



UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR
Facultad De Ciencias Agropecuarias Recursos Naturales y del
Ambiente
Carrera de Medicina Veterinaria

Tema:

**“EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DEL
ÁRBOL DE TÉ (*Melaleuca alternifolia*) FRENTE TRES GÉNEROS
BACTERIANOS AISLADAS DE MASTITIS BOVINA”**

Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Médica Veterinaria,
otorgado por la Universidad Estatal de Bolívar a través de la Facultad de Ciencias
Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente. Carrera de Medicina
Veterinaria

Autora:

SAHARA BELÉN VELOZ CARRASCO.

TUTOR:

DR. EDISON RIVELIÑO RAMÓN CURAY M.Sc.

Guaranda – Ecuador

2023

CERTIFICADO DE APROBACIÓN DEL TUTOR

TEMA:

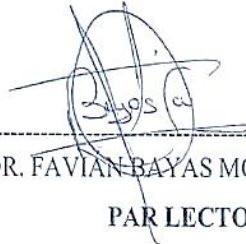
EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DEL ÁRBOL DE TÉ (*Melaleuca alternifolia*) FRENTE TRES GÉNEROS BACTERIANOS AISLADAS DE MASTITIS BOVINA

REVISADO Y APROBADO POR:



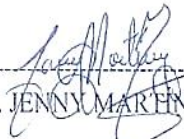
DR. EDISON RIVELINO RAMÓN CURAY M.Sc.

TUTOR



DR. FAVIAN BAYAS MOREJÓN PhD.

PAR LECTOR



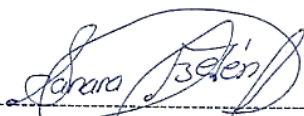
DRA. JENNY MARTÍNEZ MOREIRA M.Sc.

PAR LECTORA

CERTIFICACIÓN DE AUTORIA

Yo, Sahara Belén Veloz Carrasco, con C.I. 0604370445, declaro que el trabajo y los resultados presentados en este informe, no han sido previamente presentados para ningún grado o calificación profesional; y, que las referencias bibliográficas que se incluyen han sido consultadas y citadas con su respectivo autor(es).

La Universidad Estatal de Bolívar, puede hacer uso de los derechos de publicación correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, su Reglamentación y la Normativa Institucional vigente.



SAHARA BÉLEN VELOZ CARRASCO
C.I. 0604370445
AUTORA



DR. EDISON RIVELIÑO RAMÓN CURAY M.Sc.
TUTOR

Se otorgó ante mi y en fe de ello
confiero ésta Primera copia
certificada, firmada y sellada en AS
Guaranda, 13 de Noviembre del 2023


Dr. Hernán Cristóbal Arcas
NOTARIO SEGUNDO DEL CANTÓN GUARANDA



20230201002P01616 DECLARACION JURAMENTADA
OTORGA: SAHARA BELEN VELOZ CARRASCO
CUANTIA: INDETERMINADA
DI 2 COPIAS



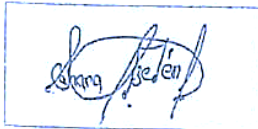
En la ciudad de Guaranda, provincia Bolívar, República del Ecuador, hoy día lunes trece de noviembre de dos mil veintitrés, ante mí DOCTOR HERNÁN RAMIRO CRIOLLO ARCOS, NOTARIO SEGUNDO DE ESTE CANTÓN, comparece la señorita Sahara Belén Veloz Carrasco, por sus propios derechos. La compareciente es de nacionalidad ecuatoriana, mayor de edad, de estado civil soltero, domiciliada en las Calles 10 de agosto y Colón, parroquia Lizarzaburu, cantón Riobamba, provincia de Chimborazo, y de tránsito por este lugar, con celular número: cero nueve siete nueve cero siete uno ocho seis cinco, correo electrónico: belenveloz001@gmail.com, a quien de conocerle doy fe en virtud de haberme exhibido su cédula de ciudadanía en base a la que procedo a obtener su certificado electrónico de datos de identidad ciudadana, del Registro Civil, mismo que agrego a esta escritura como documento habilitante; bien instruida por mí el Notario en el objeto y resultados de esta escritura de Declaración Juramentada que a celebrarla procede, libre y voluntariamente.- En efecto juramentado que fue en legal forma previa las advertencias de la gravedad del juramento, de las penas de perjurio y de la obligación que tiene de decir la verdad con claridad y exactitud, declara lo siguiente: "Que previo a la obtención del Título de Médico Veterinario, de la carrera de Medicina Veterinaria, otorgado por la Universidad Estatal de Bolívar, a través de la Facultad de Ciencias Agropecuarias Recursos Naturales y del Ambiente, manifestó que los criterios e ideas emitidas en el presente Proyecto de Investigación Titulado: "EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DEL ÁRBOL DE TÉ (*Melaleuca alternifolia*) FRENTE TRES GÉNEROS BACTERIANOS AISLADAS DE MASTITIS BOVINA", es de mi exclusiva responsabilidad en calidad de autora, además autorizo a la Universidad Estatal de Bolívar hacer uso de todos los contenidos que me pertenece o parte de los que contiene esta obra, con fines estrictamente académicos o de investigación. Es todo cuanto tengo que decir en honor a la verdad". Hasta aquí la declaración juramentada que junto con los documentos anexos y habilitantes que se incorpora queda elevada a escritura pública con todo el valor legal, y que la compareciente acepta en todas y cada una de sus partes, para la celebración de la presente escritura se observaron los preceptos y requisitos previstos en la Ley Notarial; y, leída que le fue a la compareciente por mí el Notario, se ratifica y firma conmigo en unidad de acto quedando incorporada en el Protocolo de esta Notaría, de todo cuanto DOY FE.


Sahara Belén Veloz Carrasco
C.C. 0604370445


DR. HERNÁN RAMIRO CRIOLLO ARCOS
NOTARIO SEGUNDO DEL CANTÓN GUARANDA



CERTIFICADO DIGITAL DE DATOS DE IDENTIDAD



Número único de identificación: 0604370445

Nombres del ciudadano: VELOZ CARRASCO SAHARA BELEN

Condición del cedulado: CIUDADANO

Lugar de nacimiento: ECUADOR/CHIMBORAZO/RIOBAMBA/VELOZ

Fecha de nacimiento: 30 DE DICIEMBRE DE 1998

Nacionalidad: ECUATORIANA

Sexo: MUJER

Instrucción: SUPERIOR

Profesión: ESTUDIANTE

Estado Civil: SOLTERO

Cónyuge: No Registra

Fecha de Matrimonio: No Registra

Datos del Padre: VELOZ HARO FABIAN ALONSO

Nacionalidad: ECUATORIANA

Datos de la Madre: CARRASCO MOREJON ANGELICA DEL PILAR

Nacionalidad: ECUATORIANA

Fecha de expedición: 28 DE MAYO DE 2018

Condición de donante: SI DONANTE

Información certificada a la fecha: 13 DE NOVIEMBRE DE 2023

Emisor: HERNAN RAMIRO CRIOLLO ARCOS - BOLIVAR-GUARANDA-NT 2 - BOLIVAR - GUARANDA



Nº de certificado: 235-952-42370



235-952-42370

Ing. Carlos Echeverría.

Director General del Registro Civil, Identificación y Cedulación
Documento firmado electrónicamente






REPÚBLICA DEL ECUADOR
 INSTITUTO ECUATORIANO DE REGISTRACIÓN
 REGISTRO CIVIL

Ciudad: VELOZ CARRASCO
 SAHARA BELEN
 UGALDE FLORENTINO
 CHIMBORAZO
 RIOBAMBA
 VELOZ
 FECHA DE NACIMIENTO: 1998-12-30
 NACIONALIDAD: ECUATORIANA
 SEXO: MUJER
 ESTADO CIVIL: SOLTERO

0604370445



GUARANDA
 ESTE AÑO
 VELOZ CARRASCO SAHARA BELEN
 GUARANDA, GUAYACILLO Y RIOBAMBA DE LA PROV.
 RIOBAMBA
 RESOLUCION
 2020-05-23
 E. M. GONZALEZ
 2020-05-23

VELOZ CARRASCO SAHARA
 BELEN
 0604370445

CHIMBORAZO
 RIOBAMBA
 LIZARZABURU
 0604370445




CIUDADANILVO:
 ESTE DOCUMENTO DECLARA QUE US FICHAO
 EN LAS ELECCIONES DEL 15 DE OCT DE 2021

La ciudadanía que altere cualquier documento electoral
 será sancionado de acuerdo a lo que establece el artículo
 375 y el numeral 3 del artículo de la LOEOP - Código de la
 Democracia.


 REPRESENTANTE DE SA JURV



[Handwritten mark]



Factura: 001-002-000040010



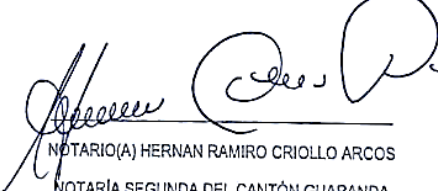
20230201002P01616

NOTARIO(A) HERNAN RAMIRO CRIOLLO ARCOS

NOTARÍA SEGUNDA DEL CANTON GUARANDA

EXTRACTO

Escritura N°:	20230201002P01616						
ACTO O CONTRATO:							
DECLARACIÓN JURAMENTADA PERSONA NATURAL							
FECHA DE OTORGAMIENTO:	13 DE NOVIEMBRE DEL 2023, (11:50)						
OTORGANTES							
OTORGADO POR							
Persona	Nombres/Razón social	Tipo interviniente	Documento de Identidad	No. Identificación	Nacionalidad	Calidad	Persona que le representa
Natural	VELOZ CARRASCO SAHARA BELEN	POR SUS PROPIOS DERECHOS	CÉDULA	0604370445	ECUATORIANA	COMPARECIENTE	
A FAVOR DE							
Persona	Nombres/Razón social	Tipo interviniente	Documento de Identidad	No. Identificación	Nacionalidad	Calidad	Persona que representa
UBICACION							
Provincia	Cantón		Parroquia				
BOLIVAR	GUARANDA		ANGEL POLIVIO CHAVEZ				
DESCRIPCIÓN DOCUMENTO:							
OBJETO/OBSERVACIONES:							
CUANZIA DEL ACTO O CONTRATO:	INDETERMINADA						


NOTARIO(A) HERNAN RAMIRO CRIOLLO ARCOS
NOTARÍA SEGUNDA DEL CANTÓN GUARANDA



Reporte de similitud

NOMBRE DEL TRABAJO

URKUND Tesis SBVCdocx.docx

AUTOR

SAHARA VELOZ

RECuento DE PALABRAS

18196 Words

RECuento DE CARACTERES

99722 Characters

RECuento DE PÁGINAS

78 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

2.1MB

FECHA DE ENTREGA

Nov 8, 2023 11:51 AM GMT-5

FECHA DEL INFORME

Nov 8, 2023 11:53 AM GMT-5

● 10% de similitud general

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

- 4% Base de datos de Internet
- 4% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de Crossref
- Base de datos de contenido publicado de Crossref
- 2% Base de datos de trabajos entregados

● Excluir del Reporte de Similitud

- Fuentes excluidas manualmente



DEDICATORIA

Esto va dedicado para mi mami una mujer trabajadora y orgullosa de su pequeña bebé aunque ya no tan pequeña esto es de las dos porque tú al igual que yo te has quedado noches en vela ayudándome hacer mis maquetas mis deberes aunque a veces ni siquiera entendíamos muy bien de que se trataba juntas buscábamos la forma para mi papá y tíos que con cada meta por más pequeña que sea ustedes la hacen la más asombrosa de todas las noticias, para mí abuelito que se que desde arriba el me manda su bendición y para mí Mauricito que a pesar de todas las cosas siempre a estado al frente conmigo poniendo el pecho a las balas por mi con todo mi amor esto va dedicado para todos ustedes los amo mucho.

SAHARA BELÉN VELOZ CARRASCO

AGRADECIMIENTO

Primero quiero agradecerle a Dios y a la vida por darme la oportunidad de llegar tan lejos porque en el camino me e encontrado con algunos obstáculos pero también con personas que realmente me ayudaron a sobre llevar y poder llegar hasta aquí, a mi mami que siempre a Sido el motor de mi vida apoyándome, cuidándome, guiándome al pendiente de mi, a mi papi que de igual manera me apoyado, a Mauri que siempre está a mi lado inspirándome a ser mejor cada día que hombro a hombro estamos llegando a la meta que tanto soñamos, gracias también al doctor Ramón Riviño por su paciencia y dedicación por esa predisposición de ayudar a sus estudiantes, gracias infinitas a todos.

SAHARA BELÉN VELOZ CARRASCO

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CONTENIDO	PAG.
CAPÍTULO I.....	1
1.1. INTRODUCCIÓN	1
1.2. PROBLEMA.....	2
1.3. OBJETIVOS	3
1.3.1. Objetivo General.....	3
1.3.2. Objetivos Específicos.....	3
1.4. HIPÓTESIS	4
CAPÍTULO II	5
2. MARCO TERORICO.....	5
2.1. Anatomía de la ubre.....	5
2.1.1. Cuartos Mamarios.....	5
2.1.2. Sistema de soporte de la ubre.....	6
2.1.3. Sistema lactogénico.	7
2.1.4. Pezón de la ubre	11
2.1.5. Irrigación sanguínea de la ubre	12
2.1.6. Drenaje linfático de la ubre.....	14
2.1.7. Inervación de la ubre.....	14
2.2. Fisiología de la ubre bovina.....	14
2.2.1. Mamogénesis	14
2.2.2. Lactogénesis.....	15
2.2.3. Como se produce.....	15
2.2.4. Consumo de la leche Bovina.....	15
2.3. La Mastitis.	16

2.3.1.	Clasificación.	17
2.3.2.	Factores determinantes.....	18
2.3.3.	Etología.....	19
2.3.4.	Detección. de la mastitis.	25
2.3.5.	Tratamiento de la mastitis.....	26
2.4.	Árbol de Té (<i>Melaleuca alternifolia</i>).....	27
2.4.3.	Usos del Árbol de Té.	30
2.5.	Obtención del aceite esencial.....	33
2.5.1.	Método de extracción de aceites esenciales.....	33
2.5.2.	Características fisicoquímicas.....	33
CAPÍTULO III.....		34
3.	MARCO METODOLÓGICO.....	34
3.1.	Ubicación y características de la investigación	34
3.1.1.	Localización del experimento	34
3.1.2.	Situación Geográfica y edafoclimática	34
3.1.3.	Zona de vida.....	34
3.2.	Metodología	35
3.2.1.	Material Experimental	35
3.2.2.	Factores en estudio.....	35
3.2.3.	Tratamientos.	36
3.2.4.	Tipo de diseño experimental o estadístico	37
3.2.5.	Manejo del experimento	37
3.2.6.	Métodos de evaluación y datos a tomar.....	41
3.2.7.	Análisis de datos	42

CAPÍTULO IV	43
4.1. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	43
4.1.1. Obtención del aceite esencial.....	43
4.1.2. Rendimiento del aceite esencial del árbol de té.....	44
4.1.3. Análisis de susceptibilidad antimicrobiana del aceite esencial a las concentraciones propuestas frente a <i>Escherichia coli</i> aislada de mastitis bovina.....	44
4.1.4. Análisis de susceptibilidad antimicrobiana del aceite esencial a las concentraciones propuestas frente a <i>Klebsiella</i> spp., aislada de mastitis bovina.....	48
4.1.5. Análisis de susceptibilidad antimicrobiana del aceite esencial a las concentraciones propuestas frente a <i>Staphylococcus aureus</i> aislada de mastitis bovina.	53
4.1.6. Análisis de cromatografía de gases - espectrometría de masa (GC-MS) de los compuestos volátiles presentes en el aceite esencial del árbol de té (<i>Melaluca alternifolia</i>) obtenido por arrastre de vapor.....	58
4.2. COMPROBACIÓN DE HIPÓTESIS	61
CAPÍTULO V	62
5.1. CONCLUSIONES	62
5.2. RECOMENDACIONES.....	63
BIBLIOGRAFÍA	64

ÍNDICE DE TABLA

Nº	Detalle	Pag.
1	Composición química de la leche por 100 gramos.	16
2	Taxonomía del Árbol de Té.	28
3	Distribución del factor A1 x B.	36
4	Características del experimento:	36
5	Análisis de Varianza (ADEVA)	37
6	Escala de sensibilidad de un fitofármaco según Duraffourd et al. (1897).	40
7	Resultados obtenidos del pesaje del material vegetal a destilar y del aceite esencial obtenido mediante destilación por arrastre de vapor.	43
8	Resultados del rendimiento del aceite esencial	44
9.	Análisis de varianza de la actividad antimicrobiana del aceite esencial del árbol de té frente a <i>Escherichia coli</i> aislada de mastitis bovina.	44
10.	Pruebas de Tukey al 5% para la comparación de los promedios de la medida de halos de inhibición obtenidos en el antibiograma a las concentraciones propuestas del aceite esencial del árbol de té frente a <i>Escherichia coli</i> causante de mastitis.	45
11.	Escala de sensibilidad del aceite esencial del árbol de té frente a <i>Escherichia coli</i> mediante la técnica de difusión de disco.	47
12.	Análisis de varianza de la susceptibilidad antimicrobiana del aceite esencial del árbol de té frente a <i>Klebsiella spp.</i> , aislada de mastitis bovina.	48
13.	Pruebas de Tukey al 5% para la comparación de los promedios de la medida de halos de inhibición obtenidos en el antibiograma de las concentraciones propuestas del aceite esencial del árbol de té frente a <i>Klebsiella spp.</i> , aisladas de mastitis bovina.	49
14.	Escala de sensibilidad del aceite esencial del árbol de té frente a <i>Klebsiella spp.</i> , mediante la técnica de difusión de disco.	51

15. Análisis de varianza de la susceptibilidad antimicrobiana del aceite esencial del árbol de té frente a *Staphylococcus aureus* aislado de mastitis bovina.... 53
16. Pruebas de Tukey al 5% para la comparación de los promedios del antibiograma de las concentraciones propuestas del aceite esencial del árbol de té frente a *Staphylococcus aureus* aisladas de mastitis bovina..... 54
17. Escala de sensibilidad del aceite esencial del árbol de té frente a *Staphylococcus aureus* mediante la técnica de difusión de disco. 56
18. Resultados del análisis de cromatografía de gases con espectrometría de masa (GC-MS) de los compuestos volátiles del aceite esencial del árbol de té (*Melaleuca alternifolia*) obtenido por arrastre de vapor..... 59
19. Frecuencias de los rangos encontrados en los análisis de la actividad antimicrobiana del aceite esencial del árbol de té frente a tres géneros bacterianos aislados de mastitis bovina. 61

ÍNDICE DE FIGURAS

Nº	Detalle	Pag.
1.	Anatomía de la glándula mamaria bovina.....	5
2.	El aparato suspensor de la ubre, el que divide la ubre bovina.	7
3.	Alvéolo y conductos del sistema secretor de leche.....	8
4.	Secreción de leche en las células secretoras.	10
5.	Sistema arterioso de la ubre.	13
6.	Sistema venoso de la ubre bovina.	13
7.	Árbol de Té (<i>Melaleuca alternifolia</i>).....	27
8.	Resultados obtenidos del pesaje del material vegetal a destilar y del aceite esencial obtenido mediante destilación por arrastre de vapor.	43
9.	Diagrama de cajas y bigotes de las medidas de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos del antibiograma de las concentraciones propuestas frente a <i>Escherichia coli</i> causante de mastitis.....	46
10.	Porcentaje de sensibilidad de <i>Escherichia coli</i> frente a las diferentes concentraciones del aceite esencial del árbol de té.	48
11.	Diagrama de cajas y bigotes del diámetro de los halos de inhibición obtenidos del antibiograma de las concentraciones propuestas frente a <i>Klebsiella</i> spp., causante de mastitis.....	50
12.	Porcentaje de sensibilidad de <i>Klebsiella</i> frente a las diferentes concentraciones del aceite esencial del árbol de té.	52
13.	Diagrama de cajas y bigotes del diámetro de los halos de inhibición obtenidos del antibiograma de las concentraciones propuestas frente a <i>Staphylococcus aureus</i> causante de mastitis.....	55
14.	Porcentaje de la escala de sensibilidad del <i>Staphylococcus aureus</i> frente a las diferentes concentraciones del aceite esencial del árbol de té.....	57
15.	Cromatograma de los compuestos volátiles obtenidos mediante cromatografía de gases- espectrometría de masa (GC-MS) del aceite	

esencial del árbol de té (<i>Melaluca alternifolia</i>) obtenido mediante destilación por arrastre de vapor.	58
16. Porcentaje de los compuestos volátiles en mayor porcentaje del aceite esencial del árbol de té (<i>Melaleuca alternifolia</i>) obtenido por arrastre de vapor.	60
17. Prueba de Kruskal-Wallis para los resultados de los halos de inhibición en relación con la escala de sensibilidad.	61

ÍNDICE DE ANEXOS

Nº	Detalle
1.	Lugar de la experimentación.....
2.	Informe del análisis cromatográfico.....
3	Base de datos.....
4	Fotografías del trabajo experimental.....
5.	Glosario de términos

RESUMEN

La mastitis bovina es considerada como una de las enfermedades de mayor impacto negativo en la industria lechera a nivel mundial, ya que es considerada como la principal encargada de diseminar bacterias multiresistentes. El objetivo de la presente investigación fue evaluar la efectividad antimicrobiana del aceite esencial del árbol de té (*Melaleuca alternifolia*) frente tres géneros bacterianos aislados de mastitis bovina. Metodológicamente se obtuvo el aceite esencial mediante destilación por arrastre de vapor, la actividad antimicrobiana se evaluó por el método de difusión de disco del aceite esencial a las concentraciones del 75%, 50%, 30%, 20% y 10%, frente a *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., y *Staphylococcus aureus*, los cuales fueron aislados e identificados de investigaciones previamente realizadas, adicionalmente se realizó la identificación de compuestos volátiles mediante cromatografía de gases y espectrometría de masa (GC-MS), utilizando una columna HP5-MS. Como resultado se obtuvo que de un promedio de 154 g de hojas se destiló 3.28 mL de aceite esencial, con un rendimiento del 2.12%, es decir que por cada 100 g de hoja del árbol de té se obtendrá 2.12 mL de aceite esencial, dentro del estudio del antibiograma existió diferencias estadísticas altamente significativas ($p < 0.05$) en las medidas de los halos de inhibición en las concentraciones planteadas, mientras que a nivel de repeticiones no se evidenció diferencias significativas, es decir que los 10 aislados en estudio se comportaron de una manera similar, adicionalmente para inhibir en su totalidad a la población bacteriana de *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., y *Staphylococcus aureus* en estudio se requirió una concentración del aceite esencial del árbol de té al 50%, 20% y 10% respectivamente. Cromatográficamente se evidenció que el L-terpinen-4-ol era el compuesto predominante con un área del 34.02% en relación con los otros compuestos volátiles, a dicho componente se le atribuye la actividad antimicrobiana. Concluyendo que es necesario una concentración mínima del 50% del aceite esencial del árbol de té para inhibir en su totalidad a las bacterias causante de mastitis bovina.

Palabras Claves: Mastitis, Destilación, Antibiograma, Compuestos Volátiles.

SUMMARY

Bovine mastitis is one of the diseases with the greatest negative impact on the dairy industry worldwide since it is considered to be the main cause of the spread of multiresistant bacteria. The objective of this research was to evaluate the antimicrobial effectiveness of tea tree essential oil (*Melaleuca alternifolia*) against three bacterial genera isolated from bovine mastitis. Methodologically, the essential oil was obtained by steam distillation, the antimicrobial activity was evaluated by the disc diffusion method of the essential oil at concentrations of 75%, 50%, 30%, 20% and 10%, against *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp, and *Staphylococcus aureus*, which were isolated and identified from previously conducted research. In addition, the identification of volatile compounds was performed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), using a HP5-MS column. As a result, it was obtained that from an average of 154 g of leaves, 3.28 mL of essential oil was distilled, with a yield of 2.12%, that is, for every 100 g of tea tree leaf, 2.12 mL of essential oil will be obtained, within the antibiogram study there were highly significant statistical differences ($p < 0.05$) in the measurements of the inhibition halos at the concentrations proposed, while at the level of repetitions no significant differences were evidenced, that is to say that the 10 isolates under study behaved in a similar way, in addition to inhibit in their totality the bacterial population of *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp, and *Staphylococcus aureus* in the study required a concentration of tea tree essential oil at 50%, 20% and 10%, respectively. Chromatographically, it was evidenced that L-terpinen-4-ol was the predominant compound with an area of 34.02% in relation to the other volatile compounds, to which the antimicrobial activity is attributed. It was concluded that a minimum concentration of 50% of tea tree essential oil is necessary to completely inhibit the bacteria causing bovine mastitis.

Key words: Mastitis, Distillation, Antibiogram, Volatile Compounds.

CAPÍTULO I

1.1. INTRODUCCIÓN

La producción del ganado lechero está estrechamente relacionada con enfermedades que afectan tanto a los animales como a la comunidad, dentro de estas esta la mastitis bovina, la cual se caracteriza por la inflamación de la ubre generalmente como respuesta a los agentes bacterianos, trayendo como consecuencia descartes, problemas de fertilidad, descenso de la producción, baja de la calidad de la leche y los impactos económicos generados en el tratamiento o curación del animal (Quevedo, 2018).

La mastitis bovina tiene una tasa de infección desde el 20 a 65 % sobre los rebaños, por lo cual durante mucho tiempo los microorganismos han desarrollado un papel protagónico en la situación sanitaria en todo el mundo, debido a que son los causantes de las enfermedades infecciosas que se difunden rápidamente, donde la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud Animal (OIE) se han interesados en el problema de salud pública con relación en el uso indiscriminado de antibacterianos (Padilla, 2020).

Según el informe de la OMS se encuentra 50 antibióticos que actualmente están destinados para el uso en enfermedades infecciosas bacterianas y solo 32 están dirigidos al tratamiento de enfermedades de interés mundial, donde la importancia es el hecho de que únicamente 2 de ellos podrían ser efectivos frente bacterias Gam negativas multirresistente (OMS, 2020). Los antimicrobianos naturales han generado impacto a nivel pecuario en algunas producciones, como en la mastitis bovina. Siendo como una alternativa que brindan soluciones de origen natural ya que contienen moléculas con acción bactericidas y así mismo reducen el uso de químicos para controlar la mastitis (Sayed *et al.*, 2021).

La resistencia a los antimicrobianas actualmente es una de las mayores amenazas para la salud pública mundial, si no se toma medidas se llegará a la “era post antibiótica”, donde ningún antimicrobiano tendría lugar en el tratamiento (Eddie, 2018).

1.2. PROBLEMA.

La resistencia bacteriana es un proceso complejo de adaptación de todos los microorganismos, en donde se desarrollan mecanismos de protección contra agentes potencialmente nocivos y capaz de ser transmitida a otros patógenos a través de dos patrones fundamentales, la transmisión horizontal; donde el traspaso de genes de resistencia ocurre de una bacteria a otra por parte de plásmidos. Y la transmisión vertical; donde los genes son adoptados por generaciones sucesivas. Este último es menos frecuente, supone un mayor riesgo porque las bacterias pueden exhibir genes de resistencia aún en ausencia de exposición a antimicrobianos, la aparición de estos genes está influenciada por el mal uso y abuso de antibióticos, sumando los patrones de resistencia intrínseca de las bacterias (Cárdenas *et al.*, 2018).

El desconocimiento de alternativas de origen natural para el control de enfermedades infecciosas en la industria pecuaria incrementa el uso de sustancias químicas y fármacos que pueden tener efectos secundarios en el desarrollo exitoso de una producción, generando limitaciones tanto a nivel económico como productivo. En el transcurso del tiempo, el crecimiento de la transformación del sector pecuario conlleva a algunas consecuencias negativas de tipo social y ambiental, elevado costos de producción y el comercio afectando directamente al productor no logrando ganar lo que se invirtió inicialmente (Padilla, 2020).

En la producción bovina unos de los principales problemas es la aparición de mastitis y por consiguiente su control y tratamientos, una de las causas más conocidas de esta enfermedad es la presencia de microorganismos bacterianos y como una alternativa terapéutica es la implementación de los aceite esenciales, los cuales cuentan con una composición altamente tecnificada que da la seguridad de cuidar plenamente la salud del animal brindando comodidad y calidad de vida a los animales (Buldain *et al.*, 2020).

Por lo antes mencionado pongo en consideración el tema; Evaluación de la efectividad antimicrobiana del aceite esencial del Árbol de Té (*Melaleuca alternifolia*) frente tres géneros bacterianos aisladas de mastitis bovina (Veloz, 2023).

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. General

Evaluar la efectividad del aceite esencial del árbol de té (*Melaleuca alternifolia*) frente tres géneros bacterianos aisladas de mastitis bovina

1.3.2. Específicos

- Obtener el aceite esencial del Árbol de Té (*Melaleuca alternifolia*) mediante la técnica de arrastre por vapor.
- Estimar el rendimiento del aceite esencial del Árbol de Té (*Melaleuca alternifolia*).
- Reanimar cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. y *Staphylococcus aureus* del cepario del laboratorio general de la facultad.
- Analizar la actividad antimicrobiana del aceite esencial Árbol de Té (*Melaleuca alternifolia*) en los tres géneros bacterianos.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial obtenido.
- Caracterizar cromatográficamente el aceite esencial obtenido.

1.4. HIPÓTESIS

HO: No existe una efectividad antimicrobiana del aceite esencial del árbol de té (*Melaleuca alternifolia*) frente tres géneros bacterianos aislados de mastitis bovina con un halo superior a 8 mm.

HI: Existe una efectividad antimicrobiana del aceite esencial del árbol de té (*Melaleuca alternifolia*) frente tres géneros bacterianos aislados de mastitis bovina con un halo superior a 8 mm.

CAPÍTULO II

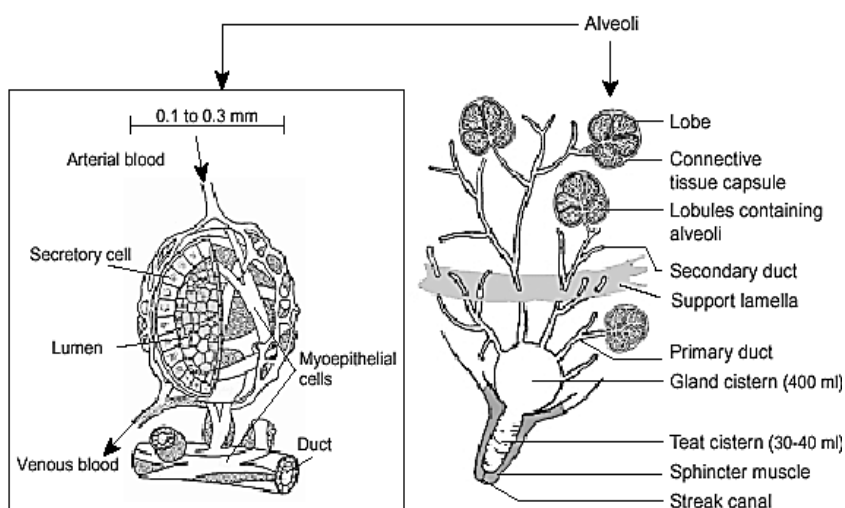
2. MARCO TERORICO.

2.1. Anatomía de la ubre.

En las vacas el sistema mamario está conformado por cuatro glándulas que provienen del tubo dérmico embrionario, por sus características fisiológicas ha sido identificada como una glándula sudorípara modificada, externamente se encuentra recubierta por tegumento con sus estructuras completas, altamente inervada en su porción mas ventral y sus papilas o pezones, en los animales adultos, generalmente en vacas multíparas se ve como un saco que almacena la leche, y se ubica en la región abdomino-inguinal del cuerpo (Acosta *et al.*, 2017).

Figura 1.

Anatomía de la glándula mamaria bovina.



Fuente: Holmes & Wilson, (1989).

2.1.1. Cuartos Mamarios.

Para el entendimiento de la fisiología mamaria es imprescindible saber que la ubre consta de cuatro unidades productivas o glándulas que a su vez son conformadas por un sinnúmero de microestructuras que contribuyen en su conformación, estas glándulas a su vez le confieren a la ubre la disposición anatómica para su estudio, de tal modo, se sabe que la ubre consta de dos cuartos anteriores, y dos cuartos posteriores, distribuidos longitudinalmente en izquierdo y derecho (Filoppo *et al.*, 2021).

2.1.1.1. Posteriores y anteriores.

La ubre bovina esta dividida en cuatro segmentos importantes, en donde las porciones posteriores o glándula mamaria caudal es la porción de la ubre de mayor escala debido a sus métricas y capacidad de producción por mayor asentamiento de tejido lactopoyético y de almacenamiento, tomando en cuenta que el 60% de la leche se produce en esta área anatómica, el 40% restante es producido por la ubre anterior con sus dos glándulas mamarias, los segmentos de la ubre se encuentra divididos por septos que histológicamente se clasifican como tejido conectivo, además de estructuras de soporte como los ligamentos suspensorios medio y sus laminas laterales (Cortes *et al.*, 2021).

2.1.2. Sistema de soporte de la ubre.

Macas, (2019) menciona que la ubre se encuentra posicionada y sostenida anatómicamente por diferentes estructuras histológicamente relacionadas.

- Externamente el tejido tegumentario que protege y da estabilidad
- Internamente las porciones de tejido areolar que delimita el tejido mamario de la pared abdominal.
- Ligamentos suspensorios conformados por tejido conjuntivo fibroso que se origina en el tendón subpélvico y que mantiene a la ubre en suspensión poco variable, ya que sujeta porciones bajas y delanteras del sistema mamario.
- Dos ligamentos suspensorios laterales que ayudan en el soporte de ubre envolviéndola lateralmente, estas estructuras se originan del tendón subpélvico y se insertan en la parte convexa de la ubre.
- Tendón subpélvico, es el encargado de dar origen a las principales estructuras encargadas en la distribución del soporte de la ubre, generalmente los ligamentos suspensorios medios, laterales, superficiales y profundos.

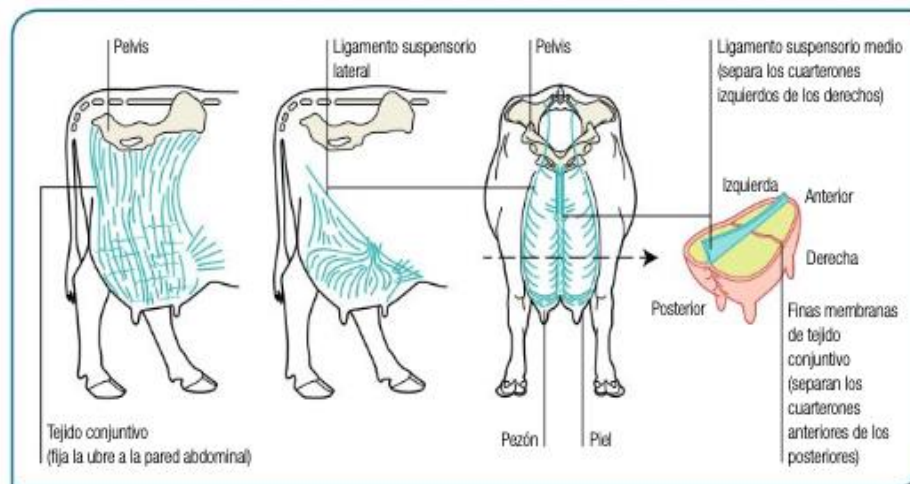
Existen estructuras conformadas por tejido conectivo que se encuentra íntimamente relacionadas con el soporte del sistema mamario, cuya principal función es mantener a la ubre en su posición anatómica normal, la cual es cerca de la pared abdominal (Rojas *et al.*, 2022). Los tejidos involucrados que se vinculan en el soporte de la ubre son el ligamento suspensorio medio y el ligamento suspensorio lateral;

La composición histológica de los ligamentos suspensorios de la ubre es comprendida de tejido elástico, el que desempeña la función de fijar la ubre al cuerpo de la vaca, desde una vista posterior se observa el ligamento medio, el cual forma un surco medial y es el principal protagonista encargado de fijar la ubre en la pared abdominal. El soporte en las partes laterales de la ubre es determinado por los ligamentos laterales los cuales se originan a partir del tendón sub-pélvico (Restrepo *et al.*, 2020).

El sistema mamario es determinado por un sinnúmero de unidades funcionales que cumplen la función de un órgano morfológicamente y funcionalmente diferenciado el cual puede llegar a pesar unos 50kg en función del estado fisiológico de la vaca (Martínez, 2017).

Figura 2.

El aparato suspensor de la ubre, el que divide la ubre bovina.



Fuente: (Chanaluisa, 2019)

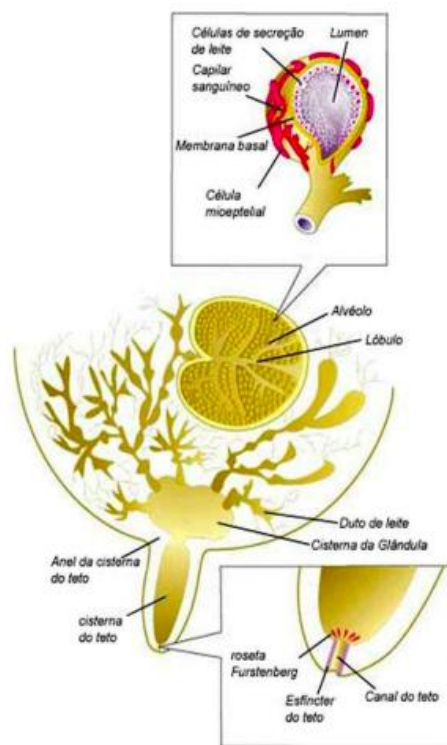
2.1.3. Sistema lactogénico.

El sistema de la lactogénesis se refiere básicamente a la capacidad de síntesis de la leche originada por las células epiteliales a partir de componentes sanguíneos, su disposición conjunta forma los alvéolos mamarios (Carbellin, 2000). El conjunto de alvéolos forma el lóbulo, los cuales almacenan entre un 60 a 80 % de la leche producida, adicionalmente, el 20 a 40% restante permanece en las cisternas mamarias antes del ordeño o vaciado de la ubre (Cortes *et al.*, 2021).

En el parénquima mamario existen células especializadas las cuales son conocidas como la unidad morfológica funcional del sistema mamario, este parénquima es conformado por un sinnúmero de septos que se encuentran en el interior de los lóbulos los cuales los dividen entre ellos (Aguirre, 2013). un grupo de aproximado de 150 a 200 alvéolos dispuestos en racimos forman el lóbulo mamario (Garzón, 2019).

Figura 3.

Alvéolo y conductos del sistema secretor de leche.



Fuente: Fonseca, (2017).

2.1.3.1. Proceso de lactopoyesis.

La leche es producida por las células epiteliales o secretoras la cuales la originan la secreción a partir de componentes sanguíneos ya que las células epiteliales se encuentran en íntima relación con vasos sanguíneos adyacentes, alrededor de las células epiteliales existe disposición de capas de células mioepiteliales, las cuales tienen capacidad contráctil que reaccionan ante estímulos hormonales generados principalmente por la prolactina. (Fonseca, 2017).

Las células epiteliales poseen determinadas rutas metabólicas para la producción de sólidos lácteos, un claro ejemplo es la utilización de la glucosa como fuente de energía para la producción de ATP, la edificación de galactosa y lactosa y como fuente de glicerol como precursor del componente graso de la leche (Schultz *et al.*, 2017).

- **Síntesis de lactosa:** A nivel de la glándula mamaria el carbohidrato principal producido en la leche es la lactosa la cual se encuentra bajo regulación enzimática, en donde participan dos unidades preformadas, principalmente la lactosa sintetasa, y la subunidad lactoalbúmina la cual es una proteína sérica de origen hepático.

La cantidad de leche producida es directamente proporcional a la cantidad de lactosa que puedan sintetizar las células epiteliales a nivel glandular, por la presión osmótica presente en la primera secreción láctea intra-alveolar esta tiene la capacidad de atraer otras moléculas entre ellas demás solutos y agua, por lo tanto, la lactosa es el principal involucrado en la cantidad y dilución de la leche y la composición relacionada a los demás solutos que la caracterizan. (Abera *et al.*, 2018).

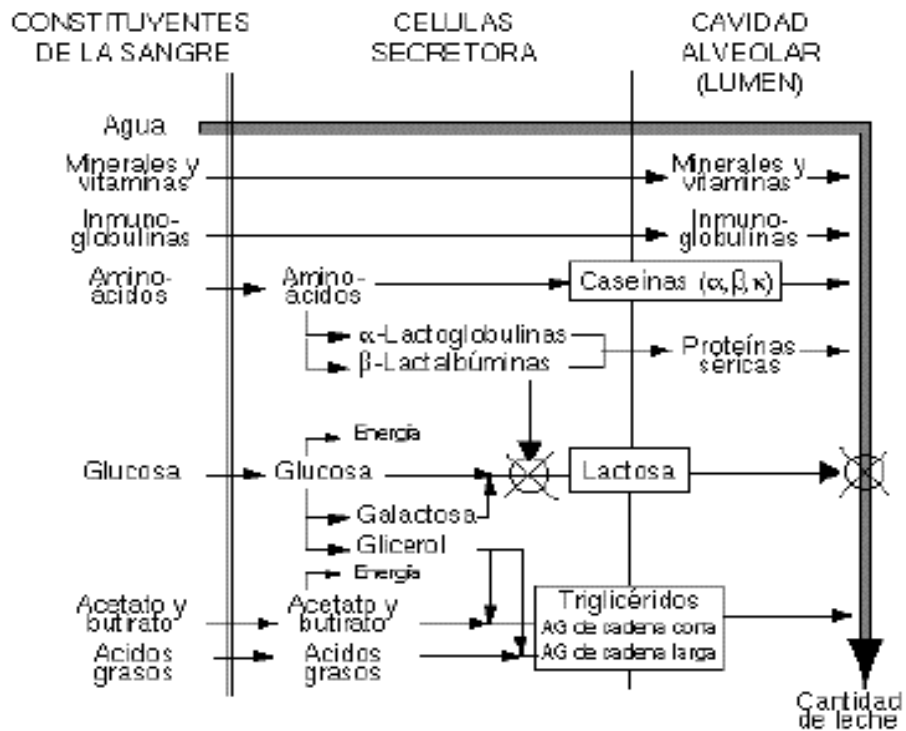
Nutricionalmente se puede manejar de manera más eficiente dicha producción ya que la ración dietética posee la capacidad de incrementar el volumen de leche producido debido a que:

- El propionato producido a nivel ruminal en dietas ricas en alimentos concentrados con alto contenido de almidón altamente digerible es el punto de partida para la producción de energía que es aprovechado por las células epiteliales de la glándula mamaria.
- La energía en forma de ATP y la glucosa producida por el hígado, son los precursores para dar origen a la formación y producción de lactosa a nivel de la glándula mamaria.
- La lactosa producida es proporcional al volumen de leche y la concentración de demás solutos disueltos en la leche.

- Las fuentes energéticas en dietas balanceadas correctamente incentivan el consumo de materia seca e incrementan la cantidad de sólidos lácteos presentes en la leche

Figura 4.

Secreción de leche en las células secretoras.



Fuente: Agrobot, (2022).

- **Síntesis de proteína:** El principal sólido de carácter proteico son las caseínas lácteas, las cuales son producidas a nivel de las células epiteliales y son producto de la reorganización y utilización de aminoácidos y ciertos productos nitrogenados, así como metabolitos proteicos producidos por el hígado (Sghaiet *et al.*, 2019).
- **Síntesis de grasa:** de la degradación ruminal de la dieta de una vaca lechera se obtiene el acetato y butirato, los cuales son precursores de los ácidos grasos de cadena corta que se encuentran como principales representantes grasos en la leche, en dietas con carencias de fibra físicamente efectiva la presencia de estos AGV es

limitada, por lo tanto, el contenido de grasa en la leche también se ve limitado (Chung *et al.*, 2021).

2.1.4. Pezón de la ubre.

El pezón o también teta se encuentra conformado por un canal principal con estructuras especializadas en la salida de la leche desde el ambiente intramamario, una de las principales es la roseta de Fürstenberg, el cual le confiere protección a dicho canal, su función se basa en la secreción de sustancias antibacterianas de consistencia muy viscosa, que cuando no hay un flujo de leche esta secreción se concretiona sellando dicha salida (Chen *et al.*, 2018).

La conformación de estas estructuras es muy variable, ya que en dependencia de ciertos factores como; la raza su longitud puede variar de entre 7 a 15 cm. Esta estructura posee fibras musculares de características lisas de distribución longitudinal y fibras musculares circulares alrededor del esfínter (Bianchi *et al.*, 2019). Al igual que la piel del cuerpo, la piel de pezón es la principal barrera física de protección del mismo, y se encuentra constituida por epidermis, dermis, capa muscular y endotelio vascular.

- La *epidermis*: es la capa superficial más expuesta o próxima al ambiente, generalmente esta compuesta por células queratinizadas vivas y muertas (Manrique *et al.*, 2019).
- La *dermis*: es la capa de la piel subyacente a la epidermis, es decir la segunda capa que conforma la piel, en esta se encuentra distribuido el endotelio vascular rico en vasos arteriales y venosos y distribución nerviosa, los cuales finalizan en la epidermis.
- Los *músculos*: su disposición se encuentra configurada en diversas formas encontrando formas longitudinales, oblicuas y trasversas, en dependencia del estrato o profundidad que se encuentre.
- El *endotelio*: es la porción de aglomerados celulares que conforman y recubren los vasos sanguíneos arteriales y venosos, estos son los encargados del transporte y evacuación de sustancias bioquímicas y células hacia el pezón (Mbindyo *et al.*, 2020).

En el ambiente intramamarios las porciones donde se almacena la leche previa a su salida se conocen como cisternas, éstas se encuentran recubierta por una porción doble de epitelio estratificado cúbico (Guo *et al.*, 2021).

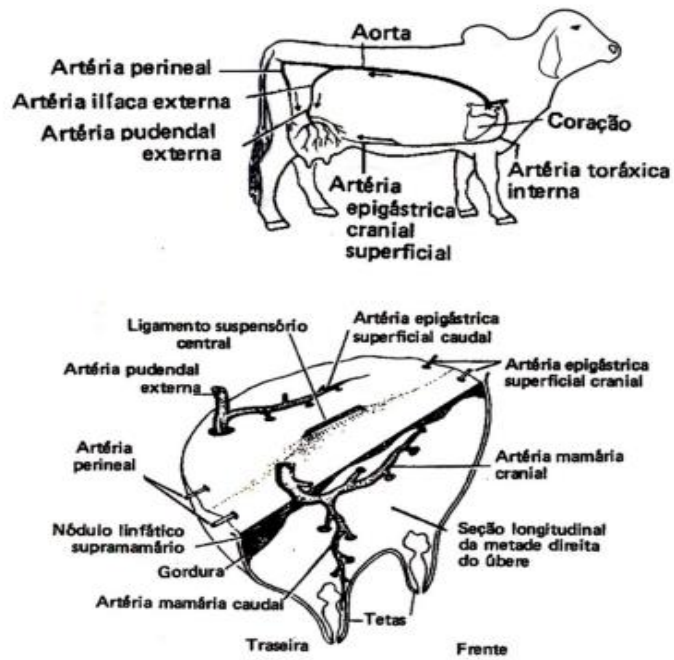
2.1.5. Irrigación sanguínea de la ubre.

El flujo sanguíneo del sistema mamario, es indispensable para la formación de la secreción láctea, este se encuentra directamente relacionado con la leche cantidad de leche que se produce, ya que para la formación de un litro de leche por la ubre debe pasar un aproximado de 400 a 500 litros de sangre arterial, su configuración está dada por vasos sanguíneos principales y de gran calibre como las arterias ilíacas externas y pudendas externas con sus homólogos derechas e izquierda, las cuales provienen de la arterias aorta abdominal, estos grandes vasos sanguíneos llegan a la ubre a través del canal inguinal, de donde se bifurcan formando las arterias mamarias anterior o craneal y posterior o caudal, para terminar subdividiéndose de manera más profunda en arteriolas alveolares (Chanaluiza, 2019).

Adicionalmente la arteria perineal, la misma que irriga gran parte de los cuartos posteriores de la ubre proviene de una rama de la arteria aorta dorsal, sin embargo, gran parte de los cuartos anteriores son irrigados por la arteria epigástrica superficial craneal la misma que es una subdivisión de la arteria torácica interna (Dalanezi *et al.*, 2020). El retorno de la sangre venosa se realiza de manera conjunta o paralela a las estructuras arteriales aferentes, dicho retorno venoso termina en dos venas de gran calibre, las cuales son la pudenda externa, la cual desemboca en la vena ilíaca externa y consecuentemente en la vena cava caudal, la misma que termina en la aurícula derecha del corazón del animal, por otra parte la vena subcutánea abdominal (vena mamaria la misma que se observa en la parte ventral de la pared abdominal) la cual es la epigástrica superficial caudal que conecta con la vena epigástrica superficial craneal terminan su vaciado en la vena torácica interna, y por ende en la vena cava craneal (Carbellin, 2000; Amer *et al.*, 2018).

Figura 5.

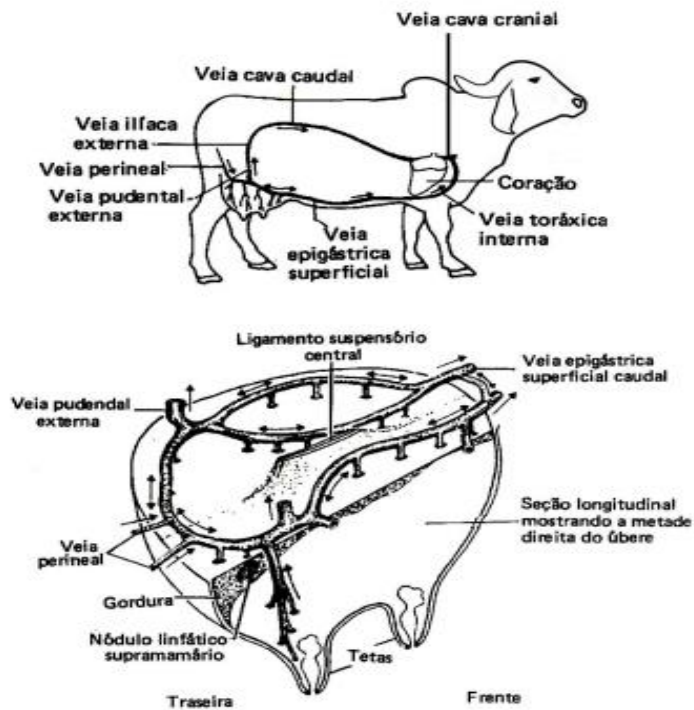
Sistema arterioso de la ubre.



Fuente: Aguilar & Alvares, Mastitis bovina (2019).

Figura 6.

Sistema venoso de la ubre bovina.



Fuente: Aguilar & Alvares, Mastitis bovina (2019).

2.1.6. Drenaje linfático de la ubre.

El drenaje linfático de la glándula mamaria está determinado por la función de los vasos linfáticos de menor calibre que se encuentra predispuestos en la cuenca del tejido glandular mamario, estos se anastomosan en un vaso linfático de gran calibre el mismo que drena la linfa y células inmunitarias hacia los nódulos linfáticos retromamarios (Ewida *et al.*, 2020).

2.1.7. Inervación de la ubre.

La inervación de la ubre esta determinada por axones y fibras aferentes simpáticas, ya que la ubre y por ende el pezón no poseen inervación parasimpática, las fibras aferentes mencionadas tienen su origen de los nervios espinales lumbares y perineales, la inervación de la ubre y la teta son fundamentales en la trasmisión de impulsos y estímulos para la activación neuroendocrina de la baja de la leche (Bhakat *et al.*, 2020).

2.2. Fisiología de la ubre bovina.

La fisiología de la ubre bovina inicia juntamente con la pubertad, estos cambios morfofisiológicos están regulados y determinados por una compleja interacción endócrina y metabólica, las cuales propician la adaptabilidad de la hembra bovina para convertirse en madre, ya que estas interacción son el punto de partida en el inicio, mantenimiento y finalización de la lactancia (Martins *et al.*, 2020).

2.2.1. Mamogénesis

Durante el desarrollo fetal inicia una serie de agrupación y diferenciación celular de la glándula mamaria la misma que se termina de desarrollar en la pubertad cuando la novilla se convierte en vaca después del parto, en donde ocurre el crecimiento isométrico y alométrico, los cuales son determinados por cuatro fases (Sharun *et al.*, 2021).

La fase isométrica ocurre en las hembras jóvenes y el crecimiento de la ubre se da de manera paralela con el crecimiento y desarrollo de los demás tejidos corporales. La fase alométrica es diferenciada debido a que el crecimiento de la ubre ocurre de manera exponencial y más rápida en comparación al crecimiento y desarrollo del resto del tejido corporal, está se encuentra bajo control ovario-neuroendocrino, en

donde los picos de hormonas reproductivas se ven directamente vinculados (Sharun *et al.*, 2021).

Iniciando la pubertad, es decir cuando empieza la función ovárica y la producción pulsátil de hormona en relación con el ciclo estral, se observa el inicio de la mamogénesis, tanto así que hormonas como el estrógeno influye en el crecimiento y desarrollo de los conductos galactóforos y la progesterona en la configuración celular del sistema lóbulo-alveolar, incluyendo hormonas hipofisarias GH, prolactina que influyen en la fisiología de la glándula mamaria (Aréchiga *et al.*, 2019).

2.2.2. Lactogénesis.

Es una secuencia de acontecimientos de especialización celular que cursan las células epiteliales mamarias para iniciar con los procesos fisiológicos de tomar componentes sanguíneos y conformarlos en leche (Ranasinghe *et al.*, 2021).

2.2.3. Como se produce.

Es un proceso fisiológico en donde células diferenciadas poseen la capacidad para producir leche, estas células son conocidas como células epiteliales alveolares, las cuales tienen modificaciones orgánicas y citoplasmáticas, ya que, a diferencia de una célula somática no especializada, estas células epiteliales poseen un retículo endoplásmico mucho más desarrollado y con un mayor número de ribosomas, los cuales propician un catabolismo más eficiente (Palii *et al.*, 2020).

2.2.4. Consumo de la leche Bovina.

La leche es considerada como una de las principales proteínas de origen animal destinadas al consumo alimenticio de los humanos, en teoría la leche es la secreción materna destinada para la alimentación y supervivencia de los neonatos en las primeras etapas de vida, históricamente se asume que el ser humano empezó el consumo de leche hace aproximadamente unos 9000 años A. C. (Zhu *et al.*, 2021).

Nutricionalmente la leche de vaca es rica en componentes proteícos, componentes energéticos, grasa, sólidos electrolíticos como el sodio y determinados macrominerales como el calcio y fósforo, las proporciones de cada uno de estos

elementos la convierte en un potencial sustituto de leche materna humana para la alimentación de niños y jóvenes (Wang *et al.*, 2020; Nobrega *et al.*, 2020).

Tabla 1.

Composición química de la leche por 100 gramos.

Componente	Leche entera
Energía (Kcal)	61
Agua (g)	88
Proteína (g)	3.2
Grasa (g)	3.3
Grasa saturada (g)	1.9
Colesterol (mg)	10
Sodio (mg)	43
Carbohidratos (g)	4.8
Vitaminas	B12, Riboflavina, Vitamina A, Niacina, Vitamina B6
Minerales	Ca, Zn, P, Mg.

Fuente: Shaheen *et al.*, (2020); Aguilar *et al.*, Mastitis bovina (2019).

2.3. La Mastitis.

La mastitis es una patología caracterizada por cursar eventos inflamatorios del tejido secretor de la ubre que ocasiona cambios físicos y composicionales de la leche, esta patología se ve influenciada por la interacción de células inmunitarias (células somáticas) y microorganismos patógenos infecciosos, estos últimos en dependencia de sus factores de virulencia son los responsables de ocasionar importantes eventos citotóxicos del parénquima glandular lo que se traduce en una disfuncionalidad de las células secretoras y un aumento de componentes indeseables en la leche lo que ocasiona mermas en la producción lechera tanto en cantidad como en calidad (Pirola, 2017).

Las alteraciones organolépticas de la leche son percibidas debido a que existe una disminución en el contenido de lactosa, grasa y degradación de la caseína, así como un aumento de cloruros, elevación del pH y sodio (Ruiz *et al.*, 2016).

El evidente proceso inflamatorio, cuadros crónicos es determinado por los signos inflamatorios evidentes de la patología, como dolor a la palpación, eritema, tumor y calor, en dependencia de la severidad del cuadro y de la etología involucrada se puede observar signos más sistémicos como fiebre, decaimiento, anorexia, deshidratación, shock y muerte (Jun Du *et al.*, 2018).

2.3.1. Clasificación.

Cuando se establece un cuadro mastítico este se puede clasificar en dependencia de las alteraciones clínica ocurridas a nivel intramamario y de las alteraciones anatómicas observadas a nivel de la ubre. El punto inicial que desencadena está patología es la colonización bacteriana, la misma que propicia el aumento en el número de leucocitos especialmente de polimorfonucleares como mecanismo de defensa a dicha colonización, con este antecedente la clasificación se determina como clínica y subclínica (Aguilar *et al.*, 2019).

La mastitis puede clasificarse en referencia al tiempo desde que se observaron los primeros signos inflamatorios, en aguda, subaguda, crónica e hipercrónica, esto con la finalidad de orientar el plan terapéutico que se utilizará en el animal en función del cuadro mastítico presente (Aguilar *et al.*, 2019).

2.3.1.1. Clínica.

Esta patología para poder ser diagnosticada en primeras instancias se utiliza la exploración física, este método semiológico permite evaluar las condiciones normofisiológicas de la ubre, determinando que cuando las alteraciones anatómicas de la ubre características de un proceso inflamatorio son evidentes, se traduce en la caracterización de una mastitis clínica, en donde es fácilmente observable alteraciones físicas de la leche como la presencia de grumos o dilución, cambios de coloración, sabor y aspectos no deseables (Hoque *et al.*, 2022).

2.3.1.2. Subclínica.

La mastitis subclínica no es a simple vista observable, sin embargo, mediante la aplicación de métodos diagnósticos, esta puede ser medida. En donde el conteo de células somáticas es el punto directriz para su consideración, esta elevación en dicho conteo celular es determinado por la interacción que existe en los procesos

iniciales de colonización bacteriana y los mecanismos de defensa inmunológicos mediados por células inmunológicas, si dicha interacción no es controlada por los mecanismos de defensa inmunológicos aumenta el riesgo de su evolución a una mastitis clínica (Mushtaq *et al.*, 2018).

Esta presentación de la mastitis inicialmente se puede apreciar por una disminución apenas perceptible de la cantidad de la leche producida lo que ocasiona pérdidas en la producción y limitaciones en el comercio, ya que la leche se encuentra con altos recuentos de células somáticas y bacteriana (Vyas *et al.*, 2019).

2.3.2. Factores determinantes.

2.3.2.1. Factores ambientales, genéticos y bienestar animal.

El medio donde se desarrolla la actividad lechera no se puede considerar como un parámetro influyente de manera individual, ya que se encuentra conformado por diversos factores, los mismos que pueden ser de carácter físico, de manejo y comportamentales del animal (Bochniarz *et al.*, 2020).

Tomando en cuenta que dentro de los factores ambientales, estos deben cumplir con los requerimientos necesarios para proporcionar bienestar al tipo de animal en producción, ya que ciertos tipos de animales son más exigentes en la temperatura ambiental y a la altitud geográfica, estos antecedentes citados pueden influir negativamente en el desempeño productivo, debido que pueden afectar los índices productivos y reproductivos, tomando como ejemplo la enfermedad de brisket que es recurrente en animales de pisos altitudinales elevados o el estrés calórico en animales que producen leche en zonas subtropicales, estos factores pueden ser desencadenantes de mastitis (Bochniarz *et al.*, 2020; Chuang *et al.*, 2021).

Se considera como factores influyentes en la aparición de cuadros mastíticos un elevado mérito de producción lechera y una inadecuada nutrición animal, debido a la alta capacidad de producción la ubre tiende a ser más expuesta a contraer una infección o sufrir un proceso traumático que eleva las probabilidades de presentar mastitis por lesiones, así mismo el estado subnutricional puede influir negativamente en el desarrollo de los mecanismos de protección de la glándula mamaria (Prapaiwong *et al.*, 2021).

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) estipula que para un animal se considere que posee bienestar deben realizarse correctos procedimientos de crianza, reproducción y manejo a nivel de las unidades productivas, manteniendo libre de enfermedades, hambre, sed, estrés y maltrato, con el objetivo de producir leche de buena calidad desde el punto de vista ético (Ebrahimie *et al.*, 2018; Kalińska *et al.*, 2018).

Otro factor clave para el establecimiento de un cuadro mastítico es el control sanitario, ya que es indispensable tener claro los puntos críticos que puedan desencadenar la patología dentro de una unidad productiva, pudiendo así minimizar la aparición de vacas con mastitis en una explotación y por ende disminuir los índices de morbilidad y descarte (Kalińska *et al.*, 2018; Bhakat *et al.*, 2020).

2.3.2.2. Factores Fisiológicos.

Son considerados factores arraigados al animal, los cuales se consideran predisponentes en la presentación de la patología, uno de los principales es la edad, ya que se ha observado que vacas longevas con un gran número de partos presentan tendencia a la queratinización y granulación del esfínter del pezón y conductos galactóforos ocasionando que queden abiertos y que aumente el riesgo de provocar un cuadro mastítico (Barbosa *et al.*, 2020).

2.3.3. Etología.

Existe una gama sumamente amplia de microorganismos que pueden considerarse patógenos para la glándula mamaria, los mismos que pueden ocasionar una infección del tejido glandular, hasta el momento se conoce que cerca de 300 géneros bacterianos pueden causar mastitis, desde el punto de vista productivo y en dependencia de la fuente de donde provenga el microorganismo estos pueden clasificarse como contagiosos o ambientales (Rojas *et al.*, 2022).

2.3.3.1. Mastitis contagiosa

Este tipo de mastitis es aquella en donde la transmisión de microorganismos de una vaca enferma a una susceptible es el factor determinante, considerando que la ubre y el pezón son los lugares reservorios de las bacterias patógenas que ocasionan el cuadro mastítico, la transmisión se puede dar a través de vectores mecánicos como

las pezoneras, las manos de los ordeñadores, esponjas y toallas de secado o paños de limpieza, una característica de este tipo de mastitis es que es causada por patógenos infecciosos persistentes que pueden cronificar la presentación clínica de la enfermedad (Macas, 2019).

Dentro de este abanico de microorganismos patógenos se encuentra al *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* y *Mycoplasmas spp.*, dentro de sus factores de virulencia comporten la característica de poseer propiedades adhesivas y formación de biopelículas que le permiten persistir en el tiempo (Macas, 2019).

2.3.3.1.1. *Staphylococcus aureus*.

Es una bacteria Gram-positiva cuya morfología es determinada por su apariencia de coco son anaerobios facultativos y tiende a formar agrupaciones en forma de racimos de uvas, generalmente en agar sangre producen beta-hemólisis, su reacción a la catalasa es positiva, igual que en la prueba de coagulasa, es considerado un microorganismo contagioso causante de mastitis bovina que ocasiona cuadros hiperagudos, agudo y crónicos, sin embargo se observa la mayor prevalencia en presentaciones subclínicas (Asadpour *et al.*, 2021).

Este microorganismo posee un sin número de factores de virulencia que los hacen altamente invasivos, esto debido a la hialuronidasa, la misma que le permite adherirse al parénquima mamario y lo hace resistente a la fagocitosis, esta resistencia es debido a una proteína A que está presente en su superficie, si en un caso este patógeno llega a ser fagocitado no se produce una lisis de la pared celular, debido a que produce ácido teicurónico, que le permite vivir dentro de los fagocitos y formar aglomeraciones purulentas (Kalińska *et al.*, 2018).

La incidencia de este microorganismo se encuentra asociado a factores relacionados con un mal manejo higiénico de las instalaciones y un deficiente protocolo de limpieza, desinfección y sellado de los pezones antes y después del ordeño, sumado a esto se debe considerar la resistencia a los antibióticos que posee de manera intrínseca este microorganismo (Duque *et al.*, 2021).

Siempre que se diagnostique una mastitis ocasionada por *Staphylococcus aureus* es necesario realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobianas, para poder orientar el tratamiento específico, dicho tratamiento debe ser aplicado por un tiempo

mínimo de 7 días y un máximos de 10 días, uno de los principales antibióticos utilizados es la oxitetraciclina en infusión intramamaria, ya que por sus propiedades lipofílicas, este se distribuye de una manera eficiente en el tejido mamario, sin embargo, existen opciones como las cefalosporinas de última generación y macrólidos para el tratamientos de mastitis causada por *Staphylococcus aureus* (Zaatout *et al.*, 2019; Bochniarz *et al.*, 2018).

2.3.3.1.2. *Staphylococcus Coagulasa Negativo (SCN).*

Este es un género que conforma un grupo muy amplio de microorganismos, los cuales también pueden causar mastitis e infecciones intramamaria, dentro de este grupo se incluyen especies como el *Staphylococcus chromogenes*, *S. haemolyticus*, *S. epidermis*, etc., (Kim *et al.*, 2019). Al igual que el anterior mencionado estos son altamente contagiosos (Ashraf *et al.*, 2018).

2.3.3.1.3. *Corynebacterium bovis*

Este microorganismos Gram-positivos en forma de bastón o bacilo se caracteriza por ser anaerobio facultativo no forma esporas y son inmóviles, es un microorganismos específico de las mastitis, es altamente prevalente en cuadro subclínicos, el tratamientos de las mastitis ocasionadas por este patógeno generalmente es a base de penicilinas, cefalosporinas, quinolonas, anfenicoles, tetraciclinas entre otros, como medida preventiva se recomienda realizar una correcta rutina de ordeño y un manejo eficiente de la higiene en los lugares de ordeño (Becker *et al.*, 2018; Stella *et al.*, 2019).

2.3.3.1.4. *Streptococcus agalactiae*

Este es un microorganismo en forma de coco Gram-positivo, del grupo B, es anaerobio facultativo, el cual puede identificarse debida a la beta-hemólisis que produce en agar sangre y al resultado negativo en la prueba de catalasa, su configuración es formas de cadenas cortas y cuando causa una infección intramamaria tiene la capacidad de bloquear los conductos galactóforos ocasionando ausencia de producción láctea (Raabe *et al.*, 2019).

En los reportes terapéuticos se mencionan que la resistencia antimicrobiana por parte de *Streptococcus agalactiae* es limitada ya que presenta sensibilidad a las penicilinas (Furfaro *et al.*, 2018; González *et al.*, 2019).

2.3.3.1.5. *Streptococcus dysgalactiae*

El *Streptococcus dysgalactiae* ocasiona mastitis contagiosas, este es una bacterias Gram-positivas en forma de cocos, los cuales se organizan en cadenas cortas, son anaerobios facultativos, los cuales se observan como negativos en la prueba de catalasa y la hemolisis puede ser variable, ya que algunas cepas se observan como betahemolíticos y otras como alfa hemolíticos, su incidencia es mucho más alta cuando la integridad de la piel del pezón se observa comprometida por lesiones o abrasiones debido a la manipulación incorrecta, excesiva presión en el ordeño, lesiones por enfermedades infecciosas o picaduras de insectos (Baraco, 2019).

Este microorganismo presenta susceptibilidad a la amoxicilina, penicilina y eritromicina, los cuales son la principal opción en el tratamiento en las mastitis ocasionadas por estas bacterias (Fessia *et al.*, 2022; Käppeli *et al.*, 2019).

2.3.3.2. Mastitis Ambiental

Es aquella mastitis que es ocasionada por microorganismos que se encuentran en el ambiente, generalmente se consideran como patógenos contaminantes ya que estos se encuentran en donde existe gran cantidad de materia orgánica, generalmente ocasiona mastitis cuando existe deficiente higiene (Vezina *et al.*, 2021).

Los nichos ambientales en donde se encuentran en gran numero generalmente son las heces, el suelo, aguas residuales, etc. Rutinariamente estos microorganismos no representan un riesgo biológico para el ganado lechero ya que las condiciones de resistencia inmunológica del organismo de la vaca en la mayoría de los casos suelen ser suficientes para controlar y eliminar posibles infecciones (Collado *et al.*, 2018).

Para que se desarrolle un proceso infeccioso debe presidir una serie de acontecimientos, en donde el tiempo que se mantienen en contacto la materia orgánica con los pezones es un factor crítico, así mismo influye la inmunocompetencia de la vaca, ya que la prevalencia de estos tipos de mastitis suele ser mayor en aquellos periodos donde la vaca atraviesa episodios de compromiso

inmunitario. Las principales bacterias involucradas en este tipo de mastitis son los coliformes (bacilos Gram negativos que fermentan lactosa que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae) o también conocidos como enterobacterias (Harjanti *et al.*, 2019).

Los géneros de aislamientos más comunes son los llamados coliformes (*Escherichia coli* y *Klebsiella spp*), *Streptococcus uberis* y entre otras bacterias algas como *Prototheca zopfii* y levaduras (Benić *et al.*, 2018).

2.3.3.2.1. *Streptococcus uberis*

Es una bacteria Gram-positiva en forma de coco el cual se organiza en forma de cadenas cortas, se identifica como catalasa negativos y no es betahemolítico, no forma esporas y se considera de características ambientales, ya que se encuentra en gran medida en materias orgánica netamente degradable, afecta principalmente a los animales expuestos a un manejo inadecuado de la rutina de ordeño y una deficiente higiene del establo, su incidencia aumenta cuando existe transgresión del canal del pezón, una vez se establecido la infección por este microorganismos este se puede volver altamente contagioso (Wente *et al.*, 2019).

2.3.3.2.2. *Bacillus spp.*

Son un grupo de microorganismos bacterianos que se encuentra disperso en muchos extractos ambientales como el suelo, estiércol, vegetación degradada, etc. (Minqiu *et al.*, 2022). Su morfología es característica de en forma de bastón la mayoría de ellos son aerobios facultativos, catalasa positivos, algunas especies de *Bacillus* esta relacionados en la presentación de mastitis gangrenosas, mientras que otros solo pueden causar presentaciones subclínicas de la enfermedad, las especies más comunes de *Bacillus* causantes de mastitis bovina son: *B. cereus*, *B. licheniformis*, etc. (Xiaoyu *et al.*, 2021).

La mayoría de estos microorganismos son susceptibles a los antimicrobianos de amplio espectro, sin embargo, se debe tener en cuenta que algunas especies poseen la capacidad de formar esporas el cual es un factor de virulencia responsable de ocasionar cuadros mastítico, debido a su resistencia a los agentes químicos, farmacológicos, y ambienteles (Tytukh *et al.*, 2021).

2.3.3.2.3. *Escherichia coli*

Esta enterobacteria es la más común asociada en cuadros mastítico ambientales, es una bacteria Gram-negativas, anaerobia facultativa, su forma es bacilar y no posee la capacidad de formar esporas, generalmente se aisladas en aquellas unidades productivas donde el manejo sanitario es nulo o deficiente, las mastitis cuya etiología esta asociada a esta bacteria cada vez se considera importante en las unidades productivas a tal punto que se a logrado identificar que este agente es el de mayor incidencia en el periparto y durante la lactancia temprana (Liabin *et al.*, 2019; Javadmanesh *et al.*, 2018).

Los factores de virulencia de este microorganismo generalmente determinan la severidad del cuadro patológico ya que este microorganismo posee una alta patogenicidad la cual es determinada por las endotoxinas que produce y los lipopolisacáridos (LSP) que son liberados por la bacteria, induce varios niveles de respuesta inflamatoria, llegando inclusive signos de alteraciones sistémicas que pueden provocar shock y muerte del animal (Sharifi *et al.*, 2022).

2.3.3.2.4. *Klebsiella spp.*

La *Klebsiella* es otro microorganismo bacteriano Gramnegativo inmóvil, oxidasa negativo en forma bacilar, se encuentra vinculado con la aparición de cuadros mastítico en el ganado lechero, generalmente por presentaciones de casos clínicos (Gorden *et al.*, 2018).

Es uno de los principales microorganismos causantes de cuadros severos de mastitis, las principales especies son: *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, las mismas que suelen ser resistente a la terapéutica con betalactámicos, ya que producen betalactamasas (Massé *et al.*, 2020).

2.3.3.2.5. *Pseudomona aeruginosa*

Pseudomona aeruginosa es un microorganismo bacteriano Gram-negativo anaerobio facultativo, el cual expresa positividad en la utilización del citrato oxidasa y catalasa, el reservorio de mayor asociación de este microorganismos son las aguas residuales y estancadas que se utilizan en el lavado de ubres y pezones.

Las *Pseudomonas* generalmente resisten al mecanismo de acción de la mayoría de los desinfectantes comunes (Schauer *et al.*, 2021; Rivera *et al.*, 2020).

2.3.3.2.6. *Prototheca spp.*

Prototheca sp son algas microorganismos unicelulares con características vegetales, se encuentran proliferando en gran número en lugares con alta concentración de materia orgánica en degradación, con índices de humedad relativos altos, sin embargo, *Prototheca zopfii* y *P. wickerhamii* se encuentran comúnmente en estanques y agua con alta salinidad (Kuramisawa *et al.*, 2018).

Esta tiene la capacidad de colonizar el ambiente intramamario y causar mastitis cuando existe compromiso en el estado inmunológico de la vaca, este microorganismo suele ser indetectable en los primeros estadios de la infección por lo que la hace persistente en una unidad productiva, la alternativa terapéutica es muy limitada por lo que el descarte de los animales es la primera opción dentro de la explotación (Bochniarz *et al.*, 2021).

2.3.4. Detección de la mastitis.

Existe una gran diversidad de métodos diagnósticos utilizados para la detección de la mastitis, estos métodos pueden ser enfocados en el diagnóstico microbiológico, o también basados en detectar las principales alteraciones en la composición de la leche, cada uno de ellos con una sensibilidad y especificidad diferente (Voort *et al.*, 2021). La interpretación de los resultados obtenidos es un factor crucial y necesita personal capacitado (Klibi *et al.*, 2018).

2.3.4.1. Electroconductividad.

Este es un método diagnóstico que se fundamenta en la capacidad conductiva de un gradiente eléctrico por parte de la leche, la unidad de medida de este método es el miliSiemens por centímetro (mS/cm) (Khatun *et al.*, 2019).

La conductividad eléctrica de la leche está influenciada por la concentración de aniones y cationes, principalmente el Na⁺, K⁺ y Cl⁻, juntamente con el Mg⁺⁺ y el Ca⁺⁺, como patrón interpretativo se debe saber que cuando la conductividad eléctrica aumenta a 6 mS/cm o más se asume la existencia de un aumento

significativo de los iones mencionados, lo que indicaría el inicio de un proceso patológico a nivel intramamario (Rukmana *et al.*, 2021; Sinha *et al.*, 2018).

2.3.4.2. Recuento de células somáticas

Este es el método de mayor sensibilidad y especificidad utilizado para el diagnósticos de mastitis clínica como subclínica, este análisis permite contar el número de células en la leche, estas células generalmente son células inmunitarias, como leucocitos, linfocitos, monocitos y neutrófilos, además de algunas células epiteliales, el valor en dicho conteo de células somáticas se correlaciona con el establecimiento de una infección intramamaria, ya que cuando un antígeno invade el ambiente intramamario empieza la infiltración de leucocitos como respuesta ante dicha invasión (Seligsohn *et al.*, 2021).

Se considera que altos recuentos de células somáticas en la leche son atribuidos a altos grados de inflamación del tejido glandular de la ubre, es por esto que este método diagnostico puede ser un buen predictivo del inicio de la mastitis, independientemente del genero bacteriano asociado a la mastitis (Panda *et al.*, 2018; Mircu *et al.*, 2019).

2.3.4.3. Diagnostico bacteriológico

Fundamentándose en diagnosticar el agente etiológico de la mastitis, otro de los métodos diagnósticos es el aislamiento e identificación mediante cultivo de cepas bacterianas a partir de muestras de leche de vacas con mastitis, este método es altamente confiable, ya que posee buena sensibilidad y especificidad y puede ayudar a la toma de decisiones para el control y erradicación de la infección intramamaria establecida en la unidad productiva.

Acompañado del cultivo bacteriano y la identificación del agente causal, debe realizarla la prueba de susceptibilidad antimicrobiana, esto para orientar de una manera más selectivas la terapia de las vacas patológicamente positivas (Aguilar *et al.*, 2019).

2.3.5. Tratamiento de la mastitis.

El tratamiento de la mastitis principalmente esta enfocado en el uso de agentes antibióticos como primera opción, sin embargo, el uso de estos medicamentos

puede realizarse de manera racional efectuando una terapia selectiva en función al microorganismo relacionado y a los requerimientos de la vaca considerando su estado fisiológico, o a su vez se puede determinar la aplicación de terapias antibióticas no selectiva o también llamada terapia de secado convencional (Sharif *et al.*, 2022; Sharun *et al.*, 2021).

2.4. Árbol de Té (*Melaleuca alternifolia*).

Esta planta es de características arbustiva pertenece a la familia de los mirtos, su origen es determinado en el sureste de Queensland en Australia, crece a lo largo de las llanuras pantanosas y arroyos del sur de Nueva Gales (Ramadan *et al.*, 2020).

Es considerado un árbol cuya altura no excede los 7 metros, su follaje conforma una corteza tupida y amplia, su corteza es de color blanquecino, las hojas están dispuestas de manera circular o espiral, estas tiene características lisas suaves y disposición lineal, generalmente miden de 1 a 3.5 cm y 1 mm de ancho, es considerado una especie resinosa que contiene aceites esenciales en sus hojas, las flores son características en esta especie, son de color blanco y tiene la apariencia de espigas, su tamaño es de 3 a 5 cm de longitud y aparecen durante cortos periodos de primavera (Buá *et al.*, 2020).

Los mirtos pertenecientes a la familia Myrtaceae, se caracterizan por ser ricos en oleos esenciales, tanto así que el árbol de te, es una de las principales especies vegetales utilizadas para la producción comercial de aceite esencial, el mismo que tiene varios usos en la industria farmacéuticas y cosmetológica (Miranda, 2018).

Figura 7.

Árbol de Té (Melaleuca alternifolia).



Fuente: Magazine, (2018).

2.4.1. Taxonomía.

Tabla 2.

Taxonomía del Árbol de Té.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Myrtales
Familia	Myrtaceae
Tribu	Melaleuceae
Género	<i>Melaleuca</i>
Especie	<i>alternifolia</i>
Nombre científico	<i>Melaleuca alternifolia</i>

Fuente: Maiden, (2017).

2.4.2. *Melaleuca* spp.

Esta es una especie arbustiva, el cual ha sido usado tradicionalmente para la obtención de extractos vegetales, uno de los principales es el aceite esencial, el mismo que se encuentra compuesto por mas de 92 principios activos diferentes, con al paso de algunos años se difundió por todo el mundo los múltiples beneficios que posee el aceite esencial del árbol de té (Lam *et al.*, 2018).

La familia *Myrtaceae* esta compuesta por alrededor de 3000 especies, de los cuales alrededor de unos 130 – 150 géneros, se encuentran distribuidas en las regiones de clima tropical o cálida del Ecuador (Bakar *et al.*, 2019).

Esta familia vegetal se destaca por la extraordinaria producción de aceites esenciales, debido a que poseen glándulas secretoras en la región subdérmicas de las hojas, el aceite esencial se encuentra compuesto por hidrocarburos como los terpenos, monoterpenos, sesquiterpenos y algunos alcoholes asociados con propiedades antiinflamatorios y antimicrobianas (Oliveira *et al.*, 2020).

2.4.2.1. *Melaleuca alternifolia.*

El árbol de té (*Melaleuca alternifolia*) durante varios años ha sido utilizado en la medicina tradicional, destacando principalmente el uso de su aceite esencial debido a sus propiedades medicinales, el mismo que tiene una buena actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, antifúngica, antiviral, etc. Por esto y por muchos mas beneficios se ha recurrido a la aplicación en la cosmetología de varios países como Australia, Reino Unido, Italia, Brasil y Ecuador, desde el punto de vista investigativo ha sido foco de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana y aislamiento de principios activos de dicho extraco. (Puvača *et al.*, 2018).

2.4.2.2. Evolución.

Es considerada como la principal planta de industrialización en el sentido fitofarmacológico en Australia, a tal modo que ya producen grandes cantidades de aceite esencial, por lo cual la planta tiene una distribución muy dispersa, su adaptabilidad en función al suelo es muy amplia y va desde suelos arenosos hasta los arroyos del noreste de Nueva Gales y sureste de Queensland de Australia donde destaca la evolución de esta planta (Yufang, 2019).

Los fitoquímicos del árbol del té son el resultado de las variaciones interpoblacionales e intrapoblacionales, determinándose como un árbol de tamaño medio con una corteza parecida al papel, produce aceite esencial esencial el cual es económicamente valioso, su paquete foliar posee numerosas glándulas accesorias resinosa, esta especie vegetal es somáticamente bisexual y su polinización es mediante fertilización con insectos, el cultivo y su manejo ha sido desarrollados predominantemente mediante selecciones de especies silvestres (Salvatori *et al.*, 2017).

La variabilidad química de los compuestos es un punto intrigante el cual se encuentra sujeto a la especie y a la zona agroecológica en donde se ha desarrollado, sin embargo, la diferenciación en compuestos bioactivos con propiedades fitofarmacológicas beneficiosas para la salud y muy utilizadas en el campo de la investigación viene siempre siendo el mismo beneficio para la industria farmacológica (Ejikeme *et al.*, 2020).

2.4.3. Usos del Árbol de Té.

2.4.3.1. En la medicina.

Los miembros del género *Melaleuca spp.* han sido durante mucho tiempo utilizados en la medicina popular en varias partes del mundo, además esta especie fue utilizada en la segunda guerra mundial por el ejército australiano como repelente de insectos y agentes antimicrobianos insertado en los botiquines de primeros auxilios, el uso tradicional de esta planta contra infecciones de la piel como acné, herpes y sarna también se ha mencionado, el uso de su aceite esencial contra infecciones microbianas (Labib *et al.*, 2019).

La corteza y las hojas de *Melaleuca* se ha informado que se utilizan como tranquilizantes, sedantes y para disipar el mal y aliviar el dolor en la medicina popular taiwanesa, información sobre la etnobotánica de dicha planta está registrada contra la malaria en Filipinas (conocido como árbol de aceite de cajeput) y las medicinas tradicionales cubanas. La acción antimicrobiana y fúngicas, donde dichas propiedades fueron descubiertas por los aborígenes australianos, ellos hojas triturados usadas de las plantas para tratar el resfriado común, el dolor de garganta, la picadura de insectos, las heridas o los hongos de infecciones oportunistas de la piel (Rad *et al.*, 2017).

La actividad antioxidante se da por la actividad inherente de algunos de los componentes presente en el aceite esencial, en particular los fenoles, que inhiben o reducen la tasa de oxidación aeróbica de la materia orgánica, de hecho, se ha demostrado ampliamente que los hidrocarburos monoterpénicos son mejores compuestos antioxidantes con respecto a los sesquiterpenos y particularmente aquellos con grupo metileno fuertemente activados en su estructura como el terpineno-4-ol, el γ - terpineno y el α - terpineno, fueron los más activo en el aceite de *Melaluca* (Zhang *et al.*, 2018).

Melaleuca alternifolia han sido ampliamente estudiadas e investigadas por su actividad antimicrobiana de amplio espectro, también el 1,8-cineol, el terpinen-4-ol y el metil eugenol son vitales para mediar en la actividad antimicrobiana del aceite del árbol de té, además de la eficacia del aceite de árbol de te1 para combatir las

infecciones antibacterianas, el aceite también tiene propiedades antifúngicas (Kumar, 2020).

El aceite esencial del árbol de té es eficaz para controlar el crecimiento de la microflora nativa y contrarresta la contaminación exógena por *Escherichia coli* O157:H7 en la aplicación previa a la cosecha de quitosano y lechuga mantecosa, siendo un bioconservante que controla el crecimiento de la microflora nativa en las plantas de lechuga mantecosa durante el almacenamiento refrigerado poscosecha, contrarrestar el crecimiento durante el inadecuado manejo poscosecha de la hortaliza de hoja al evaluar la supervivencia y crecimiento del patógeno presentes en infecciones nasocomiales (Neves *et al.*, 2020).

2.4.3.1.1. Farmacognosia.

No todos los usos del aceite del árbol de té y la planta han sido probadas para determinar su seguridad o eficacia, los problemas de la piel ocurren de manera más prominente en los usos tradicionales del aceite de árbol de té e incluyen hematomas, quemaduras, aftas bucales, eczema, psoriasis, rosácea e infecciones de la piel. Además de eso, se observa varias afecciones respiratorias, que incluyen resfriados, tos, congestión bronquial e irritación de la nariz y la garganta (Bhagat *et al.*, 2017).

El uso frecuente de productos de *M. alternifolia* puede provocar una variedad de afecciones que incluyen melanoma, mal olor corporal e infecciones de los huesos y la próstata, pudiendo causar una intoxicación peligrosa en menos de treinta minutos después de la aplicación (Kanso *et al.*, 2022).

2.4.3.1.2. Farmacodinámica.

Aproximadamente el 20 % de la solución de aceite de melaleuca contiene grandes concentraciones de cineol, un irritante de la piel que reduce las propiedades antisépticas del terpinen-4-ol “ingrediente activo”, además, las concentraciones de terpinen-4-ol, 2 % - 4 % de aceite de árbol de té contienen otros ingredientes activos como 1.8-cineol, alfa-terpineol y gamma-terpinen, estos componentes bioactivos son responsables de los efectos anticancerígenos, antifúngicos, antiinflamatorios y dentales en humanos (Morsoleto *et al.*, 2022).

El aceite de árbol de té interactúa con la membrana plasmática de células resistentes a múltiples fármacos e interfiere con la función de transportador de fármacos MDR P-gp, las cepas bacterianas periodontopáticas que se prueban, incluidas, entre otras, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, fueron destruidas al máximo por 30 segundos de exposición al aceite de *Melaleuca* y han mostrado una acción inhibitoria de la adhesión (Piekarz *et al.*, 2017).

El aceite de árbol de té suprime la producción de factor de necrosis tumoral alfa, interleucina 1- β , interleucina-10 y prostaglandina E2 por monocitos activados in vitro, induce la diferenciación de mielocitos en monocitos y suprime la producción de superóxido por monocitos activados in vitro (Padma *et al.*, 2019).

2.4.3.1.3. Farmacocinética.

- **Absorción:** Los productos de aceite de árbol de té aplicados a la piel humana afectan la integridad de la piel y la penetración percutánea de ácido benzoico de forma dependiente de la dosis, cantidades diminutas de los componentes del aceite de árbol de té, 1.5 % y 3 % de las cantidades aplicadas después de la aplicación de una solución concentrada de aceite de árbol de té al 20 % y aceite de árbol de té puro, penetran en la capa de la epidermis humana o la atraviesan (Fall *et al.*, 2017).
- **Distribución:** Terpinen-4-ol, metil eugenol, 3-metoximiliumollina, vomifoliol, ácido betulínico, β -sitostenona y β -sitosterol se distribuyen al hígado humano para su metabolismo, dentro de un par de horas después de la aplicación de cremas de aceite de árbol de té (Donadu *et al.*, 2022).
- **Metabolismo:** el metabolismo principal terpinen-4-ol se da en el hígado, sobre la base de la evidencia existente, tiene alta actividad antioxidante.
- **Excreción:** Como la mayoría de los fitoquímicos de otras plantas se excretan en gran medida en la orina como metabolitos que forman en los tejidos del huésped o por el microbiota y constituyen una alta proporción del metaboloma urinario (Moroni *et al.*, 2020).

2.4.3.1.4. Fitotoxicidad.

Poco se sabe de la toxicidad de los componentes individual o del aceite esencial de árbol de té completo, aunque no hay confirmación, el aceite esencial de melaleuca no debe ingerirse en cantidades relativamente altas debido a su toxicidad, aunque no se ha informado casos fatales en la literatura médica (Kasujja, 2021).

La intoxicación por aceite de árbol de té puede causar temblores musculares, debilidad, dificultad para caminar, temperatura corporal baja y salivación excesiva, según la norma australiana (AS 2782-1985) regula los niveles (Kosar *et al.*, 2022).

2.5. Obtención del aceite esencial.

2.5.1. Método de extracción de aceites esenciales.

Las características intrínsecas de las plantas influyen sobre la proporción del aceite esencial, por ejemplo, cada planta tiene características únicas del aceite esencial tanto es su viscosidad, color, solubilidad y cantidad o volumen obtenido (Cedeño *et al.*, 2019).

2.5.1.1. Destilación por vapor.

La destilación por arrastre de vapor es útil para la obtención del aceite esencia de una planta en cuestión, dicho método usa el vapor que pasa atreves o por el material vegetal, para dicho método es necesario un equipo adecuado, el cual genera vapor del agua que se encuentra por debajo del material vegetal, el vapor de agua y el vapor del aceite se condensan mediante un circuito de enfriamiento, el cual posteriormente serán separado por decantación el aceite esencial del agua (hidrolato) que contiene principio bioactivos arrastrados (Casado, 2018). Dicho método permite aislar compuestos que se encuentran en el punto de ebullición, al aplicar una destilación con bajas temperaturas (100 °C) (Gallego *et al.*, 2020).

2.5.2. Características fisicoquímicas.

Los aceites esenciales poseen las características de ser un compuesto volátil, por el cual requiere un manejo especial, ya que se puede perder fácilmente los compuestos bioactivos presentes en dicho aceite, además son muy liposolubles es decir que tiene afinidad con los lípidos, además pueden disolverse fácilmente con disolventes orgánicos (Patiño *et al.*, 2014).

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Ubicación y características de la investigación

3.1.1. Localización del experimento

País	Ecuador
Provincia	Bolívar
Cantón	Guaranda
Parroquia	Gabriel Ignacio Veintimilla
Barrio	Laguacoto I - Marco Pamba
Sector	Laguacoto, Vía Guaranda – San Simón Km 1 ½

3.1.2. Situación Geográfica y edafoclimática

Altitud	2608.00 metros
Latitud	-1.614378°
Longitud	-78.998339°
Temperatura máxima	19 ° C
Temperatura mínima	10 ° C
Temperatura media anual	14°C
Precipitación media anual	1619 mm cúbicos
Humedad relativa (%)	72%

Fuente: Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología, (2021).

3.1.3. Zona de vida

Guaranda, según menciona el geólogo Leslie Holdridge con su sistema de zonificación de vida, geológicamente corresponde a la formación Bosque Húmedo Montano Bajo (Holdridge, 1971).

3.2. Metodología

3.2.1. Material Experimental

- 10 aislados de *Escherichia coli*.
- 10 aislados de *Staphylococcus aureus*.
- 10 aislados *Klebsiella* spp.
- Aceite esencial de árbol de té (*Melaleuca alternifolia*)
- Agar EMB (Difco, Lot.0286056, USA).
- Agar MacConkey (Difco, Lot.9364856, USA).
- Agar Müeller Hinton (Difco, LOT: 0294294, USA).
- Agar Salt manitol (Oxoid, CM0085, LOT: 3289843).
- Disco de antibiótico en blanco (BBL, Lot.ref, USA)

3.2.2. Factores en estudio

- Tomando como referencia del principal objetivo planteado en esta investigación se pone en consideración los siguientes factores;

Factor A

- A0: Disco de antibiótico de Cefoxitin (Testigo)
- A1: Aceite esencial al 10 %
- A2: Aceite esencial al 20 %
- A3: Aceite esencial al 30 %
- A4: Aceite esencial al 50%
- A5: Aceite esencial al 75%

Factor B

- B: tres géneros bacterianos (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*)

3.2.3. Tratamientos.

Tabla 3

Distribución del factor A1 x B.

TRATAMIENTO	CÓDIGO	DESCRIPCIÓN
T0	A0B	Disco de antibiótico de Cefoxitin + Cepa de <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella</i>
T1	A1B	Aceite esencial al 10% + Cepa de <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella</i>
T2	A2B	Aceite esencial al 20% + Cepa de <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella</i>
T3	A3B	Aceite esencial al 30% + Cepa de <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella</i>
T4	A4B	Aceite esencial al 50% + Cepa de <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella</i>
T5	A5B	Aceite esencial al 75% + Cepa de <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella</i>

Experimental, Veloz (2023).

- **Paramétricas del experimento**

Para la investigación se consideró las siguientes características del experimento.

Tabla 4.

Características del experimento:

Tratamientos	6
Repeticiones	2
Número de Unidades experimentales (aislados)	10
Número total de análisis	360

3.2.4. Tipo de diseño experimental o estadístico

- Diseño de bloques completamente al azar (DBCA), con el siguiente modelo matemático; $Y_{ij} = \mu + Y_{\text{BLOQUES}} + t_i + t_j + \epsilon_{ij}$
- Prueba de Tukey 5%, como comparativa entre las medias de los tratamientos.

Tabla 5.

Análisis de Varianza (ADEVA)

Fuentes de variación	Grados de libertad
Total (t*r) -1	7
Tratamientos (t-1)	3
Bloques (repeticiones -1)	1
Error experimental (t-1) (t-r)	6

3.2.5. Manejo del experimento

- **Destilación por arrastre de vapor del aceite esencial de *Melaleuca alternifolia*:** Para la obtención del aceite esencial del árbol de té, se consideró como punto de partida la recolección de los elementos foliares del árbol de té, donde se separó y seleccionó las hojas, posteriormente se procesó el material vegetal lavándolo y dejándolo secar a temperatura ambiente, considerando que de planta en estudio las hojas son de un tamaño pequeño, lo que facilitó el llenado del balón de destilación del equipo (MS-E104), para su efecto se hicieron 5 destilaciones con un valor promedio de 154 gramos de material vegetal utilizado, una vez ensamblado y funcionando el equipo de destilación se controló periódicamente la temperatura (100 °C), manteniéndose por un lapso 3 horas por cada destilación realizada, una vez transcurrió este periodo se dejó reposar por 24 horas para su posterior decantación y envasado del aceite.
- **Cálculo del rendimiento del extracto vegetal:** la estimación del rendimiento del aceite esencial extraído de las hojas árbol de té se fundamentó en el pesaje del mismo al inicio de la extracción, de igual forma se pesó el volumen total de aceite esencial obtenido durante las 3 horas de destilación, estos valores

permitieron obtener el rendimiento, para ello el valor neto del aceite esencial fue dividido para el valor neto del pesaje al inicio del material vegetal, multiplicando por el factor (100) para la obtención en porcentaje dicho resultado.

- **Reactivación de los microorganismos en estudio:**
- **Elaboración de Caldo nutritivo:** Inicialmente se tomó en consideración la preparación de agua peptonada tamponada (Acumedia, Lot. 107596^a, USA) como un medio nutritivo requerido para la reanimación de cepas criopreservadas, se realizó la inoculación del medio nutritivo con 100µl del suspendido bacteriano presente en el criovial, este medio inoculado se introdujo en incubación por 24 horas a una temperatura de 37 °C.
- **Reactivación de cepas bacterianas:** Se procedió a seleccionar del refrigerador las bacterias que fueron aisladas e identificadas y proporcionadas por el trabajo de Mazón & Mazón (2022). Estas cepas fueron sometidas a un proceso de destiempo térmico, el mismo que se realizó mediante la exposición del criovial a temperatura ambiente por un periodo de 1 hora, luego de este procedimiento por el tiempo de 1 hora se introdujo el criovial a la incubadora a 37 °C para reactivar el metabolismo bacteriano.
- **Tiempos de incubación:** Las cepas que lograron reanimarse fueron sembradas en Agar sólido y posteriormente sometidas a un tiempo de incubación de 24 horas a 37 °C, luego de este periodo se identificó las características morfológicas de las colonias de cada una de las cepas que estaban en estudio.
- **Establecimiento de la sensibilidad y resistencia:**
- **Siembra en caja Petri:** En el desarrollo de los procedimientos de la medición de la susceptibilidad de los agentes patógenos en estudio, se inició con la formulación de la cantidad de medio de cultivo Agar Müeller Hinton (Difco, Lot. 0294294, USA) en base al requerimiento de análisis, una vez realizado esto se colocó en promedio 20 mL distribuidos en cada caja Petri para dejar solidificar por un lapso de 10 minutos, tras este periodo se sembraron colonias que previamente fueron suspendidas en agua destilada estéril hasta un ajuste de la escala de turbidez McFarland al 0,5% (USGS, USA) esta suspensión bacteriana fue sembrada en el Agar con la utilización de un hisopo estéril de manera continua, homogénea y en

todas direcciones para posteriormente colocar el agente antibacteriano e incubar por un lapso de 24 horas a 37° C.

- **Dilución del aceite esencial del árbol de té (*Melaleuca alternifolia*):** Fue requerido probar las concentraciones del aceite esencial del árbol de té al 10%, 20%, 30%, 50% y 75% diluido en Dimetilsulfóxido (DMSO) al 99% (Loba Chemie, A359352102, India), con la finalidad de medir su efecto antimicrobiano en la inhibición del crecimiento de las bacterias *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp, y *Staphylococcus aureus*.

Las microdiluciones se realizaron con una micropipeta de 1000µL, considerando que para alcanzar la concentración del 10% se pipetearon 100µL de aceite esencial del árbol de té y 900µL de DMSO, lo que permitió realizar el alcance de la unidad requerido es decir 1mL en tubos Eppendorf, este procedimiento se realizó repetidamente hasta determinar la equivalencia en cada una de las concentraciones propuestas, es decir, 20%, 30%, 50% y 75% se tomaron alícuotas de 200, 300, 500 y 750 µL de aceite esencial respectivamente a lo que se le añadió 800, 700, 500 y 250 µL de DMSO y se homogenizó mediante agitación vortical.

Las concentraciones obtenidas de las diluciones previamente realizadas fueron establecidas como los agentes antimicrobianos sometidos a prueba, cada una de estas fueron impregnadas en discos de papel filtro de celulosa (Oxoid, Lot. 3337882, Reino Unido) y probados en las pruebas de susceptibilidad frente a los géneros bacterianos estudiados

- **Aplicación de los discos de inhibición:** El antibiograma consistió en colocar los discos de papel filtro de celulosa (Oxoid, Lot. 3337882, Reino Unido) en blanco que fueron impregnados de la dilución que contiene una concentración determinada del aceite esencial del árbol de té con una pinza de manera estéril sobre la superficie del medio de cultivo que previamente fue inoculado con la cepa bacteriana en estudio, es decir este procedimiento se repitió por el número de cepas consideradas dentro de cada género bacteriano, los discos se colocaron con una separación entre disco y disco de 20 a 30 mm, considerando que por cada procedimiento desarrollado se colocaron un máximo de 5 discos, este procedimiento finalizó con el sellado e incubación de la caja a 37° C por 24 horas.

- **Medición de los halos de inhibición:** La manera directa de medir el efecto antimicrobiano que posee cada una de las concentraciones estudiadas fue mediante la medición de los halos de inhibición, los mismos que se realizaron con la ayuda de un calibrador de Vernier tomando como referencia de medida los bordes del halo, a este valor obtenido se le restó 6 mm que corresponden a la medida de los discos, esta operación es necesaria para obtener el valor neto de la zona de inhibición.

La base referencial fue la escala de sensibilidad propuesta por Duraffourd et al. (1897), en donde se expresan los valores para considerar el nivel de sensibilidad o resistencia de una bacteria expuesta a un fitofármaco.

Tabla 6.

Escala de sensibilidad de un fitofármaco según Duraffourd et al. (1897).

Inhibición	Diámetro del halo de inhibición
Actividad Nula (-)	≤ 8 mm
Sensible (+)	> 8 mm ≤ 14 mm
Muy sensible (++)	> 14 mm ≤ 20 mm
Sumamente sensible (++++)	> 20 mm

Fuente. Duraffourd et al. (1897).

- **Estimación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)**

En base a lo establecido en los objetivos, se planteó la realización del procedimiento de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial en estudio, sin embargo, mediante los resultados obtenidos en la actividad antimicrobiana se demostró que no fue requerido concentraciones más bajas a la planteada en la presente investigación, de tal modo se desestimó la realización de dicho procedimiento.

- **Estudio de cromatografía de gases con espectrometría de masa (GC-MS) de los compuestos volátiles del aceite esencial del árbol de té**
- La determinación de los compuestos volátiles se efectuó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa (GC-MS), en un cromatógrafo (Agilent

Technologies 7890A, CN12181050, USA) y un espectrómetro de masa (Agilent Technologies 5977A MSD, US1439M1416, USA) con una columna capilar HP-5MS de una medida de 30m x 0.250mm x 0.25µm (Agilent Technologies, USE556037H, USA) como fase estacionaria y helio de alta pureza como gas de arrastre para la fase móvil.

- Se inyectó 1 µL de muestra derivatizada en modo Split, empleando la relación 50:1.
- La temperatura de la cámara de inyección fue de 220 °C.
- El programa térmico fue configurado mediante el mantenimiento del horno desde 60 °C con una rampa de temperatura de 3 °C/min hasta los 240 °C.
- El tiempo total de corrido fue de 60 minutos.
- Los compuestos fueron identificados mediante la comparación con los espectros de masa de la librería NIST14.L

3.2.6. Métodos de evaluación y datos a tomar

- **Obtención del aceite esencial:** Variable de tipo dependiente, la cual se desarrolló mediante la técnica de destilación de arrastre por vapor, obteniendo un control de la cantidad en mL de aceite esencial extraído de un peso (gramos) en cuestión del material vegetal (hojas).
- **Rendimiento del aceite:** Variable dependiente adjudicada a la cantidad de aceite que poseía el material vegetal sometido a destilación, esta variable se operacionalizó mediante el procedimiento de destilación por arrastre de vapor y finalizó con el cálculo del porcentual establecido en la formal de Melo *et al.* (2020);

$$P = (M1/M2) * 100$$

Donde:

M1= Es la masa final del aceite esencial.

M2= La masa inicial del follaje.

100= Es un factor aritmético.

- **Susceptibilidad antimicrobiana:** Es una variable independiente considerada como una característica cuantitativa que ciertos agentes bacterianos expresan, esta peculiaridad puede dividirse en dos criterios de clasificación excluyentes conocidos como sensibilidad y resistencia, básicamente se fundamenta en la capacidad de sobrellevar o ser inhibida por los mecanismos de acción de un agente antimicrobiano (antibiótico/aceite esencial de *Melaleuca alternifolia*) por parte de uno o varios microorganismos bacterianos (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp, y *Staphylococcus aureus*) a determinadas concentraciones (10%, 20%, 30%, 50% y 75%), considerando que para su registro y medición se mesuraron las zonas de inhibición encontradas en el antibiograma, las mismas permitieron discernir si el patógeno fue resistente o si agente antimicrobiano evaluado poseía actividad antimicrobiana (nula: halos de inhibición ≤ 8 mm; sensible valores > 8 mm.) comparado en base a una escala de sensibilidad.
- **Concentración mínima inhibitoria:** Variable de tipo independiente, que se desarrolló mediante la estimación de la concentración mínima inhibitorias (CMI) necesaria del aceite esencial del árbol de té (*Melaleuca alternifolia*) para que los patógenas en estudio expresen sensibilidad mediante halos de inhibición con medidas > 8 mm.
- **Compuestos volátiles:** Es una variable de tipo dependiente, la cual fundamentó su operacionalización en la medición de los compuestos volátiles presentes en el aceite esencial de árbol de té (*Melaleuca alternifolia*), esta variable se evaluó por cromatografía de gases con espectrometría de masa GS-MS.

3.2.7. Análisis de datos

Los datos obtenidos como resultado de los análisis fueron desarrollados mediante el ensamble del diseño de bloques completamente al azar (DBCA), con la ayuda del paquete estadísticos SAS 9.4 y SPSS versión 25.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1.1. Obtención del aceite esencial

Tabla 7.

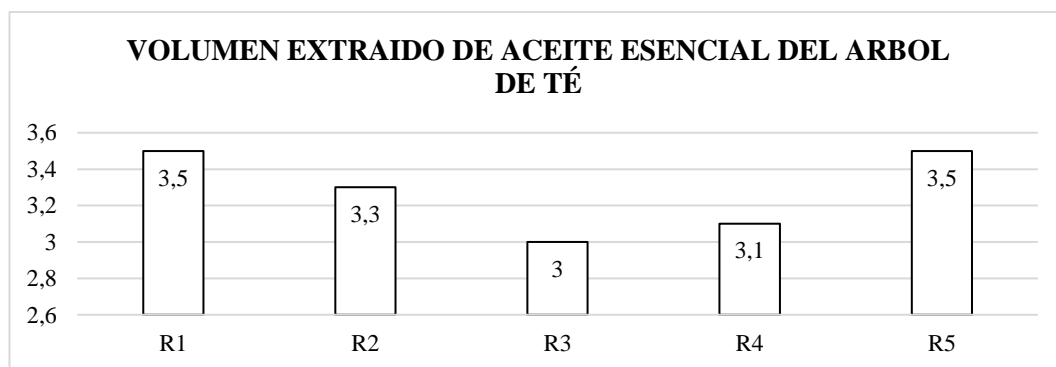
Resultados obtenidos del pesaje del material vegetal a destilar y del aceite esencial obtenido mediante destilación por arrastre de vapor.

Mat.	P. g	\bar{X}	Sol. H ₂ O	T. ex.	T°C	V. ext.	Repeticiones	\bar{X}
	180		500	3	100	3.5 ml	R1	
	150		500	3	100	3.3 ml	R2	
Hojas	120	154	400	3	100	3.0 ml	R3	3.28
	150		500	3	100	3.1 ml	R4	
	170		500	3	100	3.5 m	R5	

Mat. Materia, P.g.: peso en gramos, \bar{X} : media Sol.: solvente, T. ex.: tiempo de extracción en horas, T°C.: temperatura en grados centígrados, V. ext.: volumen extraído en mL.

Figura 8.

Resultados obtenidos del pesaje del material vegetal a destilar y del aceite esencial obtenido mediante destilación por arrastre de vapor.



De acuerdo con los resultados obtenidos (tabla 9) mediante el procesamiento del material vegetal (hoja) del árbol de té, mediante la técnica de arrastre por vapor se obtuvo en promedio 154 gramos de materia vegetal, la cual fue procesada por un tiempo de 3 horas, dándonos una cantidad de aceite esencial en promedio 3.28 mL.

4.1.2. Rendimiento del aceite esencial del árbol de té

Tabla 8.

Resultados del rendimiento del aceite esencial

Muestra	Hojas
Peso (gr)	154
Aceite esencial (mL)	3.28
Rendimiento %	2.12

Del procesamiento de las muestras de la materia vegetal utilizado, en este caso las hojas del árbol de té se obtuvo aceite esencial, lográndose un rendimiento del 2.12% en un tiempo de extracción de 3 horas, es decir que por cada 154 g se obtendrá 3.28 mL de aceite esencial. Comparativamente estos resultados son iguales a los obtenidos por Carson *et al*, (2020) en su investigación sobre las propiedades medicinales del aceite esencial del árbol de té. Quienes obtuvieron un rendimiento del 2%, adicionalmente, mencionan que dicho rendimiento está sujeto a variación en depende de las condiciones de hidratación de la planta.

4.1.3. Análisis de susceptibilidad antimicrobiana del aceite esencial a las concentraciones propuestas frente a *Escherichia coli* aislada de mastitis bovina.

Tabla 9.

Análisis de varianza de la actividad antimicrobiana del aceite esencial del árbol de té frente a Escherichia coli aislada de mastitis bovina.

F. V	G. L	S.C	C.M	V. F	Pr.F	Sig.
Tra.	5	4374.24	874.848	543.25	<.0001	**
Rep.	1	0.3760	0.3760	0.23	0.6299	NS
Error	113	181.97	1.61			
Total	119	4556.59			C.V.: 11.68%	

Nota. **: Diferencias estadísticas altamente significativas, NS: diferencias no significativas.

De acuerdo con la pruebas de Fisher podemos determinar que entre los tratamientos planteados existió diferencias estadísticas altamente significativas ($P < 0.05$), es

decir que las concentraciones del aceite esencial del árbol de té al 75%, 50%, 30%, 20% y 10% tiene distinto efecto inhibitorio sobre *Escherichia coli*, mientras que a nivel de repeticiones no existió diferencias significativas, es decir que los 10 aislados de *Escherichia coli* tuvieron un comportamiento similar al ser expuestas a las concentraciones planteadas. Con un coeficiente de variación del 11.68% otorgando veracidad y aceptabilidad a los datos obtenidos en la presente investigación.

Tabla 10.

Pruebas de Tukey al 5% para la comparación de los promedios de la medida de halos de inhibición obtenidos en el antibiograma a las concentraciones propuestas del aceite esencial del árbol de té frente a Escherichia coli causante de mastitis.

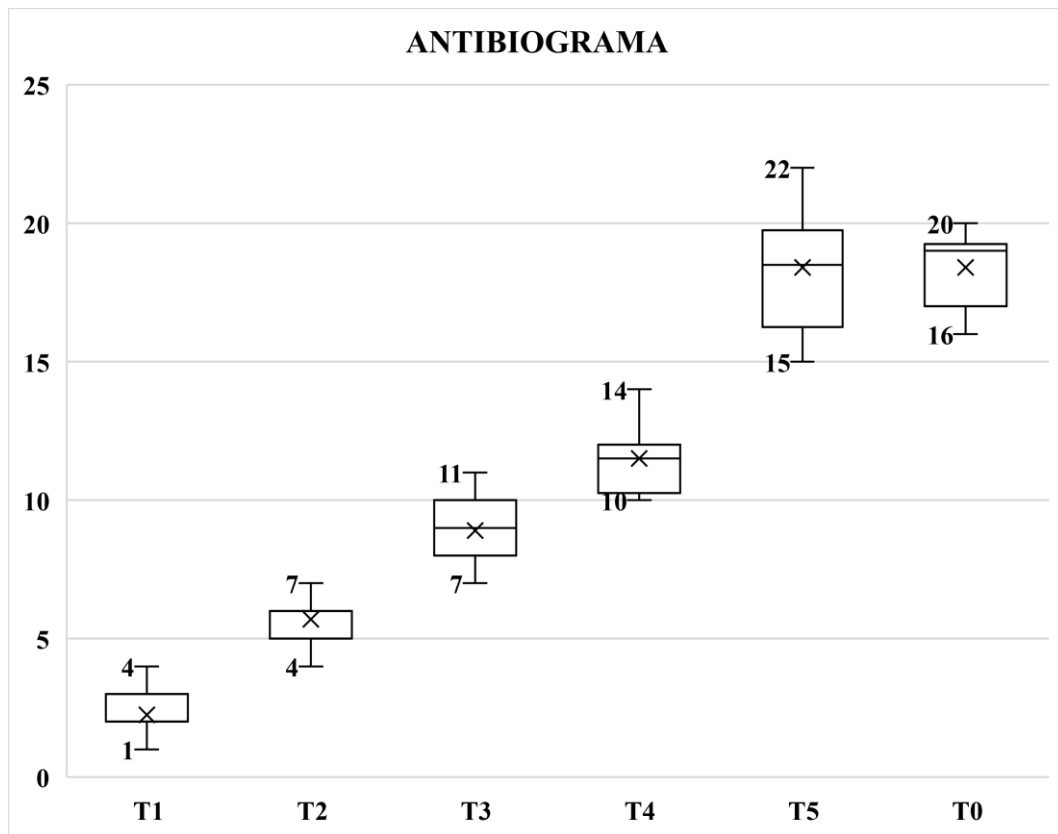
Tratamiento	Promedio	Tukey agrupamiento
0 (Testigo/FOX-30)	18.40	A
5 (75% A.E.)	18.40	A
4 (50% A.E.)	11.50	B
3 (30% A.E.)	8.90	C
2 (20% A.E.)	5.70	D
1 (10% A.E.)	2.25	E

Nota. Medias cubiertas por la misma letra no son significativamente diferentes. Fox: Cefoxitin 30µg, A.E: aceite esencial

De acuerdo con la prueba de Tukey al 5% podemos determinar que los promedios de los tratamientos son estadísticamente diferentes, sin embargo, se presenta una igualdad según Tukey entre el T0 (testigo) y T5 (75% aceite esencial), con un promedio de 18.40 mm respectivamente. Siguiéndole el T4 (50% aceite esencial) con un promedio de 11.50 mm, posteriormente el T3 (30% aceite esencial) que obtuvo un promedio de 8.90 mm de halo de inhibición, finalmente los T2 (20% aceite esencial) y T1 (10% aceite esencial) obtuvieron los promedios mas bajos con 5.70 mm y 2.25 mm respectivamente, determinando que estos dos últimos tratamientos no poseen actividad frente a *Escherichia coli* causante de mastitis.

Figura 9.

Diagrama de cajas y bigotes de las medidas de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos del antibiograma de las concentraciones propuestas frente a *Escherichia coli* causante de mastitis.



En la investigación de Zhang *et al*, (2018) sobre la evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* donde utilizó la técnica de difusión de disco de Kirby Bauer, metodológicamente impregno 0.1 mL de aceite esencial al 100% (puro) sobre el disco de papel filtro, evaluando la susceptibilidad de *Escherichia coli* frente a dicha concentración, obtuvo un diámetro de 12 mm, comparativamente son resultados menores a los encontrados en la presente investigación.

Según Carson *et al*, (2020) menciona que la inhibición de la bacteria *Escherichia coli* ocasionada por el aceite esencial del árbol de té se debe a los efectos perjudiciales sobre la homeostasis del potasio, respiración celular, alteración en la síntesis de la membrana celular, todos estos daños debido a los compuestos volátiles del aceite esencial como los terpenos que pueden ocasionar la lisis bacteriana.

4.1.3.1. Análisis de la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial del árbol de té frente a *Escherichia coli* causante de mastitis bovina.

Tabla 11.

Escala de sensibilidad del aceite esencial del árbol de té frente a Escherichia coli mediante la técnica de difusión de disco.

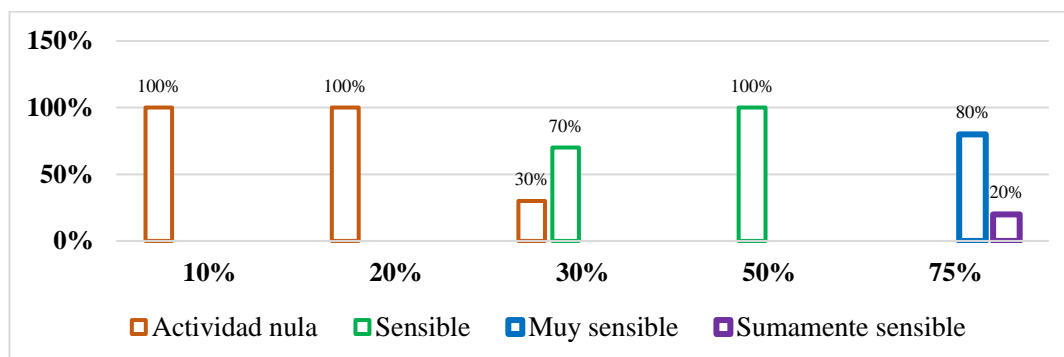
Escala de sensibilidad	10%		20%		30%		50%		75%		Fr.Total
	Fr.	%	Fr.	%	Fr.	%	Fr.	%	Fr.	%	
-	10	100	10	100	3	30	-	-	-	-	23
+	-	-	-	-	7	70	10	100	-	-	17
++	-	-	-	-	-	-	-	-	8	80	8
+++	-	-	-	-	-	-	-	-	2	20	2

Nota. -: Actividad nula, +: Sensible, ++: Muy sensible, +++: Sumamente sensible, Fr: Frecuencia

De acuerdo con los resultados obtenidos de los tratamientos realizados por duplicados sobre los 10 aislados de *Escherichia coli* se promedió los resultados de los halos de inhibición por cada aislado bacteriano, dichos resultados se compararon con la escala de sensibilidad de Duraffourd *et al.* (1897) como criterio interpretativo, observando que el aceite esencial del árbol de té (*Melaleuca alternifolia*) al 10% y 20% obtuvo un 100% de resistencia (-). Mientras que a la concentración del 30% se evidenció que un 30% de los aislados presentaron resistencia (-) y un 70% como sensibles (+), posteriormente a la concentración del 50% el 100% de la población bacteriana en estudio se presentó como sensibles (+) a dicha concentración, y finalmente el tratamiento con 75% de aceite esencial del árbol de té (*Melaleuca alternifolia*) mostró un 80% de actividad muy sensible (++) mientras que el 20% restante se exhibieron como sumamente sensibles (+++). Interpretando que la concentración del 50% del aceite esencial del árbol de té (*Melaleuca alternifolia*) fue la concentración mínima requerida para inhibir el crecimiento del total de *Escherichia coli* en estudio, corroborando con la prueba de Tukey al 5% el mismo que expresó una media de 11.50 mm del halo de inhibición.

Figura 10.

Porcentaje de sensibilidad de Escherichia coli frente a las diferentes concentraciones del aceite esencial del árbol de té.



En la investigación de Thomsen *et al.* (2011), sobre el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Melaleuca alternifolia*, donde utilizó la concentración del 5%, 10% y 15% obtuvo diámetros de halos de inhibición de 22 mm, 27 mm, y 28 mm respectivamente, siendo estos valores superiores a los encontrados en la presente investigación, este hallazgo se le atribuye a las diferencias entre el origen del aislamiento de *Escherichia coli* ya que este microorganismo posee diferencias en la resistencia a determinados componentes bioactivos según la fuente clínica.

4.1.4. Análisis de susceptibilidad antimicrobiana del aceite esencial a las concentraciones propuestas frente a *Klebsiella spp.*, aislada de mastitis bovina.

Tabla 12.

*Análisis de varianza de la susceptibilidad antimicrobiana del aceite esencial del árbol de té frente a *Klebsiella spp.*, aislada de mastitis bovina.*

F. V	G. L	S.C	C.M	V. F	Pr. F	Sig.
Tra.	5	3367.06	673.41	198.11	<.0001	**
Rep.	1	0.00	0.00	0.00	1.000	NS
Error	113	384.10	3.39			
Total	119	37571.17			C.V.: 12.22%	

Nota. **: Diferencias estadísticas altamente significativas, NS: diferencias estadísticas no significativas.

De acuerdo con la prueba de Fisher podemos determinar que entre los tratamientos planteados existió diferencias estadísticas altamente significativas ($P < 0.05$), es decir que las concentraciones del aceite esencial del árbol de té al 75%, 50%, 30%, 20% y 10% tiene distinto efecto inhibitorio sobre *Klebsiella* spp.

Mientras que a nivel de repeticiones no existió diferencias significativas, es decir que los 10 aislados de *Klebsiella* spp., tuvieron un comportamiento similar al ser expuestas a las concentraciones del aceite esencial del árbol de té planteadas. Con un coeficiente de variación del 12.22% confirmando veracidad y aceptabilidad a los datos obtenidos en la presente investigación.

Tabla 13.

Pruebas de Tukey al 5% para la comparación de los promedios de la medida de halos de inhibición obtenidos en el antibiograma de las concentraciones propuestas del aceite esencial del árbol de té frente a Klebsiella spp., aisladas de mastitis bovina

Tratamiento	Promedio	Tukey agrupamiento
5 (75% A.E.)	23.35	A
0 (Testigo/Cefoxitin-30)	17.70	B
4 (50% A.E.)	17.70	B
3 (30% A.E.)	14.20	C
2 (20% A.E.)	10.50	D
1 (10% A.E.)	7.05	E

Nota. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes. AE: aceite esencial.

De acuerdo con la prueba de Tukey al 5% podemos ver que los promedios de los tratamientos son estadísticamente diferentes, obteniendo que el mayor promedio lo expresó el tratamiento T5 (75% aceite esencial) con 23.35 mm en el halo de inhibición. Sin embargo, se presenta una igualdad según Tukey entre el T0 (Testigo/FOX-30) y T4 (50% aceite esencial), con un promedio de 17.70 mm respectivamente.

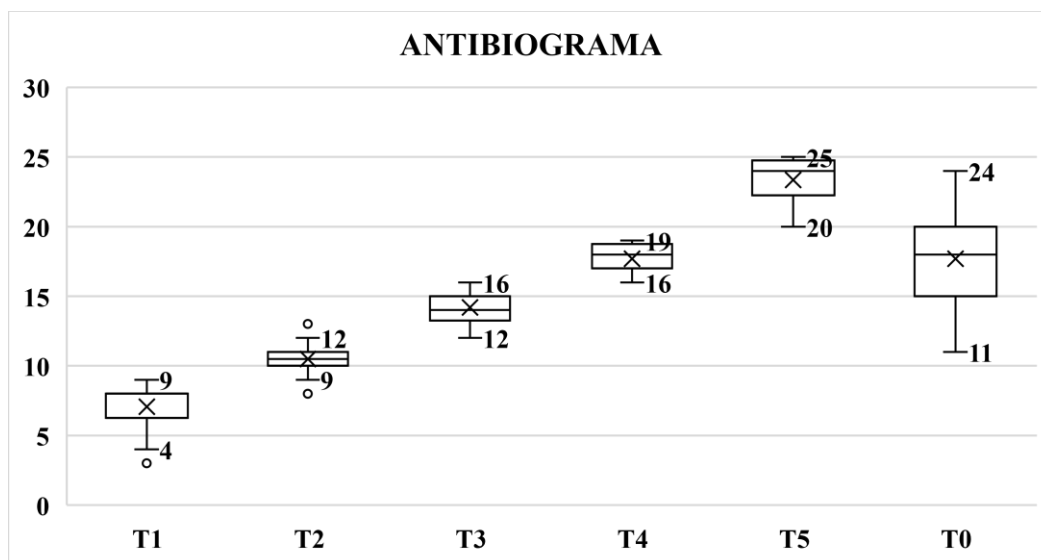
Siguiéndole el T3 (30% aceite esencial) que obtuvo un promedio de 14.20 mm en el diámetro del halo de inhibición, posteriormente el T2 (20% aceite esencial) que

obtuvo un promedio de 10.50 mm y finalmente el menor promedio lo obtuvo el T1 (10% aceite esencial) con 7.05 mm en el diámetro del halo de inhibición.

Según Kullkarni *et al.* (2012) en su investigación del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* sobre patógenos multiresistente a los antibióticos, encontró que en 30 aislados de *Klebsiella pneumoniae* multiresistente a los antibióticos (Ampicilina, Estreptomicina y Teraciclina), el aceite esencial a la concentración del 100% frente exhibió un promedio de 19 mm en el diámetro del halo de inhibición, considerando estos resultados similares a los obtenidos en la presente investigación.

Figura 11.

Diagrama de cajas y bigotes del diámetro de los halos de inhibición obtenidos del antibiograma de las concentraciones propuestas frente a Klebsiella spp., causante de mastitis.



Según Kullkarni *et al.* (2012) en su investigación del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* sobre patógenos multiresistentes a los antibióticos, encontró que la actividad antimicrobiana del aceite esencial a una concentración del 100% obtuvo valores máximos de 22 mm y un mínimo de 17 mm en el diámetro del halo de inhibición, comparativamente en la presente investigación se evidenció valores superiores a una concentración del 75% (T5), en donde se obtuvo máximo de 25 mm y un mínimo de 20 mm en el diámetro del halo de inhibición.

Oliva *et al.* (2018) en su investigación de alta potencia antimicrobiana del aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* al 100% contra bacteria Gram-negativas resistentes a múltiples antibióticos, encontró que mediante la técnica de difusión de disco obtuvo halos de inhibición de 15 mm, siendo valores similares a los encontrados en la presente investigación si se los compara con los encontrados a la concentración del 30% (T3).

4.1.4.1. Análisis de la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial del árbol de té frente a *Klebsiella* spp., causante de mastitis bovina

Tabla 14.

Escala de sensibilidad del aceite esencial del árbol de té frente a Klebsiella spp., mediante la técnica de difusión de disco.

Escala de sensibilidad	10%		20%		30%		50%		75%		Fr.Total
	Fr.	%	Fr.	%	Fr.	%	Fr.	%	Fr.	%	
-	10	100	-	-	-	-	-	-	-	-	10
+	-	-	10	100	6	60	-	-	-	-	16
++	-	-	-	-	4	40	10	100	-	-	14
+++	-	-	-	-	-	-	-	-	10	100	10

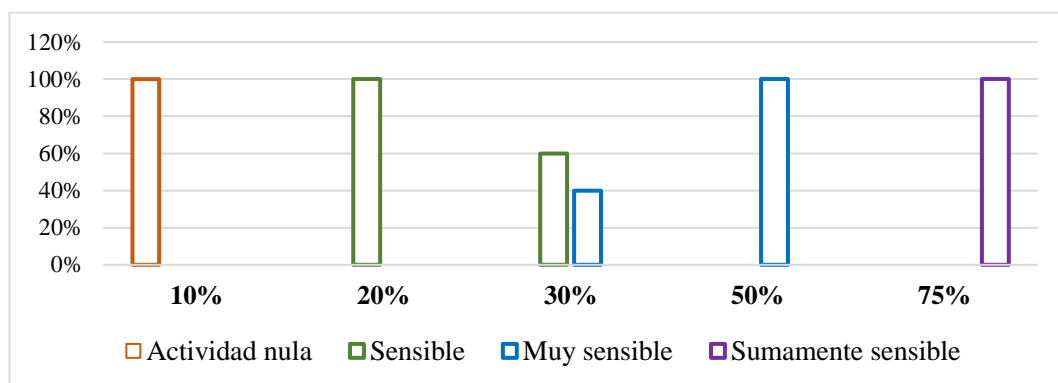
Nota. -: Actividad nula, +: Sensible, ++: Muy Sensible, +++: Sumamente sensible, Fr: Frecuencia

De acuerdo con los resultados obtenidos de los tratamientos realizados por duplicados sobre los 10 aislados de *Klebsiella* spp. se promedió los resultados de los halos de inhibición por cada aislado bacteriano, dichos resultados se compararon con la escala de sensibilidad de Duraffourd *et al.* (1897) como criterio interpretativo, observando que el aceite esencial del árbol de té (*Melaleuca alternifolia*) al 10% obtuvo un 100% de resistencia (-). Mientras que a la concentración del 20% obtuvo un 100% de sensibilidad (+), mientras que a la concentración del 30% se evidenció que un 60% de los aislados presentaron sensibilidad (+) y un 40% se presentaron como muy sensibles (++) , posteriormente a la concentración del 50% el 100% de la población bacteriana en estudio se presentó como muy sensibles (++) a dicha concentración, y finalmente el tratamiento con 75% de aceite esencial del árbol de té (*Melaleuca alternifolia*)

mostró que el 100% de los aislados se exhibieron como sumamente sensibles (+++). Interpretando que la concentración del 20% del aceite esencial del árbol de té (*Melaleuca alternifolia*) fue la concentración mínima requerida para inhibir el crecimiento del total de *Klebsiella* spp., en estudio, corroborando con la prueba de Tukey al 5% el mismo que expresó una media de 10.50 mm del halo de inhibición.

Figura 12.

Porcentaje de sensibilidad de Klebsiella frente a las diferentes concentraciones del aceite esencial del árbol de té.



Según Corona *et al.* (2022) en su investigación del efecto antimicrobiano del aceite esencial del árbol de té, timol y carvacrol y sus combinaciones sobre microorganismo aislados de casos de mastitis clínica bovina, donde utilizó 20µL (2%) de aceite esencial más timol frente a *Klebsiella*, obtuvo un promedio del diámetro del halo de inhibición de 29 mm (+++), los investigadores mencionados atribuyen dicho hallazgo, debido al efecto antimicrobiano del timo ya que este actúa sobre la síntesis de la pared celular bacteriana, comparativamente los valores encontrados en la investigación citada son superiores a los encontrados en la presente investigación, este debido a que el timol potencializa el efecto antimicrobiano frente a bacterias Gram-negativas.

Ramadan *et al.* (2020) en su investigación sobre la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* frente a patógenos Gram-negativos, utilizó 25µL (2.5%) de aceite esencial para pruebas de susceptibilidad frente a *Klebsiella pneumoniae*, en donde encontró 18 mm de halo, de manera comparativa estos valores superan a los encontrados en la presente investigación.

4.1.5. Análisis de susceptibilidad antimicrobiana del aceite esencial a las concentraciones propuestas frente a *Staphylococcus aureus* aislada de mastitis bovina.

Tabla 15.

Análisis de varianza de la susceptibilidad antimicrobiana del aceite esencial del árbol de té frente a Staphylococcus aureus aislado de mastitis bovina.

F. V	G. L	S.C	C.M	V. F	Pr. F	Sig.
Tra.	5	3115.47	623.09	142.97	<.001	**
Rep.	1	0.033	0.033	0.01	0.9305	NS
Error	113	492.47	4.3581			
Total	119	3607.97			C.V.: 12.41%	

Nota. **: Diferencias estadísticas altamente significativas, NS: diferencias estadísticas no significativas.

De acuerdo con la prueba de Fisher podemos determinar que entre los tratamientos planteados existió diferencias estadísticas altamente significativas ($P < 0.05$), es decir que las concentraciones del aceite esencial del árbol de té al 75%, 50%, 30%, 20% y 10% tiene distinto efecto inhibitorio sobre *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovinas, asumiendo que entre mayor sea la concentración del extracto natural mayor será el rango de la zona de inhibición.

En el ADEVA, a nivel de repeticiones no existió diferencias estadísticas significativas, es decir que los 10 aislados de *Staphylococcus aureus* tuvieron un comportamiento similar al ser expuestas a las concentraciones planteadas. Con un coeficiente de variación del 12.41% confirmando veracidad y aceptabilidad a los datos obtenidos en la presente investigación.

Zhan *et al.* (2020) en su investigación hallaron que el crecimiento de *Staphylococcus aureus* se redujo significativamente al ser evaluado mediante microdilución en placa de 96 pocillos (1×10^5 UFC/pocillo) al cuál se le añadió el aceite esencial del árbol de té, en distintas concentraciones, además, evidenciaron que aumenta la proliferación de células epiteliales mamarias y su resistencia a la exposición del *Staphylococcus aureus*, sumado a esto observaron que el aceite

esencial del árbol de té puede aliviar la respuesta inflamatoria desencadenada por este patógeno y mejora la expresión de la interleucina-8 (IL-8), la cual es fundamental en el reclutamiento de polimorfonucleares al ambiente intramamario. Concordando con lo citado ya que se pudo observar en la presente investigación que el aceite esencial del árbol de té a distintas concentraciones inhibe el crecimiento del *Staphylococcus aureus* mediante el método de difusión de discos.

Tabla 16.

Pruebas de Tukey al 5% para la comparación de los promedios del antibiograma de las concentraciones propuestas del aceite esencial del árbol de té frente a Staphylococcus aureus aisladas de mastitis bovina.

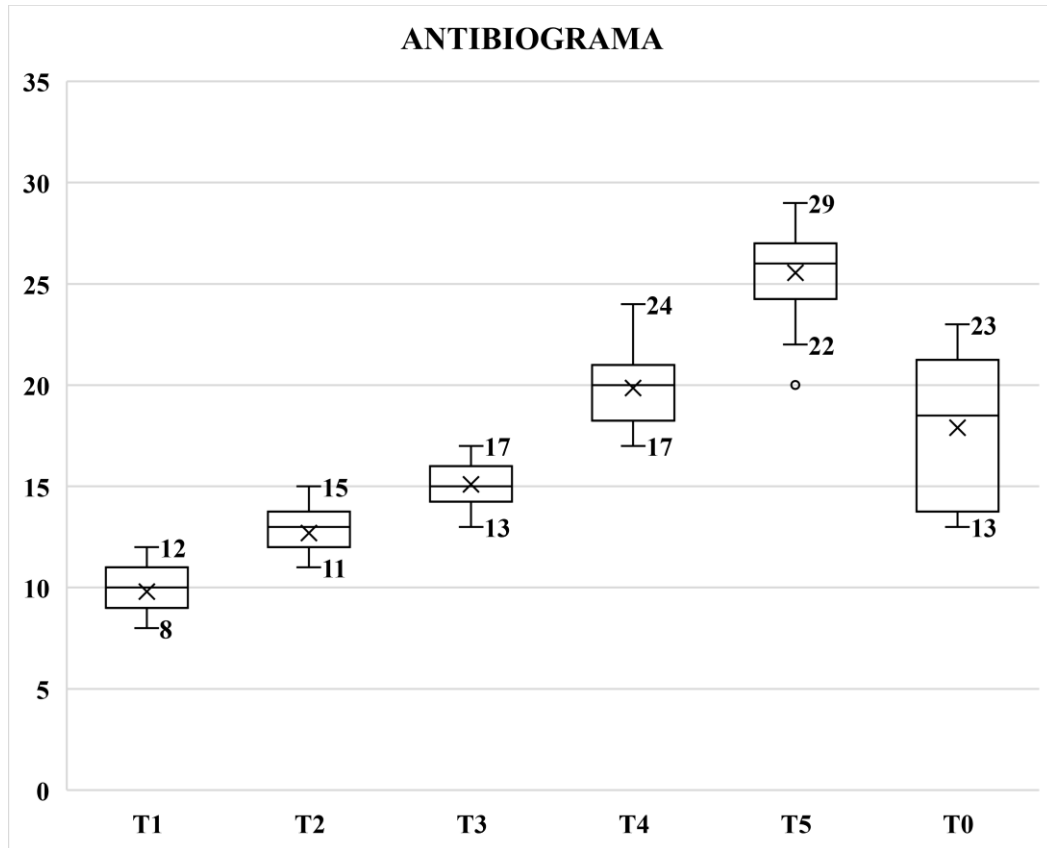
Tratamiento	Promedio	Tukey agrupamiento
5 (75% A.E.)	25.55	A
4 (50% A.E.)	19.85	B
0 (Cefoxitin 30µg)	17.90	C
3 (30% A.E.)	15.10	D
2 (20% A.E.)	12.70	E
1 (10% A.E.)	9.80	F

Nota. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes. AE: aceite esencial.

De acuerdo con la prueba de Tukey al 5% se observa que los promedios de los tratamientos son estadísticamente diferentes, identificando que el tratamiento T5 (75% aceite esencial) obtuvo 25.55 mm en el diámetro del halo de inhibición en promedio. Siguiéndole el T4 (50% aceite esencial) el cual presentó un promedio de 19.85 mm en el diámetro del halo de inhibición, posteriormente el T3 (30% aceite esencial) logró un promedio de 15.10 mm en el diámetro del halo de inhibición, continuando el T2 (20% aceite esencial) que alcanzó un promedio de 12.70 mm y finalmente el menor promedio lo tuvo el T1 (10% aceite esencial) con 9.80 mm en el diámetro del halo de inhibición. Observando mediante la escala de sensibilidad que la concentración mínima inhibitoria (CMI) del *Staphylococcus aureus* se observó a la concentración de 10% del aceite esencial del árbol de té.

Figura 13.

*Diagrama de cajas y bigotes del diámetro de los halos de inhibición obtenidos del antibiograma de las concentraciones propuestas frente a *Staphylococcus aureus* causante de mastitis.*



Kulkarni *et al.* (2012) En su investigación sobre la actividad antimicrobiana del aceite esencial del árbol de té sobre patógenos multiresistentes a los antibióticos, utilizó una concentración del 100% del aceite esencial frente 30 aislados de *Staphylococcus aureus*, encontrando halos de inhibición de 16 mm en promedio, además obtuvo un valor máximo de 22 mm y un mínimo de 10 mm, los autores citados mencionan que el aceite esencial del árbol de té posee buena actividad antimicrobiana.

Comparativamente los resultados citados son similares a los encontrados en la presente investigación a la concentración evaluada del 30% (T3) en donde se obtuvo un promedio de 15.10 mm del diámetro del área de inhibición con valores máximos de 17 mm y mínimos de 13 mm en el diámetro de la zona de inhibición en los 10 aislados de *Staphylococcus aureus* causantes de mastitis bovina.

4.1.5.1. Análisis de la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial del árbol de té frente a *Staphylococcus aureus* causante de mastitis.

Tabla 17.

Escala de sensibilidad del aceite esencial del árbol de té frente a Staphylococcus aureus mediante la técnica de difusión de disco.

Escala de sensibilidad (mm)	10%		20%		30%		50%		75%		Fr. Total
	Fr.	%	Fr.	%	Fr.	%	Fr.	%	Fr.	%	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
+	10	100	10	100	2	20	-	-	-	-	22
++	-	-	-	-	8	80	8	80	-	-	16
+++	-	-	-	-	-	-	2	20	10	100	12

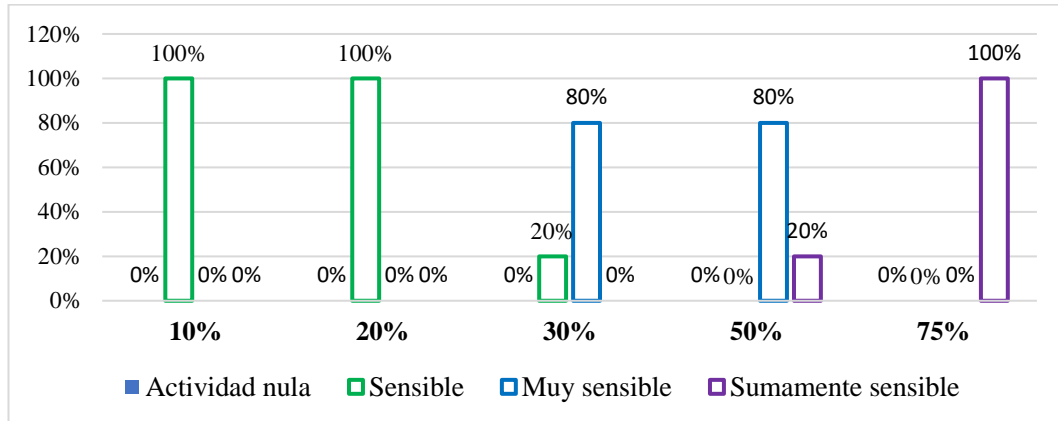
Nota. -: Actividad nula, +: Sensible, ++: Muy sensible, +++: Sumamente sensible, Fr: Frecuencia

De acuerdo con los resultados obtenidos de los tratamientos realizados por duplicados sobre los 10 aislados de *Staphylococcus aureus* se promedió los resultados de los halos de inhibición por cada aislado bacteriano, dichos resultados se compararon con la escala de sensibilidad de Duraffourd *et al.* (1897) como criterio interpretativo, observando que el aceite esencial del árbol de té (*Melaleuca alternifolia*) al 10% y 20% obtuvo un 100% de sensibilidad (+). Mientras que a la concentración del 30% se evidenció que un 20% de los aislados presentaron sensibilidad (+) y un 80% como muy sensibles (++) , posteriormente a la concentración del 50% se obtuvo que un 80% de la población bacteriana en estudio se presentó como muy sensibles (++) y un 20% como sumamente sensible, y finalmente el tratamiento con 75% de aceite esencial del árbol de té (*Melaleuca alternifolia*) mostró un 100% de actividad sumamente sensible (+++) en los *Staphylococcus aureus* en estudio.

De tal modo inferimos que la concentración de 10% del aceite esencial del árbol de té (*Melaleuca alternifolia*) fue suficiente para inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, corroborando con la prueba de Tukey al 5% el mismo que expresó una media de 9.80 mm del halo de inhibición.

Figura 14.

Porcentaje de la escala de sensibilidad del Staphylococcus aureus frente a las diferentes concentraciones del aceite esencial del árbol de té



Puvača *et al.* (2021) en su investigación sobre la actividad antimicrobiana in vitro del aceite esencial del árbol de té a una concentración del 50% obtuvo un halo de inhibición de 18 mm, siendo valores similares a los encontrados en la presente investigación.

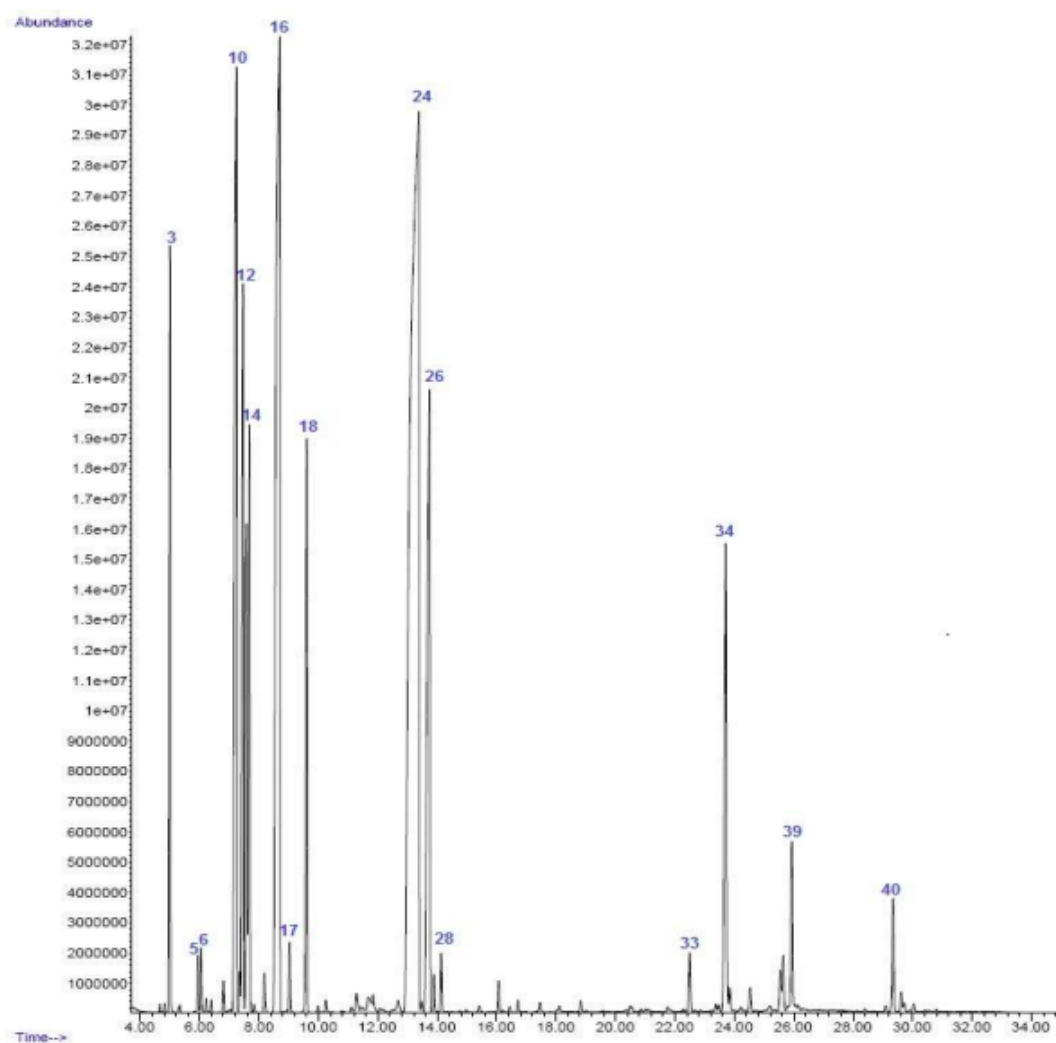
Sichieri *et al.* (2019) en su investigación de la actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* comerciales mediante la técnica de difusión de disco, utilizaron un volumen de 10µl de aceite esencial a una concentración del 100% sobre *Staphylococcus aureus*, en donde obtuvieron una medida de 24 mm de halo de inhibición. comparativamente los resultados de la investigación citada fueron diferentes a los encontrados en la presente investigación, ya que a la concentración del 75% se obtuvo una media de 25.55 mm en la medida del halo de inhibición.

Esmael *et al.* (2020) en su investigación donde probaron el aceite esencial del árbol de té (*Melaleuca alternifolia*) sobre *Staphylococcus aureus* mediante la técnica de difusión en agar en pozos de 6 mm, evidenciaron que a la concentración del 20% se obtuvo zonas de inhibición de 15.5 mm de halo. Comparativamente los resultados de la investigación citada son superiores a los encontrados en la presente investigación, cabe recalcar que en ambas investigaciones se utilizó la misma concentración del aceite esencial, sin embargo, difiere del método aplicado.

4.1.6. Análisis de cromatografía de gases - espectrometría de masa (GC-MS) de los compuestos volátiles presentes en el aceite esencial del árbol de té (*Melaluca alternifolia*) obtenido por arrastre de vapor.

Figura 15.

*Cromatograma de los compuestos volátiles obtenidos mediante cromatografía de gases- espectrometría de masa (GC-MS) del aceite esencial del árbol de té (*Melaluca alternifolia*) obtenido mediante destilación por arrastre de vapor.*



Mediante la cromatografía de gases con espectro de masa (GC-MS) se procesó el aceite esencial del árbol de té, donde se identificaron 41 compuestos volátiles, observando en la figura 15 los picos de los compuestos volátiles, destacando con color azul los compuestos de mayor tiempo de retención a la hora del análisis.

Tabla 18.

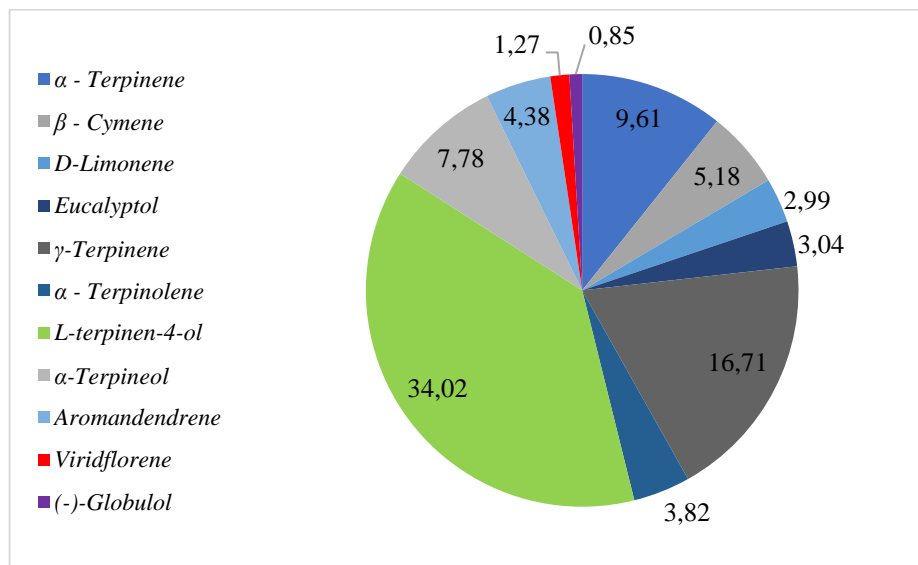
Resultados del análisis de cromatografía de gases con espectrometría de masa (GC-MS) de los compuestos volátiles del aceite esencial del árbol de té (Melaleuca alternifolia) obtenido por arrastre de vapor.

Nº	Compuesto	Tiempo de retención (min)	Área (%)
10	α - Terpinene	7.234	9.61
12	β - Cymene	7.457	5.18
13	D-Limonene	7.585	2.99
14	Eucalyptol	7.670	3.04
16	γ -Terpinene	8.684	16.71
18	α - Terpinolene	9.606	3.82
24	L-terpinen-4-ol	13.368	34.02
26	α -Terpineol	13.737	7.78
34	Aromandendrene	23.711	4.38
39	Viridflorene	25.937	1.27
40	(-)-Globulol	29.339	0.85

De acuerdo con los resultados obtenidos en la tabla 20, el compuesto volátil en mayor porcentaje es el L-terpinen-4-ol con un área del 34.02% en relación a los otros compuestos volátiles, seguido por el γ -Terpinene con un 16.71%, posteriormente el α -Terpinene que representó el 9.61%, continuando el α -Terpineol con un 7.78%, así mismo el β -Cymene con un 5.18%, después el Aromandendrene con un 4.38% , compuestos que se les tribuye la actividad antimicrobiana frente a bacterias causante de mastitis en estudio, y finalmente con un 26.69% representa los otros compuestos de menor área en el cromatograma.

Figura 16.

*Porcentaje de los compuestos volátiles en mayor porcentaje del aceite esencial del árbol de té (*Melaleuca alternifolia*) obtenido por arrastre de vapor.*



Ramadan *et al.* (2020) en su investigación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial del árbol de té, en el análisis GC-MS identificó 40 compuestos volátiles, de los cuales el compuesto volátil de mayor porcentaje es el Terpinen-4-ol con un área del 44.41% y el γ -Terpinene con un área de 21.88%, comparativamente los resultados de la investigación antes citada son ligeramente mayores a los obtenidos en la presente investigación, sin embargo, otros compuestos como el α -Terpinene se expresó con un área del 6.83%, siendo valores menores a los obtenidos en la presente investigación.

Ossa *et al.* (2020) en su estudio cromatográfico (GC-MS) del aceite esencial del árbol de te (*Melelauca alternifolia*) obtuvo que el compuesto de mayor área fue el Terpinen-4-ol con 39%, siendo ligeramente mayor a los encontrados en la presente investigación, sin embargo, γ -Terpinene, se expresó en un área del 10%, siendo este valor menor a los obtenidos en la presente investigación. Se asume que dichas diferencias son atribuidas a diversas características agroecológicas necesarias para el desarrollo del tejido vegetal y depósito de compuestos bioactivos, también al tiempo de extracción y equipos usados para la obtención del aceite esencial que influyen de manera cuantitativa en la concentración de los compuestos volátiles.

4.2. COMPROBACIÓN DE HIPÓTESIS

De acuerdo con el análisis de la prueba de Kruskal-Wallis para grupos no homogéneos (diferentes concentraciones y diferentes bacterias), podemos determinar que existió un efecto altamente significativo ($P < 0.05$) en la distribución de los halos de inhibición con relación a la escala de sensibilidad, la misma que nos determina el grado de actividad que posee el aceite esencial, en base a este resultado rechazamos la hipótesis nula (Figura 17) y aceptamos la hipótesis alterna la misma que no expresa que; Existe una efectividad antimicrobiana del aceite esencial del árbol de té (*Melaleuca alternifolia*) frente tres géneros bacterianos aisladas de mastitis bovina con un halo superior a 8 mm.

Figura 17.

Prueba de Kruskal-Wallis para los resultados de los halos de inhibición en relación con la escala de sensibilidad descrita por Duraffourd et al. (1897).

Resumen de prueba de hipótesis				
	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de halo es la misma entre las categorías de Sensibilidad.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Tabla 19.

Frecuencias de los rangos encontrados en los análisis de la actividad antimicrobiana del aceite esencial del árbol de té frente a tres géneros bacterianos aislados de mastitis bovina.

Escala de Sensibilidad		N
Halo Inhibición	Actividad nula < 8 mm	33
	sensible > 8 mm – 14 mm	55
	muy sensibles > 14 mm – 20 mm	38
	sumamente sensible > 20 mm	24
	Total	150

CAPÍTULO V

5.1. CONCLUSIONES

- Fueron suficientes un total de 154 gramos de material vegetal para obtener 3.28 mL de aceite esencial de árbol de té (*Melaleuca alternifolia*) en un tiempo de 3 horas.
- El resultado del rendimiento en la obtención del aceite esencial del árbol de té fue de un 2.12%, es decir que por cada 100 g de material vegetal utilizado en el procedimiento de destilado se obtendrá 2.12 mL de aceite esencial.
- Se evidenció diferencias estadísticas altamente significativas ($P < 0.05$) entre los espectros antimicrobianos de las diferentes concentraciones planteadas del aceite esencial del árbol de té sobre *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp, y *Staphylococcus aureus* causante de mastitis bovina.
- Se logró determinar que para inhibir el 100% de los aislados de *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp y *Staphylococcus aureus* en estudio se requirió concentraciones del aceite esencial del árbol de té del 50%, 20% y 10% respectivamente, esto sin encontrar evidencia de medidas de halos ≤ 8 mm.
- Cromatográficamente el L-terpinen-4-ol se encontraba en un gran porcentaje con un área del 34.02% en relación con los otros compuestos volátiles, seguido por el γ -Terpinene con un 16.71%, posteriormente el α -Terpinene que representó el 9.61%, continuando el α -Terpineol con un 7.78%, compuestos que se les tribuye la actividad antimicrobiana frente a las bacterias causante de mastitis en estudio, y finalmente con un 36.25% los otros compuestos de menor área en el cromatograma.

5.2. RECOMENDACIONES

- Utilizar el hidrolato residual del procedimiento de destilación en pruebas de susceptibilidad antimicrobiana con los patógenos estudiados en la presente investigación.
- Medir la actividad antimicrobiana que posee el aceite esencial del árbol de té en diferentes patógenos (*Bordetella bronchiseptica*) de otras fuentes clínicas de aislamiento.
- En pruebas de susceptibilidad de *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp, y *Staphylococcus aureus* utilizar una concentración mínima del 50% (T4) del aceite esencial del árbol de té para inhibir en su totalidad el crecimiento en pruebas in vitro.
- Determinar si existe evidencia de otros compuestos bioactivos como compuestos fenólicos de extractos vegetales del árbol de te.

BIBLIOGRAFÍA

- Abera, B., Lemma, D., & Iticha. (2018). Study of bovine mastitis in a sella government dairy farm of Oromia Regional state, South Eastern Ethiopia. *International Journal of Current Research and Academic Review.*, 1(2), pp. 134 -145.
- Acosta, A. M., Juliana Mira, H., & Silvia, P. A. (2017). Tópicos en mastitis bovina: desde la etiología hasta algunas terapias alternativas. *Journal of Agriculture and Animal Sciences*, 6(1).
- AEMPS, A. E. (2018). Guía sobre aceites esenciales en productos cosméticos. edqm.eu (1 edición).
- Agrobot. (2022). Agrobot.com. Obtenido de [https://www.agrobot.com/Documentos/E_3_Producci/483_ga000019pr\[1\].htm](https://www.agrobot.com/Documentos/E_3_Producci/483_ga000019pr[1].htm)
- Aguilar, G., & Alvares, D. (2019). Mastitis bovina.
- Aguirre, L. R. (2013). Características a seleccionar en bovinos tipo leche para las ganaderías de la Region Sur del Ecuador. *Centro de biotecnología*, 2(1), pp. 59-67.
- Amer, S., Gálvez, F., Fukuda, Y., Tada, C., Jimenez, L., Valle, W., & Nakai, Y. (2018). Prevalence and etiology of mastitis in dairy cattle in el Oro Province, Ecuador. *Journal of Veterinary Medical Sciences*.
- Asadpour, R., Zangiband, P., Nofouz, K., & Saberivand, A. (2021). Differential expression of antioxidant genes during clinical mastitis of cow caused by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Veterinarski arhiv*.
- Asraf, A., & Imran, M. (2018). Diagnosis of bovine mastitis: from laboratory to farm. *Tropical Animal Health and production*.
- Bakar, A., Ahmand, H., Sulaiman, S., Baharudin, O., & Rasadah, M. (2019). Evaluation of in vitro Bioactivity of *Melaleuca cajuputi* Powell Essential Oil against *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse). *Sains Malaysiana*, 48(9), pp. 1919-1926.

- Baraco, J. (2019). Infections Caused by Group C and G *Streptococcus* (*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* and Others): Epidemiological and Clinical Aspects. *American Society for Microbiology*.
- Becker, J., Rohles, M., & Wittmann, C. (2018). Metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* for bio-based production of chemicals, fuels, materials, and healthcare products. *Metabolic Engineering*.
- Benić, M., Cvetnić, L., Habrun, B., & Samardzija, M. (2018). Bovine mastitis: a persistent and evolving problem requiring novel approaches for its control-a review. *Veterinarski arhiv*, 88(4).
- Bhagat, M., Sangral, M., Pandita, S., Vironica., Gupta, S., & Bindu, K. (2017). Pleiotropic Chemodiversity in Extracts and Essential Oil of *Melaleuca viminalis* and *Melaleuca armillaris* of Myrtaceae Family. *Journal of Exploratory Research in Pharmacology*, 2(4), pp. 113-120.
- Bhakat, C., Mahammad, A., Mandal, D., Mandal, A., Rai, A., Chatterjee, A., Dutta, T. (2020). Readily usable strategies to control mastitis for production augmentation in dairy cattle: A review. *Veterinary World*, 13(11).
- Bianchi, R., Schwertz, C., Cecco, B., Panziera, W., Lorenzo, C., Heck, L., Lopes, B. (2019). Pathological and microbiological characterization of mastitis in dairy cows. *Tropical Animal Health and production*.
- Bochniarz, M., Kocki, T., Dąbrowki, R., Szczubial, M., & Wladyslaw, W. (2018). Tryptophan, kynurenine, kynurenic acid concentrations and indoleamine 2,3-dioxygenase activity in serum and milk of dairy cows with subclinical mastitis caused by coagulase-negative *Staphylococcus*. *Reproduction in domestic animals*, pp. 53.
- Bochniarz, M., Piech, T., Kocki, T., Iskra, M., Krukowski, H., & Jagielski, T. (2021). Tryptophan, Kynurenine and Kynurenic Acid Concentrations in Milk and Serum of Dairy Cows with Prototheca Mastitis. *Animals*, 11(12).
- Bochniarz, M., Szczubiat, M., Brodzki, P., Krakwski, L., & Dabrowski, R. (2020). Serum amyloid A as an marker of cow' s mastitis caused by

Streptococcus sp. Comparative Immunology, *Microbiology and infectious disease*.

- Boeris, M., Meglia, G., & Genero, A. (2016). Glándula mamaria y lactación. A secreção do leite e sua composição.
- Buá, A., Molicotti, P., Donadu, M., Usai, D., & Le, S. (2020). Actividad “in vitro” de *Melaleuca cajuputi* frente a especies de micobacterias. *Investigación de producto naturales.*, 34(10).
- Buldain, D., Aliverti, F., Mestorino, N., Gortari, L., Bandoni, A., Buchamer, V., & Marchetti, L. (2020). *Melaleuca armillaris* Essential Oil in Combination With Rifaximin Against *Staphylococcus aureus* Isolated of Dairy Cows. *Frontiers in Veterinary Science*, pp. 7.
- Carbellin, C. (2000). Fisiopatología de la lactancias y calidad de leche. En *Anatomo-fisiología de la glándula mamaria*. La Plata, Buenos aires: Universidad Nacional de la Plata.
- Cárdenas, J., Castillo, O., Cámara, C., & González, V. (2018). Combatiendo la resistencia bacteriana: una revisión sobre las terapias alternas a los antibióticos convencionales. *Bol Venez Infectol*, 29(1).
- Carson, F., Hammer, K., & Riley, T. (2020). *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(1), pp. 1-17.
- Casado, I. (2018). Evaluación diferencial de extractos de orégano en la producción de ácidos grasos volátiles y metano durante fermentación ruminal in vitro. Universidad politécnica de madrid.
- Chanaluisa, U. J. (2019). Estandarización de la Rutina de Ordeño de Bovinos en las Unidades Productivas del Cantón Salcedo (Bachelor's thesis, Ecuador, Latacunga. Universidad Técnica de Cotopaxi (UTC)).
- Chen, M., Zheng, S., Zeng, B., Huang, S., Zhao, J., Zhang, Y., Zhang, H. (2019). Cow-to-mouse fecal transplantations suggest intestinal microbiome as one cause of mastitis. *Microbiome*.

- Chuang, S., YiLi, K., tu, W.-p., Ho, S., Hsu, C., Hsieh, C., & Chen, M. (2021). Investigating the Reciprocal Interrelationships among the Ruminal Microbiota, Metabolome, and Mastitis in Early Lactating Holstein Dairy Cows. *Animals*, 11(11).
- Chung, L., Sahibzada, S., Annandale, H., Robertson, D., Waichigo, F., Tufail, M., & Aleri, J. (2021). Bacterial pathogens associated with clinical and subclinical mastitis in a Mediterranean pasture-based dairy production system of Australia. *Research in veterinary Science*, 141(1), pp. 103-109.
- Collado, R., Montbrau, C., Sitjá, M., & Prenafeta, A. (2018). Study of the efficacy of a *Streptococcus uberis* mastitis vaccine against an experimental intramammary infection with a heterologous strain in dairy cows. *Journal of Dairy Science*.
- Corona, L., Hernández, L., Mendoza, S., Milián, F., Ricardo, D., & Quintanar, D. (2022). In vitro antimicrobial effect of essential tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*), thymol, and carvacrol on microorganisms isolated from cases of bovine clinical mastitis. *International journal of veterinary science and medicine*, 10(1), pp. 72-79.
- Cortes, H., Ruíz, L., & García, R. (2021). Características de conformación asociadas a producción y composición de la leche de vacas Holstein. *Abanico Veterinario*, pp. 11.
- Dalanzeri, F., Schmidt, E., Joaquim, S., Guimarães, F., Guerra, S., Lopes, C. R., Longoni, H. (2020). Concentrations of Acute-Phase Proteins in Milk from Cows with Clinical Mastitis Caused by Different Pathogens. *Pathogens*, 9(9).
- Deb, R., Pal, P., Chaudhary, P., Bhadsavle, S., Behera, M., Parmanand., . . . Sachinandan, D. (2022). Development of gold nanoparticle-based visual assay for rapid detection of *Escherichia coli* specific DNA in milk of cows affected with mastitis. *LWT*, pp. 155.
- Donadu, M., Chowdhury, S., Elgamal, M., Usai, D., Zanetti, S., & Zughairer, S. (2022). Antibacterial activity of *Myrtus communis* L. and *Melaleuca*

leucadendron var. cajaputi essential oils against antibiotic-resistant bacterial strains. *Journal Of Emergency Medicine, Trauma & Acute Care*.

- Du., J., Wang, X., Luo, H., Wang, Y., Liu, X., & Zhou, X. (2018). Epidemiological investigation of non-albicans *Candida* species recovered from mycotic mastitis of cows in Yinchuan, Ningxia of China. *BMC Veterinary Research*.
- Duque, P., Velasco, J., Ceballos, A., Catalina, L., & Carmona, J. (2021). Intramammary treatment using allogeneic pure platelet-rich plasma in cows with subclinical mastitis caused by Gram-positive bacteria. *Scientific*.
- Ebrahimie, E., Ebrahimie, F., Ebrahimi, M., Tomlison, S., & Petrovski, K. (2018). A large-scale study of indicators of sub-clinical mastitis in dairy cattle by attribute weighting analysis of milk composition features: highlighting the predictive power of lactose and electrical conductivity. *Journal of dairy research*.
- Eddie, A. (2018). Uso racional de antimicrobianos y resistencia bacteriana ¿hacia dónde vamos? *Revista Medica Herediana*, 28(1).
- Ejikeme, N., Akintunde, M., Josphine, E., Nnena, C., & Chidi, O. (s.f.). Efecto antimicótico de *Melaleuca alternifolia* en micosis cutáneas. *GSC Ciencias Biológicas y Farmaceuticas*, 11(2), pp. 114-123.
- Esmael, A., Hassan, M., Amer, M., Abdelrahman, S., Hamed, A., Abd-raboh, H., & Foda, M. (2020). Antimicrobial activity of certain natural-based plant oils against the antibiotic-resistant acne bacteria. *Saudi journal of biological sciences*, 27(1), pp. 448-455.
- Ewida, R., & Hosary, A. (2020). Prevalence of enterotoxins and other virulence genes of *Staphylococcus aureus* caused subclinical mastitis in dairy cows. *Veterinary World*, 13(6), pp. 1193-1198.
- Fall, R., Ngom, S., Sall, D., Sembéne, M., & Samb, A. (2017). Chemical characterization of essential oil from the leaves of *Callistemon viminalis* (D.R.) and *Melaleuca leucadendron* (Linn.). *Asian pacific journal of tropical biomedicine*, 7(4), pp. 347-351.

- Fessia, A., & Odierno, L. (2021). Potential factors involved in the early pathogenesis of *Streptococcus uberis* mastitis: a review. *Folia Microbiologica*, pp. 66.
- Filoppo, F., G., M., Mancini, S., Pisseri, F., & Najjar, B. (2021). Evaluation of the in vitro antibacterial activity of some essential oils and their blends against *Staphylococcus* spp. isolated from episodes of sheep mastitis. *Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali*.
- Fonseca, S. (2017). Composición y propiedades de la leche. Química e Sociedad.
- Furfaro, L., Chang, B., & Payne, M. (2018). Perinatal *Streptococcus agalactiae* Epidemiology and Surveillance Targets. Microbiology Careers Salary Survey.
- García Estrella, G. R. (2014). características generales del *Staphylococcus aureus*. Rev. Latinoamericana de Patología Clínica y Medicas de Laboratorio, 61(1), pp. 28 - 40.
- Garzón, t. D. (2019). Revisión bibliográfica del efecto de la clasificación lineal en los parámetros productivos y reproductivos de la raza holstein-Colombia. Doctoral dissertation.
- González, M., Zapata, S., Guerrero, H., Suárez, P., & Cardona, M. (2019). *Klebsiella pneumoniae* and *Streptococcus agalactiae*: Passengers in the sperm travel. Archivos de Urología.
- Gorden, P., Kleinhenz, M., Ydstie, J., Brick, T., Slinden, T., Peterson, M., . . . Brukhardth. (2018). Efficacy of vaccination with a *Klebsiella pneumoniae* siderophore receptor protein vaccine for reduction of *Klebsiella* mastitis in lactating cattle. Journal of Dairy Science.
- Guo, M., Gao, Y., Xue, Y., Lui, Y., Zeng, X., Cheng, Y., Yan, Y. (2021). Bacteriophage Cocktails Protect Dairy Cows Against Mastitis Caused By Drug Resistant *Escherichia coli* Infection. *Front cell. Infec. Microbiol*.

- Harjanti, W., Wahyono, F., & Afifah, N. (2019). Milk production and milk quality of sub-clinical mastitis cows feed with different supplementation of herbal in the diet. *Conf. Series: Earth and Environmental Science*.
- Hoque, N., Rahman, S., Islam, T., Sultana, M., Crandall, K., & Hossain, A. (2022). Induction of mastitis by cow-to-mouse fecal and milk microbiota transplantation causes microbiome dysbiosis and genomic functional perturbation in mice. *Animal Microbiome*.
- Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología. (2021). Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología. Obtenido de INAMHI: <https://www.inamhi.gob.ec/>
- Javadmanesh, A., Tanhaeian, A., Mousavi, S., & Azghandi, M. (2018). (Investigation of recombinant thanatin effects on the growth inhibition of e. coli mastitis in dairy cows). *Bibtex*.
- Kalińska, A., Wójcik, A., Slószarz, J., Kruzińska, B., Michalczyk, M., Jaworski, S., Golebiewski, M. (2018). Occurrence and aetiology of *Staphylococcal* mastitis – a review. *Animal Science Papers and Reports*, pp. 36.
- Kanso, M., Aboul, M., Lakany, A., & Hijazi, M. (April de 2022). Genus *Melaleuca*: Phytochemistry, Pharmacology and effect against covid-19. *Bou Journal- Health And Wellbeing.*, 4(2).
- Käppeli, N., Morach, M., Zurfluh, K., Corti, S., & Nü. (2019). Sequence Types and Antimicrobial Resistance Profiles of *Streptococcus uberis* Isolated From Bovine Mastitis. *Front. Vet. Sci*.
- Kasujja, I. (2021). Evaluación crítica de *Melaleuca alternifolia*: una revisión del perfil fitoquímico, los atributos farmacológicos y las propiedades medicinales en las perspectivas botánica, humana y mundial. *Open Journal of Medicinal Chemistry*, 11(1).
- Khatun, M., Bruckmaier, M., Thomson, P., House, J., & García, S. (2019). Suitability of somatic cell count, electrical conductivity, and lactate

dehydrogenase activity in foremilk before versus after alveolar milk ejection for mastitis detection. *Journal of Dairy Science*.

- Kim, H., Min, Y., & Choi, B. (2019). Real-time temperature monitoring for the early detection of mastitis in dairy cattle: Methods and case research. *Computers And Electronics In Agriculture*.
- Klibi, A., Maaroufi, A., Torres, C., & Jouini, A. (2018). Detection and characterization of methicillin-resistant and susceptible coagulase-negative staphylococci in milk from cows with clinical mastitis in Tunisia. *International Journal of Antimicrobial Agents*.
- Kosar, M., & Demrci, F. (2022). Aceite de árbol de té (*Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel) un importante aceite esencial medicinal. *Revista EMU de ciencias farmacéuticas*, 5(1), pp. 57-74.
- Kulkarni, A., Jan, N., & Nimbarte, S. (2012). Monitoring Of Antimicrobial Effect of GC-MS Standardized *Melaleuca alternifolia* Oil (Tea Tree Oil) On Multidrug Resistant Uropathogens. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 2(1), pp. 6-14.
- Kumar, P. (2020). La influencia de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia* y *Cocos nucifera* en la cepa de *Candida albicans* en acondicionadores de tejidos a intervalos de tiempo variables. *The Journal of indian prosthodontic society*, 20(2), pp. 171-179.
- Kurumisawa, T., Nakamura, Y., Hibana, M., Kamata, T., & Suzuki, K. (2018). La mastitis prototecal bovina está relacionada con la infección persistente en el intestino. *Revista de Ciencias Médicas Veterinaria*.
- Labib, R., Ayoub, I., Michel, H., Mehanny, M., Kamil, V., Hany, M., Mahamed, A. (2019). Appraisal on the wound healing potential of *Melaleuca alternifolia* and *Rosmarinus officinalis* L. essential oil-loaded chitosan topical preparations. *Plos Uno*, 14(9).
- Lam, S., Long, X., Griffin, R., Chen, M., & Doery, J. (2018). Puede el aceite de árbol de té (planta autóctona de Australia: *Melaleuca alternifolia* Cheel)

ser un tratamiento alternativo para la demodicosis humana en la piel. *Parasitología*, 145(12), pp. 1510-1520.

- Larrea, A., Mata, H., & Meglia, G. (2016). Recordatorio Anatómico. En M. Boeris, G. Genero, & G. Meglia, Glandula mamaria y lactación.
- Liabin, L., Xiuli, C., & Zeshi, C. (2019). Identification of Key Candidate Genes in Dairy Cow in Response to *Escherichia coli* Mastitis by Bioinformatical Analysis. *Front. Genet.*
- Macas, M. (2019). relación del volumen aparente de la ubre, frente a la cantidad de leche producida por vacas holstein mestizas, en la provincia de Chimborazo. Escuela superior politécnica de Chimborazo.
- Marinque, T., Hernández, V., & Becerra, A. (2019). Bacterial and fungal infectious etiology causing mastitis in dairy cows in the highlands of Boyacá (Colombia). *Rev. Med. Vet. Zoot.*, 66(3).
- Martínez, G. A. (2017). Determinación del efecto de la suplementación con Se, Cu, Zn, y Cr, en el alimento balanceado suministrado en vacas lecheras, para reducir el número de células somáticas en la leche. Universidad de Guayaquil.
- Martins, L., Barcelos, M., Roger, C., Anderson, K., Santos, M., & Gonçalves, L. (2020). Chronic subclinical mastitis reduces milk and components yield at the cow level. *Journal of dairy research.*
- Massé, J., Dufour, S., & Archambaul, M. (2020). Characterization of *Klebsiella* isolates obtained from clinical mastitis cases in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 103(4), pp. 3392-3400.
- Mazón, J., & Mazón, D. (2022). Anàlisis de resistencia y susceptibilidad antimicrobiana en bacterias asiladas de mastitis bovina en la cooperativa agropecuaria "La colina", Provincia de Pichincha (Ecuador).
- Mbindyo, C., Gitao, C., & Mulei, C. (2020). Prevalence, Etiology, and Risk Factors of Mastitis in Dairy Cattle in Embu and Kajiado Counties, Kenya. *Veterinaty Medicine International.*

- Medrano, E., & Medrano, D. (2020). “Actividad antimicrobiana y efecto desinfectante del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. (orégano) frente a *Staphylococcus aureus* Y *Escherichia coli*”. Lima, Perú.
- Melo, M., Ortiz, D., & Hurtado, A. (2020). Comparación de la composición y de la actividad antioxidante del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla*) obtenido mediante extracción con fluidos supercríticos y otras técnicas verdes. *Ciencias químicas*, 845-856.
- Mengistie, D. (2022). PCR- based detection and identification of mastitis-causing bacteria: A review. *Archives of Infectious Diseases & Therapy*, 6(2), pp. 163-168.
- Minqiu, F. L., Zhao, C., Gao, S., Bao, L., Zhao, Y., Fu, Y., & Xiaoyu, H. (2022). Commensal *Bacillus subtilis* from cow milk inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and mastitis in mice. *FEMS Microbiology Ecology*.
- Miranda, V. (2018). Efecto inhibitorio del aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* al 100% frente a *Streptococcus mutans* considerando como control positivo la clorhexidina al 0,12% y como control negativo agua estéril. Universidad Internacional Del Ecuador.
- Mircu, C., Matiuti, M., Tepes, T., Lungu, B., & Boldura, O. T. (2019). Notes on somatic cells count in dairy mastitis detection. *lucrări științifice medicină veterinară*.
- Moroni, G., Cardin, E., Rendina, C., Millar, V., Felipe, J., & Martino, P. (2020). In Vitro Efficacy of Essential Oils from *Melaleuca alternifolia* and *Rosmarinus Officinalis*, Manuka Honey-based Gel, and Propolis as Antibacterial Agents Against Canine *Staphylococcus pseudintermedius* Strains. *Antibiotics*, 9(6), pp. 344.
- Morsoleto, F., Werneck, P., Bomfim, F., Esquisatto, M., & Morsoleto, M. (2022). Therapeutic ultrasound and essential oil of *melaleuca alternifolia* interfere with muscle regeneration? *Research, Society and Developmen*, 11(6).

- Mushtaq, S., Manzoor, A., Shah, A., Ahmad, S., Hussain, A., Hassan, P., & Ali, M. (2018). Bovine mastitis: An appraisal of its alternative herbal cure. *Microbial Pathogenesis*.
- Neves, R., Barros, L., Mendes, S., Amorim, T., Ferraz, V., Mateus, L., . . . Ferreira, A. (2020). The sensitivity of *Demodex canis* (Acari: Demodicidae) to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* – an in vitro study. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 29(3).
- Nobrega, D., Naqvi, A., Dufour, S., Deardon, R., Kastelic, P., Buck, J., & Barkema, H. (2020). Critically important antimicrobials are generally not needed to treat nonsevere clinical mastitis in lactating dairy cows: Results from a network meta-analysis. *Journal of dairy Science*, 103(11).
- Oliva, A., Costantini, S., De Angelis, M., Garzoli, S., Bozovic, M., Mascellino, T., Rango, R. (2018). High Potency of *Melaleuca alternifolia* Essential Oil against Multi-Drug Resistant Gram-Negative Bacteria and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, 23(10), pp. 2584.
- Oliveira, R., Teixeira, A., Barbosa, J., Feiria, B., Boni, G., Maia, F., . . . Höfling, J. (2020). *Melaleuca* spp essential oil and its medical applicability. a brief review. *Brazilian Journal Of Natural Sciences*, 3(1), pp. 249-258.
- OMS, O. M. (2020). La falta de nuevos antibióticos pone en peligro los esfuerzos mundiales por contener las infecciones farmacorresistentes. Obtenido de <https://www.who.int/es/news/item/17-01-2020-lack-of-new-antibiotics-threatens-global-efforts-to-contain-drug-resistant-infections>
- Ossa, C., Llanos, C., & García, A. (2020). Evaluación de las características fisicoquímicas y de la actividad antimicrobiana del aceite del árbol de té contra *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*) ATCC 6919. *Biomédica*, 40(4), pp. 693-701.
- Padilla, G. (2020). Moléculas naturales con potencial uso como alternativa para el control de la mastitis bovina. Universidad de Cundinamarca.
- Padma, T., Kaushita, B., Saha, G., Sahoo., & P. (2019). Alumina nanoparticle incorporated *Melaleuca alternifolia* oil formulation for control of

Streptococcus mutans isolated from dental caries. *Journal of microbiology, biotechnology and food Sciences*, 9(1), pp. 44-52.

- Paliy, A., Ulko, S., Bogomalov, O., Korkishchenko, K., Kambur, M., Zamazyi, A., Paliy. (2020). Species composition of microbiota of cows udder and raw quality at mastitis. *Ukrainia Journal of Ecology*, 10(3), pp. 75-85.
- Panda, S., Das, D., Jena, B., & Sahoo, A. (2018). Somatic Cell Count: A Biomarker for Early Diagnosis and Therapeutic Evaluation in Bovine Mastitis. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 7(3), pp. 1459-1463.
- Piekarcz, T., Mertas, A., Wiatrak, C., Rój, R., Kownacki, P., Wilczewska, J., Morawiec. (2017). La influencia de la pasta de dientes que contiene aceite australiano de *Melaleuca alternifolia* y extracto etanólico de propóleo polaco en la higiene bucal y el microbioma en pacientes que requieren procedimientos conservadores. *Moléculas*, 22(11).
- Pirola, S. (2017). Evaluación de la capacidad de persistencia en células epiteliales mamarias bovinas de cepas de *S. aureus* aislados de infecciones intramamarias transitorias y persistentes. *Encuentro de Jóvenes Investigadores*.
- Prado, M. (2015). Anatomía macroscópica. En M. Prado, Guía paractica de produccion bovina (Mastitis bovina). pp.1.
- Prapaiwong, T., Srakaew, W., Wachirapakorn, C., & Jarassaeng, C. (2021). Effects of hydrolyzable tannin extract obtained from sweet chestnut wood (*Castanea sativa* Mill.) against bacteria causing subclinical mastitis in Thai Friesian dairy cows. *Veterinary World*.
- Puvača, N., Milenković, J., Galonja, T., Bursić, V., Petrovic, A., Tanasković, S., Milikovic, T. (2021). Antimicrobial activity of selected essential oils against selected pathogenic bacteria: in vitro study. *Antibiotics*, 10(5), pp. 546- 560.
- Puvača, N., Petrovic, A., & Bursic, V. (2018). Microbial, Antioxidant And Acaricidal Properties Of Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*). *Journal Of Agronomy, Technology And Engineering Management*, 1(1), pp. 29-38.

- Quevedo, W. (2018). Somatic cell count (rsc) as an indicator in the resistance of bovine mastitis. *Revista Ciencia, Tecnología e Innovación.*, 16(17).
- Quispe, P. K. (2022). Principales agentes bacterianos en la Mastitis bovina. Universidad Técnica de Babahoyo.
- Raabe, V., & Shane, A. (2019). Group B *Streptococcus* (*Streptococcus agalactiae*). *Microbiology Careers Salary Survey*.
- Rad, S., Salehi, B., Varoni, E., Sharopov, F., Yousaf, Z., Ayatollahi, S., Iriti, M. (2017). Plants of the Melaleuca Genus as Antimicrobial Agents: From Farm to Pharmacy. *Phytotherapy Research*.
- Ramadan, M., Shawkey, A., Rabeh, M., & Abdellatif, A. (2020). Promising antimicrobial activities of oil and silver nanoparticles obtained from melaleuca alternifolia leaves against selected skin-infection pathogens. *Journal of herbal medicine*, 20, pp. 100289.
- Ramadan, M., Shawkey, A., Rabeh, M., & Abdellatif, A. (April de 2020). Promising antimicrobial activities of oil and silver nanoparticles obtained from Melaleuca alternifolia leaves against selected skin-infecting pathogens. *Journal of herbal medicine*, 20(1).
- Ranasinghe, K., Deshapriya, C., Abeygunawardana, D., Rahularaj, R., & Dematawewa, B. (2021). Subclinical mastitis in dairy cows in major milk-producing areas of Sri Lanka: Prevalence, associated risk factors, and effects on reproduction. *Journal Of Dairy Science*.
- Restrepo, M., & Vargas, C. (2020). Relación entre forma del pezón y el recuento de células somáticas en una lechería en Viterbo, Caldas.
- Rivera, P., Bruna, L., Alarcón, C., Cayupe, B., González, C., Rojas, G., & Fuentes, C. (2020). Antimicrobial and Antibiofilm Capacity of Chitosan Nanoparticles against Wild Type Strain of Pseudomonas sp. Isolated from Milk of Cows Diagnosed with Bovine Mastitis. *Antibiotics*, 9(9), pp. 551.

- Rojas, P., Tello, F. L., Arias, M., & López, F. (2022). Evaluación de las características de producción y tipo en vacas Holstein. *Polo del conocimiento*, 7(5), pp. 1722-1738.
- Ruiz, G., Peña, R., & Remón, D. (2016). Mastitis bovina en cuba. *Revista de producción animal*, 28(2-3), pp. 39-50.
- Rukamana, M., Rakhmatysah, A., & Wardana. (2021). Mastitis detection system in dairy cow milk based on fuzzy inference system using electrical conductivity and power of hydrogen sensor value. *Emitter International Journal Of Engineering Technology*, 9(1), pp. 154-168.
- Sayed, A., & Kamel, M. (2021). Bovine mastitis prevention and control in the post-antibiotic era. *Tropical Animal Health and Production* .
- Schauer, B., Wald, R., Urbantke, V., Loncaric, I., & Boumgarther, M. (2021). Tracing Mastitis Pathogens—Epidemiological Investigations of a *Pseudomonas aeruginosa* Mastitis Outbreak in an Austrian Dairy Herd. *Animals*, 11(2).
- Schultz, R., Smitg, K., Hongan, J., & Love, B. (2017). Antimicrobial Susceptibility Of Mastitis Pathogens From First Lactation And Older Cows. *Elsevier*.
- Seija, V. (2019). Cocos Gram Positivos: Aspectos Prácticos. *Higiene. edu*.
- Seligsohn, D., Younan, M., Larsen, T., Morrell, M., Chenais, E., & Nyman, A. (2021). Detection of subclinical mastitis in camels (*Camelus dromedarius*) using somatic cell count, N-acetyl- β -D-glucosaminidase and lactate dehydrogenase activity. *Small Ruminant Research*, pp. 204.
- Sghaien, S., Abbassi, S., Pascual, A., Serrano, L., Alba, D., Said, M., Cerero, L. (2019). Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae from animal origin and wastewater in Tunisia: first detection of O25b-B23-CTX-M-27-ST131 *Escherichia coli* and CTX-M-15/OXA-204-producing *Citrobacter freundii* from wastewater. *Journal of Global Antimicrobial resistance*, pp. 180-194.

- Shaheen, T., Ahmad, B., Rehman, U., Muzamil, S., Bhat, R., Hussain, I., Dawood, M. (2020). Investigations on cytokines and proteins in lactating cows with and without naturally occurring mastitis. *Journal of King saud university science*.
- Sharif, S., Okello, E., ElAshmawy, W., Williams, D., Anderson, R., Rossitto, P., Lehenbauer, T. (2022). Effectiveness of Intramammary Antibiotics, Internal Teat Sealants, or Both at Dry-Off in Dairy Cows: Clinical Mastitis and Culling Outcomes. *Antibiotics*, 11(7).
- Sharifi, S., Shahreza, M., Pakdel, A., Reecy, J., Ghadiri, N., Atashi, H., . . . Ebrahimie, E. (2022). Systems Biology–Derived Genetic Signatures of Mastitis in Dairy Cattle: A New Avenue for Drug Repurposing. *Animals*.
- Sharun, K., Dhama, K., Tiwari, R., Gugjoo, M., Yato, M., Kumar, P. P., Chaicumpa, W. (2021). Advances in therapeutic and managerial approaches of bovine mastitis: a comprehensive review. *Veterinary Quarterly*.
- Sichieri, F., De Assis Kretzl, F., & Bonapaz, R. (2019). Avaliação da capacidade antimicrobiana de amostras comerciais do óleos essencial de *Melaleuca alternifolia* e de *Rosmarinus officinalis*. *TCC's Biomedicina*.
- Sinha, R., Bhakat, M., Mohanty, K., Ranjan, A., Kumar, R., Lone, A., Ziaulla, D. (2018). Infrared thermography as non-invasive technique for early detection of mastitis in dairy animals -A review. *Asian J. Dairy & Food Res*, 37(1), pp. 1-6.
- Solis, P. (2011). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare* L.) y Tomillo (*Thymus vulgaris* L.) como potenciales bioconservadores en carne de pollo. Riobamba - Chimborazo.
- Srikok, S., Patchanee, P., Boonyayatra, S., & Chuammitri, P. (2020). Potential role of MicroRNA as a diagnostic tool in the detection of bovine mastitis. *Preventive Veterinary Medicina*, pp. 182.

- Stella, R., Wiechert, J., Noack, S., & Frunzke, J. (2019). Evolutionary engineering of *Corynebacterium glutamicum*. *Biopolymers Special Collection*.
- Thomsen, P., Jensen, T., Hammer, K., Carson, C., Mølgaard, P., & Riley, T. (2011). Survey of the Antimicrobial Activity of Commercially Available Australian Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) Essential Oil Products In Vitro. *The Journal Of Alternative And Complementary Medicine*, 17(9), pp. 835-841.
- Tytukh, Y., Musiienko, Y., & Grebenik, N. (2021). Application of *Bacillus megaterium* for Subclinical Mastitis in Cows. *SSRN*.
- vezina, B., Harbi, H., Ramay, H., Soust, M., Moore, R., Olchow, J., & Alawneh. (2021). Sequence characterization and novel insights into bovine mastitis-associated *Streptococcus uberis* in dairy herds. *Scientific Reports*.
- Voort, M., Jensen, D., Kamphuis, C., Athanasiadis, N., Vries, D., & Hogeveen. (2021). Invited review: Toward a common language in data-driven mastitis detection research. *Journal of dairy Science*.
- Vyas, S., Shukla, V., & Doshi, N. (2019). FMD and Mastitis Disease Detection in Cows Using Internet of Things (IOT). *Procedia Computer Science*.
- Wang, D., Liu, L., Augustino, S., Hall, T., Machugh, D., Dou, J., Ying, Y. (2020). Identification of novel molecular markers of mastitis caused by *Staphylococcus aureus* using gene expression profiling in two consecutive generations of Chinese Holstein dairy cattle. *Journal of animal science and biotechnology*.
- Wattianux, M. A. (s, f). Secreción de leche por la ubre de una vaca lechera. en esenciales lecheras. Guías técnicas lecheras, *Instituto Babcock*, pp. 77-80.
- Wente, N., Klocke, D., Paduch, H., Zhang, Y., Seeth, M., Zochegolob, V., . . . Krömker, V. (2019). Associations between *Streptococcus uberis* strains from the animal environment and clinical bovine mastitis cases. *Journal of dairy Science*.

- Xiaoyu, H., Tang, R., Zhao, C., Mu, R., Wang, Y., Cao, Y., . . . Fu, Y. (2021). The Prevention Effect of *Bacillus subtilis* on *Escherichia coli*-Induced Mastitis in Mice by Suppressing the NF- κ B and MAPK Signaling Pathways. *Probiotics and antimicrobial proteins*.
- Yapicier, S., Ozturk, D., & Mehmet, K. (2019). First Documented Mastitis Case of *Nocardia puris* in Turkey from Two Cows: Microbiological and Molecular Identification. *Res. J. Microbiol.*
- Yufang, L. (2019). An integrative medicine physician's perspective on herbal and energy medicine. *Medicina china longua*, 2(1).
- Zaatout, N., Ayachi, A., Kecha, M., & Kadlec, K. (2019). Identification of staphylococci causing mastitis in dairy cattle from Algeria and characterization of *Staphylococcus aureus*. *Jornal of Applied Microbiology*.
- Zhan, K., Yang, T., Feng, B., Zhu, X., Chen, Y., Huo, Y., & Zhao, G. (2020). The protective roles of tea tree oil extracts in bovine mammary cells and polymorphonuclear leukocytes. *Journal of animal science and biotechnology*, 11(62), pp. 1-12.
- Zhang, X., Guo, Y., Guo, L., Jiang, H., & Ji, Q. (2018). Evaluación in vitro de las actividades antioxidantes y antimicrobianas del aceite esencial de *Melaleuca alternifolia*. *Hindawi BioMed Research Internationa*, 2018, pp. 1-8.
- Zhu, C., Tang, K., Lu, X., Tang, J., & Laghi, L. (2021). An Untargeted Metabolomics Investigation of Milk from Dairy Cows with Clinical Mastitis by ¹H-NMR. *Foods*

ANEXOS

Anexo 1.

Lugar de la experimentación



Fuente: (Google Earth, 2022).

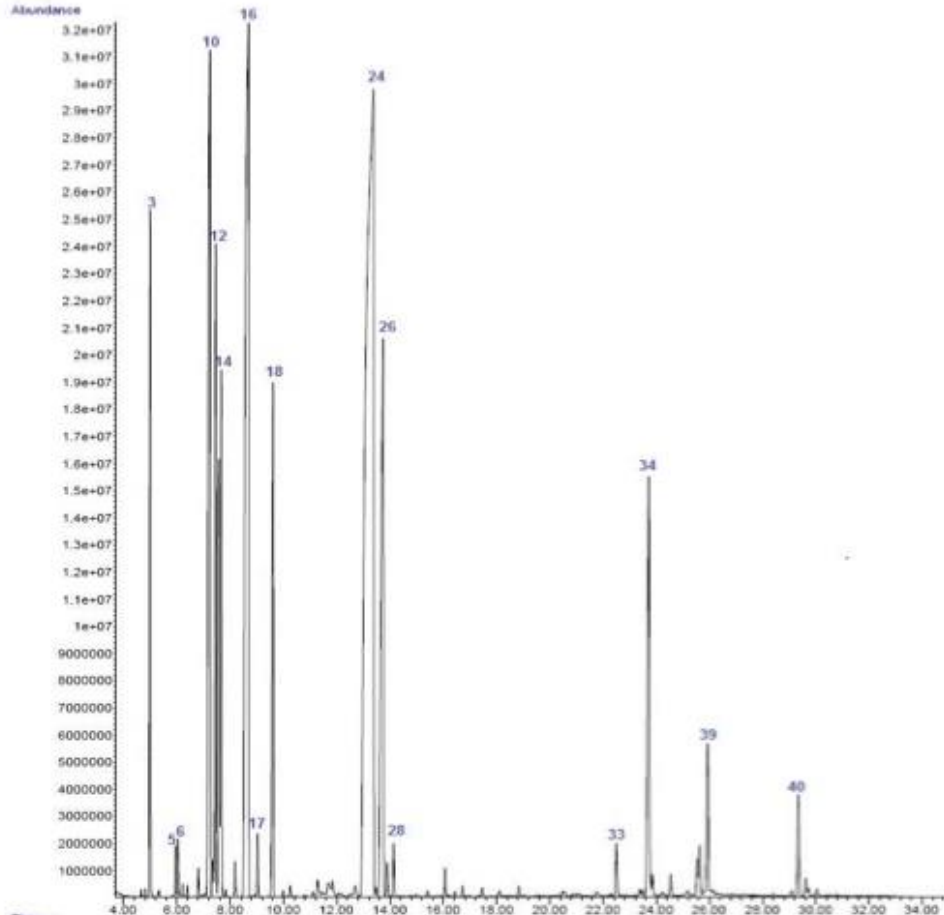
Anexo 2.


Informe del análisis cromatográfico

 UNIVERSIDAD del BÍO-BÍO	VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN	LABORATORIOS DE INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN	Código	FPG12-01
		Laguacoto II, Km 1 1/2, vía a San Simón, Cantón Guaranda, Provincia Bolívar, Ecuador.	Versión	1
		INFORME DE RESULTADOS	Año	2023
			Página	Página 1 de 3

INFORME DE ENSAYOS N°084-2023

Descripción de la muestra	
Muestra	Aceite esencial de arbol de te (<i>Melaleuca alternifolia</i>)
Código asignado UEB	INV 193
Estado de la muestra	Líquido
Envase de recepción	Frasco de vidrio color ámbar con 10mL aprox de muestra
Análisis requerido(s)	Identificación de compuestos volátiles por GC-MS
Fecha de recepción	02 de mayo de 2023
Fecha de análisis	03 y 08 de mayo de 2023
Fecha de informe	08 de mayo de 2023
Técnico asignado	ECCR

RESULTADOS OBTENIDOS	
 <p>The chromatogram displays the abundance of various compounds over time. The y-axis represents abundance, ranging from 0 to 3.2e+07. The x-axis represents time in minutes, ranging from 4.00 to 34.00. The most prominent peaks are labeled with their retention times: 3, 5, 6, 10, 12, 14, 16, 17, 18, 24, 26, 28, 33, 34, 39, and 40. The peak at 16 minutes is the highest, reaching an abundance of approximately 3.2e+07. Other significant peaks are at 10, 24, and 34 minutes.</p>	

 VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN	LABORATORIOS DE INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN <small>Lagunacoto II, Km 1 1/2, vía a San Simón, Cantón Guaranda, Provincia Bolívar, Ecuador.</small>	Código	FPG12-01
	INFORME DE RESULTADOS	Versión	1
		Año	2023
		Página	Página 2 de 3

EQUIPO		GC AGILENT TECHNOLOGIES 7890 A	
DETECTOR		AGILENT TECHNOLOGIES 5977A MSD	
COLUMNA		Columna HP-5MS (30m x 0.250mm x 0.25µm)	
MÉTODO CROMATOGRÁFICO		Temperatura del inyector: 220°C; Modo de inyección: Split 50:1, volumen de inyección: 1 µL; Programa térmico: Temperatura del horno 60°C con una rampa de temperatura de 3 °C/min hasta 240 °C. Tiempo total de corrida: 60 minutos	
N°	Compuesto	Tiempo de retención (min)	Área (%)
1	1-Vinyl-5,5-dimethyl[2.1.1]bicyclohexane	4.663	0.38
2	α-Thujene	4.820	0.41
3	d-α-Pinene	5.000	4.13
4	Camphene	5.340	0.20
5	Sabinene	5.949	0.25
6	L-β-Pinene	6.045	0.30
7	3-p-Menthene	6.221	0.07
8	β-Myrcene	6.396	0.06
9	α-Phellandrene	6.804	0.17
10	α-Terpinene	7.234	9.61
11	p-Menth-1-ene	7.346	0.19
12	β-Cymene	7.457	5.18
13	D-Limonene	7.585	2.99
14	Eucalyptol	7.670	3.04
15	β-cis-Ocimene	8.183	0.27
16	γ-Terpinene	8.684	16.71
17	Linalool oxide, (Z)	9.029	0.41
18	α-Terpinolene	9.606	3.82
19		10.253	0.08

 UNIVERSIDAD ESTADUAL BOLÍVAR	VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN	LABORATORIOS DE INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN <small>Laguacoto II, Km 1 1/2, vía a San Simón, Cantón Guaranda, Provincia Bolívar, Ecuador.</small>	
		Código	FPG12-01
		Versión	1
		Año	2023
INFORME DE RESULTADOS		Página	Página 3 de 3

20	1-Terpineol	11.285	0.19
21	β -Terpineol	11.676	0.26
22	E-2-Caren-4-ol	11.836	0.17
23	p-Menth-8-en-2-ol	12.689	0.17
24	L-terpinen-4-ol	13.368	34.02
25	3,9-Epoxy-p-menth-1-ene	13.479	0.07
26	α -Terpineol	13.737	7.78
27	γ -Terpineol	13.891	0.22
28	2(5H)-Furanone, 5-(2-methyl-3-methylene-4-butyl)-	14.135	0.34
29	trans-Ascaridol glycol	16.064	0.20
30	trans-Ascaridol glycol	16.719	0.08
31	trans-Ascaridol glycol	17.457	0.08
32	Spiro[2,3]hexan-4-one, 5,5-diethyl-6,6-dimethyl-	18.832	0.08
33	α -Gurjunene	22.497	0.42
34	Aromandendrene	23.711	4.38
35	Selina-5,11-diene	23.848	0.16
36	Alloaromadendrene	24.532	0.18
37	β -Selinene	25.549	0.30
38		25.637	0.39
39	Viridflorene	25.937	1.27
40	(-)-Globulol	29.339	0.85
41	Viridflorol	29.619	0.10

Los compuestos fueron identificados con la Librería NIST14.L.



ISIDRO FAVIAN BAYAS
MOREJÓN

Ing. Favian Bayas Morejón PhD.
Director DIVIUEB
Teléf. (+593) 99 031 6224

Anexo 3

Base de datos

#	Código	<i>Escherichia coli</i>															T0: Testigo (FOX30µg)
		T1:10%			T2:20%			T3:30%			50%			75%			
		R1	R2	\bar{x}	R1	R2	\bar{x}	R1	R2	\bar{x}	R1	R2	\bar{x}	R1	R2	\bar{x}	
1	D002PI	2	2	2	6	5	5,5	9	8	8,5	11	12	11,5	16	18	17	19
2	D003PI	1	2	1.5	5	5	5	8	8	8	10	11	10,5	17	16	16,5	17
3	EA006PI	3	3	3	7	6	6,5	10	9	9,5	12	13	12,5	20	19	19,5	20
4	AR001AI	1	2	1.5	6	6	6	7	9	8	11	10	10,5	16	18	17	16
5	AR001AD	2	1	1.5	5	6	5,5	11	10	10,5	12	13	12,5	18	19	18,5	19
6	AR002PD	2	3	2.5	4	5	4,5	9	9	9	11	10	10,5	21	20	20,5	18
7	AR0004PD	2	2	2	6	5	5,5	8	7	7,5	10	10	10	18	19	18,5	17
8	AR013PI	3	2	2.5	7	6	6,5	9	8	8,5	12	11	11,5	16	19	17,5	19
9	SV001PI	3	4	3.5	5	7	6	9	10	9,5	12	14	13	22	22	22	20
10	SV002PI	3	2	2.5	6	6	6	10	10	10	12	13	12,5	19	15	17	19

<i>Klebsiella</i>																	
#	Código	T1:10%			T2:20%			T3:30%			T4:50%			T5:75%			Testigo (FOX30µg)
		R1	R2	\bar{x}	R1	R2	\bar{x}	R1	R2	\bar{x}	R1	R2	\bar{x}	R1	R2	\bar{x}	
1	EA006PD	8	8	8	10	9	9,5	14	14	14	17	18	17,5	21	23	22	24
2	EA007PI	8	5	6,5	11	12	11,5	15	16	15,5	17	19	18	20	24	22	20
3	EA008PI	6	7	6,5	11	11	11	13	14	13,5	19	19	19	22	23	22,5	19
4	EA012PD	4	3	3,5	13	12	12,5	16	13	14,5	17	16	16,5	25	24	24,5	15
5	EA013AI	8	8	8	10	9	9,5	15	15	15	17	17	17	24	22	23	17
6	EA014AD	7	7	7	10	10	10	14	13	13,5	19	18	18,5	21	23	22	20
7	AR014PD	8	6	7	8	10	9	12	14	13	18	18	18	24	25	24,5	11
8	AR015PI	8	8	8	11	12	11,5	15	15	15	17	18	17,5	24	24	24	19
9	AR016PD	9	7	8	11	11	11	14	14	14	16	19	17,5	25	25	25	17
10	MCH001PD	8	8	8	10	9	9,5	15	13	14	18	17	17,5	25	23	24	15

Staphylococcus aureus

#	Código	T1:10%			T2:20%			T3:30%			T4:50%			T5:75%			T0: Testigo (FOX30µg)
		R1	R2	\bar{x}	R1	R2	\bar{x}	R1	R2	\bar{x}	R1	R2	\bar{x}	R1	R2	\bar{x}	
1	D001AI	9	11	10	12	12	12	14	13	13,5	17	19	18	22	20	21	13
2	D004AI	9	9	9	13	11	12	15	15	15	20	19	19,5	24	26	25	14
3	D004AD	8	9	8,5	14	12	13	17	14	15,5	20	18	19	25	22	23,5	13
4	EA001AI	10	11	10,5	13	11	12	15	13	14	17	19	18	27	27	27	16
5	EA002PI	10	12	11	12	13	12,5	16	16	16	18	22	20	29	27	28	18
6	EA003PD	9	10	9,5	11	12	11,5	15	15	15	20	20	20	28	29	28,5	22
7	EA004AI	8	10	9	14	13	13,5	15	14	14,5	23	24	23,5	27	27	27	23
8	EA004AD	9	10	9,5	14	13	13,5	16	16	16	21	22	21,5	26	26	26	19
9	EA005PI	11	11	11	15	12	13,5	17	16	16,5	19	21	20	25	25	25	20
10	EA009AI	11	9	10	14	13	13,5	15	15	15	18	20	19	24	25	24,5	21

Anexo 4

Fotografías del trabajo experimental



Foto 1. Selección del material vegetal



Foto 2. Preparación del material vegetal



Foto 3. Proceso de destilado por arrastre de vapor



Foto 4. Purificación de los cultivo



Foto 5. Selección de los cultivos



Foto 6. Ajuste de la escala McFarladn 0.5%

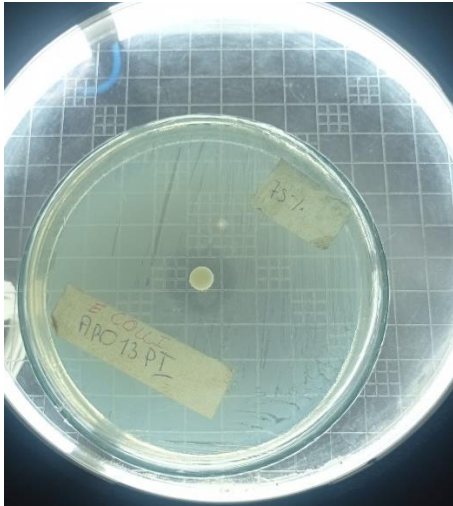


Foto 7. Halos de inhibición del 75% en *Escherichia coli*

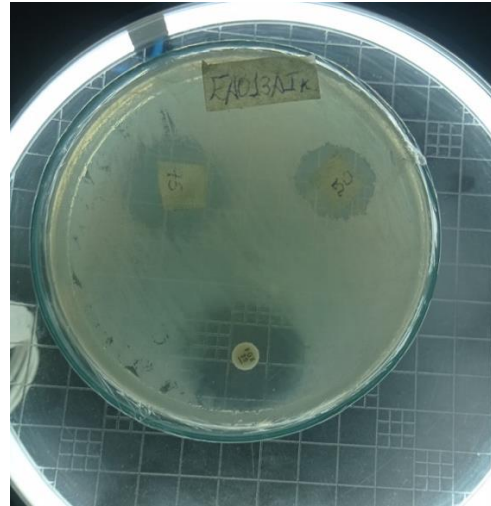


Foto 8. Halos de inhibición del 50% y 75% en *Klebsiella spp.*

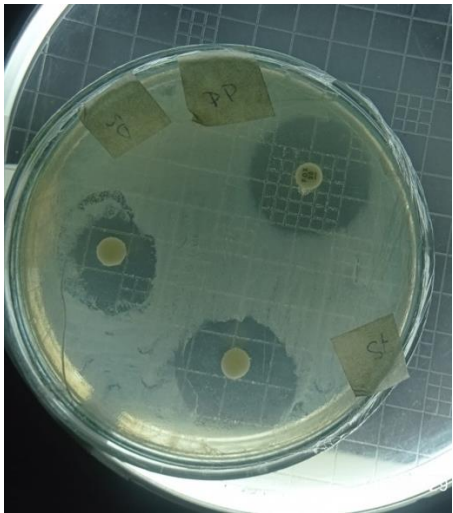


Foto 9. Halos de inhibición del 50% y 75% en *Staphylococcus aureus* .

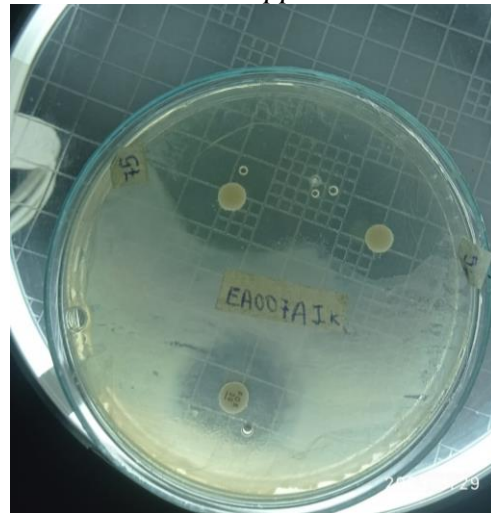


Foto 10. Halos de inhibición del 50% y 75% en *Klebsiella spp.*



Foto 11. Halos de inhibición del 50% y 75% en *Staphylococcus aureus* .

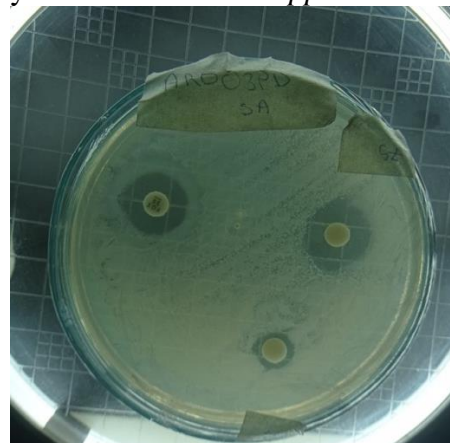


Foto 12. Halos de inhibición del 50% y 75% en *Staphylococcus aureus* .

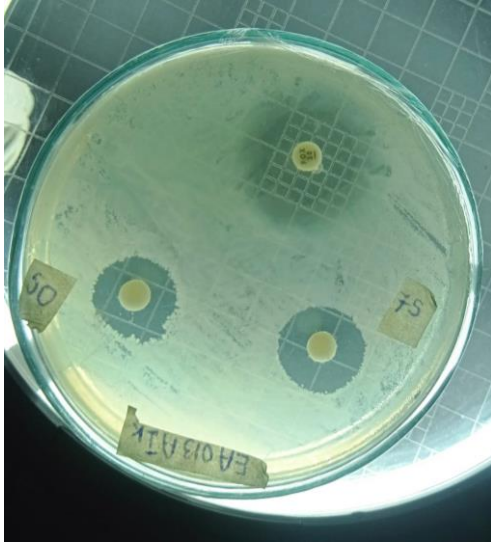


Foto 13. Halos de inhibición del 50% y 75% en *Klebsiella spp*

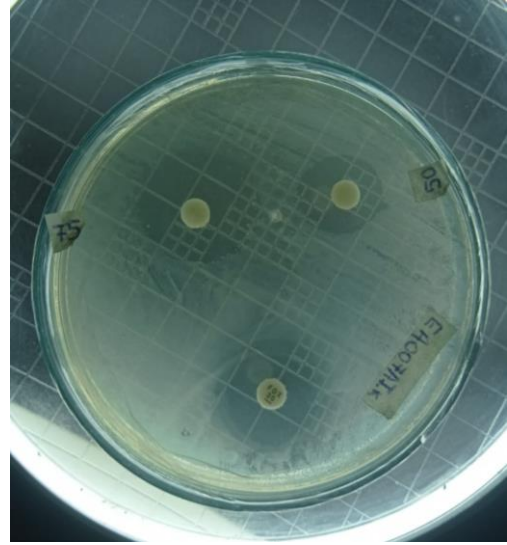


Foto 14. Halos de inhibición del 50% y 75% en *Klebsiella spp*

Anexo 5.

Glosario de términos

- **Adhesina:** Componente de superficie de un microbio que se une con un receptor celular.
- **Agar:** Polisacárido derivado de algas y que se utiliza como agente de solidificación para los medios de cultivo.
- **Antibiótico:** También denominados antibacterianos, son unas moléculas que bloquean el crecimiento de ciertas bacterias y se prescriben habitualmente para tratar infecciones bacterianas
- **Bacteria:** son microorganismos procariotas (células sin núcleo, a diferencia de las células eucariotas que tienen núcleo y son las células que componen el cuerpo humano), fueron de las primeras formas de vida que aparecieron en la Tierra.
- **Beta-lactamasa:** enzimas producidas por determinadas bacterias que le confiere resistencia a los antibióticos beta-lactámicos debido a su capacidad hidrolizante del anillo beta-lactámico presente en sus estructuras químicas.
- **Contaminación:** es la introducción de un agente microbiológico extraño en un alimento o en un ambiente estéril.
- **Enterotoxina:** Sustancia toxica producida por un grupo específico de microorganismos, generalmente estas sustancias son producidas por bacterias que pertenecen a la familia de las Enterobacteriaceae.
- **Espora:** Son porciones encapsuladas que participan en la supervivencia y dispersión de material bacteriano, el mismo que participa en la reproducción, en dependencia del microorganismo la formación de esporas puede considerarse un factor de virulencia.
- **Gram negativa:** grupo de bacterias procariotas que cuando se tiñen con la técnica de tinción de Gram se observan al microscopio de una coloración rosa, o fucsia debido a las características de la membrana bacteriana la misma que posee poca cantidad de peptidoglicano.

- **Hidrogenaza:** es un tipo de enzimas producidas por determinados microorganismos, la cual se encarga de adicionar H₂ al medio de crecimiento microbiano, generalmente es producida por microorganismos anaerobios.
- **Infección:** Colonización de un género bacteriano en el organismo vivo de un animal.
- **Inflamación:** mecanismo de respuesta del organismo vivo del hospedador cuando ocurre un determinado grado de lesión tisular ocasionada por diversos factores.
- **Inhibición:** se considerada como la disminución del crecimiento bacteriano ocasionada por muerte de los microorganismos presentes en un medio de crecimiento generalmente propiciada por un agente inhibitorio.
- **Lisis:** se considera como la disrupción o desintegración de estructuras celulares bacterianas generalmente su pared, lo que provoca desintegración y liberación de los componentes citoplasmáticos.
- **Medio de cultivo:** es considerado una solución compilada de polisacáridos que favorecen el crecimiento microbiano con finalidad de estudio investigativo.
- **Mesófilo:** microorganismo biológico el cual tiene la capacidad de crecer a una temperatura que va desde los 18° C a los 45°C.
- **Patógeno:** microorganismo capaz de interactuar de manera negativo con la organización tisular del hospedador y causar un daño.
- **pH:** se refiere a la escala de medición del logaritmo de concentración de iones de hidrógeno presentes en una solución.
- **Quinolona:** son un grupo de antimicrobianos cuyo mecanismo de acción hace referencia a la inhibición del ADN girasa impidiendo la transcripción y secuenciación de bases del ADN a nivel ribosomal.
- **Resistencia antimicrobiana:** es la capacidad de un agente bacteriano de resistir al mecanismo de acción de un agente farmacológico el cual puede ser un antibiótico.

- **Turbidez:** Escala de medida en base a la cantidad de moléculas suspendidas en un medio líquido.
- **Xenófilo:** microorganismo con capacidades de crecer y resistir en medios con bajo contenido de humedad.
- **Zoonosis:** Enfermedad que inicia su progresión patológica en el organismo animal pero que puede ser transmitida al organismo humano

