




Actividad antimicrobiana de plantas nativas de Sonora, México, contra bacterias patógenas aisladas de leche de vacas diagnosticadas con mastitis



Jesús Sosa-Castañeda ^a

Carmen Guadalupe Manzanarez-Quin ^b

Ramón Dolores Valdez-Domínguez ^a

Cristina Ibarra-Zazueta ^a

Reyna Fabiola Osuna-Chávez ^a

Edgar Omar Rueda-Puente ^a

Carlos Gabriel Hernández-Moreno ^a

Alejandro Santos-Espinosa ^c

Alejandro Epigmenio-Chávez ^c

Claudia Vanessa García-Baldenegro ^c

Tania Elisa González-Soto ^c

Ana Dolores Armenta-Calderón ^c

Priscilia Yazmín Heredia Castro ^{c*}

^a Universidad de Sonora. Departamento de Agricultura y Ganadería. Carretera 100 a Bahía Kino km 21, 83000. Sonora, México.

^b Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. Tecnología de Alimentos de Origen Animal. Sonora, México.

^c Universidad Estatal de Sonora. Unidad Hermosillo. Ingeniería en Horticultura. Sonora, México.

* Autor de correspondencia: priscilia.heredia@ues.mx

Resumen:

La mastitis bovina es una enfermedad causada por bacterias patógenas que infectan la glándula mamaria del ganado lechero, lo cual genera pérdidas económicas importantes, además, debido al uso excesivo de antibióticos para tratar esta enfermedad, los microorganismos han creado resistencia a estos fármacos, por ello, se buscan nuevas alternativas para este fin. El objetivo fue evaluar el efecto antimicrobiano de extractos de plantas nativas de Sonora contra bacterias patógenas aisladas de vacas diagnosticadas con mastitis. Se obtuvieron 17 extractos etanólicos de plantas nativas de Sonora, y se evaluó su actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar contra siete patógenos aislados de leche de vacas con mastitis utilizando una concentración de 50 mg/ml de cada extracto. El contenido de fenoles y flavonoides totales se determinó mediante espectrofotometría. Los resultados mostraron que los extractos de *Ibervillea sonorae* (wereke, tubérculo), *Populus alba* (álamo, hojas), *Ambrosia ambrosioides* (chicura, tallos), *Krameria sonorae* (cosahui, raíces) y *Prosopis velutina* (mezquite, hojas) fueron eficaces para eliminar a *S. aureus*, *Streptococcus* spp., *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Shigella* spp. y *Citrobacter* spp. ($P < 0.05$). Además, los extractos con alto contenido de fenoles y flavonoides totales (wereke, álamo, chicura, cosahui y mezquite) mostraron una correlación inversa con respecto al pH ($r = -0.94$, $r = -0.92$, respectivamente) ($P < 0.05$) y presentaron mayor actividad antimicrobiana contra los patógenos probados. Por lo anterior, los extractos de las plantas de Sonora podrían representar una alternativa para el control de patógenos Gram (+) y Gram (-) que infectan la glándula mamaria del ganado lechero.

Palabras clave: Mastitis, Patógenos, Antimicrobiano, Extractos de plantas, Alternativa natural, Fenoles, Flavonoides.

Recibido: 11/07/2021

Aceptado: 20/10/2021

Introducción

La mastitis es la principal enfermedad infecciosa que se presenta en el ganado bovino productor de leche. El origen de esta enfermedad es multifactorial y puede depender del manejo, sistema de producción y condiciones del medio ambiente en las cuales se encuentre el ganado, y se presenta como respuesta ante la infección de una gran biodiversidad de

microorganismos, tales como, micoplasmas, levaduras, hongos, virus y bacterias⁽¹⁾, y suele manifestarse como una inflamación en la glándula mamaria, que dependiendo de la severidad de la infección puede generar fibrosis, edema mamario, atrofia del tejido mamario, abscesos o gangrena; además, puede alterar las propiedades físicas y químicas de la leche incrementando el número de células somáticas y la carga microbiana en la leche, lo cual puede disminuir el pH de la leche y alterar el sabor y el olor. Así mismo, la leche de vacas con mastitis presenta menor cantidad de lactosa, grasa y caseínas lo cual disminuye sus propiedades tecnológicas para la industria de los alimentos^(2,3).

En algunas ocasiones la mastitis puede ser detectada de manera clínica, es decir, cuando se observa físicamente la presencia de pus o de sangre en la glándula mamaria y la leche; mientras que, en otras ocasiones, la mastitis se presenta de manera subclínica y suele ser más difícil de detectar, ya que la inflamación en la ubre no es visible y la leche muestra una apariencia física normal^(4,5). Algunas de las bacterias patógenas responsables de esta enfermedad son *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis* y *Mycoplasma bovis*, las cuales pueden ocasionar daños importantes en la glándula mamaria, tales como, lesiones, y en casos más severos pueden llegar a generar necrosis en el tejido. Generalmente, la infección con estas bacterias ocurre al momento del ordeño^(3,6), aunque en otras ocasiones también puede ocurrir la infección por contacto con otras bacterias presentes en el medio ambiente, tales como, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, entre otras⁽⁵⁾. Aunque estas bacterias son consideradas como patógenas, por lo general suelen ser menos agresivas al momento del contagio, además, la leche con la presencia de estos microorganismos no puede ser comercializada^(5,6). En la actualidad, la mastitis sigue siendo uno de los mayores retos en los establos lecheros, ya que se estima que representa el 70 % de los gastos de los ganaderos lecheros, lo que genera pérdidas económicas anuales de aproximadamente \$35 mil millones de dólares en todo el mundo y \$2 mil millones de dólares en los Estados Unidos^(7,8,9). En México se estiman pérdidas de \$2 millones y medio de pesos, lo cual representa entre el 20 y 30 % de la mastitis clínica, por lo que las pérdidas aún podrían ser mayores debido al otro 70-80 % de los animales que presentan mastitis subclínica⁽¹⁰⁾.

En Sonora, los estudios de la mastitis bovina son muy escasos, sin embargo, en un establo lechero de Santa Ana, Sonora se encontró la presencia de mastitis subclínica en 18.3 % de los animales, mientras que, la incidencia de la mastitis clínica fue de 5.35 %, donde el costo promedio mensual de cada animal con mastitis fue de \$185.40 y el costo total fue de \$30,966.34, correspondiendo \$12,470.75 (40.3 %) a mastitis subclínica y \$18,459.59 (59.7 %) a mastitis clínica⁽¹¹⁾. Hoy en día, la mastitis es considerada como la enfermedad más costosa dentro de los establos lecheros debido a la disminución en la producción de leche, deshecho de leche contaminada, reemplazo de animales y uso de medicamentos⁽¹⁰⁾. En este contexto, el uso excesivo de terapias con antibióticos para prevenir o tratar esta enfermedad ha generado que algunos microorganismos se adapten y adquieran resistencia a estos

fármacos, por ejemplo, *S. aureus* ha presentado 59.5 % y 49.6 % de resistencia a la penicilina y ampicilina, respectivamente; mientras que, algunas cepas de *Streptococcus spp.* han reportado 40 %, 80 % y 73 % de resistencia contra, eritromicina, oxitetraciclina y penicilina, respectivamente; además, algunas cepas de *E. coli* han presentado 88.24 % de resistencia contra eritromicina, oxitetraciclina, penicilina y estreptomina y 70.59 % de resistencia contra la gentamicina, por ello, uno de los grandes retos del Sector de la Salud es disminuir el uso de antibióticos en los animales y humanos⁽¹²⁻¹⁵⁾. En este contexto, la utilización de compuestos químicos naturales derivados de plantas para tratar enfermedades en el humano y animales ha ido en aumento en las últimas décadas^(16,17). En México, se estima que existen alrededor de 26,000 especies de plantas, de las cuales, se utilizan alrededor de 4,000 especies para tratar enfermedades de manera tradicional^(18,19). Aunque se ha reportado que algunas plantas nativas del noroeste de Pakistán han sido efectivas para eliminar bacterias asociadas a la mastitis bovina⁽⁹⁾, no ha sido reportado el uso de plantas de Sonora, México, para este fin. Sin embargo, se ha evidenciado su potencial antimicrobiano contra las bacterias de colección *Helicobacter pylori* ATCC 43504, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Escherichia coli* ATCC 35219 y 25922, *Shigella flexneri* ATCC 12022 y *Salmonella typhimorium* ATCC 14028^(19,20,21). Tomando en cuenta que Sonora posee una gran biodiversidad de plantas nativas, de las cuales, alrededor de 400 son utilizadas por los grupos étnicos locales para tratar enfermedades⁽²⁰⁾, y que además algunas de estas plantas han mostrado potencial antimicrobiano, resulta interesante evaluar el efecto antimicrobiano de extractos de plantas nativas de Sonora contra bacterias patógenas aisladas de vacas diagnosticadas con mastitis.

Material y métodos

Preparación de los extractos etanólicos

Los extractos fueron obtenidos de 17 plantas nativas del estado de Sonora, México (Cuadro 1), las cuales fueron cosechadas en el Jardín Botánico del Departamento de Agricultura y Ganadería (DAG) de la Universidad de Sonora (UNISON) e identificadas en el Herbario del DAG. Cada planta fue deshidratada a 34 °C en una estufa de aire caliente (Thelco, Precision Science, modelo 28, USA) y después fueron pulverizadas en un molino (Pulvex Mini 100, Mx) hasta obtener un tamaño de partícula de 100 micras. Posteriormente, se colocaron 100 g de materia seca y se añadieron 100 ml de etanol al 99 % de pureza (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) en un frasco de vidrio herméticamente sellado, los cuales fueron almacenados por 5 días en la oscuridad a 25 °C⁽²²⁾. Los extractos fueron filtrados con papel filtro Whatman No. 41 y el material vegetal fue deshidratado nuevamente. La diferencia de peso del material vegetal antes y después de su almacenamiento fue considerado como la cantidad de compuestos químicos solubles extraídos de las plantas⁽²³⁾. Después, los extractos etanólicos fueron concentrados en un evaporador rotativo (Yamato RE300) a 40 °C y ajustados a 50

mg/ml con una solución de dimetilsulfóxido al 20 % (DMSO). Finalmente, los extractos fueron almacenados en la oscuridad a 4 °C hasta su utilización.

Cuadro 1: Identificación y partes de las plantas utilizadas en los extractos etanólicos

Clave	Nombre común	Familia	Nombre científico	Parte
E1	Álamo	Salicaceae	<i>Populus alba</i>	Hojas
E2	Batamote	Asteraceae	<i>Baccharis glutinosa</i>	Tallos
E3	Chicura	Asteraceae	<i>Ambrosia ambrosioides</i>	Tallos
E4	Cosahui	Krameriaceae	<i>Krameria sonora</i>	Raíz
E5	Guaje	Fabaceae	<i>Leucaena leucocephala</i>	Hojas
E6	Guamúchil	Fabaceae	<i>Pithecellobium dulce</i>	Corteza
E7	Jojoba	Simmondsiaceae	<i>Simmondsia chinensis</i>	Hojas
E8	Mezquite	Fabaceae	<i>Prosopis velutina</i>	Hojas
E9	Palo verde	Fabaceae	<i>Parkinsonia microphylla</i>	Tallos y hojas
E10	Palo verde azul	Fabaceae	<i>Cercidium floridum</i>	Tallos y hojas
E11	Rama blanca	Asteraceae	<i>Encelia farinosa</i>	Hojas
E12	Sangregado	Euphorbiaceae	<i>Jatropha cardiophylla</i>	Tallos
E13	Tepehuaje	Fabaceae	<i>Lysiloma watsonii</i>	Hojas
E14	Torote	Burseraceae	<i>Bursera microphylla</i>	Hojas
E15	Vinorama	Fabaceae	<i>Acacia constricta</i>	Hojas
E16	Wereke	Cucurbitaceae	<i>Ibervillea sonora</i>	Tubérculo
E17	Zamota	Fabaceae	<i>Coursetia glandulosa</i>	Tallos

Plantas cosechadas en el Jardín Botánico del DAG de la UNISON.

Determinación de fenoles totales

Se utilizó 1 mg de extracto y se mezcló con 0.5 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu. Después, se añadieron 10 ml de agua destilada y 1 ml de Na₂CO₃ saturado y se homogeneizó por 3 min. Finalmente, la mezcla fue aforada a 25 ml con agua destilada y se dejó reposar por 1 h en un lugar libre de luz. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 750 nm en un espectrofotómetro (Spectro Max MD, EU) y el contenido de fenoles totales fue expresado como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto⁽²⁴⁾.

Determinación de flavonoides totales

Se utilizaron 0.25 mg de extracto y se mezclaron con 5 ml de agua destilada. Después, se agregaron 0.3 ml de una solución de NaNO_2 al 5 % y la mezcla se dejó reposar en la oscuridad por 6 min. Posteriormente, se añadieron 0.6 ml de una solución de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ al 10 % y se dejó reposar hasta terminar la reacción. Finalmente, se añadieron 2 ml de NaOH (1 M) y la mezcla fue aforada a 10 ml con agua destilada. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 510 nm en un espectrofotómetro (Spectro Max MD, EU) y el contenido de flavonoides totales fue expresado como miligramos de quercetina por gramo de extracto⁽²⁴⁾.

Lugar del estudio y toma de muestras

Las muestras fueron tomadas en dos establos ubicados en la periferia de la ciudad de Hermosillo, Sonora, México. El Sitio-1 pertenece al ejido La Yesca, ubicado al suroeste de la ciudad a 10 km de distancia, mientras que, el Sitio-2 pertenece al ejido Los Bajotes, ubicado al noroeste de la ciudad a 12 km de distancia. Las vacas se seleccionaron de acuerdo a la técnica de la prueba de California para mastitis⁽²⁵⁾. Las muestras se colectaron durante un año y se tomaron de los 4 cuartos de 15 vacas del Sitio-1 y 15 del Sitio-2. Antes de la colección de las muestras, los pezones se sumergieron en una solución a base de yodo al 1 % por 30 seg, y posteriormente el exceso de yodo fue retirado con una toalla desechable. Después se colectaron 10 ml de leche de cada cuarto en un frasco estéril con tapa rosca y cada pezón fue nuevamente sumergido en la solución desinfectante. Finalmente, las muestras fueron transportadas a 4 °C y procesadas dos horas después de su colección⁽²⁶⁾.

Aislamiento e identificación de bacterias asociadas a la mastitis en la leche

Para el aislamiento e identificación de las bacterias de la leche de las vacas diagnosticadas con mastitis se utilizó la metodología reportada por Rodríguez y Muñoz⁽²⁷⁾. Las muestras se sembraron por estría en agar base Columbia adicionado con 5 % de sangre de carnero (BD Difco, Sparks, MD) y agar MacConkey (BD Difco, Sparks, MD) y se incubaron a 37 °C por 48 h. Después, se realizó una tinción de Gram, la prueba de coagulasa, prueba de oxidasa (reactivo de Kovacs) y prueba de catalasa (H_2O_2 al 3 %) para diferenciar a las colonias aisladas. Las colonias seleccionadas se purificaron tres veces por cultivos subsecuentes en las condiciones establecidas anteriormente. Las bacterias aisladas se identificaron por los kits comerciales API20E, API Staph y API Strep (BioMérieux, Marcy, France), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Las bacterias identificadas se almacenaron a -80 °C en glicerol al 80 % (v/v) hasta su utilización.

Actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos

Las bacterias aisladas de leche de vacas con mastitis fueron propagadas en el medio de cultivo caldo BHI (infusión cerebro-corazón, BD Difco, Sparks, MD). Posteriormente, se prepararon tres placas con agar BHI (infusión cerebro-corazón, BD Difco, Sparks, MD) para cada una de las bacterias patógenas y se colocaron cuatro discos estériles de papel filtro Whatman No. 41 de 6 mm de diámetro en cada placa, donde fueron adicionados 20 μ l de cada extracto etanólico (50 mg/ml). Finalmente, las placas fueron incubadas a 37 °C por 24 h. Los halos mayores a 3 mm fueron considerados como inhibición de acuerdo a los criterios utilizados por Heredia-Castro⁽²⁸⁾.

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar de una vía al 95 % de confianza con tres repeticiones por tratamiento. La prueba de comparación de medias se realizó por Tukey-Kramer a un nivel de significancia del 0.05 %, y el análisis de correlación se realizó con una confiabilidad del 95 %. El software estadístico utilizado fue el NCSS versión 11.

Resultados y discusión

Los compuestos químicos responsables de la actividad antimicrobiana de las plantas son sintetizados en el citoplasma de las células, y dentro de estos compuestos se encuentran los flavonoides, los cuales forman parte de un grupo de compuestos químicos llamados fenoles⁽²⁹⁾. En el Cuadro 2 se muestran los análisis químicos y el rendimiento de los extractos etanólicos. Los resultados mostraron que el pH de los extractos etanólicos varió en un rango de 4.35 a 6.22, siendo el extracto E5 el más ácido y el E11 el menos ácido ($P < 0.05$). Así mismo, el extracto E5 presentó la concentración más alta de fenoles totales (143.68 ± 0.04 mg) y flavonoides totales (95.10 ± 0.05 mg), mientras que, el extracto E11 presentó los valores más bajos para fenoles totales (56.28 ± 0.05 mg) y flavonoides totales (30.08 ± 0.90 mg) ($P < 0.05$). El pH de los extractos se puede deber al carácter ácido de los fenoles y flavonoides totales, o a la presencia de otros compuestos polares como taninos, ácido benzoico, oleico, esteárico, lignocérico, entre otros⁽³⁰⁾. En este contexto, Al-rifai *et al*⁽²⁴⁾ estudiaron dos plantas medicinales de Arabia Saudita (*Convolvulus austroaegyptiacus* y *Convolvulus pilosellifolius*) y reportaron que el contenido de fenoles y flavonoides totales de los extractos etanólicos fue similar a los encontrados en este estudio. Además, en los extractos etanólicos de *Vernonia amygdalina* y *Tephrosia purpurea* también se encontró la presencia de fenoles y flavonoides totales^(31,32), sin embargo, Bitchagno *et al*⁽³³⁾ no encontraron la presencia de flavonoides en el extracto etanólico de la fruta de *Tectona grandis*. Lo anterior sugiere que los compuestos químicos presentes pueden variar de una parte del tejido vegetal a otra.

Cuadro 2: Análisis químicos y rendimiento de los extractos etanólicos

Extracto	pH	Fenoles totales	Flavonoides totales	Rendimiento (%)
E1	4.86	130.26 ± 0.05 ^d	89.23 ± 0.08 ^d	6.33
E2	5.22	115.45 ± 0.03 ^f	80.06 ± 0.03 ^h	5.54
E3	5.15	120.33 ± 0.06 ^e	85.09 ± 0.07 ^f	5.45
E4	4.82	135.03 ± 0.06 ^c	91.06 ± 0.02 ^c	4.51
E5	4.35	143.68 ± 0.04 ^a	95.10 ± 0.05 ^a	7.82
E6	5.34	110.03 ± 0.04 ⁱ	70.06 ± 0.08 ^k	4.02
E7	4.4	140.65 ± 0.07 ^b	93.05 ± 0.07 ^b	8.39
E8	5.34	112.12 ± 0.03 ^g	74.05 ± 0.80 ⁱ	6.49
E9	5.43	95.23 ± 0.08 ^j	71.05 ± 0.03 ^j	6.72
E10	5.6	85.24 ± 0.06 ^k	70.09 ± 0.04 ^k	6.55
E11	6.22	56.28 ± 0.05 ^l	30.08 ± 0.90 ^l	7.44
E12	5.22	115.02 ± 0.04 ^f	81.18 ± 0.06 ^g	5.23
E13	4.57	130.14 ± 0.09 ^d	93.78 ± 0.05 ^b	8.62
E14	5.3	111.56 ± 0.02 ^h	79.28 ± 0.20 ^h	8.35
E15	5.41	110.09 ± 0.06 ⁱ	73.29 ± 0.07 ⁱ	6.65
E16	5.55	109.89 ± 0.07 ⁱ	70.47 ± 0.80 ^k	9.32
E17	5.11	120.02 ± 0.04 ^e	87.55 ± 0.40 ^e	5.85

Fenoles totales= mg de ácido gálico/g de extracto; Flavonoides totales= mg de quercetina/g de extracto.
^{abcde fghijk} Diferente literal indica diferencia significativa entre los datos de la misma columna ($P < 0.05$).

Por otro lado, el rendimiento de los extractos fue variable, siendo el extracto E16 el que presentó el rendimiento mayor (9.32 %) y el extracto E6 el que presentó el rendimiento más bajo (4.02 %). En concordancia con este estudio, también se reportaron variaciones en el rendimiento de los extractos obtenidos con plantas de Pakistán⁽³⁴⁾. Además, resultados similares fueron reportados por Mostafa *et al*⁽³⁵⁾, donde *Punica granatum* presentó el rendimiento más alto (9.74 %), mientras que, *Cuminum cyminum* presentó el rendimiento más bajo (3.12 %). Así mismo, en otro estudio se evaluó el rendimiento de extractos etanólicos de 49 plantas medicinales de Indonesia, y se encontró que el rendimiento más alto fue para el fruto de *Salacca zalacca* (77.89 %), mientras que, el rendimiento más bajo se reportó en la raíz de *Plectranthus scutellarioides* (3.07 %). Adicionalmente, los autores reportaron que los extractos elaborados con hojas, mostraron mayor rendimiento comparado con los extractos donde se utilizaron raíces o partes más leñosas de las plantas⁽³⁶⁾, lo que coincide con lo encontrado en este estudio. Lo anterior, sugiere que la cantidad de compuestos solubles en etanol es dependiente de cada planta y de la parte utilizada.

Por otra parte, la mastitis es una enfermedad infecciosa de origen bacteriano y suele ser muy persistente dentro de los establos lecheros. En el Cuadro 3 se muestran las bacterias identificadas por las pruebas bioquímicas y la frecuencia con que aparecen en la leche de las vacas diagnosticadas con mastitis. Los resultados mostraron que en el Sitio-1 *E. coli* se presentó con mayor frecuencia en 58 de 60 muestras analizadas, seguido de *S. aureus* con 35, *Proteus spp.* con 6 y *Enterobacter spp.* con 4. Por otro lado, en el Sitio-2 se encontró a *E. coli* en 43.8 % de las muestras analizadas, seguido de *S. aureus* con 32.85 %, *Streptococcus spp.* con 10.95 %, *Shigella spp.* con 8.76 % y *Citrobacter spp.* con 3.65 %. En este estudio *E. coli* y *S. aureus* fueron los patógenos más representativos para ambos hatos, ya que se encontró su presencia en el 82.50 % del total de las muestras analizadas. Otros autores han mencionado que las bacterias del género *Streptococcus*, así como *E. coli* y *S. aureus*, son microorganismos comunes en vacas diagnosticadas con mastitis^(5,37,38), lo cual coincide con lo encontrado en esta investigación. Los microorganismos que causan mastitis variaron entre el Sitio-1 y el Sitio-2, lo que sugiere que el medio ambiente y el manejo de los animales puede influir en la biodiversidad de los microorganismos patógenos que causan la mastitis⁽⁵⁾.

Cuadro 3: Bacterias identificadas por pruebas bioquímicas y frecuencia de los patógenos presentes en la leche de las vacas diagnosticadas con mastitis

Lugar	Bacterias	Frecuencia	Porcentaje
Sitio-1			
	<i>Staphylococcus aureus</i>	35	33.98
	<i>Escherichia coli</i>	58	56.31
	<i>Proteus spp.</i>	6	5.83
	<i>Enterobacter spp.</i>	4	3.88
Total		103	100.00
Sitio-2			
	<i>Staphylococcus aureus</i>	45	32.85
	<i>Streptococcus spp.</i>	15	10.95
	<i>Escherichia coli</i>	60	43.8
	<i>Shigella spp.</i>	12	8.76
	<i>Citrobacter spp.</i>	5	3.65
Total		137	100.00

Frecuencia = número de veces que se repite el mismo patógeno en muestras diferentes; Porcentaje = Frecuencia * 100/Total.

En el Cuadro 4 se muestra la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos contra bacterias patógenas aisladas de vacas diagnosticadas con mastitis. Los resultados mostraron que el extracto E16 presentó la mayor actividad antimicrobiana contra *S. aureus* (20.50 ± 1.70 mm) ($P < 0.05$), mientras que, los extractos E9 y E10 presentaron la menor actividad (5.50 ± 0.70 y 5.50 ± 0.70) ($P < 0.05$). Por otro lado, los extractos E1 y E16 (*Populus alba* e *Ibervillea sonorae*) presentaron la mayor actividad contra *E. coli* (13.00 ± 1.51 y $13.00 \pm$

1.40 mm) ($P<0.05$), mientras que, el extracto E13 presentó la menor actividad (3.00 ± 0.70 mm) ($P<0.05$) y el extracto E10 no presentó actividad contra ese patógeno ($P>0.05$). Así mismo, el extracto E16 presentó la mayor actividad contra *Enterobacter* spp. (16.00 ± 2.40 mm) ($P<0.05$), mientras que, el extracto E9 presentó la menor actividad (5.50 ± 0.70 mm) ($P<0.05$) y los extractos E2, E10, E15 y E17 no presentaron actividad antimicrobiana contra ese mismo patógeno ($P>0.05$). Los extractos E8 y E16 presentaron la mayor actividad contra *Proteus* spp. (13.50 ± 1.11 mm y 13.50 ± 2.70 mm) ($P<0.05$), mientras que, los extractos E2, E9 y E10 presentaron la menor actividad antimicrobiana (5.50 ± 0.60 mm, 5.50 ± 0.70 mm y 5.50 ± 0.70 mm) ($P<0.05$), y los extractos E5 y E13 no mostraron actividad contra este patógeno ($P>0.05$). De igual manera, el extracto E16 presentó la mayor actividad antimicrobiana contra *Streptococcus* spp., mientras que, los extractos E12 y E17 presentaron la menor actividad (5.00 ± 0.41 mm y 5.00 ± 0.50 mm) ($P<0.05$), y los extractos E5 y E13 no fueron eficientes contra este patógeno ($P>0.05$). Por otro lado, los extractos E2 y E8 presentaron la mayor actividad antimicrobiana contra *Shigella* spp. (15.50 ± 2.32 mm y 16.00 ± 1.40 mm) ($P<0.05$), mientras que, los extractos E3, E9 y E14 presentaron la menor actividad (5.50 ± 0.68 mm, 5.50 ± 0.70 mm y 5.0 ± 1.41 mm) ($P<0.05$), y el extracto E15 no presentó actividad contra ese patógeno ($P>0.05$). Finalmente, el extracto E16 presentó la mayor actividad antimicrobiana contra *Citrobacter* spp. (17.00 ± 2.4 mm) ($P<0.05$), mientras que, el extracto E14 presentó la menor actividad (4.5 ± 1.41 mm) ($P<0.05$), y los extractos E2, E9 y E17 no mostraron ser efectivos contra esta bacteria ($P>0.05$).

Resultados similares han sido reportados en *S. aureus* aislado de vacas con mastitis utilizando los extractos de *Piptadenia viridiflora* y *Schinopsis brasiliensis*⁽³⁹⁾, así mismo, se ha reportado que los extractos de *Calpurinia aurea*, *Croton macrostachyus* y *Nicotiana tabacum* fueron eficientes al inhibir el crecimiento de *S. aureus* causante de la mastitis en rumiantes⁽⁴⁰⁾. También se ha reportado que *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus agalactiae* aislados de vacas con mastitis fueron susceptibles al extracto de *Zingiber officinale* Roscoe⁽⁴¹⁾ y el extracto de *Sanguisorba officinale* fue eficiente para inhibir la formación de biopelícula de *S. aureus* aislado de vacas con mastitis. Lo anterior resulta favorable ya que la biopelícula es una barrera de protección de la bacteria, y al inhibir su formación, la bacteria queda expuesta contra la protección natural del hospedero⁽⁴²⁾. Finalmente, el efecto de compuestos purificados extraídos de plantas (*trans*-cinamaldehído, eugenol, carvacrol y timol) demostraron su eficacia al inhibir el crecimiento de *S. aureus*, *E. coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Streptococcus uberis* aislados de vacas con mastitis⁽⁴³⁾.

Cuadro 4: Actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos contra bacterias patógenas aisladas de leche de vacas con mastitis

EXT	<i>S. aureus</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>E. coli</i>	<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Proteus</i> spp.	<i>Shigella</i> spp.	<i>Citrobacter</i> spp.
E1	9.00 ± 1.21 ^e	9.00 ± 1.41 ^d	13.00 ± 1.51 ^a	10.00 ± 1.21 ^e	8.00 ± 0.92 ^f	8.00 ± 0.61 ^d	10.00 ± 1.22 ^c
E2	6.00 ± 0.75 ^{gh}	8.50 ± 0.90 ^d	8.00 ± 1.16 ^d	n.p	5.50 ± 0.60 ^g	15.50 ± 2.32 ^a	n.p
E3	11.50 ± 2.16 ^{cd}	12.50 ± 2.12 ^c	10.50 ± 0.80 ^c	15.00 ± 0.70 ^{ab}	9.50 ± 1.10 ^d	5.50 ± 0.68 ^f	6.50 ± 0.70 ^d
E4	10.50 ± 1.11 ^d	8.50 ± 2.42 ^d	10.50 ± 1.15 ^c	12.00 ± 2.62 ^d	11.50 ± 1.19 ^b	11.00 ± 1.15 ^c	14.00 ± 2.00 ^b
E5	12.50 ± 2.32 ^{bc}	n.p	11.00 ± 2.34 ^{bc}	8.50 ± 0.92 ^f	n.p	12.50 ± 2.15 ^b	5.00 ± 0.12 ^e
E8	12.00 ± 1.31 ^b	12.00 ± 1.81 ^c	12.00 ± 1.33 ^{ab}	10.50 ± 1.41 ^e	13.50 ± 1.11 ^a	16.00 ± 1.40 ^a	10.00 ± 1.31 ^c
E9	5.50 ± 0.70 ^h	14.50 ± 1.70 ^b	7.00 ± 0.80 ^{de}	5.50 ± 0.70 ^g	5.50 ± 0.70 ^g	5.50 ± 0.70 ^f	n.p
E10	5.50 ± 0.70 ^h	8.50 ± 1.20 ^d	n.p	n.p	5.50 ± 0.70 ^g	8.00 ± 1.41 ^d	9.00 ± 1.40 ^c
E12	5.00 ± 1.2 ^h	5.00 ± 0.41 ^f	4.50 ± 0.50 ^g	8.50 ± 0.60 ^f	7.00 ± 1.31 ^f	11.50 ± 1.70 ^{bc}	15.00 ± 2.70 ^b
E13	7.50 ± 1.10 ^f	n.p	3.00 ± 0.70 ^h	13.50 ± 2.70 ^c	n.p	6.50 ± 0.70 ^e	9.50 ± 0.70 ^c
E14	9.00 ± 1.71 ^e	7.00 ± 1.22 ^e	6.0 ± 1.40 ^{ef}	14.0 ± 1.41 ^{bc}	10.00 ± 2.22 ^c	5.0 ± 1.41 ^f	4.5 ± 1.41 ^f
E15	8.50 ± 1.12 ^f	15.50 ± 1.62 ^b	10.50 ± 0.70 ^c	n.p	11.50 ± 1.12 ^b	n.p	6.50 ± 0.70 ^d
E16	20.50 ± 1.70 ^a	19.50 ± 1.90 ^a	13.00 ± 1.40 ^a	16.00 ± 2.40 ^a	13.50 ± 2.70 ^a	8.00 ± 1.4 ^d	17.00 ± 2.4 ^a
E17	6.50 ± 0.70 ^g	5.00 ± 0.50 ^f	5.50 ± 0.70 ^{fg}	n.p	8.50 ± 0.70 ^{de}	6.50 ± 0.70 ^e	n.p

EXT= extractos. (Los extractos 6,7 y 11 no presentaron ninguna actividad); Resultados expresados en mm de halos de inhibición; Concentración de los extractos= 50 mg/ml; n.p.= no presentó actividad.

^{abcde} Diferente literal indica diferencia significativa entre los datos de la misma columna ($P<0.05$).

Es interesante mencionar que el pH de los extractos mostró una correlación inversa con la concentración de fenoles totales ($r = -0.94$, $P<0.05$) y flavonoides totales ($r = -0.92$, $P<0.05$), es decir, los extractos con los pH más bajos, presentaron mayores concentraciones de fenoles y flavonoides totales. Además, los extractos con el mayor contenido de estos compuestos presentaron mayor actividad antimicrobiana, lo que sugiere que este efecto podría estar asociado a la cantidad de fenoles y flavonoides totales presentes en los extractos, ya que se ha sugerido que los flavonoides tienen un grupo funcional hidroxilo (-OH) que aumenta las reacciones de hidroxilación en la superficie de las bacterias alterando su funcionalidad y

disminuyendo el espesor de la bicapa lipídica, alterando la fluidez de la membrana celular y aumentando su permeabilidad, provocando la salida de iones y de proteínas intracelulares ocasionando la muerte de las bacterias, o bien, pueden modificar el metabolismo de las bacterias alterando la síntesis de ADN y proteínas, lo cual puede causar la muerte de las bacterias^(44,45).

Conclusiones e implicaciones

El extracto etanólico de *Ibervillea sonorae* (wereke) fue el más eficiente para eliminar bacterias patógenas aisladas de la leche de vacas diagnosticadas con mastitis. Sin embargo, los extractos de *Populus alba* (álamo), *Ambrosia ambrosioides* (chicura), *Krameria sonorae* (cosahui) y *Prosopis velutina* (mezquite) también presentaron actividad antimicrobiana importante. Además, la actividad antimicrobiana se relacionó con el contenido de fenoles y flavonoides totales presentes en los extractos. Por lo anterior, los extractos de plantas nativas de Sonora, México, pueden ser considerados en pruebas *in vivo* como un tratamiento alternativo y natural para controlar las infecciones en la glándula mamaria causadas por diferentes microorganismos en bovinos productores de leche.

Agradecimientos

Al apoyo de la Universidad Estatal de Sonora y a la Universidad de Sonora por el uso de materiales e instalaciones, así como a Lic. Gerardo Reyna Cañez por su apoyo técnico. Este trabajo de investigación fue soportado por el proyecto UES-PII-20-UAH-IH-02.

Literatura citada:

1. Miranda S, Albuja C, Tríbulo H. Asociación entre la mastitis subclínica con la pérdida temprana de gestación en un hato de vacas lecheras. La granja Rev Ciencias la Vida 2019;30(2):48-56.
2. Andrade RM, Espinoza MM, Rojas JA, Tirado PO, Salas RG, Falcón VV. Mastitis bovina y su repercusión en la calidad de la leche. Rev Electrón Vet 2017;18(11):1-16.
3. Ruegg PL. A 100-year review: Mastitis detection, management, and prevention. J Dairy Sci 2017;100(12):10381-10397.
4. Calderón A, Rodríguez VCR. Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundiboyacense (Colombia). Rev Colomb Cienc Pecu 2008;21(4):582-589.
5. Klaas IC, Zadoks RN. An update on environmental mastitis: Challenging perceptions. Transbound Emerg Dis 2018;65:166-185.

6. Abebe R, Hatiya H, Abera M, Megersa B, Asmare K. Bovine mastitis: prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. BMC Vet Res 2016;12(1):1-11.
7. Steeneveld W, van Werven T, Barkema HW, Hogeveen H. Cow-specific treatment of clinical mastitis: An economic approach. J Dairy Sci 2011;94(1):174-188.
8. Guimarães JL, Brito MA, Lange CC, Silva MR, Ribeiro JB, Mendonça LC, *et al.* Estimate of the economic impact of mastitis: A case study in a Holstein dairy herd under tropical conditions. Prev Vet Med 2017;142:46-50.
9. Amber R, Adnan M, Tariq A, Khan SN, Mussarat S, Hashem A, *et al.* Antibacterial activity of selected medicinal plants of northwest Pakistan traditionally used against mastitis in livestock. Saudi J Biol Sci 2018;25(1):154-161.
10. Bedolla CC, de León MP. Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera. Rev Electrón Vet 2008;9(4):1-26.
11. Gerlach BFA, Ayala AF, Denogean BFG, Moreno MS, Gerlach BLE. Incidencia y costo de la mastitis en un establo del municipio de Santa Ana, Sonora. Rev Mex Agroneg 2009;24(8):789-796.
12. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiol Mol Biol Rev 2010;74(3):417-433.
13. Oliver SP, Murinda SE, Jayarao BM. Impact of antibiotic use in adult dairy cows on antimicrobial resistance of veterinary and human pathogens: a comprehensive review. Foodborne Pathog Dis 2011;8(3):337-355.
14. Oliver SP, Murinda SE. Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. Vet Clin Food Anim Pract 2012;28(2):165-185.
15. Cameron A, McAllister TA. Antimicrobial usage and resistance in beef production. J Anim Sci Biotechnol 2016;7(1):1-22.
16. Mushtaq S, Shah AM, Shah A, Lone SA, Hussain A, Hassan QP, *et al.* Bovine mastitis: An appraisal of its alternative herbal cure. Microb Pathog 2018;114:357-361.
17. Ginovyan M, Petrosyan M, Trchounian A. Antimicrobial activity of some plant materials used in Armenian traditional medicine. BMC Compl Alternative Med 2017;17(1):1-9.
18. Ruiz-Bustos E, Velazquez C, Garibay-Escobar A, García Z, Plascencia-Jatomea M, Cortez-Rocha MO, *et al.* Antibacterial and antifungal activities of some Mexican medicinal plants. J Med Food 2009;12(6):1398-1402.

19. Robles-Zepeda RE, Velázquez-Contreras CA, Garibay-Escobar A, Gálvez-Ruiz JC, Ruiz-Bustos E. Antimicrobial activity of Northwestern Mexican plants against *Helicobacter pylori*. J Med Food 2011;14(10):1280-1283.
20. Moreno-Salazar SF, Verdugo AE, López CC, Martínez EB, Candelas TM, Robles-Zepeda RE. Activity of medicinal plants, used by native populations from Sonora, Mexico, against enteropathogenic bacteria. Pharm Biol 2008;46(10-11):732-737.
21. Robles-Zepeda RE, Coronado-Aceves EW, Velázquez-Contreras CA, Ruiz-Bustos E, Navarro-Navarro M, Garibay-Escobar A. *In vitro* anti-mycobacterial activity of nine medicinal plants used by ethnic groups in Sonora, Mexico. BMC Complement Altern Med 2013;13(1):1-6.
22. Khan S, Imran M, Imran M, Pindari N. Antimicrobial activity of various ethanolic plant extracts against pathogenic multi drug resistant *Candida spp.* Bioinformation 2017;13(3):67-72.
23. Celaya-Michel H, Anaya-Islas J, Barrera-Silva MA, Barrales-Heredia SM, Nieblas-López M, Osuna-Chávez RF, *et al.* Extractos hidro-etanólicos de plantas comestibles como alternativa para controlar bacterias patógenas, parásitos e insectos en la industria pecuaria. Biotecnia 2019;21(2):47-54.
24. Al-Rifai A, Aqel A, Al-Warhi T, Wabaidur SM, Al-Othman ZA, Badjah-Hadj-Ahmed AY. Antibacterial, antioxidant activity of ethanolic plant extracts of some *Convolvulus* species and their DART-ToF-MS profiling. Evid-Based Compl Alt 2017;2017:1-9.
25. Amer S, Gálvez FLA, Fukuda Y, Tada C, Jiménez IL, Valle WFM, *et al.* Prevalence and etiology of mastitis in dairy cattle in El Oro Province, Ecuador. J Vet Med Sci 2018;80(6):861-868.
26. Abdalhamed AM, Zeedan GSG, Zeina HAAA. Isolation and identification of bacteria causing mastitis in small ruminants and their susceptibility to antibiotics, honey, essential oils, and plant extracts. Vet World 2018;11(3):355-362.
27. Rodríguez PR, Muñoz GE. Frecuencia y susceptibilidad antimicrobiana de bacterias causantes de mastitis en bovinos de un establo de Trujillo, Perú. Rev Investig Vet Perú 2017;28(4):994-1001.
28. Heredia-Castro PY, Méndez-Romero JI, Hernández-Mendoza A, Acedo-Félix E, González-Córdova AF, Vallejo-Cordoba B. Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocin-like inhibitory substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from artisanal Mexican cheese. J Dairy Sci 2015;98(12):8285-8293.

29. Lin D, Xiao M, Zhao J, Li Z, Xing B, Li X, *et al.* An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molecules* 2016;21(137):1-19.
30. Ochoa PA, Marin MJ, Rivero BD, Saborít A. Caracterización física, físico-química y química de extractos totales de hojas frescas de *Petiveria alliacea* L. con acción antimicrobiana. *Rev Mex Cienc Farm* 2013;44(1):52-59.
31. Pandey MM, Khatoon S, Rastogi S, Rawat AKS. Determination of flavonoids, polyphenols and antioxidant activity of *Tephrosia purpurea*: a seasonal study. *J Integr Med* 2016;14(6):447-455.
32. Alara OR, Abdurahman NH, Olalere OA. Ethanolic extraction of flavonoids, phenolics and antioxidants from *Vernonia amygdalina* leaf using two-level factorial design. *J King Saud Uni Sci* 2020;32(1):7-16.
33. Bitchagno GTM, Fonkeng, LS, Kopa TK, Tala MF, Wabo HK, Tume CB, *et al.* Antibacterial activity of ethanolic extract and compounds from fruits of *Tectona grandis* (Verbenaceae). *BMC Compl Alternative Med* 2015;15(1):1-6.
34. Naz R, Ayub H, Nawaz S, Islam ZU, Yasmin T, Bano A, *et al.* Antimicrobial activity, toxicity and anti-inflammatory potential of methanolic extracts of four ethnomedicinal plant species from Punjab, Pakistan. *BMC Compl Alternative Med* 2017;17(1):1-13.
35. Mostafa AA, Al-Askar AA, Almaary KS, Dawoud TM, Sholkamy EN, Bakri MM. Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Saudi J Biol Sci* 2018;25(2):361-366.
36. Romulo A, Zuhud EA, Rondevaldova J, Kokoska L. Screening of *in vitro* antimicrobial activity of plants used in traditional Indonesian medicine. *Pharm Biol* 2018;56(1):287-293.
37. Tenhagen BA, Köster G, Wallmann J, Heuwieser W. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J Dairy Sci* 2006;89(7):2542-2551.
38. Gomes F, Henriques M. Control of bovine mastitis: old and recent therapeutic approaches. *Curr Microbiol* 2016;72(4):377-382.
39. Ribeiro ICDO, Mariano EGA, Careli RT, Morais-Costa F, de Sant'Anna FM, Pinto MS, *et al.* Plants of the Cerrado with antimicrobial effects against *Staphylococcus spp.* and *Escherichia coli* from cattle. *BMC Vet Res* 2018;14(1):1-10.

40. Kalayo S, Haileselassie M, Gebre-egziabher G, Tiku'e T, Sahle S, Taddele H, *et al.* *In vitro* antimicrobial activity screening of some ethnoveterinary medicinal plants traditionally used against mastitis, wound and gastrointestinal tract complication in Tigray Region, Ethiopia. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012;2(7):516-522.
41. Poeloengan M. The effect of red ginger (*Zingiber officinale Roscoe*) extract on the growth of mastitis causing bacterial isolates. *Afr J Microbiol Res* 2011;5(4):382-389.
42. Chen X, Shang F, Meng Y, Li L, Cui Y, Zhang M, *et al.* Ethanol extract of *Sanguisorba officinalis* L. inhibits biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an *ica*-dependent manner. *J Dairy Sci* 2015;98(12):8486-8491.
43. Baskaran SA, Kazmer GW, Hinckley L, Andrew SM, Venkitanarayanan K. Antibacterial effect of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogens *in vitro*. *J Dairy Sci* 2009;92(4):1423-1429.
44. Radulovic NS, Blagojevic PD, Stojanovic-Radic ZZ, Stojanovic NM. Antimicrobial plant metabolites: structural diversity and mechanism of action. *Curr Med Chem* 2013;20(7):932-952.
45. Mickymaray S. Efficacy and mechanism of traditional medicinal plants and bioactive compounds against clinically important pathogens. *Antibiotics* 2019;8(257):1-57