



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y**  
**ZOOTECNIA**



**ACCIÓN ANTIBACTERIANA DE LA AYAC ZAPATILLA**  
**(CALCEOLARIA SPARSIFLORA KUNTZE), CANCHALAGUA**  
**(SCHKUHRIA PINNATA) FRENTE A MICROORGANISMOS**  
**CAUSANTES DE MASTITIS BOVINA**

**TESIS**

**PRESENTADA POR:**

**GLENY MARÓN MARÓN**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

**PUNO – PERÚ**

**2022**



## Reporte de similitud

NOMBRE DEL TRABAJO

**ACCION ANTIBACTERIANA DE LA AYAC ZAPATILLA ( CALCEOLARIA SPARSIFLORA KUNTZE), CANCHALAGUA (SCHKUHRIA PINNATA) FRENTE A MICROORGANISMOS CAUSANTES DE MASTITIS BOVINA**

AUTOR

**GLENY MARON MARON**

RECuento DE PALABRAS

**14132 Words**

RECuento DE CARACTERES

**81091 Characters**

RECuento DE PÁGINAS

**71 Pages**

TAMAÑO DEL ARCHIVO

**745.7KB**

FECHA DE ENTREGA

**Dec 21, 2022 12:04 PM EST**

FECHA DEL INFORME

**Dec 21, 2022 12:06 PM EST**

### ● 18% de similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos.

- 18% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 4% Base de datos de trabajos entregados
- 1% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

### ● Excluir del Reporte de Similitud

- Material bibliográfico
- Material citado
- Bloques de texto excluidos manualmente
- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 25 palabras)



Firmado digitalmente por COILA  
AÑASCO Pedro Ubaldo FAU  
20145496170 hard  
Motivo: Doy Vº Bº  
Fecha: 15.03.2024 15:25:00 -05:00

Resumen



## DEDICATORIA

### A Dios

Por iluminar mi camino y ayudarme a superar los diferentes obstáculos que se fueron presentando y a nunca rendirme.

### A mi familia

Por ser mi soporte emocional y económico y estar siempre ahí para apoyarme durante mi crecimiento tanto personal como profesional.



## AGRADECIMIENTOS

Al Mg. Abigail de la Cruz Pérez por su apoyo, dedicación y amistad brindada, por compartir sus conocimientos y aconsejarme en el camino de esta gran aventura, gracias por el impulso dentro de la investigación.

A todos los docentes de la facultad de medicina veterinaria y zootecnia por las experiencias compartidas, enseñanzas, consejos, conocimientos brindados para impulsar el desarrollo de nuestra formación profesional.



# ÍNDICE GENERAL

**DEDICATORIA**

**AGRADECIMIENTOS**

**ÍNDICE GENERAL**

**ÍNDICE DE FIGURAS**

**ÍNDICE DE TABLAS**

**ÍNDICE DE ACRÓNIMOS**

**RESUMEN** ..... 11

**ABSTRACT**..... 12

## **CAPITULO I**

### **INTRODUCCIÓN**

**1.1. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN**..... 16

1.1.1. Objetivo general: ..... 16

1.1.2. Objetivos específicos:..... 16

## **CAPITULO II**

### **REVISIÓN DE LITERATURA**

**2.1. ANTECEDENTES** ..... 17

**2.2. MARCO REFERENCIAL** ..... 21

2.2.1. Perspectiva de la producción láctea en el Perú y la región Puno ..... 21

2.2.2. Aspectos generales - Patología de la mastitis..... 22

2.2.3. Aspectos botánicos y etnobotánicos de las plantas en estudio ..... 25

2.2.3.1. Características de la familia Asteráceas (Chancalagua). ..... 25

2.2.3.2. Características de la familia calceolariaceae – Ayac Zapatilla (*calceolaria sparsiflora kuntze*). ..... 30

2.2.4. Método de difusión con disco en agar ..... 33



2.2.5. Extracto etanólico .....	36
---------------------------------	----

### CAPITULO III

#### MATERIALES Y MÉTODOS

<b>3.1. ÁMBITO DE ESTUDIO</b> .....	37
<b>3.2. MATERIALES</b> .....	38
3.2.1. Material biológico .....	38
3.2.2. Material de laboratorio .....	38
<b>3.3. METODOLOGÍA</b> .....	40
3.3.1. Diseño de la investigación .....	40
3.3.2. Población .....	40
3.3.2.1. Recolección, taxonomía de <i>Schkuhria pinnata</i> (Canchalagua) y <i>Calceolaria sparsiflora kuntze</i> (Ayac Zapatilla). .....	40
3.3.2.2. Preparación del extracto etanólico de <i>Schkuhria pinnata</i> (Canchalagua) y <i>Calceolaria sparsiflora kuntze</i> (Ayac Zapatilla). .....	41
3.3.3. Método de difusión con disco en agar. ....	42
3.3.4. Análisis estadístico .....	44

### CAPITULO IV

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

<b>4.1. EFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA <i>in vitro</i> AYAC ZAPATILLA (<i>calceolaria sparsiflora kuntze</i>) FRENTE A MICROORGANISMOS CAUSANTES DE LA MASTITIS BOVINA</b> .....	46
<b>4.2. EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA <i>in vitro</i> CANCHALAGUA (<i>Schkuhria pinnata</i>), FRENTE A MICROORGANISMOS CAUSANTES DE LA MASTITIS BOVINA</b> .....	49



<b>4.3. INTERACCIÓN PLANTA – MICROORGANISMO, <i>in vitro</i> DE AYAC ZAPATILLA (<i>calceolaria sparsiflora kuntze</i>) Y CANCHALAGUA (<i>schkuhria pinnata</i>), FRENTE A MICROORGANISMOS CAUSANTES DE LA MASTITIS BOVINA.....</b>	<b>52</b>
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>56</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>57</b>
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>58</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>65</b>

**Área:** Salud animal.

**Tema:** Acción antibacteriana de la ayac zapatilla y canchalagua frente a microorganismos causantes de mastitis bovina.

**FECHA DE SUSTENTACIÓN:** 22 de diciembre de 2022



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Especie vegetal <i>Schkuhria pinnata</i> (Lanm.).....	28
<b>Figura 2.</b> <i>Calceolaria sparsiflora</i> kuntze (Ayac Zapatilla).....	33



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación Taxonómica de la especie Schkuhria pinnata (Lanm.) Canchalagua, según el laboratorio de botánica de la facultad de biología de la universidad nacional san Antonio abad del cusco.....	27
<b>Tabla 2.</b> Acción antimicrobiana in vitro del extracto etanólico de Calceolaria sparsiflora kuntze (Ayac Zapatilla), frente a bacterias causantes de mastitis bovina. ....	46
<b>Tabla 3.</b> Acción Antimicrobiana in vitro del extracto etanólico de Schkuhria pinnata (Canchalagua), frente a bacterias causantes de mastitis bovina.....	49
<b>Tabla 4.</b> Acción antimicrobiana in vitro del extracto etanólico de Calceolaria sparsiflora kuntze (Ayac Zapatilla) y Schkuhria pinnata (Canchalagua), frente a bacterias específicas causantes de mastitis bovina.....	52



## ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

- FMVZ Facultad de medicina veterinaria y zootecnia
- FPL Federación panamericana de lechería
- OMS Organización mundial de la salud
- INS Instituto nacional de salud
- MINAGRI Ministerio de agricultura y riego
- TBC Recuento total de bacterias
- CS Células somáticas
- L Litros
- SCN Staphylococcus coagulasa negativa
- MIC Concentración inhibitoria mínima
- CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute
- AZ Ayac zapatilla
- RSNRV Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis
- MH Müller-Hinto



## RESUMEN

El uso inadecuado, sin criterio médico, ni estudios complementarios como un antibiograma en el uso de antibióticos para el tratamiento de la mastitis bovina, genera la presencia de residuos de antibióticos en la leche que es consumida por la población ocasionando resistencia a los antibacterianos, siendo el motivo para la búsqueda de nuevos estudios como la medicina alternativa y/o complementaria, evaluando para este fin el principio activo de las plantas que actúen contra los principales agentes causantes de esta enfermedad en bovinos. El presente estudio fue realizado en el laboratorio de Farmacología de la FMVZ de la UNA-PUNO, siendo el objetivo evaluar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las plantas Ayac zapatilla (*Calceolaria sparsiflora kuntze*) y Chanchalagua (*Schkuhria pinnata*), recogidos del centro arqueológico Pikillacta, Distrito de Lucre - Quispicanchis - Cusco, fueron procesadas, para obtener el extracto etanólico y evaluar mediante la técnica de difusión disco en agar, evidenciándose actividad antimicrobiana del extracto etanólico de Ayac zapatilla ( $p < 0,05$ ), con mayor tamaño de halo sobre bacterias *Bacillus licheniformes* y *Staphylococcus epidermidis* (14,97mm y 16,32 mm) y menor tamaño de halo sobre *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* (10,49 mm y 11,48 mm), mientras el extracto etanólico de Chanchalagua ( $p < 0,05$ ), muestra mayor tamaño de halo sobre bacterias *S. epidermidis* y *B. licheniformes* (18,85 mm y 19,25 mm) y menor tamaño de halo sobre *B. mucoide* (12,74 mm). Al interactuar plantas versus agente muestra diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ), Chanchalagua con mejor efecto sobre el *B. licheniformes* y *S. epidermidis* (19,25 mm y 18,85 mm) y Ayac zapatilla menor efecto sobre *B. subtilis* y *S. aureus* (11,48 mm y 10,49 mm). Llegando a la conclusión que el extracto etanólico de las plantas en estudio tienen efectividad antibacteriana frente a los patógenos causantes de mastitis.

**Palabras clave:** Mastitis, terapia alternativa, antibióticos, bovinos, plantas medicinales



## ABSTRACT

Inappropriate use, without medical criteria, or complementary studies such as an antibiogram in the use of antibiotics for the treatment of bovine mastitis, generates the presence of antibiotic residues in the milk that is consumed by the population, causing resistance to antibacterials, being the reason for the search for new studies such as alternative and/or complementary medicine, evaluating for this purpose the active principle of the plants that act against the main causative agents of this disease in bovines. The present study was carried out in the Pharmacology laboratory of the FMVZ of UNA-PUNO, The objective being to evaluate the antimicrobial activity of the ethanolic extract of the Ayac zapatilla (*Calceolaria sparsiflora* kuntze) and Chancalagua (*Schkuhria pinnata*) plants, collected from the Pikillacta archaeological center, Lucre - Quispicanchis - Cusco district, were processed to obtain the ethanolic extract and evaluated using the agar disk diffusion technique, evidencing antimicrobial activity of the ethanolic extract of Ayac zapatilla ( $p < 0.05$ ), with a larger halo size on *Bacillus licheniformes* and *Staphylococcus epidermidis* bacteria (14.97mm and 16.32mm) and smaller halo size on *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* (10.49 mm and 11.48 mm), while the ethanolic extract from Chancalagua ( $p < 0.05$ ) shows larger halo size on *S. epidermidis* and *B. licheniformes* bacteria (18.85 mm and 19.25 mm) and smaller halo size on *B. mucoide* (12.74 mm). When interacting plants versus agent it shows a significant difference Statistically ( $p < 0.05$ ), Chancalagua with better effect on *B. licheniformes* and *S. epidermidis* (19.25 mm and 18.85 mm) and Ayac zapatilla less effect on *B. subtilis* and *S. aureus* (11.48mm and 10.49mm). It was concluded that the ethanol extract of the plants under study have antibacterial properties and it is effective against the pathogens that cause mastitis.

**Keywords:** Mastitis, alternative therapy, antibiotics, bovine, medicinal plants



# CAPITULO I

## INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales son utilizadas por billones de personas en la mayor parte de los países, debido a la falta de asistencia de los servicios de salud. El Perú presenta una gran diversidad de plantas medicinales nativas, desde la época pre incaica hasta la actualidad. Siendo éstas utilizadas en forma empírica por sus bondades terapéuticas en el cuidado de la salud, debido a la actividad farmacológica que poseen, pero a la vez pudiendo ocasionar toxicidad en el organismo humano, dependiendo de la dosis · y vía de administración (cueva,2003).

La leche de vaca considerada alimento de gran valor nutricional completo y fuente importante de proteína que son aprovechados por niños y adultos. Según la Federación Panamericana de Lechería el consumo promedio de leche en América latina es de 130 litros por habitante por año, siendo Uruguay el país con mayor consumo de leche per cápita (240 litros por habitante/año), le sigue Costa Rica y Argentina que consumen 200 litros por habitante por año, en el caso de Perú el consumo de leche es de 84 litros por habitante por año, en la ciudad de Puno este consumo llega a los 25 litros por habitante por año, (Fao, 2018). Los datos evidencian un consumo significativo de leche en la población a nivel internacional, nacional y local.

La producción láctea, es una actividad importante en el país por la gran demanda de los consumidores de productos lácteos y sus derivados. La región Puno, constituye una de las mayores zonas productoras de leche a nivel del sur del país, en enero del 2018 se reportó 10 mil 255 toneladas de producción de leche fresca, incrementándose en 16,4%, comparado con enero del año 2017, (Costa *et al.*, 2018), parte de esta producción es



destinada a satisfacer la demanda local y a la elaboración de subproductos como el queso que se distribuyen a nivel local y regional. Una de las enfermedades con mayor incidencia en la producción de vacunos lecheros en el altiplano es la mastitis, el cual es un proceso inflamatorio de la glándula mamaria causada por patógenos como el *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma sp*, *Corynebacterium bovis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp*, *Pseudomonas sp*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Enterococcus sp*, (Pérez y Ganoza, 2017), esta enfermedad afecta la producción láctea y por ende la economía familiar del productor del medio rural.

Las dos presentaciones de la mastitis se caracterizan por la manifestación de los signos clínicos, siendo la mastitis clínica la que muestra signos evidentes de inflamación e infección y mastitis subclínica que no evidencia sintomatología alguna, por lo que es la más perjudicial, pues se modifica la composición de la leche (Fernández *et al.*, 2012). Para el tratamiento de la mastitis, es importante la identificación del agente causal, lo cual no se realiza por diferentes factores como: falta de reactivos, personal no capacitado para un correcto procedimiento e interpretación de los resultados y ocasiona alto costo, es así que se hace uso de antibióticos de manera inadecuada, lo que podría ocasionar resistencia a los antibióticos en algunas bacterias y causando depresión al animal afectado (Velázquez y Vega, 2012).

La mastitis es una enfermedad que disminuye la producción láctea, es por ello que los propietarios recurren a tratamientos agresivos haciendo uso de diferentes antibióticos, los cuales no son administrados correctamente, porque se interrumpe los periodos de terapia y no se respetan los tiempos de retiro de la leche, constituyendo una de las causas para la aparición de microorganismos resistentes a la terapia antibacteriana, tomando en cuenta que una de las vías de eliminación de los antibióticos es la leche, y que pueden ser



evidenciados en esta, y así lo demuestra un estudio realizado en Lima, (Salas *et al.*, 2013) donde se encontraron restos de antibióticos en el 45% de las muestras analizadas, constituyendo esto un riesgo para la salud pública ya que podría causar alergias y resistencia de las bacterias.

Un problema mayor es la resistencia a los antibióticos siendo uno de los amenazas para la salud mundial, por ejemplo, España en personas sanas se determinó la sensibilidad antibiótica del *Staphylococcus aureus*, encontrándose una resistencia del 87.1%, 11.4% a la fenoximetilpenicilina y azitromicina respectivamente (Llor *et al.*, 2018). Latinoamérica, en Colombia donde se evidencia resistencia antibiótica del *Staphylococcus aureus* un 49.6% resistente a la meticilina a su vez se encontró resistencia múltiple a la clindamicina, gentamicina, ciprofloxacina (Pérez *et al.*, 2010). A nivel Nacional nos informa sobre la resistencia del *Staphylococcus aureus* frente a la oxacilina con 84% y penicilina 99%, según el Instituto Nacional de Salud 2012. En Puno se evidencia el problema de resistencia a los antibióticos en un estudio realizado en el Hospital Regional Manuel Núñez Butrón donde se encontró cepas de *Staphylococcus* y *E. coli* resistentes en un 100% a antibióticos como la penicilina y ácido nalidixico respectivamente (Apaza, 2017). Teniendo en cuenta que estos antibióticos son también utilizados en la ganadería, para el tratamiento de enfermedades como la mastitis, como promotores de crecimiento y otras diversas enfermedades, es posible que ya se esté generando cepas resistentes a causa del mal uso inadecuada de antibióticos en animales.

Ante la problemática del uso inadecuado de antibióticos que ocasiona altos costos y promueve la aparición de cepas bacterianas resistentes se hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas que sean eficaces, de bajo costo y fácil aplicación para el tratamiento de la mastitis en bovinos (Sharma *et al.*, 2018). En el presente trabajo se buscó



verificar la actividad antibacteriana de las especies vegetales: Ayac zapatilla (*calceolaria sparsiflora kuntze*), Canchalagua (*Schkuhria pinnata*) como una alternativa para el descubrimiento de nuevos agentes antibacterianos. Ya que el uso de plantas medicinales puede ser tan eficaces como los productos sintéticos, por ejemplo, el orégano que según (Moreno *et. al.*, 2017), tiene propiedades bactericidas frente a la *Escherichia coli*, que es uno de los agentes etiológicos de la mastitis bovina. Todo esto con el fin de disminuir los residuos de antibióticos en la leche y sus derivados, siendo los objetivos de la presente investigación:

## 1.1. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

### 1.1.1. Objetivo general:

- Determinar la acción antibacteriana *in vitro* de Ayac zapatilla (*calceolaria sparsiflora kuntze*) y Canchalagua (*Schkuhria pinnata*), frente a microorganismos causantes de mastitis bovina.

### 1.1.2. Objetivos específicos:

- Determinar la efectividad antibacteriana *in vitro* Ayac zapatilla (*calceolaria sparsiflora kuntze*) frente a microorganismos (*B. licneniformes*, *B. subtilis*, *staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *bacillus sp.*) causantes de mastitis bovina.
- Determinar la efectividad antibacteriana *in vitro* Canchalagua (*Schkuhria pinnata*), frente a microorganismos (*B. licneniformes*, *B. subtilis*, *S taphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *bacillus sp.* ) causantes de mastitis bovina.



## CAPITULO II

### REVISIÓN DE LITERATURA

#### 2.1. ANTECEDENTES

Existen evidencias de actividad antimicrobiana en trabajos de investigación realizados en referencia a las plantas en estudio; Ayac zapatilla (*calceolaria sparsiflora kuntze*) y Canchalagua (*Schkuhria pinnata*), podemos mencionar:

Leal, (2014), en su trabajo de investigación de las especies vegetales de *Thymus vulgaris caléndula officinalis* y *salvia officinalis* evaluó el extracto Fito terapéutico, con efectos antibacterianos contra bacterias causantes de la mastitis (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Echirichia coli*). Encontrando acción bactericida de la *caléndula officinalis* frente a las cepas bacterianas causantes de la mastitis.

Flores y col., (2021), evaluó el efecto antimicrobiano de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) en bacterias causantes de mastitis, dichas bacterias fueron aisladas de vacas con mastitis. Para ello utilizaron 8 cepas de bacterias grampositivas (4 *S. aureus* y 4 *S. coagulasa negativa*) y 8 cepas gramnegativas (4 *Klebsiella spp.* y 4 *E. coli*), al utilizar la concentración de 200 mg/ml obtuvieron un diámetro de 21.62 mm para bacterias grampositivas y de 9.6 mm para bacterias gramnegativas. Mientras que al utilizar 50 mg/ml de extracto etanólico obtuvieron un diámetro promedio de 13.75 mm en lo que respecta a bacterias grampositivas, mientras que para las gramnegativas no obtuvieron halo de inhibición. En este estudio podemos observar un mayor efecto sobre bacterias del género *Staphylococcus*.



Ramírez (2010), cita a la *Schkuhria pinnata* del género *Schkuhria* y familia de *Asterácea* conocida con el nombre común de Canchalagua en varias regiones del Perú, siendo una planta herbácea pequeña que crece en las regiones montañosas de Sudamérica. Las hojas, tallo y flores han sido tradicionalmente usados desde tiempo ancestrales por poseer propiedades antiinflamatorias, depurante sanguíneo, acné, etc. Teniendo resultados favorables frente a infecciones antibacterianas.

Purizaca y col. (2018), realizaron un estudio de la actividad antibacteriana de los extractos hidroalcohólicos de hojas, flores, tallo y raíz de Canchalagua (*Schkuhria pinnata*), frente a *Propionibacterium acnés* (*Cutibacterium acnés*), reportando un resultado positivo del extracto hidroalcohólico de las hojas de Canchalagua (*Schkuhria pinnata*), obteniendo con esta parte de la estructura vegetal un mayor diámetro halo de inhibición, demostrando la actividad antibacteriana de la planta en estudio.

Fernández y col. (2021), reportan actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Mentha spicata L.* (Hierba buena) a una concentración de 100%, 75% y 50% sobre *Staphylococcus aureus*. Encontrándose tamaños de halos de inhibición de 19,76; 18,35 y 17,55 respectivamente. Observándose una mayor acción antibacteriano en el extracto etanólico al 100% sobre *S. aureus*, y disminuyendo el efecto conforme disminuye su concentración.

Reyna (2020), nos reporta la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Verbena officinalis* (verbena), utilizando concentraciones de 50% y 75% donde demuestra los promedios de halos de inhibición de 13.3mm y 25.0 mm de diámetro respectivamente. Valores que indican que existe actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*. Según lo expuesto por (Martínez y Sánchez, 2017), recalcan que



la envoltura celular actúa como un mecanismo de resistencia; tanto en bacterias grampositivas y gramnegativas que presentan pared celular y membrana plasmática, *Staphylococcus aureus* es una bacteria grampositiva que carece de membrana externa presentando una mayor permeabilidad, considerando este aspecto es que se muestra más sensible a la acción de los extractos etanólicos, haciendo notoria esta diferencia en los resultados obtenidos en el presente estudio.

Santa y col. (2021), en su trabajo de investigación nos reporta que el extracto etanólico de *annona muricata* (guanábana) inhibió el crecimiento *in vitro* de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus B-hemolíticos*. La mayor inhibición se observó a una concentración de 1000 mg/ml con halo inhibitorio de 14,6 mm y 12,33 mm de diámetro respectivamente. Las cepas de *Streptococcus B-hemolíticos* y *Staphylococcus aureus* mostraron una concentración mínima inhibitoria a 250 y 500 mg/ml, respectivamente, demostrándose el efecto antibacteriano *in vitro* es directamente proporcional a la concentración empleada. Sin embargo, en el caso de *Escherichia coli* no se observó inhibición de crecimiento del extracto etanólico de *annona muricata* (guanábana).

Pérez (2018), reporta actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico de *Juglans regia* (nogal), sobre cepas de *Staphylococcus epidermidis*, en donde emplearon concentraciones al 25%, 50%, 75% y 100%. Observándose que las medias del tamaño de halo a diferentes concentraciones incrementan de acuerdo a la concentración, obteniendo al 50% un promedio de 7.40; a 75% un promedio de 10.75 y al 100% es de 15.75, siendo ésta el halo de inhibición mayor que indica a mayor concentración mayor inhibición del halo.



Bussmann *et al.* (2013), presentaron un estudio sobre la actividad antimicrobiana de las plantas tradicionalmente usadas contra el acné en el norte del Perú, siendo una de las plantas en estudio (*Schkuhria pinnata*) Canchalagua, frente a *Propionibacterium acnés* causante del acné, en el cual reporta una actividad antibacteriana y antiinflamatoria frente a estas bacterias obteniendo resultados favorables.

Soto (2019), realizó un estudio cuyo objetivo fue determinar el efecto antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico (*Schkuhria pinnata*) Canchalagua en *Rattus Rattus* Albino (Ratón albino macho), siendo la investigación de tipo experimental, evaluando el efecto antiinflamatorio mediante la inhibición del edema inducido por carragenina, con extracto hidroalcohólico de (*Schkuhria pinnata*) Canchalagua a concentraciones de 1% y 2.5% en comparación al medicamento (Diclofenaco 1%), obteniendo resultados favorables de inhibición del edema, el cual es mayor si se incrementa la concentración 2.5%, demostrando tener propiedades antiinflamatorias de la planta en estudio.

Condorhuaman (2012), evaluó el efecto antihipertensivo y tóxico del extracto etanólico de la *Calceolaria myriophylla* Kraenz (Ayac Zapatilla) en ratones hipertensos inducidos por L-Name, encontrándose efectos antihipertensivos sin demostrar efectos tóxicos en los animales en estudio. También manifiesta que a nivel mundial se investigan y reportan numerosos estudios de plantas medicinales con actividad farmacológica, como a la especie vegetal (Ayac Zapatilla - *Calceolaria myriophylla*), utilizada en la medicina tradicional de la región del Cusco a la que atribuyen propiedades “curativas” en diversas enfermedades como reumatismo, regulador menstrual, infecciones, úlceras gástricas, dolores estomacales, como diurético y enfermedades renales.



Olazábal (2001), menciona en su texto que la Ayac zapatilla o zapatilla identificada como *Calceolaria myriophylla* Kraenz es una hierba anual de 20 m a 30 cm. de altura, cuyas flores amarillas son parecidas a los zapatos, de ahí su nombre; de hojas pequeñas. Se encuentra en laderas y cercas de piedra hasta los 4000 m.s.n.m. La infusión de las flores, hojas y tallo son considerados como remedios caseros para tratar afecciones renales.

## **2.2. MARCO REFERENCIAL**

### **2.2.1. Perspectiva de la producción láctea en el Perú y la región Puno**

El Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI 2017), reporta a través del Plan Ganadero 2017-2021, que en los últimos 15 años la producción de leche fresca de vaca ha crecido a una tasa anual de 4.75 %, detallando que el incremento de este porcentaje se debe a un mayor número de vacas en ordeño y un incremento en el promedio de producción láctea por de vaca/ordeño, pasando de 4.75 kg/vaca en ordeño/día en el año 2011 a 5.85 kg/vaca en ordeño/día en el año 2015.

Málaga y Col. (2007), cita que la región Puno, en las provincias de Azángaro, Melgar y Huancané, que son provincias con mayor población de vacunos productores de leche, cuya principal actividad de sustento económico en las familias de escaso recurso económico es la producción láctea, siendo la mastitis clínica y sub clínica una enfermedad con mayor incidencia, generando pérdidas económicas en los hatos ganaderos, señala también que no existe hato libre de esta enfermedad debido a la interacción de microorganismos que son agentes patógenos más importantes causantes de esta enfermedad, tomando en consideración lo citado, cabe señalar que la mastitis en su



presentación sub clínica reduce en un 70% la producción láctea, afectando de manera negativa en el ingreso económico de las familias rurales y el valor nutricional de la leche por consecuente sus derivados.

SENASA (2015), cita que, en los últimos tres años, el proceso patológico de la mastitis, ocasionaron en el Perú pérdidas económicas de aproximadamente US\$ 2, 500 000, este monto solo se atribuye a una forma de presentación de la mastitis, el cual es la mastitis clínica, el cual es más perceptible por el modo de patología que desencadena, la cual representa el 20-30% de esta enfermedad.

### **2.2.2. Aspectos generales - Patología de la mastitis**

#### **a) Glándula Mamaria**

Según (Sisson y Grossman 1982), son glándulas cutáneas modificadas, que están asociadas funcionalmente a los órganos genitales, en rumiantes llamados popularmente ubre. Al realizar un corte transversal se aprecia el cuerpo de la glándula, seno galactóforo, cavidad del pezón, conducto galactóforo, surco inter mamario, septum entre las glándulas y grasa supra mamaria. Existen cuatro pezones de 7 a 8 cm de longitud. Cada pezón tiene un conducto galactóforo simple, que se amplía dorsalmente en un seno galactóforo. La pared del pezón está compuesta de cinco distintas capas, que de fuera adentro son: piel, capa fibrosa externa, capa intermedia, capa fibrosa interna y mucosa.



## **b) Mastitis**

Aranguren *et al.* (2009), determina que la mastitis bovina es la inflamación de la glándula mamaria que puede ser ocasionada por factores físicos, químicos, mecánicos o infecciosos. El 80% de los casos de mastitis bovina son ocasionados con la entrada de microorganismos patógenos específicos a través de los pezones y tejidos mamarios.

Ahmad *et al.* (2015), define a la mastitis como una inflamación de la glándula mamaria con una serie de cambios físicos y químicos de la leche, los cambios patológicos de los tejidos glandulares de la ubre se manifiestan con un incremento de CS (Células somáticas) por la presencia de microorganismos patógenos.

Cunningham (2009), manifiesta que las causas de la mastitis son multifactoriales como lesiones traumáticas, presencia de sustancias irritantes, agentes infecciosos y sus toxinas, principalmente por el daño producido en el interior del canal, durante la actividad de ordeño y que a su vez los microorganismos se transfieren a la ubre durante el ordeño como sostiene (Belachew, 2016).

## **c) Clasificación de la mastitis**

Hoyos (2014), sostiene que la mastitis se clasifica en dos grandes tipos, contagiosa y ambiental; debiéndose de considerar a la mastitis contagiosa como la patología que ocasiona mayor incidencia por el modo de presentación: Clínica y subclínica como indican (Awale *et al.*, 2012).



Gasque (2008), define a la mastitis clínica como una patología, cuya presentación es de manera súbita, observándose inflamación, enrojecimiento y dolor de la ubre, con la subsecuente disminución de la producción láctea y alteraciones en la leche de los cuartos afectados.

Awale *et al.* (2012), sostiene que la mastitis subclínica, se caracteriza por no presentar signos visibles de enfermedad, apreciándose la leche en un estado aparentemente normal, sin embargo, existe una disminución en la producción de la misma y un aumento en el conteo de células somáticas. Observándose un mayor porcentaje de presentación en animales con más números de ciclos de lactación que en animales jóvenes. Estas características hacen dificultosa su identificación y requieren de pruebas especiales para su detección, ocasionando mayor pérdida económica en los hatos lecheros.

#### **d) Agentes bacteriológicos causantes de la mastitis**

Barbosa *et al.* (2007), manifiesta que existe referencia bibliográfica de que la mastitis en sus dos formas de prestación puede ser causada por al menos 135 agentes patógenos diferentes, teniéndose en consideración que en su mayoría son causadas por bacterias, las cuales pueden ser patógenas o de origen ambiental.

Oviedo *et al.* (2006), cita que los patógenos causantes de la mastitis se clasifican en: Coco bacilo Gram negativo, bacilos cocoides, destacando la *Pasteurella sp*, *Pasteurella haemolytica*. Cocos Gram positivos con tres familias: *Micrococcoceae*, *Streptococcoceae* y *Peptococcoceae* cuyos representantes son los *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Peptococos* respectivamente.



Condori (2017), cita un estudio realizado en la región de Arequipa, donde se aislaron agentes causales de la mastitis sub clínica en vacas en estado fisiológico de producción láctea, encontrándose un 82% de presentación de *Staphylococcus aureus*, siendo esta una especie del género *Staphylococcus*, microorganismo con importancia desde el punto de vista clínico y que a su vez está permanentemente presente en las mucosas, la piel y en el medio ambiente que rodea a los vacunos, encontrándose su depósito principal en las vacas adultas, en su ubre y pezones afectados; forma colonias en los canales de los pezones, especialmente si existe lesión ocasionando la formación de un tejido cicatrizal que impide que las drogas y medicamentos penetren en los lugares infectados, haciendo que el tratamiento en la lactancia sea a menudo ineficaz (Macedo *et al.*, 2006).

### **2.2.3. Aspectos botánicos y etnobotánicos de las plantas en estudio**

#### **2.2.3.1. Características de la familia Asteráceas (Chancalagua).**

Ramírez (2010), manifiesta que las Asteráceas, también conocidas como Compositae, representan alrededor de 1500 géneros y unas 32,000 especies a nivel mundial. Abarcan desde hierbas de 1 centímetro hasta árboles de más de 30 metros. Se les puede encontrar desde regiones polares hasta los trópicos. Constituyen hasta el 10% de la flora. Son angiospermas; su nombre deriva del vocablo aster (estrella), por su inflorescencia.

a) **Género *Schkuhria Schkuhria*.** Es un género de plantas fanerógamas perteneciente a la familia de las asteráceas. Comprende 41 especies descritas y solo 7 aceptadas, el género fue descrito por *Albrecht Wilhelm Roth*, a continuación, se brinda



un listado de las especies del género *Schkuhria* aceptadas hasta junio de 2012, ordenadas alfabéticamente, indicando el nombre binomial seguido del autor, abreviado según las convenciones y usos (Purizaca y col., 2018).

- *Schkuhria anthemoides* (Kunth) Wedd.
- *Schkuhria degenerica* (Kuntze) R.E.Fr.
- *Schkuhria multiflora* Hook. & Arn.
- ***Schkuhria pinnata* (Lanm.) Kuntze ex Thell.**
- *Schkuhria schkuhrioides* (Link & Otto) Thell.
- *Schkuhria senecioides* Nees
- *Schkuhria virgata* (La Llave) DC.

**b) Especie vegetal *Schkuhria pinnata* (Lanm.) Kuntze ex Thell.** - La especie vegetal fue identificada por el botánico y biólogo *Carl Ernst Otto Kuntze*, siendo publicado en *Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis* el 25 de noviembre de 1912. Luego se descubrió que Kuntze habría puesto un sinónimo del nombre de la especie que Thell dio en la página 308 de un libro con autor anónimo. Por ello el nombre lleva aparte de Lanm. O. *Kuntze ex Thell*. El nombre esta aceptado oficialmente de las 41 especies propuestas del género *Schkuhria* (Purizaca y col., 2018).

**c) Nombre común, vulgar, vernacular, trivial o popular Akech**, Anisillo Cimarrón, Azureta, Cachalagua, Canchalagua, Canchalahua, Dwarf Marygold, Escoba de anisillo, escobilla, Jayajpichana, Jayak Pichana, Kanchalawa, Karatataraku Putsutiri, Khakibush, Kuti Pichaña, Mata Pulgas, Onyalo Biro, Pinnate False Threadleaf, Pinqui-Pichana, Piqui Pichana, Schkuhria, Starry Skies, Tacote, Yelow Tumbleweed (Purizaca y col., 2018).

**d) Descripción botánica y taxonómica.** - Es una planta anual, erecta, ramificada por encima de la base, de 0,25 a 0,75 m. de altura. No olorosa, ni viscosa. Sin látex. Muy ramificada en los dos tercios superiores.

**Tabla 1.** Clasificación Taxonómica de la especie *Schkuhria pinnata* (Lanm.) Canchalagua, según el laboratorio de botánica de la facultad de biología de la universidad nacional san Antonio abad del cusco.

REINO	PLANTAE
DIVISION	Magnoliophyta
CLASE	Magnoliopsida
SUBCLASE	Asteridae
ORDEN	Asterales
FAMILIA	Asteraceae
GENERO	<i>Schkuhria</i>
ESPECIE	<i>Schkuhria pinnata</i> (lanm) kuntze ex thell

- **Raíz:** Axonomorfa, robusta, subterránea y perenne.
- **Tallo:** Rollizo, cilíndrico, o en ocasiones comprimido, estriado y lampiño.
- **Ramos:** Con escasos pelos cortos, gruesos, pediculados y aplicados, que aumentan en número hacia los extremos de las ramificaciones, y aún más en los pedúnculos.
- **Hojas:** Basales opuestas (frecuentemente faltan cuando la planta está desarrollada) y las superiores alternas, hasta de 4 cm de largo, pinnada o bipinnadamente divididas en segmentos filiformes, o bien, indivisas y filiformes, los segmentos de hasta 1,5 cm de largo, con numerosas glándulas hundidas pequeñas.
- **Inflorescencia/Floración:** Muy abundante. Inflorescencia en racimo compuesto cimoso-corimboso flojo de hasta 5 mm de largo. Cabezuela/Flores: Cabezuelas agrupadas, de 4 a 5 mm de alto, sus brácteas 4 o 5, obovadas u oblanceoladas,

obtusas o redondeadas en el ápice, generalmente las flores centrales son amarillas, las cabezuelas están rodeadas de unas hojitas (involucro) verdes que están coloreadas de rojo, amarillo o morado en los bordes, las flores llegan a medir 1,5 cm.

- **Frutos y semillas:** Aquenios tetraangulares, de 3 a 4 mm de largo y 0,7 a 1,0 mm de ancho, pubescentes en los ángulos; vilano de 8 escamas, 4 de ellas aristadas, desiguales o iguales. Los frutos son secos y no se abren.
- **Plántulas:** Hipocótilo alargado, de 63 mm; epicótilo de hasta 24 mm; hojas de 6 a 10 mm de largo y de 4,5 a 8 mm de ancho, pecíolo de 2 a 6 mm de largo (6,9).

*Schkuhria pinnata* (Lanm.) Kuntze ex Thell Flores frescas de “Canchalagua”



**Figura 1.** Especie vegetal *Schkuhria pinnata* (Lanm.)

**e) Hábitat y distribución.** - De origen desconocido, habita en clima templado de 1 875 msnm a más. Está asociada a la agricultura de riego y de temporal, así como a matorrales xerófilos y pastizales y florece de junio a noviembre. Esta especie no es propia de nuestra flora, siendo así de amplia distribución geográfica en países de continentes como América y África. En América se pueden encontrar desde Estados Unidos de Norteamérica y México, en Sudamérica forma parte de la flora de Perú, Ecuador, Bolivia, Argentina y Paraguay “Canchalagua” *Schkuhria pinnata* (Lanm.) Kuntze ex Thell es una hierba



pequeña que crece en nuestro territorio distribuida en los valles y laderas de sierra entre 2000 y 3000 msnm en las serranías de Ayacucho, Ancash y Piura, principalmente (Ramírez, 2010).

**f) Propiedades terapéuticas.** - En la Medicina tradicional de países como México, Ecuador, Perú y Argentina *S. pinnata* (Lanm.) es usada para el tratamiento de diversas afecciones de la salud como diurética, depurativa, emenagogo, diaforético, laxante ligero, febrífuga, adelgazante, antidiabética, antiinflamatorio, antibiótico, regulador hormonal y de grasas, tratamiento de problemas hepáticos y alérgicos, se le atribuye actividad colagoga, además es usado como insecticida doméstico. Es usado también para tratar enfermedades como pulmonía, pleuresía, estimulante, digestiones difíciles, dolor estomacal, estimulante del apetito y de la función biliar, fatiga, falta de ánimo y para la caída de cabello o calvicie prematura. Además, su empleo para tratar afecciones de la piel como el acné, dermatitis, infecciones urinarias, antimalárico, antimicrobiano y antioxidante están garantizados por diversos estudios de investigación farmacológica (Ramírez, 2010).

**g) Composición química.** - Se ha reportado el aislamiento de compuestos bioactivos en especies pertenecientes a la familia Asteraceae. La investigación química de las partes aéreas de *Schkuhria pinnata* var. *wislizeni* (Asteraceae) permitió la caracterización de lactonas sesquiterpénicas flavonoides, y acil fenil propanoides (Purizaca y col., 2018).

En relación con los compuestos químicos acerca de la especie se caracterizaron metabolitos como: Alcaloides, Flavonoides, Compuestos fenólicos, Taninos, Triterpenoides y esteroides, Azúcares reductores, Lactonas, Desoxiazúcares, Núcleo esteroideal. El estudio fitoquímico del extracto etanólico al 96% de toda la planta determinó que posee una mayor proporción de alcaloides, flavonoides, compuestos



fenólicos y taninos. El efecto diurético se puede atribuir a la presencia de flavonoides y compuestos fenólicos (Ramírez, 2010). Según un estudio realizado, se reportó de *Schkuhria pinnata* (Lam.) O. Kuntze. var. *pinnata*, el aislamiento de dos flavonoides, caracterizando a uno de ellos como el 5, 7,3'; 4' - tetrahidroxi-6-metoxiflavonol y proponiendo tentativamente al otro como 5, 7, 3', 4'- tetrahidroxi-3-metoxiflavona, además de los ya reportados sitosterol, a-amirina, lupeol y una mezcla de hidrocarburos lineales C-27 a C-33 (Purizaca y col., 2018).

### **2.2.3.2. Características de la familia calceolariaceae – Ayac Zapatilla (*calceolaria sparsiflora kuntze*).**

Ayac Zapatilla (*calceolaria sparsiflora kuntze*), es una hierba anual de 20 a 30 cm. de altura, cuyas flores amarillas son parecidas a los zapatos, de ahí su nombre; de hojas pequeñas. Se encuentra en laderas y cercos de piedra hasta los 4000 m.s.n.m. (Ramírez, 2010). Las flores tienen corola bilabiada, cuya parte inferior está hinchada y tiene forma de zapato, la inflorescencia 3 – 10 flores, las ramas son blancas, las hojas son pequeñas, elípticas a ovaladas (Rodas, 2012).

**a) Género Calceolaria L.:** La familia Calceolariaceae es reconocida en el Perú por presentar dos géneros y 121 especies (Brako & Zarucchi, 1993). Principalmente arbustos y hierbas donde se reconoció 101 endemismos, la mayoría del género Calceolaria, (Salinas y león, 2006). Estos autores indican que los taxones endémicos se encuentran principalmente en las regiones Mesoandina, Puna Húmeda, Seca y Páramo, entre los 300 y 4500 msnm. De los cuales 27 taxones endémicos se encuentran representados dentro del Sistema Nacional de Áreas Naturales Protegidas por el Estado.

**b) Especie vegetal *Calceolaria sparsiflora kuntze*.** - Es una especie de flor de zapatilla, descrita por el entomólogo y botánico alemán **Gustav Kunze**, citado por (Roskov *et al.*,



2014). También conocida con *Calceolaria cuneiformes* var. *Baccharidiofolia* mie., *Calceolaria herrerae* var. *Ramossissima* Kranzl. En el Perú, este género posee más de 120 especies sin considerar las subespecies e híbridos, se caracteriza por tener corola bilabiada con el labio inferior en forma de saco y las flores son generalmente de color amarillo (Andersson, 2006).

**c) Nombre común, vulgar, vernacular o popular.** - Capuchito, zapatitos de venus, topa-topa, zapatitos de la virgen, zapatilla (Andersson, 2006).

**d) Descripción botánica y taxonómica.** – Es una hierba perennes, sub arbustos o arbustos. Hojas simples, opuestas y decusadas o ternadas, raro alternas. Inflorescencia usualmente en cimas, usualmente amarilla; labio superior formado por las dos piezas corolinas adaxiales.

Tabla 2. Clasificación Taxonómica de la especie *Calceolaria sparsiflora* kuntze (Ayac Zapatilla), según el laboratorio de botánica de la facultad de biología de la universidad nacional san Antonio abad del cusco (herbario Vargas).

REINO	PLANTAE
DIVISION	Magnoliophyta- Angiospermas
CLASE	Magnoliopsida- Dicotiledoneas
SUBCLASE	Asteridae
ORDEN	Lamiales
FAMILIA	Calceolaria L.
GENERO	Calceolariaceae
ESPECIE	Calceolaria sparsiflora kunze

**e) Hábitat y distribución.** – La familia calceolariaceae es reconocida en el Perú por presentar dos géneros y 121 especies, principalmente arbustos y hierbas. Los taxones endémicos se encuentran principalmente en las regiones mesoandina, puna húmeda y seca y páramo, entre los 300 y 4500 m de altitud, (Purizaca y col., 2018).



**f) Propiedades terapéuticas.** – Dentro de los antecedentes reportados se mencionan estudios de muchas especies del género *Calceolaria*: Se evaluó la actividad insecticida de dos naftoquinonas extraído de la *Calceolaria* andina en donde se concluye que son altamente efectivos para las especies de Homóptera y Acari. Además, demostraron la baja toxicidad oral y dérmica en mamíferos. Se describe que esta planta es muy buscada por sus flores muy amarillas, color canario, tienen la forma de zapato. Es una de las plantas más útiles en la medicina casera. Con el cocimiento de unas cuantas ramitas y flores, una cucharada de garbanzo tostado y molido, una regular porción de cola de caballo y otra de estigmas de maíz, se obtiene la curación de todas las enfermedades de las vías urinarias (Mora, 2013).

Sus hojas y flores son utilizadas como antivenéreo, descensos vaginales, diurético, afecciones uterinas y manchas de rostro (Ramírez, 2010). Concluye que todas las especies de *Calceolaria* existentes en la zona sur andina del Perú tiene una preferencia clara en afecciones renales, uterinas, vaginales y post parto (Purizaca y col., 2018). Reportes etnobotánicos describen el uso como anticonceptivo, colerina, tos, dolor de estómago, para los riñones, post parto y úlceras gástricas (Ramírez, 2010). En el Distrito de Colquepata – Paucartambo se reporta su uso contra las afecciones renales reposando los tallos, hojas y flores; igualmente es utilizado contra las úlceras gástricas y dolor de estómago (Purizaca y col., 2018).

Demostó el efecto gastroprotector sobre lesiones gástricas inducidas por indometacina en ratas al utilizar el extracto hidroalcohólico de *Calceolaria myriophylla*. También determinó la presencia de constituyentes químicos como azúcares reductores, heterósidos, flavonoides, compuestos fenólicos, alcaloides, taninos, saponinas y cumarinas (Sharma, 2014) y también se ha demostrado que el extracto acuoso de *Calceolaria tripartita* mejora la función hepática en ratas con inducción de hepatotoxicidad

por tetracloruro de carbono al reducir los niveles de TGO y TGP en condiciones experimentales (Vallejos y Col., 2012). Finalmente existen múltiples reportes etnobotánicos de las propiedades terapéuticas de *Calceolaria myriophylla* Kraenz, entre las que destacan el tratamiento de afecciones renales y vías urinarias, así como reumatismos, regulaciones menstruales, infecciones, úlceras gástricas y dolores estomacales; sin embargo, no existen estudios científicos que validen estas aplicaciones terapéuticas (Sharma, 2014).

**g) Composición química.** – la síntesis fitoquímica es abundante están los azucares, flavonoides y menor cantidad de fenoles, terpenos y esteroides, grupos aminos libres. Sólo la tercera parte de este género estudiados químicamente presentan, alcaloides, saponinas, han sido aislados. Y mínima cantidad taninos, quinonas.



**Figura 2.** *Calceolaria sparsiflora* Kuntze (Ayac Zapatilla)

#### 2.2.4. Método de difusión con disco en agar

Se basan en la difusión del antibiótico desde un soporte sólido hacia una base de agar, generalmente agar Müller-Hinton (MH) de pH 7.2 - 7.4, medio recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) al que se añadirán los suplementos necesarios para asegurar el crecimiento de organismos exigentes.



La recomendación del uso del medio en base de MH está fundamentada en la buena reproducibilidad en los test de susceptibilidad, la baja concentración de inhibidores de sulfonamida, trimetoprim y tetraciclinas, que permite el crecimiento de la mayor parte de las bacterias patógenas y en la experiencia en su uso con cepas clínicas.

Antibiograma disco-placa, este método, basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores es uno de los recomendados por el CLSI para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. Es ampliamente utilizado en la práctica habitual de los laboratorios de Microbiología.

En el medio de cultivo, previamente inoculado en su totalidad con el microorganismo problema, se depositan discos de celulosa impregnados con diferentes antibióticos; cada disco está identificado y contiene un antibiótico con una concentración conocida.

Indicaciones: Es un método aplicable a una amplia variedad de bacterias, fundamentalmente bacterias aerobias no exigentes de crecimiento rápido.

Ventajas e inconvenientes: Es un método fácil de realizar, rápido (con la limitación que supone el tiempo necesario para el crecimiento bacteriano) y barato además de presentar flexibilidad en la selección de los agentes antimicrobianos a estudiar. Tiene el inconveniente de no permitir una lectura directa del valor de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

### **Procedimiento:**



- Paso 1: partiendo de una cepa crecida en una placa de cultivo de 20-24h, se recoge la cantidad necesaria con un asa de siembra hasta ajustar el inóculo a una turbidez 0.5 de la escala McFarland (1) en suero fisiológico (aproximadamente 108 UFC/ml). Variaciones en el tamaño del inóculo pueden afectar sustancialmente a la CMI obtenida en un estudio de sensibilidad.
- Paso 2: mediante una torunda de algodón estéril se inocula el medio de cultivo específico en toda su superficie de forma homogénea, sin dejar ninguna zona libre. Se consigue deslizando la torunda por el agar tres veces, rotando la placa unos 60° cada vez y finalmente pasándola por la periferia.
- Paso 3: Los discos de antibiótico deben repartirse uniformemente en la placa.
- Paso 4: Incubación del medio inoculado en las condiciones idóneas de crecimiento del microorganismo estudiado.

Una vez en contacto el disco de antibiótico y el agar, la celulosa absorbe agua y el antibiótico contenido difunde radialmente a través del agar a partir del disco, formándose un gradiente continuo de concentración. El microorganismo testado crecerá en el medio que contenga una cantidad de antibiótico que en función de sus características se lo permita, creando áreas de inhibición más o menos extensas Interpretación del antibiograma disco-placa: Está basada en la correlación existente entre el diámetro de los halos de inhibición y la respuesta in vivo. Esta correlación está estudiada para los antibióticos más comunes y los principales agentes bacterianos aislados en la práctica clínica diaria y puede ser consultada en diferentes institutos y sociedades de estandarización nacionales (Mesa Española de Normalización de la Sensibilidad y



Resistencia a los Antibióticos MENSURA, European Commitee on Antimicrobial Susceptibilit y Testing CLSI). Su principal inconveniente es que sólo ofrece resultados cualitativos y categóricos (Sensible, Intermedio y Resistente), lo que puede ser una información limitada en determinadas ocasiones (Garín *et al.*, 2012).

### **2.2.5. Extracto etanólico**

Extracto con olor característico, obtenido a partir de materia prima desecada de origen vegetal, por maceración o percolación en contacto con etanol, seguida de la eliminación de dicho solvente por un procedimiento físico. Estos procesos pueden ser sometidos a determinadas operaciones para eliminar algunos de sus componentes y así mejorar notablemente la calidad del producto deseado. Es una extracción que se realiza a temperatura ambiente. Consiste en remojar el material vegetal, debidamente fragmentado en un solvente (agua o etanol, se prefiere el etanol puesto que a largos tiempos de extracción el agua puede propiciar la fermentación o la formación de mohos) hasta que éste penetre y disuelva las porciones solubles. Se puede utilizar cualquier recipiente con tapa que no sea atacado con el disolvente; en éste se colocan el material vegetal con el disolvente y tapado se deja en reposo por un período de 2 a 14 días con agitación esporádica. Luego se filtra el líquido, se exprime el residuo, se recupera el solvente en un evaporador rotatorio y se obtiene el extracto (Gonzales, 2004).



## CAPITULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. ÁMBITO DE ESTUDIO

El presente trabajo se realizó en la ciudad de Puno, ubicada a 3820 msnm, al sureste del Perú entre los 13° 00' 30" de latitud sur y los 71° 06'57" y 68° 48' 46" de longitud oeste del meridiano de Greenwich en la Meseta del Collao. El territorio puneño comprende parte de dos regiones, el altiplano y la selva que son bastante diferenciadas y con características propias. La región Puno se encuentra en el altiplano entre los 3,812 y 5,500 m s. n. m. y entre la ceja de selva y la selva alta entre los 4,200 y 500 m s. n. m.. el territorio se encuentra en la Meseta del Collao orillas del Lago Titicaca, su clima frío y seco cuyas temperaturas promedio anual de 8.4 grados Celsius y una precipitación pluvial anual de 1200 mm. Topografía semi accidentada con abundancia de pastos naturales y cultivadas para la crianza del ganado vacuno y ovino (SENAMHI, 2020).

El trabajo de análisis del efecto antimicrobiano de la planta, se llevó a cabo en el laboratorio de Farmacología y Terapéutica Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano.



## 3.2. MATERIALES

### 3.2.1. Material biológico

- *Schkuhria pinnata* (Chancalagua), *Calceolaria sparsiflora kuntze* (Ayac Zapatilla).

Para el presente estudio, se utilizaron muestras secas de hojas, flores y tallos de *Schkuhria pinnata* (Chancalagua) y *Calceolaria sparsiflora kuntze* (Ayac Zapatilla), las especies vegetales fueron recolectadas en las cercanías del centro arqueológico Pikillacta, ubicado a 3,350 msnm a 30 km al sureste de la ciudad de Cusco, perteneciente al Distrito de Lucre, Provincia Quispicanchis, Región Cusco.

- Las bacterias identificadas fueron aisladas de muestras de leche provenientes del establo del C.E. Chuquibambilla, establo San Francisco y del establo San Juan colindantes al CECH, la identificación de las bacterias, fueron realizadas en el Laboratorio Veterinario del Sur (LABVETSUR), las cepas microbiológicas en las que se probaron la acción antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico de las dos plantas en estudio fueron:
  - *Staphylococcus aureus*
  - *Bacillus subtilis*
  - *Bacillus sp*
  - *Bacillus lecheiformis*
  - *Staphylococcus epidermidis*

### 3.2.2. Material de laboratorio

- Placas Petri de 25 ml de capacidad y de 90 mm de diámetro



- Vaso de precipitados de 1 O ml 500 ml y 1000 ml
- Embudo de vidrio
- Matraz con perlas de vidrio
- Tubos de ensayo de 1 O mi
- Papel filtro
- Hisopos de algodón estériles
- Discos de 6 mm de diámetro por 1 ,4 mm de espesor
- Pinzas
- Mechero
- Ansa
- Pinza simple
- Frascos de vidrio
- Pizeta
- Micropipeta
- Tips para micropipeta de 201II
- Balanza digital
- Balanza granataria
- Homogenizador
- Cámara de flujo Laminar
- Estufa
- Incubadora
- Regla digital milimetrada de Vernier
- Lámpara
- Agar Mueller-Hinton
- Caldo Mueller-Hinton



- Etanol absoluto

### 3.3. METODOLOGÍA

#### 3.3.1. Diseño de la investigación

El tipo de estudio fue experimental. Se consideró como unidad experimental los discos de papel filtro impregnado con solución del extracto etanólico de las plantas en estudio.

La variable dependiente: el halo de inhibición del crecimiento de las bacterias causantes de la mastitis

La variable independiente: extracto etanólico de *Schkuhria pinnata* (Chanchalagua), *Calceolaria sparsiflora kuntze* (Ayac Zapatilla).

#### 3.3.2. Población

Se procedió a determinar mediante un preparado etanólico de toda la planta (flores, tallos y hojas), la acción antimicrobiana *In vitro* de *Schkuhria pinnata* (Chanchalagua) y *Calceolaria sparsiflora kuntze* (Ayac Zapatilla), frente cepas microbiológicas causantes de la mastitis en bovinos.

##### 3.3.2.1. Recolección, taxonomía de *Schkuhria pinnata* (Chanchalagua) y *Calceolaria sparsiflora kuntze* (Ayac Zapatilla).

- Las plantas en estudio fueron recolectadas en las cercanías del centro arqueológico Pikillacta, ubicado a 3,350 m.s.n.m. perteneciente al distrito de Lucre, provincia Quispicanchis, departamento de Cusco, Perú, en el mes de marzo del año 2021. Se recolectó la planta entera en su estado silvestre (hojas, tallos y



flores) sin raíz. La identificación taxonómica de la planta fue realizada en el Herbario Vargas de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco.

### **3.3.2.2. Preparación del extracto etanólico de *Schkuhria pinnata* (Canchalagua) y *Calceolaria sparsiflora kuntze* (Ayac Zapatilla).**

- La planta entera recolectada fue sometida a secado natural, sin la intervención de la luz solar en un área oscura, ventilada y a temperatura ambiente, colocadas en papel Craf durante un periodo de 10 días.
- La muestra seca fue seleccionada para realizar la molienda en un molino eléctrico hasta obtener una pulverización uniforme de toda la planta, con el fin de que el etanol extraiga con mayor facilidad los componentes de la planta.
- Posterior a la molienda se realizó el pesado en balanza de precisión triple beam oHaus correspondiente de las dos plantas en estudio, utilizándose 250 gr de *Schkuhria pinnata* (Canchalagua) y 250 gr de *Calceolaria sparsiflora kuntze* (Ayac Zapatilla), añadiéndose a cada muestra 1L de etanol absoluto.
- Luego se procedió con la maceración de la planta molida en etanol absoluto por un periodo de 7 días a temperatura ambiente el cual oscila entre 8 y 10 °C, debidamente acondicionado para evitar exponer los preparados a la luz.
- Una vez macerado se realizó el filtrado, utilizando para ello papel filtro de 6 mm, previamente esterilizados, el que nos permitió retener las partes trituradas de la planta y el paso del extracto etanólico macerado.



- Posterior a ello se colocó el extracto etanólico macerado, en una estufa de secado Boekel a 56 °C con el fin de evaporar el etanol, logrando su evaporación en 5 días.
- Una vez evaporado el etanol se obtuvo una pasta resinosa, almacenándose en viales estériles, luego se procedió a pesar 430 mg de *Schkuhria pinnata* (Canchalagua) y 430 mg de *Calceolaria sparsiflora kuntze* (Ayac Zapatilla), diluyéndose en 2 ml de etanol, obteniéndose una solución al 21.5% la cual fue utilizada en el procedimiento de difusión con disco en agar.

### 3.3.3. Método de difusión con disco en agar.

La efectividad antibiótica *In vitro* de *Schkuhria pinnata* (Canchalagua) y *Calceolaria sparsiflora kuntze* (Ayac Zapatilla) se procedió de la siguiente forma:

- Se realizó la técnica disco difusión en agar, para lo cual se utilizó papel filtro de 6 mm de diámetro previamente esterilizados, estos discos, fueron impregnados con una alícuota de 10  $\mu$ L.
- Se pesó 9.8 gr de Agar Difco MUELLER-Hinton en la balanza de precisión “triple Bear oHaus 10 gr” para luego mezclar con 250 ml de agua bidestilada en un frasco Erlenmeyer, seguidamente el caldo preparado se llevó a baño maría para hervir a una temperatura de 48°C – 58°C.
- Luego se procedió a esterilizar las placas Petri y los discos de sensibilidad de papel filtro de 6 mm en autoclave a una temperatura de 121°C por 15 min con una presión de 15 libras aproximadamente.
- En las 10 placas Petri se procedió a plaquear para luego dejar que se estabilicé (enfriar).



- Se preparó cultivos de reciente inoculación, en un medio solido específico para las bacterias a probar, según los estándares dados por el CLSI tenemos como sensible: *B. licheniformes*, *S. epidermidis*; intermedio: *Bacillus subtilis*, *Bacillus sp*; resistente: *staphylococcus aureus* (Garín, 2012).
- Tomándose una cantidad determinada de cepa bacteriana, con un hisopo estéril, el cual permitió la inoculación en 5 ml de agua destilada, el grado de turbidez se ajustó a 0.5 de la escala de Mc Farland (solución de sulfato de bario a una concentración de 0.5, equivalente a  $1.5 \times 10^8$  bacterias o Unidades Formadoras de Colonias). Silva, (2006).
- Luego se procedió a inocular en la superficie seca de la placa del Agar Difco Mueller-Hinton con un hisopo humedecido en la solución de 5 ml. (El hisopo fue rotado varias veces en el interior del tubo que contenía las bacterias, realizando una siembra por estrías en tres direcciones, para asegurar una distribución uniforme del inóculo, antes de colocar los discos se dejaron secar a temperatura ambiente por 5 min.
- En la cámara de flujo laminar, se colocaron 6 discos de sensibilidad de 6 mm de diámetro, el cual estuvo impregnado con 10  $\mu$ L el extracto etanólico de *Schkuhria pinnata* (Canchalagua) y *Calceolaria sparsiflora kuntze* (Ayac Zapatilla), sobre la superficie de la placa inoculada, con la ayuda de una pinza estéril, distribuyéndose uniformemente los 6 discos, en el caso del preparado etanólico se esperó 12 horas mínimamente hasta que se evapore el etanol, se realizaron 5 repeticiones para cada microorganismo y con cada uno de los preparados, después de 10 min. se colocó la placa a la incubadora a 35 °C por el lapso de 24 horas.
- La lectura de los halos formados en las placas se realizó con una regla milimetrada de Vernier digital, colocándose la placa sobre una superficie negra con luz directa



a 45° con el fondo hacia arriba y la tapa hacia abajo, se midió el diámetro de los halos.

- Se consideró como unidad experimental los discos de papel filtro impregnado con solución del extracto etanólico de *Schkuhria pinnata* (Canchalagua) y *Calceolaria sparsiflora kuntze* (Ayac Zapatilla). La variable dependiente será el halo de inhibición, la eficacia antibacteriana de los extractos etanólicos se analizaron por inhibición del crecimiento bacteriano en milímetros alrededor del disco de papel filtro en el medio de cultivo.

### 3.3.4. Análisis estadístico

La variable a medir fue el tamaño del halo expresado en mm. Para lo cual se empleó un análisis bajo un diseño completamente al azar, bajo un arreglo factorial de 2 X 5 (2 preparados etanólicos y 5 tipos de microorganismos), empleándose también medidas de tendencia central (promedio) y dispersión (desviación estándar y coeficiente de variabilidad). Siendo el modelo aditivo lineal el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha_i \beta_j) + \epsilon_{ij}$$

Donde:

$Y_{ijk}$  = Variable respuesta (tamaño de halo en mm).

$\mu$  = Media poblacional.

$\alpha_i$  = Efecto del *i*-ésimo factor (efecto del extracto etanólico).

$\beta_j$  = Efecto del *j*-ésimo factor (efecto sobre los microorganismos).

$\epsilon_{ij}$  = Error experimental.



Ante la presencia de diferencia estadística entre medias ( $p < 0.05$ ) se realizó una prueba múltiple de significancia de Tukey.

## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos, podemos indicar que el extracto etanólico de la *Schkuhria pinnata* (Canchalagua) y *Calceolaria sparsiflora kuntze* (Ayac Zapatilla). Tiene efecto antibacteriano frente a los gérmenes aislados de muestras de leche extraídas a vacas con mastitis clínica, puesto que se formaron halos de inhibición bacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sp*, *Bacillus lecheiformis*, *Staphylococcus epidermidis*.

#### 4.1. EFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA *in vitro* AYAC ZAPATILLA (*calceolaria sparsiflora kuntze*) FRENTE A MICROORGANISMOS CAUSANTES DE LA MASTITIS BOVINA

**Tabla 2.** Acción antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico de *Calceolaria sparsiflora kuntze* (Ayac Zapatilla), frente a bacterias causantes de mastitis bovina.

Planta	Tamaño de halo
<i>Staphylococcus aureus</i>	10,49 <sup>a</sup>
<i>Bacillus subtilis</i>	11,48 <sup>ab</sup>
<i>Bacillus sp</i>	12,24 <sup>b</sup>
<i>Bacillus licheniformes</i>	14,97 <sup>c</sup>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	16,32 <sup>c</sup>
Error estándar (n=5)	0,39
Probabilidad	0,001

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

En la tabla 3 se observa que el extracto etanólico de *Calceolaria sparsiflora kuntze* (Ayac Zapatilla), tuvo un efecto sobre las bacterias causantes de mastitis bovina, encontrándose diferencia estadística ( $p < 0,05$ ) teniendo así un mayor tamaño de halo sobre las bacterias *Bacillus lecheiformis* y *Staphylococcus epidermidis* (14,97 mm y 16,32 mm,



respectivamente) y un tamaño de halo menor sobre *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* (10,49 mm y 11,48 mm respectivamente).

Mostajo *et al.*, (2018), reporta en su trabajo de investigación sobre el efecto bactericida de la *calceolaria sparsiflora* (ayac zapatilla), planta que fue recolectada en la comunidad de huaccoto - San Gerónimo - Cusco, para ver el efecto antibacteriano, utilizo un extracto acuoso y el método de difusión en agar, frente al *Staphylococcus aureus*, obteniendo un halo de inhibición de 22.8mm. De diámetro, un tamaño de halo mucho mayor al que se halló en este trabajo 10.49mm.

Pérez (2018), reporta actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Juglans regia* (nogal), sobre cepas de *Staphylococcus epidermidis*. Observándose el tamaño de halo a diferentes concentraciones en un 50% (7.40mm); a 75% (10.75mm) y al 100% (15.75mm), en comparación a nuestro trabajo del extracto *calceolaria sparsiflora* encontramos el tamaño de halo superior de (16.32mm) a una concentración de 21.5%, frente a *juglans regia* sobre las cepas *S. epidermidis*. Nos demuestra un prometedor tratamiento para la mastitis bovina.

De la Cruz (2014), realizo un estudio de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Gnaphalium vira vira*, (wira wira), diferenciando flores, hojas, tallo y toda la planta frente a: *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, a través del método de difusión microbiológica en placa, reportando tamaño de halo de 15.6418 y 14.7145 mm de diámetro respectivamente, siendo estos resultados superior a lo encontrado en la presente investigación, logrando un tamaño de halo inhibitorio de 10.49mm en lo que respecta a *Staphylococcus aureus*, esto probablemente se puede atribuir a que la *Gnaphalium vira vira*, (wira wira) presente un mejor mecanismo de inhibición enzimática frente a  $\beta$ -lactamasas, sin embargo un menor diámetro de halo



frente a *Staphylococcus epidermidis*, reportando mejor actividad antimicrobiana *in vitro* de *calceolaria sparsiflora kuntze* (Ayac Zapatilla), estos reportes permiten inducir a investigaciones posteriores, con el afán de establecer nuevas alternativas para sustituir y/o mejorar la eficacia de los fármacos que se usan en la actualidad para el control, prevención y tratamiento de la mastitis bovina.

Condorhuaman *et al.* (2014), En su trabajo de investigación de *Calceolaria myriophylla*, extraída de la comunidad del Q'orao, provincia y región del Cuzco, concluye que el extracto etanólico de la planta presentó efecto sobre los criterios clínicos y bioquímicos del síndrome metabólico en ratas, también realizó un análisis fitoquímico, donde encontró la presencia de abundante cantidad de flavonoides y compuestos fenólicos y regular cantidad de saponinas. Estos resultados concuerdan con lo obtenido por (Lastra y Yañez, 2004), quienes determinaron la presencia de flavonoides, compuestos fenólicos, saponinas y taninos en el extracto seco hidroalcohólico de *Calceolaria myriophylla*.

Por otro lado, reportes científicos han demostrado que la *Morinda citrifolia L* (noni) presenta actividad antimicrobiana frente a un gran número de bacterias y hongos patógenos, como *E. coli*, *S. aureus* y *Candida sp* (Castillo y col., 2014), También los extractos de *C. citratus*, *T. minutus* y *Elionurus sp*. Demostraron efecto contra las bacterias relacionadas con la mastitis. Los resultados mostrados en la presente investigación, refuerzan las bases para realizar investigaciones con nuevos enfoques, con alternativas que permitan la prevención, tratamiento de la mastitis bovina. Así, para el control de la resistencia microbiana, se sugiere su uso como un tratamiento alternativo de enfermedades infecciosas y para reemplazar a los antibióticos convencionales (Lambrecht *et al.*, 2013).

#### 4.2. EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* CANCHALAGUA (*Schkuhria pinnata*), FRENTE A MICROORGANISMOS CAUSANTES DE LA MASTITIS BOVINA

**Tabla 3.** Acción Antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico de *Schkuhria pinnata* (Canchalagua), frente a bacterias causantes de mastitis bovina.

Planta	Tamaño de halo
<i>Bacillus sp</i>	12,74 <sup>a</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	14,81 <sup>b</sup>
<i>Bacillus subtilis</i>	15,14 <sup>b</sup>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	18,85 <sup>c</sup>
<i>Bacillus licheniformes</i>	19,25 <sup>c</sup>
Error estandar (n=5)	0,30
Probabilidad	0,001

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)*

En la tabla anterior podemos observar que el extracto etanólico de *Schkuhria pinnata* (Chanchalagua) y su efecto sobre las bacterias causantes de mastitis bovina mostro diferencia estadística ( $p < 0,05$ ) teniendo así un mayor tamaño de halo sobre las bacterias *Staphylococcus epidermidis* y *Bacillus licheniformes* (18,85 mm y 19,25 mm, respectivamente) y el tamaño de halo menor sobre la *Bacillus sp.* (12,74 mm).

Purizaca y col (2018), reporta halos inhibitorios con valores de 22, 30, 38 y 22 mm y un promedio de 28 mm, del extracto etanólico de *Schkuhria pinnata* (Lanm.), frente a cepas liofilizadas de *Propionibacterium acnés* ATCC 11827, valor que se encuentra dentro del rango permisible para considerarse una inhibición de categoría S (Sensible) según el Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad por el método de disco



difusión del INS y tomando como referencia los patrones estándar del halo de inhibición de la SEIMC. Siendo este resultado superior al obtenido en el presente trabajo, el cual se debe probablemente a la utilización de diferentes familias de microorganismos.

Flores y col (2021), en su trabajo de investigación nos reporta el efecto antibacteriano frente a microorganismos causantes de la mastitis bovina, evidenciando mayor actividad antibacteriano de 20.75mm de diámetro de inhibición para *S. aureus* y 22.50 mm para SCN, para la concentración de 200 mg/ml del extracto de *Eucalypto globulus*, frente a un halo menor de 14.81mm de diámetro encontrado en nuestro estudio del extracto de *Schkuhria pinnata*. Estos datos nos indican que los extractos de las plantas medicinales sirven para controlar el crecimiento bacteriano de la mastitis.

Castro y col (2012), menciona en la revista Folia dermatol, que el halo de inhibición promedio obtenido de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, es de 8,1 mm, frente al extracto etanólico de *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka), especie perteneciente a la familia Asteraceae. Siendo este resultado inferior a lo obtenido en el presente trabajo en el cual reportamos un halo inhibitorio de 14,81 mm siendo estas plantas en estudio de la misma familia y efectos antibacterianos diferentes.

Fernández y col (2021), reportan actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Mentha spicata* L. (Hierba buena) a una concentración de 100%, 75% y 50% sobre *Staphylococcus aureus*. Con tamaños de halos de inhibición de 19,76; 18,35 y 17,55 respectivamente. Observándose un mayor efecto antibacteriano en el extracto etanólico al 100%, disminuyendo el efecto conforme disminuye su concentración. La reactivación de la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 se realizó según la información técnica del catálogo de la empresa comercializadora de la cepa, manteniéndose el inóculo en agar TSA. Los resultados del tamaño del halo de inhibición son mejor, se debe a que las cepas empleadas ATCC de *Staphylococcus aureus* son cepas no contaminadas ni resistentes y



para efectos de un estudio resultan las más adecuadas ya que las cepas de campo pueden ser resistentes o sufrir alguna alteración que ponen en riesgo los resultados del estudio.

Reyna, (2020), nos reporta la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Verbena officinalis* (verbena) a una concentración de 50% y 75% donde demuestra los promedios de halos de inhibición son de 13.3 mm y 25.0 mm, respectivamente. Estos valores indican que existe actividad antibacteriana a las cepas *Staphylococcus aureus*. Casi similar a nuestros resultados, pero sin superar significativamente, a una concentración de 21.5% el diámetro de inhibición fue 14.81mm. el extracto de la planta en estudio estaría presentando los mejores efectos antibacterianos frente a *S. aureus* y otros.

Es importante mencionar que los microorganismos causantes de la mastitis bovina se dividen en tres grupos principales: contagiosas, oportunistas y ambientales, dentro de las bacterias contagiosas tenemos a *S. aureus*, dentro de las bacterias oportunistas esta *S. epidermidis*, dentro de los patógenos ambientales esta *Bacillus sp.* (Nonnemann et al., 2019).

#### 4.3. INTERACCIÓN PLANTA – MICROORGANISMO, *in vitro* DE AYAC ZAPATILLA (*calceolaria sparsiflora kuntze*) Y CANCHALAGUA (*schkuhria pinnata*), FRENTE A MICROORGANISMOS CAUSANTES DE LA MASTITIS BOVINA

**Tabla 4.** Acción antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico de *Calceolaria sparsiflora kuntze* (Ayac Zapatilla) y *Schkuhria pinnata* (Canchalagua), frente a bacterias específicas causantes de mastitis bovina.

Planta	Agente	Tamaño de halo
Ayazapatilla	<i>Bacillus licheniformes</i>	14,97 <sup>c</sup>
	<i>Bacillus sp</i>	12,24 <sup>b</sup>
	<i>Bacillus subtilis</i>	11,48 <sup>ab</sup>
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	16,32 <sup>c</sup>
	<i>Staphylococcus aureus</i>	10,49 <sup>a</sup>
Canchalagua	<i>Bacillus licheniformes</i>	19,25 <sup>d</sup>
	<i>Bacillus sp</i>	12,74 <sup>b</sup>
	<i>Bacillus subtilis</i>	15,14 <sup>c</sup>
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	18,85 <sup>d</sup>
	<i>Staphylococcus aureus</i>	14,81 <sup>c</sup>
Error estandar (n=5)		0,35
Probabilidad		0,001

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Al observar la tabla 5, correspondiente a la interacción de las plantas versus el agente esta fue estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) y podemos observar en forma general que el extracto etanólico *Schkuhria pinnata* (Canchalagua), tuvo mejor efecto sobre el *Bacillus licheniformes* y *Staphylococcus epidermidis* (19,25 mm y 18,85 mm, respectivamente) y la *Calceolaria sparsiflora kuntze* (Ayac Zapatilla), tuvo el menor efecto sobre *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* (11,48 mm y 10,49 mm, respectivamente).

Según el procedimiento para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión, establecido por el Instituto Nacional de Salud, establece tamaños de halo mínimo para ser considerados como sensible, intermedio y resistente,



para el *Staphylococcus spp*, indica tamaños de halo que van desde los 13 hasta los 29 mm de diámetro como sensible; de 11 a 22mm de diámetro como intermedio, para el caso del *S. epidermidis* frente a la Ayac zapatilla formó un halo de 16.32mm de diámetro, comparando por lo establecido por el INS, se considera como susceptibilidad intermedia, En el caso de *S. aureus* frente a la Ayac zapatilla formó un halo de 10.49 mm de diámetro, que es considerado como resistente. Por otro lado, la Canchalagua frente al *S. epidermidis* y el *S. aureus*, formo un halo de inhibición de 18,85 y 14,81 frente a estas bacterias respectivamente, comparando con lo establecido por el INS podríamos indicar que es sensible.

Siendo el objetivo del presente estudio, evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico de *Schkuhria pinnata* (Canchalagua) y *Calceolaria sparsiflora kuntze* (Ayac Zapatilla), frente a microorganismos causantes de la mastitis bovina y teniendo en consideración las normas técnicas emitidas (Instituto Nacional de Salud, 2002), a través Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad por el método de disco difusión, donde establece el tamaño de halo y los clasifica como: sensible, intermedio y resistente para los diferentes antibióticos que existe en el mercado, y es específica para cada bacteria, considerando a *Staphylococcus aureus* un microorganismo con desarrollo de resistencia frente a ciertos antibióticos como la oxacilina, vancomicina y gentamicina, debiendo de formar un halo de sensibilidad de 13, 15 y 15 mm de diámetro para considerarlos como sensibles, respectivamente, comparando con los resultados obtenidos vemos que el efecto antimicrobiano *in vitro* del extracto etanólico de *Calceolaria sparsiflora kuntze* (Ayac Zapatilla), siendo el diámetro de halo de 10,49 mm, el cual es menor que la oxacilina y aún más menor que la gentamicina y la vancomicina, sin embargo se observa un halo de 14,81 mm frente al extracto etanólico de *Schkuhria*



*pinnata* (Canchalagua), siendo superior a la oxacilina e inferior a gentamicina y vancomicina.

La variación en el tamaño de halo del extracto *calceolaria sparsiflora kuntze* (Ayac Zapatilla) y *Schkuhria pinnata* (canchalagua), frente a *Staphylococcus aureus* podemos atribuir a lo citado por (Davicino *et al.*, 2007), quien manifiesta que las especies vegetales exhiben actividad antimicrobiana por el método y solvente de extracción o dilución, debiéndose de considerar también el género, familia y composición vegetal, respectivamente (Rangel *et al.*, 2001), considerando, que también en la actualidad para el tratamiento de la mastitis en bovinos se hace uso de antimicrobianos cuya cantidad presente va a depender de la dosis y vía de administración, los cuales pueden influir en la inducción de resistencia microbiana (Salas *et al.*, 2013).

Prosiguiendo, el extracto etanólico *Schkuhria pinnata* (canchalagua), muestra mejor efecto antibacteriano *in vitro* sobre las bacterias *Bacillus licheniformes* y *Staphylococcus epidermidis*, con un tamaño de halo de 19,25 mm y 18,85 mm, respectivamente, resultados que podemos atribuir a la composición química de la planta como los dipertenos (flavonoides) que se encuentran en las hojas, tallos y flores, siendo estos componentes responsables de la actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus epidermidis*, tal como cita Mendoza, (2016).

Por otro lado, ya se reportan trabajos de investigación, como lo realizado por (Leal, 2014), quien evaluó extractos fitoterapéuticos, con capacidad antibacteriana contra tres bacterias causantes de mastitis, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*. Los extractos empleados fueron obtenidos de *Thymus vulgaris*, *Caléndula officinalis* y *Salvia officinalis*, reportando hallazgos *in vitro* de efecto bactericida de la *Caléndula officinalis* frente a las bacterias antes mencionadas, a si



también (Lizcano y Vergara, 2008), determinaron el efecto antimicrobiano de extractos etanólicos vegetales y aceite esencial obtenidos a partir de 4 especies vegetales, las cuales fueron *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles ferruginea*, *Myrcianthes rhopaloides* y *Passiflora manicata*, frente a microorganismos patógenos como la *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, causantes de mastitis, obteniendo resultados similares a la presente investigación, con actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico *Schkuhria pinnata* (Chancalagua), y la *Calceolaria sparsiflora kuntze* (Ayac Zapatilla), frente a microorganismos causantes de la mastitis en bovinos.

Así mismo cabe citar, otras investigaciones como la realizada por (Schiavon *et al.*, 2011), quien evaluó la aplicación de antisépticos en la desinfección de pezones post ordeño, comparando un extracto obtenido de la especie *Tagetes minuta*, con un antiséptico comercial en un rebaño, siendo el objetivo prevenir las nuevas infecciones intramamarias, con resultados que muestran que no existió diferencia significativa entre ambos tratamientos, lo que significa que el uso de extractos de plantas medicinales en la desinfección de pezones post ordeño, puede ser útil a los sistemas de producción de leche agroecológica.



## V. CONCLUSIONES

El extracto etanólico de Ayac zapatilla (*Calceolaria sparsiflora kuntze*), demostró actividad antibacteriana *in vitro*, sobre las bacterias causantes de mastitis bovina, observándose así un mayor efecto sobre las bacterias *Bacillus licheniformes* y *Staphylococcus epidermidis* y un menor efecto sobre *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*.

El extracto etanólico de *Schkuhria pinnata* (canchalagua), demostró actividad antimicrobiana *in vitro*, sobre las bacterias causantes de mastitis bovina, demostrando mayor actividad sobre las bacterias *Staphylococcus epidermidis* y *Bacillus lecheiformis* y menor actividad sobre la *Bacillus sp.*



## VI. RECOMENDACIONES

Se sugiere continuar con las investigaciones, como la determinación de componentes químicos de la planta *Calceolaria sparsiflora kuntze* (Ayac zapatilla) y *Schkuhria pinnata* (canchalagua), ya que demostraron actividad antimicrobiana *in vitro* frente a microorganismos causantes de la mastitis en bovinos.

Estudiar la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico de *Calceolaria sparsiflora kuntze* (Ayac zapatilla) y *Schkuhria pinnata* (canchalagua), diferenciando tallo, hojas y flores, mediante el método de difusión microbiológica en placa y determinar la eficacia y/o actividad antimicrobiana *in vitro* de cada una de las partes de la planta.

Se debe realizar estudios que permitan conocer los efectos nocivos de ambas plantas, así establecer contraindicaciones en su uso.



## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andersson S., (2006). On the phylogeny of the genus *Calceolaria* (*Calceolariaceae*) as inferred from ITS and plastid matK sequences. *Taxon* 55: 125-137.
- Ahmad, AR; Ishraq, H; Bhat, SA; Muneeb, UR; Rahil, R; Bilal, S; Manzoor, RM., (2015). Bovine mastitis as an evolving disease and its impact on the dairy industry. *Sci Journal*. 7v.5, p. 48-52.
- Aranguren Parra AJ, López Ortega AA, Mendoza CA, Delgado N. Efecto de la mastitis clínica y subclínica sobre la concentración plasmática de metabolitos, proteínas totales y albúmina en hembras bovinas. *Zootec Trop [Internet]*. 2009;27(1):57-64. Disponible en: [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-72692009000100007](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-72692009000100007).
- Awale, MM; Dudhatra, GB; Avinash, K; Chauhan, BN; Kamani, DR; Modi, CM; Patel, HB; Mody, SK., (2012). *Bovine Mastitis: A Threat to Economy*. Gujarat, India.
- Barbosa, SBP; Monardes, HG; Cue, RI; Ribas, NP; Batista, AMV., (2007). Evaluation of test- day somatic cell of first lactation Holstein Cows. *Rev. Bras. Zoot.* 36v. 1, p. 94-102.
- Belachew T., (2016.) *Bovine Mastitis: Prevalence, Insolation of Bacterial Species Involved and its Antimicrobial Susceptibility Test around Debrezeit, Ethiopia*. *J Vet. Sci Technol.* 7v. 6.
- Brako, L. & J. Zarucchi., (1993). *Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms in Peru*. *Mongr. Missouri Bot. Gard.* 45.:1-1286.
- Bussmann R, Douglas S, Díaz D, Barocio Y., (2013). Peruvian plants canchalagua (*Schkuhria pinnata* (Lanm.) Kuntze), *hercampuri* (*Gentianella alborosea* (Gilg.) 45 Fabris), and corpus way (*Gentianella bicolor* (Wedd.) J. Pringle) prove to be effective in the treatment of acne. *Revista Arnaldoa*. Vol. 20 N°1(149-152).
- Castillo, A., Pascual, Y., Cunhanune, L., Lorente, C., & Cañete, F., (2014). Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de hojas y semillas de *Morinda citrifolia* L. (*noni*) Evaluation of the antimicrobial activity of extracts from leaves. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 19(1), 374–382.



- Castro V, Mendoza Y, Serrano C, Del Carpio C., (2012). Actividad antibacteriana in vitro de los extractos etanólico y clorofórmico de *Flourensia polycephala* Dillon (*phauka*) y elaboración de una forma farmacéutica tópica para su evaluación in vivo en infecciones dérmicas por *Staphylococcus aureus*. Revista Folia dermatol. Vol. N°23(2): 53-59
- Condorhuaman Y., (2012). “Efecto antihipertensivo y tóxico del extracto metanólico de *calceolaria myriophylla kraenz* en ratones hipertensos inducidos por l-name” [Tesis] Perú. Disponible en: <file:///E:/Py%20lenny%202020/ayac%20zapatilla%20federico%20villareal.pdf>
- Condorhuaman Y., (2014). Efecto del extracto etanólico de *calceolaria myriophylla* “zapatilla” sobre el modelo del síndrome metabólico inducido por fructosa en ratas. Ciencia e Investigación 2014; 17(2): 98-101 facultad de farmacia y bioquímica UNMSM.
- Condori, AA., (2017). Prevalencia y Factores de Riesgo de Mastitis Sub Clinica en Vacunos Brown Swiss del Distrito de Umachiri – Melgar. Tesis de grado – UNA – PUNO. Pg. 19.
- Cueva, A., (2003). Plantas medicinales: Propiedades y usos. 1 edición, Editorial A.F.A., Lima Perú.
- Cunningham, JG., (2009). Fisiología Veterinaria. La glándula mamaria. 4 ed. Barcelona, España. Elsevier. p.514.
- Davicino, R.; Mattar, M.; Casali, y.; Correa, S.; Pettenati, E. y Micalizzi, B., (2007). Actividad Antifúngica de extractos de plantas usadas en Medicina Popular en Argentina. Revista Peruana de Biología 14 (2). UNMSM. Lima Perú.
- De la Cruz A., (2014). Acción antimicrobiana del extracto etanólico del *Gnaphalium vira vira* (*Wira Wira*) [Tesis para optar el grado académico de magíster scientiae en salud pública]. Puno. Escuela de Postgrado Maestría en Salud Pública Universidad Nacional del Altiplano.
- Del Castillo, A., Molinares, P., Campo, M., & Martínez, A. B., (2017). Actividad antibacteriana del extracto total de hojas de *Cucurbita moschata* Duchesne (*Ahuyama*) Antibacterial activity of total extract from leaves of Cucurbita. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 22(1), 1–13.



- Fao, (2018). Situación de la cadena láctea en América latina en el año 2018, federación panamericana de lechería (FEPALE). Informe presentado en septiembre del 2019.
- Fernanda Voigt Mota, Dr. Luiz Filipe Damé Schuch, MSc. Carolina Lambrecht Gonçalves, MSc. Ângela Faccin, Dra. Diane Bender Almeida Schiavon, Ac. Bianca Conrad Bohm, Ac. Lisiane Ferreira Lessa, (2013). Actividad antibacteriana de los extractos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels (jambolán) frente a los microorganismos asociados a la mastitis bovina. Art. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2013;18(3):495-501.
- Fernández G., Perales K., (2021). Efecto antibacteriano de los extractos etanólico y acuoso de *mentha spicata* l. “hierba buena” sobre *Staphylococcus aureus*. Lima, Perú (tesis para optar el título profesional de químico farmacéutico), UMA. Pag. 11
- Flores Somarriba B., Mejía Solorzano J. L., Morales M., Mora Sánchez B., Torres D., Sheleby Elías J., (2021). Efecto inhibitorio del extracto hidroalcohólico de “Eucalipto” *Eucalyptus globulus* en bacterias aisladas de vacas con mastitis. UNAN-L. Escuela de Ciencias Agrarias y Veterinarias. Departamento de Veterinaria y Zootecnia. Centro Veterinario de Diagnóstico e Investigación. León-León. Nicaragua. Kasmera 49(2).
- Gasque R., (2008). Mastitis bovina. *Enciclopedia bovina*. Editorial de la FMVZ de México. Pág. 176 Disponible en: <https://issuu.com> [accesado el 04 de febrero 2018].
- Hoyos Miranda, AA., (2014). Prevalencia de mastitis subclínica en vacunos lecheros del distrito de Chiquián. Trabajo monográfico Ing. Lima, Perú. UNALM. 28p.
- INS, (2012). Informe de la resistencia antimicrobiana de bacterias de origen hospitalario-2012. Lima. Retrieved from [https://antimicrobianos.ins.gob.pe/images/contenido/informacion/INFORME\\_RESISTENCIA\\_ANTIMICROBIANA\\_2012.pdf](https://antimicrobianos.ins.gob.pe/images/contenido/informacion/INFORME_RESISTENCIA_ANTIMICROBIANA_2012.pdf)
- Instituto Nacional de Salud, & Zurita, S. (2013). Procedimiento de laboratorio (2da edición).
- Lambrecht, C., Almeida, D., Voigt, F., Faccin, A., Noremborg, R., Schiedeck, G., & Damé, F., (2013). Actividad antibacteriana de los extractos de *Cymbopogon citratus*, *Elionurus* sp. y *Tagetes minuta* contra bacterias que causan mastitis.



- Antibacterial activity of essential oils of *Cymbopogon citratus*., Revista Cubana de Plantas Medicinales, 18(3), 487–494.
- Lastra Y, Yáñez B., (2004). *Efecto gastroprotector de Gamochaeta americana (Mill) Wedell (K'eto K'eto) y Calceolaria myriophylla Kraenz (Ayaq Zapatilla) sobre lesiones gástricas inducidas por indometacina en ratas*. [Tesis para Optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico]. Facultad de Ciencias Químicas, Físicas, Matemáticas, Farmacia e Informática. Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco. Cusco.
- Leal, M. (2014). Eficacia antibacteriana de extractos de plantas: Aplicación clínica en mastitis bovina. Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica, 17(1), 179–187.
- Lizcano, A., & Vergara, J. (2008). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales.
- Macedo, M; Vola, M., (2006). Temas de Bacteriología y Virología Médica. 2 ed. Facultad de Medicina. Departamento de Bacteriología y Virología Instituto de Higiene, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.
- Malaga J., Condemayta Z., (2010). Prevalencia e incidencia de la mastitis sub clínica en vacas al ordeño mecánico del CIP Chuquibambilla 2007. Revista de investigación de bovinos y ovinos IIBO – FMVZ-UNA-PUNO. Volumen 8, Numero 1 – 2010, pág. 31-36.
- Mendoza Leonora., (2006). Química y Actividad Biológica del Vira Vira. Resúmenes del 1 Simposio Plantas Medicinales y Aromáticas. Los Ángeles Chile.
- MINAGRI (Ministerio de Agricultura y Riego, Perú), (2017). Dirección General de Políticas Agrarias. Dirección de Estudios Económicos e Información Agraria. Plan Ganadero 2017-2021. Bovinos. 1 ed. Lima, Perú. P. 49.
- Mora L., (2013). Formulación de un gel cosmético antiacné a base de extracto de flores de caléndula (*Caléndula officinalis*) y propóleo. [Tesis de grado previa para la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico Escuela Superior Politécnica de Chimborazo Facultad de Ciencias Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba Ecuador.
- Mostajo Zavaleta, M. N., de la Torre Mayorga, F., Tito, R. (2018). Metabolitos secundarios y actividad bactericida de *calceolaria sparsiflora (calceolariaceae)* y semillas de perseá americana (*lauraceae*). Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco.



- Garín N., Delmiro A., García J., Jaqueti J., (2012), Actualizaciones en el Laboratorio Clínico. Editor: Asociación Española de Biopatología Médica Maquetación: AEEM.
- Nonnemann, B., Lyhs, U., Svennesen, L., Kristensen, K. A., Klaas, I. C., Pedersen, K. (2019). Bovine mastitis bacteria resolved by MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Dairy Science*, 102(3), 2515-2524. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15424>
- Olazábal C, Mantillas J., (2001). Las Plantas Medicinales de Nuestra Tierra. Primera Edición. Cusco – Perú. Instituto de Ecología y Plantas Medicinales – IEPLAM.
- Oviedo-Boyso, J; Valdez-Alarcón, JJ; Cajero- Juárez, M; Ochoa-Zarzosa, A; LópezMeza, JE; Bravo-Patiño, A; Baízabal-Aguirre, VM., (2007). Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *Journal of Infection*. 54v. 4, p. 399-409.
- Pérez J., (2018). efecto antimicrobiano del extracto etanólico de *Juglans regia* (nogal), comparado con vancomicina sobre cepas de *Staphylococcus epidermidis*, estudio in vitro. Piura, Perú. Universidad Cesar Vallejo (Tesis para Obtener el Título Profesional de Médico Cirujano) pág. 31
- Purizaca K., Condori L., (2018) Actividad antibacteriana de los extractos hidroalcohólicos de las hojas, flores, tallo y raíz de *Schkuhria pinnata* (Lam.) Kuntze ex Thell “canchalagua” frente a *Propionibacterium acnés*. [Tesis] Perú.
- Ramírez F., (2010). Efecto gastroprotector, diurético y sobre la motilidad intestinal del extracto etanólico de *Schkuhria pinnata* (Lamarck) Kuntze "Canchalagua" en ratas albinas [Tesis Magister] Perú. Disponible en: [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/240/Ramirez\\_cf.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/240/Ramirez_cf.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Rangel, D.; García, I.; Velazco, J.; Buitrago, D. y Velazco, E., (2001). Actividad Antimicrobiana de los Extractos etanólico, acetónico y acuoso de *Bacharis nítida* (Ruiz et Pavon). *Revista de la facultad de Farmacia* vol. 42. Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.
- Reyna, (2020). Efecto Antibacteriano in vitro del Extracto Etanólico de Hojas de *Verbena Officinalis* (VERBENA) SOBRE *Staphylococcus aureus*. Proyecto de tesis de la facultad de Ciencias de la Salud Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica en la Universidad Católica de los Ángeles de Chimbote.



- Rodas C., (2012). Ficha informativa de producto “Canchalagua” *Schkuhria pinnata* Catalogo de Materia Prima Inkaplus. [Citado el 05 de julio de 2017] [revista en internet]. 2012. Disponible en <http://www.inkaplus.com/media/web/pdf/Canchalagua.pdf>
- Roskov Y., Kunze T., Orell T., Abucay L., Paglinawan L., Culham A., Bailly N. Kirk P., Bourgoin T., Baillargeon G., Decock W., De Wever A., Didziulis V., (2014). Species 2000 & IT IS Catalog of Life: Lista de verificación annual de 2014. Species 2000.
- Salas, P., Calle, S., Falcón, N., Pinto, C., & Espinoza, J., (2013). Determinación de residuos de antibióticos betalactámicos mediante un ensayo inmunoenzimático en leche de vacas tratadas contra mastitis. Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú, 24(2), 252–255. <https://doi.org/42132>
- Salinas I. y León, (2006). *Calceolariaceae endémicas del Perú*. In: El libro rojo de las plantas endémicas del Perú. Ed.: Blanca león et al. *Rev. Perú. Biol.* Número especial 13(2): 220 – 236
- Santa Cruz López C., Ayasta Senmache JG, Castro Hernández CY, Carrasco FA, Moreno M., (2021). Efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Annona muricata* sobre microorganismos de importancia clínica: Efecto de *Annona muricata* frente a bacterias patógenas. Gac Med Bol [Internet]. 7 de julio de [citado 21 de enero de 2022];44(1):29-33. Disponible en: <https://www.gacetamedicaboliviana.com/index.php/gmb/article/view/219>
- Schiavon, D. B. A., Schuch, L. F. D., Oyarzabal, M. E. B., Prestes, L. de S., Zani, J. L., & Hartwig, C. de A., (2011). Aplicación de plantas medicinales para la antisepsia de pezones de vacas posordeño. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 16(3), 253–259.
- Sharma C, Rokana N, Chandra M, Singh BP, Gulhane RD, Gill JPS, et al. Antimicrobial Resistance: Its Surveillance, Impact, and Alternative Management Strategies in Dairy Animals. Front Vet Sci [Internet]. 2018; 4:237. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fvets.2017.00237> DOI: 10.3389/fvets.2017.00237 PMID 29359135 PMCID PMC5766636



- [SENASA] Servicio Nacional de Sanidad Agraria, (2015). *Atributos del sistema de vigilancia*. Mayor coordinación. Lima: SENASA. [Internet]. Disponible en: <https://www.senasa.gob.pe/senasa/atributos/>
- Sharma R., (2014). Antibacterial, antioxidant activities and cytotoxicity of plants against *Propionibacterium acnes*. *South African Journal of Science*. Vol 110, Núm. (11/12).
- Sisson, S; Grossman, JD., (1982). Anatomía de los animales domésticos. Órganos genitales femeninos. Bovinos. Glándulas mamarias. 5 ed. Barcelona, España. Salvat. 1v. p. 1053-1056.
- Soto Y., (2019). “Efecto antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico de *schkuhria pinnata* “Canchalagua” en *rattus rattus* var. *albinus*. [Tesis] Perú. Disponible en: <file:///E:/Py%20lenny%202020/composicion%20quimica%20de%20canchalagua.pdf>
- Vallejos CI, Guerra M, López M, Valdéz J, Ramírez B, Ortiz R., (2012). Acné moderado. Utilidad del tratamiento combinado con antibióticos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. Vol. 32, Núm. (2): 55-60.
- Velázquez C, Vega J. 2012. Calidad de la leche y mastitis subclínica en establos de la provincia de Huaura, Lima. *Rev. Inv. Vet Perú* 23:67-71. Doi: 10.15381/rivep.v23i1.883



## ANEXOS

A.- Certificado botánico Schkuhria pinnata (Lam.) Kuntze ex Thell y calceolaria sparsiflora kuntze. Herbario Vargas cuz de la Universidad nacional de san Antonio abad del cusco.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

HERBARIO VARGAS CUZ

### CERTIFICADO DE DETERMINACIÓN TAXONÓMICA N° 10-2021-HVC-FC-UNSAAC

La directora del Herbario Vargas (CUZ) de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC), deja constancia que: la señorita **Gleny Marón Marón**, bachiller de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano Puno, con Proyecto de Investigación de Tesis titulado: "ACCION ANTIBACTERIANA DE LA AYAZAPATILLA (AYAC ZAPATILLA), CANCHALAGUA (SCHKUHRIA PINNATA) FRENTE A MICROORGANISMOS CAUSANTES DE MASTITIS BOVINA", ha presentado a la Dirección del Herbario Vargas (CUZ) dos muestras botánicas para su determinación taxonómica (expediente N° 350418). Las que al ser diagnosticadas por el Mgt. Abel Monteagudo Mendoza, utilizando claves dicotómicas, consulta con bibliografía especializada, y comparación con muestras del herbario, concuerdan con las siguientes especies; de acuerdo a la clasificación del Grupo Filogenético de las Angiospermas (Angiosperm Phylogeny Group-APG IV, 2016).

N°	FAMILIA	ESPECIE	NOMBRE LOCAL
1	CALCEOLARIACEAE	<i>Calceolaria sparsiflora</i> Kuntze	"ayac zapatilla"
2	ASTERACEAE	<i>Schkuhria pinnata</i> (Lam.) Kuntze ex Thell.	"canchalagua"

Se le expide la presente certificación a petición formal de las interesadas para los fines que vieran por conveniente.

Cusco, 13 de agosto del 2021

  
 Biga. María Luisa Ochoa Cámara  
 Directora del Herbario Vargas CUZ



## B.- Análisis Estadístico

### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
halo	25	0,89	0,86	6,73

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	Gl	CM	F	p-valor
Modelo	120,48	4	30,12	38,8	<0,0001
Agente	120,48	4	30,12	38,8	<0,0001
Error	15,53	20	0,78		
Total	136,01	24			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,66753

Error: 0,7763 gl: 20

Agente	Medias	n	E.E.		
<i>Staphylococcus aureus</i>	10,49	5	0,39	A	
<i>Bacillus subtilis</i>	11,48	5	0,39	A	B
<i>Bacillus sp.</i>	12,24	5	0,39		B
<i>Bacillus lecheiformis</i>	14,97	5	0,39		C
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	16,32	5	0,39		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )



### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
halo	25	0,95	0,94	4,13

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	156,83	4	39,21	87,91	<0,0001
Agente	156,83	4	39,21	87,91	<0,0001
Error	8,92	20	0,45		
Total	165,75	24			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,26394

Error: 0,4460 gl: 20

Agente	Medias	n	E.E.	
<i>Bacillus sp.</i>	12,74	5	0,3	A
<i>Staphylococcus aureus</i>	14,81	5	0,3	B
<i>Bacillus subtilis</i>	15,14	5	0,3	B
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	18,85	5	0,3	C
<i>Bacillus lecheiformis</i>	19,25	5	0,3	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Tamaño de halo	50	0,94	0,93	5,34

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	Gl	CM	F	p-valor
Modelo	394,17	9	43,8	71,66	<0,0001
Planta	116,86	1	116,86	191,2	<0,0001
Agente	251,53	4	62,88	102,89	<0,0001
Planta*Agente	25,78	4	6,45	10,55	<0,0001
Error	24,45	40	0,61		
Total	418,62	49			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,65530

Error: 0,6112 gl: 40

Planta	Agente	Medias	n	E.E.	
Ayazapatilla	<i>Staphylococcus aureus</i>	10,49	5	0,35	A
Ayazapatilla	<i>Bacillus subtilis</i>	11,48	5	0,35	A B
Ayazapatilla	<i>Bacillus sp.</i>	12,24	5	0,35	B
Canchalagua	<i>Bacillus sp.</i>	12,74	5	0,35	B
Canchalagua	<i>Staphylococcus aureus</i>	14,81	5	0,35	C
Ayazapatilla	<i>Bacillus lecheiformis</i>	14,97	5	0,35	C
Canchalagua	<i>Bacillus subtilis</i>	15,14	5	0,35	C
	<i>Staphylococcus</i>				
Ayazapatilla	<i>epidermidis</i>	16,32	5	0,35	C
	<i>Staphylococcus</i>				
Canchalagua	<i>epidermidis</i>	18,85	5	0,35	D
Canchalagua	<i>Bacillus lecheiformis</i>	19,25	5	0,35	D

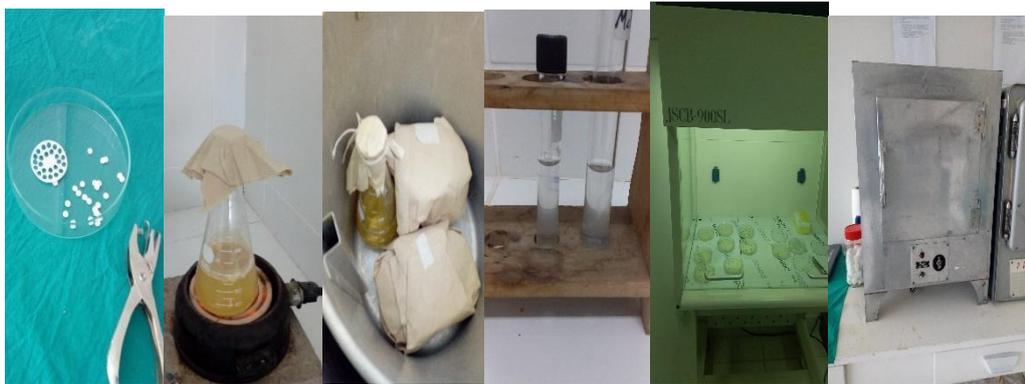
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## C.- Procedimiento

### C.1 Preparación del extracto etanólico de *Schkuhria pinnata* (Canchalagua) y *Calceolaria sparsiflora kuntze* (Ayac Zapatilla).

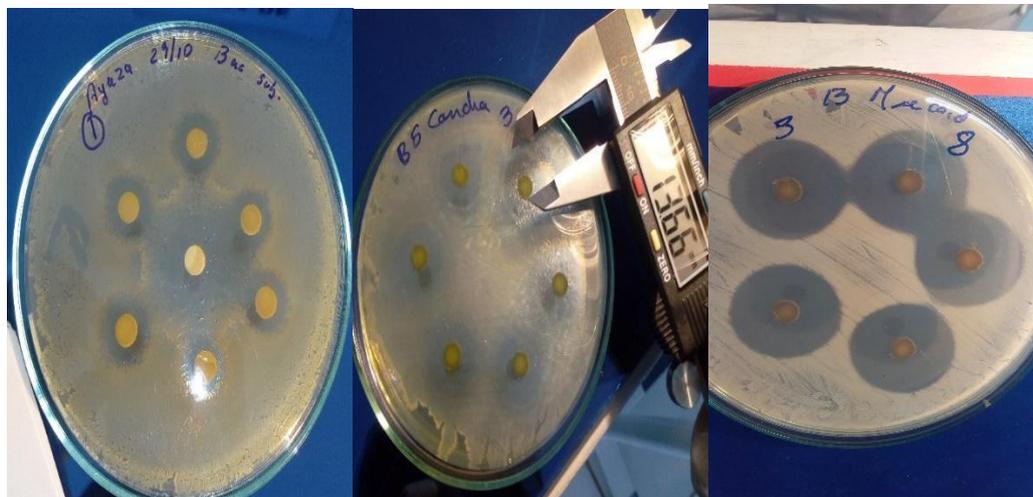


### C.2 Método de difusión con disco en agar.



### C.3 RESULTADOS: Inhibición del crecimiento de las cepas

tamaño de halo de la acción antibacteriana del extracto etanólico de *schkuhria pinnata* (canchalagua) y *calceolaria sparsiflora kuntze* (ayac zapatilla) medida con la regla vernier digital





#### D.- Método de Difusión en Placa

- Para el aislamiento e identificación de las especies bacterianas, se procedió de acuerdo al protocolo establecido en el manual de Procedimientos de laboratorios del INS (Instituto Nacional de Salud, Zurita, 2013). Las muestras de leche, se cultivaron en medios de cultivos primarios; selectivos y diferenciales para cada grupo bacteriano; como agar manitol salado para cocos Gram positivos, McConkey para bacilos Gram negativos, MRS para bacilos ácido lácticos y agar sangre para bacilos Gram positivos. La identificación se realizó por observación macroscópica de las unidades formadoras de colonia, considerando las características culturales y particularidades como: tamaño, forma, color, bordes, superficie y elevación, para luego repicarlas en nuevos medios de cultivo fértiles y obtener cepas puras, así mismo, se realizó la coloración Gram, como parte de la identificación microscópica. También, se utilizó métodos bioquímicos específicos para bacterias gram positivas y gram negativas de acuerdo a protocolos establecidos. Para la identificación de cepas que son dudosas se emplearon los sistemas API.
- Se tomó una cantidad determinada de cepa bacteriana y se inoculó en 5 ml de agua destilada, el grado de turbidez se ajustó a la turbidez del estándar de Mc ( para preparar el estándar correspondiente a la escalas 0.5 en un tubo de ensayo estéril, se mide de cloruro de bario y se añade 99.5 ml de ácido sulfúrico 0.36 N, se tapa el tubo con una tapa rosca y se procede a mezclar cuidadosamente, para verificar la densidad correcta del estándar se usa un espectrofotómetro, cuya absorbancia a 540 nm es 0,08 a 0,10 para el estándar 0,5 de Mc. Farland que equivale a  $1.5 \times 10^8$  bacterias o Unidades Formadoras de Colonias).
- Seguidamente con un hisopo estéril, se impregno en la solución que contiene la cepa bacteriana y se empezó a rotar contra las paredes del tubo para remover el exceso de inóculo.
- Luego se procedió a inocular en la superficie seca del agar con el hisopo humedecido en la solución que contenía las bacterias realizando una siembra por estrías en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo y se deja secar a temperatura ambiente por 5 min.
- En la cámara de flujo laminar, se colocaron los discos de 6 mm de diámetro impregnados de 20  $\mu$ l de preparado, se esperó 12 horas para la evaporación del etanol, luego se colocó sobre las placas que contenían el agar con el inóculo del



microorganismo, luego se colocó la placa a la incubadora a 35 °C por el lapso de 24 horas.

- La lectura se realizó en las placas donde se formaron halos alrededor del disco, se colocó la placa sobre una superficie negra con luz directa a 45° con el fondo hacia arriba y la tapa hacia abajo, se midió el diámetro de los halos con una regla milimetrada de Vernier digital (Zurita, 2013).



**E.- Reporte:** de la veterinaria labvetsur.



**LABVETSUR**  
Laboratorio Veterinario del Sur

<b>ENVIADO POR:</b> Dra. Abigail de la Cruz Pérez	<b>FECHA DE INFORME:</b> 14/09/2019
<b>DIRECCION:</b>	<b>Nro. DE DIAG:</b> 866
	<b>REFERENCIA:</b> C6/9
	<b>FECHA DE ENVIO:</b> 11/09/2019
	<b>FECHA DE RECIBIDO:</b> 11/09/2019

**REPORTE DE EXAMENES**

<b>PROPIETARIO:</b> Dra. Abigail de la Cruz Pérez	<b>ANIMAL N°:</b>
<b>DIRECCION:</b> Puno	<b>ESPECIE/LAB.:</b> Bovino
<b>LOCALIDAD:</b> Puno	<b>RAZA:</b> No indica
<b>PROVINCIA:</b> Puno	<b>SEXO:</b> Hembra
<b>DPTO:</b> Puno	<b>EDAD:</b> Adultas

**HISTORIA**

**PRUEBAS REALIZADAS:**

Laboratorio	Muestras	Total	Prueba
Bacteriología	Leche	20	ABA

MUESTRA	RESULTADOS
	<b> AISLAMIENTO</b>
Amapola PD	<i>Bacillus spp.</i>
Amapola PI	<i>Bacillus spp.</i>
Amapola AD	<i>Bacillus spp.</i>
Amapola AI	<i>Bacillus spp.</i>
Candi AI	<i>Bacillus spp.</i>
Candy AD	<i>Bacillus spp.</i>
Candy PI	<i>Bacillus spp.</i>
Candy PD	<i>Bacillus spp.</i>
Rosa AI	<i>Bacillus spp.</i>
Rosa AD	<i>Bacillus spp.</i>
Rosa PI	<i>Bacillus spp.</i>
Rosa PD	<i>Bacillus spp.</i>
Nilda PI	<i>Bacillus spp.</i>
Nilda PD	<i>Bacillus spp.</i>
Nilda AI	<i>Bacillus spp.</i>
Nilda AD	<i>Bacillus spp.</i>
Paola AI	<i>Bacillus spp.</i>
Paola AD	<i>Bacillus spp.</i>
Paola PI	<i>Bacillus spp.</i>
Paola PD	<i>Bacillus spp.</i>

**MÉTODO EMPLEADO:**  
Aislamiento de bacterias: cultivos en agar. Identificación: pruebas bioquímicas.



**LABVETSUR**

Mg. MVZ. JORGE MANRIQUE MEZA  
C.M.V.P. - 803  
GERENTE

Av. Alfonso Ugarte N° 500-A  
Teléfono: 054-213677  
Cel. Gerencia: 978404610  
Cel. Sub Gerencia: 978404667  
e-mail: labvetsur@hotmail.com  
e-mail: labvetsur.acreditación@gmail.com  
Arequipa - Perú