

Evaluación *in vitro* de extractos de *Eucalyptus citriodora* Hook y *Eucalyptus saligna* Sm. como posibles antisépticos mamarios

Guillermo Barreto Argilagos*, Bertha Velázquez Pérez**, Yordanka Peña Mejías*** y Herlinda Rodríguez Torrens****

* Centro de Estudios para el Desarrollo de la Producción Animal (CEDEPA), Universidad de Camagüey, Cuba

** Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Camagüey

*** Empresa Provincial de Medicamentos, Camagüey

**** Unidad Estrella 1, Agropecuaria-FAR, Camagüey

guillermo.barreto@reduc.edu.cu

RESUMEN

Con el objetivo de obtener antisépticos mamarios a partir de plantas se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* de tinturas de cortezas de *Eucalyptus citriodora* Hook y *Eucalyptus saligna* Sm. sobre 2 cepas de *Staphylococcus aureus* (referente y salvaje). La cepa autóctona era resistente a penicilina, gentamicina e intermedia a estreptomycin. Los extractos de *Eucalyptus citriodora* Hook (20 y 83% de alcohol) resultaron más eficaces que sus similares de *E. saligna* Sm. y ambos superiores a los antibióticos penicilina y gentamicina. No hubo diferencia significativa en la sensibilidad de ambas cepas hacia los extractos evaluados. La obtención y aplicación de dichos extractos resulta económica.

Palabras clave: mastitis, antisépticos mamarios, plantas medicinales, eucalipto

ABSTRACT

In vitro antibacterial coverage of bark stains from *Eucalyptus citriodora* Hooek and *Eucalyptus saligna* Sm on two *Staphylococcus aureus* strains (a reference strain and a wild one) was assessed as background for obtaining mammary antiseptics out of plants. The native strain was resistant to penicillin, gentamycin, and an intermediate to streptomycin. *Eucalyptus citriodora* extracts (20 % and 83 % alcohol) were more efficient than *E. saligna* ones. Both plant extracts proved their efficiency compared to penicillin and gentamycin antibiotics. No significant differences concerning both strains response to the assessed extracts was found. Manufacturing and application of these extracts are economical.

Key words: mastitis, mammary antiseptic, medicinal plants, eucalyptus

INTRODUCCIÓN

La mastitis es una enfermedad que afecta a la ganadería lechera por su amplia difusión y las enormes pérdidas económicas que ocasiona, debidas a la disminución en el rendimiento de las vacas, al empeoramiento de las características biológicas y tecnológicas de la leche, que reducen su calidad, y a los gastos para asistencia y tratamientos veterinarios (Miranda *et al.*, 1981; Acosta, 1988).

La antibioterapia constituye la opción más generalizada en su tratamiento dado el amplio espectro microbiano involucrado (Dewdney, 1999). Esta variante presenta también ciertos inconvenientes: ocasiona residuos en la leche que constituyen riesgos para la salud humana, afecta las produc-

ciones de diversos derivados lácteos y engendra la aparición, cada vez más frecuente, de cepas antibiorresistentes (National Mastitis Council, 1993).

Debido a estas limitantes, se realizan investigaciones para la obtención de antisépticos mamarios a partir de fuentes naturales que sean seguros para los animales y el hombre (National Center of Animal and Plant Health, 1996). El UDERTAN, por ejemplo, es un producto desarrollado por el Centro de Sanidad Agropecuaria (CENSA) que se aplica como antiséptico mamario post-ordeño. Se obtiene a partir de *Rhizophora mangle* L. (mangle rojo) y resulta eficaz frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*, dos de los agentes bacterianos más frecuentes en esta etiología (National Center of Animal and Plant Health, 1996).

El uso de plantas con fines medicinales constituye una práctica que se remonta a los orígenes de la humanidad. Se generaliza como práctica curativa en la Edad Media, aunque en muchos casos se atribuyeran sus virtudes a efectos mágicos colaterales. En los siglos posteriores el hombre se adentró en los secretos de la naturaleza y encontró en ella las bases de la actual industria farmacéutica (Roig, 1974; Cuéllar, 1983).

El género *Eucalyptus* pertenece a la familia *Myrtaceae*. Comprende árboles gigantes que, aunque descubiertos en Melbourne, están difundidos por todo el planeta y, desde hace muchos años, se les considera útiles en todos los conceptos (Betancourt, 1987).

Entre las especies introducidas en Cuba están: *Eucalyptus maculata* Hook, *Eucalyptus resinifera* Sm., *Eucalyptus citriodora* Hook y *Eucalyptus saligna* Sm. Las dos últimas son las más abundantes (Miranda *et al.*, 1981).

Desde 1987 la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Camagüey, Cuba, investiga en estas dos especies. Los estudios han estado encaminados, fundamentalmente, a sus cortezas. Una vez establecidas las composiciones químicas (Mulet y Velázquez, 1987; Gómez *et al.*, 1994), se demostró su posible utilización —en forma de decocciones— como antidiarreicos en diferentes especies animales afectadas por *Escherichia coli* enterotoxigénica (Velázquez *et al.*, 1991). En estudios paralelos se pudo constatar que los extractos utilizados inhibían la adhesión fimbrial de este enteropatógeno (Barreto *et al.*, 1993a, b, c, 1995a, 2001, 2005a). Otros extractos —en su mayoría hidroalcohólicos— se evaluaron en lesiones dérmicas y oftálmicas. Los mismos mostraron efectos bactericidas *in vitro* frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli* (Gómez *et al.*, 1994; Castell *et al.*, 1994; Barreto *et al.*, 1995b).

Dada la frecuente participación de estas especies bacterianas en las mastitis bovinas y, teniendo en cuenta los resultados ya descritos, nos propusimos obtener un posible antiséptico mamario a partir de cortezas de *Eucalyptus citriodora* Hook y *Eucalyptus saligna* Sm. que resultara efectivo y económico. Para ello nos trazamos los siguientes objetivos:

1. Evaluar la acción *in vitro* de extractos alcohólicos (83 y 20 %) de cortezas de *Eucalyptus*

- citriodora* Hook y *Eucalyptus saligna* Sm. sobre cepas de *Staphylococcus aureus*.

2. Comparar *in vitro* la actividad antibacteriana de dichos extractos con la de diversos antibióticos.

3. Determinar los costos debidos a: elaboración y tratamiento con los extractos propuestos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta

Las cortezas de *Eucalyptus citriodora* Hook (17 años) y *Eucalyptus saligna* Sm. (26 años) se colectaron durante las primeras horas de la mañana en la Empresa de Investigación Forestal de Camagüey. Las muestras se tomaron a una altura de 1 m con respecto al suelo. En todos los casos poseían un color uniforme y estaban libres de musgos.

Procesamiento

Ambas cortezas se secaron en estufa con recirculación de aire a 90 °C durante 72 horas. Se molieron en un molino de cuchillas. El polvo obtenido fue envasado en bolsas de nailon selladas hasta su utilización.

Obtención de los extractos

Todos los extractos se obtuvieron por percolación, usando como menstruo mezclas hidroalcohólicas al 20 y 83 %. Para ello se emplearon 1 000 mL de solvente/50 g de corteza molida. El material se maceró 24 horas previas a la percolación. Durante el proceso se adicionó solvente limpio hasta obtener los volúmenes deseados.

Cepas

En la evaluación de la actividad antimicrobiana se utilizaron 2 cepas de *Staphylococcus aureus*: ATCC 29740 (referente) y una cepa salvaje aislada de una vaca con mastitis clínica.

Medio de cultivo

En todos los ensayos se empleó agar Mueller Hinton (15 mL en placas de 100 mm de diámetro).

Evaluación *in vitro*

La actividad antimicrobiana de los extractos se estableció mediante el método de difusión sugerido por Kirby y Bauer (Bio-Merieux, 1984). Se utilizaron discos de papel de filtro Watman 3 impregnados del correspondiente extracto. Como controles se emplearon discos impregnados en soluciones alcohólicas al 20 y 83 %, respectivamente. A las dos cepas utilizadas se les determinó su sensibilidad frente a los antibióticos: cloranfeni-

Tabla 1. Comparación de los extractos en etanol 83% frente a *S. aureus* (cepa salvaje)

Extractos	Media aritmética	Desviación estándar
<i>E. citriodora</i>	1,58	0,13
<i>E. saligna</i>	1,1	0,141
Etanol al 83 %	0,08	0,086
Probabilidad		0,021
Significación		P<0,05

Tabla 2. Comparación de los extractos en etanol 83 % frente a ATCC 29740

Extractos	Media aritmética	Desviación estándar
<i>E. citriodora</i>	1,56	0,23
<i>E. saligna</i>	1,12	0,209
Etanol al 83 %	0,26	0,083
Probabilidad		0,038
Significación		P<0,05

Tabla 3. Comparación entre ambas cepas ante extractos al 83 %

Cepas	Media aritmética	Desviación estándar
ATCC 29740	0,98	0,539
<i>S. aureus</i> (salvaje)	0,92	0,625
Probabilidad		0,0102
Significación		N.S.

Tabla 4. Comparación de los extractos al 20% frente a *S. aureus* (salvaje)

Extractos	Media aritmética	Desviación estándar
<i>E. citriodora</i>	1,64	0,207
<i>E. saligna</i>	1,06	0,089
Etanol al 20 %	0	0
Probabilidad		0,0102
Significación		P<0,05

Tabla 5. Comparación entre los extractos al 20 % frente a ATCC 29740

Extractos	Media aritmética	Desviación estándar
<i>E. citriodora</i>	1,62	0,342
<i>E. saligna</i>	0,96	0,089
Etanol al 20 %	0	0
Probabilidad		0,0148
Significación		P<0,05

col, ampicilina, penicilina benzatínica G, eritromicina, estreptomycin, gentamicina, kanamicina, tetraciclina y sulfametoxazol.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza a los valores obtenidos mediante el programa estadístico Systat.

Valoración económica

Se realizó la valoración económica sobre el costo de los extractos elaborados a partir de las cortezas de *Eucalyptus* sp., para su utilización como desinfectantes mamarios. El costo se comparó con

el que implican los tratamientos convencionales para 5 días de aplicación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La cepa de *Staphylococcus aureus* salvaje resultó resistente a penicilina G y gentamicina; intermedia a estreptomycin y sensible a los restantes; la cepa ATCC 29740 fue sensible a todos los antibióticos evaluados.

La mayor antibiorresistencia de la cepa de *Staphylococcus aureus* salvaje se esperaba debido a su posible exposición a estos antimicrobianos y/o al contacto con bacterias que han experimentado estas interacciones y, mediante conjugación o transducción, le han conferido este tipo de respuesta (Dewdney, 1999). Las cepas de referencia, mantenidas a nivel de laboratorio, no están sometidas a estos eventos, de ahí que ATCC 29740 cumpla el patrón de sensibilidad característico (Bio-Merieux, 1984; Dewdney, 1999).

La antibiorresistencia de la cepa de *Staphylococcus aureus* salvaje frente a la penicilina G, gentamicina, y la sensibilidad intermedia a la estreptomycin, se deben a que: el primero es un antibiótico de espectro reducido, bactericida efectivo contra cocos y bacilos grampositivos, pero que puede sufrir lisis por la β -lactamasa, una enzima presente en los estafilococos resistentes a este antibacteriano. La gentamicina y la estreptomycin son aminoglucósidos y su efectividad está dirigida, principalmente, a gérmenes gramnegativos, aunque las generaciones posteriores incluyen variantes con un espectro más amplio, por ejemplo la kanamicina a la cual mostró sensibilidad la cepa salvaje (Barreto *et al.*, 2000b). Tanto la penicilina G como la gentamicina y la estreptomycin cuentan con una amplia y prolongada utilización en la terapia veterinaria y humana (Dewdney, 1999).

La mayor acción bactericida de las tinturas, tanto al 83 % (Tablas 1 y 2) como al 20 % (Tablas 4 y 5) correspondió a las elaboradas a partir del *Eucalyptus citriodora* Hook; sus efectos fueron significativamente superiores a los brindados por las confeccionadas con *Eucalyptus saligna* Sm. Los efectos bactericidas no estuvieron asociados al alcohol, sino a los metabolitos (o metabolito) ex-

traídos por las mezclas hidroalcohólicas (Tablas 1; 2; 4 y 5). Es conocido que la mayor acción bactericida del alcohol se alcanza en mezclas hidroalcohólicas al 70 %, concentración a la que se consigue el máximo efecto coagulante de las proteínas bacterianas (Barreto *et al.*, 2000a).

Al parecer la polaridad de las mezclas hidroalcohólicas, en el rango evaluado, posibilitó la extracción de metabolitos (o metabolito) asociados a los resultados obtenidos, siendo más efectivos los extraídos a partir de la corteza de *Eucalyptus citriodora* Hook, sin importar la mayor o menor concentración de alcohol en estas mezclas, ni la cepa utilizada (Tablas 1; 2; 3; 4; 5 y 6).

El tamizaje fitoquímico arrojó que ambas especies contienen: taninos, quinonas, lactonas, flavonoides, azúcares reductores, aceites esenciales, triterpenos y esteroides; pero fenoles solo presentó *Eucalyptus citriodora* Hook, mientras que solo se encontró saponinas en *Eucalyptus saligna* Sm.

En sentido general las diferencias entre ambas especies son mínimas si se analiza cualitativamente los metabolitos. Sin embargo, es prudente destacar que se trata de grupos de metabolitos que pueden diferir entre especies, como se ha reportado en el caso de los taninos y flavonoides (Gómez *et al.*, 1994).

De los metabolitos reportados en ambas especies, tres poseen actividad antibacteriana comprobada: taninos, flavonoides y aceites esenciales (Cuéllar, 1983; Dellacassa, 1989). Dada la alta temperatura para el secado de las cortezas, hay que descartar a los aceites esenciales como responsables de los efectos constatados.

Tabla 8. Costo de los extractos al 20 % de etanol

VARIABLES	Importe (MN)
Materia prima	0,18711125
Salario	2,415319
Otros gastos	0,89366803
Envase	0,1625
Costo total (1L)	3,65859828

Tabla 9. Costo de los extractos al 83 % de etanol

VARIABLES	Importe (MN)
Materia prima	0,41736125
Salario	2,415319
Otros gastos	0,89366803
Envase	0,1625
Costo total (1L)	3,88884828

Tabla 6. Comparación entre ambas cepas ante extractos al 20 %

Cepas	Media aritmética	Desviación estándar
ATCC 29740	0,86	0,665
<i>S. aureus</i> (salvaje)	0,90	0,679
Probabilidad		0,0143
Significación		N.S.

Tabla 7. Comparación entre los extractos al 20 y al 83 %

Extractos	Media aritmética	Desviación estándar
83 %	0,94	0,578
20 %	0,88	0,672
Probabilidad		0,0141
Significación		N.S.

Como colofón podría plantearse que la acción bactericida de las tinturas depende de la especie de *Eucalyptus* y es independiente de las concentraciones hidroalcohólicas y de las cepas. En estudios anteriores realizados a partir de infusiones y decocciones de estas dos especies, se manifestó la influencia de la especie al evaluar sus efectos sobre la viabilidad y expresión fimbrial bacteriana (Barreto y Campal, 2001; Barreto *et al.*, 2001; 2005).

La sensibilidad de ambas cepas a las tinturas resultó similar en todos los ensayos pese a su distinto perfil antibiorresistente (Tablas 3 y 6). Esto último es de gran interés dada la creciente polirresistencia que caracteriza a especies como *Staphylococcus aureus* y otras tantas que han dado lugar a la denominada “epidemia silente” otra de las herencias del siglo XX (Barreto y Rodríguez, 2006).

Las tablas 8 y 9 recogen los costos de producción de los extractos de *Eucalyptus* al 20 y al 83 %, que oscilan entre 0,37 y 0,39 pesos respectivamente.

En la tabla 10 se muestran los costos derivados de tratamientos convencionales con antibióticos y lugol. Los mismos se comparan con los que implicarían, hipotéticamente, tratamientos a base de *Eucalyptus citriodora* Hook como antiséptico mamario, donde se aprecian las ventajas económicas. No obstante, previo a este paso es preciso cumplir con otros ensayos que, además de probar su efectividad *in vivo*, garanticen que el producto no cause efectos colaterales adversos en los animales. Por ello, aunque los objetivos de este trabajo se han cumplido satisfactoriamente, el mismo solo constituye un primer paso en la evalua-

ción de dichos extractos como posibles antisépticos mamarios.

CONCLUSIONES

Las tinturas de *Eucalyptus citriodora* Hook, al 20 y al 83 %, son las de mayor eficacia *in vitro* contra las cepas de *Staphylococcus aureus*.

Las tinturas de *Eucalyptus citriodora* Hook, al 20 y al 83 %, tienen mejor acción antibacteriana *in vitro* contra la cepa de *Staphylococcus aureus* salvaje que la penicilina y la gentamicina.

Aparentemente no existen diferencias *in vitro* en cuanto a la actividad antimicrobiana de las tinturas de *Eucalyptus* sp. al 20 y al 83 %, frente a las cepas de *Staphylococcus aureus*.

La producción y la utilización de las tinturas de *Eucalyptus* sp., como desinfectantes mamarios, resultan más ventajosas económicamente que el uso de antibióticos.

RECOMENDACIONES

Establecer a qué metabolitos se debe la acción antibacteriana de las tinturas de *Eucalyptus* sp.

Comprobar la acción *in vivo* de las tinturas de *Eucalyptus citriodora* Hook.

Aplicar los extractos en vacas afectadas con la misma frecuencia que los tratamientos convencionales.

Comprobar en la leche, la presencia de residuos de extractos después de 12 h post-tratamiento.

Utilizar las tinturas como soluciones profilácticas en sustitución de la solución lugol.

REFERENCIAS

- ACOSTA, C. I.: Les dossier de L'Allaitement, La Leche League, 10-12, 1998
 BARRETO, G.; Y. LEZCANO, O. RAMOS, B. VELÁSQUEZ, M. MORENO Y G. PARDO: Efec-

to bactericida o bacteriostático de un medicamento a base de eucalipto (Eucabev), *Rev. prod. anim.*, Universidad de Camagüey, Cuba, 7 (1 y 2): 69-71, 1993a.

BARRETO, G.; O. RAMOS, Y. LEZCANO, B. VELÁSQUEZ, M. MORENO, Y G. PARDO: Efecto de un medicamento a base de eucalipto (Eucabev) sobre la producción de los factores de colonización F4 y F5 de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *Rev. prod. anim.*, Universidad de Camagüey, Cuba, 7 (1 y 2): 73-76, 1993b.

BARRETO, G.; B. VELÁSQUEZ, M. MORENO, O. RAMOS, Y. LEZCANO Y H. RODRÍGUEZ: Efecto de un medicamento a base de eucalipto (Eucabev) sobre los receptores para F5 de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *Rev. prod. anim.*, Universidad de Camagüey, Cuba, 7 (3): 135-136, 1993c.

BARRETO, G.; M. PAZOS, G. PARDO, M. MARTÍN Y S. DÍAZ: Efecto de extractos de *Eucalyptus saligna* y *Eucalyptus citriodora* sobre el factor de colonización F4, *Rev. prod. anim.*, Universidad de Camagüey, Cuba, 9: 68-70, 1995a.

BARRETO, G.; B. VELÁSQUEZ, G. PARDO Y A. LEZCANO: Efecto bactericida *in vitro* de extractos de *Eucalyptus* sobre *Pseudomonas aeruginosa*, *Rev. prod. anim.*, Universidad de Camagüey, Cuba, 9: 99-101, 1995b.

BARRETO, G.; B. GANDARILLA, M. E. LORET DE MOLA Y B. RODRÍGUEZ: Microbiología Farmacéutica t. I, texto básico de la carrera de Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Camagüey, Cuba, 2000a.

BARRETO, G.; B. GANDARILLA, M. E. LORET DE MOLA Y B. RODRÍGUEZ: Microbiología farmacéutica, t. I, Texto Básico de la Carrera de Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Camagüey, Cuba, 2000b.

BARRETO, G. Y A. CAMPAL: Efectos de extractos de *Eucalyptus saligna* y *Eucalyptus citriodora* sobre la viabilidad y adhesión fimbrial (K88 y CFA/I) de ECET, *Rev. prod. anim.*, Universidad de Camagüey, Cuba, 13 (2): 71-82, 2001.

Tabla 10. Comparación de los costos por tratamientos convencionales y con extractos

Medicamentos	Dosis	Frecuencia (h)	Costo de los tratamientos convencionales para 100 kg de peso (moneda nacional))			
Cloranfenicol	33 mg/kg	24	3,7125			
Penicilina G	22 UI/kg	12			0,975	
Oxitetraciclina	11 mg/kg	24		1,826		
Infusión mamaria	1 tubo	24				1,50
Solución lugol	10 mL	24	0,10	0,10	0,10	0,10
Total			3,8125	1,926	1,075	1,60
Extracto <i>Eucalyptus</i> 20%	20 mL	24	0,37	0,37	0,37	0,37
Ahorro			3,4425	1,556	0,705	1,23
Extracto <i>Eucalyptus</i> 83%	20 mL	24	0,39	0,39	0,39	0,39
Ahorro			3,4225	1,536	0,685	1,21

Evaluación *in vitro* de extractos *Eucalyptus citriodora* Hook y *Eucalyptus saligna* Sm. como posibles antisépticos mamarios

- BARRETO, G.; A. CAMPAL Y O. ABREU: Opciones para el bloqueo de la adhesión fimbrial de *Escherichia coli*: Empleo de extractos de plantas, disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos30/bloqueo-escherichia-coli/bloqueo-escherichia-coli.shtml>, 2005.
- BETANCOURT, A.: *Silvicultura especial de árboles maderables tropicales*, pp. 120- 122, Ed. Científico Técnica, La Habana, 1987.
- BIO-MERIEUX: Bacteriología. Productos y reactivos para laboratorio, pp. 63-69, Lyon, Francia, 1984.
- CASTELL, M. Y A. J. VIAMONTES: Estudio farmacognóstico preliminar de corteza de *Eucalyptus citriodora* Hook y evaluación antimicrobiana sobre *Pseudomonas aeruginosa*, Trabajo de Diploma, Universidad de Camagüey, Cuba, 1994.
- CUÉLLAR, A.: Química de los fármacos naturales, Facultad de Biología, Universidad de la Habana, 1983.
- DELLACASSA, E.; F. MENÉNDEZ, P. CERDEIRAS Y P. MOYNA: Antimicrobial Activity of *Eucalyptus* Essential Oils, *Fitoterapia*, pp. 544-546, 1989.
- DEWDNEY, J. M.: "The Effects of Antibacterial Antibiotics on Immune Reactions and Host Resistance to Infection", en M. Lessof (ed.): *Immunological and Clinical Aspects of Allergy*, pp. 407-427, MTT Press., 1999.
- GÓMEZ, Y.; A. J. VIAMONTES Y B. VELÁSQUEZ: Estudio comparativo de la composición química de dos especies de *Eucalyptus*. Evaluación de la actividad farmacológica, trabajo de diploma, Universidad de Camagüey, Cuba, 1994.
- MIRANDA, M.; J. R. PÉREZ Y R. D. HENRIQUES: Estudio de los componentes principales de 19 especies de eucaliptos aclimatados en Cuba, *Rev. Cub. Farm.*, 15 (2): 106-114, 1981.
- MULET, P. Y B. VELÁZQUEZ: Estudio preliminar del eucalipto para su posible utilización en los trastornos gastroentéricos, trabajo de diploma, Universidad de Camagüey, Cuba, 1987.
- NATIONAL CENTER OF ANIMAL AND PLANT HEALTH: Natural Drug for Veterinary Use UDERTAN as Mammary Disinfectant, Technical Review, pp. 1-57, 1996.
- NATIONAL MASTITIS COUNCIL: Mastitis Control in Dairy Herds, cap 9, pp. 229-277, 1993.
- ROIG, J. T.: *Plantas aromáticas venenosas de Cuba*, Ed. Científico-Técnica, La Habana, 1974.

Recibido: 5/2/2006

Aceptado: 9/4/2006