



**Pontificia Universidad Católica del Ecuador**

**Sede Ibarra**

**ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES**

**INFORME FINAL DEL PROYECTO**

**TEMA:**

**Evaluación del efecto antibiótico del extracto de la planta medicinal más usada en  
mastitis bovina en la provincia de Imbabura**

**PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE**

**INGENIERA EN ZOOTECNIA**

**LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN:**

**Línea 1. Desarrollo y Sostenibilidad**

**Sublínea 1.3. Tecnologías Pecuarias**

**AUTORA: Viviana Estefanía Tatés Cabrera**

**ASESOR: Ing. Santiago Mafla Mgs.**

**Ibarra, Septiembre 2018**



Ibarra, 26 de Septiembre de 2018

Ing. Santiago Mafla Mgs.

ASESOR

CERTIFICA:

Haber revisado el presente informe final de investigación, el mismo que se ajusta a las normas vigentes en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECAA), de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI); en consecuencia, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.

(f:) .....

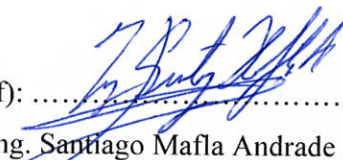
Ing. Santiago Mafla Mgs.


C.C.: 1002658399




## PÁGINA DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

El jurado examinador, aprueba el presente informe de investigación en nombre de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI):

(f):   
Ing. Santiago Mafla Andrade Mgs.  
C.C.: 1002658399

(f):   
PhD. Paola Ordóñez Vivanco  
C.C.: 1103764872

(f):   
Ing. María Fernanda López Flores Mgs.  
C.C.: 1002509600



## ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS

Yo Viviana Estefanía Tatés Cabrera, declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 165 del Código Orgánico de la 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 u oneroso, según las condiciones que determinen. Esta facultad podrá ejercerse mediante licencias libres, abiertas y otros modelos alternativos de licenciamiento o la renuncia”.

Ibarra, 26 de Septiembre de 2018

f):  .....

Viviana Estefanía Tatés Cabrera

C.C.: 100367693-7



## AUTORÍA

Yo, Viviana Estefanía Tatés Cabrera, portador de la cédula de ciudadanía N°100367693-7, declaro que la presente investigación es de total responsabilidad del autor, y eximo expresamente a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra de posibles reclamos o acciones legales.

f): .....

Viviana Estefanía Tatés Cabrera

C.C.: 100367693-7



## DECLARACIÓN y AUTORIZACIÓN

Yo: Viviana Estefanía Tatés Cabrera, con CC: 100367693-7, autor del trabajo de grado intitulado: “*Evaluación del efecto antibiótico del extracto de la planta medicinal más usada en mastitis bovina en la provincia de Imbabura*”, previo a la obtención del título profesional de Ingeniera en Zootecnia en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales.

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede- Ibarra, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCESI el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Ibarra, 26 de Septiembre de 2018

(f.).....

Viviana Estefanía Tatés Cabrera

C.C. 100367693-7



**DECLARACIÓN DE COMPORTAMIENTO ÉTICO EN LA ELABORACIÓN,  
DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

Por medio de la presente declaro conocer y aplicar en la elaboración, desarrollo y evaluación del Proyecto de Titulación: “*Evaluación del efecto antibiótico del extracto de la planta medicinal más usada en mastitis bovina en la provincia de Imbabura*”, lo propuesto en el código de Ética de la Investigación y Aprendizaje de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, aprobado por el Consejo Superior de la PUCE con fecha 15 de enero de 2018.

Para constancia firma:

(f) .....

Viviana Estefanía Tatés Cabrera

C.I: 100367693-7

Ingeniería en Zootecnia



## **DEDICATORIA**

Este trabajo de investigación está dedicado primeramente a Dios, ya que gracias a él logré culminar mi carrera.

A mis padres Silvia Cabrera y Gustavo Tatés, que siempre me han sido mi gran apoyo y con su excelente ejemplo me han formado en una persona de bien que sabe cumplir sus obligaciones, por que gracias a ellos es que logré cumplir con mi carrera universitaria.

A mi esposo Tito Mendoza quien me brindó su amor, su cariño, su sabiduría y supo apoyarme siempre.

A mi adorado hijo Matías Mendoza quien en cada mañana me regalaba las ganas de superarme cada día y me prestó el tiempo que le pertenecía para terminar mis estudios.

A mi querida hermana Vanessa Tatés, por que es una de las personas a las que admiro y respeto y que me ha enseñado que todo es posible con esfuerzo y corazón.



## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente agradezco a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador sede Ibarra y en especial a mi querida Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales ECAA por llenarme de pasión por mi carrera, y por los excelentes docentes que supieron compartir su valiosos conocimientos conmigo.

Agradezco también al Ing. Santiago Mafla Mgs, mi director de tesis; por haberme brindado la oportunidad de trabajar con él, por su paciencia y dedicación a mi trabajo de investigación.

Mi agradecimiento también va dirigido para mis asesoras Mgs. María Fernanda López y PhD. Paola Ordoñez, ya que gracias a sus conocimientos logré cumplir con mi investigación.

## RESUMEN.

La presente investigación se llevó a cabo con el objetivo de evaluar el efecto antimicrobiano de la principal planta medicinal utilizada en campo por los ganaderos de Imbabura sobre las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, que son organismos prevalentes en mastitis bovina. Mediante 330 encuestas a productores de los seis cantones de Imbabura se determinó que la planta más utilizada es *Solanum nigrum* (Hierba Mora). Utilizando un diseño completamente al azar (DCA) con el fin de evaluar la acción antimicrobiana de dicha solanácea en concentraciones de 175mg/ml, 350mg/ml, 525mg/ml y 700 mg/ml. La obtención de los extractos se realizó por maceración dinámica con solvente de metanol al 99%, a continuación, se realizó cultivos con las bacterias seleccionadas en agar nutritivo, en los cuales se distribuyó discos empapados con las cuatro concentraciones del extracto, tomando como control positivo la Penicilina G y el alcohol metanol como control negativo. Una vez transcurridas 24 horas de la siembra se procedió a la medición de los halos de inhibición, referente a *E. Coli* se obtuvo un promedio de 0,64; 3,56; 3,82 y 7,21 mm con concentraciones de 175mg/ml, 350mg/ml, 525mg/ml y 700 mg/ml respectivamente, mientras que con las bacterias de *S. aureus* se produjeron halos de inhibición de 1,96; 1,32; 1,91; 2,02 y 3,72 mm, con las mismas concentraciones. Se logró establecer diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos mediante la prueba de Tukey al 5%, estableciendo que el mejor tratamiento antimicrobiano fue la concentración al 100% del extracto de *Solanum Nigrum* sobre ambas bacterias, aunque generó mayor sensibilidad sobre las bacterias *E. coli*.

Palabras clave: *Solanum nigrum*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, mastitis antimicrobiano

## ABSTRACT.

The present investigation was carried out with the objective of evaluating the antimicrobial effect of the main medicinal plant used in the field by Imbabura farmers on the bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, which are organisms prevalent in bovine mastitis. By means of 330 surveys to producers of the six cantons of Imbabura, it was determined that the most used plant is *Solanum nigrum* (Hierba mora). Using a completely randomized design (DCA) in order to evaluate the antimicrobial action of said solanaceous in concentrations of 175mg / ml, 350mg / ml, 525mg / ml and 700 mg / ml. The extracts were obtained by dynamic maceration with 99% methanol solvent, then cultures were carried out with the selected bacteria on nutritive agar, in which discs soaked with the four concentrations of the extract were distributed, taking as a positive control Penicillin G and alcohol methanol as negative control. After 24 hours of planting, the inhibition zones were measured, referring to *E. Coli*, an average of 0.64 was obtained; 3.56; 3.82 and 7.21 mm with concentrations of 175mg / ml, 350mg / ml, 525mg / ml and 700 mg / ml, respectively, while bacteria of *S. aureus* produced haloes of inhibition of 1.96; 1.32; 1.91; 2.02 and 3.72 mm, with the same concentrations. It was possible to establish statistically significant differences between treatments using the Tukey test at 5%, establishing that the best antimicrobial treatment was the 100% concentration of *Solanum Nigrum* extract on both bacteria, although it generated greater sensitivity on *E. coli* bacteria.

Key words: *Solanum nigrum*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, Antimicrobial mastitis

## INDICE GENERAL

CERTIFICA:.....	ii
PÁGINA DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL.....	iii
ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS.....	iv
AUTORÍA.....	v
DECLARACIÓN y AUTORIZACIÓN.....	vi
DEDICATORIA.....	viii
AGRADECIMIENTOS.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xi
CAPÍTULO I.....	4
1.1 INTRODUCCIÓN.....	4
1.2 Objetivos.....	6
1.2.1 Objetivo General.....	6
1.2.2 Objetivos Específicos.....	6
1.3 Variables.....	7
1.3.1 Variable independiente:.....	7
1.3.2 Variable dependiente:.....	7
CAPÍTULO II.....	8
2. ESTADO DEL ARTE.....	8
2.1 Mastitis.....	8
2.1.1 Origen de la Mastitis.....	8
2.1.2 Tipos de mastitis.....	9
2.1.2.1 Mastitis Clínica.....	9
2.1.2.2 Mastitis Subclínica.....	10
2.1.3 Prevalencia mastitis.....	10
2.1.4 Principales agentes causales de la mastitis.....	11
2.1.4.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	12

2.1.4.2	<i>Escherichia coli</i> .....	13
2.2	Alternativas antibióticas.....	13
2.2.1	Plantas con propiedades antibióticas .....	13
2.2.2	Extracción.....	14
2.2.2.1	Extracción por solución, sólido – líquido.....	15
2.2.3	<i>Solanum nigrum</i> .....	15
2.2.3.1	Taxonomía.....	16
2.2.3.2	Generalidades .....	16
2.2.3.3	Características.....	17
2.2.3.4	Usos.....	17
2.2.3.5	Estudios Fitoquímicos.....	18
2.2.3.6	Farmacología .....	18
CAPÍTULO III.....		19
2.3	Materiales.....	19
2.4	Metodología .....	20
2.4.1	Diseño experimental .....	20
2.4.1.1	Características del Experimento .....	20
2.4.2	Muestras para entrevistas a pequeños ganaderos de Imbabura.....	21
2.4.2.1	Preparación de extractos de <i>Solanum nigrum</i> (Hierba Mora) .....	22
2.4.2.2	Recolección .....	22
2.4.2.3	Secado Mecánico de <i>Solanum nigrum</i> .....	23
2.4.2.4	Maceración Dinámica .....	24
3.2.3.4	Obtención del extracto de <i>Solanum nigrum</i> . .....	25

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diseño experimental .....	21
Tabla 2. Concentraciones de extractos de <i>Solanum nigrum</i> empleadas en los tratamientos	28
Tabla 3. Distribución de los tratamientos.....	33
Tabla 4. Concentraciones del extracto de <i>Solanum nigrum</i> para el control de cuantificación de bacterias.....	35
Tabla 5. Medición de los halos de inhibición con los discos del extracto de <i>Solanum nigrum</i> y testigos frente a <i>Escherichia coli</i> .....	43
Tabla 6. Medición de los halos de inhibición con los discos del extracto de <i>Solanum nigrum</i> y testigos frente a <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	45
Tabla 7. Recuento de las bacterias de <i>Escherichia coli</i> en cámara de Neubauer, en una con extracto <i>Solanum nigrum</i> .....	57
Tabla 8. Recuento de bacterias de <i>Escherichia coli</i> en cámara de Neubauer, frente a las concentraciones del extracto de <i>Solanum nigrum</i> . ....	58
Tabla 9. Recuento de las bacterias de <i>Staphylococcus aureus</i> en cámara de Neubauer, en ausencia del extracto de Hierba Mora ( <i>Solanum nigrum</i> ). ....	61
Tabla 10. Recuento de bacterias de <i>Staphylococcus aureus</i> en cámara de Neubauer, frente a las concentraciones del extracto de <i>Solanum nigrum</i> .....	63

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Solanum nigrum</i> (Hierba Mora).....	15
Figura 2. Prensado de <i>Solanum nigrum</i> .....	23
Figura 3. Proceso de secado .....	24
Figura 4. Deshidratador.....	24
Figura 5. Triturador.....	24
Figura 6. Agitador.....	25
Figura 7. Filtración.....	26
Figura 8. Rotavapor.....	27
Figura 9. Recolección del extracto.....	27
Figura 10. Concentración del extracto .....	28
Figura 11. Técnica de siembra por estrías.....	30
Figura 12. Bacterias de <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .....	30
Figura 13. Autoclave N_ BIOTECK ®	
Figura 14. Inoculación de bacterias .....	31
Figura 15. Discos de papel filtro empapados con las concentraciones del extracto de <i>Solanum nigrum</i> en placas inoculadas.....	32
Figura 16. Incubación de las bacterias .....	32
Figura 17. Medición de los halos de inhibición de cada tratamiento.....	34
Figura 18. Concentraciones del extracto junto con las bacterias de <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .....	35
Figura 19. Microtubos.....	36
Figura 20. Espectrofotómetro de Microplaca Epoch™ de Biotek instruments.....	37
Figura 21. Cámara de Neubauer .....	38
Figura 22. Visualización de las bacterias con el objetivo 40 X en la cámara de Neubauer. 38	
Figura 23. Plantas más utilizadas en el tratamiento para mastitis en la provincia de Imbabura según la encuesta realizada. ....	39
Figura 24. Tratamientos usados en bovinos con mastitis según la encuesta realizada. ....	40
Figura 25. Zonas donde localizar Hierba Mora silvestre .....	41

Figura 26. Actividad antimicrobiana del extracto metanólico de <i>Solanum nigrum</i> frente a <i>Escherichia coli</i> . A) Discos de penicilina (control positivo). B) Discos con metanol (control negativo). C) Discos con concentración al 175 mg/ml. D) Discos con concentración al 350 mg/ml. E) Discos con concentración al 525 mg/ml. F) Discos con concentración de 700 mg/ml.....	42
Figura 27. Actividad antimicrobiana del extracto metanólico de <i>Solanum nigrum</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i> . G) Discos de penicilina (control positivo). H) Discos con metanol (control negativo). I) Discos con concentración al 25%. J) Discos con concentración al 50%. K) Discos con concentración al 75%. L) Discos con concentración al 100%.....	44
Figura 28. Prueba Tukey 5% medición de los halos de inhibición de los distintos tratamientos con <i>Escherichia coli</i> . T1) Metanol. T2) Penicilina. T3) 175mg/ml. T4) 350 mg/ml. T5) 525 mg/ml. T6) 700 mg/ml.....	46
Figura 29. Prueba Tukey 5% con respecto a la medición de los halos de inhibición de los distintos tratamientos frente a la bacteria de <i>Staphylococcus aureus</i> . T1) Metanol. T2) Penicilina. T3) 175mg/ml. T4) 350 mg/ml. T5) 525 mg/ml. T6) 700 mg/ml.....	47
Figura 30. Curva de crecimiento de las bacterias de <i>E. coli</i> en ausencia de <i>Solanum nigrum</i> . .....	50
Figura 31. Curva de crecimiento de las bacterias de <i>E. coli</i> en una concentración de 175mg/ml de <i>Solanum nigrum</i> .....	51
Figura 32. Curva de crecimiento de las bacterias de <i>E. coli</i> en una concentración de 350 mg/ml de <i>Solanum nigrum</i> .....	51
Figura 33. Curva de crecimiento de las bacterias de <i>E. coli</i> en una concentración de 525 mg/ml de <i>Solanum nigrum</i> .....	52
Figura 34. Curva de crecimiento de las bacterias de <i>E. coli</i> en una concentración de 700 mg/ ml de <i>Solanum nigrum</i> .....	52
Figura 35. Curva de crecimiento de las bacterias de <i>S. aureus</i> en ausencia de <i>Solanum nigrum</i> . .....	53
Figura 36. Curva de crecimiento de las bacterias de <i>S. aureus</i> en una concentración de 175 mg/ml de <i>Solanum nigrum</i> .....	54

<i>Figura 37.</i> Curva de crecimiento de las bacterias de <i>S. aureus</i> en una concentración de 350 mg/ml de <i>Solanum nigrum</i> .....	54
<i>Figura 38.</i> Curva de crecimiento de las bacterias de <i>S. aureus</i> en una concentración de 525 mg/ml de <i>Solanum nigrum</i> .....	55
<i>Figura 39.</i> Curva de crecimiento de las bacterias de <i>S. aureus</i> en una concentración del 700 mg/ ml de <i>Solanum nigrum</i> .....	56
<i>Figura 40.</i> Curva de crecimiento bacteriano de <i>Escherichia coli</i> en cámara de Neubauer, ausencia del extracto de <i>Solanum nigrum</i> . ....	57
<i>Figura 41.</i> Curva de crecimiento bacteriano de <i>Escherichia coli</i> en cámara de Neubauer, frentes a las concentraciones del extracto de <i>Solanum nigrum</i> .....	59
<i>Figura 42.</i> Prueba Tukey al 5% con respecto al conteo bacteriano de <i>Escherichia coli</i> en la cámara de Neubauer. ....	60
<i>Figura 43.</i> Prueba Tukey al 5% con respecto al conteo bacteriano de <i>Escherichia coli</i> en la cámara de Neubauer. ....	60
<i>Figura 44.</i> Curva de crecimiento bacteriano de <i>Staphylococcus aureus</i> en cámara de Neubauer, en ausencia del extracto de <i>Solanum nigrum</i> .....	62
<i>Figura 45.</i> Curva de crecimiento bacteriano de <i>Staphylococcus aureus</i> en cámara de Neubauer, frentes a las concentraciones del extracto de <i>Solanum nigrum</i> .....	63
<i>Figura 46.</i> Prueba Tukey al 5% con respecto al conteo bacteriano de <i>Staphylococcus aureus</i> en la cámara de Neubauer. ....	64
<i>Figura 47.</i> Prueba Tukey al 5% con respecto al conteo bacteriano de <i>Staphylococcus aureus</i> en la cámara de Neubauer . ....	65
<i>Figura 48.</i> Resultados de la socialización de la investigación.....	66

# CAPÍTULO I

## 1.1 INTRODUCCIÓN.

La presente investigación busca determinar la principal planta medicinal usada por los productores de ganado en Imbabura y analizar su efecto antibiótico, ya que puede llegar a ser una gran alternativa al uso de antibióticos suministrados a animales de producción. La Organización Mundial de la Salud (OMS) (2018) anunció que los antibióticos son un elemento fundamental tanto para la salud humana como para la sanidad animal y el bienestar animal. La extralimitación del uso de estos medicamentos puede generar la manifestación de bacterias resistentes a su acción, también conocido como antibiorresistencia, amenazando el control de las enfermedades a nivel mundial.

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (2018) indica que la resistencia a los antibióticos es un problema a nivel mundial que perjudica la salud humana y a la sanidad animal. Quiñones (2017) cita a Infectious Diseases Society of America (2011) “la OMS ha designado a la RAM (Resistencia Antimicrobiana) como una de los tres problemas cruciales que enfrenta la salud humana en el presente siglo al ser una de las mayores amenazas para la salud mundial”.

Paralelamente, los pequeños ganaderos del Ecuador ejercen ciertas acciones terapéuticas para tratar enfermedades que se presentan de manera frecuente en los semovientes. Estas prácticas se realizan de manera empírica, tras conocimientos adquiridos ancestralmente. Los principales problemas sanitarios son las parasitosis externa e interna, las neumonías y la mastitis. Esta última patología, es muy importante de acuerdo a que se encuentra en casi todas las ganaderías productoras de leche y genera grandes pérdidas económicas, en este sentido San Martín, B. *et al*, (2002) manifiesta que el valor promedio de influencia económica oscila entre 27 y 50 dólares por vaca al año, además declaran que la mastitis representa el 26% del costo total de todas las enfermedades en el ganado lechero; y las pérdidas por mastitis son el doble de las pérdidas por infertilidad y problemas de reproducción.

La mastitis bovina comúnmente se asocia con infección bacteriana, donde el tratamiento más común se basa en la administración de antibióticos. Este procedimiento, cuando se hace de manera incorrecta, permite la presencia de residuos de estas sustancias en la leche, además de generar resistencia bacteriana que ofrecen riesgos para la salud humana. (Lambrecht *et al*, 2013 cita a Albuquerque, 1996)

La leche y sus derivados corresponden al grupo de alimentos de mayor amenaza en salud pública, no tan solo por tratarse de un alimento básico y de amplio consumo, sino por su sensibilidad para difundir enfermedades debido a la concurrencia de microorganismos y agentes contaminantes como insumos veterinarios, hormonas, plaguicidas y antibióticos. (Mattar, Calderón, Sotelo, Sierra y Tordecilla, 2009)

En este contexto, surge la necesidad de evaluar si las alternativas aplicadas empíricamente como el uso de plantas medicinales, tienen una base científica que caracterice a estas especies vegetales con propiedades antibióticas, y de igual manera buscar si estos elementos contribuyen a dar una solución efectiva al problema de la resistencia a antibiótico

Grosso (2010) cita a Bullitta *et al.* (2007) la OMS en el 1980, en la Reunión de Tien-Tsin en China, establece a las plantas medicinales como «... *cada especie vegetal contiene en sus partes sustancias utilizadas a objetivo terapéutico o preventivo*». La fitoterapia ha sido enormemente empleada en el pasado para el tratamiento de múltiples patologías de animales.

El empleo de plantas medicinales en medicina veterinaria y zootecnia, han sido diversos y unificadas a la actividad específica (antiinflamatoria, antibacteriana, antifúngica, antiparasitaria y diurética) gracias a los principios activos que poseen. (Grosso, 2010, cita a Aiello *et al.*, 1999; Bauer, 1999; Camporese, 1999)

“Una publicación realizada por *The Lancet Planetary Health* alega que se puede minimizar hasta un 39% a las bacterias resistentes a antibióticos destinados a los animales de producción, implementando cualquier tipo de intervención que limitan el uso de estos medicamentos”. (OMS, 2017)

Verde, García y Rivas (2016) mencionan que “tan sólo entre el 5% al 15% de las aproximadamente 250,000 plantas de uso medicinal, han sido investigadas para compuestos bioactivos. Esto subraya el gran potencial de las plantas en la búsqueda de nuevos medicamentos”

Así, el objetivo principal de este estudio es la evaluación del efecto antibiótico de la planta medicinal más utilizada en campo por los ganaderos de Imbabura en las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1 Objetivo General**

Evaluar el efecto antibiótico de la principal planta medicinal utilizada en campo por los ganaderos de Imbabura en las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* que desarrollan mastitis bovina.

### **1.2.2 Objetivos Específicos**

1. Establecer la principal planta medicinal utilizada por pequeños ganaderos de Imbabura en el tratamiento de mastitis bovina a través de la aplicación de una entrevista.

2. Obtener el extracto de la planta medicinal más utilizada, mediante la maceración dinámica para la posterior evaluación antimicrobiana
3. Evaluar la actividad antibiótica sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* mediante análisis in vitro.
4. Socializar los resultados obtenidos mediante una charla técnica que permita la difusión de la investigación.

### 1.3 Variables

#### 1.3.1 Variable independiente:

Para comprobar el efecto antibiótico de la principal planta medicinal en Imbabura, se utilizarán como factores analizables lo siguiente, el porcentaje de concentración de cada extracto sobre las bacterias.

- Concentración de los extractos, según lo mencionado por Ramírez, Castillo, Quintana, Torres, Villegas y Díaz, 2015.

700 mg/ml

525 mg/ml

350 mg/ml

175 mg/ml

- Bacterias de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

#### 1.3.2 Variable dependiente:

- Número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)
- Turbidez
- Halo de inhibición

## CAPÍTULO II

### 2. ESTADO DEL ARTE.

#### 2.1 Mastitis

La Federación Internacional de Leche (FIL) define a la mastitis como una reacción inflamatoria de la glándula mamaria. Esta inflamación produce cambios en el tejido glandular y una serie de variaciones en la composición bioquímica de la leche (FIL, 2016).

Ruíz (2017), asegura que la mastitis genera mayores pérdidas económicas en comparación con otras enfermedades en la producción lechera a causa de varios factores como:

- Baja producción de leche
- Costo veterinarios e insumos
- Leche desechada
- Descarte animales infectados
- Muerte prematura

Comúnmente el principal causante de mastitis es el mal manejo de las prácticas de ordeño y su falta de higiene. (FAO, 2010)

“Una ubre sana no debería mostrar cualquier patológica externa y la leche debe estar libre de microorganismos patógenos con un nivel normal de células somáticas  $<100,000\text{cel/ml}$ ”. (Wolter, Kloppert y Zschoeck, 2017)

##### 2.1.1 Origen de la Mastitis

La generación de la mastitis es de origen multifactorial, ya que la enfermedad se determina por la relación del animal con el ambiente, en lo cual, si este último supera la capacidad defensiva del animal, se predispondrá una infección que desarrolla una mastitis. Otros factores predisponentes para la presencia de la enfermedad son: la conformación de la ubre,

estado de nutrición, condición sanitaria y manejo de los ordeños en los bovinos. (Kleinschroth, E. *et al.*, 1991)

Existen dos mecanismos de defensa que protegen al animal: la resistencia genética y la insensibilidad adquirida por exposición al agente etiológico, resaltando que la capacidad congénita es de bajo grado heredable. (Kleinschroth, E. *et al.*, 1991)

### **2.1.2 Tipos de mastitis**

Iñiguez, F. (2011) señala que existen dos tipos de mastitis de acuerdo a la presencia de signos clínicos: clínica y subclínica.

#### **2.1.2.1 Mastitis Clínica**

En esta forma la vaca no ha podido eliminar las bacterias y su toxinas, los leucocitos como respuesta al combate inflaman la ubre, las vacas afectadas muestran hostilidad al momento del ordeño a causa del dolor, su leche presenta grumos amarillentos o rosada y con mal olor. De esta manera el animal puede llegar a perder los cuartos de ubres afectadas e incluso morir si no se trata adecuadamente (FAO, 2010).

Puede presentar los siguientes signos (Pastor y Bedolla, 2008 cita a Heringstad *et al.*, 2000; Schrick *et al.*, 2001):

- Inflamación de la ubre, caracterizada por: rubor, tumor, calor y dolor
- Apariencia anormal en la leche
- Incremento de la temperatura corporal
- Decaimiento
- Anorexia
- Inclusive hasta la muerte del animal por septicemia

### **2.1.2.2 Mastitis Subclínica**

La mastitis subclínica es debe a la presencia de microorganismos en unión con un elevado conteo de células somáticas de la leche (CCS). (Pastor y Bedolla, 2008 cita a Schrick *et al.*, 2001)

En este tipo de mastitis los signos no son visibles, la concurrencia de patógenos y los cambios citológicos de la leche traen como consecuencia una mastitis subclínica, la cual es más incesante y común en el grupo de enfermedades de importancia por la higiene en un ganado lechero (Pastor y Bedolla, 2008). Es necesario realizar como control un conteo de células somáticas y un cultivo bacteriológico para detectar inflamación e infección.

Esta alteración tiene mayor efecto en vacas que tiene más de un parto que en animales jóvenes, generando un nexo negativo en cuanto al CCS y el rendimiento de la leche. (Ruíz, 2017)

### **2.1.3 Prevalencia mastitis**

En el Ecuador los estudios documentados sobre prevalencia de mastitis son muy escasos; Echeverría R. (2016), obtuvo una prevalencia de 81.48% de mastitis subclínica en haciendas de la provincia Imbabura; Espinoza, M. y Mier, J. (2013) en el cantón El Chaco de la provincia de Napo fue de 79,66%; Caraguay, M. (2012) determinó una incidencia de la mastitis subclínica del 44,3%; por otra parte Conlago, L. (2013) concluye en su investigación una prevalencia del 64% y una incidencia del 70% de mastitis bovina.

#### 2.1.4 Principales agentes causales de la mastitis

En la glándula mamaria bovina se han reconocido hasta 140 especies, subespecies y serovariedades microbianas. Gracias a las técnicas de laboratorio microbiológicas se ha llegado a identificar varios microorganismos patógenos de la mastitis. Estos microorganismos se han dividido en patógenos contagiosos y ambientales; en base a su asociación epidemiológica con la enfermedad y a su tendencia de causar la infección. Dependiendo, asimismo, de la interacción del animal con el medio en el se relaciona, de tal manera que perjudica aún más el cuarto de la glándula mamaria infectada (Bedolla, C. 2017).

Se conoce que la mastitis es una enfermedad cosmopolita, en la cual se han reportado varias investigaciones sobre la prevalencia de estos agentes patógenos. En este sentido, Echeverría R., (2016), en su investigación realizada en Imbabura (Ecuador) determinó que la mastitis más prevalente fue generada por *Staphylococcus aureus* con un 46%. Hernández J., *et al*, (2015) establecieron como agente etiológico más frecuente al *Staphylococcus aureus* con un 26%. Bedolla, C. (2017), indica que la bacteria más prevalente es *Escherichia coli* (14.2%) y *Staphylococcus aureus*. Así mismo, Calderón, A., y Rodríguez, V. (2007) en su investigación resultó el aislamiento de *Staphylococcus aureus* en el 29.09% de vacas con mastitis y se convirtió en el principal patógeno encontrado, y como bacteria ambiental se determinó a la *Escherichia coli*.

Es así que estas bacterias son el primer agente etiológico de acuerdo al tipo de mastitis, es decir, que la mastitis contagiosa es causada principalmente por *Staphylococcus aureus*, y la mastitis ambiental se genera con mayor frecuencia por *Escherichia coli*. Esto dado en la mayor parte del mundo, y que una vez establecidos en la glándula mamaria son difíciles de erradicar y generan pérdidas económicas muy considerables en la industria de la leche.

#### 2.1.4.1 *Staphylococcus aureus*

Desde su descubrimiento por el médico Alexander Ogston en 1880, *Staphylococcus aureus* es considerado un patógeno con gran potencial para causar múltiples infecciones en el ser humano y los animales. *S. aureus* es una bacteria anaerobia facultativa, grampositiva considerada muy virulenta, a la cual es responsable de un amplio espectro de enfermedades, que van desde infecciones de la piel y tejidos blandos hasta infecciones graves que amenazan con la vida. (Cervantes, García y Salazar, 2014). Esta bacteria se encuentra ampliamente diseminada en el ambiente, ya que el principal problema con este microorganismo es la resistencia que desarrolla con facilidad ante presencia de varios antibióticos.

“Son cocos Gram positivos de 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$  de diámetro pudiendo estar solos, en pares, tétradas, cadenas de tres o cuatro células y estar agrupados en forma de racimos irregulares” (Ruíz, 2017).

Es uno de los patógenos que causan gran impacto en la salud de la glándula mamaria por su alta capacidad infecto contagiosa. *Staphylococcus aureus* contiene una variedad de proteínas de virulencia expresados en su pared celular, que son responsables de las lesiones en los tejidos y células (Hernández, 2010). Esta bacteria se adhiere a las células epiteliales mamarias extracelulares, penetrando el epitelio y otras células como las endoteliales y fibroblastos. Al ingresar esta bacteria al orificio del pezón, subsiste y se multiplica para posteriormente ingresar al canal del pezón ya sea colonizando progresivamente o debido a cambios en la presión intramamaria, el momento del contacto con la leche facilita para que la bacteria se extienda a través del seno del pezón a la glándula, lo cual ocurre durante el ordeño manual o mecánico. (Ruíz, 2017). Convirtiéndose así en el principal agente infeccioso por su prevalencia y patogenicidad, ocasionando más del 80% de las infecciones intramamaria. (REDVET, 2011 cita a González, 1980., McDonald, 1984., Rampone, 1993. y Wilson 1998)

La infección por *Staphylococcus aureus* es peculiarmente crónica, ya que esta bacteria es capaz de resistir en los neutrófilos y a las células del sistema inmunitario (macrófagos), de

esta manera se ha demostrado que la bacteria es capaz de perdurar y multiplicarse en el interior de algunas vacuolas citoplasmáticas de la propia célula alveolar, usando como propio el citoesqueleto membranoso de la célula huésped. (Corbellini, 2015)

#### **2.1.4.2 *Escherichia coli***

La mastitis medioambiental es causada por bacterias coliformes, donde la mayoría son clasificadas como *Escherichia coli*, la cual es una bacteria anaerobia facultativa, gramnegativa.

La mastitis originada por estas bacterias es habitualmente esporádica y las señales clínicas varían desde una mastitis leve hasta cuadros clínicos muy severos que pueden ser mortíferos. (Bedolla, 2017) La infección con estos gérmenes se produce por el descuido en las medidas profilácticas, como la deficiente higiene de los pezones (lavado o presellado) y no sellado de los pezones, la aplicación de la terapia de la vaca seca (TVS) sin una desinfección del esfínter del pezón y la introducción total de la cánula. (Calderón, 2008). Generalmente produce mastitis clínica en el transcurso de horas, no infectando crónicamente a la glándula mamaria. (Corbellini, 2015)

## **2.2 Alternativas antibióticas**

### **2.2.1 Plantas con propiedades antibióticas**

La búsqueda de fármacos alternativos basados en las propiedades farmacológicas y fitoquímicas de las plantas se han convertido en una prioridad en la investigación de la salud del ganado (Ríos, J. 2005). Además, los altos costos de las drogas sintéticas y sus diversos efectos secundarios justifican la búsqueda de productos alternativos a partir de plantas. Estos productos, además de un bajo costo de fabricación, pueden tener otros beneficios observados, como por ejemplo la *Artemisia annua* es una alternativa coccidiostática, que también genera aumento en la ganancia de peso, mejora la tasa de producción de huevos, el tamaño y la intensidad de la yema de huevo. Además, no se han documentado informes de resistencia

antimicrobiana a estos fitoquímicos, probablemente debido a sus múltiples mecanismos de acción que potencialmente impiden la selección de bacterias resistentes. (Upadhyay, A, 2014).

En esta nueva era ha surgido la necesidad de recurrir a alternativas eficaces y naturales para controlar infecciones bacterianas por lo cual se ha recurrido a la fitoquímica y fitofarmacología de las plantas. El alto porcentaje de metabolitos secundarios de las plantas brindan una gran posibilidad de hallar moléculas bioactivas con actividad biológica, por esa razón se puede considerar a las plantas como una fuente primordial de sustancias activas con propiedades antibacterianas. (Chang *et al.*, 2013 cita a Jawetz *et al.*, 2002)

A pesar de los resultados alentadores de varios estudios, se requieren más estudios incluyendo plantas nativas o aclimatadas para cubrir áreas geográficas distintas con el fin de tener una gran disponibilidad y un bajo costo de elaboración para estos productos.

### **2.2.2 Extracción.**

Se conoce por extracción a la disolución de una mezcla de sustancias por el desprendimiento de cada componente, apoyándose de disolventes para obtener los componentes deseados, como: el extracto en su disolvente y su residuo. (UNP, 2013)

Una extracción con disolventes orgánicos produce un rendimiento eficaz, debido a que estos solventes penetran en el material vegetal, obteniendo los componentes de importancia del molde herbáceo, como: grasas, pigmentos, ceras, elementos volátiles, entre otros. Es importante considerar que al momento de realizar una extracción la temperatura a la que es sometida el solvente con la materia vegetal sea a bajos grados, ya que una elevada temperatura podría descomponer dichos componentes y sus principios activos. (M. Paz Arraiza Bermúdez –Cañete, 2009).

### 2.2.2.1 Extracción Por Solución, sólido – líquido

La extracción sólido líquido: cuando se trata de una muestra sólida, primero se la tritura y de preferencia la planta debe pasar por un proceso de secado y a continuación, se extraen los metabolitos mediante un disolvente con el que sean muy solubles, con el fin que los distinga de las sustancias presentes en la especie vegetal, que han de ser muy insolubles en ese disolvente (M. Paz Arraiza Bermúdez –Cañete, 2009)

### 2.2.2.2 Maceración Dinámica

Se entiende por maceración dinámica al contacto prolongado durante cierto tiempo del material crudo con el solvente constituyendo un conjunto homogéneamente mezclado en el cual el solvente actúa simultáneamente sobre todas las proporciones de la planta, circulando en todas las direcciones que disuelven sus principios activos hasta producirse una concentración en equilibrio con la del contenido celular. (Carrión y García, 2010).

### 2.2.3 *Solanum nigrum*

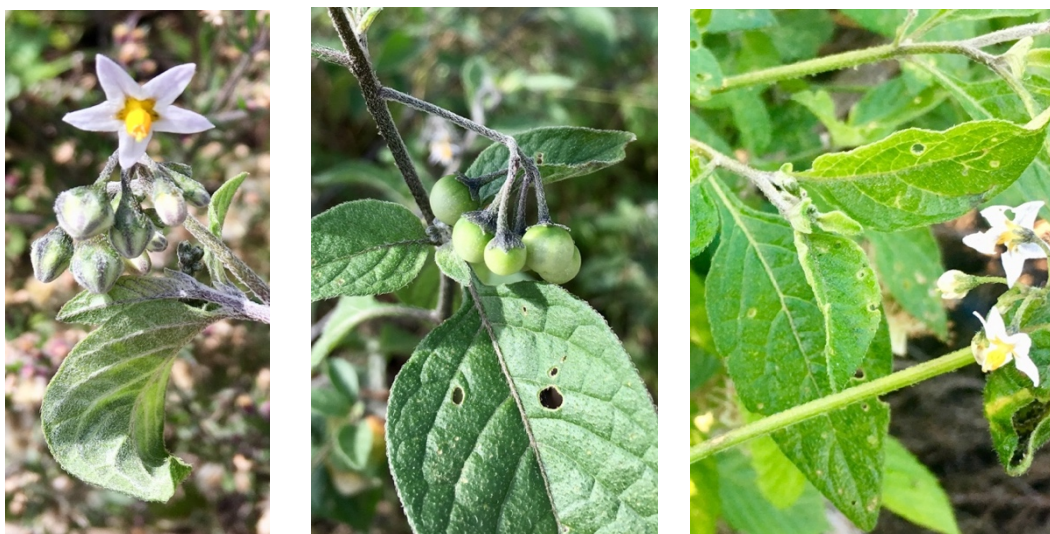


Figura 1. *Solanum nigrum* (Hierba Mora)

Fuente: La Autora

**Nombre común:** Hierba mora, tomatillos del diablo

**Nombre científico:** *Solanum nigrum*

Es una planta nativa de Centroamérica y crece en todo el trópico americano. Su nombre científico es *Solanum nigrum* L., conocida también como hierba mora y pertenece a la familia Solanaceae. L. (Realpe, 2014 cita a Méndez, 2008.)

### **2.2.3.1 Taxonomía**

**Reino:** Plantae

**Subreino:** Tracheobionta

**Filo:** Magnoliophyta

**Clase:** Magnoliopsida

**Subclase:** Asteridae

**Orden:** Solanales

**Familia:** Solanaceae

**Género:** Solanum

**Especie:** *Solanum nigrum*

### **2.2.3.2 Generalidades**

La *Solanum nigrum* es una planta originaria de América, perenne y anual, tipo arbustiva, sus hojas son ovaladas terminando en punta, con sus extremos dentados; su inflorescencia es de color blanco y sus frutos presentan una baya globular de color verde cuando la planta es joven, que a la maduración la baya cambia a un color negro. Esta especie crece desde una altitud de 1300 msnm. (Escobar, 2017)

Escobar, 2017 cita a Méndez, 2008, indicando que *Solanum nigrum* opta por suelos ricos en nitrógeno, sueltos y húmicos. Al ser una planta cosmopolita se presenta terrenos incultivables, jardines y en todo tipo de cultivos herbáceos, especialmente en cultivos de hilera.

Según Realpe, (2014) a esta planta se le otorga propiedades curativas, entre la que más predomina es su característica analgésica y sedante. Al mismo tiempo, *Solanum nigrum* es una planta con efecto anti-prurito, pero cabe recalcar que en dosis medianas o altas puede tener cierto grado de toxicidad. (p. 61)

### **2.2.3.3 Características**

Según Fonnegra y Jiménez (2007) se determina:

- Subarbusto herbáceo
- Altura: 10 cm hasta un 1m.
- Hojas: alternas, en forma romboidales a elípticas, 13 cm de longitud por 6 cm de ancho en la mitad de la hoja, bordes con ligeras ondulaciones.
- Flores: blancas, pequeñas, agrupadas en corimbos axilares con 3 a 6 flores en cada corimbo, cada flor contiene 5 pétalos doblados hacia el exterior.
- El cáliz: con vellosidad glabrescente, tiene 5 sépalos.
- Frutos: bayas globosas verde y negra (en su madurez), con muchas semillas, de 5 a 10 mm de diámetro.
- Periodo de crecimiento: planta anual

### **2.2.3.4 Usos**

- Es usada en tratamientos tópicos como emoliente, narcótico, analgésico, sedante, antiséptico, cicatrizantes, antiinflamatorio y antineurálgico. (Fonnegra y Jiménez, 2007)
- La infusión de hojas y frutos se usan en cataplasmas contra dolores articulares. (Fonnegra y Jiménez, 2007)
- Las hojas de la planta fresca, se muelen y se aplican en forma de compresas sobre los golpes. (Sánchez, 2009)

### **2.2.3.5 Estudios Fitoquímicos**

Sánchez (2009) argumenta que las partes aéreas de *Solanum nigrum* incluyendo los frutos, contienen los alcaloides esteroidales (solamargina, 12 beta-hidroxi solasodina, y alfa y beta-solasodina) y solamente en los frutos se han identificado la solanocapsina, los derivados acetil-hidroxilado y metilado de la solasodina, la solasonina y el tomatidenol.

Otros componentes detectados en esta planta son flavonoides (rutina), taninos, saponinas, ácido cítrico, ácido linoleico, ácido palmítico y nitratos.

### **2.2.3.6 Farmacología**

Sánchez (2009), asegura que una fracción de alcaloides y de lactonas sesquiterpénicas obtenidas de las partes aéreas de la planta presentó actividad antibacteriana frente a *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*. De igual forma, los extractos etanólico y metanólico, de la planta entera, fueron activos contra *Vibrio colera*, *Bacillus anthracis*, *Proteus vulgaris*, *S. aureus* y *Candida albicans*. Se observó actividad antiviral frente al virus de la influenza, con un extracto acuoso del fruto.

## CAPÍTULO III

### Materiales y Métodos

#### 2.3 Materiales

##### a) Material Biológico

- Bacterias (*Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*)
- Planta (*Solanum nigrum*)

##### b) Laboratorio

- Cuarto frío
- Papel periódico
- Papel filtro
- Cartón
- Tablas triplex
- Secadora
- Deshidratador
- Triturador Restsch ®
- Incubadora Shaking NB-205L N\_BIOTEK®
- Rotavapor BUCHI ®
- Vasos de precipitación
- Embudo
- Papel filtro
- Pinzas
- Autoclave N\_ BIOTECK ®
- Tubos de ensayo
- Cajas Petri
- Incubadora N\_ BIOTECK ®
- Estufa Memmert UN
- Calibrador electrónico TRUPER ®
- Pipeta automática
- Balanza electrónica

- Espectrofotómetro de Microplaca Epoch <sup>TM</sup> de Biotek instruments
- Cámara de Neubauer BOECO Germany
- Microscopio de micros AUSTRIA

#### **c) Reactivos**

- Agua destilada
- Metanol Merck KgaA
- Agar Nutritivo
- Caldo Nutritivo
- Penicilina G

## **2.4 Metodología**

### **2.4.1 Diseño experimental**

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con un arreglo factorial de A x B, donde el factor “A” corresponde a un antibiótico específico (penicilina G), al solvente (metanol), y a las concentraciones del extracto (175mg / ml, 350mg / ml, 525mg / ml and 700 mg / ml) según lo mencionado por Ramírez, Castillo, Quintana, Torres, Villegas y Díaz (2015). El factor “B” corresponde a dos cepas de bacterias: *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, con tres repeticiones de cada tratamiento.

#### **2.4.1.1 Características del Experimento**

**Factor A:** Antimicrobiano

A1 Metanol (control negativo)

A2 Penicilina G (control positivo)

A3 Extracto con una concentración al 25% = 175 mg/ml

A4 Extracto con una concentración al 50% = 350 mg/ml

A5 Extracto con una concentración al 75% = 525 mg/ml

A6 Extracto con una concentración al 100% = 700 mg/ml

**Factor B: Bacterias**

B1 *Escherichia coli*

B2 *Staphylococcus aureus*

Tabla 1  
*Diseño experimental*

<b>F.V.</b>	<b>GL</b>
Total	35
Tratamiento	11
Factor A	5
Factor B	1
Int AxB	5
Error	24

Nota. FV fuentes de variación; GL grados de libertad

En caso de detectarse diferencia estadística significativas entre tratamientos se utilizará prueba de tukey al 5%.

**2.4.2 Muestras para entrevistas a pequeños ganaderos de Imbabura.**

Si bien existe un estimado de Unidades de Producción Animal (UPAs), no se posee un dato claro que pueda discernir entre pequeños y grandes ganaderos, para lo cual se aplicó la “fórmula para determinación de muestra” según Fernández, C (2004) estableciendo de esta manera realizar 55 entrevistas por cantón en la provincia de Imbabura (Ibarra, Otavalo, Cotacachi, Antonio Ante, Pimampiro y Urququí) dando un total de 330 entrevistas, con el fin de identificar las plantas medicinales que usan frecuentemente los ganaderos en el caso de mastitis en su ganado lechero. (Anexo 1)

$$n = \frac{Z^2 Pq}{d^2}$$

Donde:

Z= nivel de confianza

P= probabilidad de éxito, o proporción esperada

Q= probabilidad de fracaso

D2= precisión

Con un 90% de Nivel de Confianza y 10% de error se determina que:

$$n = \frac{Z^2 Pq}{d^2}$$

$$n = \frac{1,645^2 * 0,5 * 0,5}{0,1^2}$$

$$n = 54,1$$

$$n = 55 \text{ por cantón}$$

Las trescientos treinta (330) entrevistas se realizaron de manera aleatoria en los seis cantones de la provincia de Imbabura, como se observa en el Anexo 2. Posteriormente se tabuló los datos obtenidos que permitieron seleccionar la planta más usadas en mastitis bovina, la especie vegetal *Solanum nigrum* (Hierba Mora).

#### **2.4.2.1 Preparación de extractos de *Solanum nigrum* (Hierba Mora)**

#### **2.4.2.2 Recolección**

Se realizaron tres recolectas de *Solanum nigrum* en el Corredor Periférico Sur de la ciudad de Ibarra (N 0° 19'48"; W 78° 09'14" a 2200 m.s.n.m) Anexo 3. Las cuales se higienizaron y posteriormente las partes marchitas se desecharon, obteniendo un peso de 327,20; 314,68g

y 339,78g, respectivamente, preparando el material para su extracción en los laboratorios de la PUCE-SI.

#### 2.4.2.3 Secado Mecánico de *Solanum nigrum*

Se llevó a cabo el método de secado, conforme lo publicado por Escobar (2007) en su investigación de estudio in vitro del efecto inhibitorio del extracto de hierba mora (*Solanum Nigrum*) sobre el *Streptococcus Mutans*.

Para la preparación del extracto se tomó la parte aérea de la planta: hojas, tallos, flores y frutos; las cuales en el Herbario de la PUCE-SI se desinfectaron rociando alcohol potable, para posteriormente prensar la planta en papel periódico, papel filtro y tablas triplex (Figura 2). A continuación, se envolvió el paquete prensado en funda plástica para ingresar a cuarentena en el cuarto frío por un periodo de 48 horas a  $-10^{\circ}\text{C}$ .



Figura 2. Prensado de *Solanum nigrum*

Fuente: La Autora

Transcurrida la cuarentena se procedió a secar la planta por cuatro horas aproximadamente a  $30^{\circ}\text{C}$ , tomando en cuenta que las hojas debían presentar una textura suave al terminar el secado (Figura 3). Es importante mencionar que la humedad determinada en la planta fue de 78,37%.



*Figura 3.* Proceso de secado

Fuente: La Autora

Posteriormente, se retiró la planta de la prensa y se separó cada parte de ella para someterla al deshidratador por 20 minutos (Figura 4), para luego pulverizar la muestra vegetal en un triturador, resultando un peso de 95,42; 93,86 y 96,99g de planta seca y pulverizada en cada recolección. (Figura 5)



*Figura 4.* Deshidratador

Fuente: La Autora



*Figura 5.* Triturador

Fuente: La Autora

#### **2.4.2.4 Maceración Dinámica**

Se procedió a macerar las muestras de 95,42 g; 93,86 g y 96,99 g de la planta, siguiendo el siguiente procedimiento:

- Se sumergió la muestra vegetal en metanol al 99% en vasos de precipitación.

- Se agregó 1 litro de metanol por cada 100 g de la planta triturada y a continuación se tapo cada vaso con algodón.
- Encender el Shaking NB-205L N\_BIOTEK® (Figura 6) y se configuró su temperatura a 40 ° C, con un movimiento continuo de 50 rpm por 24 horas, con los comandos ubicados en la base del equipo.
- A continuación, se colocó los frascos dentro de las pinzas del agitador y se procedió a iniciar con la maceración.



*Figura 6. Agitador*

Fuente: La Autora

#### **3.2.3.4 Obtención del extracto de *Solanum nigrum*.**

Transcurridas las 24 horas de maceración se filtró la muestra vegetal (Figura 8) para luego ser sometida al Rotavapor BUCHI ® (Figura 9), en donde el equipo cumplió con la función de separar el solvente del extracto por medio de la evaporación del metanol.



*Figura 7.* Filtración

Fuente: La Autora

El rotavapor (Figura 8) lleva a cabo destilaciones de una sola etapa de forma rápida y cuidadosa con el producto. La base de este método es la evaporación y la condensación de disolventes utilizando un matraz de evaporación rotativo bajo vacío. Destilar productos bajo vacío incrementa el rendimiento y ayuda y proteger los productos. (BUCHI ®, 2009)

Para este proceso se siguió la siguiente secuencia:

- Se colocó agua destilada en el baño calefactor, la cual debe permanecer a 40°C para evitar la descomposición de los principios activos de la planta.
- El agua de refrigeración debe fluir por el condensador.
- Se introdujo la solución en el matraz de evaporación y se conecta al rotavapor, simultáneamente se enciende la bomba de vacío.
- Con ayuda del elevador rápido se introdujo el matraz en el baño calefactor y se encendió el interruptor de velocidad de rotación, ajustando la rotación del matraz a una velocidad moderada.
- Aproximadamente de cinco a seis horas se logró obtener la evaporación del alcohol en el matraz receptor, y el extracto deseado en el matraz. (Figura 9)



*Figura 8.* Rotavapor

Fuente: La Autora



*Figura 9.* Recolección del extracto

Fuente: La Autora.

### **3.3 Concentración del extracto**

Posterior al proceso de evaporación del solvente se obtuvo 10,95g; 12,35g y 12,05g, resultando un total de 35,35g del extracto de *Solanum nigrum*. En donde, a los 35,35g se lo

disolvió en 50,5 ml de metanol para realizar su posterior análisis *in vitro* (vale indicar que se añadió esta cantidad de metanol para poder disolver el extracto seco).

Para el análisis de actividad antibiótica sobre las bacterias de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, se procedió a realizar las diluciones del extracto en metanol, como se observa en la Tabla 2.

Tabla 2

*Concentraciones de extractos de Solanum nigrum empleadas en los tratamientos*

Concentraciones (mg/ml)	
100%	700
75%	525
50%	350
25%	175



Figura 10. Concentración del extracto

Fuente: La Autora

### 3.4 Preparación de microorganismos de ensayo

Se realizó una replicación de las bacterias de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* de investigaciones realizadas en los laboratorios de la PUCE-SI, las cuales fueron conservadas bajo refrigeración a 4°C, donde se siguió el siguiente procedimiento para cada bacteria, según lo publicado por Santambrosio, Ortega y Garibaldi (2009).

- Se preparó 80 ml de Agar Nutritivo para ser dispensado en tres cajas Petri.
- 200 ml de Caldo Nutritivo distribuidos en 20 tubos de vidrio con capacidad para 10 ml cada uno.
- Posteriormente se tapó cada tubo con algodón para ser esterilizado en el Autoclave N\_ BIOTECK® por una hora y media, junto con las cajas Petri previamente desinfectadas y envueltas en papel periódico.
- Con la ayuda de papel periódico y alcohol se desinfecta la cámara de flujo laminar para evitar una posible contaminación en la duplicación de bacterias.
- Una vez terminado el tiempo en el autoclave se procede a extraer los materiales del autoclave y a trabajar en la cámara de flujo laminar.
- Se enciende el mechero dentro de la cámara.
- Con la ayuda de una micro pipeta se extrajo 100 µl de las bacterias de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, conservadas en microtubos en los laboratorios de la PUCE-SI.
- Se colocó la muestra en un contorno de la caja Petri.
- Con un asa previamente esterilizada se extiende la bacteria en dos sectores de la placa formando estrías sobre la superficie del agar, siguiendo un patrón. De la misma manera se realizó este proceso en las dos cajas Petri
- Se sellaron las cajas con Parafilm y se colocan de manera invertida en una estufa por 24 horas a 37°C (Figura 11).
- Se procedió a examinar las muestras, y se realizó un raspado con un asa limpia para ser colocado en los tubos de ensayo con caldo nutritivo, 10 tubos para *Escherichia coli* y los otros 10 tubos para *Staphylococcus aureus* (Figura 12).
- Al cabo de 24 horas se obtiene las bacterias duplicadas en un cultivo líquido, las cuales fueron conservadas bajo refrigeración a 4°C.

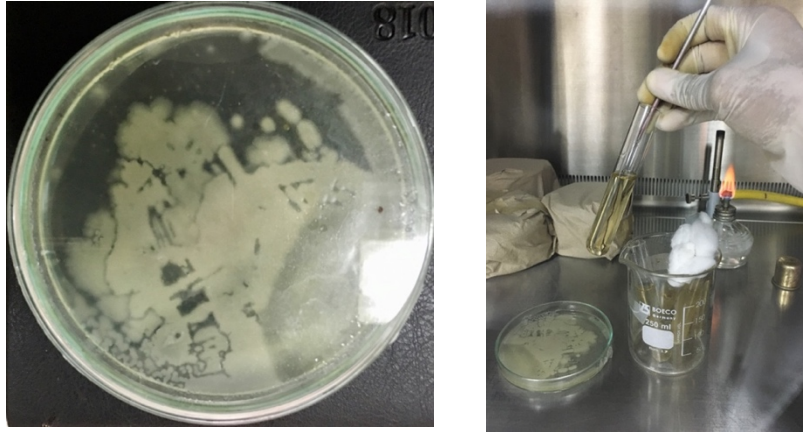


Figura 11. Técnica de siembra por estrías



Figura 12. Bacterias de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

Fuente: La Autora

### 3.5 Antibiograma

Una vez obtenidas las bacterias se procedió a realizar antibiogramas con cada concentración, a continuación, su respectivo procedimiento:

- Se preparó discos de papel filtro para ser empapados en el extracto.
- Se elaboró 720 ml de Agar Nutritivo en un frasco Boeco con capacidad para 1000 ml.

- Luego se desinfectó 36 cajas Petri y se las envolvió en papel periódico para ser esterilizados en el Autoclave N\_ BIOTECK ® juntos con un par de pinzas y los discos de papel filtro. (Figura 13).
- Se dispensó el Agar Nutritivo en las 36 cajas y se deja enfriar por un momento hasta que el agar tome una consistencia gelatinosa.
- Con la ayuda de un hisopo se empapa de la bacteria de *Escherichia coli* que se encuentran en los tubos, luego se inocula en las cajas designadas a esta bacteria (Figura 14)
- Se realizó el mismo procedimiento para las bacterias de *Staphylococcus aureus*.
- Se colocó los discos de papel filtro dentro de los frascos cada concentración del extracto.
- A continuación, con unas pinzas estériles se tomó los discos y fueron colocados en las cajas Petri que ya fueron inoculadas por las bacterias. (Figura 15)
- Se colocó cuatro discos en cada caja.
- Finalmente se sellan las cajas con cinta Parafilm y fueron colocados en una estufa a 37°C por 24 horas como se observa en la Figura 16. Como grupo testigo, se utilizó discos empapados con el solvente (metanol) y discos de penicilina G.



Figura 13. Autoclave N\_ BIOTECK ®

Fuente: La Autora

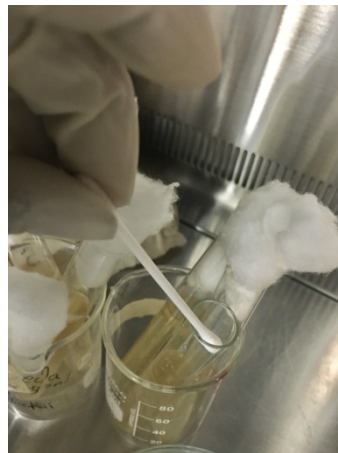
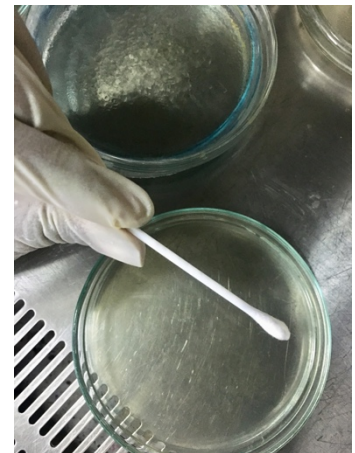
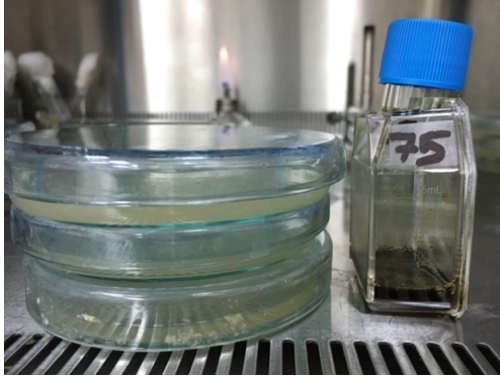


Figura 14. Inoculación de bacterias

Fuente: La Autora





*Figura 15.* Discos de papel filtro empapados con las concentraciones del extracto de *Solanum nigrum* en placas inoculadas.



*Figura 16.* Incubación de las bacterias  
Fuente: La Autora

Tabla 3  
*Distribución de los tratamientos*

<b>Tratamientos</b>		<b>Bacterias</b>
T1	Discos de metanol	<i>Escherichia coli</i>
		<i>Staphylococcus aureus</i>
T2	Discos de penicilina G.	<i>Escherichia coli</i>
		<i>Staphylococcus aureus</i>
T3	Discos de extracto al 25%	<i>Escherichia coli</i>
		<i>Staphylococcus aureus</i>
T4	Discos de extracto al 50%	<i>Escherichia coli</i>
		<i>Staphylococcus aureus</i>
T5	Discos de extracto al 75%	<i>Escherichia coli</i>
		<i>Staphylococcus aureus</i>
T6	Discos de extracto al 100%	<i>Escherichia coli</i>
		<i>Staphylococcus aureus</i>

Fuente: La Autora

Para la determinación de la actividad antibacteriana de la *Solanum nigrum* (Hierba Mora) se realizaron seis tratamientos de tres repeticiones con cada bacteria, como se muestra en la Tabla 3.

### 3.5.3 Medición de los halos de inhibición.

Al finalizar las 24 horas de incubación de las bacterias, se procedió a medir la zona de inhibición de cada disco con las concentraciones del extracto de *Solanum nigrum* y de los testigos, con la ayuda de un calibrador como se observa en la Figura 17, para luego analizar los datos obtenidos.

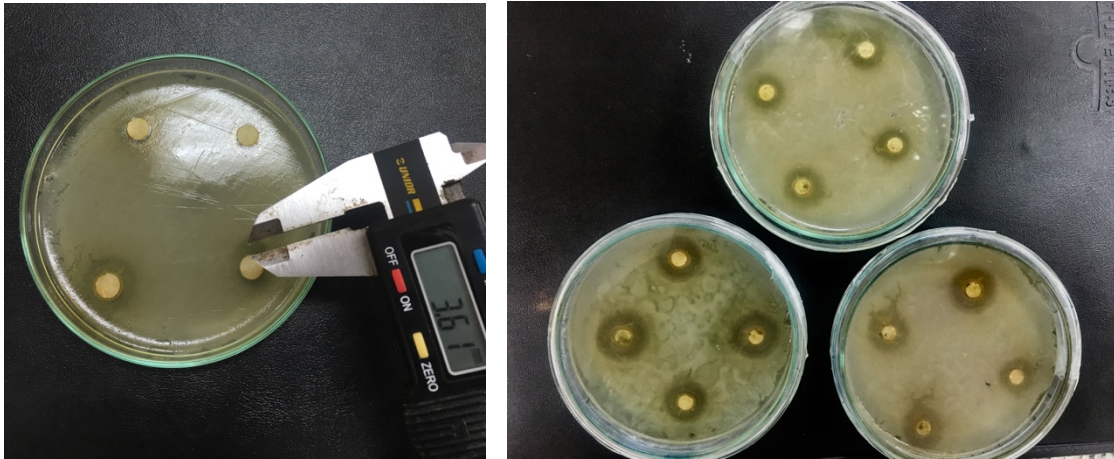


Figura 17. Medición de los halos de inhibición de cada tratamiento.

### 3.6 Control de Cuantificación de bacterias: Método de Espectrofotometría y Recuento Directo en Cámara de Neubauer.

En bioensayos la concentración de la biomasa microbiana es un parámetro importante que debe estimarse, para lo cual se realizó un control por doce horas consecutivas con cada cepa bacteriana experimentada, en los cuales se incluyeron los siguientes procesos: métodos de turbidimetría y recuento directo en cámara de Neubauer.

Para la elaboración de dichos controles se utilizaron las mismas concentraciones del extracto de la Tabla 2, junto con 100 $\mu$ L de *Escherichia coli* y 100 $\mu$ L *Staphylococcus aureus*, en 5ml de caldo nutritivo, según lo menciona Granados (2014), ya que representa el límite para realizar una cuantificación bacteriana.

Tabla 4  
 Concentraciones del extracto de *Solanum nigrum* para el control de cuantificación de bacterias.

Extracto de <i>Solanum nigrum</i>	0 ml	700 mg/ml	525 mg/ml	350 mg/ml	175 mg/ml
Caldo Nutritivo	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml
<i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L

Fuente: La Autora.

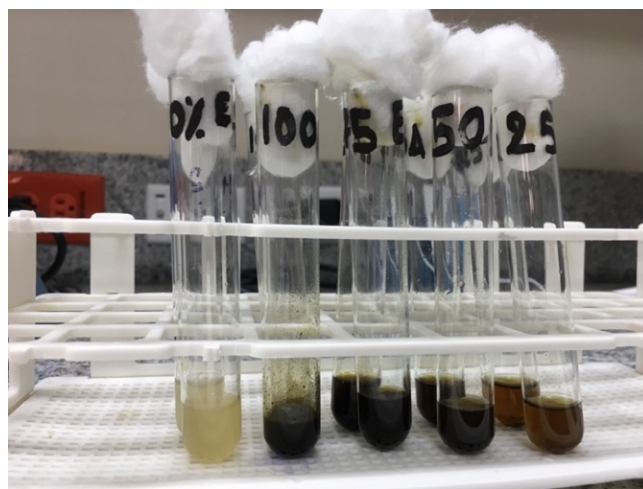


Figura 18. Concentraciones del extracto junto con las bacterias de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

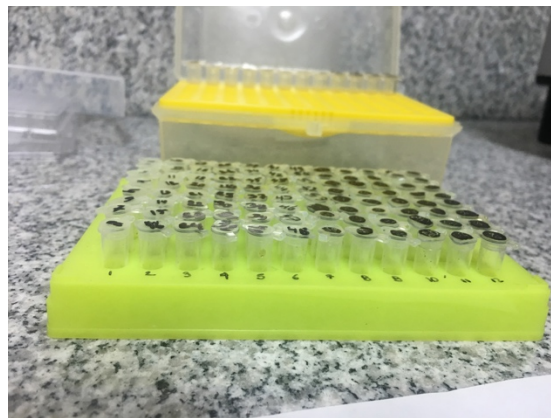
Fuente: La Autora.

### 3.6.3 Espectrofotometría

El espectrofotómetro cumple con la función de medir la cantidad de luz que atraviesa un medio líquido, para así determinar la turbidez de una suspensión bacteriana, ya que la proporción de luz diseminada en dicha suspensión es directamente proporcional al número de células y al crecimiento bacteriano. Cabe recalcar que el crecimiento bacteriano conlleva a un aumento del número de células. (Aquiahuatl, Volke, Ramírez, Salazar, Prado y Shirai, 2010)

Para la lectura de espectrofotometría se llevó a cabo el siguiente proceso:

- Con la ayuda de una micropipeta se recolectó 50  $\mu$ l de cada concentración y se colocó en microtubos. Este procedimiento se realizó cada hora por 12 horas para lograr una lectura del crecimiento bacteriano (Figura 19).
- Al terminar cada recolección las muestras permanecieron en refrigeración a una temperatura de 4 ° para evitar su crecimiento.
- Al terminar las 12 horas de muestreo se introdujo los 50  $\mu$ l de cada microtubo en una placa del espectrofotómetro (Figura 20).
- Se prosigue a la lectura del espectrofotómetro, con una longitud de onda de 540nm según lo recomendado por la UNAM, ya que cuanto menor es la longitud de onda, más sensible es la medida, lo usual es entre 540 – 600 nm. Al ser un método no destructivo se puede realizar una curva de crecimiento bacteriano y ver como evoluciona el cultivo.



*Figura 19.* Microtubos

Fuente: La Autora



Figura 20. Espectrofotómetro de Microplaca Epoch™ de Bioteck instruments

Fuente: La Autora

#### 3.6.4 Recuento directo en cámara de Neubauer

El proceso de recuento ayuda a cuantificar el número de partículas, por ejemplo: bacterias, esporas fúngicas, polen por unidad de volumen en un medio líquido, entre otras, lo cual se realiza por conteo visual bajo un microscopio. (Aquiahuatl *et al.*, 2010).

Para el conteo celular se realizó los siguientes pasos, según lo recomendado por Bastidas, O. (2009). De Igual manera se llevó a cabo el conteo en doce horas para establecer una curva de crecimiento.

- 1. Preparación de la muestra.** - Dependiendo del tipo de muestra a medir, se prepara una concentración ideal para en recuento. El rango de concentración debe estar entre 250.000 células y 2,5 millones de células por mililitro, ya una concentración menor a 250.000 células/ml no es suficientemente fiable para una estimación de conteo celular, en cambio, al sobrepasar los 2,5 millones, se incrementa la posibilidad de cometer errores de conteo por su rápido crecimiento.

2. **Introducción de la muestra en la cámara de Neubauer.** – Primero se coloca el cubre objetos sobre la cámara, luego una vez preparada la dilución se toma 25 ul de la muestra con una micropipeta y manteniéndola en posición vertical se lleva hasta la cámara de Neubauer. Se coloca la punta de la pipeta entre el extremo del borde del cubreobjetos y la cámara, permitiendo que el líquido fluya entre ambos, asegurándose que la muestra entre correcta y uniformemente en la cámara de Neubauer.
  
3. **Preparación y enfoque del microscopio.** – Se coloca la cámara en la bandeja del microscopio fijándola con la pinza de sujeción, se enfoca y se busca los cuadros donde se vaya a realizar el conteo. Al realizar el recuento de células se debe tomar en cuenta que, si las células tocan el límite superior izquierdo del cuadro, deben contabilizarse; pero si las células tocan el límite inferior o derecho no se deben contar.
  
4. **Cálculo de concentración.** - Para determinar el número de bacterias presentes en cada concentración se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Número de células} = \frac{\text{Número de bacterias contadas} * 10.000}{\text{Número de cuadros}}$$

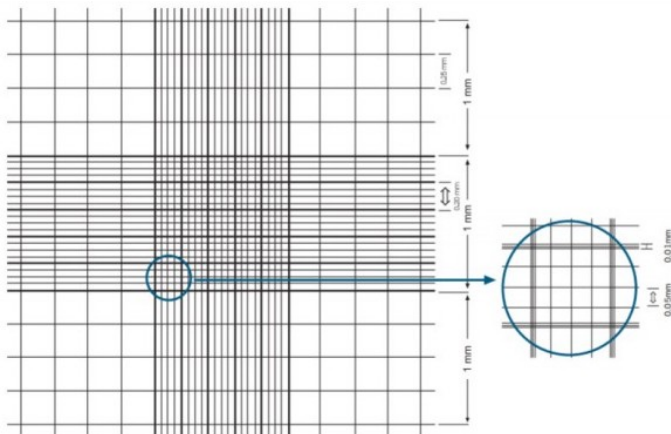


Figura 21. Cámara de Neubauer

Fuente: Aquiahuatl, M., Volke, T., Ramírez, F., Salazar, M., Prado, L., Shirai, K. (2010). Manual de prácticas del laboratorio de microbiología general.

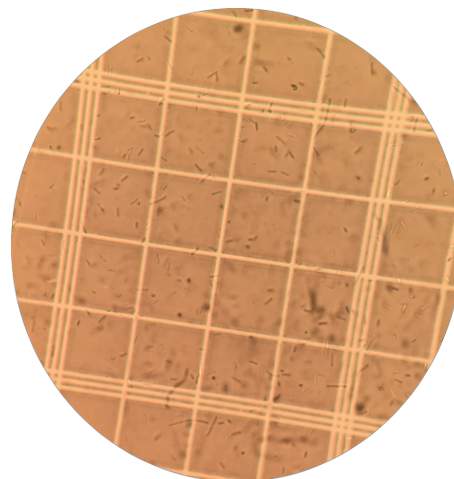


Figura 22. Visualización de las bacterias con el objetivo 40 X en la cámara de Neubauer.

Fuente: La Autora

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio se logró determinar cuál es la planta más utilizada por los pequeños ganaderos de Imbabura con respecto a la mastitis bovina, y se analizó in vitro el efecto antibacteriano que posee la planta sobre las bacterias de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

#### 4.1 RESULTADOS DE LA ENCUESTA

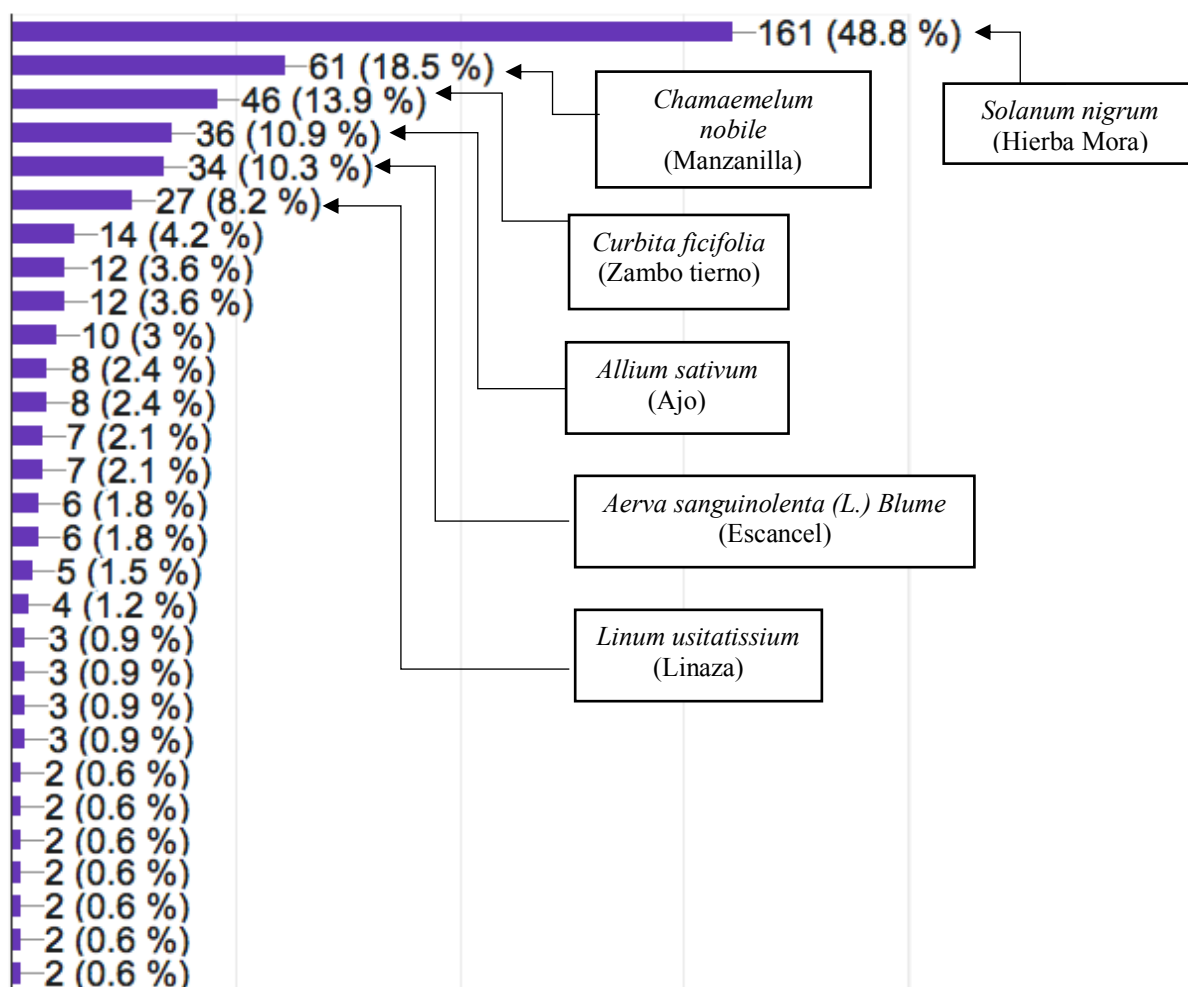


Figura 23. Plantas más utilizadas en el tratamiento para mastitis en la provincia de Imbabura según la encuesta realizada.

Fuente: Investigación de campo

- Mediante la aplicación de encuestas a los seis cantones de Imbabura se logró determinar que la planta más comúnmente usada por pequeños ganaderos en el tratamiento de mastitis bovina es la hierba mora conocida por su nombre científico como *Solanum nigrum*, con un 48.8 % de respuestas, y las plantas que le subsiguen son: la Manzanilla (*Chamaemelum nobile*) con el 18.5 %, Zambo tierno o seco (*Cucurbita ficifolia*) 13.9%, Ajo (*Allium sativum*) 10.9%, Escancel (*Aerva sanguinolenta* (L.) Blume) con el 10.3%, Linaza (*Linum usitatissimum*) obteniendo el 8.2%, Diente de león (*Taraxacum officinale*) 4.2%, Saúco (*Sambucus nigra*) con un 3.2%, Hoja de col 3,6%, Hinojo (*Foeniculum vulgare*) 3%, Tomillo (*Thymus vulgaris*) 2.4%, Zanahoria (*Daucus carota*) 2.4%, Hierba luisa (*Aloysia triphylla*) 2.1%, Toronjil (*Melissa officinalis*) 1.8%, Siempre viva (*Sempervivum tectorum*) 1.8%, Anguyuyu (*Taraxacum officinale*) 1.5%, Mosquera 1.2% y Hoja de higo con el 0.9% entre otras (Figura 23).

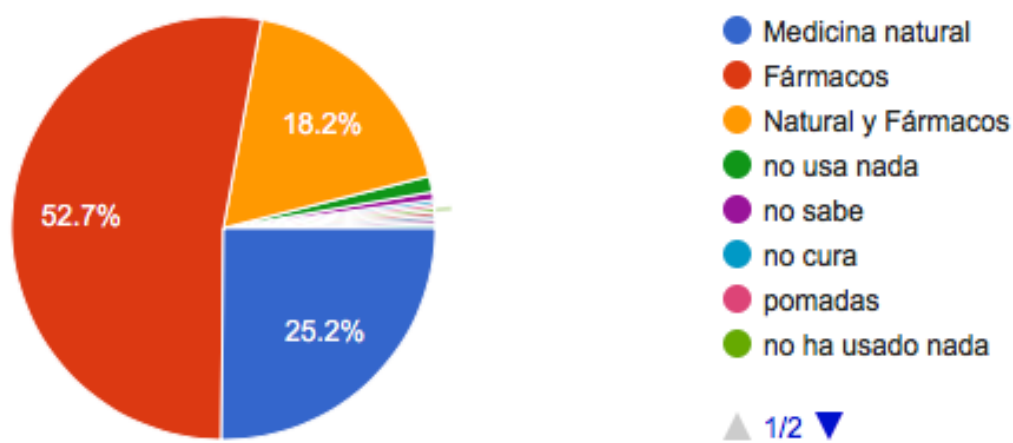


Figura 24. Tratamientos usados en bovinos con mastitis según la encuesta realizada.

Fuente: Investigación de campo

- En el presente estudio se comprobó que el 52,7% de los ganaderos usan fármacos para tratar la mastitis, el 18,2 % usa fármacos y medicina natural y el 25,5% práctica la medicina natural, es decir, que gran cantidad de ganaderos usan alternativas naturales para tratar la mastitis. (Figura 24).

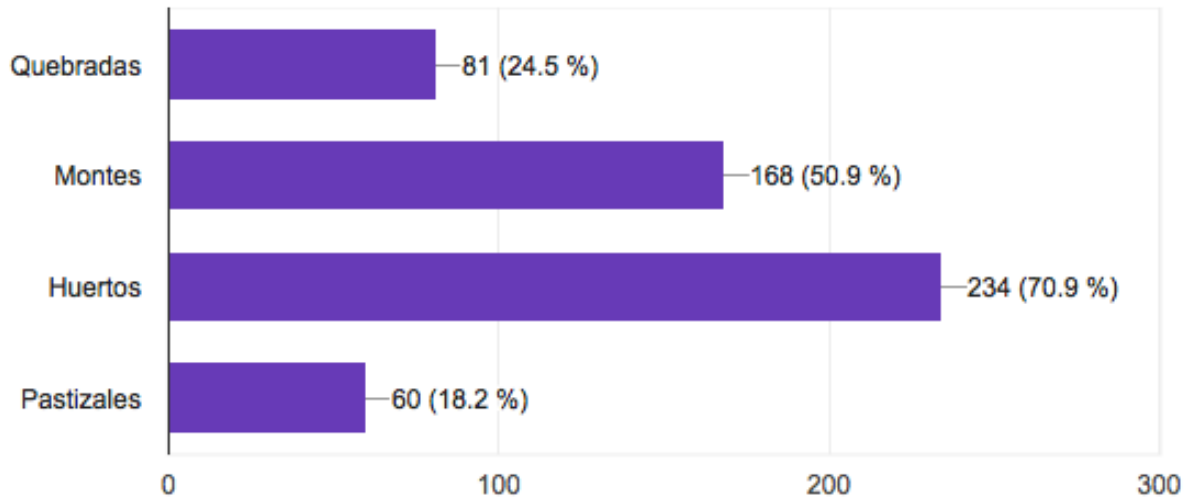


Figura 25. Zonas donde localizar Hierba Mora silvestre

Fuente: Investigación de campo.

- La hierba mora al ser una planta cosmopolita se la puede encontrar según el 24.5 % de los productores en quebradas, el 50.9 % afirma que en los montes, el 70.9 % en huertos y el 18.2% de ganaderos mencionan que se la puede encontrar en pastizales (Figura 25).

## 4.2 EVALUACIÓN IN VITRO

En la presente investigación se comprobó el efecto antibacteriano del extracto de *Solanum nigrum* en sus diferentes concentraciones sobre las bacterias de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Para la evaluación de la sensibilidad de los extractos con respecto a las bacterias se realizó antibiogramas, en los cuales se utilizó como medio de cultivo el Agar Nutritivo y al cabo de 24h después de la siembra de las bacterias con las respectivas concentraciones y testigos, se prosiguió a medir los halos de inhibición con un calibrador electrónico.

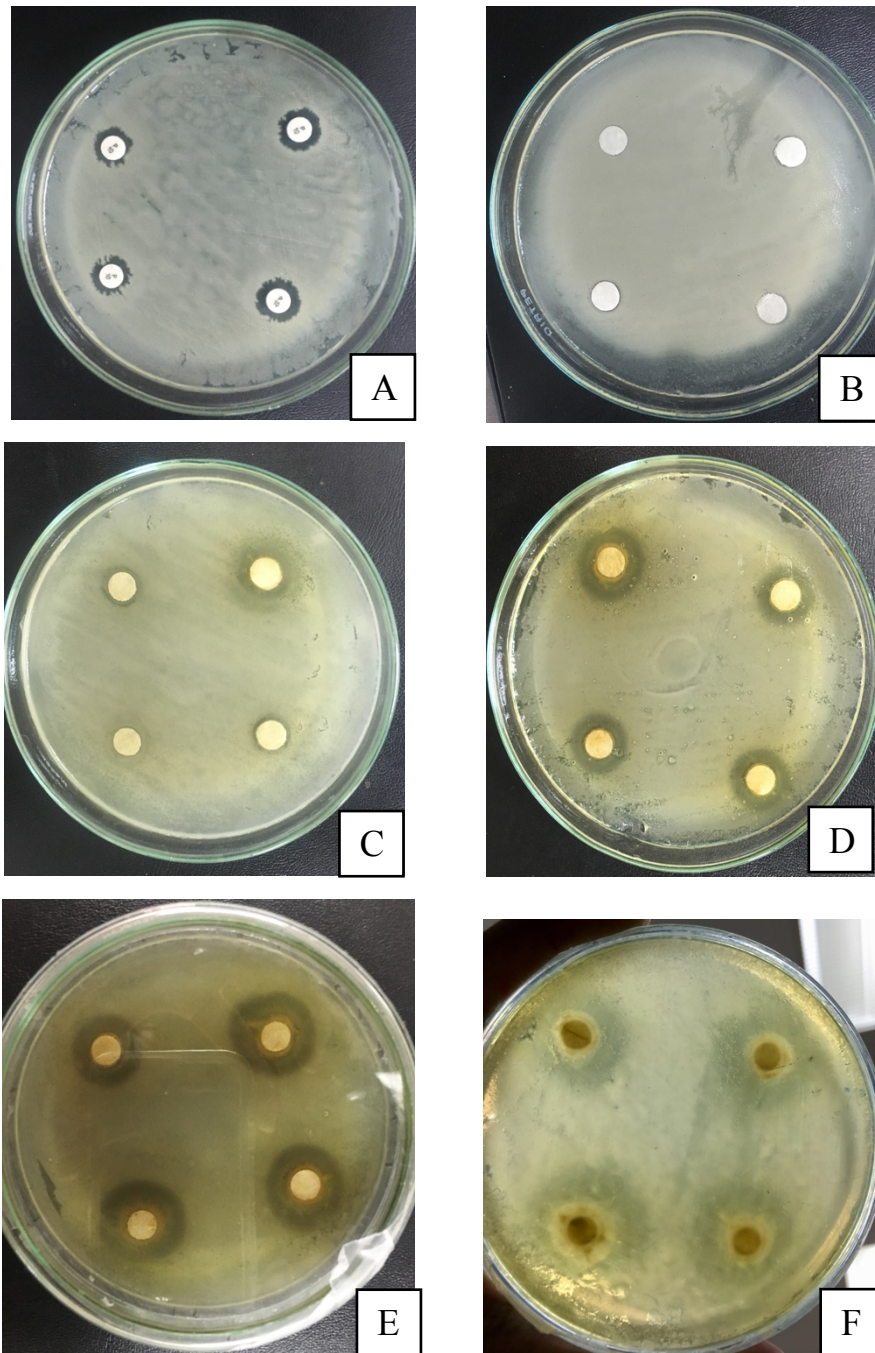


Figura 26. Actividad antimicrobiana del extracto metanólico de *Solanum nigrum* frente a *Escherichia coli*. A) Discos de penicilina (control positivo). B) Discos con metanol (control negativo). C) Discos con concentración al 175 mg/ml. D) Discos con concentración al 350 mg/ml. E) Discos con concentración al 525 mg/ml. F) Discos con concentración de 700 mg/ml .

En la Figura 26 se aprecian los halos de inhibición generados frente a *Escherichia coli*, de acuerdo al extracto metanólico de *Solanum nigrum*; donde: “A” corresponde a la actividad antimicrobiana de la penicilina, “B” compete a los discos de metanol, “C” a los discos con una concentración de 175 mg/ml, “D” al tratamiento con la concentración de 350 ml/mg, “E” al tratamiento de la concentración del 525 mg/ml y “F” a la concentración de 700 mg/ml.

Tabla 5  
*Medición de los halos de inhibición con los discos del extracto de Solanum nigrum y testigos frente a Escherichia coli.*

<b>Concentraciones de <i>Solanum nigrum</i></b>		<b>N</b>	<b>Promedio (mm)</b>
700 mg/ml		3	7,21
525 mg/ml		3	3,82
350 mg/ml		3	3,56
175 mg/ml		3	0,64
<b>Testigos</b>			
Metanol	(99.9%)	3	0,00
Penicilina G	10 U	3	2,80

Nota. 700 mg/ml (100%); 525 mg/ml (75%); 350 mg/ml (50%); 175 mg/ml (25%)

Fuente: La Autora

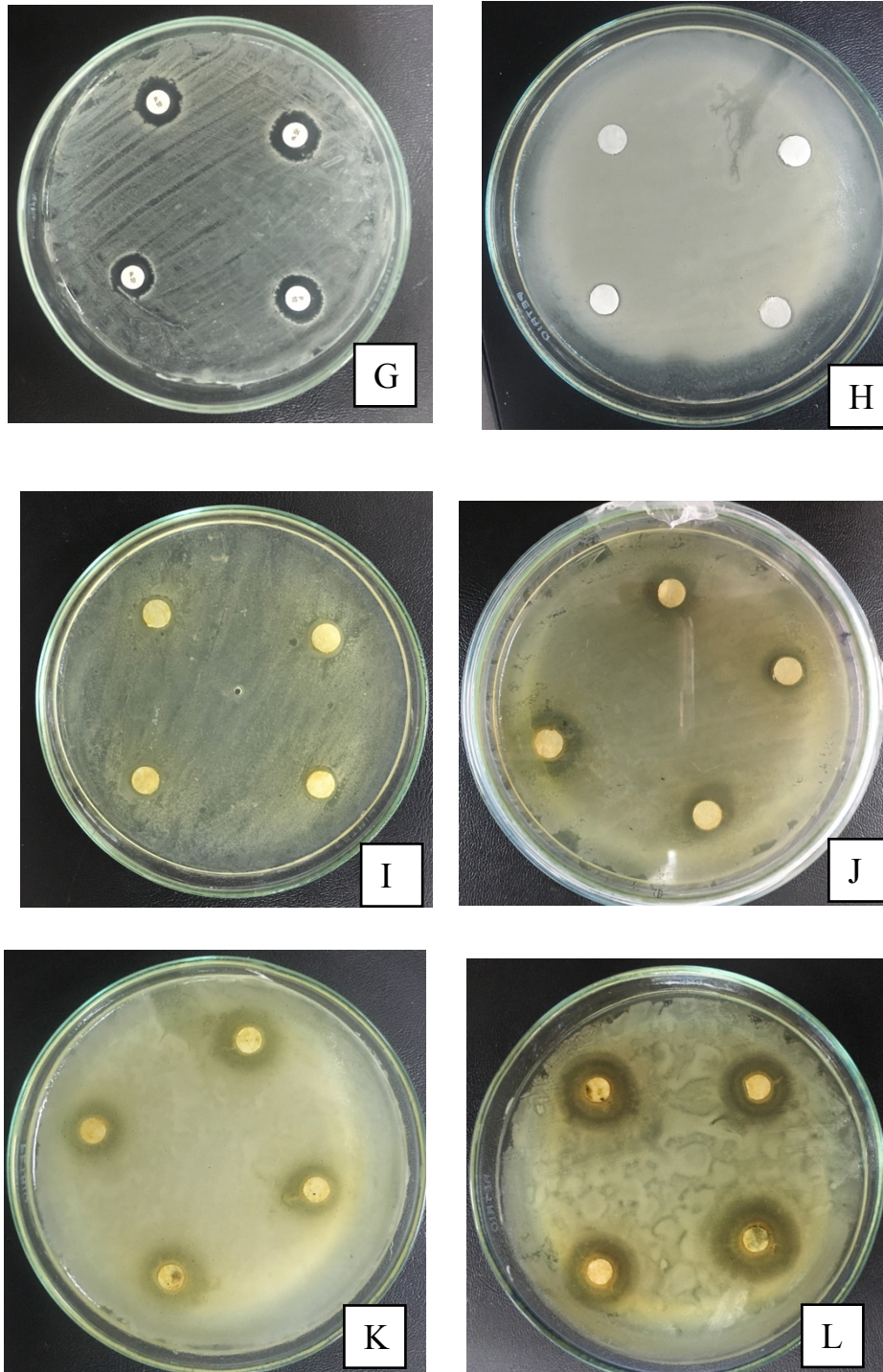


Figura 27. Actividad antimicrobiana del extracto metanólico de *Solanum nigrum* frente a *Staphylococcus aureus*. G) Discos de penicilina (control positivo). H) Discos con metanol (control negativo). I) Discos con concentración al 25%. J) Discos con concentración al 50%. K) Discos con concentración al 75%. L) Discos con concentración al 100%

En la Figura 27 se aprecian los halos de inhibición generados frente a *Staphylococcus aureus*, de acuerdo al extracto metanólico de *Solanum nigrum*; donde: “G” corresponde a la actividad antimicrobiana de la penicilina, “H” compete a los discos de metanol, “I” a los discos con una concentración de 175 mg/ml, “J” al tratamiento con la concentración de 350 ml/mg, “K” al tratamiento de la concentración del 525 mg/ml y “L” a la concentración de 700 mg/ml.

Tabla 6

*Medición de los halos de inhibición con los discos del extracto de Solanum nigrum y testigos frente a Staphylococcus aureus.*

<b>Concentraciones de <i>Solanum nigrum</i></b>		<b>N</b>	<b>Promedio (mm)</b>
700 mg/ml		3	3,72
525 mg/ml		3	2,02
350 mg/ml		3	1,91
175 mg/ml		3	1,32
<b>Testigos</b>			
Metanol	(99.9%)	3	0,00
Penicilina G	10 U	3	1,96

Nota. 700 mg/ml (100%); 525 mg/ml (75%); 350 mg/ml (50%); 175 mg/ml (25%)

Fuente: La Autora

- Los resultados obtenidos de las mediciones de los halos fueron organizados estadísticamente en el programa GraphPad Prism – 1 way ANOVA, en donde se logró establecer las diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos mediante la prueba de Tukey al 5%.

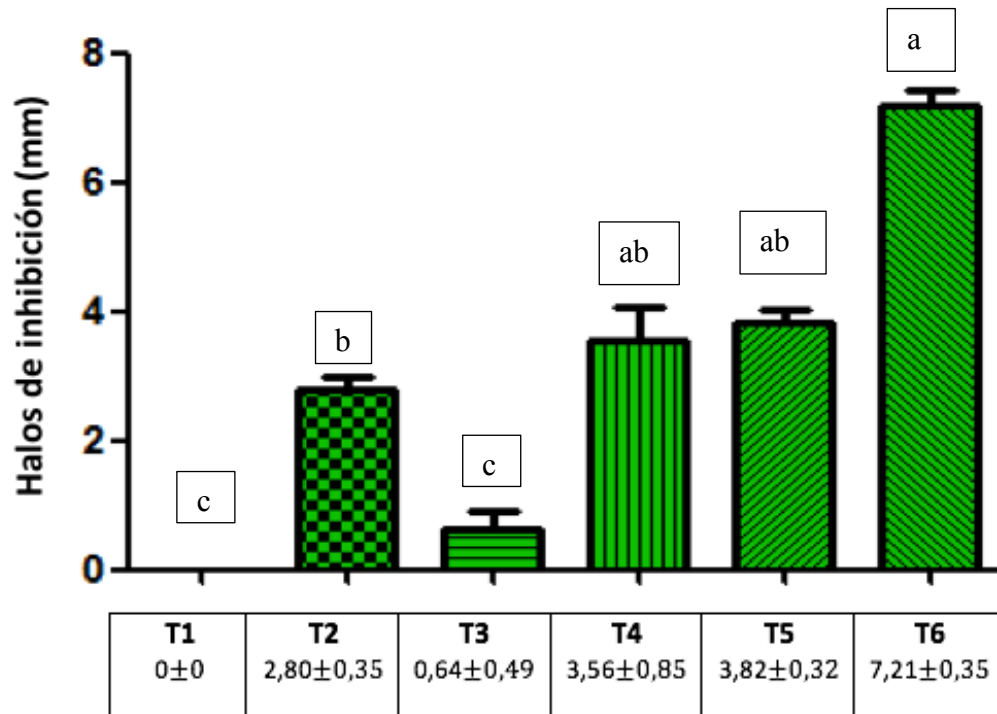


Figura 28. Prueba Tukey 5% medición de los halos de inhibición de los distintos tratamientos con *Escherichia coli*. T1) Metanol. T2) Penicilina. T3) 175mg/ml. T4) 350 mg/ml. T5) 525 mg/ml. T6) 700 mg/ml.

Fuente: La Autora

La prueba de Tukey al 5% para la medición de los halos de inhibición con las distintas concentraciones del extracto de hierba mora y testigos en *E. Coli* como se observa en la figura 28, determinó cuatro grupos de significancia. En el primer grupo se encuentran el tratamiento 6 (700 mg/ml.) con promedio de 7,21 mm de inhibición con respecto a la sensibilidad con las bacterias de *Escherichia coli*. En el segundo grupo el tratamiento 5 (525 mg/ml.) con promedio de 3,82 mm y el tratamiento 4 (350 mg/ml) con promedio de 3,56 mm de inhibición. El tercer grupo corresponde al tratamiento 2 (penicilina) con promedio de 2,80 mm. En el último grupo está el tratamiento 3 (175mg/ml.) con promedio de 0,64 mm y el tratamiento 1 metanol con promedio de 0 mm de inhibición.

Los resultados tabulados de la medición de los halos de inhibición, se muestran en la Figura 28. Se observa que existen diferencias estadísticas, recalando que el tratamiento que obtuvo

los mejores resultados fue el tratamiento 6 (700 mg/ml), seguido de los tratamientos 5 (525 mg/ml);4 (350 mg/ml); 2 (penicilina); 3 (175mg/ml) y por último el tratamiento 1 (metanol)

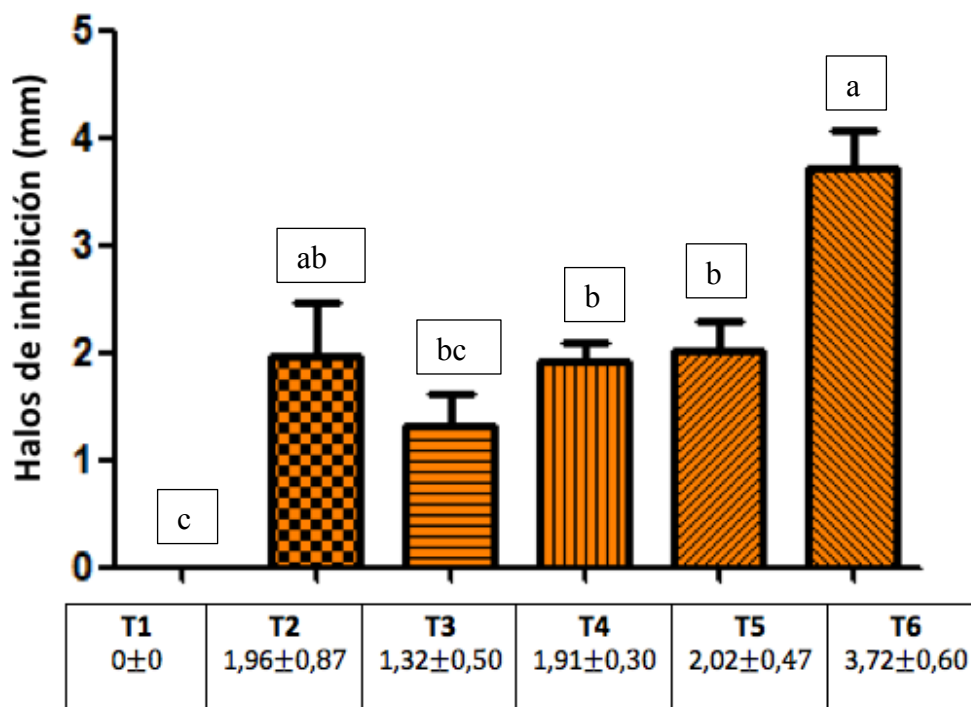


Figura 29. Prueba Tukey 5% con respecto a la medición de los halos de inhibición de los distintos tratamientos frente a la bacteria de *Staphylococcus aureus*. T1) Metanol. T2) Penicilina. T3) 175mg/ml. T4) 350 mg/ml. T5) 525 mg/ml. T6) 700 mg/ml.

La prueba de Tukey al 5 % para la medición de los halos de inhibición con las distintas concentraciones del extracto de hierba mora y testigos en de *S. aureus* como se observa en la Figura 29, determinó cuatro grupos de significancia. En el primer grupo se encuentra el tratamiento 6 (700 mg/ml). con un promedio en los halos de inhibición de 3,72 mm. En el segundo grupo se encuentra el tratamiento 5 (525 mg/ml) con un promedio de 2,02 mm de inhibición y el tratamiento 4 (350 mg/ml) con un promedio de 1,91 mm de sensibilidad. El tercer grupo corresponde a los tratamientos 3(175mg/ml) con un promedio de 1,32 mm de inhibición y el tratamiento 2 (penicilina) con un promedio de 1,96 mm de sensibilidad. Por último, el cuarto grupo está el tratamiento 1 (Metanol) con un promedio de 0 mm de inhibición frente a las bacterias de *Staphylococcus aureus*.

Los resultados tabulados de la medición de los halos de inhibición que se observan en la Figura 29, indica que existen diferencias estadísticas significativas, exponiendo de tal manera que el mejor tratamiento fue el tratamiento 6 (700 mg/ml.), seguido de los tratamientos 5 (525 mg/ml.), 4(350 mg/ml), 2(penicilina), 3(175mg/ml) y por último el tratamiento 1(Metanol) que no tubo sensibilidad alguna con las bacterias.

#### 4.2.1 Discusión

Un estudio realizado sobre la caracterización fitoquímica y la evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos de hojas y tallos de *Solanum nigrum* L. Desarrollado en Cuba por Chang *et al.* en el 2013, reportaron que los halos de inhibición de los extractos secos, tanto de hojas como de tallos, mostraron actividad antibacteriana frente a las bacterias de *B. subtilis* y *S. aureus*. Teniendo mayor sensibilidad el extracto seco extraído de las hojas, frente a *S. aureus* con un diámetro de 8mm y con respecto a *B. subtilis*, los halos de inhibición fueron de 6 y 5 mm para los extractos secos de las hojas y tallos, respectivamente.

Sanabria, Mendoza y Moreno, en el 1998 desarrollaron una investigación sobre la actividad antimicrobiana *in vitro* de Angiospermas colombianas, donde determinaron la actividad de 29 especies, entre ellas *Solanum nigrum* L. (Hierba Mora) frente *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxisporum* y *Mucor* sp. Se obtuvieron los extractos de las 29 especies con etanol al 95% como solvente, utilizando toda la parte aérea de la planta a excepción de la Hierba Mora, utilizando solamente sus frutos. Los resultados de esta investigación fueron que para *Staphylococcus aureus*, se presentaron diámetros de inhibición mayor a 15 mm a una concentración de 3mg/ml

Sridhar, Josthna y Naidu en el 2011, estudiaron la actividad antibacteriana *in vitro* y análisis fitoquímico de *Solanum nigrum* (Linn), en donde usaron metanol como uno de los disolventes para realizar los extractos de frutos, raíces y hojas frente a bacterias de *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas putida*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumonia* y *Staphylococcus aureus*. Los halos de inhibición con respecto al extracto de las hojas frente a *E. coli* y *S. aureus* fueron de 0mm y 7 mm, respectivamente. Referente al extracto de los frutos los halos tuvieron una zona de inhibición de 8mm y 15 mm correspondientemente y por último con los extractos de las raíces no obtuvieron ningún tipo de sensibilidad a las bacterias.

El comportamiento del extracto frente a las bacterias produjo un efecto inhibitorio mayor que el control positivo, de acuerdo a que los metabolitos de la planta generaron mayor sensibilidad a *E. coli* y *S. aureus*, los cual puede haber sido por efecto de los alcaloides esteroidales, taninos y saponinas que pudieron haber producido daño en la pared o membrana bacteriana, síntesis de proteínas o ácidos nucleico. Vale destacar, que es *in vitro* ya que para una valoración precisa de su comportamiento *in vivo*, se deberán aplicar más pruebas microbiológicas que permitan conocer la acción en los seres vivos.

### **4.3 Cuantificación de bacterias**

#### **4.3.1 Espectrofotometría**

Para cuantificar la acción antimicrobiana del extracto de *Solanum nigrum* se llevó a cabo un control por medio del método de Turbidimetría utilizando un Espectrofotómetro de Microplaca Epoch™ de Biotek instruments para establecer una curva de crecimiento bacteriano en un tiempo de prueba de 12 horas consecutivas.

El cambio entre la intensidad de luz que incide en el cultivo ( $I_0$ ) y la transmitida ( $I$ ) se registra en el espectrofotómetro como absorbancia ( $A$ ) o densidad óptica (D.O.), valor derivado del log del cociente entre  $I_0$  y la de la luz transmitida por la suspensión,  $A = \log I_0/I$ . A medida

que la concentración celular aumenta, el cultivo se hace más turbio y se reduce la cantidad de luz transmitida que alcanza la célula fotoeléctrica. (Díaz, 2011).

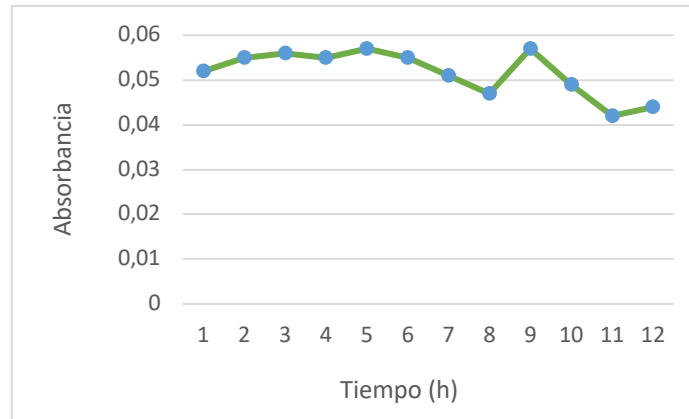


Figura 30. Curva de crecimiento de las bacterias de *E. coli* en ausencia de *Solanum nigrum*.

Fuente: La Autora.

Se observa en la Figura 30, que sin una concentración del extracto del *Solanum nigrum* las bacterias entran en un ciclo de crecimiento bacteriano comenzando por la fase de latencia donde las bacterias se adaptan al nuevo medio, luego en una fase exponencial que es cuando la población se duplica, pasando a una etapa estacionaria cuando dejan de replicarse ya que al encontrarse en un medio de cultivo existen limitaciones de crecimiento, finalmente llegan al punto de la muerte, observando en la hora 9 una disminución progresiva de las bacterias, notándose una absorbancia entre 0,05 y 0,04 durante las 12 horas.

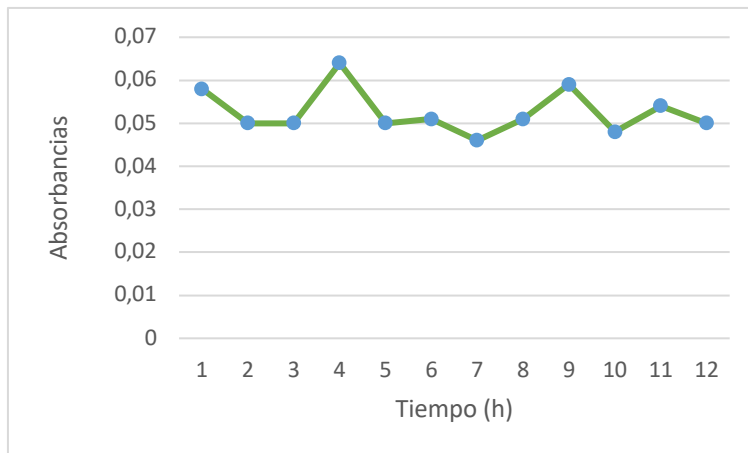


Figura 31. Curva de crecimiento de las bacterias de *E. coli* en una concentración de 175mg/ml de *Solanum nigrum*.

Con una concentración de 175 mg/ml del extracto de *Solanum nigrum* se puede observar que existe un mínimo control bacteriano, mostrándose una absorbancia entre 0,06 y 0,05 es decir, que de 1000.000 bacterias hay una muerte bacteriana hasta llegar a 100.000 bacterias (Figura 31).

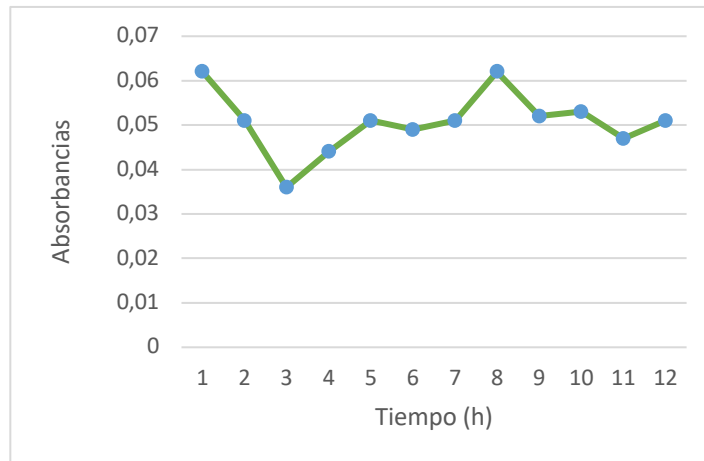


Figura 32. Curva de crecimiento de las bacterias de *E. coli* en una concentración de 350 mg/ml de *Solanum nigrum*.

Fuente: La Autora.

Se puede observar en la Figura 32 que con una de concentración de 350 mg/ml hay un tiempo de efecto terapéutico de tres horas, en donde la absorbancia baja de 0,06 a 0,04 es decir de 1000.000 a 10.000 bacterias, para luego entrar en una fase exponencial hasta llegar a su muerte.

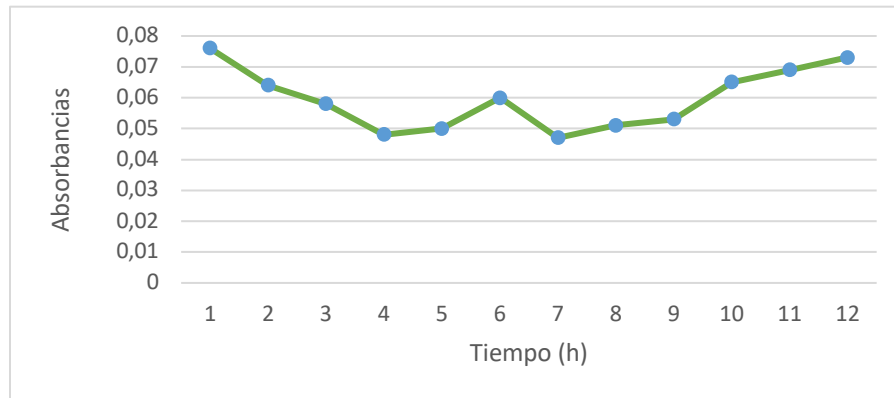


Figura 33. Curva de crecimiento de las bacterias de *E. coli* en una concentración de 75% 525 mg/ml de *Solanum nigrum*

Fuente: La Autora

Referente a la concentración de 525 mg/ml como se observa en la Figura 33, el extracto ejerce su acción antimicrobiana, ya que de una absorbancia de 0,07 descende a 0,05 en las primeras cuatro horas, dicho de otra forma, de 10.000.000 bacterias declina a 100.000 bacterias.

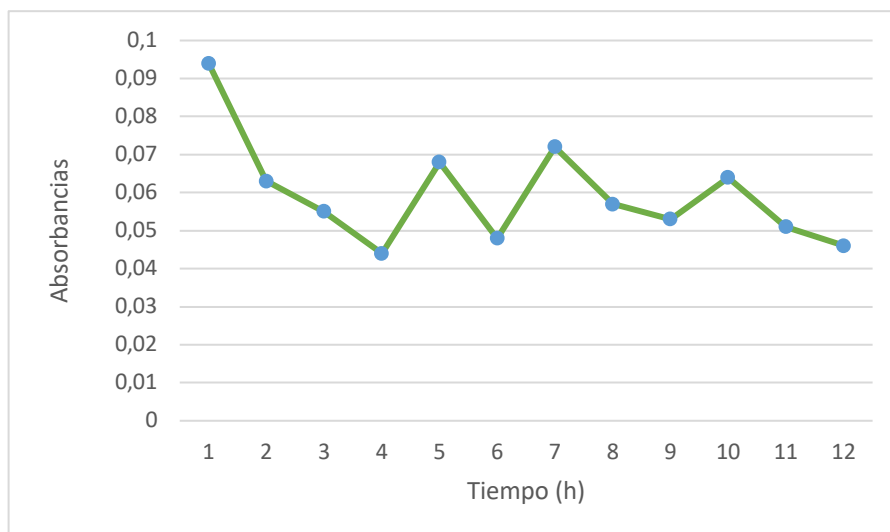


Figura 34. Curva de crecimiento de las bacterias de *E. coli* en una concentración de 700 mg/ ml de *Solanum nigrum*.

Fuente: La Autora

En la suspensión bacteriana de *Escherichia coli* con una concentración del 700 mg/ml de *Solanun nigrum* se puede observar claramente en la Figura 34 como la acción antimicrobiana de dicha planta controla la replicación bacteriana por sus propiedades antimicrobianas, de tal manera que decrece la absorbancia de 0,09 (1000.000.000 bacterias) a 0,04 (10.000 bacterias) pero no obstante pierde su efecto al cabo de cuatro horas, produciéndose una fase exponencial de las bacterias.

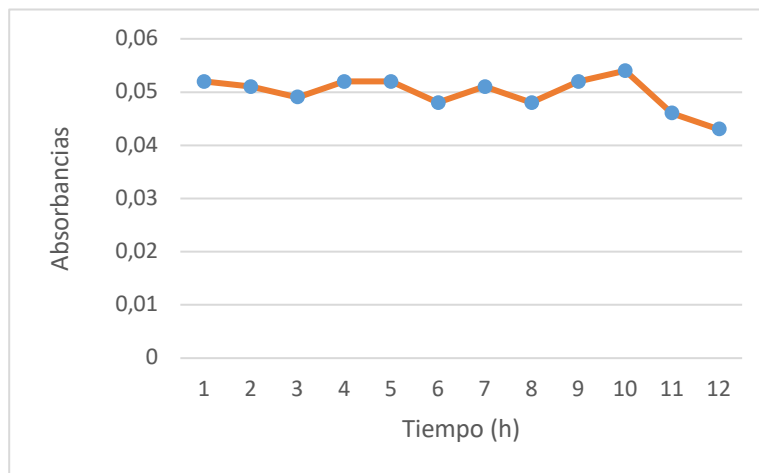


Figura 35. Curva de crecimiento de las bacterias de *S. aureus* en ausencia de *Solanum nigrum*.

Fuente: La Autora.

Se puede observar en los resultados de espectrofotometría en relación al crecimiento de la biomasa bacteriana que sin una concentración del extracto de la especie vegetal *Solanum nigrum*, las bacterias cumplen su ciclo de crecimiento bacteriano sin ningún tipo de alteración, manteniéndose en 100.000 bacterias en el tiempo de 12 horas de prueba.

(Figura 35)

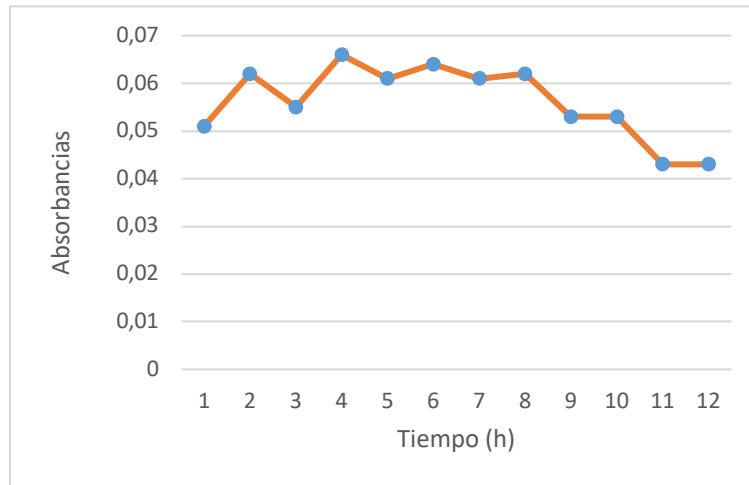


Figura 36. Curva de crecimiento de las bacterias de *S. aureus* en una concentración de 175 mg/ml de *Solanum nigrum*.

Fuente: La Autora.

Se puede observar en la curva de la Figura 36 que no existe alguna restricción en la replicación bacteriana de *S. aureus* frente a una administración de una mínima concentración del extracto de nuestra especie vegetal, manteniéndose en una absorbancia constante de 0,6.

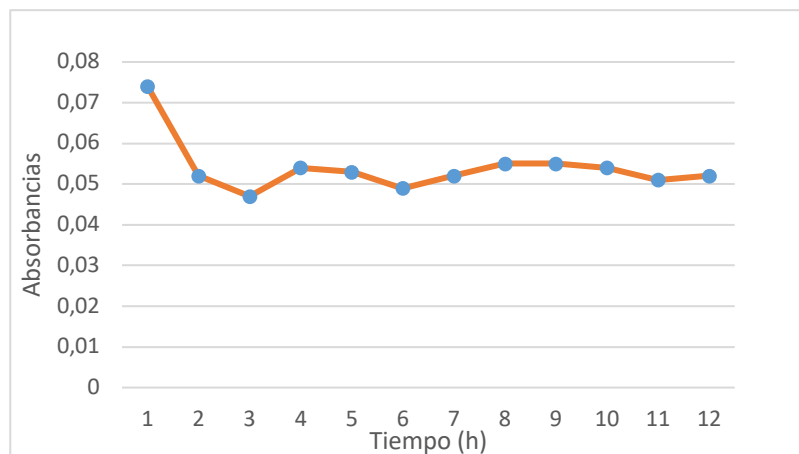


Figura 37. Curva de crecimiento de las bacterias de *S. aureus* en una concentración de 350 mg/ml de *Solanum nigrum*.

Fuente: La Autora.

Se aprecia que la absorbancia en esta concentración baja de 0,07 a 0,05 durante las primeras tres horas de prueba, a saber, que 0,07 corresponde a 10.000.000 bacterias y 0,05 a 100.000 bacterias para luego subir a una absorbancia de 0,054 y mantenerse en ese nivel constante por las siguientes horas de prueba (Figura 37).

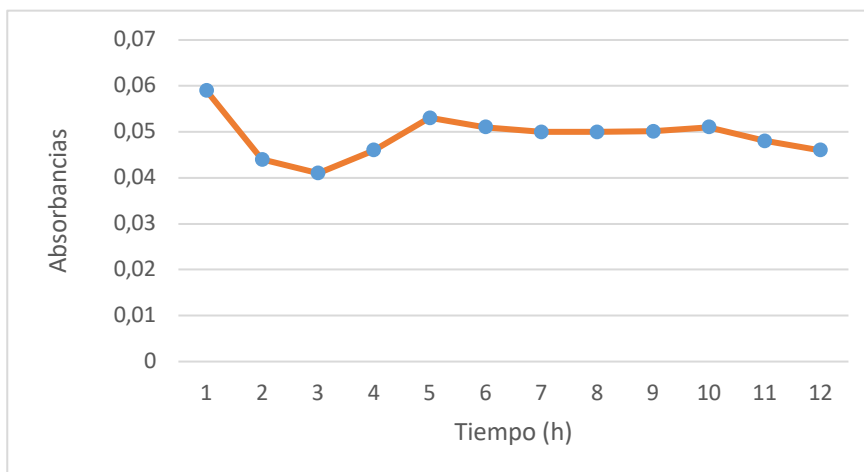
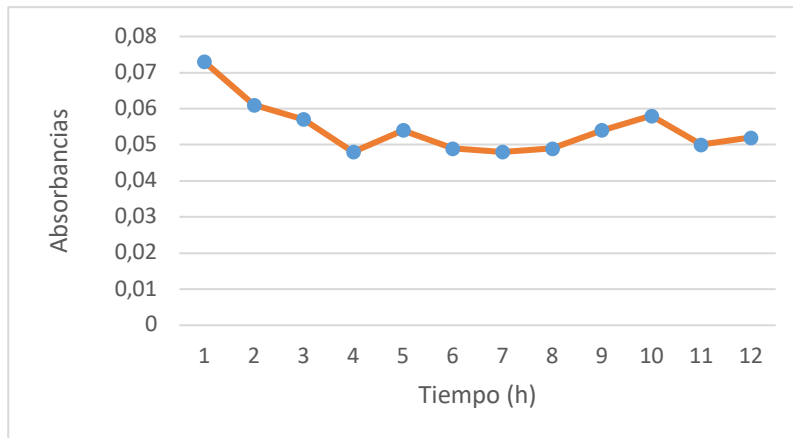


Figura 38. Curva de crecimiento de las bacterias de *S. aureus* en una concentración de 525 mg/ml de *Solanum nigrum*.

Fuente: La Autora.

En esta concentración de 525 mg/ml, se analiza el mismo patrón que la anterior concentración de 350 mg/ml, es decir que existe una respuesta por parte del extracto en las primeras tres horas, convirtiéndose en un antimicrobiana con un corto tiempo terapéutico contra *S. aureus*. Logrando extinguir a estos microorganismos de un pico 1000.000 a 10.000 bacterias en las primeras horas.



*Figura 39.* Curva de crecimiento de las bacterias de *S. aureus* en una concentración del 700 mg/ ml de *Solanum nigrum*.

Fuente: La Autora.

Se puede observar en la curva de absorbancia con la concentración de 700 mg/ml como se aminoran los niveles de concentración celular las primeras cuatro horas, de una absorbancia de 0,07 (10.000.000 bacterias) a 0,04 (10.000 bacterias) y desde ese punto las bacterias se mantienen en una turbidez constante, es decir que respecto a las bacterias de *S. aureus* con la máxima concentración del extracto de *Solanum nigrum* presenta efectos sobre su población.

### 4.3.2 Recuento directo en cámara de Neubauer

Tabla 7

*Recuento de las bacterias de Escherichia coli en cámara de Neubauer, en ausencia del extracto Solanum nigrum*

Tiempo	UFC sin extracto
0 h	0
1 h	3750
2 h	2500
3 h	4375
4 h	8750
5 h	10000
6 h	18750
7 h	296875
8 h	359375
9 h	625000
10 h	718750
11 h	812500
12 h	921875

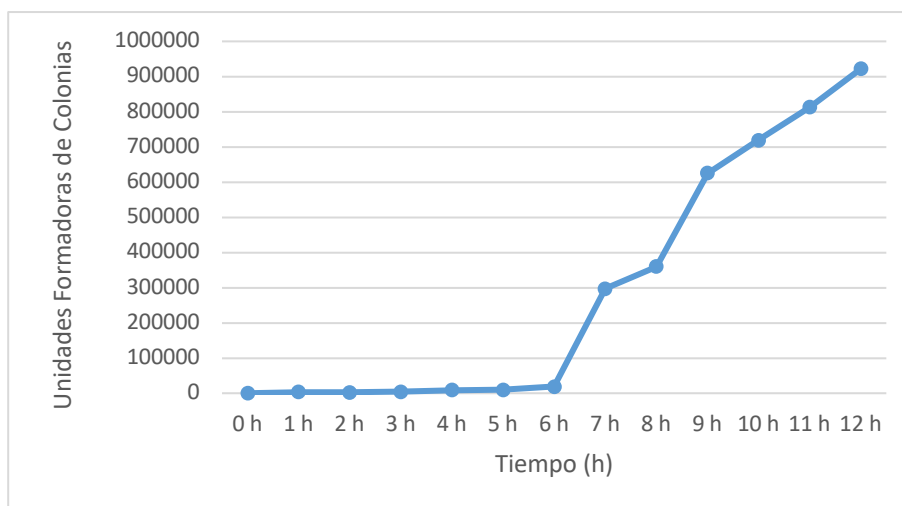


Figura 40. Curva de crecimiento bacteriano de *Escherichia coli* en cámara de Neubauer, ausencia del extracto de *Solanum nigrum*.

Partiendo desde la hora 0 se observa cómo se incrementa las bacterias de *E. coli*, donde en las seis primeras horas entran en una fase de latencia, para entrar en la fase exponencial llegando a un pico de 921.875 bacterias a las 12 horas (Figura 40).

Tabla 8  
*Recuento de bacterias de Escherichia coli en cámara de Neubauer, frente a las concentraciones del extracto de Solanum nigrum.*

Tiempo	UFC en 175 mg/ml de extracto	UFC en 350 mg/ml de extracto	UFC en 525 mg/ml del extracto	UFC en 700 mg/ml de extracto
0 h	0	0	0	0
1 h	0	0	0	0
2 h	0	0	0	0
3 h	0	0	0	0
4 h	625	0	0	0
5 h	1875	625	625	0
6 h	5000	5000	625	0
7 h	3125	3750	2500	625
8 h	5000	6875	3125	2500
9 h	8125	8125	6250	5000
10 h	7500	5625	5625	3750
11 h	10625	10625	8750	6875
12 h	11875	12500	10000	8125

Fuente: La Autora.

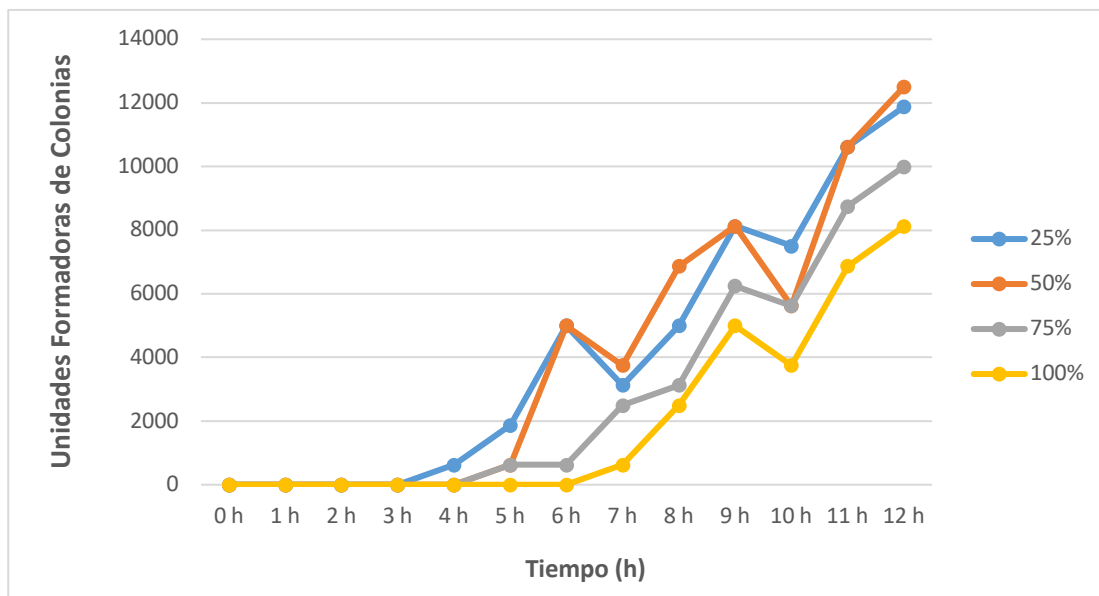


Figura 41. Curva de crecimiento bacteriano de *Escherichia coli* en cámara de Neubauer, frentes a las concentraciones del extracto de *Solanum nigrum*.

Fuente: La Autora.

En la Figura 41 se observa como la concentración de 700 mg/ml es mejor a las otras concentraciones ya que los microorganismos comienzan a replicarse a las seis horas de prueba, logrando llegar a un pico de 8.125 bacterias a las doce horas; seguida por la concentración de 525 mg/ml donde comienza la replicación de bacterias a las 4 horas, alcanzando 10.000 bacterias finalizando el ensayo; después tenemos la concentración de 350 mg/ ml donde las bacterias logran alcanzar un límite de 12.500 y la concentración de 175 mg/ml que culmina con 11.875 bacterias de *Escherichia coli*.

De esta manera se puede comparar como con el testigo (sin concentración de *Solanum nigrum*) las bacterias llegaron a replicarse hasta 921.875 relacionando con el mejor tratamiento (700 mg/ml) que logró actuar como bacteriostático por 6 horas, con hasta 8.125 bacterias en doce horas.

Cabe recalcar que las concentraciones del extracto de *Solanum nigrum* pierden su efecto terapéutico al cabo de 4 o 6 horas.

Los resultados obtenidos en la cuantificación bacteriana fueron organizados estadísticamente en el programa GraphPad Prism – 1 way ANOVA, en donde se estableció los siguientes resultados.

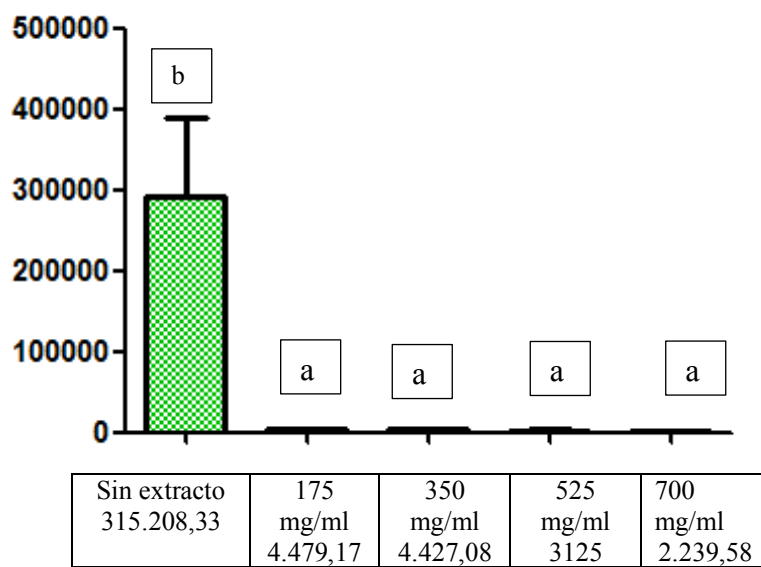


Figura 42. Prueba Tukey al 5% con respecto al conteo bacteriano de *Escherichia coli* en la cámara de Neubauer.

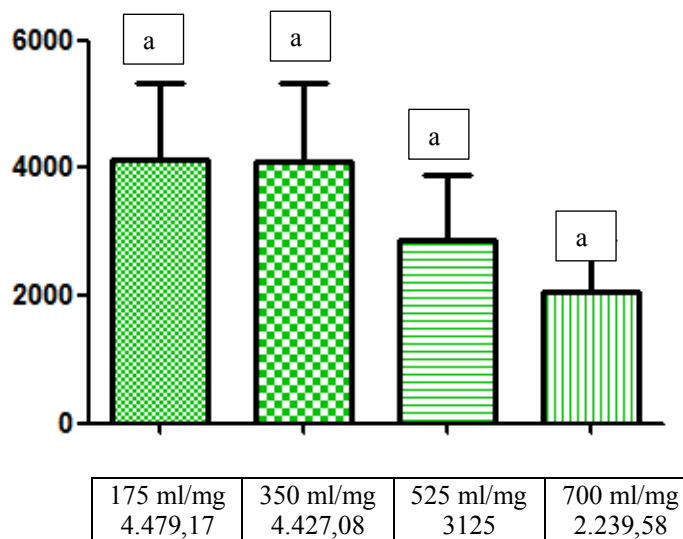


Figura 43. Prueba Tukey al 5% con respecto al conteo bacteriano de *Escherichia coli* en la cámara de Neubauer.

La prueba de Tukey al 5 % para el conteo bacteriano con los distintos tratamientos frente a las bacterias de *Escherichia coli*, determinó dos grupos de significancia. En el primer grupo se encuentra las concentraciones de 175 mg/ml, 350 mg/ml, 525 mg/ml y 100% 700 mg/ml. En el segundo grupo se encuentra el tratamiento sin ninguna concentración de extracto de *Solanum nigrum*.

Los resultados tabulados del conteo bacteriano en la cámara de Neubauer, se muestran en la Figura 42. Se observa que existen diferencias estadísticas, recalando que los mejores tratamientos fueron las concentraciones con el extracto de *Solanum nigrum*, cabe recalcar que no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones como se observa en la Figura 43.

Tabla 9  
*Recuento de las bacterias de Staphylococcus aureus en cámara de Neubauer, en ausencia del extracto de Hierba Mora (Solanum nigrum).*

Tiempo	Número de células
0 h	0
1 h	625
2 h	1875
3 h	1250
4 h	6250
5 h	6250
6 h	8750
7 h	281250
8 h	343750
9 h	562500
10 h	656250
11 h	718750
12 h	859375

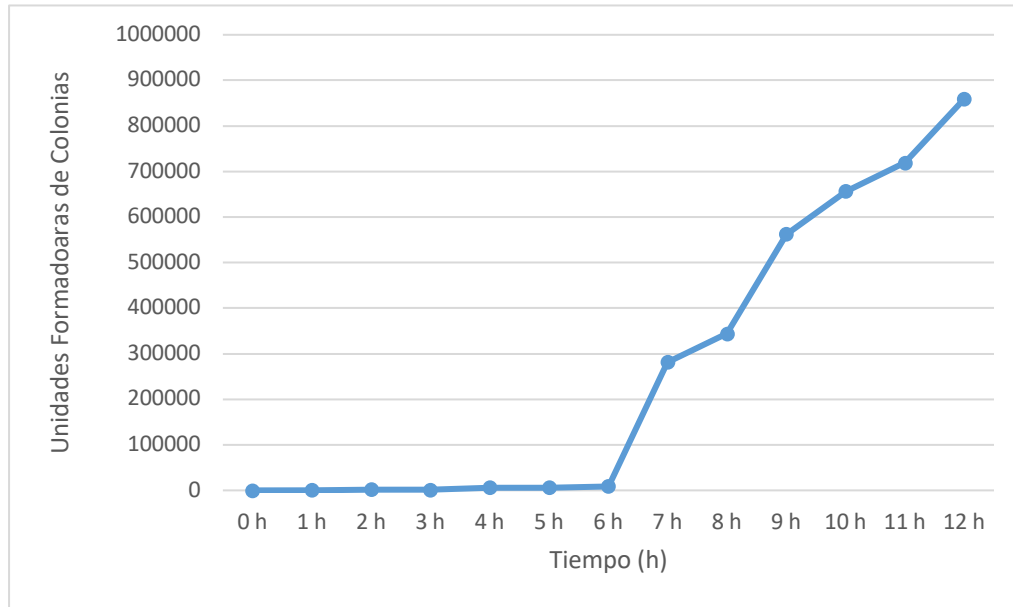


Figura 44. Curva de crecimiento bacteriano de *Staphylococcus aureus* en cámara de Neubauer, en ausencia del extracto de *Solanum nigrum*.

Como se observa en la Tabla 9 la cuantificación del crecimiento de *S. aureus* comienza desde la primera hora con una población de 625, a las seis horas con 875 y finalizando con 859.375 bacterias sin concentración del extracto de hierba mora, observándose en la Figura 44 la fase de latencia y exponencial de las bacterias.

Tabla 10

Recuento de bacterias de *Staphylococcus aureus* en cámara de Neubauer, frente a las concentraciones del extracto de *Solanum nigrum*

Tiempo	UFC en 25% del extracto	UFC en 50% del extracto	UFC en 75% del extracto	UFC en 100% del extracto
0 h	0	0	0	0
1 h	625	0	0	0
2 h	0	0	625	0
3 h	0	0	0	0
4 h	1250	1250	625	0
5 h	2500	625	625	0
6 h	3125	2500	2500	1250
7 h	6875	6250	6250	5000
8 h	3750	4375	5000	3125
9 h	8750	7500	4375	5000
10 h	6250	6875	5625	7500
11 h	11250	10625	10000	8750
12 h	15000	13125	11250	10000

Fuente: La Autora.

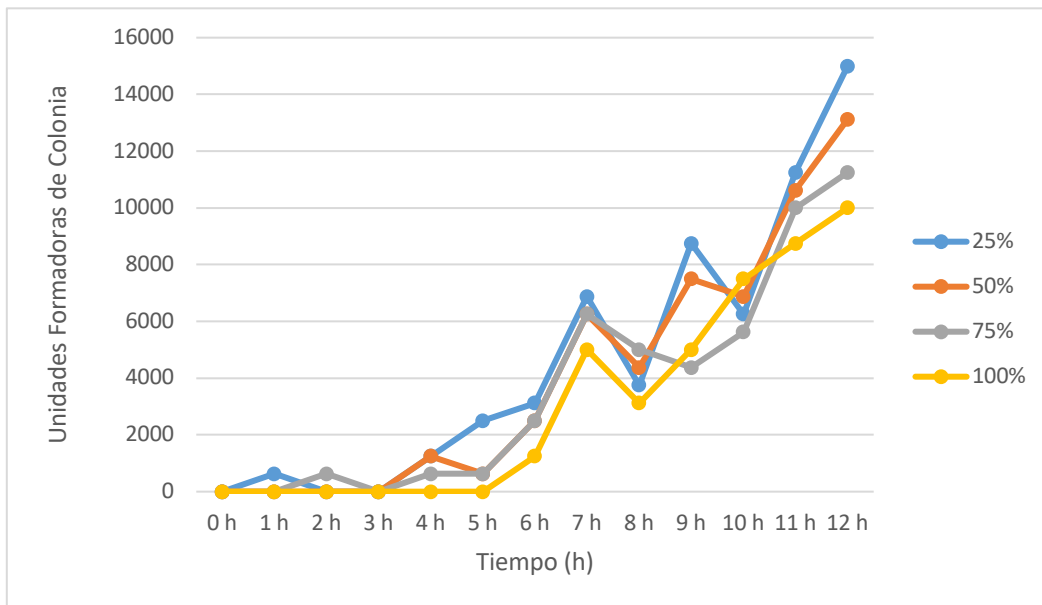


Figura 45. Curva de crecimiento bacteriano de *Staphylococcus aureus* en cámara de Neubauer, frente a las concentraciones del extracto de *Solanum nigrum*.

Fuente: La Autora.

Con respecto a las bacterias de *S. aureus* el mejor tratamiento fue la concentración de 700 mg/ml ya que inhibió el crecimiento bacteriano hasta la quinta hora de prueba y como se observa en la Figura 45 llegando las bacterias a 10.000; seguido de la concentración de 525 mg/ml con 11.250 bacterias; concentración de 350 mg/ml alcanzando 13.125 bacterias y por último la concentración de 175 mg/ml con 15.000 bacterias en doce horas de cuantificación.

De igual manera podemos comparar la diferencia de una cuantificación de bacterias sin extracto que llega alcanzar 859.375 vs el mejor tratamiento que fue el extracto de hierba mora.

Como ya se menciona anteriormente el efecto antibacteriano del extracto de *Solanum nigrum* llega a ejercer su efecto terapéutico hasta 6 horas debido a que sus componentes llegan a oxidarse.

Los resultados obtenidos en la cuantificación bacteriana fueron organizados estadísticamente en el programa GraphPad Prism – 1 way ANOVA, en donde se estableció los siguientes resultados.

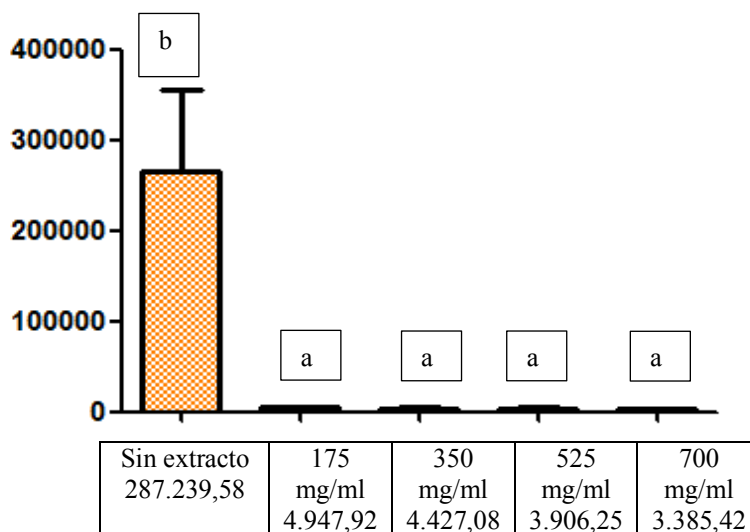


Figura 46. Prueba Tukey al 5% con respecto al conteo bacteriano de *Staphylococcus aureus* en la cámara de Neubauer.

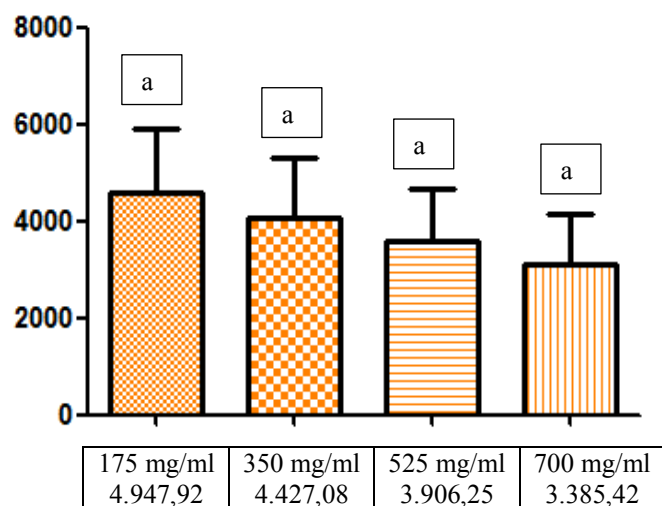


Figura 47. Prueba Tukey al 5% con respecto al conteo bacteriano de *Staphylococcus aureus* en la cámara de Neubauer .

La prueba de Tukey al 5 % para el conteo bacteriano con los distintos tratamientos frente a las bacterias de *Staphylococcus aureus*, determinó dos grupos de significancia. En el primer grupo se encuentra las concentraciones de 175 mg/ml, 350 mg/ml, 525 mg/ml y 700 mg/ml. En el segundo grupo se encuentra el tratamiento sin ninguna concentración de extracto de *Solanum nigrum*.

Los resultados tabulados del conteo bacteriano en la cámara de Neubauer, se muestran en la Figura 46. Se observa que existen diferencias estadísticas, recalando que los mejores tratamientos fueron las concentraciones con el extracto de *Solanum nigrum*, cabe recalcar que no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones como se observa en la Figura 47.

#### 4.4.Socialización

En las instalaciones de la PUCE-SI con la asistencia de 16 personas entre docentes y estudiantes de la carrera de Ingeniería en Zootecnia, se realizó la socialización de la investigación con el propósito de valorar la aceptación de la misma mediante escala de Likert (Anexo 12), tomando en cuenta los siguientes niveles:

5. MUY ALTO / 4. ALTO / 3. MEDIO / 2. BAJO / 1. NULO

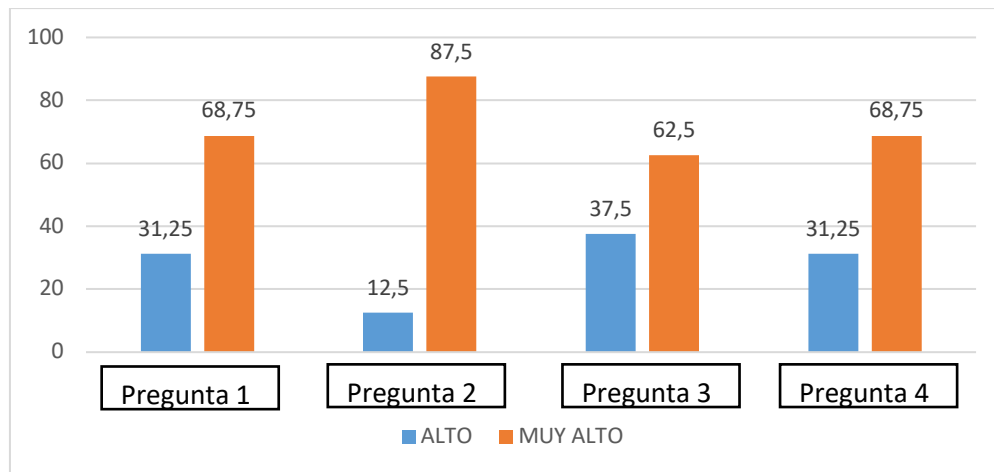


Figura 48. Resultados de la socialización de la investigación.

Se determina que la investigación tuvo relevancia para algún sector de la sociedad con un 68,75% y 31,25% en escala de muy alto y alto, respectivamente (pregunta 1). El 87,5% y 37,5% indicaron que el estudio posee perspectivas para estudios complementarios posteriores (pregunta 2); el 62,5% y 37,5% consideraron que la temática genera actualmente o a futuro un beneficio concreto para alguna organización (pregunta 3); y por último lugar el 68,75% y 31,25% valoraron que los objetivos planteados se cumplieron en la investigación (pregunta 4). Este interés demuestra la importancia de la búsqueda de nuevos principios activos que permitan ejercer control sobre bacterias que generan problemas en la salud de especies de interés zootécnico (Figura 48).

## CAPÍTULO V

### Conclusiones y Recomendaciones

#### 5.1. Conclusiones

Se determina que en Imbabura el 52,7% de los ganaderos usan fármacos para tratar la mastitis, el 18,2% aplican fármacos y medicina natural y un 25,5% practica la medicina natural, denotando que los productores de ganado aplican aún medicina alternativa, siendo la hierba mora (*Solanum nigrum*) la más utilizada por los ganaderos bovinos para el control de esta patología mamaria.

Las concentraciones del extracto de *Solanum nigrum* de 175 mg/ml, 350 mg/ml, 525 mg/ml y 700 mg/ml demostraron efecto antibacteriano sobre *Escherichia coli*, generando un halo de inhibición de 0,64; 3,56; 3,82 y 7,2mm, respectivamente. Donde las tres concentraciones más altas mostraron mayor efecto antimicrobiano frente a la penicilina G que obtuvo 2,80mm. Por lo cual el extracto de 700 mg/ml fue 2,57 veces más eficiente que la penicilina G, la concentración de 525 mg/ml fue 1,36 mejor y con 350 mg/ml 1,27 veces mayor al control positivo.

Las concentraciones del extracto de *Solanum Nigrum* de 525 mg/ml y 700 mg/ml demostraron efecto antibacteriano sobre *Staphylococcus aureus*, con halo de inhibición de 2,02 y 3,72mm, respectivamente, el cual fue superior al control positivo de la penicilina G con 1,96mm. En cambio, las concentraciones de 175 mg/ml y 350 mg/ml presentaron los menores halos de inhibición con 1.32 y 1,91mm, respectivamente. Por lo tanto, el mejor comportamiento antimicrobiano del extracto fue la concentración de 700 mg/ml, ya que fue superior 1,89 veces mayor que el efecto de la penicilina.

Con respecto a la prueba de espectrofotometría las bacterias de *Escherichia coli* presentaron menor resistencia a las concentraciones del *Solanum nigrum*, siendo la concentración de 700

mg/ml la que mejor resultado obtuvo, comenzando con una absorbancia de 0,09 (1000.000.000 bacterias) en la primera hora, bajando a 0,04 (10.000 bacterias) en la cuarta hora. Por otra parte, las bacterias *Staphylococcus aureus* presentaron mayor resistencia a los metabolitos de esta especie vegetal, donde el extracto de 700 mg/ml logró disminuir la población bacteriana de un nivel de absorbancia de 0,07 (10.000.000 bacterias) en la primera hora a 0,04 (10.000 bacterias) en la cuarta hora. Cabe mencionar que en las dos pruebas el extracto perdió su efecto al cabo de las cuatro primeras horas.

En el control de recuento directo en cámara de Neubauer se afirma que el tratamiento 1 con una concentración de 700 mg/ml actúa de mejor manera sobre ambas bacterias, resaltando que la mejor inhibición fue a *E. coli*, ya que controló su crecimiento hasta seis horas, llegando a cuantificar 8.125 bacterias al final de la prueba. En cambio, con *S. aureus* la replicación bacteriana inició a las cinco horas con 10.000 bacterias en el periodo de doce horas de la prueba. Vale referenciar, que los controles sin extracto para esta prueba *E. coli*, llegó a un pico de 921.875 bacterias a las 12 horas y el *S. aureus* finalizó con 859.375 bacterias en el mismo periodo.

La socialización de la investigación evidenció gran interés y aceptación del público; determinando que la investigación tuvo relevancia para algún sector de la sociedad con un 68,75% y 31,25% en escala de muy alto y alto, respectivamente. El 87,5% y 37,5% indicaron que el estudio posee perspectivas para estudios complementarios posteriores; el 62,5% y 37,5% consideraron que la temática genera actualmente o a futuro un beneficio concreto para alguna organización; y por último 68,75% y 31,25% valoraron que los objetivos planteados se cumplieron en la investigación.

## 5.2.Recomendaciones

Habiendo demostrado la capacidad antimicrobiana del extracto de *Solanum nigrum* sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, se recomienda a la comunidad científica desarrollar investigaciones para evaluar la acción antimicrobiana de esta especie vegetal contra otros organismos patógenos comunes en la mastitis bovina, tales como: *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma bovis*, *Corynebacterium bovis*, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus dysgalactiae*, en busca de solventar las necesidades de los ganaderos que se dedican a una actividad tan noble como la agropecuaria. Así también, continuar con estudios de otras plantas determinadas en esta investigación que por varias generaciones han sido aplicadas en tratamientos alternativos para el control de mastitis. Además, usar otros controles positivos antibióticos que permitan verificar su acción antibacteriana.

La Espectrofotometría y el control de recuento directo en cámara de Neubauer si bien determinaron una acción temporal sobre las bacterias en estudio, hacen necesario ahondar investigaciones que potencialicen el efecto por un tiempo terapéutico adecuado de ocho a doce horas, ya ese periodo de acción permitiría facilitar el manejo sanitario de la mastitis en los hatos ganaderos.

Teniendo en cuenta el positivo efecto antibacteriano de *Solanum nigrum*, es necesario evaluar la composición fitoquímica para caracterizar los metabolitos secundarios de esta planta en la región. Así, como también analizar el comportamiento del extracto con diferentes solventes que potencialicen los efectos antimicrobianos de la planta.

El interés demostrado por los asistentes es un indicador que este tipo de investigaciones deben continuarse realizando con el fin de buscar soluciones antimicrobianas que a futuro controlen infecciones bacterianas que los fármacos actuales no puedan contener.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Aquiahuatl, M., Volke, T., Ramírez, F., Salazar, M., Prado, L., Shirai, K. (2010). Manual de prácticas del laboratorio de microbiología general. Recuperado de: [http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/crl/Microbiologia/16P/Manual\\_Micro-16P.pdf](http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/crl/Microbiologia/16P/Manual_Micro-16P.pdf)
2. Bastidas, O. (2009). Conteo celular con hematocitómetro. Recuperado de: Celeromics: <http://www.celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Conteo-Camara-Neubauer.pdf>
3. Bedolla C., (2017). Etiología de la mastitis bovina. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán
4. BUCHI. (2009). Manual de instrucciones Rotavapor R II. Recuperado de: [http://www.equipar.com.mx/web2012/wp-content/uploads/2012/info\\_man/buchi/Manual\\_Operacion\\_RII.pdf](http://www.equipar.com.mx/web2012/wp-content/uploads/2012/info_man/buchi/Manual_Operacion_RII.pdf)
5. Calderón, A., y Rodríguez, V. (2007). Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundiboyacense (Colombia) Universidad de Córdoba, Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico (IIBT), kilómetro 27 vía Ciénaga de Oro. Montería, Colombia.
6. Chang, L., García, A., Rosabal, C., Espinosa, R., Ramos, M. y Remon, H. (2013). Caracterización fitoquímica y la evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos de hojas y tallos de *Solanum nigrum* L. que crece en Cuba. *Scielo*, 44. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmcf/v44n4/v44n4a4.pdf>

7. Cervantes, E., García, R., Salazar, P. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. Mediagraphic. Recuperado de: <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>
8. Corbellini, C. (2015). La Mastitis Bovina Y Su Impacto Sobre La Calidad De La Leche. Recuperado de: <http://infolactea.com/wp-content/uploads/2015/03/603.pdf>
9. Diaz, C. (2011). Adherencia y colonización de *Pseudomonas fluorescens* sobre sustratos sólidos: influencia de la topografía y composición química de la superficie. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de la Plata, Buenos Aires. [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2685/5\\_-\\_Caracterización\\_microbiológica.pdf?sequence=10](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2685/5_-_Caracterización_microbiológica.pdf?sequence=10)
10. Echeverría Richard (2016), “Análisis de susceptibilidad y resistencia a los antibióticos en vacas lecheras con mastitis en las haciendas ganaderas proveedoras de la empresa Floralp S.A. en la provincia de Imbabura”. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Ibarra.
11. Escobar, L. (2017). Estudio in vitro del efecto inhibitorio del extracto de hierba mora (*Solanum Nigrum*) sobre el *Streptococcus Mutans*. (Tesis de grado). Universidad Central del Ecuador, Quito. Recuperado de: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/11134/1/T-UCE-0015-699.pdf>
12. Espinoza, M., y 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. Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.
13. FAO. (2010). Manejo Sanitario Eficiente del Ganado Bovino: Principales Enfermedades. Recuperado de: <http://www.fao.org/docrep/019/as497s/as497s.pdf>

14. Federación Internacional de Lechería (FIL). Recursos. Brussels – Belgium. Recuperado de <https://www.fil-idf.org/resources>
15. Fernandez, C. (2004). Cálculo de la muestra. *GH CONTINUADA*, 3, 141 <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=15&ved=2ahUKEwjG8vnWoeDcAhXxuFkKHQUpDIAQFjAOegQICBAB&url=http%3A%2F%2Fwww.elsevier.es%2Fes-revista-gastroenterologia-hepatologia-continuada-8-pdf-70000192-S300&usg=AOvVaw3qtvJh9jJNHxeRMeKTP7uP>
16. Fonnegra, R y Jiménez, S. ( 2007). *Plantas medicinales aprobadas en Colombia*, Antioquia, Colombia, 2ª ed.
17. Granados, V. (2014). Suspensiones Microbianas. Recuperado de: <https://prezi.com/eqblhpwhpzqi/suspensiones-microbianas/>
18. Grosso, L. (2010). El Uso Popular De Las Plantas Medicinales En Uruguay. Recuperado de: <http://www.zoobiodi.it/wp-content/uploads/2018/04/Atti-N6.pdf>
19. Hernández Manejo Y Tratamiento Del Ganado En Condiciones De Presencia De, J (2010).
20. Iñiguez, F. (2011). Mastitis. Manual de manejo y control. Guadalajara, México.
21. Kleinschroth, E., Rabold, K., y Deneke, J. (1991). La Mastitis. España: EDIMED. (p.7).
22. Lambrecht, C., Almeida, D., Voigt, F., Faccin, A., Noremberg, R., Schiedeck, G y Damé, L. (2013). Actividad antibacteriana de los extractos de *Cymbopogon citratus*, *Elionurus* sp. y *Tagetes minuta* contra bacterias que causan mastitis. *SciELO*, 18. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S102847962013000300015](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102847962013000300015)

23. M. Paz Arraiza Bermúdez –Cañete. (2009). Análisis químico de plantas aromáticas y medicinales. Recuperado de: <http://ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal/uso-industrial-de-plantas-aromaticas-y-medicinales/contenidos/material-de-clase/tema12.pdf>
24. Mattar, S., Clderón, A., Sotelo, D., Sierra, M y Tordecilla, G. (2009). Detección de Antibióticos en Leches: Un Problema de Salud Pública. *Rev. salud pública*, 11, 579-590.  
<http://www.bdigital.unal.edu.co/36399/1/37097-158710-1-PB.pdf>
25. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). (2018). Resistencia a los antimicrobianos. Recuperado de: <http://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/productos-veterinarios/antimicrobianos/>
26. Organización Mundial de la Salud (OMS). (2018). Resistencia a los antibióticos: carteles sobre sanidad animal. Recuperado de: <http://www.who.int/campaigns/world-antibiotic-awareness-week/animal-health-posters/es/>
27. Organización Mundial de la Salud (OMS). (2017). Dejemos de administrar antibióticos a animales sanos para prevenir la propagación de la resistencia a los antimicrobianos. Recuperado de: <http://www.who.int/es/news-room/detail/07-11-2017-stop-using-antibiotics-in-healthy-animals-to-prevent-the-spread-of-antibiotic-resistance>
28. Pastor, J y Bedolla, J. (2008, 10 de octubre). Determinación de la prevalencia de mastitis bovina en el municipio de Tarímbaro, Michoacán, mediante la prueba de California. REDVET. Recuperado de: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101008/101004.pdf>

29. Quiñonez, D. (2017). Resistencia antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque “ Una Salud”. *Scielo*, 69.  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602017000300009](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602017000300009)
30. Realpe, V. (2014). Estudio De Factibilidad Para La Producción Y Comercialización De La Hierba Mora (*Solanum Nigrum*) Para Usos Medicinales Utilizando El Principio Activo (Solanina), En La Parroquia De Santa Bárbara– Cantón Sucumbíos”. (Tesis De Grado). Universidad Técnica Del Norte. Recuperado de:  
<http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/2997/1/02%20ICO%20381%20TESIS.pdf>
31. Ramirez, E., Castillo, D., Quintana, M., Torres, D., Villegas, L. y Díaz, C. (2015). Efecto antibacteriano de extractos etanólicos de plantas utilizadas en la tradiciones culinarias andinas sobre microorganismos de la cavidad bucal. *Rev Estomatol Herediana*, 25  
a. <http://www.upch.edu.pe/vrinve/dugic/revistas/index.php/REH/article/view/2736>
32. Ruiz, R. (2017). Mastitis bacteriana en ganado bovino. Recuperado de:  
[http://www.ammveb.net/articulos/Mastitis\\_bacteriana.pdf](http://www.ammveb.net/articulos/Mastitis_bacteriana.pdf)
33. Ruiz, R. (2017). Mastitis Bacteriana En Ganado Bovino: Etiología Y Técnicas De Diagnóstico En El Laboratorio. Recuperado de:  
[http://www.ammveb.net/articulos/Mastitis\\_bacteriana.pdf](http://www.ammveb.net/articulos/Mastitis_bacteriana.pdf)
34. Revista Electrónica de Veterinaria (REDVET). (2011). Mastitis Bovina: Resistencia a antibióticos de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche. Recuperado de:  
<https://issuu.com/veterinaria.org/docs/redvetn070711>
35. Ríos, J.L.; Recio, M.C. 2005. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.*, 100, 80–84.

36. Sanabria, A., Mendoza, A y Moreno, A. (1998). Actividad Antimicrobiana *In vitro* de Angiospermas Colombianas. *Revistas Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 27,47-51.  
a. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa/article/view/56444/55410>
37. Sánchez, J. (2009). Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Recuperado:  
[http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Solanum\\_nigrum&id=7697](http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Solanum_nigrum&id=7697)
38. San Martín, B., Kruze, J., Morales, M., & Agüero, H. (2002). Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región, Región Metropolitana y Xª Región, Chile.
39. Santmbrosio, E., Ortega, M y Garibaldi, P. (2009). Siembra y recuento de microorganismos. Recuperado de:  
[https://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5\\_ano/biotecnologia/practicoIII.pdf](https://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_ano/biotecnologia/practicoIII.pdf)
40. *Staphylococcus aureus*. Recuperado de: <http://cytalabs.com/wp-content/uploads/2015/01/MANEJO-Y-TRATAMIENTO-DEL-GANADO-EN-CONDICIONES-DE-PRESENCIA-DE-STAPHYLOCOCCUS-AUREUS.pdf>
41. Sridhar. T.M., Josthna, P y Naidu, C.V. (2011). In Vitro Antibacterial Activity and Phytochemical Analysis of *herichis* (Linn.) - An Important Antiulcer Medicinal Plant. *Journal of Experimental Sciences*, 2, 24-29.  
a. <http://updatepublishing.com/journal/index.php/jes/article/view/1863>
42. Upadhyay, A.; Upadhyaya, I.; Kollanoor-Johny, A.; Venkitanarayanan, K. (2014). Combating pathogenic microorganisms using plant-derived antimicrobials: A minireview of the mechanistic basis. *BioMed Res. Int.*

43. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco (UNP). (2013). Extracción. Recuperado de. <http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/tecnofarma/wp-content/uploads/2013/02/Extracci%C3%B3n.pdf>
44. Universidad Autónoma de México (UNAM). (s/f). Medición del crecimiento Microbiano. Recuperado de: [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/U4b\\_MedicionCrecimiento\\_19837.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/U4b_MedicionCrecimiento_19837.pdf)
45. Verde- Star, M.J., García- Gonzáles, S. y Rivas- Morales, C. (2016). Metodología Científica Para El Estudio De Plantas Medicinales. En Rivas- Morales, C., Oranday- Cardenas, M.A., y Verde- Star, M.J. (Eds.). *Investigación den plantas de importancia médica*. Barcelona, España: OmniaScience. 1-40
46. Wolter, W., Kloppert, B y Zschoeck, M. (2017). Mastitis Bovina. Recuperado de: <http://infolactea.com/wp-content/uploads/2015/03/608.pdf>

# ANEXOS

## Anexo 1. Entrevista Elaborada



Entrevista elaborada

Nombre del ganadero: luis chavez  
Localización (zona, parroquia, cantón): Cotoacachi - Píscosherero  
Teléfono: 062 533 392 Fecha: 09/08/2017

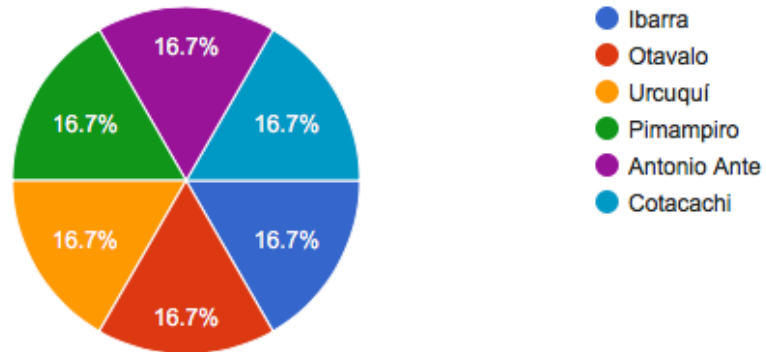
- ¿Cuántos animales tiene en total en el ordeño?  
1-10  11-40 \_\_\_\_\_ >41 \_\_\_\_\_
- ¿Qué sistema de ordeño utiliza en su explotación?  
Manual  Mecánico \_\_\_\_\_
- ¿Promedio de producción de litros de leche por vaca?  
1-5  6-10 \_\_\_\_\_ 11-15 \_\_\_\_\_ >15 \_\_\_\_\_
- ¿Tiene un área específica para el ordeño?  
No  Si \_\_\_\_\_
- ¿Cómo realiza el ordeño? (Puede seleccionar varias y colocar en orden)  
Lavado ubre \_\_\_\_\_ Presellado \_\_\_\_\_ Secado \_\_\_\_\_ Ordeño 1 Sellado \_\_\_\_\_
- ¿Le ha dado mastitis a las vacas?  
No  Si \_\_\_\_\_ ¿Qué número de animales se afectan frecuentemente? \_\_\_\_\_
- ¿Cómo se da cuenta que la vaca tiene mastitis?  
Observación ubre  Observación leche \_\_\_\_\_ CMT \_\_\_\_\_
- ¿Qué tratamiento aplica a los bovinos cuando poseen mastitis?  
Medicina natural  Fármacos \_\_\_\_\_ Natural y fármacos \_\_\_\_\_ Otro \_\_\_\_\_  
Explique lo que utiliza: ajo, tomillo, Diente de León
- ¿Cada cuánto tiempo solicita asistencia veterinaria?  
1 vez por año  2 veces al año \_\_\_\_\_ 3 veces al año \_\_\_\_\_ Indique la frecuencia \_\_\_\_\_



- ¿Conoce alguna planta que cure alguna enfermedad en el ganado?  
Si  No \_\_\_\_\_  
Cuáles son sus nombres: Ajo, tomillo, Diente León
- La planta que conoce es:  
Árbol \_\_\_\_\_ Arbusto \_\_\_\_\_ Hierba  Liana \_\_\_\_\_
- ¿La planta que conoce para qué enfermedad se utiliza?  
Mastitis 1 Cetois \_\_\_\_\_ Metritis tomillo Anemia Diente Brucelosis \_\_\_\_\_ Otra \_\_\_\_\_  
de León
- ¿Qué parte de la planta usa?  
Entera \_\_\_\_\_ Raíz \_\_\_\_\_ Tallo \_\_\_\_\_ Hojas  Flor  Fruto \_\_\_\_\_
- ¿Cómo se prepara la planta para su uso?  
Cocida \_\_\_\_\_ Triturada  Sin ninguna preparación previa \_\_\_\_\_
- ¿Cómo se le administra la planta?  
Bebida \_\_\_\_\_ Comida \_\_\_\_\_ Uso externo
- ¿Cuánto dura el tratamiento?  
De una sola vez \_\_\_\_\_ Una semana \_\_\_\_\_ Un novenario \_\_\_\_\_ Hasta que cure
- ¿En qué zonas podemos encontrar la planta?  
Quebradas \_\_\_\_\_ Montes  Huertos  Pastizales \_\_\_\_\_
- ¿Usted cree que estas plantas son conocidas a nivel  
Local \_\_\_\_\_ Comunal \_\_\_\_\_ Parroquial  Provincial \_\_\_\_\_
- ¿Usted cree que el uso medicinal de esta planta es  
Actual \_\_\_\_\_ Ancestral

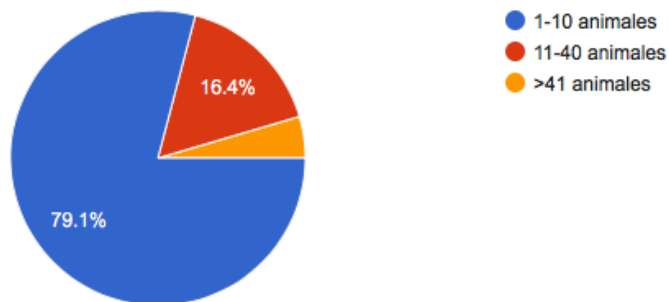
## Anexo 2. Respuestas a la Entrevista

### Localización



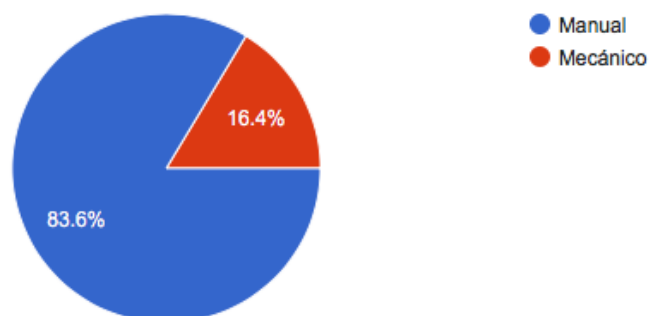
### ¿Cuántos animales tiene en total en el ordeño?

330 respuestas



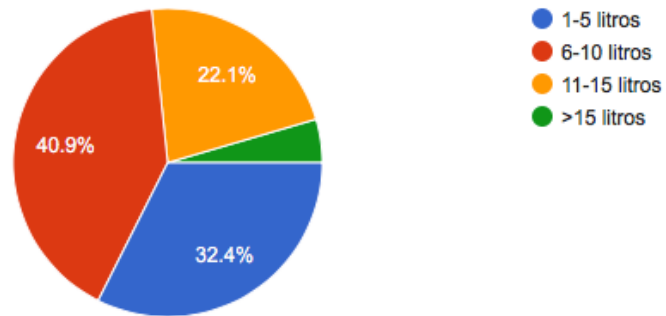
### ¿Qué sistema de ordeño utiliza en su explotación?

330 respuestas



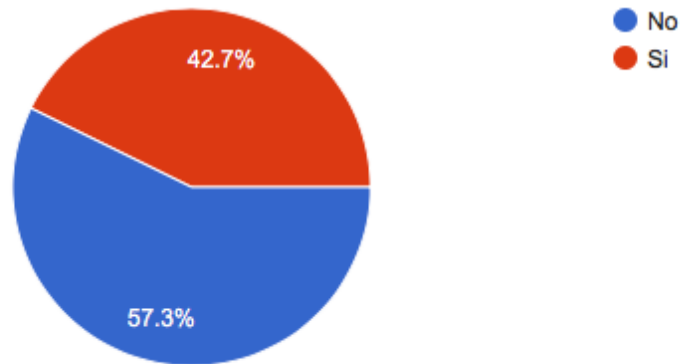
### ¿Promedio de producción de litros de leche por vaca?

330 respuestas



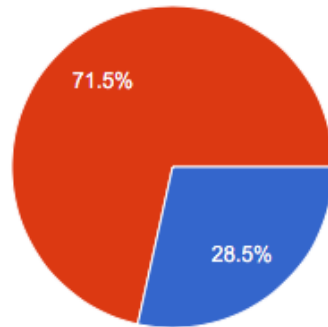
### ¿Tiene un área específica para el ordeño?

330 respuestas

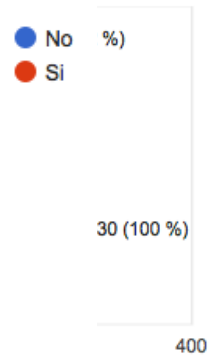


## ¿Le ha dado mastitis a las vacas?

330 respuestas

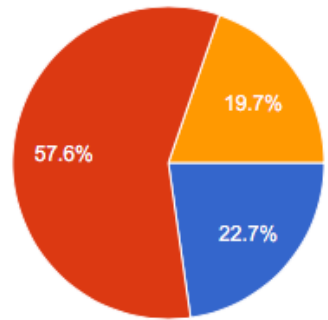


n orden)



## ¿Cómo se da cuenta que la vaca tiene mastitis?

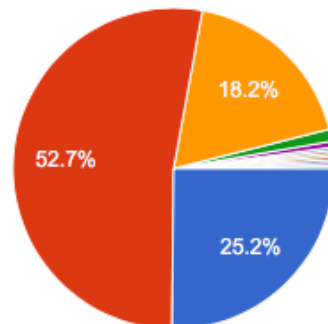
330 respuestas



- Observación de la ubre
- Observación de la leche
- CMT

## ¿Qué tratamiento aplica a los bovinos cuando poseen mastitis?

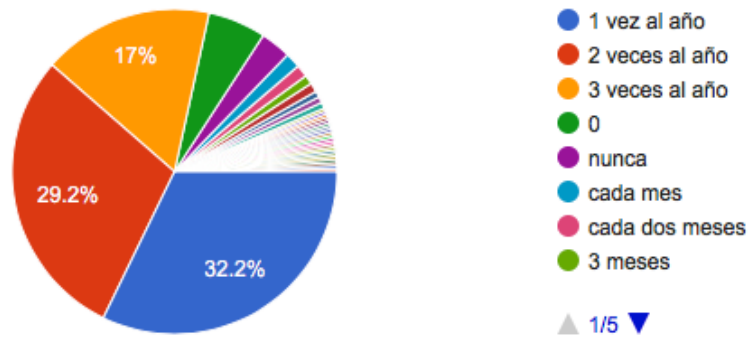
330 respuestas



- Medicina natural
  - Fármacos
  - Natural y Fármacos
  - no usa nada
  - no sabe
  - no cura
  - pomadas
  - no ha usado nada
- ▲ 1/2 ▼

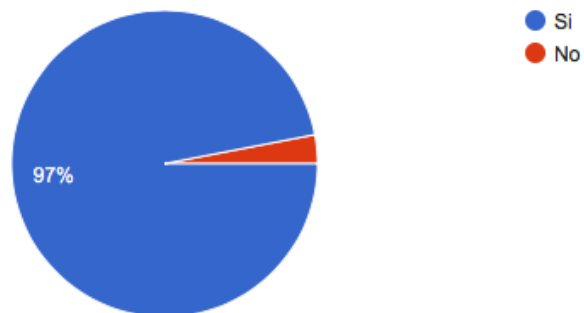
### ¿Cada cuánto tiempo solicita asistencia veterinaria?

329 respuestas



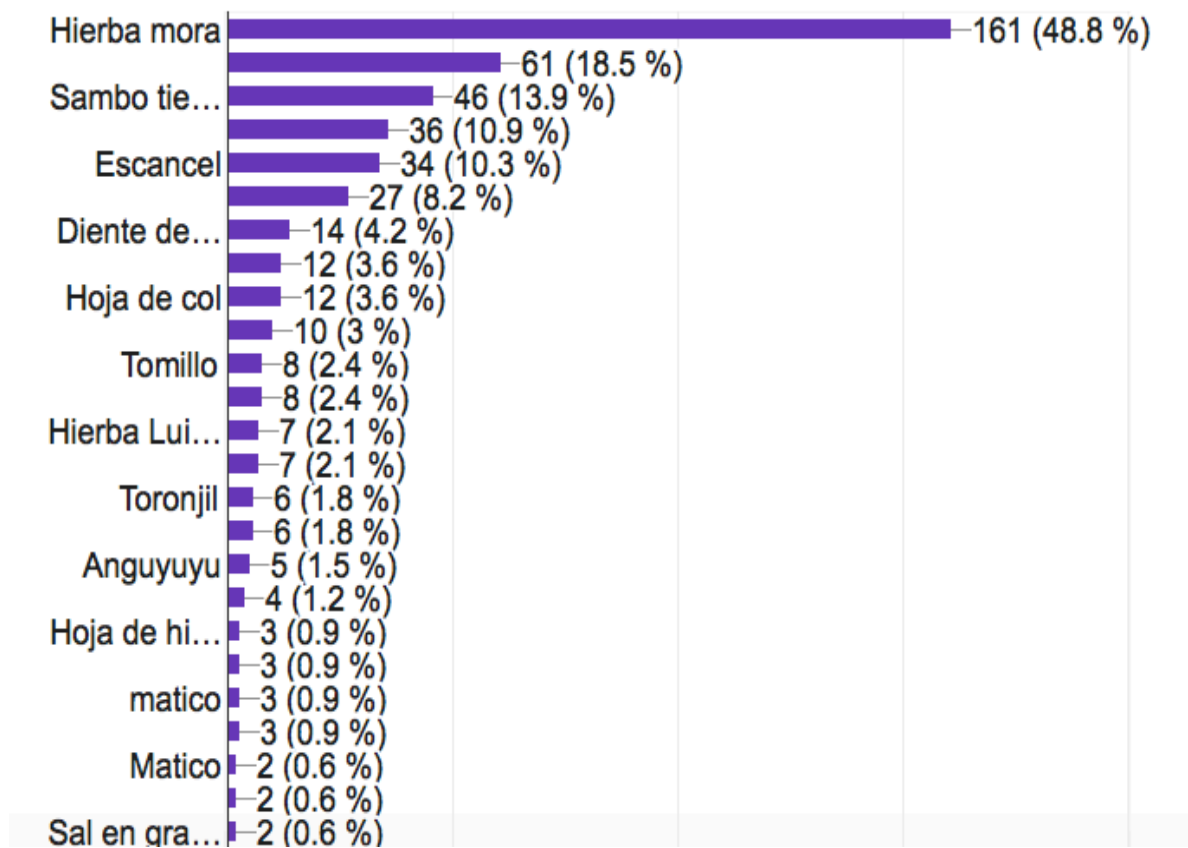
### ¿Conoce alguna planta que cure alguna enfermedad en el ganado?

330 respuestas



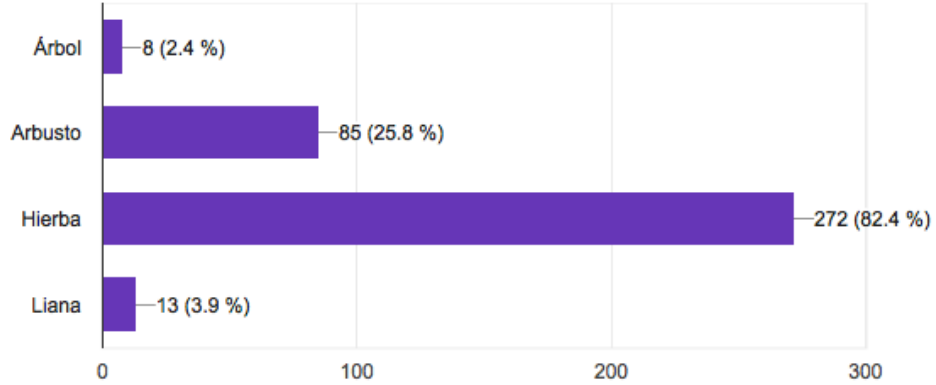
## Nombres de las plantas que usan en enfermedades del ganado

330 respuestas



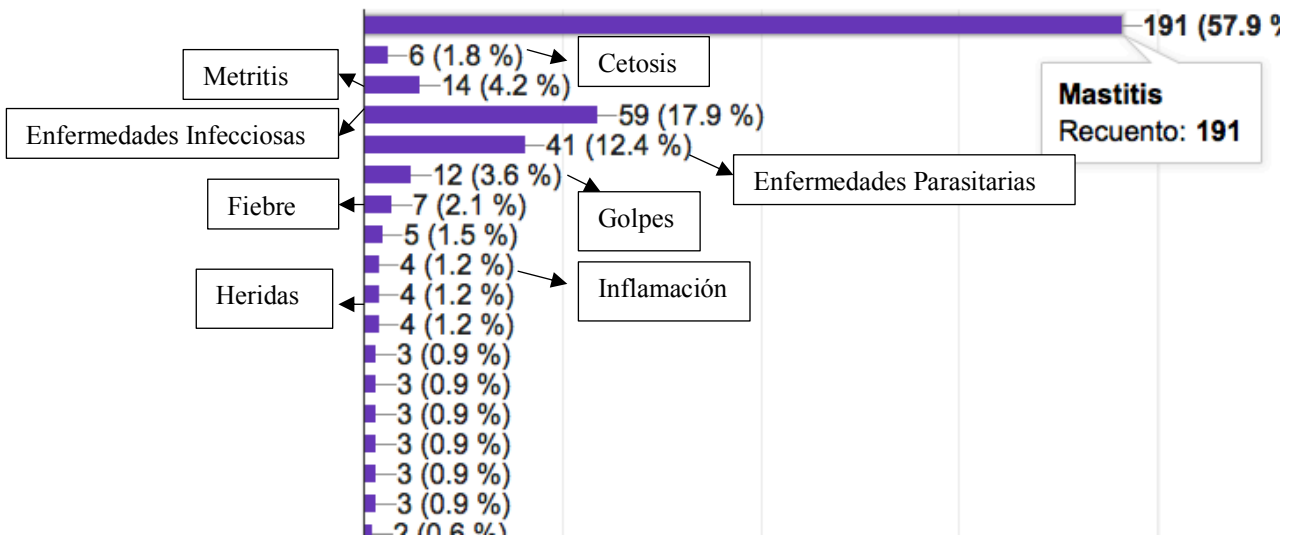
## ¿La planta que conoce es?

330 respuestas



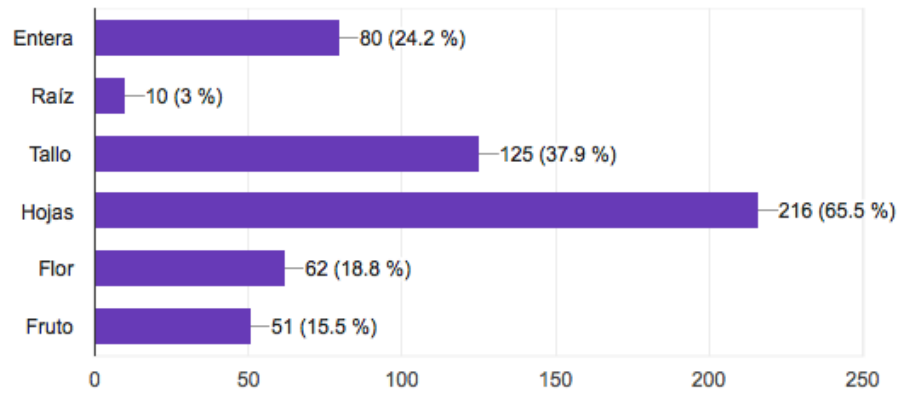
## ¿La planta que conoce para qué enfermedad se utiliza?

330 respuestas



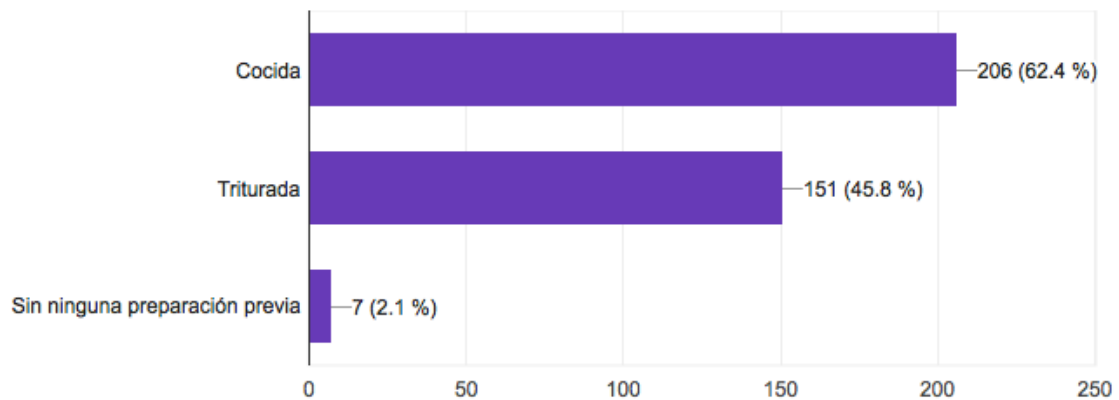
## ¿Qué parte de la planta usa?

330 respuestas



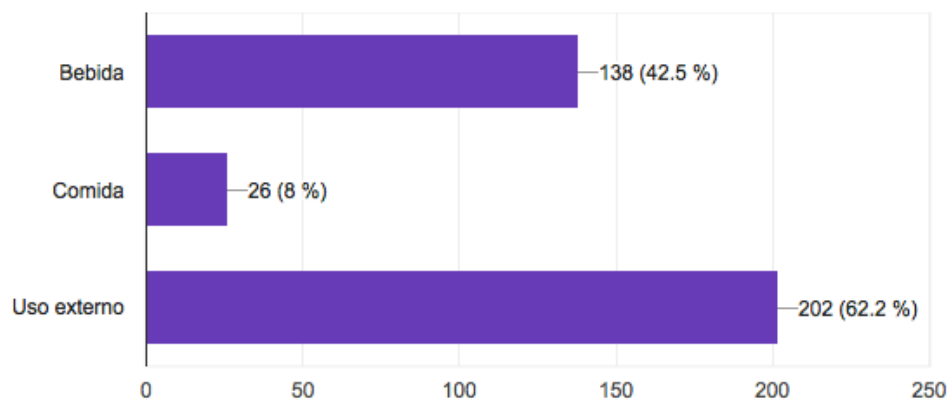
## Cómo se prepara la planta para su uso?

330 respuestas



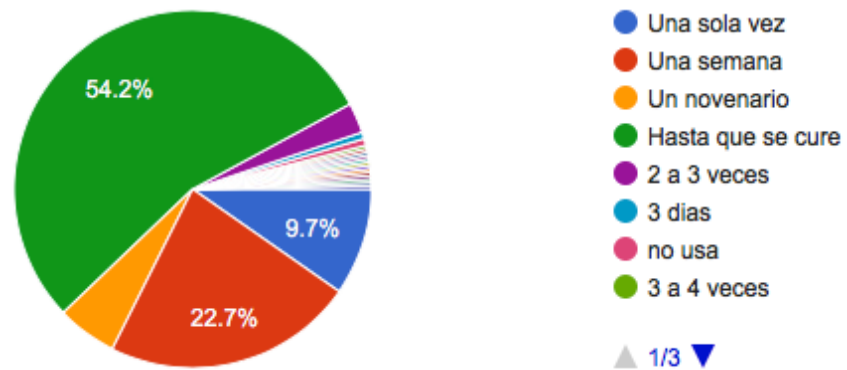
## ¿Cómo le administra la planta al animal?

325 respuestas



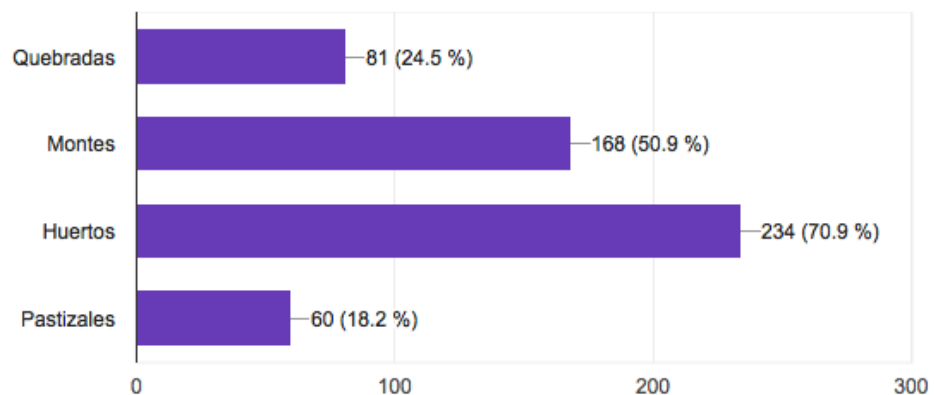
## ¿Cuánto dura el tratamiento?

330 respuestas



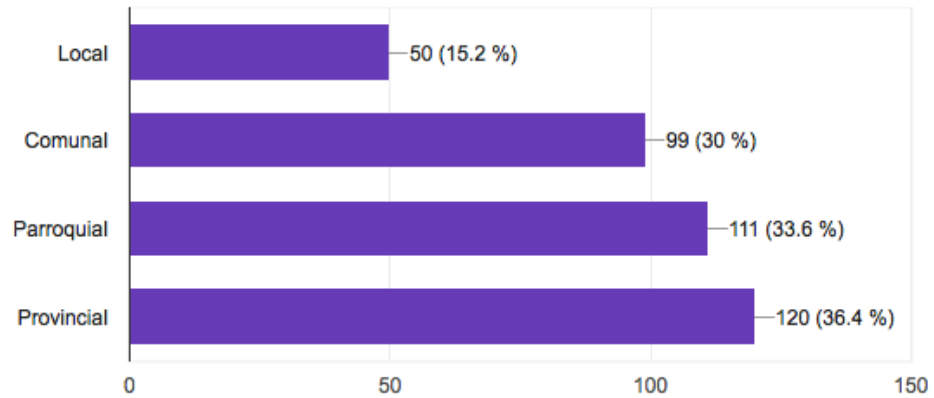
## ¿En qué zonas podemos encontrar la planta?

330 respuestas



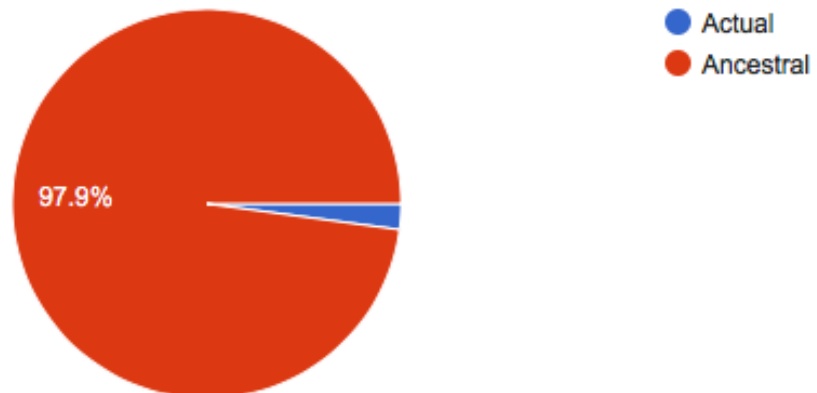
## ¿Usted cree que estas plantas son conocidas a nivel?

330 respuestas

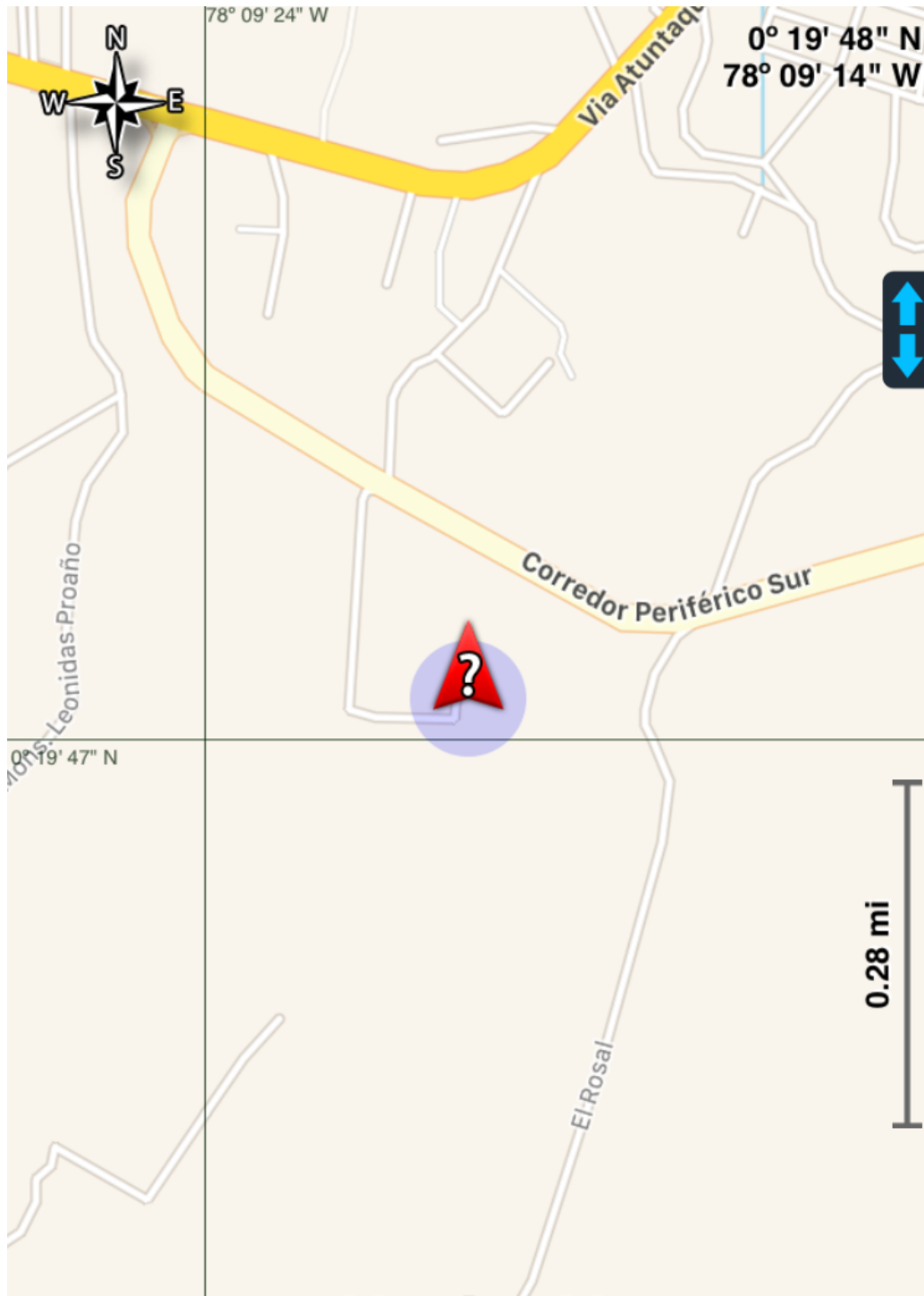


## Usted cree que el uso medicinal de esta planta es?

330 respuestas



Anexo 3. Punto GPS de la recolección de *Solanum nigrum*



Anexo 4. Recolección y Prensado de Hierba Mora (*Solanum nigrum*)



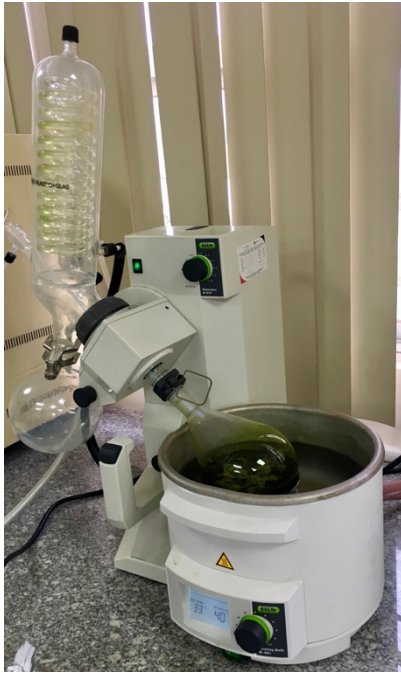
## Anexo 5. Cuarentena, Secado y Deshidratado de Hierba Mora



## Anexo 6. Trituración, Maceración y Filtración



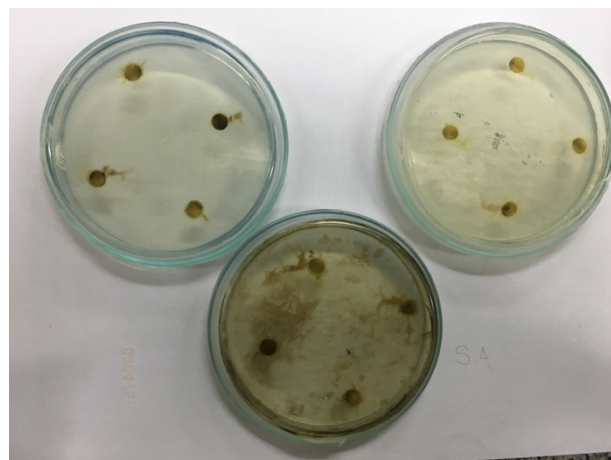
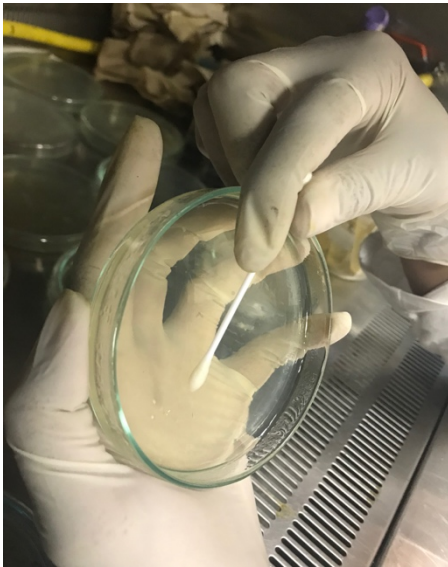
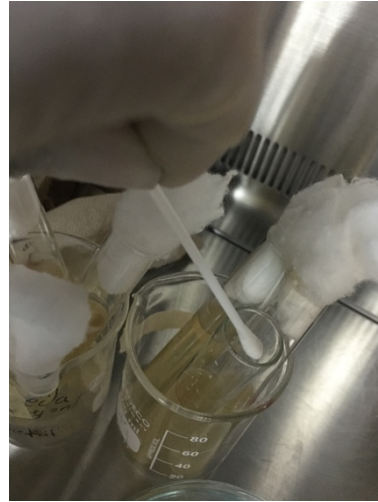
## Anexo 7. Obtención del extracto en la máquina Rotavapor



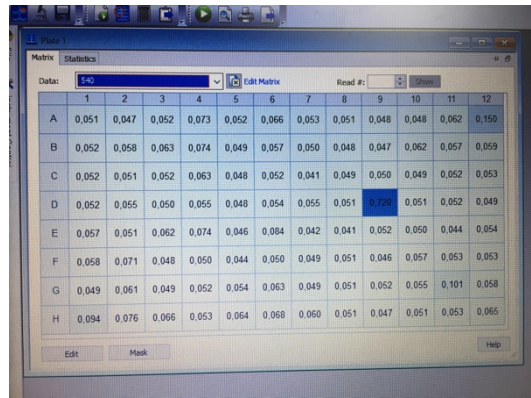
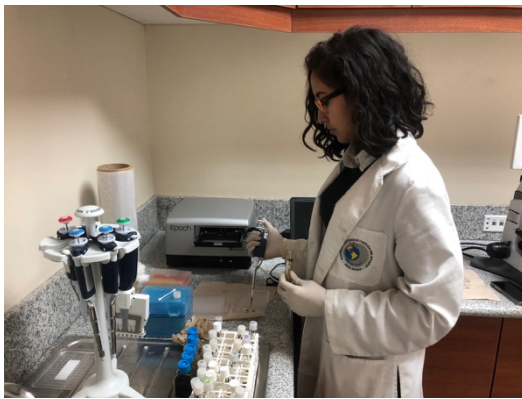
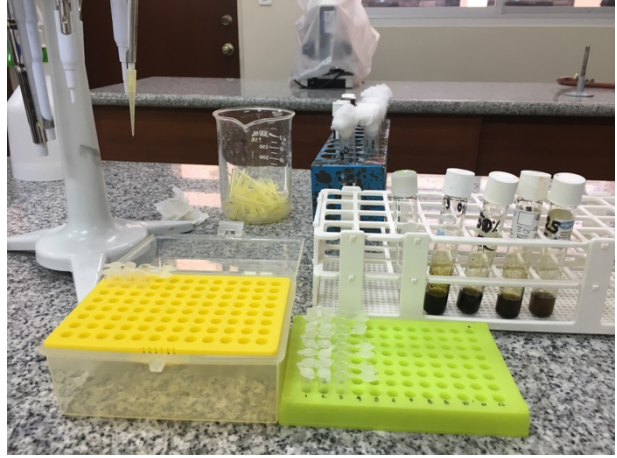
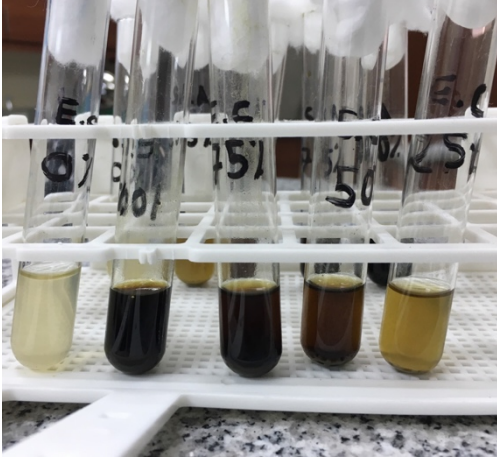
## Anexo 8. Replicación de bacterias



## Anexo 9. Antibiograma



## Anexo 10. Turbidimetría



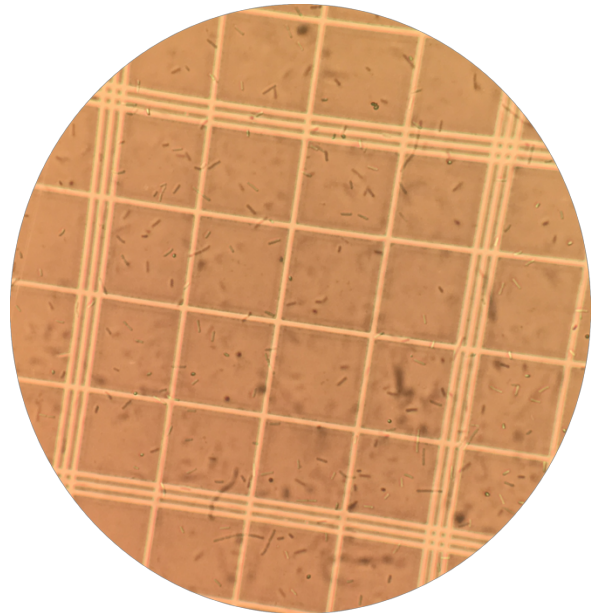
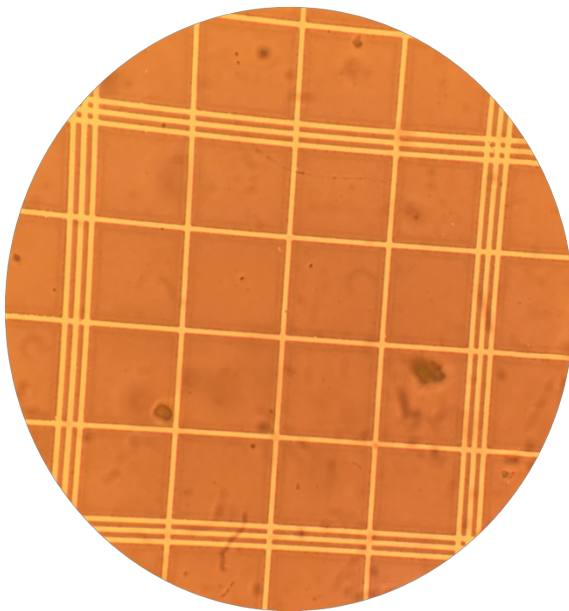
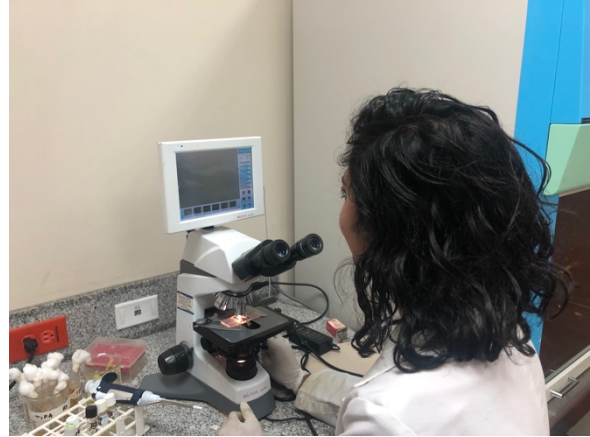
Matrix: Statistics

Data: 540

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.051	0.047	0.052	0.073	0.052	0.066	0.053	0.051	0.048	0.048	0.062	0.150
B	0.052	0.058	0.063	0.074	0.049	0.057	0.050	0.048	0.047	0.062	0.057	0.059
C	0.052	0.051	0.052	0.063	0.048	0.052	0.041	0.049	0.050	0.049	0.052	0.053
D	0.052	0.055	0.050	0.055	0.048	0.054	0.055	0.051	0.070	0.051	0.052	0.049
E	0.057	0.051	0.062	0.074	0.046	0.084	0.042	0.041	0.052	0.050	0.044	0.054
F	0.058	0.071	0.048	0.050	0.044	0.050	0.049	0.051	0.046	0.057	0.053	0.053
G	0.049	0.061	0.049	0.052	0.054	0.063	0.049	0.051	0.052	0.055	0.101	0.058
H	0.094	0.076	0.066	0.053	0.064	0.068	0.060	0.051	0.047	0.051	0.053	0.065

Edit Mask Help

## Anexo 11. Recuento en la cámara de Neubauer



## Anexo 12. Socialización

