	67
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

ANEXOS..... 84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Coordenadas de Recolección de Cada Especie Vegetal.....	38
Tabla 2. Descripción de Tratamientos.....	41
Tabla 3. Esquema del ANOVA para las Especies Vegetales Evaluadas.....	41
Tabla 4. Clasificación del CMT para Selección de Muestras.....	45
Tabla 5. Protocolo Estándar de Tinción de Gram Empleado.	46
Tabla 6. Resultados de la Identificación Molecular de la Muestra B864.....	52
Tabla 7. Prueba de Normalidad y Homogeneidad de Varianzas.....	53
Tabla 8. Análisis de Varianza de Variable de Porcentaje de Crecimiento Bacteriano del Extracto Total de <i>Eucalyptus globulus</i>	54
Tabla 9. Análisis de Varianza de Variable de Porcentaje de Crecimiento Bacteriano del Extracto Total de <i>Salvia rosmarinus</i>	57
Tabla 10. Análisis de Varianza de Variable de Porcentaje de Inhibición Bacteriana del Extracto Total de <i>Eucalyptus globulus</i>	60
Tabla 11. Análisis de Varianza de Variable de Porcentaje de Inhibición Bacteriana del Extracto Total de <i>Salvia rosmarinus</i>	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Eucalyptus globulus</i>	30
Figura 2. <i>Salvia rosmarinus</i>	33
Figura 3. Distribución Geográfica del Área de Estudio en la Parroquia El Ángel, cantón Espejo (Carchi, Ecuador).	37
Figura 4. Ubicación Geográfica de los Laboratorios de la PUCE-Ibarra (provincia de Imbabura, Ecuador).	38
Figura 5. Diluciones Seriadas de los Extractos Totales de <i>Eucalyptus globulus</i> y <i>Salvia rosmarinus</i>	48
Figura 6. Aislamiento de Bacteria en Manitol Salado Agar.....	50
Figura 7. Identificación de Colonia Bacteriana Mediante Tinción de Gram.	51
Figura 8. Identificación de Gel de Agarosa al 1% con Productos de PCR para el Fragmento 16S.....	52
Figura 9. Porcentaje de Crecimiento Bacteriano del Extracto Total de <i>Eucalyptus globulus</i> sobre <i>S. aureus</i>	55
Figura 10. Porcentaje de Crecimiento Bacteriano del Extracto Total de <i>Salvia rosmarinus</i> sobre <i>S. aureus</i>	58
Figura 11. Porcentaje de Inhibición Bacteriana del Extracto Total de <i>Eucalyptus globulus</i> sobre <i>S. aureus</i>	61
Figura 12. Porcentaje de Inhibición Bacteriana del Extracto Total de <i>Salvia rosmarinus</i> sobre <i>S. aureus</i>	63

RESUMEN

La mastitis bovina, ocasionada principalmente por *Staphylococcus aureus*, compromete la integridad del tejido mamario, disminuye las propiedades y volumen de producción láctea, lo que conlleva pérdidas económicas en la ganadería lechera debido a los costos de tratamientos, la menor productividad y el descarte de animales. La creciente resistencia de *S. aureus* a los antibióticos complica su manejo, aumentando la necesidad de alternativas sostenibles. Esta investigación evaluó el potencial inhibitorio de extractos de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) y *Salvia rosmarinus* (romero) como alternativas para el control de esta patología. A través de un Diseño Completamente al Azar (DCA) con 18 unidades experimentales por planta (6 tratamientos: 500, 250, 125, 62.5 y 31.25 mg/mL, junto con un control positivo de Shotapen), con 3 repeticiones cada uno. Se trabajó con cepas de *S. aureus* (1.5×10^8 UFC/mL) provenientes de muestras de leche de vacas infectadas. La inhibición del crecimiento bacteriano se midió por espectrofotometría después de 18 horas, analizándose con ANOVA y Tukey ($\alpha = 0.05$). Los extractos de *E. globulus* y *S. rosmarinus* a 500 mg/mL inhibieron el 84.2% y 76.1% del crecimiento bacteriano, respectivamente. Este efecto se atribuye a compuestos bioactivos como el 1,8-cineol y el ácido carnósico. Estos hallazgos destacan el potencial de ambos extractos vegetales como alternativas para reducir la carga bacteriana y contrarrestar la resistencia antimicrobiana en el manejo de mastitis bovina, contribuyendo a un manejo más responsable.

Palabras clave: *Salvia rosmarinus*, *Eucalyptus globulus*, *Staphylococcus aureus*, actividad antimicrobiana, resistencia antimicrobiana, mastitis bovina, extractos vegetales.

ABSTRACT

Bovine mastitis, primarily caused by *Staphylococcus aureus*, impairs udder health, milk quality, and yield, leading to economic losses in dairy farming due to treatment costs, reduced productivity, and animal culling. The increasing antimicrobial resistance of *S. aureus* to conventional antibiotics necessitates sustainable treatment alternatives. This study assessed the antimicrobial efficacy of *Eucalyptus globulus* and *Salvia rosmarinus* extracts for mastitis control. A completely randomized design was employed, with 18 experimental units per plant (6 concentrations: 500, 250, 125, 62.5, 31.25 mg/mL, and a positive control, Shotapen antibiotic), each with three replicates. *S. aureus* strains (Se trabajó con cepas de *S. aureus* (1.5×10^8 CFU/mL) from mastitis-affected milk were tested, with bacterial growth inhibition measured by spectrophotometry after 18 hours and analyzed using ANOVA and Tukey's test ($\alpha = 0.05$). At 500 mg/mL, *E. globulus* and *S. rosmarinus* extracts inhibited 84.2% and 76.1% of bacterial growth, respectively, due to bioactive compounds like 1,8-cineole and carnosic acid. These findings underscore the potential of these extracts as natural alternatives to reduce bacterial load and address antimicrobial resistance in bovine mastitis management, supporting sustainable dairy practices.

Keywords: *Salvia rosmarinus*, *Eucalyptus globulus*, *Staphylococcus aureus*, antimicrobial activity, antimicrobial resistance, bovine mastitis, plant extracts.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El sector lácteo mundial afronta un desafío sanitario y costoso debido a la mastitis bovina, una patología inflamatoria de la glándula mamaria cuyo principal agente causal es *Staphylococcus aureus* (Cremonesi et al., 2018). Esta enfermedad compromete el rendimiento productivo, las propiedades nutricionales de la leche y afecta las condiciones de vida del ganado (Ruegg, 2017). En Ecuador, su prevalencia alcanza el 74.7% en hatos lecheros, con pérdidas económicas de hasta \$2,949.8 por explotación, asociadas a disminuciones del 10-45% en producción, 2-5% en contenido graso y hasta 10% en caseína, además de daños en el tejido mamario (He et al., 2020; Vayas, 2021). La resistencia antimicrobiana de *S. aureus*, con un 36.8% de cepas resistentes a penicilina y un 70% de reducción en la eficacia de tratamiento debido a la formación de biofilms, problemática exacerbada por la administración indiscriminada de antibióticos (Sharma et al., 2024; Molineri et al., 2021).

El desarrollo de alternativas terapéuticas naturales es crucial para contrarrestar la resistencia antimicrobiana y promover un manejo sostenible de la mastitis bovina. Extractos de *Eucalyptus globulus* y *Salvia rosmarinus*, con compuestos activos como 1,8-cineol y ácido carnósico, han mostrado potencial antimicrobiano al afectar la membrana celular y los biofilms de *S. aureus* (Cimanga et al., 2019; Ojeda et al., 2013). Sin embargo, la evidencia sobre su eficacia contra cepas aisladas de mastitis bovina es limitada, subrayando la necesidad de investigaciones que validen su aplicación como alternativas o complementos a los antibióticos.

La investigación analizó la capacidad inhibitoria de extractos obtenidos con etanol de *E. globulus* y *S. rosmarinus* contra cepas de *S. aureus* de origen bovino con diagnóstico de mastitis, comparándolos con un antibiótico comercial (Shotapen), para consolidar su potencial como alternativas terapéuticas naturales.

El estudio se desarrolló con hojas de *E. globulus* y *S. rosmarinus* recolectadas en la zona de El Ángel, ubicada en la provincia del Carchi, se procesaron mediante maceración dinámica y concentración en rotavapor para obtener extractos etanólicos que preserven sus compuestos bioactivos como 1,8-cineol y ácido carnósico. Se implementó

un esquema de Diseño Completamente al Azar (DCA) que incluyó 6 tratamientos (concentraciones de 31.25 a 500 mg/mL y un control positivo con Shotapen) y 3 repeticiones, totalizando 18 unidades experimentales por planta. Las bacterias de *S. aureus* utilizadas fueron obtenidas de muestras de leche con diagnóstico positivo de mastitis, confirmado mediante la prueba de California Mastitis Test (CMT), su identificación se realizó mediante Tinción diferencial de Gram, pruebas bioquímicas (coagulasa y catalasa) y secuenciación del gen 16S. La inhibición bacteriana se midió por espectrofotometría a 625 nm en ensayos de microdilución en caldo, calculando el porcentaje de inhibición y crecimiento bacteriano. Los datos obtenidos fueron procesados mediante ANOVA, prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, complementando con análisis de comparación múltiple de Tukey al 5% usando XLSTAT.

Los extractos de *E. globulus* y *S. rosmarinus* inhibieron significativamente el crecimiento de *S. aureus*, alcanzando una eficacia máxima de 83.93% y 75.68% a 500 mg/mL, respectivamente, frente al 91.44% del antibiótico. El análisis de susceptibilidad determinó que los valores de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) oscilaban entre 31.25 a 500 mg/mL, evidenciando una relación dosis-respuesta.

Se concluyó que los extractos de *E. globulus* y *S. rosmarinus* demostraron actividad antimicrobiana prometedora contra *S. aureus* de mastitis bovina, sugiriendo su viabilidad como alternativas naturales para reducir la dependencia de antibióticos y mitigar la resistencia bacteriana. Se recomienda optimizar los intervalos de evaluación en tiempos cortos para determinar su tiempo óptimo de reaplicación, identificar la contribución específica de cada principio activo con HPLC, evaluar su eficacia contra cepas resistentes como MRSA y alternar su uso con antibióticos para minimizar la resistencia bacteriana.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

- Evaluar el efecto antibiótico de los extractos de las plantas medicinales Romero (*Salvia rosmarinus*) y Eucalipto (*Eucalyptus globulus*) sobre cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de bovinos con mastitis, en condiciones de laboratorio.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos de Romero (*Salvia rosmarinus*) y Eucalipto (*Eucalyptus globulus*) sobre cepas de *Staphylococcus aureus*.
- Comparar la eficacia antibacteriana de los extractos de Romero y Eucalipto con un tratamiento convencional sobre cepas de *Staphylococcus aureus*.

2.3 Hipótesis

- **Hipótesis Alternativa:** Los extractos de las plantas medicinales Romero (*Salvia rosmarinus*) y Eucalipto (*Eucalyptus globulus*) tienen efecto antibiótico sobre cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de bovinos con mastitis en condiciones de laboratorio.
- **Hipótesis Nula:** Los extractos de las plantas medicinales Romero (*Salvia rosmarinus*) y Eucalipto (*Eucalyptus globulus*) no tienen efecto antibiótico sobre cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de bovinos con mastitis en condiciones de laboratorio.

CAPÍTULO III

ESTADO DEL ARTE

3.1 Mastitis Bovina

3.1.1 Etiología e Impacto Productivo

La inflamación mamaria en bovinos representa una reacción patológica del tejido glandular productor de leche ante la penetración bacteriana por el canal del pezón (Bujňáková & Karahutová, 2024). Entre los agentes etiológicos más comunes que forman parte de las bacterias Gram positivas se encuentran *Staphylococcus aureus* (responsables de 30-40% de los casos) y *Streptococcus agalactiae* (10-15%), y bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* (5-10%), además de otros patógenos como *Klebsiella* spp. y *Mycoplasma bovis*, que ingresan a través del esfínter del pezón cuando superan las defensas naturales de la ubre como leucocitos y lactoferrina (Cremonesi et al., 2018).

La inflamación resultante es mediada por citocinas proinflamatorias que incrementan la permeabilidad vascular, facilitando la llegada de neutrófilos y proteínas plasmáticas al tejido afectado, esto provoca daños a las células epiteliales secretoras, reduciendo la producción de leche entre un 20-50%, incrementa la concentración de células somáticas y modifica significativamente su composición debido a la disfunción de la bomba de Na⁺/K⁺ ATPasa (Nobrega et al., 2018).

Según estudios recientes, el 20% y 30% de las vacas lecheras presentan casos de mastitis durante la lactancia (Bujňáková & Karahutová, 2024). Derivando en la reducción productiva (10-25% en casos subclínicos, hasta el 50% en casos severos), descarte de leche, costos veterinarios y aumento de 2.5 veces en riesgo de descarte prematuro; en donde además la inocuidad del producto se ve comprometida (Ashraf & Imran, 2018).

La mastitis también tiene un impacto significativo en la salud animal, ya que la inflamación crónica puede generar daños irreversibles en la glándula mamaria, afectando la longevidad productiva de las vacas, y así la respuesta inmune local puede exacerbar el daño tisular si no se controla adecuadamente, subrayando la importancia de un diagnóstico y control oportuno (Bedruddin, 2023).

3.1.2 Factores de Riesgo

Entre sus principales agentes causales se clasifican en dos grupos epidemiológicos: patógenos contagiosos y ambientales, entre los primeros destacan *S. aureus* y *S. agalactiae*, responsables de la mayor parte de los cuadros de mastitis del tipo contagioso, se transmiten fundamentalmente durante los procesos de ordeño a través de equipos contaminados o manipulación inadecuada, por otro lado, los patógenos ambientales como *E. coli* y *Klebsiella* spp. proliferan en entornos con deficiente higiene, siendo particularmente problemáticos en vacas recién paridas (Jamali et al., 2018).

Existen además algunos microorganismos oportunistas como *Pseudomonas aeruginosa*, levaduras y *Prototheca* spp. pueden provocar casos esporádicos de mastitis, no obstante, en hatos con graves deficiencias de higiene, estos agentes tienen el potencial de desencadenar brotes severos (Chakraborty et al., 2019). Estos agentes suelen ingresar a través de tratamientos intramamarios mal aplicados o equipos contaminados, por lo que su control requiere identificación precisa mediante cultivos bacteriológicos o técnicas moleculares para prevenir la resistencia antimicrobiana (Ashraf & Imran, 2018).

Entre los factores de manejo y ambiente, las prácticas de ordeño inadecuadas se establecen como variables significativas, considerando que los equipos mal desinfectados, pezoneras contaminadas y falta de higiene en los operarios incrementan hasta en un 60% la probabilidad de infección. (Zeryehun & Abera, 2017). El ambiente también juega un papel crucial, debido a que mantener camas húmedas, acumulación de estiércol y áreas de descanso sucias favorecen la proliferación de bacterias ambientales (Barkema et al., 2015).

Con respecto a los factores del huésped, la susceptibilidad a la mastitis varía según factores genéticos, edad y condición fisiológica, donde razas como Holstein que son seleccionadas por alta producción láctea son más propensas a infecciones intramamarias que razas como la Jersey (Jamali et al., 2018).

Las vacas multíparas presentan mayor riesgo debido a la dilatación crónica del conducto del pezón y daños acumulativos en el parénquima mamario, siendo el período de transición de 3 semanas antes y después del parto es crítico debido a la inmunosupresión fisiológica y el balance energético negativo, en donde además deficiencias nutricionales en selenio y vitaminas A y E comprometen la respuesta inmune, facilitando la colonización bacteriana (Wheeler et al., 2012).

3.1.3 Diagnóstico y Clasificación

La mastitis clínica presenta un espectro de severidad claramente diferenciable en tres categorías. El grado I se considera leve, limitándose a alteraciones en la composición láctea, destacando la aparición de coágulos, fibras o cambios en la coloración, sin evidencia de inflamación mamaria, en el grado II, se combinan estas anomalías lácteas con signos locales marcados como edemas, hipertermia, dolor a la palpación y eritema en el cuarto afectado, finalmente, en casos graves como grado III, se refleja sintomatología sistémica pronunciada, incluyendo hipertermia ($>39.5^{\circ}\text{C}$), taquicardia, deshidratación, anorexia y postración, indicativos de posible sepsis (Karlsmose et al., 2013). La distribución epidemiológica muestra que, en promedio, el 65% de los casos corresponden a las formas leves/moderadas, mientras solo 7% alcanzan gravedad (Zeryehun & Abera, 2017).

La mastitis subclínica es una variante asintomática, considerada como el mayor desafío diagnóstico en hatos lecheros debido a que su identificación requiere métodos especializados, como el recuento de células somáticas [RCS] ($>200,000$ células/mL) y la alcalinización láctea ($\text{pH} >6.8$) (López, 2022). Estudios demuestran su alta prevalencia, presentando un 40% de incidencia en hatos sin control, además, su impacto es silencioso, reduciendo un 15-25% en producción láctea (1-3 kg/vaca/día) (Wheeler et al., 2012). La prueba CMT se establece como herramienta fundamental para su diagnóstico temprano, mostrando un 92% de sensibilidad cuando el RCS supera 400,000 células/ml (Rossi et al., 2018).

La mastitis crónica conduce a cambios histopatológicos definitivos, produciendo fibrosis glandular, atrofia alveolar y pérdida de parénquima funcional (Ashraf & Imran, 2018). Estos cuadros se asocian a RCS persistentemente elevados ($>500,000$ células/mL) y formación de biofilms bacterianos que reducen la eficacia antibiótica al 30%, en donde particularmente las cepas de *S. aureus* productoras de beta-lactamasas desarrollan resistencia en el 65% de los casos crónicos, explicando las altas tasas de descarte (Jamali et al., 2018).

Su diagnóstico requiere un enfoque que aplique una evaluación clínica, análisis de laboratorio y tecnologías avanzadas, empleando un sistema de puntuación de la inflamación mamaria, técnicas de termografía infrarroja para detectar alteraciones en los patrones de temperatura y ultrasonografía para evaluar la integridad del tejido glandular (Rossi et al., 2018). Con respecto al análisis lácteo el RCS se recomienda medir

biomarcadores específicos como la lactoferrina y la N-acetil- β -D-glucosaminidasa para determinar el daño epitelial, en donde también es necesario incorporar en conjunto metodologías de biología molecular, destacando la PCR multiplex que permite identificar simultáneamente patógenos como *S. aureus*, *S. agalactiae* y *E. coli* para establecer patrones de resistencia y seleccionar terapias dirigidas (Ruegg, 2017).

3.1.4 Prevalencia e Incidencia en Ecuador

Instituto Nacional de Estadística y Censos [INEC] (2024), mediante el análisis realizado por ESPAC, en 2023 la producción láctea nacional registra un volumen total de 5.5 millones de litros, representando la región Sierra el 77.7% de la producción, la Costa con 18.3% y la Amazonía con 4%, en donde en promedio una vaca en la Sierra presenta un rendimiento de 7.7 litros/vaca, reportándose en ese año un total de 841,529 cabezas ordeñadas.

Un estudio realizado en la zona de El Chaco, ubicado en la provincia de Napo, Espinoza & Mier (2013) evalúan 174 producciones lecheras mediante el test de CMT, analizando 5490 cuartos mamarios de 1485 vacas, reflejan una tasa de afectación de mastitis del 49.98% en los cuartos positivos al test, con 1183 animales afectados, en donde la incidencia de *S. aureus* es de 12.80%.

En Manabí, un estudio realizado por Avellán et al. (2019) analizaron la incidencia de casos subclínicos de mastitis en 280 bovinos durante seis meses, mediante CMT, estableciendo que la prevalencia fue de 38.57%, afectando principalmente al 93.52% de vacas multíparas en los primeros 100 días de lactancia, este elevado porcentaje se atribuye a las malas prácticas de ordeño.

En Carchi, provincia reconocida debido a su producción diaria de 4,751,697 litros de leche, la mastitis representa un desafío significativo con pérdidas anuales del 4.73%, en donde se evaluaron fincas de los cantones de Tulcán, Huaca y Montúfar, reportándose una incidencia de mastitis del 32%, lo que resalta la urgencia de implementar medidas de control más efectivas para mitigar las pérdidas económicas (Chamorro, 2023).

En Imbabura, Mora (2023) analiza ocho haciendas que excedían los parámetros establecidos en la norma técnica ecuatoriana para indicadores de calidad, específicamente en RCS y carga bacteriana (UFC). Mediante pruebas CMT, se determina una incidencia de mastitis del 83.3% con *S. aureus* identificado como agente causal principal a través de pruebas microbiológicas.

3.1.5 Impacto Económico

La mastitis bovina constituye un problema económico significativo para las fincas lecheras. En Ecuador, Bravo et al. (2024) reportan una incidencia de mastitis subclínica y clínica del 49.42% en los Ríos, con pérdidas promedio de \$127.05 por vaca, mientras que Vayas (2021) estima \$2625.43 por ganadería en Chimborazo (2014-2016) debido a reducción de volumen, costos de tratamiento y el descarte de vacas de alto valor genético.

A nivel internacional, Bruno et al. (2024) demuestran que el tratamiento de mastitis clínica con ceftiofur refleja costos de tratamiento por caso de \$343 y los casos no tratados presentan costos de \$550, subrayando la necesidad de implementar intervenciones tempranas y eficaces para mitigar las pérdidas económicas. En el caso de Puerto et al. (2021), cuantificó las consecuencias productivas y financieras de vacas Holstein, señalando pérdidas productivas entre 382-989 kg y caídas de \$228 y \$470 por vaca en ganado Holstein, con reducciones de utilidad bruta de \$516-\$722.

Rodríguez et al. (2024) evalúan el uso de nisina como tratamiento en vacas en la primera semana de lactancia, determinando que el costo medio de un caso subclínico fue de \$170 y de un caso clínico de \$521, sin embargo, la nisina genera un beneficio económico promedio de \$19 por caso positivo para CMT, siendo rentable en el 93 % de los casos analizados, lo que resalta el potencial de alternativas innovadoras para un manejo más eficiente de la enfermedad.

En el caso de China, He et al. (2020) reportan que los casos de mastitis clínica ocasionan pérdidas mensuales por granja entre \$12,000 y \$76,000, influenciadas por la prevalencia, el tiempo de tratamiento y la producción diaria de leche. Por otra parte, dentro de sistemas de producción finlandeses, Heikkila et al. (2012) estiman costos de mastitis clínica de \$223 a \$1076.42 por vaca, dependiendo de la fase de lactancia y las decisiones de sacrificio prematuro, que incrementan los costos en un 28%, representando aproximadamente el 20% de las pérdidas totales.

Estos estudios evidencian las consecuencias financieras directas que la mastitis bovina genera en sistemas de producción lechera y su rentabilidad, subrayando el papel de *S. aureus* debido a su capacidad de adaptación y persistencia en los hatos lecheros gracias a su habilidad para formar biofilms, convirtiéndolo en agente causal de especial preocupación (Azwanida, 2015).

3.2 *Staphylococcus aureus* como Agente Causal

3.2.1 Rol en Casos de Mastitis Bovina

S. aureus forma parte del grupo de bacterias Gram positivas, siendo su reservorio óptimo la glándula mamaria afectada, generando mastitis tanto de forma clínica como subclínica, debido a la producción de toxinas y enzimas que dañan de manera irreversible al tejido mamario (Cheng & Han, 2020). Esta capacidad patogénica manifiesta su relevancia como agente causal.

Investigaciones demuestran una elevada prevalencia de *S. aureus* en mastitis clínica, con tasas que oscilan entre el 42.9% y 74%, variando notablemente de acuerdo a los entornos de tratamiento, factores ambientales y metodologías de diagnóstico, ya que, esta bacteria además de transmitirse fácilmente durante el ordeño, también cuenta con varios genes de virulencia, entre ellos el gen hla (hemolisina alfa) se encuentra en el 49.09% al 100% de los aislados, hlb (hemolisina beta) en el 60% al 84.9%, y blaZ (beta-lactamasa) en el 92.73% de las cepas que le permiten fijarse, penetrar y deteriorar el tejido mamario, dificultando su control y erradicación (Islam et al., 2025).

Es alarmante el número de cepas de *S. aureus* con perfiles de resistencia antimicrobiana, dado que, en estudios recientes, hasta el 64% de cepas aisladas manifestaron multiresistencia, y más del 20% portan el determinante genético mecA, encargado de codificar la proteína PBP2 y conferir resistencia a antibióticos beta-lactámicos, incluyendo meticilina y otros antimicrobianos de amplio espectro, constituyendo un riesgo crítico para la sanidad animal y pública, ya que las cepas portadoras de este gen presentan opciones terapéuticas limitadas y mayor persistencia en el hospedero (Monistero et al., 2018).

El abordaje terapéutico convencional para los casos de mastitis por *S. aureus* se fundamenta en emplear antibióticos como β -lactámicos, macrólidos y tetraciclinas, pero su eficacia se ve afectada por cepas multiresistentes capaces de formar biofilms, las cuales intervienen como barreras que impiden la penetración de antibióticos, conduciendo a que el huésped presenta infecciones crónicas que requieran tratamientos prolongados (Azmi et al., 2019).

La presencia de cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina presenta una amenaza significativa debido a la posibilidad de transmisión zoonótica, aunque la detección del gen mecA es un marcador clave para su identificación, además, existen

cepas que muestran resistencia sin portar este gen, lo que dificulta su diagnóstico y tratamiento, siendo fundamental ajustar métodos fenotípicos y genotípicos para un diagnóstico puntual (Tesfaye et al., 2021). Estos hallazgos resaltan la urgencia de promover estrategias que optimicen el uso de antibióticos y fomenten el desarrollo de terapias innovadoras para el control eficaz de la mastitis bovina.

3.2.2 Mecanismos de Patogenicidad y Colonización Crónica

S. aureus es responsable de aproximadamente el 20–40% de los casos de mastitis contagiosa en hatos lecheros, debido a su capacidad para colonizar la glándula mamaria y establecer infecciones persistentes (Monistero et al., 2018). La colonización comienza con la invasión del canal del pezón, donde las cepas patógenas aprovechan micro lesiones para adherirse al epitelio mediante proteínas de superficie especializadas, incluyendo la adhesión FnbA (fibronectina de unión A) y el factor de unión ClfA (proteína de unión al fibrinógeno A) (Oliver & Murinda, 2012).

Estudios han identificado que el 70% de los aislamientos bacterianos obtenidos de casos de mastitis bovina portan genes de adhesión como *fnbA* y *clfA*, lo que facilita infecciones crónicas (Zaatout et al., 2020). Estas proteínas promueven la formación de biofilms en 48–72 horas, estructuras que reducen la eficacia de los antibióticos en un 60–80% al proteger a las bacterias tanto del sistema inmunitario como la penetración de los antimicrobianos (Scherr et al., 2014).

La formación de biofilms es un mecanismo crítico de patogenicidad, ya que crea un microambiente que limita la penetración del antibiótico y la acción inmune (Argudo et al., 2019). Estudios muestran que los biofilms de *S. aureus* en mastitis bovina disminuyen la eficacia de antibióticos como la penicilina en un 50–70%, contribuyendo a que el 25–35% de las infecciones evolucionen a mastitis crónica (Melchior et al., 2023).

La proteína A (SpA) de *S. aureus* se une a anticuerpos IgG, reduciendo la opsonización en un 45% y dificultando la fagocitosis por neutrófilos, mientras que su regulación negativa durante infecciones persistentes disminuye la visibilidad ante el sistema inmune en un 55% (Foster et al., 2014). Además, *S. aureus* produce toxinas como la α -hemolisina (Hla), que induce apoptosis en neutrófilos y células epiteliales mamarias, permitiendo la internalización bacteriana en nichos intracelulares donde puede persistir durante semanas (Fraunholz & Sinha, 2012).

La internalización en células epiteliales mamarias, observada en el 40% de las cepas clínicas, está asociada con recidivas pos tratamiento, ya que las bacterias evaden los antibióticos intracelularmente, esta capacidad se ha relacionado con tasas de recurrencia del 30% en mastitis tratada (Argudo et al., 2019).

Las enterotoxinas termoestables (SEA-SEE), presentes en el 20% de las cepas de mastitis bovina, contribuyen al daño tisular y representan un riesgo para la seguridad alimentaria al resistir la pasteurización, afectando potencialmente las propiedades sanitarias de los derivados lácteos (Argudín et al., 2010). La transición a infecciones crónicas genera fibrosis en el 60% de los alveolos mamarios afectados tras 4–6 semanas, con atrofia irreversible del tejido secretor que reduce la producción láctea en un 25–45% (Rainard et al., 2018).

Factores ambientales, como el estrés por calor, incrementan la susceptibilidad a la mastitis en un 20% al suprimir la función de neutrófilos, mientras que prácticas de ordeño inadecuadas elevan las tasas de nuevas infecciones en un 35% (Fraunholz & Sinha, 2012).

El tratamiento incompleto con antibióticos (menos de 5 días) está asociado con una tasa de recaída del 40%, exacerbando la persistencia bacteriana (Roy & Keefe, 2012). El 75% de las cepas bovinas portan el gen *aur*, que codifica la aureolisina, una proteasa que facilita la invasión tisular al degradar proteínas del huésped (Pietrocola et al., 2017).

La prevalencia de cepas resistentes a meticilina (MRSA), particularmente del linaje CC398, alcanza el 10–20% en Europa, mostrando resistencia a β -lactámicos y tetraciclinas, lo que complica el tratamiento (Crombé et al., 2013). Estrategias innovadoras, como vacunas multivalentes dirigidas contra antígenos como ClfA y Hla, han reducido la persistencia bacteriana en un 50% en ensayos de campo, ofreciendo una opción terapéutica viable para el manejo integral de mastitis (Argudo et al., 2019).

3.2.3 Resistencia Antimicrobiana

Se considera a *S. aureus* como patógeno de gran relevancia para la salud global por su destacable habilidad de generar resistencia frente a múltiples agentes antimicrobianos, utilizando proteínas de adhesión de la matriz extracelular (MSCRAMM) para adherirse a tejidos y formar biofilms, lo que facilita la colonización y la resistencia a tratamientos (Pietrocola et al., 2017).

Las proteínas MSCRAMM, como ClfA y FnbA, permiten una adhesión inicial que promueve la formación de biofilms, reduciendo la eficacia de los antibióticos en un 60–80% (Otto, 2013). Los patrones de resistencia varían según factores geográficos y epidemiológicos, destacando la necesidad de monitoreo constante de la susceptibilidad antimicrobiana (Oliver & Murinda, 2012).

Las cepas de MRSA representan una amenaza significativa debido a su resistencia a antibióticos como meticilina y penicilina, ya que, en hospitales de América Latina, las cepas de MRSA muestran prevalencias de resistencia del 40–70%, con perfiles específicos para cepas hospitalarias (HA-MRSA), comunitarias (CA-MRSA) y asociadas a animales (LA-MRSA) (Guzmán-Blanco et al., 2014).

En mastitis bovina, *S. aureus* está presente en aproximadamente el 25–35% de los casos, siendo difícil de erradicar debido a su alta resistencia antimicrobiana. Estudios en América Latina reportan resistencias a penicilina (70–85%), eritromicina (15–25%) y tetraciclina (10–20%) en cepas aisladas de mastitis bovina (Poutrel et al., 2018; Craft et al., 2019). En México, las cepas muestran resistencia a penicilina en un 60% y a amoxicilina con ácido clavulánico en un 25%, reflejando la presión selectiva en entornos ganaderos (Miranda et al., 2015).

En aislamientos de granjas en México, los biofilms reducen la eficacia de los antibióticos en un 50–70%, favoreciendo la persistencia bacteriana en infecciones intramamarias (Toledo et al., 2021). Cepas de mastitis subclínica en cuartos mamarios son más susceptibles a antibióticos (65–75%) que las aisladas de leche de tanque (50–60%), lo que indica una mayor presión selectiva en cepas ambientales (Ruegg, 2017).

El perfil genómico de estos aislamientos confirma la circulación de determinantes de resistencia, incluyendo los genes *mecA*, *tetK*, *tetM*, *gyrA* y *gyrB* en cepas de mastitis bovina en México evidencia la complejidad genética del problema (Miranda et al., 2015).

La resistencia antimicrobiana incrementa los costos de tratamiento, la duración de las infecciones y el riesgo de mortalidad en entornos ganaderos. Estudios estiman que las infecciones por *S. aureus* resistente aumentan los costos de tratamiento debido a la necesidad de terapias prolongadas y alternativas (Barkema et al., 2015).

3.3 Uso de Alternativas Naturales

3.3.1 Fundamento del Uso de Alternativas Naturales

Ciertas especies vegetales poseen potencial terapéutico debido a su contenido de metabolitos secundarios bioactivos con propiedades farmacológicas beneficiosas para el bienestar tanto de humanos como de animales (Paz et al., 2018). Los avances en estudios empíricos han impulsado la investigación de estos metabolitos bioactivos, fomentando el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos derivados de plantas medicinales (Bardales et al., 2020).

Las plantas sintetizan metabolitos primarios, como aminoácidos, lípidos, glúcidos y ácidos orgánicos, esenciales para su crecimiento y procesos fisiológicos básicos, en contraste, los metabolitos secundarios, que constituyen menos del 10% de la biomasa vegetal, cumplen funciones defensivas, produciendo compuestos con propiedades organolépticas o tóxicas que protegen contra herbívoros, patógenos y competencia interespecífica (Tian et al., 2018).

Por ejemplo, los terpenos, presentes en aproximadamente el 65% de las plantas medicinales, han inhibido el crecimiento de patógenos como *E. coli* y *Clostridium perfringens* en un 85-90% en ensayos in vitro, mientras que los alcaloides muestran una eficacia del 70% contra parásitos intestinales en animales (Wink, 2015).

Desde la antigüedad, las plantas medicinales han sido una herramienta clave para tratar enfermedades, con un estimado del 35% de las 422,000 especies vegetales mundiales utilizadas con fines terapéuticos, según registros etnobotánicos globales (Razzok et al., 2025). En regiones en desarrollo, el 75% de las comunidades rurales dependen de la fitoterapia como primera línea de tratamiento para humanos y animales, debido a su accesibilidad y costos hasta un 80% menores que los fármacos sintéticos (Paz et al., 2018).

En el sector ganadero, la fitoterapia se ha consolidado como una alternativa valiosa para aprovechar los principios activos de plantas medicinales, especialmente en comunidades con acceso limitado a medicamentos convencionales, por ejemplo, en comunidades andinas, infusiones de *Mentha piperita* han reducido la incidencia de diarreas en terneros en un 42%, mientras que extractos acuosos de *Ruta chalepensis* han

logrado una tasa de recuperación del 87% en casos de carbunco sintomático en bovinos tras aplicaciones tópicas (Bardales et al., 2020).

3.3.2 Aplicación de Alternativas Naturales en el Tratamiento Animal

Numerosos estudios respaldan el uso de extractos vegetales como alternativas en el tratamiento animal, en Argentina, en la provincia de Catamarca evaluaron especies como *Allium sativum* L. que al ser macerada y administrada de forma oral ha demostrado éxito para el tratamiento de parásitos intestinales, reduciendo la incidencia de diarreas; la aplicación de *Baccharis coridifolia* determinó su efectividad para el control de ectoparásitos en aves de producción (Martínez & Jiménez, 2017).

En México, se identificaron al menos 20 especies medicinales utilizadas en el tratamiento animal, como es el caso de *Artemisa absinthium* L., empleada para afecciones gastrointestinales relacionadas con parásitos internos, destacando su actividad in vitro contra *S. aureus* y *Candida albicans*; otro ejemplo destacado en este estudio es la aplicación de extractos metanólicos y aceites esenciales de *Ocimum basilicum* L frente bacterias como *E.coli* y *S. aureus* (Urióstegui, 2015).

Investigadores de la Universidad Autónoma de Nueva León de México, evaluó la suplementación con aceite de orégano en la dieta de cabras lecheras, reflejándose una reducción de hasta un 65% en las emisiones de metano durante la fermentación ruminal y un aumento del 15% la concentración de ácidos grasos volátiles, compuestos esenciales para la síntesis láctea y el crecimiento animal (López, 2022).

En cuanto a aplicaciones etnobotánicas, se ha documentado el uso tradicional de plantas como *Salvia rosmarinus* y *Eucalyptus globulus* en infecciones animales, en el caso de *E. globulus* al demostrar su capacidad antifúngica ante *Candida albicans*, con una inhibición de crecimiento del 90% (Mena Zablah, 2018).

Por su parte, *S. rosmarinus* reportó halos de inhibición de 23 mm contra *E. coli* y una CMI de 2 mg/mL contra *Clostridium perfringens*, patógeno relevante en infecciones gastrointestinales animales (Veenstra et al., 2021), consolidándolas como candidatas prometedoras para el desarrollo de tratamientos naturales en el sector ganadero.

3.4 Potencial Terapéutico de *Eucalyptus globulus* y *Salvia rosmarinus*

3.4.1 Propiedades Medicinales de *Eucalyptus globulus*

Figura 1.

Eucalyptus globulus.



Nota. Adaptado de iNaturalistEc (2014).

Eucalyptus globulus, denominado popularmente como eucalipto, es un árbol utilizado históricamente en sistemas médicos ancestrales debido a sus múltiples aplicaciones terapéuticas, diversas culturas han utilizado sus hojas y tallos para tratar enfermedades respiratorias como bronquitis, asma, resfriados y congestión nasal, aplicándose de manera empírica a través de infusiones, vapores, compresas o preparado especialmente como aceite esencial al poseer capacidad antimicrobiana para atravesar la membrana celular de bacterias (Wu et al., 2024).

También ha sido aplicado como antiinflamatorio y como analgésico, demostrándose mediante un análisis fitoquímico que *E. globulus* contiene monoterpenos, glucósidos cianogénicos y triterpenos, los cuales son los encargados de la producción de citoquinas inflamatorias, relacionado también con el proceso de melanogénesis y la formación de radicales libres; aplicándose baños medicinales para tratar enfermedades de la piel (Almas et al., 2021).

Tras la caracterización de *E. globulus* mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa se determinó que su componente principal es 1,8-cineol con un 86,1%, entre sus otros componentes se determinó la presencia de o-cimene con 4,9%, α -

pineno con 3,8 %, γ -terpineno con 2,2 % y α -terpineno con 1,6 %; siendo una mezcla compleja de monoterpenos, destacando fenoles aromáticos, óxidos terpénicos, ésteres, éteres, alcoholes, aldehídos, cetonas y otros terpenos como el limoneno (Kacaniova et al., 2024).

Estudios han demostrado que 1,8-cineol exhibe propiedades antimicrobianas efectivas contra diversos microorganismos patógenos, incluyendo bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como acción inhibitoria frente a hongos y virus, considerándose como un potencial tratamiento que ha presentado sinergia con antibióticos convencionales como penicilina o gentamicina, en donde gracias a su capacidad para permeabilizar la membrana celular se han obtenido resultados positivos contra *Salmonella* (Hoch et al., 2023).

Al evaluarse contra bacterias resistentes a la meticilina como *S. aureus* se determinó que los floroglucinoles presentes en *E. globulus* inhiben el crecimiento bacteriano al actuar sobre la membrana celular bacteriana, dificultando su capacidad para formar biofilms, además, se aplicó en heridas de ratos, demostrando que su aplicación acelera la cicatrización, por lo que debería aprovecharse como una alternativa eficaz y sostenible para combatir la resistencia antimicrobiana (Jiang et al., 2025).

3.4.2 Mecanismo de Acción del Principio Activo: 1-8, cineol

El 1,8-cineol, también conocido como eucaliptol, es un monoterpeno óxido presente en los extractos y aceites esenciales de *E. globulus*, que contribuye significativamente a sus propiedades antibacterianas y antiinflamatorias (Kacaniova et al., 2024). Su mecanismo de acción contra *S. aureus* se basa en la disrupción de la estructura membranosa bacteriana, proceso que incrementa la porosidad de la membrana, causando la fuga de contenidos intracelulares y la pérdida de viabilidad celular (Cimanga et al., 2019).

A nivel molecular, el 1,8-cineol inhibe enzimas bacterianas clave relacionadas con la formación de la pared celular, como aquellas involucradas en la biosíntesis del peptidoglicano, debilitando la integridad estructural de *S. aureus* y aumentando su susceptibilidad a la lisis osmótica (Hoch et al., 2023).

Un estudio reportó que el 1,8-cineol a 0.25 mg/ml reduce la síntesis de peptidoglicano en un 30%, comprometiendo la estabilidad de la pared celular (Li et al., 2015). Además, este compuesto induce estrés oxidativo al promover la formación de

radicales libres de oxígeno (ROS), los cuales provocan alteraciones en el ADN y las proteínas bacterianas, conduciendo a la muerte celular. El daño mediado por ROS incrementó la peroxidación lipídica en un 25% en *S. aureus* expuesto a 1 mg/ml de 1,8-cineol (Santos et al., 2018).

Los efectos antiinflamatorios del 1,8-cineol, aunque menos relevantes directamente para su acción antibacteriana, complementan su potencial terapéutico al modular la respuesta inmune del huésped, inhibiendo la vía del factor nuclear kappa B (NF- κ B), disminuyendo la síntesis de mediadores inflamatorios entre un 50–70% en cultivos celulares humanos, lo que podría mitigar la inflamación asociada con infecciones por *S. aureus* (Wu et al., 2024).

En aplicaciones respiratorias, el 1,8-cineol exhibe efectos mucolíticos y broncodilatadores, destacando su versatilidad al reducir la hipersecreción de mucina en un 30% en modelos de células bronquiales, facilitando potencialmente la eliminación de colonizaciones bacterianas en infecciones respiratorias, teniendo una rápida absorción por vía inhalatoria al tener una biodisponibilidad del 95% en tejidos pulmonares (Sudhoff et al., 2015).

3.4.3 Mecanismo de Acción de 1,8-Cineol Sobre *S. aureus*

La actividad antibacteriana del 1,8-cineol contra *S. aureus*, incluidas las cepas MRSA, se centra principalmente en la disrupción de la membrana celular bacteriana, al integrarse en la bicapa lipídica y de esta forma alterar su fluidez y aumentar su permeabilidad, provocando la fuga de iones y macromoléculas (Hoch et al., 2023).

Investigaciones han demostrado que el 1,8-cineol a 0.5% volumen/volumen incrementa la permeabilidad de la membrana en un 50% en 1 hora, resultando en una reducción de 3 log en la viabilidad de *S. aureus*, esta disrupción membranaria afecta el potencial electroquímico, esencial para la producción de ATP y la supervivencia celular (Cimanga et al., 2019).

El 1,8-cineol también induce estrés oxidativo en *S. aureus* al promover la acumulación de ROS, superando las defensas antioxidantes de la bacteria (Santos et al., 2018). Investigaciones documentaron un incremento del 35% en los niveles de ROS en *S. aureus* expuesto a 1 mg/ml de 1,8-cineol, lo que lleva a la peroxidación lipídica y daño al ADN, este daño oxidativo amplifica la disrupción inicial de la membrana, contribuyendo a una muerte bacteriana rápida (Li et al., 2015).

Además, cuenta con la capacidad de inhibir procesos metabólicos clave, como la síntesis de peptidoglicano y la replicación del ADN, actuando sobre enzimas como MurA y topoisomerasa II, de esta forma reduciendo la integridad de la pared celular en un 25–40% e inhibiendo la división bacteriana (Barbosa et al., 2016).

3.4.4 Propiedades Medicinales de *Salvia rosmarinus*

Figura 2.

Salvia rosmarinus.



Nota. Adaptado de iNaturalistEc (2022).

Planta aromática empleada ampliamente de forma terapéutica para el tratamiento de resfriados, afecciones musculares como expectorante y para tratar erupciones cutáneas, destacando especialmente por su actividad antibacteriana y anticancerígena, considerándose esta planta como un potencial farmacológico (Ivanova et al., 2025).

Estudios han demostrado que esta planta posee actividad antibacteriana contra *Salmonella*, *E.coli*, *S. aureus* y también contra hongos como *C. albicans*, al generar alteraciones estructurales en la envoltura celular microbiana mediante el aumento de su permeabilidad, además, los estudios toxicológicos determinaron que la dosis letal del extracto debe ser superior a 2000 mg/kg de peso, justificando su potencial aplicación en el futuro como nueva alternativa (Castaño et al., 2010).

Romero contiene principalmente alcanfor con un valor del 33,61%, 1,8-cineol con 22,22% y α -tuyona con 21,43%, además de otros compuestos como canfeno y borneol,

en estudios con células de hígado de rata, el aceite no mostró efectos nocivos en concentraciones bajas, pero causó daño celular en dosis muy altas, sugiriendo que a pesar de las excelentes propiedades del aceite como antioxidante, antiinflamatorio y de apoyo a enfermedades neurodegenerativas, dosis elevadas pueden resultar tóxicas, especialmente para el hígado (El Euch et al., 2019).

3.4.5 Mecanismo de Acción del Principio Activo: Ácido Carnósico

El ácido carnósico, un diterpeno fenólico abundante en *S. rosmarinus*, exhibe propiedades antioxidantes y antibacterianas a través de mecanismos distintos (Birtic et al., 2015). Su acción antioxidante principal implica la activación de la vía Keap1/Nrf2, donde el ácido carnósico alquila residuos de cisteína en Keap1, liberando Nrf2 para su translocación nuclear, esto induce la expresión de enzimas antioxidantes como la hemo oxigenasa-1 y la glutatión S-transferasa, aumentando la capacidad antioxidante celular en un 40–60% en modelos neuronales (Satoh et al., 2013).

En modelos de neurodegeneración, el ácido carnósico reduce la apoptosis neuronal al inhibir la activación de caspasa-3 en un 40%, protegiendo contra patologías como Alzheimer y Parkinson (Ojeda et al., 2013). Su modulación de la homeostasis del calcio, reduciendo picos intracelulares en un 25%, refuerza su rol neuroprotector (Hassanpour et al., 2025).

Aunque es conocido principalmente por su neuroprotección, la actividad antibacteriana del ácido carnósico contra *S. aureus* complementa su perfil terapéutico, sugiriendo aplicaciones duales en el manejo de infecciones e inflamación (Vázquez et al., 2016).

3.4.6 Mecanismo de Acción de Ácido Carnósico Sobre *S. aureus*

El ácido carnósico manifiesta actividad antibacteriana contra *S. aureus* al provocar una despolarización del potencial de membrana, esta disrupción afecta la producción de ATP y el flujo de nutrientes, comprometiendo la supervivencia bacteriana (Ojeda et al., 2013). La lipofilia del compuesto facilita su interacción con la bicapa lipídica bacteriana, aumentando la permeabilidad en un 25% (Moreno et al., 2015).

El ácido carnósico inhibe bombas de eflujo, reduciendo la capacidad de *S. aureus* para expulsar antibióticos (Nieto et al., 2018). Estudios muestran que disminuye la actividad de bombas de eflujo en un 35%, potenciando la eficacia de la gentamicina en 3 veces contra MRSA (Vázquez et al., 2016).

Su actividad antibiofilms es notable al reducir su biomasa, inhibiendo la producción de polisacáridos y el quorum sensing, en donde análisis microscópicos revelan una reducción del 40% en el grosor y densidad del biofilm, interrumpiendo la capacidad de *S. aureus* para formar comunidades estructuradas (Sato et al., 2013). Esto es particularmente efectivo contra biofilms de MRSA, donde los antibióticos convencionales suelen fallar (Birtic et al., 2015).

El efecto pro-oxidante del ácido carnósico en bacterias, a diferencia de su rol antioxidante en células eucariotas, incrementa los niveles de ROS en un 30%, superando las defensas antioxidantes de *S. aureus* y causando daño por peroxidación lipídica y proteínas (Ojeda et al., 2013). Su estabilidad química y resistencia a enzimas bacterianas como las β -lactamasas lo convierten en un agente antimicrobiano prometedor, ya que su capacidad para mantener actividad en presencia de proteínas séricas refuerza su potencial terapéutico (Vázquez et al., 2016).

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Máquinas

- Balanza electrónica ADAM
- Autoclave N_BIOTECK
- Molino de cuchillas Retsch GM 200
- Incubadora N_BIOTECK
- Deshidratador MEMMERT
- Rotavapor R-210 BUCHI
- Espectrofotómetro EPOCH BIOTEK
- Bomba de filtración BIOBASE

4.1.2 Reactivos

- Etanol 99%
- Shotapen Virbac (Antibiótico)
- Mannitol Salt Agar BBL
- Nutrient Broth TMMedia

4.1.3 Material Biológico

- Eucalipto (*Eucalyptus globulus*)
- Romero (*Salvia rosmarinus*)
- Cepas de *Staphylococcus aureus*

4.1.4 Materiales de Laboratorio

- Placa de micro titulación de 96 pocillos
- Cajas Petri de 100 mm x 15 mm
- Tubos de ensayo de 10 mL

- Mechero Bunsen
- Frascos Boeco de 1000 mL
- Embudo Buchner
- Pipeta de rango 0.5-10 µl
- Pipeta de 100 µl
- Matraz Erlenmeyer de de 500 mL

4.2 Zona de Estudio

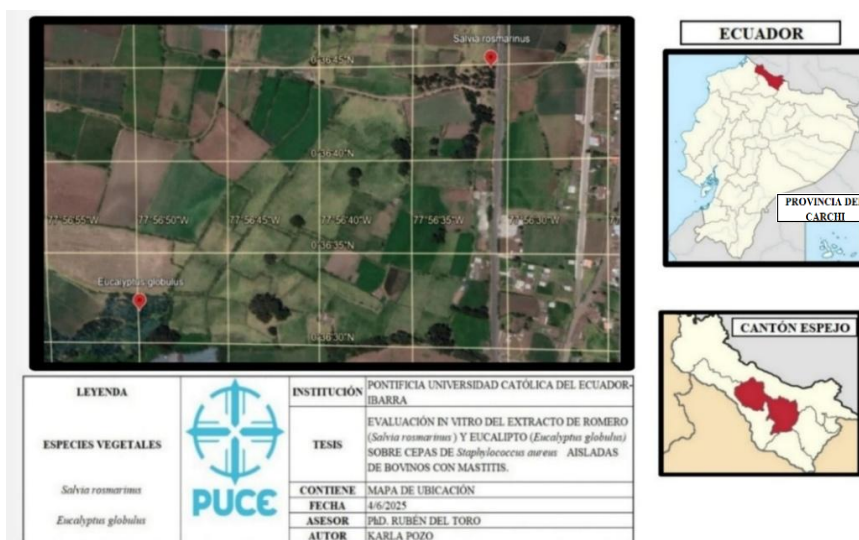
4.2.1 Fase de Campo

Se realizó la recolección de *Eucalyptus globulus* y *Salvia rosmarinus*, denominadas comúnmente como eucalipto y romero, respectivamente, como etapa inicial para la obtención de extractos de alta calidad. Se seleccionaron hojas sanas sin presencia de ningún tipo de daño o deterioro; posteriormente, fueron trasladadas al laboratorio bajo condiciones controladas para evitar su degradación (Billia et al., 2014).

El trabajo de campo se realizó en la parroquia El Ángel (cantón Espejo, Carchi), en las zonas georreferenciadas presentadas en la Figura 3.

Figura 3.

Distribución Geográfica del Área de Estudio en la Parroquia El Ángel, cantón Espejo (Carchi, Ecuador).



Nota. Adaptado de Google Maps (2025).

Además, las coordenadas geográficas de los sitios de recolección se detallaron en la Tabla 1.

Tabla 1.

Coordenadas de Recolección de Cada Especie Vegetal.

<i>Especie</i>	<i>Latitud</i>	<i>Longitud</i>	<i>Altitud (msnm)</i>
<i>Eucalyptus globulus</i>	0°61'08.127''N	77°94'7.344''W	2,934.2858535 m
<i>Salvia rosmarinus</i>	0°61'18.248''N	77°94'5.887''W	2,940.1396708 m

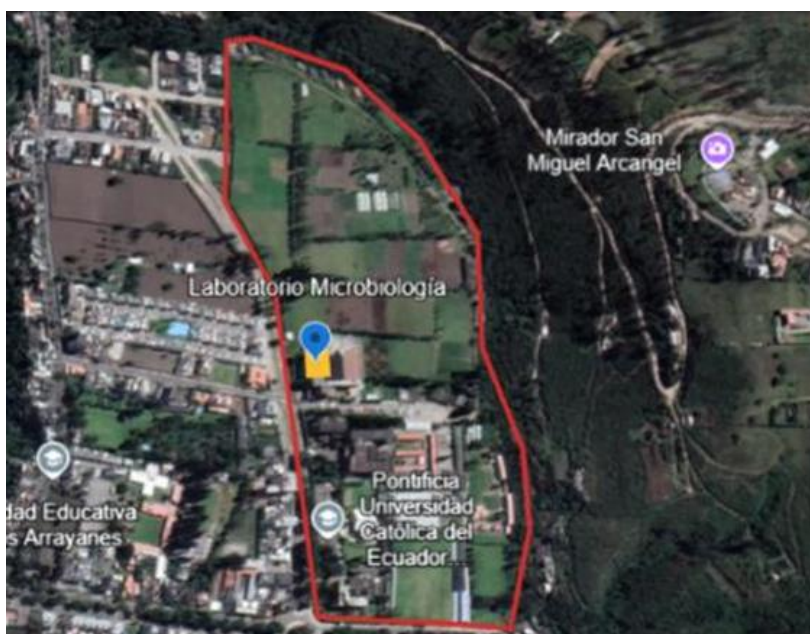
Nota. Adaptado de Google Maps (2025).

4.2.2 Fase de Laboratorio

Las muestras vegetales obtenidas en campo fueron procesadas en las instalaciones de los laboratorios de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador-Ibarra, cuya ubicación se especificó en la Figura 4.

Figura 4.

Ubicación Geográfica de los Laboratorios de la PUCE-Ibarra (provincia de Imbabura, Ecuador).



Nota. Adaptado de Google Maps (2025).

4.3 Variables

4.3.1 Variable Independiente

- **Extractos etanólicos de *Eucalyptus globulus* y *Salvia rosmarinus*:** Estas plantas fueron seleccionadas por estudios previos que demostraron su actividad antimicrobiana frente a cepas bacterianas, donde su disponibilidad local en la región del Carchi y su relevancia medicinal justificaron su inclusión (de Oliveira et al., 2019).
- **Cepas de *S. aureus*:** Seleccionadas como modelo bacteriano por ser el principal agente causal de mastitis bovina, con alta prevalencia y resistencia a antibióticos (Ruegg, 2017).

4.3.2 Variable Dependiente

- **Porcentaje inhibición bacteriana:** Se determinó midiendo los cambios en la densidad óptica (DO) a 625 nm en ensayos de microdilución en caldo, en ausencia de extractos vegetales a las 18 horas para evaluar el comportamiento de la cepa sin intervención de los extractos vegetales. De esta forma se estableció la curva de crecimiento estándar de *S. aureus* mediante un espectrofotómetro de microplacas (Elshikh et al., 2016).
- **Porcentaje crecimiento bacteriano:** Se calculó evaluando la disminución de crecimiento de *S. aureus* bajo la influencia de extractos etanólicos de *E. globulus* y *S. rosmarinus* en concentraciones que variaron de 31.25 mg/mL a 500 mg/mL, las diluciones seriadas se aplicaron en microplacas de 96 pocillos, y después de 18 horas de incubación, se determinó la inhibición comparando la ausencia de crecimiento visible con un control positivo (antibiótico), utilizando mediciones de densidad óptica (Balouiri et al., 2016).

4.4 Análisis Estadístico

4.4.1 Diseño Experimental

El estudio empleó un Diseño Completamente al Azar (DCA) para evaluar las variables de interés de forma independiente en cada planta (*E. globulus* y *S. rosmarinus*). Cada planta se analizó por separado, con su propio conjunto de unidades experimentales, garantizando la independencia de los efectos.

Este diseño fue seleccionado porque es ampliamente empleado en ensayos in vitro de actividad antimicrobiana, ya que controla la variabilidad inherente de las muestras biológicas y facilitar el análisis estadístico de los datos mediante ANOVA (Balouiri et al., 2016).

El procesamiento estadístico se realizó mediante el software XLSTAT (versión 2023.2.0;1411; ID de licencia: b1672737- bf0f-472b-a655-46d8039fd975) para realizar el ANOVA, asegurando un procesamiento eficiente y preciso de los datos.

4.4.2 Repeticiones

Se aplicaron 3 repeticiones por tratamiento, justificadas mediante un análisis de potencia estadística con un nivel de significancia de 0.05 (Faul et al., 2007).

4.4.3 Unidades Experimentales

Cada planta (*E. globulus* y *S. rosmarinus*) se evaluó de forma individual bajo un DCA, con un total de 18 unidades experimentales por planta, aplicándose 6 tratamientos, cada uno con 3 repeticiones.

4.4.4 Tamaño de Unidad Experimental

El diseño experimental consideró 18 unidades por planta, donde cada unidad experimental consistió en 3 pocillos con su respectiva concentración. Se emplearon 3 placas de 96 pocillos para cumplir con las 3 repeticiones.

4.4.5 Tratamientos

Los tratamientos descritos en la Tabla 2 fueron los aplicados para el desarrollo de este estudio, incluyendo diferentes concentraciones de extractos vegetales junto con un control positivo (Shotapen). Shotapen es un antibiótico compuesto por penicilina G procaína (100 000 UI), penicilina G benzatínica (100 000 UI), dihidroestreptomicina base 200 mg y excipiente c.b.p. 1 mL (Virbac, 2021). Este fármaco fue seleccionado como control positivo por ser el antibiótico más utilizado en la zona por productores lecheros debido a su mecanismo de acción sinérgica que combina la inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana con la interferencia en la síntesis proteica, alcanzando niveles terapéuticos en 4 horas y manteniéndolos por 72 horas, su administración en dosis únicas reduce el estrés en el ganado (Biogéneses-Bagó, 2021).

Los extractos etanólicos de *E. globulus* y *S. rosmarinus* se evaluaron en las siguientes concentraciones de 500, 250, 125, 62.50, 31.25 mg/mL, su selección se basó

en protocolos estandarizados para evaluar la actividad antibacteriana in vitro, este rango permite determinar CMI y caracterizar la relación dosis-respuesta frente a la bacteria objetivo (Balouiri et al., 2016). Las diluciones seriadas utilizadas son ampliamente aceptadas en ensayos de susceptibilidad antimicrobiana, ya que cubren un espectro amplio desde dosis altas hasta bajas, facilitando la identificación de efectos inhibitorios significativos y la comparación con estudios previos (Tariq et al., 2019). Además, concentraciones similares han sido empleadas en investigaciones con extractos vegetales, respaldando su utilidad para detectar actividad biológica en sistemas in vitro (Sienkiewicz et al., 2013).

Tabla 2.

Descripción de Tratamientos.

<i>Tratamiento</i>	<i>Descripción</i>
T1	500 mg/mL
T2	250 mg/mL
T3	125 mg/mL
T4	62.50 mg/mL
T5	31.25 mg/mL
T6	Antibiótico

4.4.6 Esquema del Análisis de Varianza

La Tabla 3 presentó el ANOVA empleado en este estudio para cada especie vegetal estudiada, lo que permitió establecer la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos evaluados.

Tabla 3.

Esquema del ANOVA para las Especies Vegetales Evaluadas.

<i>Fuente de Variación</i>	<i>Grados de Libertad (E. globulus)</i>	<i>Grados de Libertad (S. rosmarinus)</i>
Total	17	17
Tratamientos	5	5
Error	12	12

Nota. Ambas especies vegetales siguieron el mismo diseño experimental, evaluándose de forma individual.

4.4.7 Análisis Funcional

- Prueba de normalidad Shapiro Wilk
- Coeficiente de variación
- Comparación múltiple de medias de Tukey al 5%

4.5 Manejo Específico del Experimento

4.5.1 Recolección de Plantas

La zona de investigación se delimitó en la parroquia El Ángel (cantón Espejo, provincia de Carchi), tras la confirmación de la presencia de las especies de interés: romero y eucalipto. Esta zona fue seleccionada como sitio de recolección debido a la disponibilidad de ambas plantas en condiciones adecuadas para su estudio. Para garantizar la calidad de las muestras, se recolectaron hojas sanas, libres de daños y en estado óptimo de desarrollo para asegurar una alta concentración de metabolitos secundarios (Bilia et al., 2014).

La selección de romero y eucalipto se justificó por su relevancia en el contexto ecuatoriano, donde su combinación permitió aprovechar recursos locales con un equilibrio entre facilidad de cultivo, rentabilidad y aplicaciones medicinales (de Oliveira et al., 2019). En el caso del romero, que requiere un bajo mantenimiento y tiene un alto valor comercial en la industria de aceites esenciales, mientras que el eucalipto, a pesar de ser una especie introducida, sigue siendo económicamente viable por su rápido crecimiento (Flores et al., 2020; Palacios et al., 2019).

Para garantizar una mayor concentración de aceites esenciales, se recolectaron exclusivamente hojas en etapa juvenil, ya que durante esta etapa la planta se encuentra en pleno desarrollo vegetativo, produciendo metabolitos secundarios que incrementaron la síntesis y acumulación de estos compuestos, en este caso, se buscó maximizar el contenido de 1,8-cineol y ácido carnósico (Antezana, 2017).

Además, con el fin de preservar la integridad de las muestras, las hojas recolectadas fueron almacenadas en bolsas de papel para evitar la acumulación de humedad que podría promover el desarrollo de microorganismos contaminantes capaces de afectar la calidad de las muestras (Bilia et al., 2014).

4.5.2 Extracción de Compuestos Bioactivos de *Eucalyptus globulus* y *Salvia rosmarinus*

Tras la recolección de muestras, se procedió a trasladarlas a los laboratorios de PUCE-I para su limpieza, la cual consistió en un lavado minucioso con agua destilada esterilizada para eliminar suciedad y la presencia de microorganismos en la superficie. Posteriormente, se deshidrataron a una temperatura de 40°C durante 8 horas para minimizar la degradación de compuestos volátiles de ambas plantas, ya que temperaturas superiores a 50°C pudieron reducir hasta un 30% el contenido de metabolitos volátiles (Brglez et al., 2016).

Después de confirmar el estado de las hojas tras el secado, se procesaron por separado en un molino de cuchillas, obteniendo una muestra homogénea para maximizar el área de interacción que tendría con el solvente (Duarte et al., 2020). Entre cada molienda, se realizó una limpieza exhaustiva del molino, previniendo así posibles transferencias cruzadas entre las muestras. Se pesaron 60 g de cada planta y se colocaron en bolsas de papel.

Como medio de extracción se empleó el método de maceración dinámica debido a que permite una extracción eficiente de compuestos bioactivos, polifenoles y otros metabolitos secundarios de manera exhaustiva y preservando la integridad molecular de los principios activos, se consideró que su principal cualidad radica en el movimiento constante del solvente (Duarte et al., 2020).

En este caso, se empleó como solvente al etanol, al ser un solvente no tóxico ampliamente utilizado para extractos de plantas destinadas a aplicaciones farmacéuticas o alimentarias, siendo capaz de extraer una amplia gama de compuestos, y además se caracteriza por ser un solvente con facilidad de evaporación, simplificando el proceso de concentración del extracto (Sánchez et al., 2015).

Para la extracción de cada muestra, se emplearon 60 g de cada planta, que se colocaron dentro de un frasco Boeco junto con una proporción de planta:solvente del 1:10, agitados durante 24 horas a una velocidad de 250 rpm para garantizar una mezcla homogénea sin generar turbulencia excesiva, adecuada para proporcionar una agitación moderada que mejoró la extracción de compuestos favoreciendo la disrupción de los tejidos vegetales e incrementando la difusión del solvente para una extracción más completa (Nolazco et al., 2020).

El extracto se filtró usando un embudo equipado con papel filtro y una bomba de vacío para separar el material vegetal del solvente. El residuo sólido resultante se reprocesó mediante extracciones adicionales, con el objetivo de garantizar una extracción completa y maximizar el rendimiento al combinar los resultados finales de cada filtración (Akinboye et al., 2024). El etanol se eliminó mediante un rotavapor a 40°C para eliminar el etanol y concentrar los compuestos bioactivos, ajustándose a una rapidez de rotación de 60 rpm (escala 4/10) y un condensador a -4°C mediante un sistema de refrigeración.

Este proceso continuó hasta recuperar efectivamente el solvente y obtener un extracto con consistencia sólida, que se almacenó en frascos ámbar estériles, protegidos de la luz para evitar la fotodegradación de compuestos activos (Santos et al., 2018).

Con el fin de asegurar la calidad y estandarización de los extractos obtenidos, se implementó un control de rendimiento de extracción con el objetivo de evaluar su eficiencia tras la maceración dinámica, se comparó con valores reportados por plantas aromáticas, donde rangos de 5-25% fueron comunes en extractos etanólicos (Rahman et al., 2022). Para este estudio, se consideró aceptable un rendimiento $\geq 5\%$, asegurando la eficacia del proceso.

4.5.3 Aislamiento de *Staphylococcus aureus*

4.5.3.1 Recolección de Muestras de Leche

El muestreo se realizó en la parroquia de La Libertad (cantón Espejo, Carchi), se realizó bajo condiciones estériles para preservar la integridad de las muestras y minimizar la contaminación. Las vacas seleccionadas fueron evaluadas previamente para detectar signos clínicos o subclínicos de mastitis, como inflamación de la ubre, cambios en la composición de la leche o disminución en el volumen de producción (Cheng & Han, 2020).

Como herramienta de diagnóstico preliminar se empleó CMT con el fin de identificar de manera rápida la incidencia de esta patología en el ganado vacuno (Rossi et al., 2018). Para cada muestra se procedió a mezclar volúmenes iguales de 2 mL de leche procedente de cada cuarto mamario con el reactivo CMT en una paleta de cuatro pocillos, específica para el test, en donde la mezcla se agitó suavemente durante 10 segundos, y la reacción se evaluó visualmente en un plazo de 30 segundos (Jamali et al., 2018).

La clasificación de los hallazgos se realizó conforme a los parámetros establecidos en la Tabla 4.

Tabla 4.

Clasificación del CMT para Selección de Muestras.

<i>Resultado</i>	<i>Interpretación</i>
Negativo	No mastitis (bajo RCS)
Trazas	Posible mastitis subclínica (ligero aumento de células somáticas)
1+	Mastitis subclínica leve
2+	Mastitis subclínica moderada
3+	Mastitis subclínica severa

Nota. Adaptado de National Mastitis Council (2017). Negativo (sin gelificación), Trazas (ligera viscosidad), 1+ (gelificación leve), 2+ (gelificación moderada), 3+ (gelificación marcada).

Antes de la recolección, los pezones de cada cuarto mamario se limpiaron minuciosamente para eliminar suciedad y microorganismos superficiales, como parte del protocolo, se descartaron los primeros chorros de leche de cada cuarto para evitar la inclusión de contaminantes presentes en el canal del pezón (Rossi et al., 2018).

Tras el diagnóstico, se identificó el animal al que se tomaría la muestra y se procedió con la recolección empleando frascos estériles, colocándose un volumen aproximado de 10 ml y se mantuvieron refrigeradas para preservar la viabilidad de los microorganismos (Avellán et al., 2019).

4.5.3.2 Métodos de Identificación de *Staphylococcus aureus*

4.5.3.2.1 Aislamiento e Identificación Microbiológica de *S. aureus* Empleando Agar Manitol Salado

Para el aislamiento de *S. aureus* a partir de muestras de leche con mastitis, se empleó agar manitol salado (AMS) como medio selectivo para inhibir microorganismos no estafilococos, en este caso, los estafilococos coagulasa-positivos como *S. aureus* fermentaron el manitol, generando colonias amarillas con halos del mismo color debido al cambio de pH (Pasachova et al., 2019). Se disolvió el AMS en agua destilada y se autoclavó durante una hora y media. Se vertieron 20 ml en placas Petri estériles, dejándolas solidificar a temperatura ambiente.

Se inoculó 1 ml de la muestra de leche en las cajas Petri, incubándose a 37 °C durante 24 a 48 horas, identificándose la presencia de colonias amarillas rodeadas de un halo amarillo, facilitando la identificación preliminar de *S. aureus* al que reflejar su capacidad fermentativa característica (Tsegmed et al., 2012).

4.5.3.2.2 Tinción de Gram

La identificación bacteriana se realizó mediante la técnica de tinción de Gram, método diferencial que permite clasificar microorganismos según las características de su pared celular, para esta prueba, se utilizó cristal violeta, lugol, alcohol y safranina, en donde se procedió a colocar una gota de agua estéril sobre un portaobjetos limpio, en el cual se realizó un frotis con una colonia pura, que fue fijada al pasarla por la llama, después, se procedió a seguir con el protocolo expuesto en la Tabla 5 para la aplicación de cada reactivo y su respectivo lavado (Corrales & Caycedo, 2020).

Tabla 5.

Protocolo Estándar de Tinción de Gram Empleado.

<i>Reactivo</i>	<i>Tiempo de aplicación</i>
Cristal violeta	1 min
Lugol	1 min
Alcohol acetona	15 s
Safranina	30 s

Nota. Adaptado de Corrales & Caycedo (2020).

Tras dejar secar el portaobjetos con la muestra, se observó bajo microscopio óptico a 100x con aceite de inmersión, identificando cocos Gram-positivos de color violeta agrupados en racimos, esta agrupación característica es típica de *S. aureus*, debido a su pared celular gruesa rica en peptidoglicano (Asanza et al., 2024).

4.5.3.2.3 Prueba de Catalasa

La prueba de catalasa permitió confirmar la actividad enzimática de catalasa, característica de *S. aureus*, el protocolo consistió en depositar una gota de solución de H₂O₂ al 4%, mezclándola con una colonia pura usando un aplicador estéril. La formación inmediata de burbujas indicó un resultado positivo, confirmando la descomposición de H₂O₂ en agua y oxígeno (Poutrel et al., 2018).

4.5.3.2.4 Prueba de Coagulasa

Evaluó la capacidad de *S. aureus* para producir la enzima coagulasa, esta enzima fue la encargada de producir la coagulación del plasma sanguíneo, en donde un resultado positivo se confirmó tras varias horas de incubación, al observarse la formación de coágulos en la muestra de sangre (Duquesne et al., 2015).

4.5.3.2.5 Identificación molecular de *S. aureus*

La muestra se envió al laboratorio IDgen ubicado en la ciudad de Quito para la caracterización genética empleando el método de código de barras del gen 16S, con el fin de determinar si la bacteria correspondió a *S. aureus*. El procedimiento fue el siguiente:

- Tomando una muestra de aproximadamente 100 mg de la muestra se extrajo el ADN, en donde su calidad e integridad se evaluaron a través de espectrofotometría de microvolumen y análisis en gel de agarosa al 1%.
- Posteriormente, el ADN se ajustó a una concentración aproximada de 20 ng/μl, adecuada para su posterior por PCR, utilizando los cebadores 16S: 27F/1492R [1].
- El producto amplificado por PCR se purificó para su secuenciación mediante el método SANGER, las cuales fueron refinadas y ensambladas utilizando herramientas bioinformáticas especializadas.
- Finalmente, la secuencia ensamblada se comparó con las bases de datos de nucleótidos disponibles en el GenBank del NCBI para obtener una identificación taxonómica precisa del microorganismo (IDgen, 2025).

4.5.4 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) Mediante Diluciones Seriadas de Extractos Totales de *Eucalyptus globulus* y *Salvia rosmarinus*

Para la determinación de CMI, se realizó un protocolo estandarizado de diluciones seriadas empleando los extractos totales de cada planta. Inicialmente, se mezclaron 500 mg de cada extracto en un volumen de 1 mL en frascos de vidrio estériles, obteniendo una solución madre de 500 mg/mL, posteriormente, se prepararon diluciones seriadas con el fin de alcanzar las concentraciones finales que serían evaluadas, que consistieron en 500, 250, 125, 62.5, 31.25 mg/mL, estas concentraciones fueron empleadas porque permitieron evaluar un rango amplio de actividad antimicrobiana, desde dosis altas (500 mg/mL) para detectar la máxima eficacia de los extractos, hasta dosis bajas (31.25 mg/mL) cercanas a los umbrales de actividad biológica, siendo fundamental para

determinar CMI en ensayos in vitro (Balouri et al., 2016). Este rango, basado en diluciones seriadas, fue utilizado en estudios de susceptibilidad antimicrobiana, ya que facilitó la identificación de efectos dosis-respuesta (Yusuf et al., 2022).

Figura 5.

Diluciones Seriadas de los Extractos Totales de Eucalyptus globulus y Salvia rosmarinus.



Este estudio se evaluó empleando espectrofotometría en placas de 96 pocillos debido a su alta sensibilidad y capacidad para analizar múltiples concentraciones de forma simultánea y reproducible en la cuantificación del crecimiento bacteriano mediante densidad óptica (DO) a 625 nm, método ideal para ensayos de microdilución con extractos vegetales (Li et al., 2015).

El inóculo bacteriano se preparó cultivando *S. aureus* en AMS a 37°C durante 24 horas, una colonia pura se transfirió a 5 mL de Nutrient Broth, ajustando una turbidez en base a la escala de McFarland (absorbancia de 0.08-0.10 a 625 nm, 1.5×10^8 UFC/mL) usando un espectrofotómetro, esta estandarización garantizó una concentración bacteriana uniforme, primordial para minimizar variaciones en los resultados (Instituto de Normas Clínicas de Laboratorio [CLSI], 2018). En placas de 96 pocillos, se añadieron 10 μ L correspondientes a cada concentración del extracto junto con 100 μ L de la suspensión bacteriana, alcanzando un volumen total de 110 μ L en cada pocillo, óptimo para lecturas precisas y compatibilidad con lecturas de microplacas (Li et al., 2015).

Se incluyeron cuatro controles: (a) control del solvente, para detectar efectos del vehículo; (b) control del crecimiento bacteriano (inóculo en Nutrient Broth), para medir el crecimiento sin inhibición; (c) control positivo de antibiótico, para validar la sensibilidad de la cepa; y (d) control de esterilidad (solo Nutrient Broth), para confirmar la ausencia de contaminación. Los ensayos se incubaron a 27°C durante 18 horas. La absorbancia se midió a 625 nm en un lector de microplacas a 0 y 18 horas, promediando

tres réplicas por tratamiento para garantizar robustez estadística (Elshikh et al., 2016). Se calculó considerando la corrección por interferencia cromática de los extractos, aplicando la siguiente ecuación:

Ecuación 1.

Porcentaje de Inhibición de Extractos.

$$\% \text{ inhibición} = \left(1 - \left(\frac{DO_{18h} - DO_{0h}}{DOC_{18h} - DOC_{0h}} \right) \right) \times 100$$

Donde:

- **DO18h:** Densidad óptica de pocillo a las 18 h después de la inoculación.
- **DO0h:** Densidad óptica de pocillo a las 0 h después de la inoculación.
- **DOC18h:** Densidad óptica de pocillo de control de crecimiento a las 18 h después de la inoculación.
- **DOC0h:** Densidad óptica de pocillo de control de crecimiento a las 0 h después de la inoculación.

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Resultados y Discusión

5.1.1 Caracterización Microbiológica de *S. aureus*

La obtención de cepas bacterianas se efectuó mediante siembra de muestras de leche positivas a mastitis en Agar Manitol Salado, medio selectivo que permite su diferenciación. Tras 24 horas de incubación a 37°C, se identificaron colonias circulares de color amarillo dorado, rasgo típico por fermentación ya que acidifica el medio de cultivo al alterar su indicador de pH (Tsegmed et al., 2012), tal como se muestra en la Figura 6.

Figura 6.

Aislamiento de Bacteria en Manitol Salado Agar.



5.1.2 Pruebas Bioquímicas

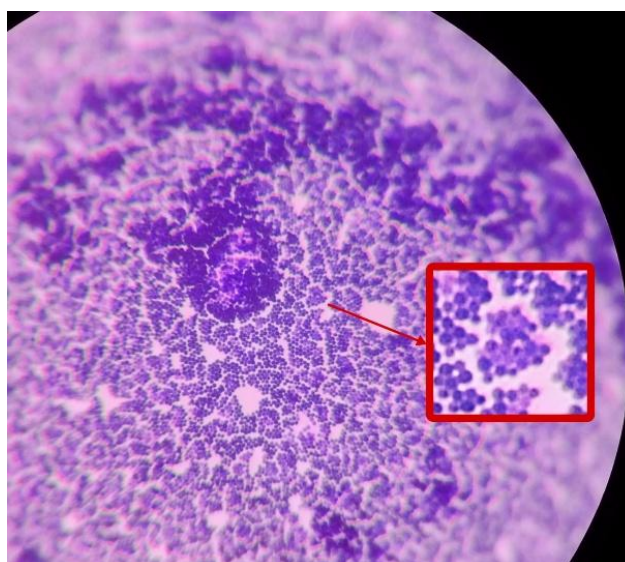
La confirmación de *S. aureus* se realizó mediante una serie de pruebas bioquímicas estandarizadas. La tinción de Gram reveló cocos Gram-positivos debido a su característico color púrpura, atribuible a la capacidad de fijación de cristal violeta en su densa capa de peptidoglicano, diferenciándolos de bacterias Gram-negativas que poseen una pared más delgada (Tong et al., 2020).

La prueba de catalasa resultó positiva, evidenciada por la formación de burbujas de oxígeno al aplicar peróxido de hidrógeno, lo que indica la presencia de la enzima catalasa, un mecanismo de defensa contra el estrés oxidativo típico de *S. aureus* (Javed et al., 2023). Por su parte, la prueba de coagulasa, marcada por la formación de coágulos, confirmó la capacidad de la bacteria para producir coagulasa libre, que transforma el fibrinógeno en fibrina, un rasgo específico de esta especie (Becker et al., 2020).

La Figura 7 muestra la disposición característica en racimos de *S. aureus*, similar a uvas, reflejo de la división celular en múltiples planos (Tong et al., 2020).

Figura 7.

Identificación de Colonia Bacteriana Mediante Tinción de Gram.

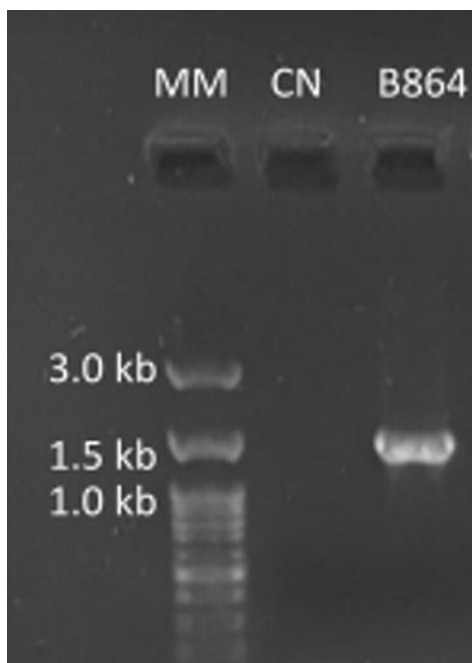


5.1.3 Identificación molecular de *S. aureus*

La muestra codificada como IDgen B864 fue analizada mediante la técnica de PCR dirigida al fragmento del gen 16S. En la Figura 8 del gel de agarosa al 1%, se observa una banda clara definida con un tamaño aproximado de 1500 pares de bases (pb), correspondiente al producto esperado. En la corrida electroforética, MM representa el marcador de peso molecular que sirvió como referencia, CN el control negativo (sin amplificación para descartar contaminación), y B864 mostró una amplificación específica de la muestra analizada, confirmando la fiabilidad del análisis (IDgen, 2025). La banda definida en el gel de agarosa al 1% indica una amplificación exitosa y específica, mientras que el control negativo sin amplificación descarta falsos positivos, reforzando la fiabilidad del examen (Woo et al., 2022).

Figura 8.

Identificación de Gel de Agarosa al 1% con Productos de PCR para el Fragmento 16S.



Nota. Adaptado de IDgen (2025).

Según el análisis de secuenciación, el fragmento amplificado presentó una identidad del 100% con la especie *Staphylococcus aureus*, confirmando su identificación molecular, esta información se detalla en la Tabla 6, validando la precisión de la secuenciación al alinearse con bases de datos genómicos (accesión CP123853.1).

Tabla 6.

Resultados de la Identificación Molecular de la Muestra B864.

Código Idgen	Muestra	Longitud	Organismo	% de identidad	N Accesoión
B864	Tubo CC	100.0	<i>Staphylococcus aureus</i>	100	CP123853.1

5.1.4 Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilks y Homogeneidad de Varianzas de Levene.

En la Tabla 7 se presentan los análisis estadísticos de normalidad (prueba de Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (test de Levene) aplicados a las variables de porcentaje de crecimiento e inhibición bacteria de los extractos de *E. globulus* y *S. rosmarinus*. Los valores de $p > 0.05$ en la prueba de normalidad sugieren una distribución normal de los datos, mientras que los valores de $p > 0.05$ en el test de Levene confirman la homogeneidad en las varianzas.

Tabla 7.

Prueba de Normalidad y Homogeneidad de Varianzas.

Variables				Shapiro_test		Levenne_test	
	Observaciones	Media	Desv. típica	W	p-value	F	p-value
% CRECIMIENTO BACTERIANO (<i>Eucalyptus globulus</i>)	18	36,010	20,266	0,982	0,969	0,677	0,649
% INHIBICIÓN BACTERIANA (<i>Eucalyptus globulus</i>)	18	63,754	20,067	0,962	0,649	0,834	0,550
% CRECIMIENTO BACTERIANO (<i>Salvia rosmarinus</i>)	18	38,461	18,357	0,965	0,699	0,537	0,745
% INHIBICIÓN BACTERIANA (<i>Salvia rosmarinus</i>)	18	61,539	18,357	0,965	0,699	0,537	0,745

Estos hallazgos son consistentes con estudios de actividad antimicrobiana de extractos vegetales, donde la normalidad y homogeneidad de los datos son esenciales para garantizar la robustez estadística (Mulyaningsih et al., 2018).

La baja variabilidad, al reflejar una desviación estándar de 18.357 y 20.266 indican una alta consistencia en las mediciones, atribuible a la estandarización de los ensayos de microdilución en caldo, el uso de etanol como solvente y la calibración del inóculo bacteriano (1.5×10^8 UFC/mL, escala McFarland 0.08-0.10 a 625 nm), que minimiza las interferencias en las mediciones de absorbancia (Do et al., 2019).

5.1.5 Variable Dependiente de Porcentaje de Crecimiento Bacteriano

5.1.5.1 Análisis de Varianza de la Variable Porcentaje de Crecimiento Bacteriano Mediante Aplicación de Dosis de Extracto Total de Eucalipto (*Eucalyptus globulus*).

Luego del análisis de varianza, en la Tabla 8, se evidencia una variación altamente significativa ($p < 0.0001$) entre las diferentes concentraciones evaluadas (dosis de extracto total de *E. globulus*) en la variable porcentaje de crecimiento bacteriano. El valor promedio de crecimiento bacteriano de *S. aureus* es de 36.010%. El coeficiente de

variación (CV) de 2.707%, sugiere una escasa variabilidad en los valores, en relación con la media.

Tabla 8.

Análisis de Varianza de Variable de Porcentaje de Crecimiento Bacteriano del Extracto Total de Eucalyptus globulus.

<i>Fuente</i>	<i>GL</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Cuadrados medios</i>	<i>F</i>	<i>Pr > F</i>	<i>p-values signification codes</i>
<i>Modelo</i>	5	6970,495	1394,099	1466,838	<0,0001	***
<i>Total, corregido</i>	17	6981,900				
<i>Tratamientos</i>	5	6970,495	1394,099	1466,838	<0,0001	***
<i>Error</i>	12	11,405	0,950			

Calculado contra el modelo Y=Media(Y)

*Signification codes: 0 < *** < 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05 < . < 0.1 < ° < 1*

Promedio (%) 36,010

CV (%) 2,707

El bajo CV refleja la alta precisión de mediciones, debido a la estandarización de la extracción y el uso de etanol como solvente, que optimiza la solubilidad de compuestos bioactivos como 1,8-cineol (Cimanga et al., 2019). Estos hallazgos presentan similitud con los reportados por Mulyaningsih et al. (2018), que documentaron diferencias significativas en el crecimiento bacteriano de *S. aureus* con extractos etanólicos de *E. globulus*, atribuyendo su actividad a 1,8-cineol.

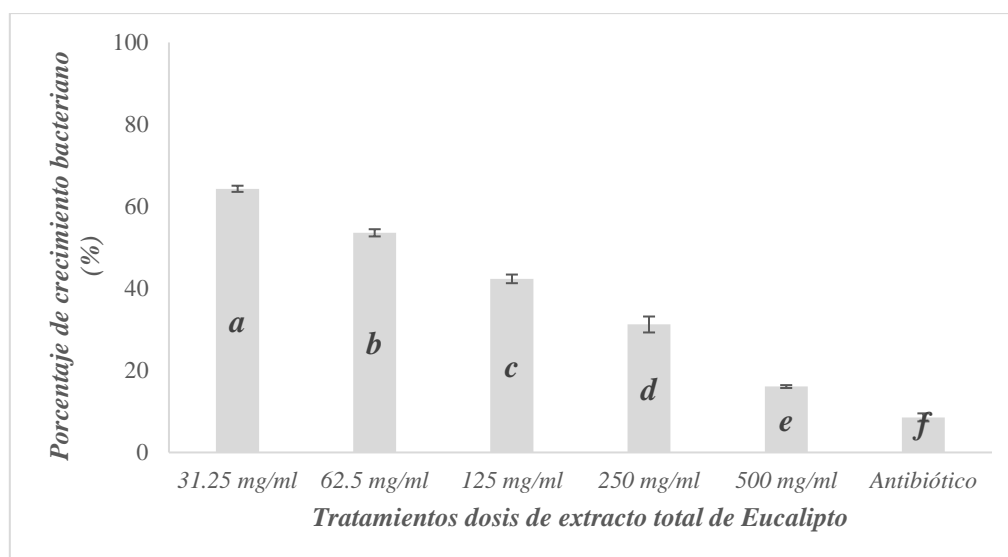
5.1.5.2 Comparación Múltiple de Promedio de la Variable Porcentaje de Crecimiento Bacteriano Mediante la Utilización de Extracto Total de *Eucalyptus globulus* Sobre la Bacteria *S. aureus*, Aislada de Bovinos con Mastitis.

La prueba de comparación múltiple de promedio mediante Tukey al 5%, muestra que existen 6 rangos de significancia, como se muestra en la Figura 9. Cada barra indica su grupo de significancia, representada por letra diferentes. El tratamiento que menor crecimiento bacteriano alcanzó fue el tratamiento en el que se aplicó antibiótico con un valor 8.557%, de los tratamientos en estudio del extracto total de *E. globulus* que menor porcentaje de crecimiento de *S. aureus* fue el tratamiento de 500 mg/mL; con un valor de 16.070%. En donde la concentración de 500 mg/mL perteneciente al grupo *e* refleja el

porcentaje con menor crecimiento. En el caso del antibiótico, identificado como *f* presentó la mejor capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano.

Figura 9.

Porcentaje de Crecimiento Bacteriano del Extracto Total de Eucalyptus globulus sobre S. aureus.



Reflejándose un aumento progresivo en el crecimiento bacteriano conforme se reducía la concentración del extracto, confirmando un efecto dependiente de la dosis. A la máxima concentración evaluada de 500 mg/mL se observó un crecimiento bacteriano de 16.07%, el cual aumentó a 31.21% a 250 mg/mL, 42.34% a 125 mg/mL, 53.57% a 62.5 mg/mL y 64.3% a 31.25 mg/mL. Esta relación dosis-respuesta indica que la actividad antimicrobiana del extracto disminuye conforme se reduce su concentración, fenómeno comúnmente descrito en estudios de compuestos antimicrobianos, donde la eficacia depende directamente de la dosis aplicada (Cushnie & Lamb, 2015).

Por otro lado, el antibiótico destacó al tener el menor crecimiento bacteriano, con un valor de 8.55%, evidenciado una eficacia superior al extracto total de *E. globulus*, no obstante, el extracto total presentó un valor significativo de inhibición de 84%, lo que sugiere un potencial antimicrobiano relevante, especialmente a concentraciones más altas. Los datos crudos de absorbancia utilizados para calcular estos porcentajes se presentan en el Anexo 16.

La relación dosis-dependiente, indica que el efecto antibacteriano se intensifica con mayores concentraciones, probablemente debido al 1,8-cineol, que altera la

permeabilidad estructural de la envoltura celular microbiana (Cimanga et al., 2019). Comparado con estudios previos, Mulyaningsih et al. (2018) reportaron un 78% de inhibición, equivalente a un 22% de crecimiento, ligeramente superior a nuestro 16.07% a 500 mg/mL.

Asimismo, la actividad antibacteriana observada coincide con investigaciones previas, en donde, Bachir & Benali (2012) reportaron que los componentes activos de *E. globulus* redujeron la proliferación de *S. aureus* hasta un 20% a concentraciones altas. Alvarado et al. (2019) observaron un crecimiento bacteriano de 22% con un extracto hidroalcohólico a 500 mg/mL, ligeramente superior al 16.07% aquí reportado, posiblemente por variaciones en la cepa bacteriana o la composición química del extracto, influenciada por el origen geográfico de la planta. Hualca & Meregildo (2021) indicaron un crecimiento bacteriano de 18 y 25% a concentraciones del 100% y 50%, reforzando la relación dosis-respuesta.

Además, Uriol & Espinoza (2019) reportaron un crecimiento de ~12% con un extracto etanólico al 100% frente a *S. aureus* resistente a oxaciclina, comparable al control positivo de vancomicina, que presentó un 10%, destacando el potencial del extracto en cepas específicas. Elangovan & Mudgil (2023) observaron un crecimiento reducido al 15% contra MRSA, subrayando su relevancia en contextos de resistencia antimicrobiana.

El uso de etanol como solvente optimizó la extracción de compuestos bioactivos, como el 1,8-cineol, terpenoides y fenoles, responsables de la actividad antibacteriana (Cimanga et al., 2019). La maceración dinámica empleada en este estudio maximizó el rendimiento al intensificar la interacción solvente-material vegetal, superando métodos estáticos (Ait-Ouazzou et al., 2011). La polaridad intermedia del etanol permitió solubilizar una amplia gama de metabolitos secundarios, a diferencia de solventes no polares como el hexano (Azmir et al., 2013).

5.1.5.3 Análisis de Varianza de la Variable Porcentaje de Crecimiento Bacteriano Mediante Aplicación de Dosis de Extracto Total de Romero (*Salvia rosmarinus*).

La Tabla 9 determina diferencias altamente significativas entre los distintos tratamientos evaluados (dosis de extracto total de *S. rosmarinus*), en la variable porcentaje de crecimiento bacteriano, en donde el valor promedio de los tratamientos en la variable antes mencionada es de 38.461 % en el crecimiento bacteriano de *S. aureus*. El CV se encuentra en el rango de 3.139 % respecto del promedio, indicando baja dispersión.

Tabla 9.

Análisis de Varianza de Variable de Porcentaje de Crecimiento Bacteriano del Extracto Total de Salvia rosmarinus.

<i>Fuente</i>	<i>GL</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Cuadrados medios</i>	<i>F</i>	<i>Pr > F</i>	<i>p-values signification codes</i>
<i>Modelo</i>	5	5710,911	1142,182	783,844	<0,0001	***
<i>Total corregido</i>	17	5728,397				
<i>Tratamientos</i>	5	5710,911	1142,182	783,844	<0,0001	***
<i>Error</i>	12	17,486	1,457			

Calculado contra el modelo Y=Media(Y)

*Signification codes: 0 < *** < 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05 < . < 0.1 < ° < 1*

Promedio (%) 38,461

CV (%) 3,139

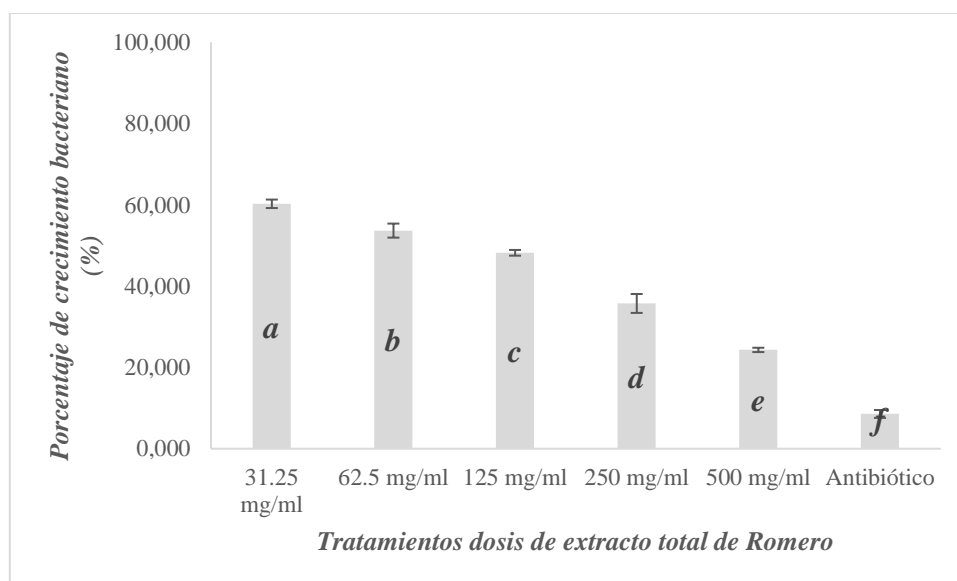
El ANOVA confirma que las dosis de *S. rosmarinus* tienen un efecto significativo en el crecimiento bacteriano. El ácido carnósico presentes en el extracto, inhiben la formación de biofilms y la expresión génica bacteriana, contribuyendo a su actividad antimicrobiana (Nakagawa et al., 2020). Estos resultados son consistentes con Jafari & Hossein (2019), quienes reportaron un 30% de crecimiento (70% de inhibición), ligeramente superior a nuestro 24.31% a 500 mg/mL.

5.1.5.4 Comparación Múltiple de Promedio de la Variable Porcentaje de Crecimiento Bacteriano Mediante la Utilización de Extracto Total de Romero (*Salvia rosmarinus*) Sobre la Bacteria *S. aureus*, Aislada de Bovinos con Mastitis.

Esta prueba mediante Tukey al 5% identificó la existencia de 6 rangos de significancia. Entre todos los tratamientos evaluados, el menor crecimiento bacteriano se observó en el tratamiento con antibiótico con un valor 8.557%, de los tratamientos en estudio del extracto total de *S. rosmarinus* que menor porcentaje de crecimiento de *S. aureus* fue el tratamiento de 500 mg/ml; con un valor de 24,313%.

Figura 10.

Porcentaje de Crecimiento Bacteriano del Extracto Total de Salvia rosmarinus sobre S. aureus.



Se refleja un aumento progresivo en el crecimiento a concentraciones menores, confirmando la relación dosis-dependiente. El tratamiento de 500 mg/mL, presentó un crecimiento bacteriano de 21,47 %, en el caso de 250 mg/mL aumentó al 32,96 %, a medida que las concentraciones disminuyeron el crecimiento aumentó progresivamente, 125 mg/mL con 48.21%, 62.5 mg/mL con 53.67% y 31.25 mg/mL con 60.26%.

Con respecto al crecimiento bacteriano del antibiótico empleado, se obtuvo un valor de 8.55%, presentando una mayor eficacia que el extracto de *S. rosmarinus*, no obstante, el resultado obtenido a 500 mg/mL es significativo al presentar una inhibición superior al 75%. Estos resultados concuerdan con estudios previos, Figueroa (2018)

reportó un crecimiento bacteriano de 30% para el aceite esencial de *S. rosmarinus* al 100%, significativamente mayor que el 10% de oxacilina, sugiriendo una menor potencia frente a antibióticos tradicionales.

Nakagawa et al. (2020) indicaron que extractos hidroalcohólicos de romero contienen compuestos de carnosol y ácido carnósico, que suprimen la regulación de genes clave y previenen la formación de biofilms en *S. aureus*, presentando resultados del 25% a concentraciones de 20 µg/mL, explicando la actividad observada a 500 mg/mL. Rodenas et al. (2018) observaron un crecimiento bacteriano de 40% al 25%, 35% al 50% y 22% al 75%, respaldando la relación dosis-respuesta.

González et al. (2023) reportaron un crecimiento de 18% con un extracto etanólico, clasificado como altamente sensible debido a compuestos fenólicos como el ácido carnósico. Además, un estudio de 2021 evaluó el extracto etanólico de *S. rosmarinus* a 30 mg/mL, contra *S. aureus* ATCC 25923, indicando una alta sensibilidad de esta cepa a los extractos de romero (Birtic et al., 2015). Sin embargo, Veenstra & Johnson (2021) sugieren que *S. rosmarinus* actúa principalmente como agente bacteriostático, lo que podría explicar su menor eficacia frente al antibiótico.

El etanol como solvente facilitó la obtención de compuestos fenólicos clave, especialmente el ácido carnósico y rosmarínico (Moreno et al., 2015).

5.1.6 Variable Dependiente de Inhibición Bacteriana

5.1.6.1 Análisis de Varianza de la Variable Porcentaje de Inhibición Bacteriana Mediante Aplicación de Dosis de Extracto Total de Eucalipto (*Eucalyptus globulus*).

En la Tabla 10 se observan diferencias altamente significativas para los tratamientos en estudio (dosis extracto total de *Eucalyptus globulus*), en esta variable de porcentaje de inhibición bacteriana se determinó que el valor promedio es de 63,754% y el coeficiente de variación de 1,580, respecto del promedio.

Tabla 10.

Análisis de Varianza de Variable de Porcentaje de Inhibición Bacteriana del Extracto Total de Eucalyptus globulus.

<i>Fuente</i>	<i>GL</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Cuadrados medios</i>	<i>F</i>	<i>Pr > F</i>	<i>p-values signification codes</i>
<i>Modelo</i>	5	6833,631	1366,726	1346,469	<0,0001	***
<i>Total corregido</i>	17	6845,811				
<i>Tratamientos</i>	5	6833,631	1366,726	1346,469	<0,0001	***
<i>Error</i>	12	12,181	1,015			

Calculado contra el modelo $Y=Media(Y)$

*Signification codes: 0 < *** < 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05 < . < 0.1 < ° < 1*

Promedio (%) 63,754

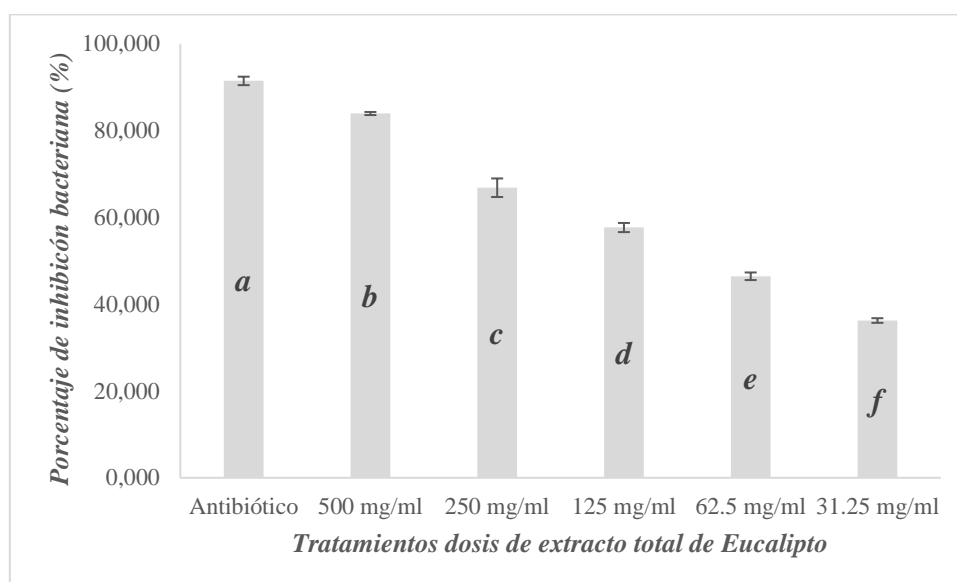
CV (%) 1,580

5.1.6.2 Comparación Múltiple de Promedio de la Variable Porcentaje de Inhibición Bacteriana Mediante la Utilización de Extracto Total de *Eucalyptus globulus* Sobre la Bacteria *S. aureus*, Aislada de Bovinos con Mastitis.

La Figura 11 determina que existen 6 rangos de significancia. La mayor eficacia inhibitoria se observó en el grupo tratado con antibiótico, alcanzando un valor de 91,443%, de los tratamientos en estudio del extracto total de *Eucalyptus globulus* que menor porcentaje de crecimiento de *S. aureus* fue el tratamiento de 500 mg/ml; con un valor de 83,930%.

Figura 11.

Porcentaje de Inhibición Bacteriana del Extracto Total de Eucalyptus globulus sobre S. aureus.



Se presenta una relación inversamente proporcional entre la concentración del extracto y su actividad antimicrobiana, observándose un patrón de disminución gradual, desde un 83.93% de inhibición a 500 mg/mL, seguido de 66.83% a 250 mg/mL, 57.66% a 125 mg/mL, 46.43% a 62.5 mg/mL hasta 36.23%. con 31.25 mg/mL con Al contrario, el antibiótico presentó un valor de 91.44%, destacando con una eficacia superior al extracto total de *E. globulus*, no obstante, el extracto total presentó un valor significativo de inhibición de 84%.

Estos hallazgos son consistentes con Escandón & Pavón (2023), quienes reportan una inhibición del 80% con aceites esenciales de *E. globulus* a concentraciones >75%, con mayor efectividad en extractos refinados.

Uriol & Espinoza (2019) observaron una inhibición de 85% con extractos etanólicos al 100%, sugiriendo que la actividad se mantiene independientemente del método de extracción, por la presencia de 1,8-cineol y terpenos. Sharma et al. (2024) reportaron una inhibición de 80%, destacando el efecto de disrupción en la membrana bacteriana. Yáñez & Cuadro (2014) identificaron a 1,8-cineol (43.36%) como un componente clave, logrando inhibiciones de 80-90% a concentraciones altas.

La alta inhibición a 500 mg/mL sugiere un potencial antimicrobiano relevante, especialmente contra cepas no resistentes. Las variaciones en los reportes científicos pueden atribuirse a variaciones en el perfil fitoquímico, influenciado por factores ambientales o métodos de extracción (Montero et al., 2019). El uso de etanol al 99% y la maceración dinámica garantizaron una eficiente recuperación de metabolitos bioactivos (Azmir et al., 2013).

5.1.6.3 Análisis de Varianza de la Variable Porcentaje de Inhibición Bacteriana Mediante Aplicación de Dosis de Extracto Total de Romero (*Salvia rosmarinus*).

En la Tabla 11 se observan diferencias altamente significativas entre los tratamientos evaluados (dosis extracto total de *Salvia rosmarinus*). Para la variable de porcentaje de inhibición bacteriana se determinó que el valor promedio es de 61.539% y el coeficiente de variación de 1.962, respecto del promedio.

Tabla 11.

Análisis de Varianza de Variable de Porcentaje de Inhibición Bacteriana del Extracto Total de Salvia rosmarinus.

<i>Fuente</i>	<i>GL</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Cuadrados medios</i>	<i>F</i>	<i>Pr > F</i>	<i>p-values signification codes</i>
<i>Modelo</i>	5	5710,911	1142,182	783,844	<0,0001	***
<i>Total corregido</i>	17	5728,397				
<i>Tratamientos</i>	5	5710,911	1142,182	783,844	<0,0001	***
<i>Error</i>	12	17,486	1,457			

Calculado contra el modelo $Y=Media(Y)$

*Signification codes: $0 < *** < 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05 < . < 0.1 < ^\circ < 1$*

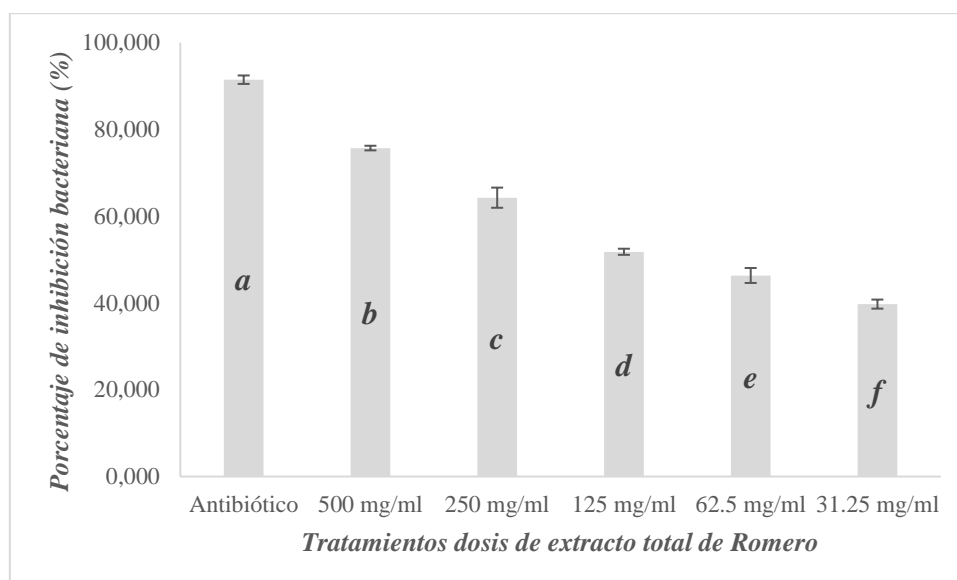
Promedio (%)	61,539
CV (%)	1,962

5.1.6.4 Comparación Múltiple de Promedio de la Variable Porcentaje Inhibición Bacteriana Mediante la Utilización de Extracto Total de *Salvia rosmarinus* Sobre la Bacteria *S. aureus*, Aislada de Bovinos de Leche con Mastitis.

En la Figura 12 se identifican 6 rangos de significancia. El mayor efecto inhibitorio fue el control positivo con antibiótico con un valor 91,443%, de los tratamientos en estudio del extracto total de *Salvia rosmarinus* que menor porcentaje de crecimiento de *S. aureus* fue el tratamiento de 500 mg/mL, con un valor de 75,687%.

Figura 12.

Porcentaje de Inhibición Bacteriana del Extracto Total de Salvia rosmarinus sobre S. aureus.



En lo que respecta a *S. rosmarinus*, una dosis de 500 mg/mL reflejó una inhibición bacteriana de 75.68%, en 250 mg/mL la inhibición disminuyó a 64.25%, 125 mg/mL con 51.79%, 62.5 mg/mL con 46.33% y 31.25 mg/mL con 39.73%., confirmando su dosis-respuesta al disminuir de forma progresiva. El antibiótico presentó mayor eficacia con una inhibición de 91.44%, no obstante, el extracto total presentó un valor significativo de inhibición de 75%.

González et al. (2023) reportaron una inhibición de 85% con extractos etanólicos, atribuida a compuestos fenólicos como el ácido carnósico. Abdellaoui et al. (2020) observaron una inhibición de 70% con aceites esenciales, sugiriendo que los extractos etanólicos son más efectivos debido a los fenoles.

Rodenas et al. (2018) confirmaron la relación dosis-respuesta con inhibiciones de 60% al 25%, 70% al 50% y 78% al 75%. El Euch et al. (2019) reportaron inhibiciones de 65–85% a concentraciones de 3,4 a 27 mg/mL, con una actividad dosis-dependiente similar.

Figueroa (2018) sugirió que *S. rosmarinus* podría usarse como coadyuvante en el manejo de infecciones causadas por *S. aureus*, reduciendo la dependencia de antibióticos y mitigando la resistencia antimicrobiana. Nakagawa et al. (2020) destacaron que el ácido carnósico inhibe la formación de biofilms, potenciando su uso en infecciones crónicas.

La menor eficacia frente al antibiótico (91,44%) apoya la hipótesis de un efecto bacteriostático (Veenstra & Johnson, 2021). El etanol y la maceración dinámica optimizan la obtención de principios activos (Azmir et al., 2013).

5.1.7 Uso de Etanol como Solvente para Extracción y Diluciones Seriadas

El etanol fue seleccionado como solvente para la extracción y dilución de los extractos de *E. globulus* y *S. rosmarinus* debido a su capacidad para solubilizar metabolitos secundarios bioactivos, como el 1,8-cineol y el ácido carnósico, y su compatibilidad con ensayos microbiológicos por su escasa toxicidad y volatilidad (Do et al., 2019). La maceración dinámica optimizó la extracción al aumentar la interacción entre el solvente y la muestra vegetal, mejorando el rendimiento de compuestos activos (Azmir et al., 2013) La polaridad del etanol con un índice 5.2 permitió extraer tanto compuestos polares como no polares, superando a solventes como el agua o el hexano (Moreno et al., 2015).

Las diluciones seriadas garantizaron la estabilidad de los compuestos activos, permitiendo una evaluación precisa de la relación dosis-respuesta, al compararlo con otros solventes, el etanol ofrece ventajas en seguridad y practicidad, siendo biodegradable y de bajo costo, lo que lo hace ideal para aplicaciones farmacológicas y veterinarias (Do et al., 2019). Estudios como Sharma et al. (2024) y González et al. (2023) respaldan el uso de etanol para obtener extractos antimicrobianos eficientes.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

- Los extractos obtenidos de *Eucalyptus globulus* y *Salvia rosmarinus* demostraron una actividad antimicrobiana significativa contra *Staphylococcus aureus* aislado de muestras de leche procedentes de bovino afectados por mastitis. La concentración de 500 mg/mL fue la más efectiva, con *E. globulus* logrando una inhibición bacteriana del 83,93% (crecimiento bacteriano del 16,07%), mientras que *S. rosmarinus* logró un 75,68% (crecimiento bacteriano del 12,15%). Estos resultados destacan el potencial de sus compuestos activos, como el 1,8-cineol en *E. globulus* y el ácido carnósico en *S. rosmarinus*, que afectan la integridad de la membrana bacteriana y los procesos metabólicos bacterianos, respectivamente, posicionándolos como alternativas prometedoras para el manejo de mastitis bovina.
- Los extractos de *E. globulus* y *S. rosmarinus* mostraron actividad antimicrobiana en el rango de concentraciones evaluado (31.25 a 500 mg/mL), con una relación dosis-dependiente evidente. La concentración de 500 mg/mL demostró ser la más eficaz para ambas especies.
- El uso de antibiótico exhibió mayor eficacia antibacteriana, con una inhibición bacteriana superior del 91,44% (crecimiento bacteriano del 8,55%), superando a ambos extractos en todas las concentraciones. No obstante, a 500 mg/mL, *E. globulus* (83,93% de inhibición) y *S. rosmarinus* (75,68% de inhibición) exhibieron una actividad antimicrobiana prometedora, sugiriendo su potencial como complementos al tratamiento convencional para reducir la dependencia de antibióticos y mitigar el riesgo de resistencia bacteriana, gracias a la acción de compuestos como el 1,8-cineol y el ácido carnósico.

CAPÍTULO VII

RECOMENDACIONES

- Se sugiere realizar estudios analíticos, mediante técnicas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), para aislar y evaluar la contribución individual del 1,8-cineol (*E. globulus*) y el ácido carnósico (*S. rosmarinus*) a la actividad antimicrobiana observada. Esto permitirá esclarecer sus mecanismos de acción y optimizar su uso en formulaciones terapéuticas
- Se propone implementar un esquema terapéutico rotatorio que combine antibióticos con extractos de *E. globulus* y *S. rosmarinus* en el tratamiento de mastitis recurrente en bovinos, esta estrategia podría disminuir el uso prologado de antibióticos, disminuyendo el riesgo de resistencia bacteriana, y aprovechar la actividad antimicrobiana de los compuestos vegetales.
- Se recomienda aplicar las mismas concentraciones evaluadas en este estudio (rango de 500 mg/mL a 31.25 mg/mL) optimizando los intervalos de evaluación en intervalos cortos (cada 6-8 horas) para determinar el tiempo óptimo de reaplicación que mantenga la inhibición bacteriana sin permitir el crecimiento bacteriano.
- Se recomienda evaluar los extractos contra cepas clínicas de MRSA para evaluar su eficacia en escenarios de resistencia aplicándose in vivo en casos de mastitis bovina y consolidar la evidencia científica generada en este estudio y explorar su potencial aplicación.

CAPÍTULO VIII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdellaoui, M., Derouich, M., & El-Rhaffari, L. (2020). Essential oil and chemical composition of wild and cultivated fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.): A comparative study. *South African Journal of Botany*, 135, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.09.004>
- Aiemsraad, J., Aiumlamai, S., Aromdee, C., Taweechaisupapong, S., & Khunkitti, W. (2011). The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their mechanisms of action on *Staphylococcus aureus* DMST 4745. *Research in Veterinary Science*, 91(1), e31–e37. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.01.012>
- Ait-Ouazzou, A., Lorán, S., Bakkali, M., Laglaoui, A., Rota, C., Herrera, A., Pagán, R., & Conchello, P. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Thymus algeriensis*, *Eucalyptus globulus* and *Rosmarinus officinalis* from Morocco. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(14), 2643–2651. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4505>
- Akinboye, A. O., Makhubu, F. N., Karzis, J., Petzer, I. M., & McGaw, L. J. (2024). In vitro antibiofilm and quorum sensing inhibition activities of selected South African plants with efficacy against bovine mastitis pathogens. *South African Journal of Botany*, 166, 455–465. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2024.01.055>
- Almas, I., Innocent, E., Machumi, F., & Kisinza, W. (2021). Chemical composition of essential oils from *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus maculata* grown in Tanzania. *Scientific African*, 12. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2021.e00758>
- Alvarado, J., Vásquez, V., Vergara, M., & Santa, C. (2019). Efecto del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* L. sobre *Staphylococcus aureus*. *Revista Experiencia en Medicina del Hospital Regional Lambayeque*, 5(3), 119-125. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=9031687>
- Amaya, D. (2018). Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* (eucalipto), sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 comparado con oxacilina

[Universidad César Vallejo].
<http://repositorio.ucsg.edu.ec/bitstream/3317/10053/1/T-UCSG-PRE-MED-ENF413.pdf>

Antezana, B. (2017). *Obtención de aceite esencial e hidrolato de hierbabuena (Menta spicata) mediante el proceso de destilación por arrastre con vapor* [Tesis de Grado, Universidad Mayor de San Andrés].
<https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/13582/EG-1911-Antezana%20Ruiz,%20Bryant%20Fabian.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Argudín, M. Á., Mendoza, M. C., & Rodicio, M. R. (2010). Enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* en alimentos. *Toxins*, 2(7), 1751–1773. <https://doi.org/10.3390/toxins2071751>

Argudo, D., Piña, M., & Neira, C. (2019). *Staphylococcus aureus*: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. *Nova*, 17(32), 25-38.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702019000200025

Asanza, S., Castillo, J., Calderón, C., Loaiza, S., Acosta, A., & Zuñiga, L. (2024). Identificación de Bacterias Gram positivas en muestras de leche cruda, obtenida por ordeño manual. *Alfa Revista de Investigación en Ciencias Agronómicas y Veterinaria*, 8(22), 69-83. <https://doi.org/10.33996/revistaalfa.v8i22.249>

Ashraf, A., & Imran, M. (2018). Diagnosis of bovine mastitis: From laboratory to farm. *Tropical Animal Health and Production*, 50(6), 1193-1202.
<https://doi.org/10.1007/s11250-018-1629-0>

Avellán Vélez, R. H., Zambrano Aguayo, M. D., De La Cruz Veliz, L. M., Cedeño Palacios, C. A., Delgado Demera, M. H., Rezabala Zambrano, P. F., & Macías Moreira, Y. A. (2019). Prevalencia de mastitis subclínica en el ganado bovino, mediante la prueba California Mastitis Test, en el cantón Rocafuerte de la provincia Manabí, Ecuador. *Revista Amazónica. Ciencia Y Tecnología*, 8(1), 62–70.
<https://doi.org/10.59410/RACYT-v08n01ep06-0108>

Azmi, K., Qrei, W., & Abdeen, Z. (2019). Screening of genes encoding adhesion factors and biofilm production in methicillin resistant strains of *Staphylococcus aureus* isolated from Palestinian patients. *BMC Genomics*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5929-1>

- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, *117*(4), 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Azwanida, N. N. (2015). Una revisión de los métodos de extracción de plantas medicinales, principios, ventajas y limitaciones. *Plantas Medicinales y Aromáticas*, *4*(3), 196. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Bachir, R. G., & Benali, M. (2012). Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *2*(9), 739–742. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60220-2](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60220-2)
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, *6*(2), 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Barbosa, L. N., da Silva, P. C., da Silva, T. M., Camargo, M. M., & de Almeida, M. T. G. (2016). Actividad antimicrobiana del aceite de *Eucalyptus globulus*, xilitol y papaína contra *Staphylococcus aureus*. *Industrial Crops and Products*, *89*, 481–486. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.05.053>
- Bardales, W., Maicelo, J. & Corroto, F. (2020). Plantas usadas en la medicina tradicional veterinaria de los bosques montanos del norte de Perú: aspectos socioeconómicos y transmisión del conocimiento. *Rev Inv Vet*, *31*(2). <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i2.16325>
- Barkema, H. W., Schukken, Y. H., & Zadoks, R. N. (2015). Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Science*, *98*(6), 3845–3866. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8847>
- Becker, K., Schaumburg, F., & Peters, G. (2020). *Staphylococcus aureus*: Molecular and clinical aspects of an emerging pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, *33*(4), e00079-20. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-9085>

- Bedruddin, M. (2023). Review on mastitis and public health importance of mastitis causing pathogens in raw milk from Mastitis infected dairy goat. *PREPRINT*, 1. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3168508/v1>
- Bilia, A. R., Guccione, C., Isacchi, B., Righeschi, C., Firenzuoli, F., & Bergonzi, M. C. (2014). Essential oils loaded in nanosystems: A developing strategy for a successful therapeutic approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 651593. <https://doi.org/10.1155/2014/651593>
- Biogénesis-Bagó. (2021). Shotapen L.A.: Antibiótico en suspensión inyectable. *Vademecum Sani*. Recuperado el 15 de julio de 2025, de https://www.sani.com.ar/producto.php?id_producto=6333
- Birtic, S., Dussort, P., Pierre, F. X., Bily, A. C., & Roller, M. (2015). Ácido carnósico. *Phytochemistry*, 115, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.12.026>
- Botaro, B. G., Cortinhas, C. S., Dibbern, A. G., e Silva, L. F. P., Benites, N. R., & dos Santos, M. V. (2015). Staphylococcus aureus intramammary infection affects milk yield and SCC of dairy cows. *Tropical Animal Health and Production*, 47(1), 61–66. <https://doi.org/10.1007/s11250-014-0683-5>
- Bravo, J., Medina, J., Bajaña, A., & Párraga, J. (2024). Mastitis subclínica con su impacto económico en hatos bovinos de doble propósito. *Conocimiento Global*, 9(2), 232-243. <https://doi.org/10.70165/cglobal.v9i2.416>
- Brglez, E., Knez, M., Škerget, M., Knez, Ž. & Bren, U. (2016). Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *In Molecules*, 21(7): 901. <https://doi.org/10.3390/molecules21070901>
- Bruno, D. R., Cleale, R. M., Overton, M. W., Short, T., Pedraza, J. R., & Wallace, R. (2024). Financial implications of treating nonsevere gram-negative clinical mastitis in 3 California dairies. *Journal of Dairy Science*, 107(5), 2899-2910. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-24012>
- Bujňáková, D., & Karahutová, L. (2024). Molecular characteristics and antibiotic resistance of Staphylococcus aureus and Staphylococcus haemolyticus isolated from bovine mastitis. *Research in Veterinary Science*, 177. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2024.105365>

- Castaño, H., Ciro, G., Zapata, J. & Jiménez, S. (2010). Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre algunas bacterias de interés alimentario. *Vitae*, 17 (2). http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042010000200006
- Chakraborty, S., Dhama, K., Tiwari, R., Yattoo, M. I., Khurana, S. K., & Khandia, R. (2019). Technological interventions and advances in the diagnosis of intramammary infections in animals with emphasis on bovine population-a review. *Veterinary Quarterly*, 39(1), 76-94. <https://doi.org/10.1080/01652176.2019.1642546>
- Chamorro, P. (2023). *Caracterización Microbiológica y Molecular de la bacteria Staphylococcus aureus aislada de la mastitis bovina y determinación de su incidencia económica en los productores de leche de la Provincia del Carchi-Ecuador* [Tesis de Grado, Pontificia Universidad Católica del Ecuador]. <https://repositorio.puce.edu.ec/handle/123456789/42768>
- Cheng, W. N., & Han, S. G. (2020). Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments-A review. *Asian Australasian Association of Animal Production Societies*, 33, (11), 1699–1713. <https://doi.org/10.5713/ajas.20.0156>
- Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., De Bruyne, T., Hermans, N., ... & Pieters, L. (2019). Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(2), 213–220. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00384-1](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00384-1)
- Corrales, L., & Caycedo, L. (2020). Principios físicoquímicos de los colorantes utilizados en microbiología. *Nova*, 18(33), 73-100. <https://doi.org/10.22490/24629448.3701>
- Craft, K. M., Nguyen, J. M., Berg, L. J., & Townsend, S. D. (2019). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Antibiotic-resistance and the biofilm phenotype. *MedChemComm*, 10(8), 1231–1241. <https://doi.org/10.1039/c9md00044e>
- Cremonesi, P., Ceccarani, C., Curone, G., Severgnini, M., Pollera, C., Bronzo, V., ... & Moroni, P. (2018). Milk microbiome diversity and bacterial group prevalence in a comparison between healthy Holstein Friesian and Rendena cows. *PLOS ONE*, 13(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205054>

- Crombé, F., Argudín, M. A., Vanderhaeghen, W., Hermans, K., Haesebrouck, F., & Butaye, P. (2013). Transmission and genetic diversity of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Veterinary Microbiology*, *162*(2–4), 344–352. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.09.030>
- Cushnie, T. P., & Lamb, A. J. (2015). Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *38*(2), 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.02.014>
- de Oliveira, J. R., Camargo, S. E. A., & de Oliveira, L. D. (2019). *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) as therapeutic and prophylactic agent. *Journal of Biomedical Science*, *26*(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0499-8>
- Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., & Ju, Y. H. (2019). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*, *22*(3), 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.11.001>
- Duarte, A. S., Jiménez, J. A., Pineda, J., González, C. A., & García, M. (2020). Extracción de sustancias bioactivas de *Pleurotus ostreatus* (Pleurotaceae) por maceración dinámica. *Acta Biológica Colombiana*, *25*(1), 61-74. <https://doi.org/10.15446/abc.v25n1.72409>
- Duquesne, A., Castro, N., Monzote, A., & Paredes, I. (2015). Caracterización de aislamientos de *Staphylococcus aureus* comunitarios en muestras purulentas. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, *31*(3) Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21252015000300004&lng=es&tlng=es.
- El Euch, S. K., Hassine, D. B., Cazaux, S., Bouzouita, N., & Bouajila, J. (2019). *Salvia officinalis* essential oil: Chemical analysis and evaluation of anti-enzymatic and antioxidant bioactivities. *South African Journal of Botany*, *120*, 253–260. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.07.010>
- Elangovan, S., & Mudgil, P. (2023). Propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* contra el SARM: una revisión sistemática. *Antibióticos*, *12*(3), 474. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030474>

- Elshikh, M., Ahmed, S., Funston, S., Dunlop, P., McGaw, M., Marchant, R., & Banat, I. M. (2016). Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnology Letters*, 38(6), 1015-1019. <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2079-2>
- Escandón, J. & Pavón, J. (2023). *Determinación la actividad antimicrobiana del aceite esencial de Eucalyptus globulus, frente a Staphylococcus aureus*. Repositorio de Universidad Católica de Cuenca. <https://dspace.ucacue.edu.ec/handle/ucacue/15569>
- Espinoza, M., & Mier, J. (2013) *Determinación de la prevalencia de mastitis mediante la prueba California Mastitis Test e identificación y antibiograma del agente causal en ganaderías lecheras del cantón El Chaco, provincia del Napo* [Tesis de Grado, Universidad Central del Ecuador]. <https://www.dspace.uce.edu.ec/server/api/core/bitstreams/bb6385fa-3566-4fde-a5b5-ae95180a60d9/content>
- Faul, F., Erdfelder, E., Lang, A.-G., & Buchner, A. (2007). G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods*, 39(2), 175-191. <https://doi.org/10.3758/BF03193146>
- Figuroa Díaz, B. P. (2018). Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* “Romero” sobre *Staphylococcus aureus* comparado con Oxacilina. ALICIA. <https://hdl.handle.net/20.500.12692/25402>
- Flores, E., Sáenz, A., Castañeda, A. O., & Narro, R. I. (2020). Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): su origen, importancia y generalidades de sus metabolitos secundarios. *TIP*, 23, e20200266. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.266>
- Foster, T. J., Geoghegan, J. A., Ganesh, V. K., & Höök, M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: The many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Microbiology*, 12(1), 49–62. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3161>
- Fraunholz, M. J., & Sinha, B. (2012). Intracellular *Staphylococcus aureus*: Live-in and let die. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 43. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00043>
- Gonçalves, J. L., Kamphuis, C., Martins, C., Barreiro, J. R., Tomazi, T., Gameiro, A. H., Hogeveen, H., & dos Santos, M. V. (2018). Bovine subclinical mastitis reduces milk

- yield and economic return. *Journal of Dairy Science*, *100*(12), 10381–10397. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12869>
- González, R., Romero, V., Hernández, A., & Morales, M. (2023). Susceptibilidad antibacteriana in vitro de *Staphylococcus aureus* frente a extractos etanólicos de *Rosmarinus officinalis* y *Menta arvensis* cultivadas en Cuba. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, *28*(2). <https://revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/download/1433/520/7011>
- Hassanpour, H., Fallah, A. A., Farhadi, N., Ameri, R., & Kaewduangta, W. (2025). Effect of *Rosmarinus officinalis* supplementation on productive performance and egg quality traits in laying hens: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Agriculture and Food Research*, *19*. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2025.101659>
- He, W., Ma, S., Lei, L., He, J., Li, X., Tao, J., Wang, X., Shikai, C., Wang, Y., Shen, J., Cai, C., & Wu, C. (2020). Prevalencia, etiología e impacto económico de la mastitis clínica en las grandes granjas lecheras de China. *Microbiología Veterinaria*, *242*. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.108570>
- Heikkila, A. M., Nousiainen, J. I., & Pyörälä, S. (2012). Costs of clinical mastitis with special reference to premature culling. *Journal of Dairy Science*, *95*(1), 139–150. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4321>
- Hoch, C. C., Petry, J., Griesbaum, L., Weiser, T., Werner, K., Ploch, M., Verschoor, A., Multhoff, G., Bashiri Dezfouli, A., & Wollenberg, B. (2023). 1,8-cineole (eucalyptol): A versatile phytochemical with therapeutic applications across multiple diseases. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *117*, 115467. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115467>
- Hualca, M. & Meregildo, I. (2021). *Actividad antibacteriana del aceite esencial de Eucalyptus globulus (eucalipto) sobre Staphylococcus aureus* [Universidad Roosevelt]. <https://hdl.handle.net/20.500.14140/550>
- Instituto de Normas Clínicas de Laboratorio [CLSI]. (2018). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically* (11th ed.). CLSI standard M07.
- Instituto Nacional de Estadística y Censos [INEC]. (2024). *Boletín técnico. Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC)*. Ecuador en Cifras.

https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/2023/Boletin_tecnico_ESPAC_2023.pdf

- Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias [INIAP]. (2021). *Manual de buenas prácticas lecheras para pequeños productores*. <https://www.iniap.gob.ec>
- Islam, M. M., Hossain, M. I., Islam, M. S., Azam, M. G., & Sultana, S. (2025). Prevalence, antibiotic resistance patterns, and virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis in northern Bangladesh. *Heliyon*, *11*(3). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2025.e42107>
- Ivanova, S., Nalbantova, V., Benbassat, N., Dzhoglova, V., Dzhakova, Z., Koleva, N., Vasilev, V., Grekova, D., & Ivanov, K. (2025). Comparison between the chemical composition of essential oils isolated from biocultivated *Salvia rosmarinus* Spenn. (*Rosmarinus officinalis* L.) and some commercial products. *Pharmacia*, *72*, 1-13. <https://doi.org/10.3897/pharmacia.72.e140155>
- Jafari, A., & Hossein, P. (2019). Antimicrobial effects of *Rosmarinus officinalis* methanolic extract on *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in laboratory conditions. *Journal of Medicinal and Chemical Sciences*, *2*(2), 103–108.
- Jamali, H., Barkema, H. W., Jacques, M., Lavallée-Bourget, E. M., Malouin, F., Saini, V., ... & Dufour, S. (2018). Invited review: Incidence, risk factors, and effects of clinical mastitis recurrence in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *101*(6), 4729–4746. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13730>
- Javed, S., Javaid, A., & Nawaz, S. (2023). Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*: Mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *78*(3), 567–579. <https://doi.org/10.1093/jac/dkac456>
- Jiang, Y. M., Wang, Z. J., Tang, D. M., Huang, H., Shi, Y. Z., Zhu, Y. Y., & Luo, X. D. (2025). *Eucalyptus globulus* residues inhibiting both MRSA and VRE in vitro and in vivo. *Industrial Crops and Products*, *226*. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2025.120725>
- Kacaniova, M., Cmikova, N., Vukovic, N., Ban, Z., Bianchi, A., Garzoli, S., Ben, R., Ben, A., Elizondo, J. & Vukic, M. (2024). *Eucalyptus globulus* essential oil as food preservative: Chemical composition, antimicrobial (in vitro and in situ), antibiofilm

- and insecticidal potential. *South African Journal of Botany*, 175, 228-240. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2024.10.022>
- Karlsnose, S., Kunstmann, L., Rundle, C. F., Krogh, K., Larsen, H. K. D., Jensen, A. B., & Damborg, P. (2013). External quality assurance system (EQAS) for identification of mastitis pathogens in Denmark from 2006 to 2011. *Preventive Veterinary Medicine*, 111(3-4), 271-277. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.05.016>
- Li, L., Yu, L., Wang, J., Gao, Y., & Wang, Y. (2015). Actividad antibacteriana del 1,8-cineol contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. *Journal of Essential Oil Research*, 27(4), 329–335. <https://doi.org/10.1080/10412905.2015.1045086>
- López, J. (2022). *Efecto del aceite de orégano sobre la productividad, fermentación ruminal y calidad de la leche en cabras lecheras* [Tesis de Maestría en Ciencia Animal, Universidad Autónoma de Nueva León]. <http://eprints.uanl.mx/23158/1/1080250581.pdf>
- Martínez, G. & Jiménez, D. (2017). Plantas de interés veterinario en la cultura campesina de la Sierra de Ancasti (Catamarca, Argentina). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 16(4):329-346. <https://www.redalyc.org/pdf/856/85651256001.pdf>
- Melchior, M. B., Vaarkamp, H., & Fink-Gremmels, J. (2023). Biofilms and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* mastitis. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 12(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s13756-023-01234-5>
- Ministerio de Agricultura y Ganadería [MAG]. (2022). *Plan Nacional del Sector Lácteo 2022-2030*. <https://www.agricultura.gob.ec>
- Miranda, R. E., Rojas, V., & Ramírez, A. (2015). Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* in dairy products in Mexico. *Journal of Food Protection*, 78(10), 1867–1873. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-129>
- Molineri, A. I., Camussone, C. M., Zbrun, M. V., Suárez Archilla, G., Cristiani, M., Neder, V., Calvino, L. F., & Signorini, M. L. (2021). Antimicrobial resistance and biofilm formation of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 75, 101626. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2021.101626>

- Monistero, V., Graber, H. U., Pollera, C., Cremonesi, P., Castiglioni, B., Bottini, E., Ceballos-Marquez, A., Lasso-Rojas, L., Kroemker, V., Wentz, N., Petzer, I.-M., Santisteban, C., Runyan, J., Veiga dos Santos, M., Alves, B. G., Piccinini, R., Bronzo, V., Abbassi, M. S., Said, M. B., & Moroni, P. (2018). *Staphylococcus aureus* Isolates from Bovine Mastitis in Eight Countries: Genotypes, Detection of Genes Encoding Different Toxins and Other Virulence Genes. *Toxins*, *10*(6), 247. <https://doi.org/10.3390/toxins10060247>
- Montero, M., Morocho, M., Avilés, D., Carrasco, A., & Ramiro, E. (2019). Eficacia antimicrobiana del aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus* spp) sobre cepas de *E. coli* y *Staphylococcus aureus*. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, *30*(2), 932-938
- Mora, M. (2023). *Determinación de la presencia de Staphylococcus aureus y su prevalencia en fincas productoras de leche en la provincia de Imbabura* [Tesis de Grado, Pontificia Universidad Católica del Ecuador]. <https://repositorio.puce.edu.ec/handle/123456789/42771>
- Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C. S., & Vojnov, A. A. (2015). Actividades antioxidantes y antimicrobianas de extractos de romero relacionadas con su composición de polifenoles. *Free Radical Research*, *40*(2), 223–231. <https://doi.org/10.1080/10715760500473865>
- Mulyaningsih, S., Sporer, F., Zimmermann, S., Reichling, J., & Wink, M. (2018). Propiedades sinérgicas de los terpenoides aromadendreno y 1,8-cineol del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* contra bacterias resistentes a antibióticos. *Phytomedicine*, *17*(13), 1061–1066. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.06.018>
- Nakagawa, S., Hillebrand, G. G., & Núñez, G. (2020). *Rosmarinus officinalis* L. (romero) extracts containing carnosic acid and carnosol are potent quorum sensing inhibitors of *Staphylococcus aureus* virulence. *Antibiotics*, *9*(4), 149. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040149>
- National Mastitis Council. (2017). *Laboratory handbook on bovine mastitis* (3rd ed.). NMC.
- Nieto, G., Ros, G., & Castillo, J. (2018). Propiedades antioxidantes y antimicrobianas del romero (*Rosmarinus officinalis*, L.): Una revisión. *Medicines*, *5*(3), 98. <https://doi.org/10.3390/medicines5030098>

- Nobrega, D. B., De Buck, J., & Barkema, H. W. (2018). Antimicrobial resistance in non-aureus staphylococci isolated from milk is associated with systemic but not intramammary administration of antimicrobials in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 101(8), 7425–7436. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14540>
- Nolazco, D., Villanueva, E., Hatta, B., & Tellez, L. (2020). Extracción y caracterización química del aceite esencial de eucalipto obtenido por microondas y ultrasonido. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 22(3), 274-284. <https://doi.org/10.18271/ria.2020.661>
- Ojeda, A. M., van Baren, C. M., Elechosa, M. A., Juárez, M. A., & Moreno, S. (2013). Nuevas perspectivas sobre las actividades antibacterianas y antioxidantes de los aceites esenciales de romero y sus componentes principales. *Food Control*, 31(1), 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.022>
- Oliveira, R., Pinho, E., Almeida, G., Azevedo, N. F., & Almeida, C. (2022). Prevalence and diversity of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw milk from Northern Portugal. *Frontiers in Microbiology*, 13, 846653. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.846653>
- Oliver, S. P., & Murinda, S. E. (2012). Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. *In Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 28(2), 165–185. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.03.005>
- Otto, M. (2013). Staphylococcal infections: Mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annual Review of Medicine*, 64, 175–188. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-042711-140023>
- Palacios, T. A., Chamorro, S. E., & Jaramillo, J. (2019). Valoración económica ambiental, producción de biomasa y carbono de un bosque nativo andino, frente a plantaciones forestales *Eucalyptus globulus* y *Pinus patula*, en la provincia de Loja. *FIGEMPA: Investigación y Desarrollo*, 7(1), 25–31. <https://doi.org/10.29166/revfig.v1i1.1801>
- Pasachova, J., Ramírez, S., & Muñoz, L. (2019). *Staphylococcus aureus*: generalidades, mecanismo de patogenicidad y colonización celular. *Nova*, 17(32): 25-38. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702019000200025&lng=en

- Paz, J. E. W., Contreras, C. R., Munguía, A. R., Aguilar, C. N., & Inungaray, M. L. C. (2018). Phenolic content and antibacterial activity of extracts of *Hamelia patens* obtained by different extraction methods. *Brazilian Journal of Microbiology*, *49*(3), 656–661. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.09.003>
- Pietrocola, G., Campoccia, D., & Speziale, P. (2017). Proteases of *Staphylococcus aureus* in tissue invasion and immune evasion. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 150. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00150>
- Poutrel, B., Bareille, N., & Lequeux, G. (2018). Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, *219*, 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.04.023>
- Puerto, M. A., Shepley, E., Cue, R. I., Warner, D., Dubuc, J., & Vasseur, E. (2021). The hidden cost of disease: I. Impact of the first incidence of mastitis on production and economic indicators of primiparous dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *104*(7), 7932–7943. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19584>
- Rahman, M. M., Gibbons, S., & Sarker, S. D. (2022). Quality control of herbal extracts: Standardization of ethanolic extracts from aromatic plants using maceration and ultrasound-assisted extraction. *Molecules*, *27*(17), 5492. <https://doi.org/10.3390/molecules27175492>
- Rainard, P., Foucras, G., & Fitzgerald, J. R. (2018). Knowledge gaps and research priorities in *Staphylococcus aureus* mastitis control. *Transboundary and Emerging Diseases*, *65*(S1), 149–165. <https://doi.org/10.1111/tbed.12817>
- Razzok, M., Mekhfi, H., Abda, N., Lekfif, A., Dahbi, N., & Bentata, Y. (2025). Uso de plantas medicinales por pacientes de un hospital universitario marroquí: un estudio transversal. *Revista Avances en Medicina Integrativa*. <https://doi.org/10.1016/j.aimed.2025.100487>
- Rodenas Egoavil, D. C., & Rodríguez Valqui, A. (2018). *Efecto antibacteriano del extracto etanólico de Rosmarinus officinalis L. (romero) en cultivos de Staphylococcus aureus: Estudio in vitro* [Tesis de grado, Universidad Inca Garcilaso de la Vega]. Repositorio institucional UIGV. <http://repositorio.uigv.edu.pe/handle/20.500.11818/2632>

- Rodríguez, Z., Cabrera, V. E., Hogeveen, H., & Ruegg, P. L. (2024). Economic impact of subclinical mastitis treatment in early lactation using intramammary nisin. *Journal of Dairy Science*, *107*(7), 4634–4645. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-24311>
- Rossi, R. S., Amarante, A. F., Correia, L. B. N., Guerra, S. T., Nobrega, D. B., & Langoni, H. (2018). Diagnostic accuracy of Somaticell, California Mastitis Test, and microbiological examination of composite milk to detect *Streptococcus agalactiae* intramammary infections. *Journal of Dairy Science*, *101*(11), 10220-10229. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14672>
- Roy, J. P., & Keefe, G. (2012). Systematic review: What is the best antibiotic treatment for *Staphylococcus aureus* intramammary infection of lactating cows? *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, *28*(2), 197–211. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.03.006>
- Ruegg, P. L. (2017). A 100-year review: Mastitis detection, management, and prevention. *Journal of Dairy Science*, *100*(12), 10381–10397. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13023>
- Sánchez, R., Fernández, M. & Nolasco, S. (2015). *Aceite de canola: Estudio exploratorio de extracción con etanol* [Tesis de Grado, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires]. https://www.aaiq.org.ar/SCongresos/docs/06_029/papers/05a/05a_1772_618.pdf
- Santos, F. A., Silva, R. M., Campos, A. R., de Araújo, R. P., Lima Júnior, R. C. P., & Rao, V. S. N. (2018). 1,8-Cineol (eucaliptol), un óxido de monoterpene, atenúa el daño colónico en ratas con colitis aguda por TNBS. *Food and Chemical Toxicology*, *62*, 527–533. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.09.031>
- Satoh, T., McKercher, S. R., & Lipton, S. A. (2013). Acciones antioxidantes mediadas por Nrf2/ARE de fármacos pro-electrofílicos. *Free Radical Biology and Medicine*, *65*, 645–657. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.022>
- Scherr, T. D., Heim, C. E., Morrison, J. M., & Kielian, T. (2014). *Staphylococcus aureus* biofilms induce macrophage dysfunction through leukocidin AB and alpha-toxin. *Bio*, *5*(5), e01021-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01021-14>
- Sharma, D., Bose, D., Yadav, R., Mehta, J. & Jaiswal, A. (2024). Exploración de los fitoquímicos del *Eucalyptus globulus*: investigaciones analíticas, antibacterianas y de

- acoplamiento molecular. *Revista El microbio*, 3.
<https://doi.org/10.1016/j.microb.2024.100084>
- Sienkiewicz, M., Łysakowska, M., Pastuszka, M., Bienias, W., & Kowalczyk, E. (2013). The potential of use basil and rosemary essential oils as effective antibacterial agents. *Molecules*, 18(8), 9334–9351. <https://doi.org/10.3390/molecules18089334>
- Sudhoff, H., Klenke, C., Greiner, J. F. W., Müller, J., Brotzmann, V., Ebmeyer, J., ... & Kaltschmidt, B. (2015). 1,8-Cineol reduce las citoquinas inflamatorias en células epiteliales bronquiales humanas. *International Immunopharmacology*, 26(1), 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.03.015>
- Tariq, S., Wani, S., Rasool, W., Shafi, K., Bhat, M. A., Prabhakar, A., Shalla, A. H., & Rather, M. A. (2019). A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 134, 103580. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103580>
- Tesfaye, K., Gizaw, Z., & Haile, A. F. (2021). Prevalence of Mastitis and Phenotypic Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Lactating Dairy Cows of Selected Dairy Farms in and Around Adama Town, Central Ethiopia. *Environmental Health Insights*, 15. <https://doi.org/10.1177/11786302211021297>
- Tian, M., Xu, X., Liu, F., Fan, X., & Pan, S. (2018). Untargeted metabolomics reveals predominant alterations in primary metabolites of broccoli sprouts in response to pre-harvest selenium treatment. *Food Research International*, 111, 205–211. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.041>
- Toledo, B., de Souza, F. N., Mertens, K., Piepers, S., Haesebrouck, F., & De Vliegher, S. (2021). Bovine-associated staphylococci and their role in intramammary infections. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 688852. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.688852>
- Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler, V. G. (2020). *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(2), e00034-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00034-19>

- Tsegmed, U., Normanno, G., Pringle, M., & Krovacek, K. (2012). Occurrence of *Staphylococcus aureus* in milk and dairy products in Mongolia. *Food Control*, 26(1), 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.01.017>
- Uriol, D., & Espinoza, M. (2019). Actividad antimicrobiana in vitro de los extractos hidroalcohólicos de frutos de aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) y de hojas de eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill) frente a *Staphylococcus aureus* [Tesis de Grado, Universidad Privada Antenor Orrego].
- Urióstegui, A. (2015). Hierbas medicinales utilizadas en la atención de enfermedades del sistema digestivo en la ciudad de Taxco, Guerrero. México. *Revista de Salud Pública* 17(1): 85-96. <https://www.redalyc.org/pdf/422/42242322008.pdf>
- Vayas, G. (2021). *Influencia económica de la mastitis en tres ganaderías de la provincia de Chimborazo período 2014-2016* [Tesis de Grado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. <https://dspace.esPOCH.edu.ec/items/b77b2ef6-4e52-43dd-92f7-59a2732b726c>
- Vázquez, N. M., Moreno, S., & Ojeda-Sana, A. M. (2016). Actividades antibacterianas y antibiopelícula del aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) y ácido carnosico. *Journal of Applied Microbiology*, 121(4), 1054–1063. <https://doi.org/10.1111/jam.13229>
- Veenstra, J. P., & Johnson, J. J. (2021). Romero (*Salvia rosmarinus*): Beneficios para la salud y propiedades conservantes de alimentos. *International Journal of Nutrition*, 6(4), 1–10. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8513767/>
- Virbac. (2021). Shotapen L.A.: Antibiótico inyectable de amplio espectro. *Virbac*. Recuperado el 15 de julio de 2025, de <https://mx.virbac.com/Shotapen-LA>
- Wheeler, T. T., Smolenski, G. A., Harris, D. P., Gupta, S. K., Haigh, B. J., & Broadhurst, M. K. (2012). Innate immune proteins as biomarkers for mastitis and endometritis. *Australasian Dairy Science Symposium*, 5, 294-297.
- Wink, M. (2015). Modes of action of herbal medicines and plant secondary metabolites. *Medicines*, 2(3), 251–286. <https://doi.org/10.3390/medicines2030251>

- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., & Teng, J. L. L. (2022). Advances in molecular diagnostics for bacterial identification. *Clinical Microbiology and Infection*, 28(4), 512–518. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.11.015>
- Wu, J., Wang, Z., Cheng, X., Lian, Y., An, X., & Wu, D. (2024). Preliminary Study on Total Component Analysis and In Vitro Antitumor Activity of Eucalyptus Leaf Residues. *Molecules*, 29(2). <https://doi.org/10.3390/molecules29020280>
- Yáñez Rueda, X., & Cuadro Mogollón, O. F. (2014). 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*, 10(1), 52–61.
- Yusuf, B., Abraha, B., Salih, K., Abdurahman, A., Alemu, S., Wondimu, A., & Bayu, Y. (2022). In vitro Antibacterial Evaluation of Four Selected Medicinal Plants against *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis in Mieso District West Hararghe Zone, Oromia Regional State, Ethiopia. *The Open Microbiology Journal*, 16(1). <https://doi.org/10.2174/18742858-v16-e221128-2022-14>
- Zaatout, N., Ayachi, A., & Kecha, M. (2020). *Staphylococcus aureus* persistence in bovine intramammary infections: Adhesion and biofilm formation as virulence strategies. *Journal of Applied Microbiology*, 129(5), 1127–1139. <https://doi.org/10.1111/jam.14724>
- Zeryehun, T., & Abera, G. (2017). Prevalence and bacterial isolates of mastitis in dairy farms in selected districts of Eastern Harrarghe Zone, Eastern Ethiopia. *Journal of Veterinary Medicine*, 6495278. <https://doi.org/10.1155/2017/6495278>

ANEXOS

Anexo 1.

Datos Finales Obtenidos Tras el Estudio.

CONCENTRACIONES	TRATAMIENTOS	REPETICIONES	% CRECIMIENTO BACTERIANO (<i>E. globulus</i>)	% INHIBICION (<i>E. globulus</i>)	% CRECIMIENTO BACTERIANO (<i>S. rosmerinus</i>)	% INHIBICION (<i>S. rosmerinus</i>)
500 mg/ml	1,00	1,00	16,07	83,93	23,80	76,20
	1,00	2,00	16,38	83,62	24,42	75,58
	1,00	3,00	15,76	84,24	24,72	75,28
250 mg/ml	2,00	1,00	29,36	64,77	35,23	64,77
	2,00	2,00	32,76	67,24	34,00	66,00
	2,00	3,00	31,52	68,48	38,01	61,99
125 mg/ml	3,00	1,00	42,34	57,66	48,21	51,79
	3,00	2,00	41,41	58,59	48,83	51,17
	3,00	3,00	43,27	56,73	47,59	52,41
62.5 mg/ml	4,00	1,00	54,39	45,61	54,70	45,30
	4,00	2,00	52,85	47,15	51,92	48,08
	4,00	3,00	53,47	46,53	54,39	45,61
31.25 mg/ml	5,00	1,00	64,28	35,72	60,27	39,73
	5,00	2,00	63,66	36,34	59,34	40,66
	5,00	3,00	64,98	36,64	61,19	38,81
Antibiótico	6,00	1,00	8,10	91,90	8,10	91,90
	6,00	2,00	9,55	90,45	9,55	90,45
	6,00	3,00	8,02	91,98	8,02	91,98

Anexo 2.

Maceración Dinámica Para la Obtención de Extractos Totales.



Anexo 3.

Filtración Tras la Maceración de Cada Planta.



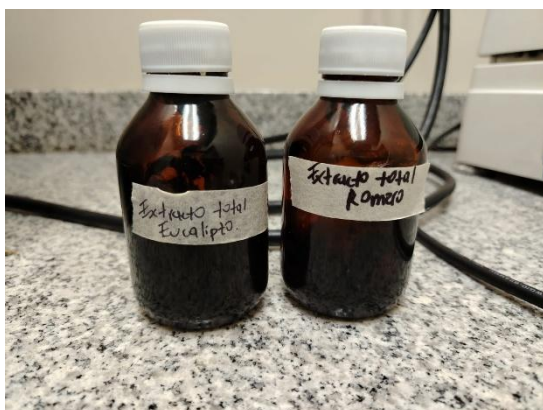
Anexo 4.

Evaporación del Solvente Empleando Rotavapor.



Anexo 5.

Obtención Final de Extractos Totales.



Anexo 6.

Lectura de Placa Mediante Espectrofotómetro.



Anexo 7.

Preparación de Agar Manitol Salado Para Siembra de Muestras.



Anexo 8.

Identificación de Muestras Positivas Empleando Agar Manitol Salado.



Anexo 10.

Identificación Molecular de *Staphylococcus aureus*.



Av. De los Granados E14-285 y Eloy Alfaro
Teléfono: 0998982450
e-mail: idgen.ecuador@gmail.com
R.U.C. 1713443479001

Informe de Resultados

Nombre del Proyecto: Identificación molecular de bacterias - Karla Pozo.
Informe No.: A-757
Técnico Responsable: Sofia Garrido, Ing.
Fecha: 28/03/2025

Tabla Resumen de Resultados

Código IDgen	Muestra	Longitud	Calidad	Organismo	Fragmento	% de identidad	Nº Acesión
B864	Tubo CC	1,305	100.0	<i>Staphylococcus aureus</i>	16S	100.00	CP123853.1

Firma autorizada

Francisco Javier Flores Flor, PhD.
Propietario IDgen

Anexo 11.

Secuencia Cruda de *Staphylococcus aureus*.

>B864_16S_2_2 2 reads from B864_16S assembled using Geneious

```
AAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCA  
CCGTAGCATGCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGTCGAG  
TTGCAGACTACAATCCGAAGTGAACAACCTTTATGGGATTTGCTTGACCTC  
GCGGTTTCGCTGCCCTTTGTATTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAAAT  
CATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCAC  
CGGCAGTCAACTTAGAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAAGCTTAAGGG  
TTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGAC  
AACCATGCACCACCTGTCACCTTTGTCCCCCGAAGGGGAAGGCTCTATCTCTA  
GAGTTGTCAAAGGATGTCAAGATTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAAT
```

TAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTT
CAACCTTGCGGTCGTACTIONCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGC
ACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGG
ACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGATCCCCACGCTTTCGCACATCAGCGT
CAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCCTCCATATCTCTG
CGCATTTCACCGCTACACATGGAATTCCACTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTTT
TCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACT
TAAAAAACCGCCTACGCGCGCTTTACGCCAATAATTCCGGATAACGCTTGC
CACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGAT
TAGGTACCGTCAAGATGTGCACAGTTACTTACACATATGTTCTTCCCTAATA
ACAGAGTTTTACGATCCGAAGACCTTCATCACTCACGCGGGCGTTGCTCCGTC
AGGCTTTCGCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCT
GGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCTCAGGTCCGGCTATGC
ATCGTTGCCTTGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCAGCGCGGAT
CCATCTATAAGTGACAGCAAGACCGTCTTTCACTTTTGAACCATGCGGTTCA
AAATATTATCCGGTATTAGCTCCGGTTTCCCGAAGTTATCCCAGTCTTATAG
GTAGGTTA

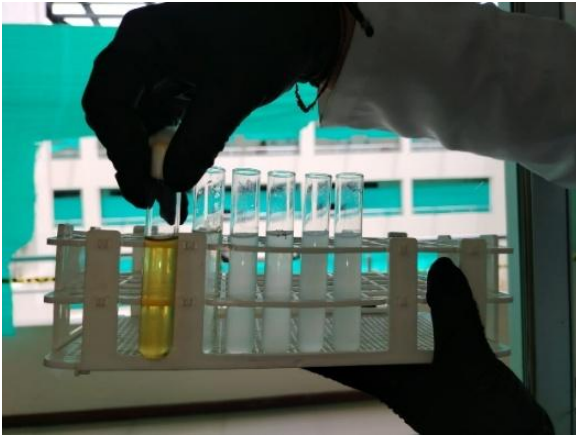
Anexo 12.

Inoculación de la Bacteria en Caldo Nutritivo.



Anexo 13.

Desarrollo de Escala de McFarland.



Anexo 14.

Prueba de Catalasa.



Anexo 15.

Elaboración de Protocolo de Tinción de Gram.



Anexo 16.

Absorbancia Ajustada de los Extractos de E. globulus y S. rosmarinus, Repetición 1, 2 y 3.

<i>Absorbancia ajustada de los extractos R1</i>	<i>concentraciones mg/ml</i>	<i>E. globulus</i>			<i>Control positivo</i>			<i>nm</i>
<i>Concentración 1</i>	<i>500 mg/ml</i>	<i>0,16</i>	<i>0,21</i>	<i>0,18</i>	<i>0,08</i>	<i>0,11</i>	<i>0,08</i>	<i>625</i>
<i>Concentración 2</i>	<i>250 mg/ml</i>	<i>0,31</i>	<i>0,33</i>	<i>0,31</i>	<i>0,09</i>	<i>0,07</i>	<i>0,10</i>	<i>625</i>
<i>Concentración 3</i>	<i>125 mg/ml</i>	<i>0,46</i>	<i>0,45</i>	<i>0,47</i>				<i>625</i>
<i>Concentración 4</i>	<i>62.5 mg/ml</i>	<i>0,58</i>	<i>0,58</i>	<i>0,58</i>				<i>625</i>
<i>Concentración 5</i>	<i>31.25 mg/ml</i>	<i>0,69</i>	<i>0,67</i>	<i>0,7</i>				<i>625</i>
<i>Absorbancia ajustada de los extractos R2</i>	<i>concentraciones mg/ml</i>	<i>E. globulus</i>			<i>Control positivo</i>			<i>nm</i>
<i>Concentración 1</i>	<i>500 mg/ml</i>	<i>0,16</i>	<i>0,18</i>	<i>0,19</i>	<i>0,08</i>	<i>0,09</i>	<i>0,13</i>	<i>625</i>
<i>Concentración 2</i>	<i>250 mg/ml</i>	<i>0,34</i>	<i>0,33</i>	<i>0,37</i>	<i>0,12</i>	<i>0,09</i>	<i>0,10</i>	<i>625</i>
<i>Concentración 3</i>	<i>125 mg/ml</i>	<i>0,46</i>	<i>0,41</i>	<i>0,45</i>				<i>625</i>
<i>Concentración 4</i>	<i>62.5 mg/ml</i>	<i>0,57</i>	<i>0,53</i>	<i>0,57</i>				<i>625</i>
<i>Concentración 5</i>	<i>31.25 mg/ml</i>	<i>0,68</i>	<i>0,71</i>	<i>0,67</i>				<i>625</i>
<i>Absorbancia ajustada de los extractos R3</i>	<i>concentraciones mg/ml</i>	<i>E. globulus</i>			<i>Control positivo</i>			<i>nm</i>
<i>Concentración 1</i>	<i>500 mg/ml</i>	<i>0,22</i>	<i>0,15</i>	<i>0,16</i>	<i>0,09</i>	<i>0,07</i>	<i>0,05</i>	<i>625</i>
<i>Concentración 2</i>	<i>250 mg/ml</i>	<i>0,37</i>	<i>0,31</i>	<i>0,34</i>	<i>0,12</i>	<i>0,10</i>	<i>0,09</i>	<i>625</i>

Concentración 3	125 mg/ml	0,5	0,43	0,47				625
Concentración 4	62.5 mg/ml	0,58	0,55	0,57				625
Concentración 5	31.25 mg/ml	0,7	0,69	0,67				625
Absorbancia ajustada de los extractos R1	concentraciones mg/ml	S. rosmarinus			Control positivo			nm
Concentración 1	500 mg/ml	0,22	0,27	0,27	0,08	0,11	0,08	625
Concentración 2	250 mg/ml	0,37	0,38	0,39	0,09	0,07	0,10	625
Concentración 3	125 mg/ml	0,51	0,53	0,52				625
Concentración 4	62.5 mg/ml	0,6	0,55	0,6				625
Concentración 5	31.25 mg/ml	0,64	0,64	0,67				625
Absorbancia ajustada de los extractos R2	concentraciones mg/ml	S. rosmarinus			Control positivo			nm
Concentración 1	500 mg/ml	0,27	0,26	0,26	0,08	0,09	0,13	625
Concentración 2	250 mg/ml	0,39	0,35	0,36	0,12	0,09	0,10	625
Concentración 3	125 mg/ml	0,53	0,53	0,52				625
Concentración 4	62.5 mg/ml	0,58	0,55	0,54				625
Concentración 5	31.25 mg/ml	0,64	0,62	0,65				625
Absorbancia ajustada de los extractos R3	concentraciones mg/ml	S. rosmarinus			Control positivo			nm
Concentración 1	500 mg/ml	0,26	0,27	0,27	0,09	0,07	0,05	625
Concentración 2	250 mg/ml	0,39	0,43	0,41	0,12	0,10	0,09	625

Concentración 3	<i>125 mg/ml</i>	<i>0,54</i>	<i>0,53</i>	<i>0,5</i>				<i>625</i>
Concentración 4	<i>62.5 mg/ml</i>	<i>0,59</i>	<i>0,59</i>	<i>0,58</i>				<i>625</i>
Concentración 5	<i>31.25 mg/ml</i>	<i>0,66</i>	<i>0,62</i>	<i>0,68</i>				<i>625</i>