



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE *Aloe
barbadensis* Miller ASOCIADO A CEFTIOFUR O CLOXACILINA
SOBRE CEPAS DE *Staphylococcus aureus***

Fernando Andrés Kuhlmann Fehlandt

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Clínicas

PROFESORA GUÍA: DRA. BETTY SAN MARTÍN NÚÑEZ
Laboratorio de Farmacología, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias (FAVET)

FINANCIAMIENTO PROYECTO FONDEF IDeA CA12I10008

SANTIAGO, CHILE
2014



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE *Aloe barbadensis* Miller ASOCIADO A CEFTIOFUR O CLOXACILINA
SOBRE CEPAS DE *Staphylococcus aureus***

Fernando Andrés Kuhlmann Fehlandt

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Clínicas

Nota Final:

		Nota	Firma
Prof. Guía:	Betty San Martín N.
Profesor Corrector:	Daniela Iragüen C.
Profesor Corrector:	Patricio Retamal M.

SANTIAGO, CHILE
2014

MEMORIA DE TÍTULO

“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE *Aloe barbadensis* Miller ASOCIADO A CEFTIOFUR O CLOXACILINA SOBRE CEPAS DE *Staphylococcus aureus*”

“EVALUATION OF ANTIMICROBIAL EFFECT OF *Aloe barbadensis* Miller ASSOCIATED TO CEFTIOFUR OR CLOXACILLIN ON STRAINS OF *Staphylococcus aureus*”

Fernando Andrés Kuhlmann Fehlandt*

*Departamento de Ciencias Clínicas, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Financiamiento

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto FONDEF IDeA CA12I10008

RESUMEN

El uso excesivo de antimicrobianos, debido a la intensificación de los sistemas productivos, ha producido un aumento en la resistencia bacteriana. Debido a esto, diferentes organizaciones intergubernamentales han solicitado el uso racional de estos fármacos en estos sistemas productivos. El mal uso de antimicrobianos se observa en diversas patologías, dentro de las cuales se encuentra la mastitis clínica del ganado lechero, cuyo principal agente etiológico en la zona sur del país es *Staphylococcus aureus*, resistente a múltiples fármacos. Por este motivo se han estudiado nuevas alternativas terapéuticas, como *Aloe vera*, por su efecto antimicrobiano. Se evaluaron los efectos inhibitorios de liofilizados de geles de *A. vera* comercial y extraído de plantas nacionales, asociados a cloxacilina o ceftiofur frente a *S. aureus* ATCC 29213 mediante el Método de Macrodilución en Caldo. Se determinó su Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) mediante turbidez y se confirmó por UFC/mL y absorbancia. Los resultados obtenidos demostraron una disminución de un 87,5% y 75% en las CMI establecidas por el CLSI de ceftiofur y cloxacilina respectivamente. Estos resultados permitirían formular un tratamiento intramamario con esta asociación para las mastitis clínicas causadas por *S. aureus*. Esto disminuiría la posibilidad de generar resistencia, como también reduciría los periodos de carencia definidos actualmente para estos fármacos.

Palabras claves: *Aloe vera*, *Staphylococcus aureus*, Cloxacilina, Ceftiofur, Mastitis bovina.

ABSTRACT

The excessive use of antimicrobial drugs, due to the intensification of the productive systems, has lead to an increase in the bacterial resistance. Due to this, different intergovernmental organizations have recommended the rational use of these drugs in these productive systems. The misuse of antimicrobials has been observed in the treatment of several pathologies, such as clinical mastitis of the dairy cattle. The main etiologic agent in the southern regions of the country is *Staphylococcus aureus*, which presents resistance to several drugs. In consequence, new therapeutic alternatives have been studied, as *Aloe vera*, because of its antimicrobial effect. The inhibitory effects of the freeze-dried *A. vera* gels collected from commercial distributors and national plants, associated to cloxacillin or

ceftiofur, against *S. aureus* ATCC 29213 was evaluated by means of Broth Macrodilution Method. The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) was determined by turbidity and confirmed by UFC/mL and UV-visible Spectrophotometry. The results showed a decrease of a 87,5% and 75% in the MIC values for ceftiofur and cloxacillin, respectively, when compared with the MIC reported by the CLSI. These results may be used for the design of a formulation for intramammary use containing this association for the treatment of clinical mastitis caused by *S. aureus*. Thus, the possibility of generating bacterial resistance will be diminished and shorter withdrawal times for these antimicrobials may be needed.

Keywords: *Aloe vera*, *Staphylococcus aureus*, , Cloxacillin, Ceftiofur, Mastitis.

INTRODUCCIÓN

Debido al aumento en la demanda alimenticia, originado principalmente por el crecimiento demográfico, estas últimas décadas a nivel mundial se han intensificado los sistemas de producción animal. Entre las desventajas de este mayor hacinamiento, está el aumento de la diseminación de agentes infecciosos de origen bacteriano y por ende el uso excesivo de antimicrobianos en animales productivos. El uso excesivo de antimicrobianos ha generado un aumento de la resistencia bacteriana, teniendo implicancias en la salud de los animales y en la salud pública, debido al aumento de la resistencia en bacterias patógenas transmitidas por los alimentos tales como *Salmonella spp.* y *Campylobacter spp.* (OMS, 2001).

Debido a lo señalado, diferentes organizaciones intergubernamentales como la Organización Mundial de la Salud (OMS) en conjunto con la "Food and Agriculture Organization" (FAO) (2009), la Organización Internacional de Epizootias (OIE) y el *Codex Alimentarius*, solicitan a los países disminuir el uso de antimicrobianos en medicina veterinaria e incluir las Buenas Prácticas del uso de fármacos en animales de producción.

Además, diferentes países han instaurado Programas de Vigilancia de la Resistencia en bacterias patógenas, zoonóticas y comensales aisladas de animales productivos (Martel *et al.*, 2001; Goodyear, 2002). Los resultados de éstos han permitido tomar decisiones frente a los antimicrobianos a los que las bacterias están presentando mayores niveles de resistencia, como es el caso de la "Food and Drug Administration", que prohibió el uso de enrofloxacin en aves de corral (FDA, 2005).

A nivel nacional, en abril de 2005, Chile adoptó la petición en todos los sistemas productivos, eliminando la utilización de antimicrobianos como promotores de crecimiento. En el caso de la industria del salmón, SERNAPESCA por la resolución N°67/2003 declaró que el uso de antimicrobianos solo podrá ser efectuado bajo prescripción de un Médico Veterinario. Recientemente, en abril de 2012, el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) también adoptó esta medida en bovinos, cerdos y aves.

La problemática de la resistencia bacteriana y el uso excesivo de antimicrobianos se ve reflejada en la mastitis bovina, una de las patologías más frecuentes en el ganado bovino lechero a nivel mundial. En los Estados Unidos de América (E.E.U.U.) se estima que cerca del 80% del uso de estos fármacos es por esta causa, calculándose costos cercanos a los dos billones de dólares anuales en antimicrobianos (Pol y Ruegg, 2007).

Las bacterias de mayor importancia en los cuadros de mastitis, a nivel nacional, corresponden a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, y *Escherichia coli*, reconociéndose como agentes causales del 95% de los casos (San Martín *et al.*, 2002). El Consorcio Lechero (2011) confirmó que *S. aureus* continúa siendo el patógeno mamario más importante en los rebaños lecheros del sur de Chile.

Al igual que en otros cuadros infecciosos de origen bacteriano, la terapia antimicrobiana generalmente se inicia después de un diagnóstico empírico, generando en varios casos repetición de terapia por bacterias resistentes. Durante el tratamiento y el periodo de carencia, la leche debe ser eliminada y no debe ser destinada al consumo humano ni animal, aumentando así las pérdidas económicas para el productor por el costo del tratamiento en sí y mayoritariamente por la disminución de la producción y las pérdidas de leche (San Martín *et al.*, 2002).

Ceftiofur y cloxacilina son dos de los antimicrobianos de primera elección para el tratamiento de las mastitis causada por *S. aureus* (Melchior *et al.*, 2007; Aarestrup y Skov, 2010).

Debido al aumento de la resistencia bacteriana en esta patología, tanto el uso de vacunas como Enviracor[®] (SAG, 2013) y la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas, es actualmente de gran importancia. Dentro de estas han destacado la homeopatía como Reylac, donde la respuesta no ha sido satisfactoria en tratamiento de mastitis subclínicas (Sepúlveda *et al.*, 2010; Valera *et al.*, 2005).

Por otro lado, plantas medicinales, como es el caso de la *Aloe barbadensis* Miller ha demostrado *in vitro* gran eficacia frente a las bacterias causantes de mastitis, entre las que se encuentra *S. aureus* (Agarry *et al.*, 2005). El uso de esta planta con fines medicinales ha sido extenso debido a sus propiedades inmunoestimulantes, dermatológicas,

antineoplásicas, antioxidantes, odontológicas y endocrinas (Luján *et al.*, 2008), además de actividad antimicrobiana.

El efecto antimicrobiano se ha asociado a diferentes compuestos químicos ubicados en la hoja de esta planta, siendo los más abundantes los polisacáridos y los compuestos fenólicos. Muchos de estos compuestos han sido identificados y cuantificados, pero la actividad antimicrobiana no se ha podido atribuir a un componente en particular, postulándose que el efecto inhibitorio de *Aloe vera* frente a diferentes bacterias, se debe al conjunto de los polisacáridos con los compuestos fenólicos (Rodríguez *et al.*, 2010).

Se postula además que el conjunto de estos compuestos actúa simultáneamente en diferentes sitios blancos de la bacteria, como son las enzimas esenciales del metabolismo, la pared celular y el material genético (Rodríguez *et al.*, 2010). Debido a esto, es probable que las bacterias no sean capaces de generar resistencia o la adquisición de genes de resistencia sea más lenta.

Por otro lado, pruebas realizadas con pomos de gel de *A. vera* y otros componentes naturales (Mastiliber[®]) para el tratamiento de las mastitis, han demostrado una buena recuperación clínica, pero sin una eliminación total de las bacterias, observándose una reincidencia del cuadro clínico (Sumano *et al.*, 1996).

Debido a los antecedentes señalados y a la necesidad de disminuir el uso excesivo de los antimicrobianos sintéticos, la hipótesis que se plantea en esta memoria de título postula que la asociación de *Aloe barbadensis* Miller con ceftiofur o cloxacilina, en concentraciones menores a la CMI definida para cada antimicrobiano, inhibe el crecimiento de *S. aureus* ATCC 29213, lo que permitiría disminuir la dosis y, en consecuencia, los periodos de carencia de estos antimicrobianos. Para comprobar la hipótesis planteada, el objetivo fue evaluar el efecto inhibitorio de la asociación de *Aloe barbadensis* Miller con cloxacilina o ceftiofur frente a *S. aureus* ATCC 29213.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las actividades se realizaron en el Laboratorio de Farmacología Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (Favet), el cual trabaja bajo un Sistema de Calidad (ISO 17025 of 2005), asegurando la protección del personal y del ambiente al manipular bacterias (se adjunta el certificado del Comité de Bioseguridad Animal).

Obtención del gel desde plantas de *A. vera*

Se trabajó con plantas de *A. vera* cultivadas en Chile y con un gel liofilizado comercial (America Inc. Arizona, USA). El gel comercial se utilizó como control debido a que la concentración de polisacáridos y compuestos fenólicos son conocidos.

Las hojas obtenidas de plantas de *A. vera*, se rotularon señalando el origen y la edad de la planta, debido a que estos parámetros podrían cambiar la cuantificación de los componentes químicos de la planta, influyendo en la CMI. Para obtener el gel, se utilizó como referencia el trabajo de Femenia *et al.* (2003). Las hojas se lavaron con agua corriente con 50 ppm de cloro activo, finalizando con agua desionizada. Se eliminó la corteza, dejando sólo el gel de color blanco, que fue pesado y centrifugado dos veces, la primera por 5 min a 4200 x g y la segunda por 15 min a 4200 x g. El gel se congeló a -80°C y luego fue liofilizado.

Extracción de los componentes inhibitorios

Para extraer los compuestos fenólicos y polisacáridos del liofilizado y eliminar residuos vegetales, se tomo como referencia el método descrito por Habeeb *et al.* (2007) con modificaciones. La extracción se realizó con 5g de liofilizado (comercial y obtenido de plantas). Como solvente de extracción se utilizó metanol y con el extracto se analizaron las CMI.

Determinación de la CMI de los liofilizados de *A. vera* frente a *S. aureus* ATCC 29213

Para cuantificar el efecto inhibitorio de *A. vera* sobre *S. aureus* ATCC 29213, se trabajó con el liofilizado comercial y una vez conocida la concentración (mg/mL) necesaria para

inhibir la bacteria, se utilizaron liofilizados de geles de hojas de *A. vera* obtenidos de plantas cultivadas a nivel nacional.

Para los análisis se utilizó el Método de Macrodilución en Caldo, siguiendo las normas del Clinical and Laboratory Standards Institute para animales (CLSI, 2008).

- Obtención del cepario a partir de la bacteria ATCC

Para mantener un cepario desde los liofilizados de *S. aureus* ATCC 29213, se siguieron las instrucciones del proveedor. El cepario se mantuvo congelado en un sistema de esferas Cryobank[®] a -80° C hasta el momento de su uso.

- Preparación de las diluciones del gel de A. vera

El extracto obtenido de los 5 g de liofilizado fueron diluidos en 10 mL de caldo Mueller-Hinton catión ajustado, generando una concentración inicial de 500 mg de gel/mL. A partir de ésta, se prepararon las siguientes diluciones: 250; 125; 62; 31; 15,5; 7,8; 3,9; 1,95 y 0,975 mg de gel/mL. También se utilizaron diluciones intermedias para determinar de manera más precisa la CMI.

- Inoculación de las bacterias en las diferentes diluciones del gel

A partir del cepario se preparó una concentración bacteriana equivalente al estándar 0,5 McFarland correspondiente a $1-2 \times 10^8$ UFC/mL. A partir de éste se realizó una dilución para obtener una concentración final de 5×10^6 UFC/mL.

A cada tubo se colocó 1 mL del inóculo bacteriano, 5 mL de cada dilución de *A. vera* y 4 mL de caldo. Se realizaron dos controles, uno sin *A. vera* y uno sin inóculo bacteriano para controlar esterilidad. Todo el proceso se realizó en un lapso inferior a 15 min. Los tubos se incubaron a $36 \pm 1^\circ$ C por 24 horas.

La CMI se evaluó visualmente por turbidez y fue confirmada midiendo absorbancia por espectrofotometría UV-visible y recuento bacteriano (UFC/mL). En este último caso 10 μ L de cada tubo se sembraron en placa con “Agar Plate Count” y se incubaron a $36\pm 1^\circ$ C por 24 horas. Finalizada la incubación, se realizó el recuento bacteriano.

Confirmación de la CMI de cloxacilina y ceftiofur frente a *S. aureus* ATCC 29213

Se evaluó la CMI de cada antimicrobiano en estudio, con el fin de comprobar los rangos de inhibiciones establecidas CLSI (2008). Se utilizó el Método de Macrodilución en Caldo descrito anteriormente, siguiendo las recomendaciones de solventes y diluyentes establecidos para cada antibiótico.

En un tubo de ensayo se colocaron: 8 mL de caldo Mueller-Hinton catión ajustado, 1 mL de diluciones decrecientes de ceftiofur o cloxacilina según correspondía y 1 mL de suspensión bacteriana. Se incubaron por 24 horas a $36\pm 1^\circ$ C. Se realizó un control sólo con el inóculo bacteriano y un control sin inóculo bacteriano para controlar esterilidad.

Determinación de la concentración de cloxacilina y ceftiofur para su utilización en la asociación con *A. vera* frente a *S. aureus* ATCC 29213

Se realizaron curvas de crecimiento bacteriano según lo establecido por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (1999) para determinar la concentración de antimicrobianos a utilizar en la asociación con *A. vera*.

Las curvas de crecimiento se realizaron con concentraciones decrecientes de antimicrobianos partiendo de la CMI definida para cada uno de ellos. A cada tubo se le colocó 1 mL de inóculo bacteriano (5×10^6 UFC/mL), 1 mL de cada concentración de antibiótico y 8 mL de caldo Mueller-Hinton catión ajustado. Los tubos se incubaron por 24 horas a $36 \pm 1^\circ$ C. Para evaluar la curva de crecimiento bacteriano, a las 0,4,8,10 y 24 horas se midieron las UFC/mL de cada concentración y se midió la absorbancia por espectrofotometría UV-visible.

La concentración que presentó una curva de crecimiento bacteriano similar a la curva de crecimiento sin antimicrobiano, fue elegida para utilizar en la asociación con *A. vera*.

Determinación de la CMI de la asociación de *A. vera* con ceftiofur o cloxacilina

Se utilizó el Método de Macrodilución en Caldo, de acuerdo a las normas recomendadas por el CLSI (2008).

La concentración establecida por las curvas de crecimiento para cloxacilina y ceftiofur se asociaron con diluciones decrecientes de *A. vera* menores a la CMI establecida frente a la cepa de *S. aureus* ATCC 29213. Se realizaron las pruebas de asociaciones.

En esta etapa se siguieron los siguientes pasos:

En un tubo de ensayo se colocaron: 3 mL de caldo Mueller-Hinton catión ajustado, 1 mL de la dilución de ceftiofur o cloxacilina según correspondía, 5 mL de la concentración determinada de *A. vera* y 1 mL de suspensión bacteriana. Se realizó un control para cada asociación sin antimicrobiano y un control sin *A. vera*. Además se realizó un control de crecimiento sólo con el inóculo bacteriano y un control de esterilidad. Se incubaron por 24 horas a $36\pm 1^\circ\text{C}$.

La CMI se evaluó visualmente por turbidez y fue confirmada midiendo absorbancia por espectrofotometría UV-visible y recuento bacteriano (UFC/mL). En este último caso 10 μL de cada tubo se sembraron en placa con "Agar Plate Count" y se incubaron a $36\pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. Finalizada la incubación, se realizó el recuento bacteriano.

Análisis de los resultados

Los resultados confirmatorios de la CMI definida mediante a turbidez (visual) fueron analizados porcentualmente, comparando la absorbancia de los tubos correspondientes a la CMI con la absorbancia del tubo control de crecimiento bacteriano normal. Así también se comparó las UFC/mL de los tubos correspondientes a la CMI con las UFC/mL del tubo control de crecimiento bacteriano normal.

Se aceptó la CMI definida visualmente cuando los resultados de las concentraciones correspondientes en los métodos confirmatorios presentaron una disminución del crecimiento mayor o igual a un 80% comparado con el tubo control de crecimiento normal.

RESULTADOS

La liofilización de los geles de *A. vera* tuvieron un rendimiento promedio de un 0,5% del peso inicial de la hoja (4,2 g). Las hojas frescas pesaban entre 800-1000 g.

- CMI de los extractos de liofilizados de geles de *A. vera*

La CMI de los extractos de liofilizado de *A. vera* frente a *S. aureus* ATCC 29213, evaluada por turbidez, se determinó en 45 mg/mL. Este valor fue igual para los extractos obtenidos de liofilizados comerciales y de hojas de plantas cultivadas a nivel nacional. En las Figuras 1 y 2 se muestran las CMI de ambos extractos comparando la turbidez de cada concentración con el tubo control sin bacterias.

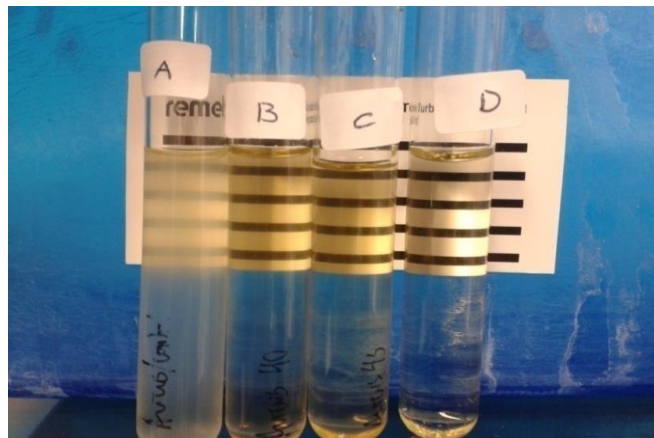


Figura 1. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto del gel liofilizado de *A. vera* comercial (America Inc. Arizona) sobre *S. aureus* ATCC 29213 (medido visualmente). A: Control: *S. aureus* ATCC 29213 en crecimiento normal; B: *S. aureus* ATCC 29213 + 40 mg/ml del extracto del liofilizado del gel de *A. vera* comercial; C: *S. aureus* ATCC 29213 + 45 mg/mL del extracto del liofilizado del gel de *A. vera* comercial; D: Control sin bacteria.

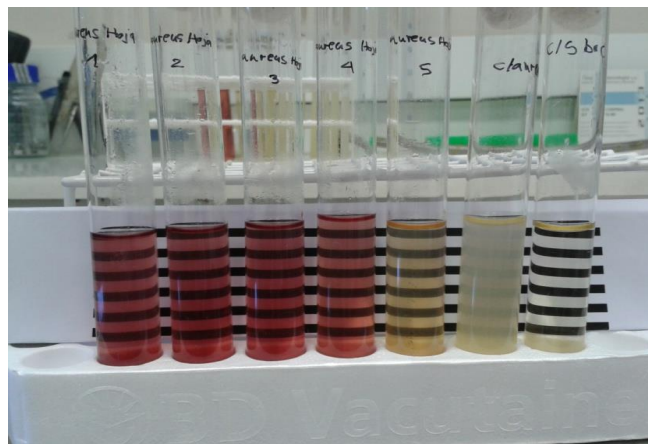


Figura 2. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto del gel liofilizado de *A. vera* obtenido de hojas cultivadas a nivel nacional sobre *S. aureus* ATCC 29213 (medido visualmente). 1: *S. aureus* ATCC 29213 + 60 mg/mL del extracto del liofilizado del gel de *A. vera* obtenido de hoja; 2: *S. aureus* ATCC 29213 + 50 mg/ mL del extracto del liofilizado del gel de *A. vera* obtenido de hoja; 3: *S. aureus* ATCC 29213 + 45 mg/ mL del extracto del liofilizado del gel de *A. vera* obtenido de hoja; 4: *S. aureus* ATCC 29213 + 40 mg/ mL del extracto del liofilizado del gel de *A. vera* obtenido de hoja; 5: *S. aureus* ATCC 29213 + 30 mg/ mL del extracto del liofilizado del gel de *A. vera* obtenido de hoja; 6: Control: *S. aureus* ATCC 29213 en crecimiento normal; 7: Control sin bacteria.

La CMI definida a 45 mg/mL por turbidez fue confirmada por absorbancia y UFC/mL, ya que los resultados de ambos métodos presentaron una disminución del crecimiento mayor o igual a un 80%, comparado con el tubo control de crecimiento normal.

En las Tablas 1 y 2 se señalan los resultados obtenidos por UFC/mL y absorbancia para los extractos del liofilizado del gel comercial y de hojas obtenidas de plantas cultivadas a nivel nacional.

Tabla 1. Confirmación por UFC/mL y absorbancia de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) del extracto del liofilizado del gel de *A. vera* comercial (America Inc. Arizona) frente a *S. aureus* ATCC 29213.

Concentración del extracto del liofilizado (mg/mL)	Confirmación por UFC/mL			Confirmación por absorbancia		
	*UFC/mL	Crecimiento bacteriano (%)	Inhibición del crecimiento bacteriano (%)	Absorbancia	Crecimiento bacteriano (%)	Inhibición del crecimiento bacteriano (%)
0	320.000.000	100	0	1,446	100	0
23	122.333.333	38,2	61,8	0,673	46,5	53,5
34	43.233.333	13,5	86,5	0,429	29,7	70,3
45	13.400.000	4,2	95,8	0,257	17,8	82,2
68	1.700	0,001	99,999	0,044	3,04	96,96
90	1	0,0	100,00	0,058	4,01	95,99

* Unidades Formadoras de Colonias por mL

Tabla 2. Confirmación por UFC/mL y absorbancia de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) del gel de *A. vera* liofilizado obtenido de hoja sobre *S. aureus* ATCC 29213.

Concentración del extracto del liofilizado (mg/mL)	Confirmación por UFC/mL			Confirmación por absorbancia		
	*UFC/mL	Crecimiento bacteriano (%)	Inhibición del crecimiento bacteriano (%)	Absorbancia	Crecimiento bacteriano (%)	Inhibición del crecimiento bacteriano (%)
0	680.000.000	100	0	0,932	100	0
30	30.800.000	4,5	95,5	0,221	23,7	76,3
40	3.720.000	0,5	99,5	0,088	9,4	90,6
45	1.300.000	0,2	99,8	0,052	5,6	94,4
50	0	0,0	100,0	0,048	5,2	94,8
60	0	0,0	100,0	0,051	5,5	94,5

* Unidades Formadoras de Colonias por mL

Se realizaron tres repeticiones con cada extracto de liofilizado de gel. En la Tabla número 3 se señalan los porcentajes de crecimiento e inhibición, observándose que los resultados del porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano expresados en porcentajes están dentro del rango establecido para cada ensayo ($\geq 80\%$).

Tabla 3. Resultados de las repeticiones de los métodos confirmatorios del gel de *A. vera* comercial liofilizado y obtenido de hoja sobre *S. aureus* ATCC 29213.

<i>A. vera</i>	Concentración del extracto del liofilizado (mg/mL)	Confirmación por UFC/mL			Confirmación por absorbancia		
		*UFC/mL	Crecimiento bacteriano (%)	Inhibición del crecimiento bacteriano (%)	Absorbancia	Crecimiento bacteriano (%)	Inhibición del crecimiento bacteriano (%)
No	0	770.000.000	100	0	0,833	100	0
Comercial	45mg/ml	62.400	0,008	99,992	0,005	0,6	99,4
Comercial	45mg/ml	10.100	0,001	99,999	0,003	0,36	99,64
Comercial	45mg/ml	10.100	0,001	99,999	0,068	8,163	91,837
Hoja	45mg/ml	7.480.000	0,971	99,029	0,087	10,444	89,556
Hoja	45mg/ml	8.520.000	1,106	98,894	0,115	13,806	86,194
Hoja	45mg/ml	7.880.000	1,023	98,977	0,1	12,005	87,995

* Unidades Formadoras de Colonias por mL

- Confirmación de la CMI de cloxacilina y ceftiofur definida según el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008)

La CMI definida por el CLSI (2008) para ambos antimicrobianos fue confirmada, ya que los resultados frente a *S. aureus* ATCC 29213 fueron de 0,5 µg/mL y 0,25 µg/mL, para ceftiofur y cloxacilina respectivamente.

En la Tabla 4 se señalan las CMI para los antimicrobianos en estudio y para el extracto de los liofilizados de geles de *A. vera* frente a *S. aureus* ATCC 29213:

Tabla 4. Resumen de las CMI's de los antimicrobianos en estudio y *A. vera*.

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213		
Agente inhibitorio	CMI obtenido	CMI definida por el CLSI (2008)
Ceftiofur	0,5 µg/mL	0,25-1,0 µg/mL
Cloxacilina	0,25 µg/mL	0,12-0,5 µg/mL
<i>A. vera</i>	45 mg/mL	Sin definición

- Determinación de las concentraciones de cloxacilina y ceftiofur para la asociación con *A. vera*

Como resultado de las curvas de crecimiento bacteriano con los antimicrobianos en estudio, las concentraciones de 0,06 y 0,125 µg/mL de cloxacilina y ceftiofur respectivamente, fueron definidas para ser utilizadas en la asociación con *A. vera*. Estas curvas presentaron un comportamiento del crecimiento similar a la curva del crecimiento control sin antimicrobiano y la concentración correspondió a un 25% de la CMI definida para cada antimicrobiano frente a la bacteria en estudio.

En la Tabla 5 y las Figuras 3 y 4 se observan las curvas de crecimiento de *S. aureus* ATCC 29213 en presencia de cloxacilina medidas por UFC/mL y confirmadas por espectrometría UV-visible. En la Tabla 6 y las Figuras 5 y 6 se observan las curvas de crecimiento de *S. aureus* ATCC 29213 en presencia de ceftiofur medidas por UFC/mL y confirmadas por espectrometría UV-visible.

Tabla 5. Evaluación de las curvas de crecimiento de *S. aureus* ATCC 29213 con distintas concentraciones de cloxacilina.

Horas	Concentraciones de cloxacilina									
	*UFC/mL					Absorbancia				
	Sin cloxacilina	0,06 µg/mL	0,125 µg/mL	0,188 µg/mL	0,25 µg/mL	Sin Cloxacilina	0,06 µg/mL	0,125 µg/mL	0,188 µg/mL	0,25 µg/mL
0	250.000	380.000	250.000	240.000	270.000	0,018	0,034	0,023	0,019	0,022
4	4.000.000	2.400.000	620.000	70.000	50.000	0,080	0,064	0,057	0,042	0,031
8	45.500.000	20.050.000	140.000	1	1	0,435	0,517	0,060	0,024	0,024
10	155.000.000	20.050.000	150.000	1	1	0,757	0,746	0,065	0,025	0,024
24	320.000.000	41.533.333	96.000.000	310.000	1	1,446	1,400	1,033	0,023	0,020

* Unidades Formadoras de Colonias por mL

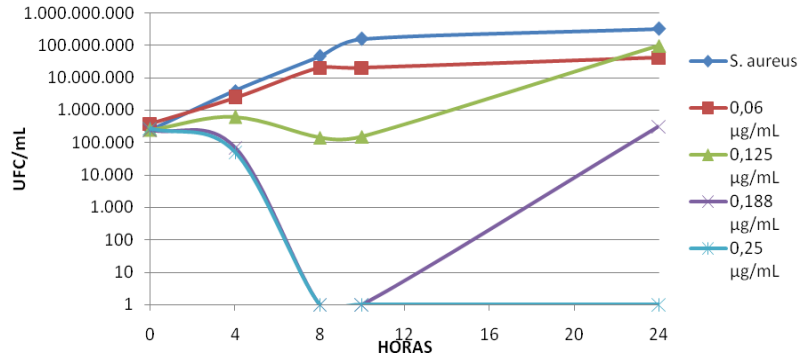


Figura 3. Curva de crecimiento evaluada por UFC/mL en relación al tiempo de incubación para cada concentración de cloxacilina.

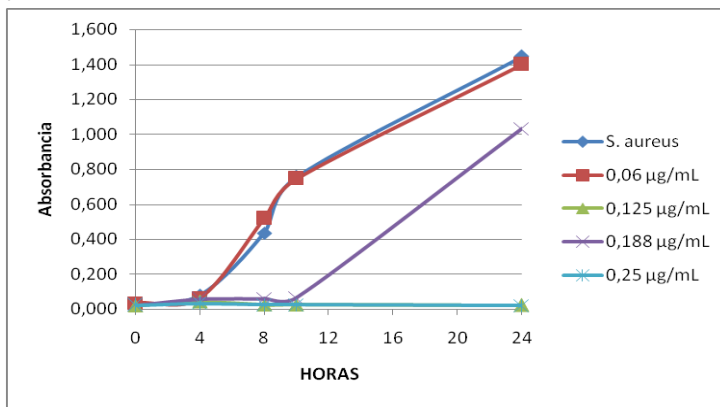


Figura 4. Curva de crecimiento evaluada por absorbancia en relación al tiempo de incubación para cada concentración de cloxacilina

Tabla 6. Evaluación de las curvas de crecimiento de *S. aureus* ATCC 29213 con distintas concentraciones de ceftiofur.

		Concentraciones de Ceftiofur									
		*UFC/mL					Absorbancia				
Horas	Sin ceftiofur	0,125 µg/MI	0,25 µg/mL	0,375 µg/mL	0,5 µg/mL	Sin ceftiofur	0,125 µg/mL	0,25 µg/mL	0,375 µg/mL	0,5 µg/mL	
0	250.000	580.000	540.000	130.000	500.000	0,018	0,024	0,019	0,018	0,019	
4	4.000.000	3.240.000	430.000	100.000	120.000	0,080	0,043	0,024	0,023	0,029	
8	45.500.000	99.500.000	2.376.667	10.000	10.000	0,435	0,471	0,059	0,024	0,027	
10	155.000.000	216.500.000	2.123.333	40.000	1	0,757	0,621	0,076	0,025	0,025	
24	320.000.000	258.000.000	50.000.000	13.266.667	1	1,446	1,350	0,241	0,103	0,021	

* Unidades Formadoras de Colonias por mL

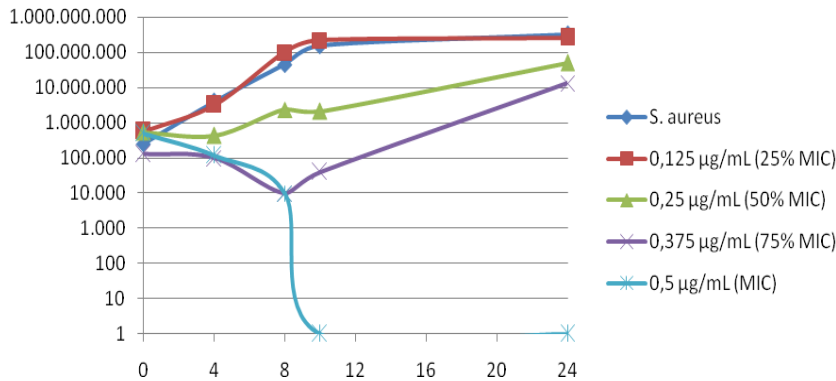


Figura 5. Curva de crecimiento evaluada por UFC/mL en relación al tiempo de incubación para cada concentración de ceftiofur.

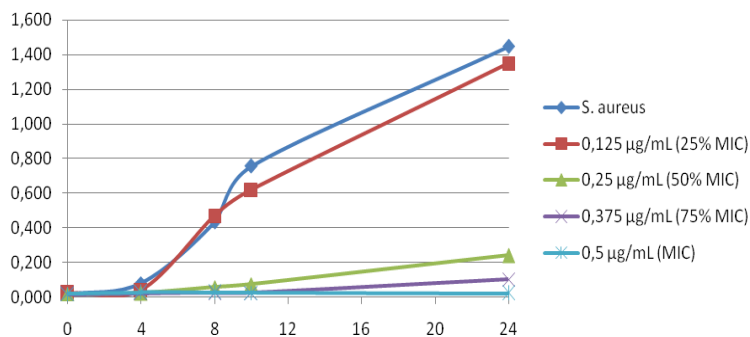


Figura 6. Curva de crecimiento evaluada por absorbancia en relación al tiempo de incubación para cada concentración de ceftiofur.

- Determinación de la CMI de la asociación de cloxacilina o ceftiofur con *A. vera*

Las concentraciones definidas para cloxacilina y ceftiofur frente a *S. aureus* ATCC 29213 fueron probadas con concentraciones menores a la CMI definida para *A. vera* (30, 23 y 15 mg/mL).

Para el caso de ceftiofur, comparando la turbidez de la concentración elegida en la curva de crecimiento bacteriano para este fármaco (0,125 µg/mL) con diferentes concentraciones de *A. vera*, se observó un 100% de inhibición del crecimiento bacteriano para ambos liofilizados. Debido a estos resultados se probó una concentración más baja del antimicrobiano (0,06 µg/mL) con las diferentes concentraciones de *A. vera*. Con esta concentración de ceftiofur asociado a *A. vera* se logró resultados similares al ensayo

anterior, existiendo diferencias en la concentración de *A. vera* (mg/mL) entre el extracto del liofilizado del gel comercial y el extracto del liofilizado del gel obtenido de hojas de plantas nacionales.

La CMI del extracto del liofilizado del gel comercial + ceftiofur fue de 30 mg/mL + 0,06 µg/mL respectivamente.

La CMI del extracto del liofilizado del gel obtenido de hojas de plantas nacionales + ceftiofur fue de 23 mg/mL + 0,06 µg/mL respectivamente.

Para el caso de cloxacilina la CMI del extracto del liofilizado del gel comercial y del obtenido de hojas de plantas nacionales asociado a este fármaco fue igual. La CMI para ambos casos se definió en 30 mg/mL del extracto del liofilizado + 0,06 µg/mL de cloxacilina.

En las Figuras 7, 8, 9 y 10 se observa la determinación de la CMI por turbidez para cada asociación.

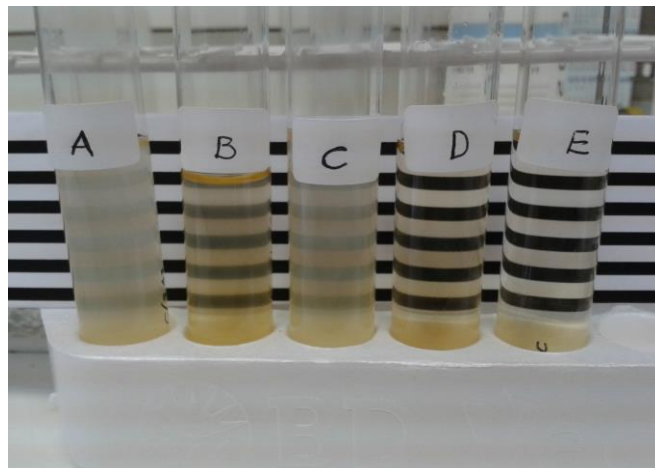


Figura 7. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de la asociación del extracto del gel liofilizado de *A. vera* comercial y ceftiofur frente a *S. aureus* ATCC 29213 (medido visualmente). A: Control: *S. aureus* ATCC 29213 en crecimiento normal; B: *S. aureus* ATCC 29213 + 30 mg/mL del extracto del gel de *A. vera* comercial; C: *S. aureus* ATCC 29213 + 0,06 µg/mL de ceftiofur; D: *S. aureus* ATCC 29213 + 30 mg/mL del extracto del gel de *A. vera* comercial + 0,06 µg/mL de ceftiofur; E: Control sin bacteria.

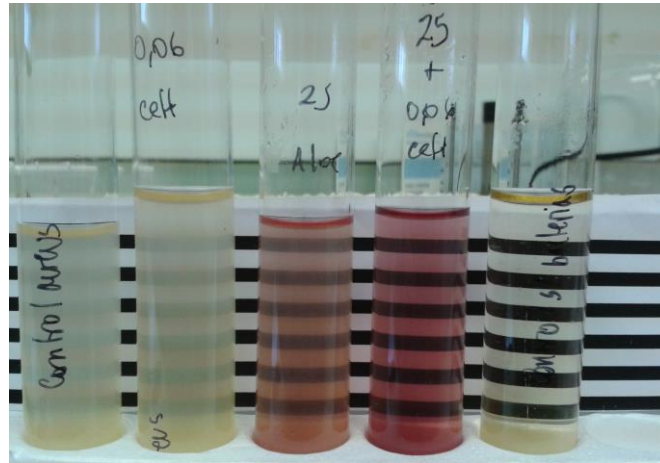


Figura 8. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de la asociación del extracto del gel liofilizado obtenido de hojas de plantas nacionales y ceftiofur frente a *S. aureus* ATCC 29213 (medido visualmente). A: Control: *S. aureus* ATCC 29213 en crecimiento normal; B: *S. aureus* ATCC 29213 + 0,06 µg/mL de ceftiofur; C: *S. aureus* ATCC 29213 + 23 mg/ mL del extracto del gel obtenido de hojas de plantas nacionales; D: *S. aureus* ATCC 29213 + 23 mg/ mL del extracto del gel obtenido de hojas de plantas nacionales + 0,06 µg/ml de ceftiofur; E: Control sin bacteria.

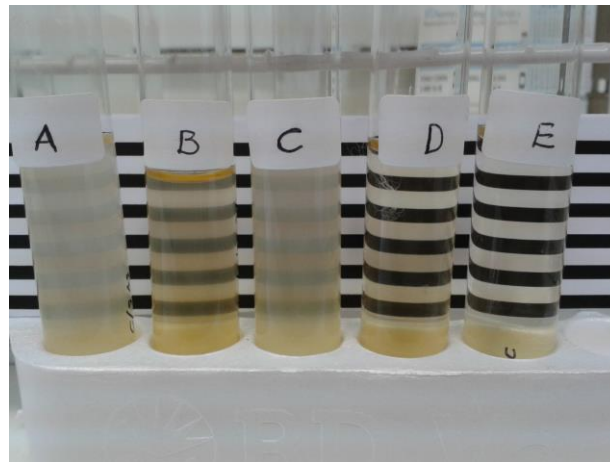


Figura 9. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de la asociación del extracto del gel liofilizado de *A. vera* comercial y cloxacilina frente a *S. aureus* ATCC 29213 (medido visualmente). A: Control: *S. aureus* ATCC 29213 en crecimiento normal; B: *S. aureus* ATCC 29213 + 30 mg/ mL del extracto del gel de *A. vera* comercial; C: *S. aureus* ATCC 29213 + 0,06 µg/ mL de cloxacilina; D: *S. aureus* ATCC 29213 + 30 mg/ mL del extracto del gel de *A. vera* comercial + 0,06 µg/ mL de cloxacilina; E: Control sin bacteria.

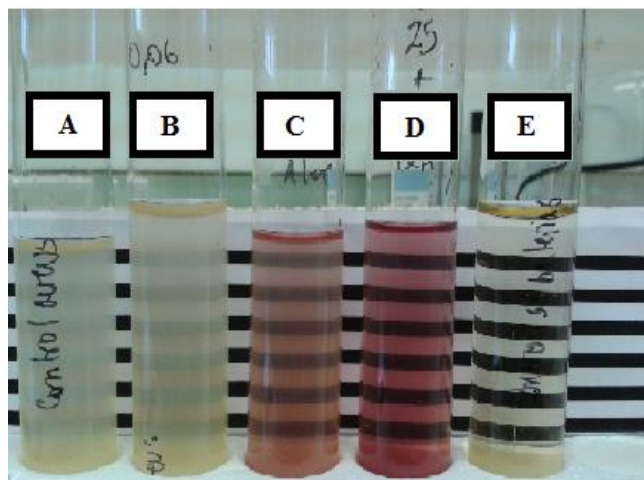


Figura 10. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de la asociación del extracto del gel liofilizado obtenido de hojas de plantas nacionales y cloxacilina frente a *S. aureus* ATCC 29213 (medido visualmente). A: Control: *S. aureus* ATCC 29213 en crecimiento normal; B: *S. aureus* ATCC 29213 + 0,06 µg/ mL de cloxacilina; C: *S. aureus* ATCC 29213 + 30 mg/ mL del extracto del gel obtenido de hojas de plantas nacionales; D: *S. aureus* ATCC 29213 + 30 mg/ mL del extracto del gel obtenido de hojas de plantas nacionales + 0,06 µg/ mL de cloxacilina; E: Control sin bacteria.

Las CMI definidas por turbidez para cada asociación, fueron confirmadas mediante a absorbancia y UFC/mL. Por ambos métodos los resultados porcentuales presentaron un porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano mayor al 80%.

En la Tabla 7 se observan los porcentajes de inhibición confirmados por UFC/mL y absorbancia para el gel liofilizado comercial asociado con ceftiofur o cloxacilina frente a *S. aureus* ATCC 29213. En la Tabla 8 se observan los porcentajes de inhibición confirmados por UFC/mL y absorbancia para el gel liofilizado obtenido de hojas asociado con ceftiofur o cloxacilina frente a *S. aureus* ATCC 29213.

Tabla 7. Confirmación de la CMI por UFC/mL y absorbancia de la asociación del gel de *A. vera* comercial liofilizado + ceftiofur o cloxacilina frente a *S. aureus* ATCC 29213.

<i>A. vera</i> comercial (mg/mL) + antimicrobiano (ug/mL)	Confirmación por UFC/mL			Confirmación por absorbancia		
	*UFC/mL	Crecimiento bacteriano (%)	Inhibición del crecimiento bacteriano (%)	Absorbancia	Crecimiento bacteriano (%)	Inhibición del crecimiento bacteriano (%)
Control (sin asociación)	580.000.000	100	0	0,715	100	0
30+ 0,06 ceftiofur	90.000	0,02	99,98	0,064	9	91
30+ 0,06 ceftiofur	13.280.000	2,3	97,7	0,180	25,2	74,8
30+ 0,06 ceftiofur	11.280.000	1,9	98,1	0,085	11,9	88,1
30+ 0,06 cloxacilina	5.600	0,001	99,999	0,025	3,5	96,5
30+ 0,06 cloxacilina	8.400	0,001	99,999	0,003	0,4	99,6
30+ 0,06 cloxacilina	14.700	0,003	99,997	0,044	6,2	93,8

* Unidades Formadoras de Colonias por mL

Tabla 8. Confirmación de la CMI por UFC/mL y absorbancia de la asociación del gel de *A. vera* liofilizado obtenido de hoja y ceftiofur o cloxacilina frente a *S. aureus* ATCC 29213.

<i>A. vera</i> de hoja (mg/mL) + antimicrobianos (ug/mL)	Confirmación por UFC/mL			Confirmación por absorbancia		
	*UFC/mL	Crecimiento bacteriano (%)	Inhibición del crecimiento bacteriano (%)	Absorbancia	Crecimiento bacteriano (%)	Inhibición del crecimiento bacteriano (%)
Control(sin asociación)	580.000.000	100	0	0,715	100	0
23+ 0,06 ceftiofur	17.760.000	3,1	96,9	0,142	19,9	80,1
23+ 0,06 ceftiofur	20.400.000	3,5	96,5	0,150	20,9	79,1
23+ 0,06 ceftiofur	16.480.000	2,8	97,2	0,145	20	80
30+ 0,06 cloxacilina	30.000	0	100	0,084	11,7	88,3
30+ 0,06 cloxacilina	0	0	100	0,059	8,3	91,7
30+ 0,06 cloxacilina	0	0	100	0,078	10,9	89,1

* Unidades Formadoras de Colonias por mL

DISCUSIÓN

Debido a la alta resistencia bacteriana frente a los antimicrobianos sintéticos de uso habitual en medicina veterinaria, se hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para tratar estos cuadros infecciosos. Dentro de estas alternativas los productos de origen natural, como la *A. vera*, han sido estudiado (Agarry *et al.*, 2005).

Al respecto diferentes investigadores, han realizado estudios de sensibilidad *in vitro* de geles obtenidos de plantas de *A. vera* frente a diferentes bacterias, demostrando el efecto inhibitorio de esta planta (Agarry *et al.*, 2005). Para el caso particular de *S. aureus* se han determinado CMI entre 25 y 30 mg/mL (Habeeb *et al.*, 2007; Shilpakala *et al.*, 2009). Estos resultados difieren con los resultados obtenidos en este estudio, ya que la CMI determinada fue de 45 mg/mL. La diferencia de los resultados de este estudio con los estudios mencionados, podría ser explicada por la concentración del inóculo bacteriano utilizado para determinar la CMI. En el presente trabajo se utilizó la concentración recomendada por el CLSI (2008) para la evaluación de la CMI de cualquier sustancia con efecto antimicrobiano. Habeeb *et al.* (2007) utilizaron una concentración cinco veces menor y en el caso de Shilpakala *et al.* (2009) no se especifica la concentración utilizada en el inóculo. Es importante señalar que a mayor concentración bacteriana se necesita mayor cantidad de sustancia antimicrobiana y por el contrario a menor cantidad de bacteria se necesita una menor concentración de estas sustancias. Es por eso que el CLSI (2008) recomienda que siempre que se realicen estudios de CMI, se comience con un inóculo de 0,5 McFarland con el fin que los resultados entre diferentes estudios sean comparables.

Por otro lado, el CLSI (2008) señala que la concentración de la sustancia inhibitoria definida como CMI mediante observación visual de la turbidez debe ser capaz de inhibir al menos el 80% el crecimiento bacteriano comparado con el tubo control sin inhibición. Señala además que esto se debe corroborar evaluando las UFC/mL y absorbancia. En el presente trabajo las CMI fueron corroboradas por ambos métodos dándole validez a nuestros resultados. Podemos señalar además que en el caso de Habeeb *et al.* (2007) y Shilpakala *et al.* (2009), las CMI no fueron confirmadas de acuerdo a estas recomendaciones.

También es importante mencionar que no hubo diferencia en la CMI entre los liofilizados de *A. vera* comercial y el liofilizado obtenido del gel de hojas cultivadas en Chile. Aun cuando la literatura señala que los diferentes componentes de la hoja de *A. vera* a los cuales se les atribuye el efecto inhibitorio pueden variar en composición o cantidad con respecto a la luz, humedad y edad de la planta (Rodríguez *et al.*, 2010), esto no se vio reflejado en los resultados, ya que las hojas se obtuvieron de plantas con diferente edad. Por otro lado si

bien las hojas provenían de una misma plantación, estas se obtuvieron en diferentes épocas del año, por lo que se puede inferir que de haber existido diferencias en los porcentajes de humedad y en la temperatura ambiental, aun cuando en este trabajo no pudieron ser registradas, los resultados no se vieron afectados por estos factores.

Para elegir las concentraciones en la asociación se siguieron las recomendaciones del NCCLS (1999), quienes señalan que cuando se realizan estudios de asociaciones de sustancias inhibitorias, se debe dejar fija la concentración de la sustancia de mayor potencia. Además se señala que las concentraciones elegidas deben tener una curva de crecimiento semejante a la curva de crecimiento sin inhibidor. Debido a esto se seleccionaron cloxacilina y ceftiofur, ya que los valores de CMI de estos fármacos están a nivel de $\mu\text{g/mL}$, mil veces menor que la CMI de *A. vera*, la cual está a nivel de mg/mL . Esto se ve reflejado en estudios que demuestran la mayor actividad de los antimicrobianos sintéticos por sobre el *A. vera* (Shilpakala *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos de las asociaciones de antimicrobianos más liofilizados de *A. vera* frente a *S. aureus* ATCC 29213, permitieron bajar la concentración de los antimicrobianos en un 12,5% y 25% en relación a la CMI definida para ceftiofur y cloxacilina, respectivamente.

La posibilidad de disminuir las CMI de los antimicrobianos sintéticos una vez asociados con *A. vera*, permitiría disminuir las dosis actuales que se utilizan de estos fármacos para el tratamiento de mastitis clínicas utilizando pomos intramamarios. La disminución de las dosis de estos fármacos llevaría a una posible reducción del periodo de carencia (*Codex Alimentarius*, 2005). Esto además se suma a que el *A. vera* no posee un periodo de carencia por ser considerado inocuo para la salud humana. Esto último favorece al productor, debido a que disminuyen las pérdidas económicas relacionadas con la eliminación de leche como causa de la terapia con antimicrobianos que actualmente se utilizan para la mastitis clínica, debido a que se reducen los riesgos de residuos de fármacos (Jaimes, 2007).

Otra de las ventajas que presentaría la disminución de la dosis de los antimicrobianos, es la posibilidad de evitar o disminuir la resistencia bacteriana, causadas por dosis subterapéuticas de estos fármacos (Falcón *et al.*, 2009). La disminución de la resistencia

bacteriana se debería a que el *A. vera* posee una gran cantidad de componentes activos que podrían actuar sobre diferentes sitios blancos de las bacterias, impidiendo o disminuyendo la posibilidad de seleccionar cepas resistentes (Rodríguez *et al.*, 2010).

Los resultados de este trabajo son una de las soluciones al planteamiento que estipula la OMS en conjunto con la FAO en el *Codex Alimentarius* (2009), de reducir el uso de los antimicrobianos en animales de producción, tomando en cuenta que la resistencia bacteriana en el país y en el mundo ha ido en aumento de manera alarmante. En el caso de las mastitis bacterianas, el problema de la resistencia no está ausente, observándose altos niveles en diferentes bacterias causantes de esta enfermedad (San Martín *et al.*, 2002; Valero-Leal *et al.*, 2010).

Esta asociación de *A. vera* más antimicrobianos sintéticos, podría tener una eficacia clínica y bacteriológica, tomando en cuenta que la gran mayoría de los tratamientos alternativos solo en base a compuestos naturales, si bien han logrado una respuesta clínica aceptable, no siempre se acompañan de una recuperación bacteriana (Ruegg, 2012).

En el caso del Mastiliber[®], como intramamario compuesto por diferentes plantas naturales con actividad antimicrobiana, Sumano *et al.* (1996) señalan que este como intramamario utilizado en las vacas con mastitis, ha logrado excelente recuperación clínica pero a los meses siguientes se observó reincidencia de la enfermedad, lo que hace suponer que no hubo recuperación bacteriológica. Esto fue confirmado de manera *in vitro*, ya que no inhibió la totalidad bacteriana de muestras aisladas de vacas con mastitis clínicas.

A la fecha no existen trabajos que demuestren la eficacia de *A. vera* asociado a antimicrobianos sintéticos, pero sí existen otros estudios que han demostrado la actividad inhibitoria de *A. vera* asociada con otros compuestos como cationes de ciertos elementos, cobre, hierro, plata y bismuto, frente a *S. aureus* (Saavedra *et al.*, 2012).

En conclusión se puede determinar que la asociación de *Aloe barbadensis* Miller y los antimicrobianos en estudio (ceftiofur y cloxacilina) utilizados en dosis inferiores a su CMI presentan actividad antimicrobiana. Esto presentaría una alternativa beneficiosa en el tratamiento de la mastitis bovina, ya que podría disminuir tanto la resistencia bacteriana, como también los periodos de carencia que implican los antimicrobianos sintéticos.

BIBLIOGRAFÍA

AARESTRUP, F.; SKOV, R. 2010. Evaluation of ceftiofur and cefquinome for phenotypic detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* using disk diffusion testing and MIC-determination. *Vet Microbiol.* 140 (1-2): 176-179.

AGARRY, O.; OLALEYE, M.; BELLO-MICHAEL, C. 2005. Comparative antimicrobial activities of *Aloe vera* gel and leaf. *Afr J Biotechnol.* 4(12): 1413-1414.

CHILE. SERNAPESCA, SERVICIO NACIONAL DE PESCA. 2003. Resolución N°67 Programa Sanitario General de manejo de Enfermedades (PSGE). 30 enero 2003.

CLSI, CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. 2008. Standard M31-A3. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. Approved Standard- Third Edition. 28(8). 112p.

CODEX ALIMENTARIUS. 2005. Code of practice to minimize and contain antimicrobial resistance. CAC/RCP 61. 15 p.

CONSORCIO LECHERO. 2011. Asociación entre niveles de células somáticas en la leche de estanque y la incidencia de mastitis clínica en rebaños lecheros del sur de Chile (XIV región) Informe técnico presencial. Consorcio tecnológico de la leche. FIC-SC-C-2004-1-P-001. 13 y 14 Enero 2011. Osorno, Chile. 17 p.

FALCÓN, N.; ORTEGA, C.; GORNIK, S.; VILLAMIL, LC.; RÍOS, C.; SIMÓN, MC. 2009. El problema de la resistencia a antibióticos en salud pública. *Revista Sapuvet de Salud Pública.* 1(1): 75-88.

FAO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION; OMS, ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. 2009. *Codex alimentarius.* Producción de alimentos de origen animal. Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias. Segunda Edición. 281 p.

FEMENIA, A.; GARCÍA-PASCUAL, P.; SIMAL, S.; ROSSELLO, C. 2003. Effects of heat treatment and dehydration on bioactive polysaccharide acemannan and cell wall polymers from *Aloe barbadensis* Miller. *Carbohydrate Polymers.* 51(4): 397-405.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. 2005. Enrofloxacin for poultry: Final decision of withdrawal of new animal drug application following formal evidentiary public hearing: availability. *Federal Register.* 70(146): 44105.

GOODYEAR, K. 2002. Veterinary surveillance for antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother.* 50(4): 612-614.

HABEEB, F.; SHAKIR E.; BRADBURY, F.; CAMERON, P.; TARAVATI, M.; DRUMMOND, A.; GRAY, A.; FERRO, V. 2007. Screening methods used to determine the anti-microbial properties of *Aloe vera* inner gel. *Methods*. 42: 315-320.

JAIMES, G. 2007. Compendio de los residuos de medicamentos en leche bovina. Monografía título de Médico Veterinario Zootecnista. Bogota D.C., Colombia. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Medicina Veterinaria y Zootecnia. 114p.

LUJÁN, M.; BECERRA, L.; CHÁVEZ, M.; OTINIANO, N.; BENITES, S. 2008. Efecto del extracto acuoso del gel de *Aloe vera* “sábila” sobre la fagocitosis por macrófagos de *Mus musculus* BALB/c y la producción de anticuerpos por *Oryctolagus cuniculus*. *Rev. Med. Vallejana*. 5(1): 7-15.

MARTEL, L.; TARDY, F.; SANDERS, P.; BOISSEAU, C. 2001. New trends in regulatory rules and surveillance of antimicrobial resistance on bacteria of animal origin. *Vet Res*. 32(3-4): 381-392.

MELCHIOR, M.; FINK-GREMMELS, J.; GAASTRA, W. 2007. Extended antimicrobial susceptibility assay for *staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis growing in biofilms. *Vet Microbiol*. 125(1-2): 141-149.

NCCLS. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. 1999. Standard M26-A. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. 19(18). 29 p.

OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. 2001. Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.2. 105p.

POL, M.; RUEGG, PL. 2007. Relationship between antimicrobial drug usage and antimicrobial susceptibility of gram-positive mastitis pathogens. *J Dairy Sci*. 90(1): 262-273.

RODRÍGUEZ, E.; DARIAS, J.; DÍAZ, C. 2010. *Aloe vera* as a functional ingredient in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 50(4): 305-326.

RUEGG, P. 2012. Factores que influyen en el tratamiento de las mastitis clínicas. **In:** XVI Congreso Internacional ANEMBE de Medicina Bovina. Madison, USA. Noviembre-Diciembre 2012. University of Wisconsin. pp. 36-46.

SAAVEDRA, F.; LÓPEZ, B.; YREI, V.; GALLARDO, T.; ALE, N.; GORDILLO, G. 2012. Actividad antibacteriana y fungicida de las antraquinonas de *Aloe vera* L. combinadas con cationes cobre, hierro, plata y bismuto. *Ciencia e Investigación*. 15(1): 30-35.

SAG. SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO. 2012. Medicamentos Veterinarios que no deben ser utilizados en predios que exportan a la Unión Europea. 3p.

SAG. SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO. 2013. Sistema en línea de búsqueda de medicamentos veterinarios autorizados por el SAG. [en línea] <http://medicamentos.sag.gob.cl/ConsultaUsrPublico/BusquedaMedicamentos_1.asp> [consulta: 16-06-2013].

SAN MARTÍN, B.; KRUIZE, J.; MORALES, P.; AGÜERO, P.; LEÓN, B.; ESPINOZA, S.; IRAGÜEN, D.; PUGA, J.; BORIE, C. 2002. Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región, Región Metropolitana y X Región. Chile. Scielo. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile. [en línea] <http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0301732X2002000200008&script=sci_arttext> [consulta: 12-03-2013].

SEPÚLVEDA, J.; SEPÚLVEDA, R.; ARIAS, A.; GONZÁLEZ, D.; VILLEGAS, A. 2010. Evaluación de vacunas autógenas como herramienta para el control de la Mastitis durante la lactancia en vacas Holstein. *Rev Elect Nova Sci.* 2(4): 1-5.

SHILPAKALA, S.; PRATHIBA, J.; MALATHI, R. 2009. Susceptibilities of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to *Aloe barbadensis*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 13: 461-464.

SUMANO, H.; MATEOS, G.; BRUMBAUGH, G. 1996. Bases farmacológicas del tratamiento de la mastitis bovina. *Veterinaria México.* 27(1): 63-82.

VALERA, R.; CABALLERO, C.; LINARES, F.; NOVOA, R.; CASANOVAS, E. 2005. [en línea]. Reylac, una alternativa homeopática en el control de la mastitis subclínica bovina. *RedVet.* 6(6). <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060605/060511.pdf>> [consulta: 14-03-2013].

VALERO-LEAL, K.; OLIVARES, Y.; PEROZO, A.; VALBUENA, E.; BOSCÁN, L.; COLINA, G.; BRÍÑEZ, W. 2010. Susceptibilidad a los agentes antimicrobianos en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en leche de bovinos con mastitis subclínica y leche de tanque. *FCV-LUZ.* 20 (4): 367-376.

ANEXOS



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

CERTIFICADO N° 4

El Comité de Bioseguridad ha revisado la postulación al 1° Concurso de Ciencia Aplicada Fondef 2012, del proyecto "Desarrollo de Formulaciones Farmacéuticas en base a Aloe Vera y antimicrobianos de uso habitual en sistemas intensivos de producción animal, que permitan disminuir las dosis y los periodos de carencia de estos fármacos" a cargo de la Dra. Betty San Martín.


En el proyecto se trabajará con bacterias de origen animal, clasificadas dentro de los niveles 1-2 de bioseguridad (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Renibacterium salmoninarum*) con el fin de realizar estudios de efectos inhibitorios del Aloe Vera solo y asociado a otros antimicrobianos. Como medidas de bioseguridad, el proyecto estipula lo siguiente:


1. Todos los ensayos se realizarán en el laboratorio FARMAVET, que cuenta con la acreditación vigente ISO 17025 Of 2005.
2. Los aislamientos bacterianos a partir de Salmones se realizarán en una empresa externa acreditada según ISO 9001 Of 2008 y las cepas serán enviadas correctamente selladas y rotuladas hasta el laboratorio FARMAVET.
3. Los aislamientos a partir de leche bovina serán realizados en el laboratorio FARMAVET, considerando el uso de Gabinete de Bioseguridad, uso de desinfectantes y antisépticos (Cloro y Alcohol yodado), eliminación de materiales contaminados por autoclavado o por incineración según corresponda, uso de delantales y guantes desechables. La obtención de las muestras de leche será realizada por personal del proyecto entrenado.
4. La cuantificación de la inhibición del crecimiento bacteriano se realizará en el Laboratorio BIOVETEC bajo las normas estipuladas por el mismo.
5. Todos los desechos líquidos peligrosos serán eliminados por una empresa externa, mientras que los sólidos serán incinerados.



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

Con relación a lo expuesto, este comité estima que el proyecto se ajusta convenientemente con las especificaciones contenidas en el "Manual de Normas de Bioseguridad" editado por CONICYT versión 2008 y previenen el riesgo para las personas, los animales y el medio ambiente.


SANTIAGO URCELAY VICENTE
Decano y Presidente
Comité de Bioseguridad Animal



Santiago, mayo 28, 2012