



Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

Dirección de Investigación

Subdirección de Programación y Evaluación



Proyecto de Investigación 2018

Unidad:	Saltillo	División:	Ciencia Animal	Departamento:	Nutrición Animal
Tema estratégico (ANA/PEP):		<p>ANA: Biotecnología. Generación de procesos tecnológicos integrados de transformación de productos vegetales y nutrición avanzada. Innovación y desarrollo de biocidas, bioinsecticidas y biofertilizantes. Desarrollo de tecnología para la extracción de biomoléculas, vitaminas naturales, enzimas, cofactores y productos derivados de bioprocesos para el sector agroalimentario.</p> <p>PEP: 3.2 Fortalecer la sanidad, inocuidad y calidad agroalimentaria para proteger la salud de la población y elevar la competitividad del sector. 4.2 Aprovechar la biotecnología con base en rigurosos análisis científicos, cuidando nuestra riqueza genética, la salud humana y el medio ambiente. 5.1 Coadyuvar a la alimentación y nutrición de la población mexicana, particularmente aquellos en extrema pobreza o con carencia alimentaria severa. Metas de producción: leche de bovino, caprino.</p>			
Línea de investigación:		Posgrado en Ciencias en Producción Agropecuaria			
Título del proyecto: Evaluación del efecto antibacteriano de biocompuestos derivados de plantas sobre patógenos bacterianos de mastitis bovina y su posible efecto asociativo					
Presupuesto solicitado (Máximo \$75,000)		\$75,000		El proyecto es:	Nuevo <input type="checkbox"/> Continuasión <input checked="" type="checkbox"/>
Tipo de investigación:		Básica <input type="checkbox"/>	Aplicada <input checked="" type="checkbox"/>	Tecnológica <input checked="" type="checkbox"/>	e-mail del responsable: aguilera_carbo@yahoo.com
Vinculación:	Si <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/>	Fondos concurrentes:		\$250,000	
Cooperante(s):		FONDO CONAFOR-CONACYT			
Entidad (es):		Coahuila, Tamaulipas, Puebla		Municipio (s): Saltillo, Ramos Arizpe, General Cepeda, Torreón, Puebla	
Localidades:		Saltillo, Ramos Arizpe, General Cepeda, Torreón, Puebla			
A realizar durante el(los) año(s):		Dos años			
Participantes		Adscripción (Clave Depto.)		Expediente No.	
Responsable		Antonio Francisco Aguilera Carbó		3623 3497	
Colaborador:		Miguel A. Mellado Bosque		3623 852	
Colaborador:		Dr. Jesús Alberto Mellado Bosque		3623	
Colaborador:		Dr. Juan Alberto Ascacio Valdés		Externo UdeC	
Colaborador:		Dr. Cristóbal Noé Aguilar González		Externo UdeC	
Colaborador:		Dra. Lilia Arely Prado Barragán		Externo UAM-I	
		Grado por obtener		Matrícula	
Tesis:		MC. Eloisa Gómez Macías		Doctorado 42083218	
Programa Docente:		Doctorado en Ciencias en Producción Agropecuaria			
Tesis:		Por confirmar		Licenciatura	
Programa Docente:		ICTA y/o Zootecnia			
Vo. Bo.			Autoriza		
Firma y sello					
Nombre		Dr. José Eduardo García Martínez Jefe de Departamento		Dr. Armando Robledo Olivo Subdirector de Programación y Evaluación	

- Cada Jefe de Departamento deberá dejar copia para su archivo

1.-Título del proyecto

Presupuesto solicitado:

Evaluación del efecto Antibacteriano de Biocompuestos Derivados de Plantas Sobre Patógenos Bacterianos de Mastitis Bovina y su Posible Efecto Asociativo	\$ 75,000 NMX
--	---------------

2.- Introducción

En la actualidad la mastitis bovina es considerada un grave problema ya que afecta de manera considerable los ingresos de los productores, las pérdidas económicas atribuidas a esta enfermedad se aproximan a los 35.000 millones de dólares anualmente (Mubarack *et al.*, 2011). Este problema consiste en un proceso inflamatorio de la glándula mamaria y sus conductos secretores, lo cual afecta de considerablemente la producción de leche y la calidad de la misma (Dhanabalan *et al.*, 2008).

La mastitis usualmente es tratada con antimicrobianos sintéticos por vía intramamaria y parenteral (Dhanabalan *et al.*, 2008). El uso indiscriminado y prolongado de dichos productos puede resultar en una multiresistencia a antibióticos por parte de los microorganismos, lo cual conduce a incrementar las dosis de antimicrobianos, provocando así el incremento de residuos de antimicrobianos en la leche, representando un riesgo potencial al consumidor (Gopinath *et al.*, 2011).

Es por ello de suma importancia indagar acerca de compuestos producidos de manera natural por las plantas, ya que estos poseen mayor capacidad de biodegradación que los compuestos de origen sintético, de modo que pueden resultar ambientalmente aceptables (Gopinath *et al.*, 2011).

A lo largo del tiempo las plantas han sido ampliamente utilizadas en diversas áreas como la industria alimentaria, medicina alternativa, así como también en la implementación de productos farmacéuticos, tanto profiláticos como correctivos ya que son una gran fuente de compuestos bioactivos (Kalayou *et al.*, 2012).

Existen especies de plantas como *Aster gymncephalus gray* y *Purshia plicata*, pertenecientes a la región del desierto Chihuahuense, de las cuales en estudios anteriores por medio de métodos cromatográficos se obtuvo un perfil de moléculas bioactivas. Entre dichas moléculas se incluyen compuestos de la familia de los flavonoles (Epigallocatequin 3-O glucuronido, (+)-catequina, 3,7-dimethyl quercetina), así como también algunos elagitaninos (ácido elágico, pedunculagina, oenothien b), entre otros, compuestos de los cuales se ha evidenciado potencial tanto antimicrobiano como antioxidante (Gómez-Macías, 2016).

Con base en los antecedentes, el presente trabajo está enfocado en encontrar plantas, cuyos metabolitos secundarios puedan desempeñar un importante papel en el desarrollo de un antimicrobiano de origen natural, el cual pueda llegar a ser utilizado en el campo de la medicina veterinaria, ya sea como tratamiento profiláctico o correctivo contra Mastitis bovina.

Objetivos

Objetivo general

⇒ Evaluar el efecto antimicrobiano de biocompuestos derivados de plantas sobre los principales patógenos bacterianos de mastitis bovina, así como también el posible efecto asociativo entre biocompuestos de diferentes plantas.

⇒

Objetivos específicos

⇒ Evaluar el efecto antimicrobiano de biocompuestos extraídos de *Aster gymnocephalus gray* y *Purshia plicata* a diferentes concentraciones sobre los principales patógenos de mastitis bovina por medio de la técnica de difusión en agar.

⇒ Determinar la concentración a la cual se ejerce mayor efectividad antimicrobiana.

⇒ Evaluar la existencia de efecto asociativo entre los dos grupos de compuestos sobre los principales patógenos de mastitis bovina por medio de la técnica de difusión en agar.

⇒ Determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de biocompuestos de *Aster gymnocephalus gray* y

Purshia plicata a diferentes concentraciones sobre los principales patógenos de mastitis bovina por medio de la técnica de dilución en caldo.

- ⇒ Determinar la concentración mínima bactericida (MBC) de biocompuestos de *Aster gymnocephalus gray* y *Purshia plicata* a diferentes concentraciones sobre los principales patógenos de mastitis bovina por medio de la técnica de dilución en caldo.
- ⇒ Evaluar la cinética bactericida de los grupos de compuestos sobre los patógenos bacterianos de mastitis bovina, así como la persistencia de su actividad antimicrobiana utilizando como modelo biológico leche estéril y libre de antibiótico.
- Desarrollar una estrategia para la aplicación in vivo de los biocompuestos y evaluar su potencial antimicrobiano en casos clínicos de mastitis bovina.

Hipótesis

Los biocompuestos derivados de plantas exhiben efecto antibacteriano sobre patógenos bacterianos de mastitis bovina, además de un efecto asociativo entre compuestos de diferentes especies de plantas.

3.-Revisión de Literatura

Mastitis bovina

La mastitis bovina es un proceso inflamatorio de la glándula mamaria y sus conductos secretores (Kaithwas *et al.*, 2011). Este proceso es causado usualmente por una invasión bacteriana en la glándula mamaria. lo que consigo trae como consecuencia considerables pérdidas económicas a la industria lechera (Baskaran *et al.*, 2009).

Está caracterizada por cambios tanto físicos como químicos en la composición de la leche, así como también por cambios patológicos en los tejidos de la glándula mamaria. Algunos de los cambios importantes en la leche son el cambio de consistencia de la secreción observándose grumos aunado al incremento de los niveles de leucocitos, lo que conlleva a un aumento en el recuento de células somáticas, aunque en casos severos este proceso trae consigo la pérdida de la función secretora del tejido mamario (Mansor *et al.*, 2013).

Etiología

Con base en la etiología bacteriológica, la mastitis bovina se clasifica en ambiental y contagiosa; los patógenos ambientales como *Escherichia coli*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Streptococcus uberis* proliferan en fuentes como lo son la cama, pastos, agua acumulada y estiércol, en cambio los patógenos contagiosos se alojan en los cuartos infectados (*Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*) (Baskaran *et al.*, 2009).

Patogénesis

Durante este proceso las bacterias patógenas ingresan a la glándula mamaria durante el proceso de ordeño y después del mismo, la invasión esta predispuesta por situaciones como lo son; la disminución de tono muscular en el esfínter y las fluctuaciones de vacío; al ingresar a la glándula mamaria a través del canal del pezón, los agentes patógenos entran en contacto directo con la leche, medio en el cuál se adaptan con la finalidad de sobrevivir y posteriormente replicarse provocando así una invasión posterior a la cuál acontece una infección (Baskaran *et al.*, 2009).

Tratamiento

El método terapéutico mayormente utilizado y con mayor disponibilidad es la infusión intramamaria de antibióticos. No obstante, aproximadamente el 90% de los residuos de drogas en leche se origina como consecuencia de terapias antibacterianas para el control de mastitis, aunado a la resistencia bacteriana a los antibióticos desarrollada como consecuencia del uso indiscriminado de los mismos (Kulkarnii *et al.*, 2013).

Uso de biocompuestos extraídos de plantas como antimicrobianos

En la actualidad se ha descrito ampliamente el uso de plantas como tratamiento antimicrobiano, gracias a la gran gama de biocompuestos que sintetizan de manera natural (Forbes *et al.*, 2014).

El hecho de que microorganismos como las bacterias constantemente desarrollen mecanismos de resistencia a los antimicrobianos, hace creciente la necesidad de indagar acerca de la gran variedad de compuestos bioactivos producidos por las plantas, así como también, despierta el interés de evaluar el potencial de dichos compuestos como antimicrobianos de origen natural (Wilson, 2014).

A lo largo del tiempo, se ha comprobado por diferentes investigadores la efectividad antimicrobiana de los compuestos bioactivos de plantas frente a diversos agentes patógenos, tanto en la industria farmacéutica como en la industria alimentaria (Brusotti *et al.*, 2014).

Dhanabalan *et al.*, 2009 reportaron que los extractos acuosos y metanolicos de *S. campanulata* y *T.procumbens*

ejercen significativa actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* aislada a partir de casos clínicos de mastitis bovina en Brasil, sin embargo, no reportaron un perfil de biocompuestos a los cuales atribuir tal efecto.

Baskaran *et al.*, 2009 evidenciaron el efecto antimicrobiano in vitro de compuestos tales como, eugenol, carvacrol y timol, compuestos aislados de plantas frente a patógenos de mastitis bovina, dichos compuestos comercializados por Sigma-Aldrich Chemical Co.

A pesar de que los antecedentes hablan acerca del efecto antimicrobiano de biocompuestos frente a algunos patógenos de mastitis bovina, es importante el hecho de caracterizar el perfil de biocompuestos de cada especie vegetal a evaluar, así como también utilizar los recursos vegetales pertenecientes al país, por tal motivo se pretende evaluar el efecto antimicrobiano y concentración inhibitoria de biocompuestos derivados de *Áster gymnocephalus gray* y *Purshia plicata*, plantas pertenecientes al desierto chihuahuense de México y de las cuales aún no se ha investigado sobre sus propiedades antibacterianas y las cuales poseen una amplia gama de biocompuestos.

4.- Procedimiento Experimental

Lugar de estudio

La presente investigación se llevará a cabo de agosto de 2017 a mayo de 2019 en el laboratorio de Nutrición Animal perteneciente al Departamento de Nutrición Animal de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, ubicada en Buenavista, Saltillo, Coahuila, México al sur de la ciudad de Saltillo, Coahuila, sobre la carretera 54 con dirección a Zacatecas y cuyas coordenadas terrestres son: 25°22'06.66" latitud norte 101°01'32.78" latitud oriente. La altitud corresponde 1.555 msnm. La temperatura anual es de 17.8°C. Alcanzando temperaturas de hasta 35°C durante el verano.

Material vegetal

Será recolectado en la región de la angostura, Coahuila. Se utilizarán hojas, tallos y pétalos de *Áster gymnocephalus gray* y *Purshia plicata*. Las muestras deshidratadas se someterán a molienda para la obtención de un polvo fino, posteriormente se realizará una extracción por percolación.

Obtención del extracto vegetal y Concentración de biocompuestos

Se realizará un proceso de extracción acuosa, se mezclarán 200 g de material vegetal deshidratado y molido con 1 L de agua destilada 1/5 (m/v), manteniendo su temperatura a 30 °C durante 30 minutos. Posterior a la extracción acuosa, se realizará una cromatografía de adsorción con Amberlite XAD16 para concentrar los biocompuestos (Ascacio- Valdés *et al.*, 2010).

Cepas bacterianas

Se utilizarán cepas bacterianas aisladas a partir de casos clínicos de mastitis bovina tales como, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp* entre otros, los cuáles serán aisladas y propagadas, las bacterias serán debidamente identificadas por la morfología macroscópica y microscópica, así como también con ayuda de pruebas bioquímicas.

Actividad antibacteriana

La determinación de actividad antibacteriana se llevará a cabo por medio del método de difusión en disco de Kirby-Bauer (Bauer *et al.*, 1966, Parekh y Chanda, 2006), realizando el ensayo por quintuplicado, utilizando un control negativo y un control positivo. La capacidad antibacteriana será determinada midiendo el diámetro de inhibición (mm).

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)

Se utilizará el método de dilución en caldo para determinar (MIC) (Perez *et al.*, 1990; Nair y Chanda, 2005)., Se considerará el crecimiento bacteriano para determinar MIC, la ausencia de crecimiento será confirmada por la ausencia de turbidez y por inoculación en agar y posterior incubación.

Determinación de la concentración mínima bactericida (MBC)

La concentración mínima bactericida (MBC) del grupo de compuestos a evaluar frente a cada agente patógeno serán determinadas por medio del ensayo de dilución en caldo descrito por Sánchez *et al.*, 2010.

Cinética bactericida

Se llevará a cabo el ensayo de cinética bactericida de los biocompuestos utilizando la técnica descrita por Baskaran *et al.*, 2009. Utilizando como modelo biológico leche estéril libre de antibióticos.

Determinación de persistencia

Se llevará a cabo la técnica de determinación de persistencia de la supervivencia bacteriana propuesta por Baskaran *et al.*, 2009. A partir de la actividad antimicrobiana en leche por parte de los compuestos, se inocularán muestras de leche que contengan la concentración mínima bactericida (MBC), como testigo se utilizarán muestras de leche que no contengan tratamiento, cada ensayo se llevará a cabo por triplicado.

Determinación de pH

Se transferirán 5 mL de leche a tubos con capacidad de 20 mL. Posteriormente se añadirá el grupo de moléculas antimicrobianas determinando de manera inmediata el pH con ayuda de un potenciómetro.

Ensayo de actividad antimicrobiana in vivo

Con base en los ensayos in vitro se formulará el tratamiento idóneo en cuanto a la concentración del tratamiento, utilizando como vehículo solución salina fisiológica al 0.9% para la administración de tratamiento in vivo, el cual será administrado por vía intramamaria.

Diseño Experimental

Completamente al azar

Variables a Evaluar

- ⇒ Rendimiento de biocompuestos
- ⇒ Diámetro de inhibición
- ⇒ Porcentaje de inhibición
- ⇒ Concentración mínima inhibitoria
- ⇒ Concentración mínima bactericida
- ⇒ Tiempo de muerte
- ⇒ Persistencia de actividad antimicrobiana
- ⇒ pH

Análisis estadístico

Se utilizará la opción Modelo Lineal General del paquete estadístico Minitab 16. Utilizando 33 tratamientos por quintuplicado para cada cepa bacteriana. Realizando además una comparación de medias por el método de Tukey.

Cronograma de Actividades para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Rec. de muestras de leche	X	X	X									
Obtención de microorganismos			X	X	X							
Pruebas de difusión en disco						X	X					
Determinación de (MIC) y (MBC)								X	X			
Evaluación de cinética bactericida									X	X	X	

Cronograma de distribución de presupuesto para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Rec. de muestras de leche		X	X									
Obtención de microorganismos		X	X									
Pruebas de difusión en disco		X	X									
Determinación de (MIC) y (MBC)			X	X								
Evaluación de cinética bactericida					X	X						

Duración total del proyecto

Año de Inicio	2018	Año estimado de conclusión	2019
---------------	------	----------------------------	------

5.-Productos Esperados

- Avance tesis de Doctorado y Licenciatura

- 1 artículo científico publicado
- 1 artículo científico enviado
- Estrategia para aplicación de tratamientos in vivo
- Inicio del registro ante IMPI

6.-Literatura Citada

- Ali, S. M., A. A. Khan, I. Ahmed, M. Musaddiq, K. S. Ahmed, H. Polasa, V. L. Rao, C. M. Habibullah, L. A. Sechi, & N. Ahmed. Antimicrobial activities of eugenol and cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2005; 4:20–26
- Ascacio-Valdés, J., Aguilera-Carbó, A., Martínez-Hernández, J., Rodríguez-Herrera, R. & Aguilar, C. Euphorbia antisiphilitica residues as a new source of ellagic acid. *Chem Pap*. 2010; 64, 528-532
- Baskaran, S. A., Kazmer, G. W., Hinckley, L., Andrew, S. M., & Venkitanarayanan, K. Antibacterial effect of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogens in vitro. *J. Dairy Sci.* 2009; 92(4), 1423-1429
- Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*. 1966; 45: 493-496
- Bhattacharjee I, Chatterjee SK, Ghosh A, Chandra G. Antibacterial activities of some plant extracts used in Indian traditional folk medicine. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2011; S165-S169
- Brusotti, G., Cesari, I., Dentamaro, A., Caccialanza, G., & Massolini, G. Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethnopharmacological approach. *J Pharm Biomed Anal*. 2014; 87, 218-228
- Dhanabalan, R. In vitro Phytochemical Screening and Antibacterial Activity of Organic Leaf Extracts of *Spathodea campanulata* P. Beauv against Hospital Isolated Bacterial Strains. *Ethnobotanical Leaflets*, 2008; (1), 134-145
- Forbes-Hernández, T. Y., Giampieri, F., Gasparrini, M., Mazzoni, L., Quiles, J. L., Alvarez-Suarez, J. M., & Battino, M. The effects of bioactive compounds from plant foods on mitochondrial function: A focus on apoptotic mechanisms. *Food Chem Toxicol*. 2014; 68, 154-182
- Gopinath, S. M., Suneetha, T. B., & Mruganka, V. D. Chemical prophylaxis and antibacterial activity of methanolic and aqueous extracts of some medicinal plants against bovine mastitis. *Int J Adv Biol Res*. 2011; 1(1), 93-95
- Kaithwas, G., Mukerjee, A., Kumar, P., & Majumdar, D. K. *Linum usitatissimum* (linseed/flaxseed) fixed oil: antimicrobial activity and efficacy in bovine mastitis. *Inflammopharmacology*. 2011; 19(1), 45-52
- Kalayou, S., Haileselassie, M., Gebre-egziabher, G., Tiku'e, T., Sahle, S., Taddele, H., & Ghezu, M. 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
- Kulkarni, A. G., & Kaliwal, B. B. Bovine mastitis: a review. *Intl J Rec Sci Res*. 2013; 4(5), 543-548.
- Mansor, R., Mullen, W., Albalat, A., Zerefos, P., Mischak, H., Barrett, D. C., & Eckersall, P. D. A peptidomic approach to biomarker discovery for bovine mastitis. *J Proteom*. 2013; 85, 89-98
- Min, B. R., Pinchak, W. E., Merkel, R., Walker, S., Tomita, G., & Anderson, R. C. Comparative antimicrobial activity of tannin extracts from perennial plants on mastitis pathogens. *Sci Res Essay*. 2008; 3(2), 066-073
- Mubarack, H. M., Doss, A., Dhanabalan, R., & Venkataswamy, R. In vitro antimicrobial effects of some selected plants against bovine mastitis pathogens. *Hygeia JD Med*. 2011; 3(1), 71-75

Nair R, Chanda S. Antibacterial activity of Punica granatum in different solvents. *Ind. J. Pharm. Sci.* 2005; 67: 239-243

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). National Committee for Clinical Laboratory Standards. Villanova: PA; 2000

Parekh J, Chanda S. In vitro antimicrobial activities of extracts of *Launaea procumbens* Roxb. (Labiatae), *Vitis vinifera* L. (Vitaceae) and *Cyperus rotundus* L. (Cyperaceae). *Afr. J. Biomed. Res.* 2006; 9: 89-93

Parekh J, Chanda S. Antibacterial and phytochemical studies on twelve species of Indian medicinal plants. *Afr. J. Biol. Res.* 2007; 10: 175-181

Paul C, Arnold JV, Dirk VB, Louis M. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept' Review. *J Ethnopharmacol.* 2006; 106: 290-302

Perez C, Paul M, Bazerque P. An antibiotic assay by the agar well diffusion method. *Acta Biol Med Exp.* 1990; 15: 113-115

Sánchez E, Heredia N, García S. Extracts of edible and medicinal plants damage membranes of *Vibrio cholerae*. *App Environ Microbiol.* 2010; 76(20):6888-6894

Wilson, D. N. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2014; 12(1), 35-48