



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES
DE CANELA, TÉ DE ÁRBOL Y ROMERO CONTRA
Staphylococcus CAUSANTES DE MASTITIS BOVINA**

Por:

José Francisco Valenzuela Sánchez

TESIS APROBADA POR LA

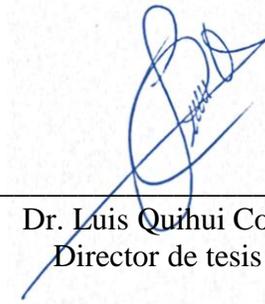
COORDINACIÓN DE NUTRICIÓN

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

APROBACIÓN

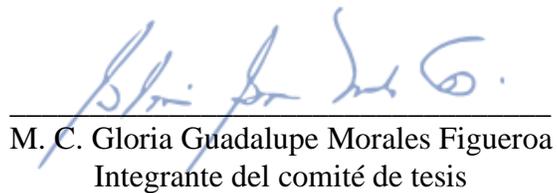
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de José Francisco Valenzuela Sánchez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



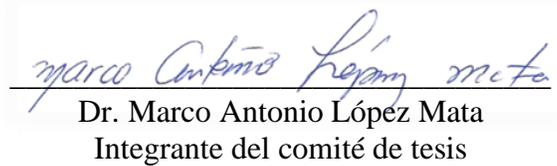
Dr. Luis Quihui Cota
Director de tesis



Dr. Jaime Lizardi Mendoza
Integrante del comité de tesis



M. C. Gloria Guadalupe Morales Figueroa
Integrante del comité de tesis



Dr. Marco Antonio López Mata
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Actividad Antimicrobiana de Aceites Esenciales de Canela, Té de Árbol y Romero Contra *Staphylococcus* Causantes de Mastitis Bovina” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor José Francisco Valenzuela Sánchez, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**
Coordinación de Programas Académicos

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Pablo Wong Gonzalez", written over a horizontal line.

Dr. Pablo Wong Gonzalez
Director General

AGRADECIMIENTOS

El primer agradecimiento es para CONACYT por el apoyo prestado durante toda mi estancia de posgrado, y que ayudó a la culminación exitosa de este proyecto. Agradezco al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD) por todas las facilidades que me dio para realizar esta maestría, siempre tendré un bello recuerdo de él.

Quiero agradecer a mi asesor de tesis, el Dr. Luis Quihui Cota por aceptarme como parte de su grupo de trabajo y por todas las enseñanzas que me dio durante este tiempo. A los miembros de mi comité de tesis, comenzando por la M.C. Gloria Guadalupe Morales Figueroa, por siempre estar pendiente de mí y de mis compañeros, por ese trato tan amable y servicial que siempre tuve de su parte. La recordaré con mucho cariño. Al Dr. Marco Antonio López Mata y el Dr. Jaime Lizardi Mendoza, por su gran apoyo y aporte de conocimiento.

Quiero dedicar un agradecimiento a la M.C. Karla Guadalupe Martínez Robinson, quien siempre me ayudó con todo lo relacionado al laboratorio, en todo momento pendiente y dispuesta a ayudarme cuando lo necesitaba, muchas gracias. Mención especial y un profundo agradecimiento para el Dr. Melvin Roberto Tapia Rodríguez, Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala, Q.B. Mónica Alejandra Villegas Ochoa y M.C. Rosalba Pérez Morales por sus atenciones y por permitirme usar sus laboratorios y sus equipos.

A mi querida familia, mis padres Víctor Manuel Valenzuela Mayboca y Martha Lourdes Sánchez Ayón, a mi hermana Irma María Valenzuela Sánchez, gracias por todo su apoyo incondicional durante este trayecto. Sin ustedes, esto no sería posible. Los amo y los admiro mucho. A mi abuelo, mis tías, tíos y primas, siempre estuvieron conmigo, gracias.

Agradezco a mis compañeros Mario Alejandro Sánchez Guerrero y Manuel Everardo Reyna Murrieta, quienes además de ser compañeros de maestría y de laboratorio, han sido grandes amigos míos desde hace años. Gracias a ustedes por todo el apoyo, las risas y las grandes experiencias que me ayudaron a vivir en este posgrado.

DEDICATORIA

Quiero dedicar mi trabajo primeramente a Dios, quien es mi motor y mi fuerza de cada día. Gracias por haber sido mi guía durante todo este trayecto. Además, este trabajo va para el Sr. Víctor Manuel Valenzuela Mayboca y la Sra. Martha Lourdes Sánchez Ayón, mis padres. Esto es para ustedes. Gracias por tanto.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN CONSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
CONTENIDO	6
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE CUADROS	9
LISTA DE ECUACIONES	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUCCIÓN	13
2. ANTECEDENTES	15
2.1. Mastitis Bovina	15
2.1.1. Mastitis Clínica y Subclínica.....	15
2.1.2. Agentes Causantes de Mastitis Bovina	16
2.1.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	16
2.1.2.2. <i>Staphylococcus</i> coagulasa negativos	17
2.1.2.3. Patógenos Menores.....	18
2.1.3. Prevalencia en México y en el Mundo.....	18
2.1.4. Repercusiones Económicas	20
2.2. Antimicrobianos Convencionales y Resistencia.....	21
2.3. Aceites Esenciales	23
2.3.1. Actividad Antibacteriana	24
2.3.2. Aceite Esencial de Canela	25
2.3.3. Aceite Esencial de Té de Árbol	27
2.3.4. Aceite Esencial de Romero	28
3. HIPÓTESIS	30
4. OBJETIVOS	31
4.1. Objetivo General	31
4.2. Objetivos Específicos	31
5. MATERIALES Y MÉTODOS	32
5.1. Diseño Experimental	32
5.2. Reactivación Bacteriana	32
5.3. Método de Difusión en Agar	33
5.3.1. Preparación del Inóculo	33
5.3.2. Preparación de los Aceites Esenciales	33

CONTENIDO (continuación)

5.3.3. Preparación de los Discos de Sensibilidad.....	34
5.3.4. Siembra del Inóculo.....	34
5.3.5. Medición de los Halos de Inhibición.....	35
5.4. Método de Microdilución en Caldo.....	35
5.4.1. Solución Madre y Microdiluciones.....	35
5.5. Conteo de Unidades Formadoras de Colonias.....	37
5.6. Análisis Estadístico.....	38
6. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	39
6.1. Método de Difusión en Agar.....	39
6.1.1. Halos de Inhibición por el Aceite Esencial de Canela.....	39
6.1.2. Halos de Inhibición por el Aceite Esencial de Té de Árbol.....	41
6.1.3. Halos de Inhibición por el Aceite Esencial de Romero.....	43
6.2. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB).....	46
6.2.1. CMI y CMB del Aceite Esencial de Canela.....	46
6.2.2. CMI y CMB del Aceite Esencial de Té de Árbol.....	47
6.2.3. CMI y CMB del Aceite Esencial de Romero.....	48
6.3. Efecto de la concentración del aceite esencial sobre las UFC/mL.....	50
6.3.1. Efecto de la Concentración del Aceite Esencial de Canela sobre las UFC/mL.....	51
6.3.2. Efecto de la Concentración del Aceite Esencial de Té de Árbol sobre las UFC/mL.....	52
6.3.3. Efecto de la Concentración del Aceite Esencial de Romero sobre las UFC/mL.....	54
7. CONCLUSIONES.....	56
8. RECOMENDACIONES.....	57
9. BIBLIOGRAFÍAS.....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Solución madre y preparación de diluciones	37
2	Cuentas de crecimiento de los distintos <i>S. aureus</i> expresados en log (UFC/mL) expuestos a diferentes concentraciones del aceite esencial de canela	52
3	Cuentas de crecimiento de los distintos <i>S. coagulasa</i> positivos expresados en log (UFC/mL) expuestos a diferentes concentraciones del aceite esencial de canela	53
4	Cuentas de crecimiento de los distintos <i>S. aureus</i> expresados en log (UFC/mL) expuestos a diferentes concentraciones del aceite esencial de té de árbol	54
5	Cuentas de crecimiento de los distintos <i>S. coagulasa</i> positivos expresados en log (UFC/mL) expuestos a diferentes concentraciones del aceite esencial de té de árbol.....	54
6	Cuentas de crecimiento de los distintos <i>S. aureus</i> expresados en log (UFC/mL) expuestos a diferentes concentraciones del aceite esencial de romero	55
7	Cuentas de crecimiento de los distintos <i>S. coagulasa</i> positivos expresados en log (UFC/mL) expuestos a diferentes concentraciones del aceite esencial de romero	56

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Componentes principales del aceite esencial de canela	26
2	Halos de inhibición de crecimiento bacteriano generados por exposición a las distintas concentraciones del aceite esencial de canela	40
3	Halos de inhibición de crecimiento bacteriano promedio generados por exposición al aceite esencial de canela según la concentración utilizada	41
4	Halos de inhibición de crecimiento bacteriano generados por exposición a las distintas concentraciones del aceite esencial de té de árbol	42
5	Halos de inhibición de crecimiento bacteriano promedio generados por exposición al aceite esencial de té de árbol según la concentración utilizada.....	43
6	Halos de inhibición de crecimiento bacteriano generados por exposición a las distintas concentraciones del aceite esencial de romero	45
7	Halos de inhibición de crecimiento bacteriano promedio generados por exposición al aceite esencial de romero según la concentración utilizada	46
8	Concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida (CMB) del aceite esencial de canela para cada bacteria probada.....	47
9	Concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida (CMB) del aceite esencial de té de árbol para cada bacteria probada.....	49
10	Concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida (CMB) del aceite esencial de romero para cada bacteria probada.....	50

LISTA DE ECUACIONES

Ecuación		Página
1	Cálculo de unidades formadoras de colonias por mililitro.....	38

RESUMEN

La mastitis bovina es considerada la enfermedad del ganado lechero de mayor importancia en el mundo, debido a que provoca grandes pérdidas económicas. El género *Staphylococcus* es el agente bacteriano más comúnmente aislado dentro de estas infecciones. Sin embargo, el uso indiscriminado e inapropiado de los medicamentos para su tratamiento ha provocado la aparición de cepas resistentes. La necesidad de buscar alternativas para el control de esta enfermedad nos ha conducido a la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas basadas en compuestos naturales aislados de plantas, entre estos se incluyen a los aceites esenciales. Por tanto, en este trabajo se realizó la evaluación de la actividad antimicrobiana “*in vitro*” de tres aceites esenciales: canela, té de árbol y romero en contra de distintas cepas del género *Staphylococcus* causantes de mastitis bovina. Para ello, se inició con un análisis de sensibilidad utilizando la metodología de difusión en disco. Se observó, que las siete bacterias probadas mostraron sensibilidad ante las concentraciones ensayadas, siendo la de 8.0% v/v del aceite la más efectiva para inhibir el crecimiento bacteriano. Asimismo, se obtuvo que todas las bacterias tuvieron una CMI de 0.3125 mg/mL y CMB de 0.625 mg/mL para el aceite esencial de canela. Por otra parte, para el aceite esencial de té de árbol se determinó una CMI de 0.625 mg/mL, mientras que la CMB fue de 1.25 mg/mL para todas las bacterias en estudio. El análisis del aceite esencial de romero arrojó valores similares, 0.625 mg/mL como CMI y 1.25 mg/mL como CMB. Se realizaron los conteos bacterianos correspondientes para observar el comportamiento de las cepas ante las distintas concentraciones de los aceites y se determinó que el *S. aureus* ATCC 6538 fue la bacteria más sensible a los aceites esenciales usados. También se observó que el aceite esencial de canela mostró la más alta efectividad antibacteriana contra los distintos estafilococos ensayados.

El presente trabajo evidenció que los aceites esenciales probados en este estudio son una alternativa promisoriosa a futuro para ayudar a combatir el problema de la resistencia bacteriana.

Palabras clave: Aceites Esenciales, Mastitis Bovina, Resistencia Bacteriana, Bacterias.

ABSTRACT

Bovine mastitis is considered the most important dairy cattle disease because it causes major economic losses. The genus *Staphylococcus* is the most isolated within these infections. However, the indiscriminate and the inappropriate use of drugs for its treatment has caused the appearance of resistant strains. Searching for alternatives to control this disease has led us to the seek for natural compounds that include the use of essential oils. Therefore, in this work we evaluated the *in vitro* antimicrobial activity of three different essential oils was evaluated: cinnamon, tree tea and rosemary against different *Staphylococcus* spp. causing bovine mastitis. Firstly, a sensitivity analysis was carried out by disc diffusion methodology. The three tested bacteria showed sensitivity to the concentrations probed, being the 8.0% v/v concentration of the oil the most effective to inhibit bacterial growth.

In addition, the Minimum Inhibitory Concentration (CMI) and Minimum Bactericidal Concentration (CMB) were estimated. As a result, a similar behavior for the seven bacteria treated was observed. A CMI of 0.3125 mg/mL and CMB of 0.625 mg/mL for cinnamon essential oil was estimated against all tested bacteria. On the other hand, for the tea tree essential oil, a CMI of 0.625 mg/mL and an CMB of 1.25 mg/mL against all the tested bacteria were estimated. Similarly, the CIM and the CMB were 0.625 mg/mL and 1.25 mg/mL respectively for the rosemary essential oil. The bacterial counts were carried out to observe the behavior of the strains being exposed to the oils. *S. aureus* ATCC 6538 was the most sensitive bacteria in this study. It was concluded that cinnamon essential oil was the most effective antimicrobial oil. The present work showed that the essential oils tested in this study are a promising alternative against the bacterial resistance problem.

Key words: Essential Oils, Bovine Mastitis, Bacterial Resistance, Bacteria.

1. INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina es la enfermedad del ganado lechero de mayor importancia en el mundo debido a que provoca pérdidas económicas muy grandes para los ganaderos, además del enorme gasto que se destina al tratamiento de los animales enfermos (Pellegrino *et al.*, 2011). Entre las principales afectaciones se encuentran los problemas en la calidad de la leche, ya que altera su composición, así como la generación de grumos o coágulos, consistencia de agua y variaciones en la cantidad de grasa. Por otra parte, en el ganado suele presentar fiebre, depresión, anorexia, ubres inflamadas e incluso hemorragia (Abebe *et al.*, 2016; Ruiz, 2005).

Existe una gran variedad de microorganismos reconocidos como los principales agentes causales de mastitis bovina, entre ellos podemos mencionar a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulasa negativos*, *Staphylococcus coagulasa positivos* y *Streptococcus spp* (Ismael, 2018).

Los tratamientos para mastitis incluyen antibióticos, pero los protocolos no se siguen al pie de la letra. Esto sucede ya que primero es necesaria la identificación del patógeno causante de la mastitis para proporcionar una terapia antibiótica adecuada según el caso (Hossain *et al.*, 2017; Ruiz, 2005). Sin embargo, la administración de medicamentos puede realizarse en forma empírica e indiscriminada, lo que posiblemente no erradique la bacteria invasora y como resultado se presentan cepas bacterianas resistentes a una gran variedad de antibióticos.

Las bacterias del género *Staphylococcus* ya han mostrado resistencia alta a los antibióticos de mayor uso clínico en ganadería como son: penicilina, eritromicina, estreptomina o gentamicina (Pellegrino *et al.*, 2011). Investigadores como Ramírez *et al.*, (2018) reportaron que *Staphylococcus aureus* aislado de leche bovina ha mostrado resistencias de 98% a trimetoprima, 81.3% a cefalexina, 38.8% a penicilina y 35.5% a ampicilina. Por otra parte, Bravo (2009) encontró que 45.8% de las cepas de *S. aureus* y 84.2% de *S. coagulasa negativo* eran resistentes a la penicilina.

Los numerosos casos de resistencia bacteriana a los antibióticos, los altos costos que implican los tratamientos para mastitis bovina y las pérdidas económicas que generan han provocado que los científicos busquen alternativas para poder reducir la problemática causada por la resistencia bacteriana a los antibióticos. Se han descrito varias sustancias o agentes biológicos que tienen éxito en inhibir o eliminar el crecimiento de patógenos causantes de mastitis *in vitro*. Aunque estos son

muy prometedores, todavía no se encuentran disponibles para su administración *in vivo* (Gomes & Henriques, 2016).

El uso de extractos naturales, particularmente los aceites esenciales de las plantas han sido probados en distintas áreas de investigación y sus efectos sobre el crecimiento bacteriano han sido analizados con resultados alentadores. Por ende, estas sustancias podrían convertirse en auxiliares en el tratamiento y prevención de la mastitis ya que muchos de ellos han mostrado excelentes propiedades antibacterianas en contra de bacterias patógenas (Mordmuang & Voravuthikunchai, 2015).

Entre los distintos aceites esenciales que existen, los de canela, té de árbol y romero han atraído la atención debido a su actividad antioxidante, desinflamatoria y por supuesto, la actividad antibacteriana. Estos aceites han sido probados en distintas especies bacterianas, sobre todo en aquellas causantes de infecciones y contaminaciones alimentarias como lo son *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*, sin embargo, los estudios sobre su efectividad antibacteriana “*in vitro*” aún son muy limitados y no concluyentes. Por lo tanto, se plantea que estos aceites esenciales de canela, romero y té de árbol posean actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa positivos*, dos de los principales agentes causantes de la mastitis bovina.

2. ANTECEDENTES

2.1. Mastitis Bovina

La mastitis bovina es una enfermedad de incidencia alta a nivel mundial, y es considerada una de las patologías más relevantes no solo por las pérdidas económicas ocasionadas a la industria láctea, sino por las dificultades para su adecuado control (Mendoza *et al.*, 2017). Los agentes etiológicos causantes de la enfermedad pueden variar de lugar a lugar dependiendo del clima, raza de animal y sistema de explotación utilizado. Por ello, la mastitis permanece como un desafío para los veterinarios en todo el mundo (Varshney *et al.*, 2012; Deb *et al.*, 2013).

2.1.1. Mastitis Clínica y Subclínica

La mastitis puede ser clasificada como clínica o subclínica. La clínica es caracterizada por un inicio repentino, y donde se presentan alteraciones en la composición y apariencia de la leche (grumos, presencia de coágulos, consistencia de agua, variaciones en la cantidad de grasa). Además, se observa la disminución de producción de leche y, sobre todo, la presencia de signos clínicos en la vaca: fiebre, depresión, anorexia, ubres inflamadas y/o con sangre (Abebe *et al.*, 2016; Ruiz *et al.*, 2005). La incidencia de mastitis clínica se considera un importante indicador de salud y bienestar del animal (Trevisi *et al.*, 2014).

Los factores de riesgo asociados a casos de mastitis clínica en el ganado pueden ser: el mes de lactación, estación del año, conteo de células somáticas (macrófagos, linfocitos, neutrófilos) elevadas en lactaciones previas o historial clínico de mastitis (Bhat *et al.*, 2017). Debido a lo anterior, la mastitis es un padecimiento que puede ser observable, ya que las vacas se muestran visiblemente enfermas y la consistencia de la leche se vuelve anormal.

La mayoría de los casos de mastitis clínica son causados por bacterias. Las más importantes son *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. y *Streptococcus* spp. (Ismael, 2018).

Por otra parte, la mastitis subclínica se caracteriza por no presentar signos visibles de enfermedad, y la leche es aparentemente normal (sin presencia de sangre ni grumos) pero existe una disminución en su producción y su conteo de células somáticas es elevado (Ruiz, 2005). Se han propuesto distintos puntos de corte para la definición de mastitis subclínica en base al conteo celular, pero se ha establecido que alrededor de 250,000 células/mL indica la presencia de la enfermedad.

Además, se ha encontrado una relación entre el conteo de células somáticas y la cantidad de leche producida por la vaca. Mientras mayor sea el número de células, el animal produce menos litros de leche (Ismael, 2018). La mayoría de los casos de mastitis subclínica son causados por estafilococos coagulasa negativos como son: *S. chromogenes* y *S. epidermidis*, también por cepas de *Streptococcus agalactiae* y sobre todo por *S. aureus* (Mpatswenumugabo *et al.*, 2017).

En contraste con la clínica, la mastitis subclínica es difícil de detectar mediante una inspección visual y palpación de las ubres debido a la ausencia de cambios visibles, lo que la convierte en un reto para su detección (Hussein *et al.*, 2018).

2.1.2. Agentes Causantes de Mastitis Bovina

2.1.2.1 *Staphylococcus aureus*. Pertenece al grupo de estafilococos coagulasa positivos, y se considera el principal causante de la mastitis bovina. Se ha encontrado transitoriamente en la piel y pequeñas heridas de las vacas, donde pueden llegar a tener acceso al pezón e infectar la glándula mamaria (Dingwell *et al.*, 2003). Se estima que es responsable de más del 30% de las infecciones de mastitis en el mundo. Es capaz de producir mastitis clínica con síntomas locales y sistémicos de moderados a severos, pero también es causante de mastitis subclínica, en donde la bacteria es persistente (Del Cura, 2014).

Algunos datos establecen que la localización geográfica de los establos puede modificar la susceptibilidad de los animales a infecciones de mastitis por *S. aureus*. Por ejemplo, predios en regiones con temperaturas altas y humedades relativas presentan mayor prevalencia de la bacteria en comparación con aquellos que tienen temperaturas más bajas (Contreras, 2009). Otra forma común de transmisión se presenta entre vacas antes del parto y, además, se ha demostrado que las

moscas juegan un papel importante como vectores en la transmisión y propagación de la enfermedad (Del Cura, 2014).

El tratamiento de las infecciones causadas por *S. aureus* es complicado, ya que la presencia de exopolisacáridos en las bacterias dificulta la acción de los fármacos. A esto se suma la capacidad de vivir en el interior de los macrófagos y células epiteliales, además de la alta resistencia a los antibióticos. La tasa de recuperación depende de varios factores: la edad de la vaca (mientras es mayor, menor probabilidad de cura), mayores niveles de células somáticas, elevada duración de la infección, mayor número de conteo de colonias bacterianas en cultivos (Del Cura, 2014).

2.1.2.2 *Staphylococcus coagulasa negativos*. Los *Staphylococcus coagulasa negativos* (SCN) son organismos que constituyen parte de la microbiota normal de la piel, mucosas y glándulas de mamíferos. Entre ellos se encuentran *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. chromogenes*, *S. simulans* (Bonetto, 2014).

En los diagnósticos de mastitis bovina, los SCN normalmente no son identificados a nivel de especies, sino que son tratados como un grupo homogéneo. Los altos costos de identificación de especies y la falta de tratamientos específicos para cada uno de ellos son motivos justificados para agruparlos entre sí (Bonetto, 2014). Las infecciones por SCN suelen ser leves o de tipo subclínico, aunque en algunas ocasiones pueden causar procesos más graves y persistentes. Además, provocan aumentos en el número de células somáticas y la consecuente disminución en la calidad y cantidad de leche debido al daño causado en el tejido mamario (Sánchez & Gutiérrez, 2015).

El conocimiento de la virulencia y los mecanismos asociados a SCN son limitados. Hoy en día, se han identificado a dos posibles mecanismos: su invasividad (permean barreras protectoras para adherirse a las células del hospedero) y su toxicidad, porque son capaces de sintetizar enzimas como lipasas, ADNasas, hemolisinas y otras exoenzimas que degradan los tejidos, contribuyendo a la persistencia de las infecciones por estas bacterias (Tremblay *et al.*, 2013; Fariña *et al.*, 2013).

En la actualidad, los *Staphylococcus coagulasa negativos* (SCN) están siendo considerados como patógenos emergentes de la mastitis bovina y se aíslan frecuentemente en rebaños de vacas donde a menudo provocan infecciones antes del parto. Además, la resistencia a antibióticos es más común en este grupo a comparación de *S. aureus*, aunque frecuentemente los SCN responden mejor a los tratamientos con antibióticos (Ruiz, 2005).

2.1.2.3 Patógenos menores. Existen otro tipo de bacterias, aunque menos comunes, las cuales también pueden ser causantes de mastitis bovina, y consideradas como patógenos menores. El hábitat de estas bacterias es el medio ambiente donde se encuentran las vacas, por lo que se considera la principal fuente de infección. Dentro de esta categoría se incluyen coliformes como *Escherichia coli* o *Klebsiella* spp., distintos tipos de *Streptococos* y especies de *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. (Ruiz, 2005).

Los llamados patógenos ambientales están ampliamente diseminados en los lugares donde viven las vacas, en especial si están húmedos y/o con un alto contenido de materia orgánica (fecal, restos de alimentos como granos húmedos, etc.). Este tipo de infecciones ocurren por lo general entre los ordeños. La realización de este proceso bajo condiciones higiénicas disminuye en gran medida el riesgo de infección en el ganado (Corbellini, 2002). Estos patógenos causan mastitis clínica y los signos se caracterizan por ser de intensidad moderada a severa, la leche es anormal (con sangre, grumos) y la glándula se encuentra inflamada. Además de esto, infecciones por bacterias como *Klebsiella* spp. provocan una respuesta inflamatoria severa (Ruiz, 2005).

2.1.3 Prevalencia en México y en el Mundo

La mastitis bovina es uno de los principales problemas que enfrentan los productores de ganado lechero en el mundo. Las condiciones en las que se encuentra el ganado, así como el desconocimiento de la enfermedad, son algunas de las causas por las que este problema ha aumentado durante los últimos años. Se estima que un tercio de las vacas lecheras de todo el mundo están afectadas por cualquier forma de mastitis (Vento *et al.*, 2008).

La prevalencia de mastitis bovina ha sido estudiada alrededor del mundo, particularmente en Colombia debido a que las actividades ganaderas representan el mayor aporte al PIB (Producto Interno Bruto) de ese país. Trujillo *et al.* (2011) reportaron una prevalencia de 19.9% en 7 fincas colombianas estudiadas. Otros estudios mostraron porcentajes que se encuentran entre 34-50% en distintas zonas de ese país (Calderón *et al.*, 2008; Pinzón *et al.*, 2009; Ramírez *et al.*, 2014). Uno de los trabajos más recientes por Sánchez *et al.* en 2018 encontró un 45.4% de prevalencia de mastitis bovina en una de las regiones lecheras de Colombia, donde los estafilococos fueron el

microorganismo causante más común.

En Ecuador, Bonifaz y Conlago (2016), estimaron una prevalencia de 66% de la infección en una zona ganadera del país. Asimismo, Santibáñez *et al.* (2011), reportaron 65.5% de prevalencia en un distrito lechero de Perú, mientras que Castillo *et al.* (2009), reportaron una prevalencia de 35.2% de mastitis bovina de 12 fincas distintas en Venezuela. Por otra parte, el continente africano ha reportado cifras que se encuentran en rangos similares a las reportadas en el continente americano. Ondiek *et al.* (2013), muestrearon vacas lactantes en Kenia y encontraron que el 34.1% tenían mastitis. Otra investigación realizada por Iraguha *et al.* (2015) en 23 granjas de Ruanda estimó una prevalencia de 51.8% de mastitis.

En México, la prevalencia de mastitis bovina se mantiene en un rango de entre 30% - 75% aproximadamente. Diversos estudios han mostrado tasas de infección variables en distintas regiones del país. Las causas asociadas podrían ser las condiciones climáticas, características del ambiente y las medidas de higiene y condiciones de ordeño de cada establo ganadero.

En la zona sur de México, uno de los primeros reportes lo realizaron Velásquez *et al.* (2001) en el estado de Veracruz, donde encontraron mastitis desde 33% a 46%. Ávila *et al.* (2004), reportaron una prevalencia de mastitis de 69% para el Valle de México, mientras que Guízar *et al.* (2008), de 49% en el estado de Michoacán. Asimismo, Bolaños *et al.* (2004), estimaron una prevalencia de 33% a 49% de mastitis en Hidalgo, y de igual manera, Romero *et al.* (2004), encontraron una prevalencia de 46% en Tlaxcala. Por otra parte, Pech *et al.* (2007), reportaron una prevalencia de 53% en nueve unidades de producción de Yucatán. Aunado a esto, resultados de Aguilar *et al.* (2014), indicaron que la prevalencia de mastitis bovina fue de 35.6% en 37 establos muestreados en el estado de Jalisco.

En la zona norte de nuestro país, los estudios sobre la prevalencia de mastitis bovina son limitados. El primer dato en el estado de Sonora lo presentaron Solórzano *et al.* (1980), quienes mostraron una prevalencia de 30.94% de mastitis en establos de Hermosillo. Posteriormente, Gerlach *et al.* (2009), reportaron un 18.3% de mastitis subclínica y 5.35% de mastitis clínica en un establo del municipio de Santa Ana. Uno de los estudios más recientes lo realizó Valle (2015), quien encontró una prevalencia de 20.6% de mastitis en la comunidad de Cobachi, Sonora.

La información relacionada con la prevalencia de la mastitis bovina, sus factores de riesgo, y el tipo de patógeno involucrado, es esencial para diseñar medidas de prevención y control de la enfermedad (Birhanu *et al.*, 2017).

2.1.4. Repercusiones Económicas

La mastitis bovina es una enfermedad de alta prevalencia en los ganados lecheros y subsecuentemente afecta de manera importante la economía de la industria lechera. Esto se debe a que la propia enfermedad provoca una disminución en la cantidad de leche producida por la vaca, lo cual aumenta los costos de los tratamientos y el desecho (aquellas vacas destinadas al matadero tras su última lactancia) temprano de las vacas.

Se consideran una gran variedad de factores al momento de determinar el impacto económico de la mastitis. Algunos son intrínsecos de la vaca como su edad o número de parto, la raza, el momento en la lactancia y su duración, el estado reproductivo y el volumen de producción láctea. Otros factores son las características anatómicas de las ubres, el estado de su sistema inmunológico o deficiencias nutricionales (Villagómez y Cervantes, 2013). Existen además factores extrínsecos ajenos a la vaca y que también repercuten en el impacto económico de la enfermedad. Algunos de ellos son las condiciones ambientales del establo, el estrés calórico, las épocas del año, la cantidad de ganado o características de los equipos de ordeño. Asimismo, otros factores influyentes son la presencia de microorganismos patógenos en ubres o ambiente, el manejo higiénico antes, durante y después del ordeño, o los procedimientos y la rutina de ordeño (Villagómez y Cervantes, 2013).

La mastitis subclínica es mucho más importante económicamente hablando que la clínica. En principio, tiene mayor prevalencia, su detección es más compleja y pasa muchas veces desapercibida, lo que provoca un aumento en el número de infecciones. Asimismo, provoca elevado número de células somáticas en leche, lo que disminuye su precio o incluso limita su comercialización (López, 2014).

El Consejo Nacional de la Mastitis (NMC) en Estados Unidos, estima que la enfermedad provoca una pérdida promedio de \$225 dólares anuales por vaca en un hato con problemas de infección (Meza *et al.*, 2006). El 64% de las pérdidas se atribuyen a una disminución de la producción de leche, 14% al descarte de leche después de tratamientos, 8% al costo de medicamentos y de honorarios profesionales, 13% a muertes prematuras y 1% a cuestiones diversas (Saran y Chaffer, 2000).

En México, se estima que las pérdidas económicas derivadas de la mastitis son de 2,500 millones

de pesos anuales, donde solo entre el 20 al 30% pertenecen al tipo clínico, mientras que entre el 70% y 80% son ocasionadas por la mastitis subclínica (Romero, 2004).

Debido a la cuantiosa pérdida económica que causan las infecciones por mastitis en la industria ganadera, se vuelve necesario el seguimiento de las políticas establecidas por cada país para reducir y controlar los casos. La mayoría consisten en mantener una buena higiene en el lugar donde se encuentran los animales y asear las ubres para evitar la proliferación de bacterias (Armenteros *et al.*, 2002). También es necesario llevar prácticas de ordeño de calidad, higiénicas, realizar la desinfección de pezones post-ordeño, verificar el equipo utilizado, vacunar y cuidar las dietas de las vacas. El cumplimiento de estas medidas puede reducir la aparición de la enfermedad en el ganado lechero (Scaramelli y González, *et al.* 2005).

2.2. Antimicrobianos Convencionales y Resistencia

Los métodos actuales de control de mastitis fueron desarrollados hacia fines de la década de los sesenta y están basados en la prevención de nuevas infecciones. La terapia con antibióticos es uno de los pilares de programas de control tanto de casos clínicos como subclínicos (Calvinho *et al.*, 2001). El principal objetivo del tratamiento con antibióticos es eliminar al microorganismo causante de la enfermedad, mediante una administración óptima de la droga en el sitio activo de la infección. Además, se busca que la glándula mamaria se recupere y la leche producida regrese a sus niveles normales. De igual manera, se busca que el potencial de producción continúe y que el costo/beneficio del tratamiento sea positivo (Andresen, 2011).

Un tratamiento adecuado se reflejará en la disminución de la incidencia de mastitis y en la mayor calidad de la leche, además reduce el sufrimiento de los animales y previene el consumo de alimentos contaminados que causan enfermedades en los humanos.

Para aplicar el tratamiento se consideran los siguientes factores: detección de la glándula mamaria infectada, inicio rápido del tratamiento y su administración correcta además de su registro. Asimismo, se deben identificar las vacas en tratamiento y asegurarse que su leche se encuentre libre de antibióticos antes de mezclarla con la leche de tanque (Ruiz, 2005).

Se recomienda que antes de iniciar cualquier tratamiento para mastitis bovina, primero se realicen

los cultivos de muestras provenientes del ganado enfermo con el fin de identificar al agente causal y su sensibilidad a fármacos. Una vez aislado, se selecciona aquel antibiótico con un espectro lo más estrecho posible contra el patógeno específico (Hossain *et al.*, 2017). Desafortunadamente esto casi no se realiza porque los resultados de diagnóstico por laboratorio son lentos. Entonces, se utilizan antibióticos a conveniencia, por precio o por alcance, lo cual los hace menos efectivos (Ruiz, 2005). Lo anterior puede provocar la persistencia de las infecciones en el ganado, y la subsecuente aparición de bacterias resistentes a los antibióticos, todo derivado de ese uso inadecuado durante el tratamiento.

Los mecanismos básicos de resistencia bacteriana pueden ser clasificados en tres. En primer lugar, tenemos a aquellas bacterias que son capaces de destruir o modificar la estructura química del fármaco. Esto lo realizan gracias a la producción de enzimas destinadas para esta función. Una de las más conocidas son las beta-lactamasas, que se caracterizan por hidrolizar el núcleo beta-lactámico rompiendo el enlace amida del anillo. Otro ejemplo es la eritromicina esterasa, la cual hidroliza el anillo de lactona de ciertos antibióticos (Pérez-Cano & Robles-Conteras, 2013). El segundo mecanismo consiste en bacterias que pueden alterar el sitio blanco que posee el antibiótico. En estos casos, la bacteria modifica algunos aspectos propios como la pared celular o su membrana.

Algunas especies que tienen los mecanismos antes mencionados son *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *E. coli* (Mosquito *et al.*, 2011). Además, existe un tercer mecanismo de resistencia que actúa alterando las barreras de permeabilidad membranal. Esto lo realiza mediante la inducción de cambios en los receptores bacterianos específicos para los antibióticos o por alteraciones en aquellos componentes que forman parte de la envoltura de la célula bacteriana. Esto provoca la expresión de bombas de eflujo que “expulsan” el antibiótico fuera de la bacteria. Este tipo de sistemas se encuentra tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas y es capaz de conferir resistencia ante tetraciclinas, beta-lactámicos y quinolonas (Riverón *et al.*, 2013).

Los numerosos casos de resistencia bacteriana a los antibióticos, los altos costos que implican los tratamientos para mastitis bovina y las pérdidas económicas que se generan, han creado la necesidad de buscar alternativas de tratamiento, no solo para el control de la enfermedad sino también para minimizar el proceso de resistencia que las bacterias generan hacia el tratamiento con antibióticos. Se han descrito sustancias o agentes biológicos que tienen éxito en prevenir el

crecimiento de patógenos causantes de mastitis *in vitro*. Aunque algunos de estos enfoques son muy prometedores como tratamiento o terapia complementaria, no existe aún, el tratamiento disponible para su administración “*in vivo*” (Gomes & Henriques, 2016).

Una alternativa para enfrentar el problema de la resistencia bacteriana podría ser a través del uso de compuestos naturales obtenidos de las plantas, los cuales pueden ser buena opción para ayudar a disminuir la cantidad de infecciones, combatir a los agentes causales de la mastitis bovina y con ello, minimizar las pérdidas monetarias de la industria de ganado lechero (Mordmuang & Voravuthikunchai, 2015). Aunque son diversos los compuestos que pueden obtenerse de las plantas, la atención se ha enfocado principalmente en el uso de aceites esenciales, los cuales son reconocidos principalmente por sus propiedades antibacterianas.

2.3. Aceites Esenciales

Los aceites esenciales son sustancias aromáticas que se encuentran en numerosas plantas. La Organización Internacional de Normalización define a un aceite esencial como un producto obtenido a partir de materia prima natural de origen vegetal mediante métodos de destilación por vapor. Este proceso puede ser mecánico a partir del epicarpio de los cítricos o por destilación en seco (International Organization for Standardization 9235, 2013).

Se considera que los aceites esenciales contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas. Estos se encuentran contenidos en glándulas o vesículas secretoras inmersas en tejidos como hojas, flores, frutos, cortezas, semillas o raíces (Ríos, 2010). Los aceites esenciales contienen una gran cantidad de sustancias orgánicas como compuestos alifáticos (alcoholes, ésteres, ácidos, alcanos, fenoles, cetonas), monoterpenos o sesquiterpenos. La naturaleza de un aceite puede variar de acuerdo con la familia botánica, especie, año de cultivo, época y hora de recolección, el lugar geográfico o cambios genéticos producidos por las plantas; por lo que cada etapa del proceso de producción es un determinante crítico de la calidad (Vera, 2018).

Las plantas pueden producir aceites esenciales para diversos fines, normalmente funcionan como protección en contra de plagas o enfermedades y para prevenir invasiones por otras plantas. Tradicionalmente han sido utilizados por la industria cosmética para la elaboración de perfumes,

aunque durante el último siglo han cobrado relevancia en el sector farmacéutico y alimentario debido a sus propiedades antimicrobianas y a la creciente demanda de productos de origen natural por parte de los consumidores (Burt, 2004; Elizari, 2013).

2.3.1. Actividad Antibacteriana

Debido a la creciente resistencia bacteriana a los antibióticos convencionales, se buscan distintas alternativas para el tratamiento y prevención de enfermedades causadas por infecciones bacterianas. En los últimos años, los aceites esenciales han sido una opción viable.

La actividad antibacteriana de los aceites esenciales depende de la composición de sus componentes. Éstos pueden actuar contra una amplia gama de microorganismos patógenos, abriendo así una ventana para la creación de nuevas medidas terapéuticas y de prevención basadas en el uso de aceites esenciales. Algunos estudios han probado y reportado la acción antibacteriana de distintos aceites esenciales contra infecciones bacterianas comunes, entre ellos se encuentran: el orégano, canela, tomillo, eucalipto, limón, romero o té de árbol (Argote-Vega *et al.*, 2017).

Los métodos más utilizados para la evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos o aceites esenciales vegetales son el de difusión en agar y el de microdilución en caldo. El primero consiste en aplicar una cantidad determinada del aceite esencial sobre un disco de papel que se coloca sobre la superficie del medio de agar donde se ha distribuido previamente el inóculo con el microorganismo en cuestión. El aceite esencial se difunde alrededor del disco y la sensibilidad del microorganismo se relaciona con el tamaño del halo de inhibición del crecimiento bacteriano, que puede categorizarse como sensible o resistente al aceite (Castaño, 2012).

Por otra parte, el método de microdilución se basa en incorporar el aceite esencial a un medio de cultivo como lo puede ser un agar o caldo. Se preparan tanto las diluciones deseadas, así como una serie de placas con diferentes concentraciones del aceite esencial. Los resultados se expresan como la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB), que se comparan con la actividad del agente antimicrobiano convencional (Zekaria, 2006).

Los ensayos antibacterianos con aceites esenciales en relación con el contexto de mastitis bovina han sido muy poco estudiados, pero su eficacia contra cepas bacterianas de enfermedades

diferentes y cepas de referencia, los posiciona como una buena alternativa antibacteriana a probar. Ya sea como auxiliar en el tratamiento o como profilaxis, los aceites esenciales podrían ser una alternativa contra toda la problemática económica que representa para la industria ganadera la alta incidencia de la infección y al problema de resistencia que las bacterias presentan hacia los antibióticos del cuadro de elección para tratar mastitis bovina. Por lo anterior, los siguientes subtemas se relacionarán en el contexto de los aceites esenciales con mayor potencial o alternativa para el tratamiento de la mastitis bovina.

2.3.2. Aceite Esencial de Canela

La canela es una de las especias más importantes en el mundo, no solamente en la cocina, sino por su uso tradicional y moderno en la medicina. El árbol de canela (familia Lauraceae) posee alturas de entre 10 y 15 metros y es originario de Sri Lanka, siendo la corteza interna la más aprovechada (Rao y Gan, 2014).

El aceite esencial de canela es un líquido amarillento con un olor y sabor muy característico. Es posible obtenerlo por métodos de destilación principalmente a partir de las hojas o de la corteza seca, y constituye alrededor del 0.5-2.5 % de su composición (Vargas, 2019).

Este aceite esencial es uno de los más estudiados debido a sus diversas aplicaciones y su característico olor. A partir de él se han aislado distintos compuestos biológicamente activos en la canela, particularmente el cinamaldehído, ácido cinámico y acetato de cinamilo. Este aceite ha sido muy investigado debido a sus características y propiedades, entre las cuales se pueden mencionar: antiinflamatorias, antioxidantes y como agentes antimicrobianos (Kaskatepe *et al.*, 2016).

Diversas publicaciones reportan que la composición de los aceites esenciales en general es afectada por su origen geográfico, la estación del año y la parte de la planta de donde proviene (Faleiro *et al.*, 2002). Teles *et al.* (2016) reportaron la composición química del aceite esencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) mediante la técnica de cromatografía gaseosa acoplada a gases, donde el cinamaldehído aparece con un porcentaje mayor (44.30 %), seguido por el alfa-copaeno (16.35%) y el beta-cariofileno (8.26 %) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Componentes principales del aceite esencial de canela

Componente	Porcentaje (%)
Cinamaldehído	46.30
Alfa-copaeno	16.35
Beta-Cariofileno	8.26
Cinnamal acetato	7.54
Benzaldehído	4.16
3-fenilpropionaldehido	2.95
Óxido de Cariofileno	2.80

Teles *et al.* (2019)

El mecanismo de acción antibacteriana del aceite esencial de canela ha sido parcialmente dilucidado. Gómez y López (2009) indican que el aceite esencial de canela ejerce su acción desestabilizando la integridad de la membrana celular de los microorganismos. Esta acción puede ser ejercida por elementos particulares del aceite o por acción sinérgica de sus componentes. Esta acción sobre la membrana puede provocar el aumento de la permeabilidad de la membrana de la célula bacteriana, lo cual ocasiona su muerte (Zhang *et al.*, 2016).

El cinamaldehído ha sido categorizado como el componente con mayor acción antibacteriana del aceite esencial de canela. Se ha propuesto que su grupo carbonilo es capaz de unirse a las proteínas celulares bacterianas, evitando la acción de las enzimas amino-ácido descarboxilasas. Estas enzimas son las responsables de la formación de compuestos que juegan un papel importante en la conservación de la integridad de la superficie celular. Esta limitación enzimática por acción del aceite esencial también limita el estado de supervivencia de la bacteria (Gómez y López, 2009). Asimismo, Yang *et al.*, (2011) estudiaron la actividad antibacteriana del aceite esencial de canela, y reportaron que las bacterias expuestas a él sufrían cambios morfológicos: la adopción de formas ovaladas, presencia de arrugas, pérdida de material celular o formación de agregados celulares. Estos descubrimientos revelaron que la acción de este aceite esencial se centra principalmente sobre la membrana bacteriana.

Diversos estudios también han evaluado las propiedades antibacterianas del aceite esencial de canela. Se ha encontrado una importante acción en contra de algunos géneros Gram positivos como *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp. y *Bacillus* spp. (Unlu *et al.*, 2010). De igual manera, ha sido muy efectivo al probarse en bacterias Gram negativas que incluyen a *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* (Kaskatepe *et al.*, 2016).

Por tanto, el aceite esencial de canela podría ser potencialmente útil para el tratamiento o como terapia auxiliar contra infecciones bacterianas asociadas a la mastitis bovina.

2.3.3. Aceite Esencial de Té de Árbol

El árbol de té (*Melaleuca alternifolia*) es un árbol de la familia de las Mirtáceas. Generalmente no sobrepasa los 6 m de altura y es originario de Australia, donde es cultivado de manera frecuente. A partir de las hojas y ramas tiernas se obtiene su aceite esencial, un líquido que va de incoloro a amarillo pálido, destacado por sus distintas propiedades antibacterianas, antifúngicas y antiinflamatorias (Vila & Cañigual, 2006).

El aceite esencial de té de árbol está compuesto de terpenos hidrocarbonados, donde destacan principalmente los monoterpenos, sesquiterpenos y alcoholes asociados (Carson *et al.*, 2006). Dentro de estos compuestos tenemos al Terpinen-4-ol, el cual es considerado como el principal ingrediente activo del aceite. Diversos autores han reportado su presencia entre un 30-40% de la composición total del aceite. Otros componentes de importancia son el γ -terpineno y el α -terpineno en concentraciones que van del 10-28% y 5-13% respectivamente (ISO 4370, 2004; Carson *et al.*, 2006).

Particularmente, el aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* (árbol de té) ha sido reconocido por sus propiedades antisépticas (Gnatta *et al.*, 2013). Debido a su acción antibacteriana, el aceite esencial del árbol de té ha sido probado ante gran variedad de bacterias. Dentro del grupo de las Gram positivas, Franca *et al.* en 2017 reportaron que al aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* fue efectivo ante bacterias como *Streptococcus mutans* y *Streptococcus salivarius* causantes del biofilm dental. De igual manera, Sá-Silva *et al.* en 2019 reportaron que el aceite era capaz de inhibir el crecimiento de las cepas de referencia de *Listeria monocytogenes* y *Streptococcus mutans* en distintos tipos de carne.

En el caso de bacterias Gram negativas, Mumu & Hoosain en 2018 encontraron que el aceite esencial de té de árbol mostró efectividad *in vitro* contra *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus vulgaris*. Adicionalmente, Sakkas *et al.* en 2016 reportaron que el aceite de *Melaleuca alternifolia* tuvo actividad antimicrobiana contra *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas*

aeruginosa.

El mecanismo de acción que tiene el aceite sobre las bacterias ha sido parcialmente dilucidado. Se basa principalmente en que los componentes del aceite son capaces de alterar la pared celular y la membrana citoplásmica de las bacterias, y como consecuencia, se presenta la lisis celular y la salida de los componentes intracelulares (López *et al.*, 2015). La envoltura celular es vital para la sobrevivencia de la bacteria y la protección del citoplasma del medio externo, por tanto, cualquier cambio en la permeabilidad de la pared celular afecta el crecimiento de la bacteria. Debido a que los aceites esenciales son ricos en fenoles, tienen el potencial de penetrar en la capa de fosfolípidos de la pared celular de las bacterias, unirse a proteínas y bloquear la actividad normal de ellas (Sakkas *et al.*, 2015). Es bien sabido que los aceites esenciales tanto del té de árbol como de otras plantas tienen una gran variedad de moléculas en su composición, por lo que no es posible atribuir los mecanismos de acción a un solo componente, sino más bien a los diversos componentes y reacciones bioquímicas que conllevan a la muerte celular de las bacterias.

2.3.4. Aceite Esencial de Romero

El romero (*Rosmarinus officinalis*) es una planta aromática muy conocida que ha sido utilizada desde la antigüedad como un condimento de los alimentos y con fines medicinales (Luego, 2008). Dentro de la medicina tradicional, ha sido usada como antiasmático, coadyuvante digestivo, dolores de cabeza, desórdenes circulatorios, para mejorar la agudeza visual y como antirreumático (Jafari & Pashazadeh, 2020).

Se ha encontrado que en las hojas de la planta se concentran la mayor parte de los principios activos del romero y del aceite esencial que oscilan entre 1.0 y 2.5% (Mendoza *et. al.*, 2019). Este aceite está compuesto principalmente por derivados terpénicos, carburos pineno, canfeno, borneol y alcanfor. Trabajos realizados por Sienkiewicz *et al.* (2013), Jiang *et al.* (2011) y Bendeddouche *et al.* (2011) mostraron que el aceite contiene principalmente 1,8-cineol (10.0%-46.4%), alcanfor (11.4%-37.6%) y a-pineno (11.0%-20.14%).

Los usos del romero son muy variados debido al gran número de propiedades que tiene. Por sus propiedades aromáticas se ha usado en la industria cosmética, mientras que la alimentaria lo

aprovecha como saborizante de distintos preparados. Hoy en día, y gracias a los extractos contenidos en él, el romero ha tomado relevancia dentro del área de la investigación en salud (Cueva, 2017).

Diversos estudios “*in vitro*” han evaluado la actividad antibacteriana del aceite esencial de romero sobre distintas cepas bacterianas, inhibiendo tanto microorganismos Gram positivos como Gram negativos. Coy y Acosta (2013) reportaron que el aceite provocó inhibiciones hasta de 45% para cepas de referencia como *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. Asimismo, Jafari & Pashazadeh (2020) encontraron que el aceite esencial de romero es efectivo ante *Escherichia coli* de referencia, mientras que Burt (2004) también reportó efectividad ante *Bacillus cereus* y *Clostridium perfringes* “*in vitro*”.

El mecanismo de acción ha sido parcialmente dilucidado, y se atribuye principalmente a la acción de flavonoides y compuestos terpenoides y polifenoles. Dichos componentes tienen acción degradando la membrana de las bacterias, lo cual modifica su permeabilidad y provoca la pérdida de distintos iones, cambios en el transporte en la membrana y baja en la producción de ATP. Como consecuencia, las bacterias se vuelven más vulnerables al ataque inmunológico, a la acción de los antibióticos o la propia lisis de la célula (Al Sereiti *et al.*, 1999; Purca, 2013).

3. HIPÓTESIS

Los aceites esenciales de Canela (*Cinnamomum zeylanicum*), Té de Árbol (*Melaleuca alternifolia*) y Romero (*Rosmarinus officinalis*) tienen efecto antibacteriano “*in vitro*” en contra de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa* positivos causantes de mastitis bovina.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar la actividad antibacteriana “*in vitro*” de los aceites esenciales de Canela (*Cinnamomum zeylanicum*), Té de Árbol (*Melaleuca alternifolia*) y Romero (*Rosmarinus officinalis*) en contra de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa* positivos causantes de mastitis bovina.

4.2. Objetivos Específicos

1. Evaluar la sensibilidad de las bacterias seleccionadas ante distintas concentraciones de aceites esenciales mediante el método de difusión en disco.
2. Evaluar la actividad antimicrobiana “*in vitro*” de los aceites esenciales sobre las cepas bacterias seleccionadas mediante el método de microdilución.
3. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de cada aceite esencial sobre las bacterias seleccionadas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Diseño Experimental

Este estudio inició a partir de aislamientos bacterianos que se obtuvieron de ganado bovino que padecía mastitis bovina. En este trabajo, las cepas utilizadas fueron tres *Staphylococcus aureus* (a los que referiremos como 10V, 11V y 13V) y tres *Staphylococcus coagulasa* positivos (1V, 2V y 3V) aislados de ganado bovino proveniente del Estado de Sonora. Además, se contó con un *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P como cepa de referencia. Se realizó la evaluación de la sensibilidad antimicrobiana de tres aceites esenciales comerciales: canela (Sigma-Aldrich, densidad: 1025 mg/mL), romero (Sigma-Aldrich, densidad: 908 mg/mL) y té de árbol (Sigma-Aldrich, densidad: 898 mg/mL), utilizando la metodología de difusión en agar establecida por Kirby-Bauer. Para esta metodología se utilizaron discos del antibiótico kanamicina (Becton-Dickinson, 30 µg) como control positivo (inhibición). La selección de este antibiótico como control está basada en que es un medicamento utilizado para el tratamiento de la mastitis en bovinos. Por otra parte, como control negativo se usaron discos impregnados únicamente con DMSO 10% v/v (Dimetil Sulfoxido).

También se realizó la metodología de microdilución en caldo para obtener la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de cada uno de los aceites esenciales contra las cepas bacterianas en estudio. Para este proceso se trabajaron dos controles: un control positivo de inhibición que fue la utilización de kanamicina (Sigma-Aldrich) preparada a 1 mg/mL. Por otra parte, el control negativo fue preparado con caldo estéril y nuestro inóculo, pero sin el aceite esencial.

5.2. Reactivación Bacteriana

Cada una de las cepas a utilizar permaneció congelada en glicerol al 80% y almacenada a -80°C

hasta su utilización. Se realizó el proceso de reactivación de cada una de ellas tomando una asada (0.01 mL) con un asa bacteriológica y se inoculó cada una por separado en tubos de ensaye con caldo BHI (infusión cerebro corazón) estéril. Se incubaron a 37°C por 48 horas. Pasado este tiempo se tomó una muestra de 100 µL de cada caldo y se inocularon por separado en placas de agar Mueller-Hinton usando la técnica de estría y se incubaron en condiciones de 37°C durante 48 h. Después de incubar se realizaron tinciones Gram para comprobar que las características de cada cepa a utilizar eran las correctas.

5.3. Método de Difusión en Agar

5.3.1. Preparación del Inóculo

Cada uno de los aislados bacterianos usados fueron sembrados en caldo BHI y se incubaron por 24 horas a 37°C. Se estandarizaron al 0.5 de la escala de McFarland a 620 nm en un espectrofotómetro para ajustar una concentración aproximada de 1.5×10^8 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por mililitro. Es importante mencionar que la utilización de estas bacterias no debe sobrepasar los 15 minutos después de haber sido ajustadas.

5.3.2. Preparación de los Aceites Esenciales

Para fines de este trabajo se tomaron 3 concentraciones de cada aceite esencial: 2.5%, 5.0% y 8.0% (v/v), las cuales se mezclaron con DMSO 10% (Dimetil Sulfóxido) (1% v/v) y una solución de buffer fosfato (PBS) estéril a un pH de 7.4 (Kwieciński *et al.*; 2009; López *et al.*, 2017; Montero-Recalde *et al.*, 2017). Cada una de las preparaciones (9 en total) se sometieron a agitación constante en un ThermoMixer F1.5 (Eppendorf®) durante 20 minutos y a 200 rpm hasta obtener una consistencia lechosa. Cada una de las emulsiones fueron almacenadas en viales ámbar y colocadas

en refrigeración (5°C) evitando el contacto con la luz (López *et al.*, 2017).

5.3.3. Preparación de los discos de sensibilidad

En este proceso se utilizaron discos estériles de papel filtro Whatman No. 1 de aproximadamente 6 mm de diámetro. Cada uno de ellos fue impregnado con 20 µL de las emulsiones de cada aceite esencial (canela, romero y té de árbol) y se dejaron reposar para la absorción correcta del aceite (Picazo, 2000; Taroco *et al.*, 2006).

5.3.4. Siembra del Inóculo

De cada una de las cepas bacterianas (previamente ajustadas a 0.5 McFarland) se tomaron 100 µL y se colocaron en el centro de una placa de agar Mueller-Hinton. Posteriormente con ayuda de un asa de Digrafsky se extendió de manera uniforme y completa sobre toda la superficie del medio (sembrado masivo). Realizado esto se dejaron reposar por aproximadamente 5 minutos y con ayuda de pinzas estériles los discos de sensibilidad preparados anteriormente fueron colocados sobre la superficie del medio en la placa (Picazo, 2000). Cada placa contenía 5 discos distintos: 1 con el antibiótico kanamicina (Becton-Dickinson, 30 µg) como control positivo de inhibición, uno con DMSO 10% (Dimetil Sulfoxido) como control negativo de inhibición, y 3 discos con las diluciones de los aceites esenciales a probar: 2.5%, 5.0% y 8.0%. (López *et al.*, 2017). Esto se ajustó a lo recomendado por diversos manuales de microbiología clínica, donde la sugerencia es no exceder el límite de 6 discos por cada placa Petri de 100 mm (Taroco *et al.*, 2006; Picazo, 2000).

Al colocarse en placa, los discos fueron presionados ligeramente y se reposaron 5 minutos para asegurar su adherencia al medio. Cada una de las placas inoculadas fue incubada de manera invertida en condiciones de 37°C durante 24 h y cada cepa fue ensayada por triplicado.

5.3.5. Medición de los Halos de Inhibición

Transcurrido el periodo de incubación, y con ayuda de un vernier electrónico digital 150 mm/0.01 mm, se midieron los diámetros de los halos de inhibición observados alrededor de cada disco con las concentraciones de los aceites en cada placa. Al realizarse el análisis, se tomaron los datos obtenidos y se obtuvo el valor promedio para cada caso, el cual se registró en las cuadros de resultados. En aquellos casos donde el diámetro de los halos de inhibición es menor a 7 mm se reportó como <7, y se consideró a la bacteria como no sensible al aceite.

5.4. Método de Microdilución en Caldo

La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de cada uno de los aceites esenciales sobre las bacterias seleccionadas se llevó a cabo por el método de microdilución en caldo utilizando microplacas de poliestireno de 96 pocillos (Falcon™ y/o Costar™). Para este trabajo se seleccionó el caldo Mueller-Hinton, ya que es el recomendado en este tipo de metodología.

Para este procedimiento, primero se prepararon los inóculos bacterianos a utilizar. Con ayuda de un lector de microplacas FLUOstar Omega® (BMG LabTech) se midieron las absorbancias de 300 µl de cada una de las bacterias (por triplicado), y se ajustaron para tener un equivalente al estándar 0.5 de McFarland. Con esto se obtuvo una concentración bacteriana de aproximadamente 1.5×10^8 UFC/mL, y dicho ajuste se realizó utilizando caldo Mueller-Hinton estéril (Sánchez *et. al.*, 2006).

5.4.1. Solución Madre y Microdiluciones

Como paso inicial se realizó la preparación de la solución madre de cada uno de los aceites esenciales a probar. A partir de una concentración conocida, se realizaron las diluciones a las

concentraciones a ensayar. La solución madre tenía caldo Muller-Hinton, aceite esencial y un agente emulsificante para el aceite esencial, en este caso DMSO, los cuales se añaden según los requerimientos necesarios (5.0% del volumen total de la preparación).

Para este trabajo, se prepararon 9 mL de solución madre de cada aceite. Para el aceite de canela se utilizaron 201 μL , para el aceite de té de árbol fueron 230 μL , y finalmente para el aceite de romero se necesitaron 227 μL . A cada preparación se añadió 450 μL de DMSO (5% v/v) y el resto del volumen fue caldo Mueller-Hinton.

La solución madre partió de una concentración inicial de 23 mg de aceite esencial y a partir de dicha solución, se prepararon las diluciones acordes a las concentraciones probadas. Diversos estudios mencionan que el rango de las CMI y CMB de un aceite esencial para los *Staphylococcus* pueden variar generalmente hasta los 2 mg/mL. Incluso existen trabajos que reportan hasta 4 mg/mL para casos como *S. aureus* resistentes a metilicina. (Bogavac *et. al.*, 2017; Carson *et. al.*, 2006; Raeisi *et al.*, 2015; Zhang *et. al.*, 2016), Por tal motivo, en este trabajo se seleccionaron en total, 8 concentraciones distintas: 10 mg/mL, 5 mg/mL, 2.5 mg/mL, 1.25 mg/mL, 0.625 mg/mL, 0.3125 mg/mL, 0.1562 mg/mL y 0.0781 mg/mL, con el fin de cubrir los rangos mencionados.

Se tomaron 295 μL de cada una de las diluciones del aceite esencial y de los controles y se agregaron a cada uno de los pocillos de la microplaca y después se añadieron 5 μL de cada uno de los inóculos bacterianos correspondientes. En total, para cada bacteria se colocaron 8 microdiluciones en los pocillos de la microplaca (correspondientes a cada una de las concentraciones a preparadas anteriormente).

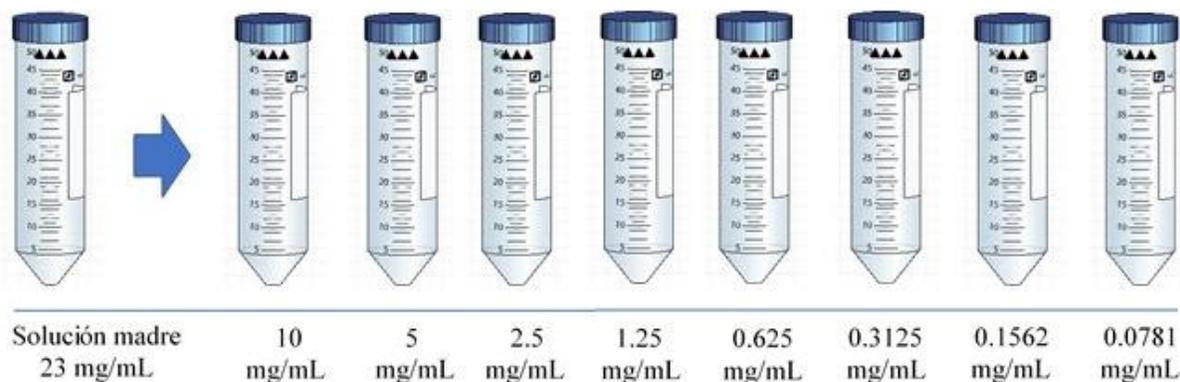


Figura 1. Solución madre y preparación de diluciones. La preparación se realizó a partir de una solución madre, de la cual se generaron las concentraciones probadas.

Adicional a esto, se agregaron dos pocillos como controles. Como se mencionó en la sección del diseño experimental, se trabajaron dos controles: un control positivo de inhibición con kanamicina (Sigma-Aldrich) preparada a 1 mg/mL. Por otra parte, el control negativo de inhibición fue la adición de caldo estéril y nuestro inóculo, pero sin el aceite esencial. Todo este procedimiento se realizó por triplicado para cada una de las bacterias ensayadas y para cada uno de los tres aceites esenciales distintos que se probaron.

Posterior a esto, se incubó cada una de las microplacas a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, se agitó la placa suavemente por 20 segundos para leerlo a una densidad óptica de 595 nm en un lector de microplacas FLUOstar Omega® (BMG LabTech). Los blancos fueron usados para ajustar la D.O a 595 nm de cada una de las diluciones con bacterias. La CMI se consideró como la concentración más baja del aceite esencial que pudo inhibir el crecimiento visible de cada una de las bacterias después del periodo de incubación. (Ramírez y Castaño, 2009).

Para la obtención de la CMB se tomaron muestras de aquellos pocillos de la microplaca donde se observó aparente inhibición bacteriana. Con ayuda de una micropipeta se tomaron 20 µL de cada pocillo, se sembraron en placas de agar Mueller-Hinton y se incubaron a 37° durante 24 horas. El procedimiento fue realizado por triplicado. Transcurrido este tiempo, se definió como concentración mínima bactericida (CMB) a aquella que fue capaz de eliminar el 99% del inóculo bacteriano después del periodo de incubación (Ramírez y Castaño, 2009).

5.5. Conteo de Unidades Formadoras de Colonias

Para este procedimiento se utilizó la técnica de goteo en placa. Esta consistió en realizar diluciones seriadas por triplicado de nuestro aceite esencial a probar, siendo provenientes del contenido las microplacas ya inoculadas e incubadas anteriormente. Se inició partiendo de una dilución 10^1 hasta alcanzar 10^7 . Posteriormente se procedió a colocar gotas de 20 µL de dichas diluciones sobre placas de agar Mueller-Hinton que se incubaron a 37°C por 24 h. Finalmente, se llevó a cabo el conteo del número de colonias presentes y se realizaron los cálculos correspondientes utilizando la ecuación 1 (Corral *et al.*, 2012).

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{\text{promedio de colonias sembradas}}{mL \text{ de sembrado}} * \text{factor de dilución} \quad (1)$$

5.6. Análisis Estadístico

Los datos se analizaron con el paquete estadístico NCSS en su versión 2012. Se estimaron los valores medios para diámetros de los halos de inhibición observados para cada bacteria, cada concentración y cada aceite esencial. En el caso de las CMI y CMB, las cuentas bacterianas fueron logarítmicamente transformadas para estimar su promedio, por cada concentración y aceite esencial probado.

Se llevó a cabo un análisis de la varianza (ANOVA) y una prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer para probar diferencia entre cuentas bacterianas, por cada concentración, y por cada aceite esencial. Un valor de $P < 0.05$, se consideró estadísticamente significativo.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Método de Difusión en Agar

6.1.1. Halos de Inhibición por el Aceite Esencial de Canela

Al realizar la siembra de las bacterias en el medio de cultivo y añadir los discos impregnados con aceites esenciales se observó una inhibición de crecimiento en forma de halos. El Cuadro 2 nos indica que las siete bacterias probadas en este estudio fueron sensibles en mayor o menor medida a la acción del aceite esencial de canela.

Cuadro 2. Halos de inhibición de crecimiento bacteriano generados por exposición a las distintas concentraciones del aceite esencial de canela.

Bacteria	Halo de inhibición (mm)		
	Concentración 2.5 %	Concentración 5.0 %	Concentración 8.0 %
<i>S. aureus</i> 1789 (10V)	9.0 ^{ab} ± 0.00	11.0 ^a ± 1.00	13.66 ^a ± 1.15
<i>S. aureus</i> 2072 (11V)	8.66^a ± 0.57	11.0 ^a ± 1.00	14.0 ^a ± 1.00
<i>S. aureus</i> 2997 (13V)	10.0 ^{ab} ± 1.00	12.0 ^{ab} ± 1.00	14.33 ^a ± 0.57
<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	11.33 ^b ± 1.15	14.33 ^b ± 1.15	16.66^b ± 1.15
<i>S. coagulasa</i> positivo 2076 (1V)	11.33 ^b ± 1.15	13.33 ^{ab} ± 0.57	15.0 ^{ab} ± 1.00
<i>S. coagulasa</i> positivo 7631 (2V)	11.0 ^{ab} ± 1.00	13.0 ^{ab} ± 1.00	15.33 ^{ab} ± 0.57
<i>S. coagulasa</i> positivo 9067 (3V)	11.0 ^{ab} ± 1.00	13.33 ^{ab} ± 0.57	15.33 ^{ab} ± 0.57

Distintas literales en la misma columna indican que existe diferencia estadística ($p < 0.05$) mediante Tukey-Kramer. Se muestran valores medios \pm DE para cada una de las tres réplicas por bacteria.

Cuadro 3. Halos de inhibición de crecimiento bacteriano promedio generados por exposición al aceite esencial de canela según la concentración utilizada.

Concentración (v/v)	Halos de inhibición (mm)
2.5 %	10.33 ^a ± 0.19
5.0 %	12.57 ^b ± 0.19
8.0 %	14.90 ^c ± 0.19

Distintas literales indican que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante Tukey-Kramer en los halos de inhibición según la concentración. Se muestran valores medios + DE. $n = 21$ para cada concentración.

Para el aceite de canela, el Cuadro 2 nos indica que nuestra bacteria de referencia *S. aureus* ATCC 6538P, fue la más sensible ($p < 0.05$) a las tres concentraciones del aceite esencial, mientras que los *S. aureus* 10V y 11 V provenientes de aislamiento fueron las menos sensibles, generando halos con valores más bajos en los tres tratamientos probados.

Si analizamos los halos de inhibición promedio de crecimiento bacteriano por concentración probada, encontramos que la de 8.0% v/v generó mayores halos de inhibición promedio, mientras que la de 2.5% generó los menores (Cuadro 3).

Estudios como los de Bouhdid *et al.* (2010) reportaron que el aceite esencial de canela tuvo una fuerte actividad antimicrobiana ante bacterias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa* y Gram positivas como *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 de referencia en concentraciones de 1.28 mg/mL. Montero-Recalde *et al.*, (2017) también probaron este aceite esencial contra *Salmonella typhimurium* y obtuvieron halos de 11.0 mm cuando se utilizaron concentraciones menores a 10% v/v. Estos resultados son muy similares a los encontrados en este trabajo (Cuadro 2). La propiedad antibacteriana del aceite de canela podría ser atribuida a la presencia del cinamaldehído, ya que la presencia de este componente constituye aproximadamente 46.30% del total del aceite esencial (Teles *et al.*, 2019).

En el contexto de supervivencia de la bacteria es importante destacar que gran parte de la estabilidad y correcto funcionamiento de sus membranas está relacionado con la presencia de cationes de potasio y otros elementos. Los estudios realizados por Orlov *et al.* (2002) publicaron que los aceites esenciales como el de canela tienen la capacidad de provocar la salida de este tipo de cationes por un daño inducido en la membrana, lo que produce cambios en la permeabilidad de

esta. Asimismo, el grupo de trabajo de Fuselli *et al.* (2006) indicaron que el aceite esencial de canela en concentraciones de 12.5% v/v empieza a tener un efecto inhibitorio sobre distintos microorganismos. En el presente estudio se observó que concentraciones más bajas de 12.5% del aceite esencial de canela (2.5-8.0% v/v) ya pueden generar inhibiciones significativas de crecimiento bacteriano.

6.1.2 Halos de Inhibición por el Aceite Esencial de Té de Árbol

Cuadro 4. Halos de inhibición de crecimiento bacteriano generados por exposición a las distintas concentraciones del aceite esencial de té de árbol.

Bacteria	Halo de inhibición (mm)		
	Concentración 2.5 %	Concentración 5.0 %	Concentración 8.0 %
<i>S. aureus</i> 1789 (10V)	8.66 ^{ab} ± 0.36	10.33 ^{ab} ± 0.36	12.66 ^a ± 0.36
<i>S. aureus</i> 2072 (11V)	7.66 ^a ± 0.36	9.66 ^a ± 0.36	12.66 ^a ± 0.36
<i>S. aureus</i> 2997 (13V)	9.66 ^b ± 0.36	11.0 ^{ab} ± 0.36	13.66 ^a ± 0.36
<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	9.66 ^b ± 0.36	12.0 ^b ± 0.36	14.33^a ± 0.36
<i>S. coagulasa</i> positivo 2076 (1V)	7.33^a ± 0.36	9.33 ^a ± 0.36	12.66 ^a ± 0.36
<i>S. coagulasa</i> positivo 7631 (2V)	8.33 ^{ab} ± 0.36	11.66 ^b ± 0.36	14.33^a ± 0.36
<i>S. coagulasa</i> positivo 9067 (3V)	7.66 ^a ± 0.36	10.33 ^{ab} ± 0.36	14.33^a ± 0.36

Distintas literales en la misma columna indican que existe diferencia estadística ($p < 0.05$) mediante Tukey-Kramer. Se muestran valores medios ± DE para cada una de las tres réplicas por bacteria.

En este trabajo, el aceite esencial de té de árbol mostró propiedades antibacterianas contra 6 bacterias que fueron probadas, observándose halos que variaban entre 7 y 14 mm (Cuadro 4). Estos resultados fueron similares con lo reportado por Raman *et al.* (1995) quienes trabajaron con cepas de referencia de *S. aureus* NCTC 9518 y *S. epidermidis* NCTC 11047 reportando halos de inhibición en un rango de 7 a 18 mm.

Cuadro 5. Halos de inhibición de crecimiento bacteriano promedio generados por exposición al aceite esencial de té de árbol según la concentración utilizada.

Concentración (v/v)	Halos de inhibición (mm)
2.5 %	8.42 ^a ± 0.13
5.0 %	10.61 ^b ± 0.13
8.0 %	13.52 ^c ± 0.13

Distintas literales indican que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante Tukey-Kramer en los halos de inhibición según la concentración. Se muestran valores medios + DE. $n = 21$ para cada concentración.

Adicionalmente, Kwieciński *et al.* (2009) encontraron que el aceite esencial de té de árbol era capaz de inhibir el crecimiento tanto de *S. aureus* de referencia NCTC 8325-4 como de *S. aureus* aislados de biofilm dental, a concentraciones de 8.0% v/v, las cuales son similares a las de este trabajo.

Diversos autores catalogan al aceite esencial de té de árbol como una alternativa muy promisoriosa para la erradicación de *S. aureus* en su uso como desinfectante o como tratamiento. En este estudio, se observó que para las concentraciones de 2.5% y 5.0 %, el *S. aureus* ATCC 6538P fue la bacteria que mostró ($p < 0.05$) mayor sensibilidad al efecto del aceite esencial, ya que generó los halos promedio más grandes (9-15 mm). Caso contrario sucedió con el *S. coagulasa* positivo 2076 (1V), quien mostró mayor resistencia ($p < 0.05$) al aceite de té de árbol. En el análisis de inhibición generado por la concentración mayor (8% v/v) del aceite esencial no proporcionó diferencia significativa ($p > 0.05$) entre las siete bacterias de estudio. De igual manera puede verse que el *S. aureus* ATCC 6538P fue el que mostró una tendencia a generar halos más grandes (al menos en el dato promedio), cuyo comportamiento coincidió con lo reportado en las concentraciones de 2.5% y 5.0% (Cuadro 4). Si bien esto no fue significativo, si puede indicarnos que dicha cepa tiende a ser más sensible a los efectos del aceite esencial de té de árbol.

En el Cuadro 5 se observó que a mayor concentración del aceite de té de árbol, el halo de inhibición promedio de crecimiento bacteriano es significativamente mayor. Asimismo, el análisis comparativo de las tres concentraciones probadas demostró que la concentración de 8.0 % v/v del aceite esencial fue la más efectiva ($p < 0.05$) contra *S. aureus* y *S. coagulasa* positivos (12.66 y 14.33 mm promedio respectivamente) (Cuadro 4).

Por tanto, los hallazgos en este estudio indicaron que el aceite esencial de té de árbol es capaz de inhibir el crecimiento de estas cepas. Gran parte de los estudios realizados sobre este aceite destacan la variedad de componentes que posee, y los cuales tienen propiedad antibacteriana. Particularmente, el terpinen-4-ol es considerado su componente principal, reportándose su presencia en el rango de 30-40% del total del aceite (Carson *et al.*, 2006). Estudios realizados por Zhang *et al.* (2018) reportaron que este compuesto provoca daño a la membrana celular de las bacterias, creando afectaciones en la producción de ADN y de otras proteínas, lo que lleva al microorganismo a perder sus funciones fisiológicas normales. Asimismo, los autores encontraron que cuando bacterias como *S. aureus* ATCC 25923 o *E. coli* ATCC 25922 son expuestas a el aceite esencial de té de árbol, su membrana celular sufría deformaciones, se volvían irregulares y rugosas. Además, se adherían unas con otras y se mostraba pérdida de la integridad de la membrana. La salida de material intracelular como electrolitos, ATP y proteínas conducía finalmente a la muerte celular. Además, los autores concluyeron que debido a la gran actividad antioxidante que posee este aceite esencial, tiene gran potencial de uso en la industria alimentaria, agrícola y farmacéutica. De igual manera, Carson *et al.* (2006) concluyeron que futuras investigaciones podrían promocionar al aceite esencial de té de árbol como un agente medicinal importante, debido a la gran actividad antibacteriana que ha demostrado “*in vitro*”. Por otra parte, Ziolkowska *et al.* (2016) reportaron la acción del aceite esencial de té de árbol ante otro tipo de bacterias Gram positivas, indicando CMI ligeramente menores que en nuestro trabajo, encontrándose en los rangos de 0.12-0.5 mg/mL para géneros como *Anaerococcus* y *Raminococcus*. Asimismo, mientras para *Bifidobacterium* las CMI subieron hasta los 2.0 mg/mL, la cual es aparentemente más alta que la utilizada en nuestro estudio. Sumado a esto, Van Vuuren *et al.* (2014) encontraron CMI para distintas bacterias gram positivas en un rango de los 0.5 a 2.0 mg/mL para *S. pyogenes* ATCC 8668 y *S. agalactiae* ATCC 55618, mientras que para *S. epidermidis* estos valores incrementaban hasta los 2.0 mg/mL.

6.1.3 Halos de Inhibición por el Aceite Esencial de Romero

El Cuadro 6 muestra los halos de inhibición de las cepas bacterianas probadas, observados con las

tres concentraciones distintas del aceite esencial de romero. Todas ellas presentaron sensibilidad, lo que nos indica que este aceite es capaz de inhibir el crecimiento de las cepas bacterianas probadas en este estudio. Al realizar el análisis comparativo de inhibición bacteriana por cada concentración, encontramos que no existió diferencia ($p > 0.05$). Se observó que los halos son de tamaño muy similar entre sí. Lo que sí podemos destacar, es que para la bacteria *S. aureus* ATCC 6538P, el aceite esencial de romero tendió a generar halos de inhibición mayores (en números crudos) que el resto de las cepas analizadas.

Cuadro 6. Halos de inhibición de crecimiento bacteriano generados por exposición a las distintas concentraciones del aceite esencial de romero.

Bacteria	Halo de inhibición (mm)		
	Concentración 2.5 %	Concentración 5.0 %	Concentración 8.0 %
<i>S. aureus</i> 1789 (10V)	8.66 ^a ± 0.39	10.0 ^a ± 0.39	13.0 ^a ± 0.39
<i>S. aureus</i> 2072 (11V)	8.66 ^a ± 0.39	10.66 ^a ± 0.39	13.33 ^a ± 0.39
<i>S. aureus</i> 2997 (13V)	7.66 ^a ± 0.39	10.0 ^a ± 0.39	12.33 ^a ± 0.39
<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	9.0 ^a ± 0.39	11.0 ^a ± 0.39	13.33^a ± 0.39
<i>S. coagulasa</i> positivo 2076 (1V)	7.66 ^a ± 0.39	9.66 ^a ± 0.39	11.66 ^a ± 0.39
<i>S. coagulasa</i> positivo 7631 (2V)	7.66 ^a ± 0.39	9.66 ^a ± 0.39	11.33 ^a ± 0.39
<i>S. coagulasa</i> positivo 9067 (3V)	7.66 ^a ± 0.39	9.66 ^a ± 0.39	12.0 ^a ± 0.39

Distintas literales en la misma columna indican que existe diferencia estadística ($p < 0.05$) mediante Tukey-Kramer. Se muestran valores medios ± DE para cada una de las tres réplicas por bacteria.

El Cuadro 6 muestra que los halos de inhibición generados por el aceite esencial de romero presentaron un rango de 8-14 mm para *S. aureus* y de 7-14 mm para los *S. coagulasa* positivo. Esto fue similar a lo publicado por Manilal *et al.* (2020) quienes probaron la actividad del aceite de romero ante cepas de *S. aureus* provenientes de pacientes HIV positivos, obteniendo halos de inhibición en los rangos de 6-25 mm al utilizar concentraciones de 2 mg/mL. Igualmente se observó algo similar por el grupo de trabajo de Fu *et al.* (2007) donde el aceite de romero fue probado con bacterias gram positivas como *S. aureus* ATCC 6538, *S. epidermidis* ATCC 12228 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633, encontrando halos de inhibición en los rangos de 10-18.5 mm.

Adicionalmente, Bozin *et al.*, (2007) evaluaron la actividad del aceite esencial de romero contra distintas bacterias Gram positivas como *Bacillus subtilis* ATCC 10707, *S. aureus* ATCC 6538 (misma cepa utilizada por nosotros) y *Micrococcus flavus* ATCC 10240, obteniendo halos de inhibición en un rango de 17-30 mm a una concentración de 20% v/v del aceite. Si bien estos halos fueron más grandes que los encontrados en este trabajo, hay que destacar también que las concentraciones que los autores usaron en ese estudio eran mayores (más de doble) que las utilizadas en nuestro estudio.

Cuadro 7. Halos de inhibición de crecimiento bacteriano promedio generados por exposición al aceite esencial de romero según la concentración utilizada.

Concentración (v/v)	Halos de inhibición (mm)
2.5 %	8.14 ^a ± 0.15
5.0 %	10.09 ^b ± 0.15
8.0 %	12.42 ^c ± 0.15

Distintas literales indican que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante Tukey-Kramer en los halos de inhibición según la concentración. Se muestran valores medios + DE. $n = 21$ para cada concentración.

El análisis comparativo del aceite esencial de romero nos indica que la concentración de 8.0% v/v fue la que mostró una mayor actividad antibacteriana ($p < 0.05$) contra las cepas de *S. aureus* y *S. coagulans* positivos, obteniendo halos de hasta 13.66 mm en promedio (Cuadro 7).

Diversos grupos de trabajo han intentado dilucidar el mecanismo de acción antibacteriana del aceite esencial de romero, y han encontrado que esta actividad se encuentra asociada a su contenido de flavonoides (diosmetina, diosmina, hispidulina) y compuestos terpenoides (ácido carnósico, ácido ursólico y ácido oleanólico). Sin embargo, parece ser que a los compuestos a los cuales se atribuye más esta actividad antibacteriana es al α -pineno, acetato de bornilo, alcanfor y 1,8-cineol, que en conjunto conforman más del 40% del total del aceite esencial (Ebrahimi *et al.*, 2020).

Todos estos componentes de la mezcla degradan la membrana citoplasmática de la bacteria, modificando la permeabilidad de la misma conduciendo a la pérdida de iones, y alterando la vía de transporte de membrana y producción de ATP. Fu *et al.*, (2007) indicaron que el aceite esencial de romero tiene un alto potencial para ser usado como agente antiinfeccioso en el campo de la salud pública.

6.2 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB)

A partir de los resultados del proceso de microdilución se estimaron los valores de las CMI y CMB para cada uno de los aceites esenciales ensayados (canela, té de árbol y romero).

6.2.1 CMI y CMB del Aceite Esencial de Canela

Cuadro 8. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida (CMB) del aceite esencial de canela para cada bacteria probada.

BACTERIA	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)
<i>S. aureus</i> 1789 (10V)	0.3125	0.625
<i>S. aureus</i> 2072 (11V)	0.3125	0.625
<i>S. aureus</i> 2997 (13V)	0.3125	0.625
<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	0.3125	0.625
<i>S. coagulasa</i> positivo 2076 (1V)	0.3125	0.625
<i>S. coagulasa</i> positivo 7631 (2V)	0.3125	0.625
<i>S. coagulasa</i> positivo 9067 (3V)	0.3125	0.625

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. ATCC: American Type Culture Collection.

El Cuadro 8 nos indicó que en todos los casos, las CMI y CMB contra las bacterias probadas fueron idénticas.

El grupo de trabajo de Sim *et al.*, (2019) encontraron una CMI muy similar a la de nuestro estudio, ya que para *S. aureus* ATCC 29213 encontraron una CMI de 0.307 mg/mL, pero la CMB fue más elevada (1.23 mg/mL) que en este estudio. Dichos investigadores catalogan al aceite esencial de canela como un antimicrobiano muy prometedor a futuro y exhortan a que se continúe con su investigación. Asimismo, Zhang *et al.*, (2015) trabajaron con aceite esencial de canela y reportaron una CMI de 1 mg/mL y CMB de 2 mg/mL contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. El resultado fue similar a lo que reportaron Raeisi *et al.*, (2015), quienes encontraron valores para CMI y CMB de 0.625 mg/mL contra *S. aureus* ATCC6538. Cabe destacar que este último trabajo

utilizó la misma cepa bacteriana de referencia usada en estudio, y el resultado encontrado fue idéntico.

La actividad antimicrobiana del aceite esencial de canela ha sido reportada por distintos investigadores, los cuales hacen énfasis en el papel que juega el cinamaldehído, el componente principal (44%-97%) del mismo (Marongiu *et al.*, 2007; Fei *et al.*, 2011). El efecto que dicho aceite provoca sobre la permeabilidad de la membrana hace que los componentes dentro de ella comiencen a expulsarse, y se compromete la estabilidad celular, causando la muerte de la bacteria.

6.2.2 CMI y CMB del Aceite Esencial de Té de Árbol

El Cuadro 9 (abajo) nos indica que las CMI para las siete bacterias ensayadas fueron las mismas (0.625 mg/mL), e igual para la CMB, que se estimó en 1.25 mg/mL. Esto es ligeramente menor a lo reportado por Shi *et al.*, (2016), quienes trabajaron con *S. aureus* ATCC 29213 y otros *S. aureus* aislados de alimentos. Ellos reportaron una CMI en el rango de 1-2 mg/mL para los 18 aislamientos ensayados. Entre otros hallazgos, también destacaron que el aceite esencial es capaz de inhibir ciertos factores de virulencia de *S. aureus*, y que, por lo tanto, reduce la producción de exoproteínas, esenciales para que su factor de virulencia en el hospedero.

Cuadro 9. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida (CMB) del aceite esencial de té de árbol para cada bacteria probada.

BACTERIA	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)
<i>S. aureus</i> 1789 (10V)	0.625	1.25
<i>S. aureus</i> 2072 (11V)	0.625	1.25
<i>S. aureus</i> 2997 (13V)	0.625	1.25
<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	0.625	1.25
<i>S. coagulasa</i> positivo 2076 (1V)	0.625	1.25
<i>S. coagulasa</i> positivo 7631 (2V)	0.625	1.25
<i>S. coagulasa</i> positivo 9067 (3V)	0.625	1.25

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. ATCC: American Type Culture Collection. Otros trabajos como los de Teles *et al.*, (2014) enfocados en *S. aureus* ATCC 25923 y de aislamientos clínicos reportaron que concentraciones del aceite esencial de té de árbol de 0.21

mg/mL pueden presentar efectos inhibitorios de al menos el 50% (CMI_{50%}). De manera similar a lo observado en nuestra investigación, Li *et al.*, (2016) utilizaron aceite esencial de té de árbol contra *S. aureus* ATCC 6538 obteniendo valores idénticos tanto para el CMI y CMB (1.08 mg/mL), siendo este muy similar a lo obtenido en nuestro estudio. Se sugirió que, debido a la capacidad de penetración del aceite dentro de la membrana plasmática de las bacterias, el terpinen-4-ol causa daño en las estructuras, lo que conduce a una subsecuente pérdida de material citoplasmático y muerte celular (Carson *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2016).

Es importante destacar que una gran variedad de investigadores resalta la gran capacidad inhibitoria del aceite esencial de té de árbol y su potencial utilización para la industria alimentaria y de tratamiento de infecciones de origen bacteriano (Hussain *et al.*, 2010; Barreto *et al.*, 2014; Jafari & Pashazadeh, 2020).

6.2.2 CMI y CMB del Aceite Esencial de Romero

De manera similar a lo encontrado con el aceite esencial de té de árbol, el Cuadro 10 nos muestra las CMI y CMB encontradas para el aceite esencial de romero ante las bacterias probadas. Los valores estimados fueron de 0.625 mg/mL para la CMI y de 1.25 mg/mL para la CMB. Se han realizado estudios similares como los hechos por Jafari *et al.*, (2020), quienes reportaron que para bacterias como *S. aureus* ATCC 25923 las CMI y CMB eran 0.625 y 1.25 mg/mL respectivamente, las que resultaron ser idénticas a las encontradas en nuestro trabajo. De igual manera, Álvarez *et al.*, (2019) reportaron que la CMI y CMB contra *S. aureus* ATCC 6538 (misma cepa que utilizamos nosotros) eran de 0.91 y 1.40 mg/mL respectivamente, similares a las encontradas en este estudio.

Cuadro 10. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida (CMB) del aceite esencial de romero para cada bacteria probada.

BACTERIA	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)
<i>S. aureus</i> 1789 (10V)	0.625	1.25
<i>S. aureus</i> 2072 (11V)	0.625	1.25
<i>S. aureus</i> 2997 (13V)	0.625	1.25
<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	0.625	1.25
<i>S. coagulasa</i> positivo 2076 (1V)	0.625	1.25
<i>S. coagulasa</i> positivo 7631 (2V)	0.625	1.25
<i>S. coagulasa</i> positivo 9067 (3V)	0.625	1.25

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. ATCC: American Type Culture Collection.

En contraste con nuestro estudio, Puvaca *et al.*, (2021) trabajando con el efecto del aceite de romero sobre cepas de *S. aureus* ATCC 25923 obtuvieron valores CMI de 1.4 mg/mL, el cual es mayor al CMI obtenido en nuestro estudio. Existen distintos trabajos que reportan CMI y CMB en el rango de 5-10 mg/mL contra cepas de *S. aureus* ATCC 25923 y *S. aureus* de aislados clínicos (Silveira *et al.*, 2012; Teles *et al.*, 2014). Las diferencias con estos valores pueden estar asociadas a la casa comercial donde se adquirió el aceite esencial, la pureza de este y la naturaleza de las cepas con las que se trabajan. La variedad de componentes que forman parte de este aceite esencial le confieren propiedades antibacterianas muy importantes, donde se destacan la presencia del α -Pino y 1-8 cineol. Al parecer ambos podrían tener un papel importante en la actividad antibacteriana, pero se puede inferir que realmente es el efecto sinérgico entre ellos y con otros componentes los que le confieren su actividad antibacteriana (Jiang *et al.*, 2011).

El aceite esencial de romero ha mostrado un buen potencial antimicrobiano, y para muchos investigadores es una alternativa muy promisorio a futuro para las áreas de preservación de alimentos y como alternativa de tratamiento ante agentes infecciosos (Fu *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2018; Kulaksiz *et al.*, 2018).

En general, para los tres aceites esenciales probados se observó que las cepas de referencia se mostraron con mayor sensibilidad que aquellas provenientes de aislamientos. Una posible explicación para esto es que, las cepas provenientes de aislamientos pueden mostrar comportamientos sumamente variados. Los factores que influyen son diversos: la fuente de

aislamiento (si fue algún animal, superficie o muestra clínica humana), las condiciones a las que se ha expuesto dicha bacteria (tratamientos fallidos con antibióticos por ejemplo) y la naturaleza virulenta de la cepa (*S. aureus* posee mayores mecanismos de patogenicidad que *S. epidemidis* o *S. coagulasa* positivos y negativos). Es por ello, que este tipo de bacterias se convierten en un alto riesgo para la salud tanto en humanos como animales.

6.3 Efecto de la Concentración del Aceite Esencial sobre las UFC/mL

Durante el proceso de conteo de las unidades formadoras de colonias de las bacterias ensayadas en este trabajo se pudo observar que, para el caso de los tres aceites esenciales, el número de las UFC/mL disminuían conforme aumentaba la concentración probada del aceite ($P < 0.05$).

6.3.1 Efecto de la Concentración del Aceite Esencial de Canela sobre las UFC/mL

En la figura 2 se observa el crecimiento de las cepas de *S. aureus*. Podemos notar, en general, que no existió crecimiento a la concentración de 0.625 mg/mL. Además, se observó que el *S. aureus* ATCC 6538 fue la bacteria más sensible ($p < 0.05$) ante el aceite esencial de canela ya que sólo presentó crecimiento la concentración más baja (0.0781 mg/mL). Para los estafilococos provenientes de aislamiento clínico, el crecimiento más bajo ($\log 3.10 \pm 0.17$ UFC/mL) lo presentó el *S. aureus* 2997 (13V) a la concentración de 0.3125 mg/mL. Por otra parte, el crecimiento más alto ($\log 10.63 \pm 0.02$ UFC/mL) lo tuvo el *S. aureus* 1789 (10V) a la concentración de 0.0781 mg/mL. Podemos indicar que en todas las concentraciones existió diferencia ($p < 0.05$) entre los conteos de crecimiento.

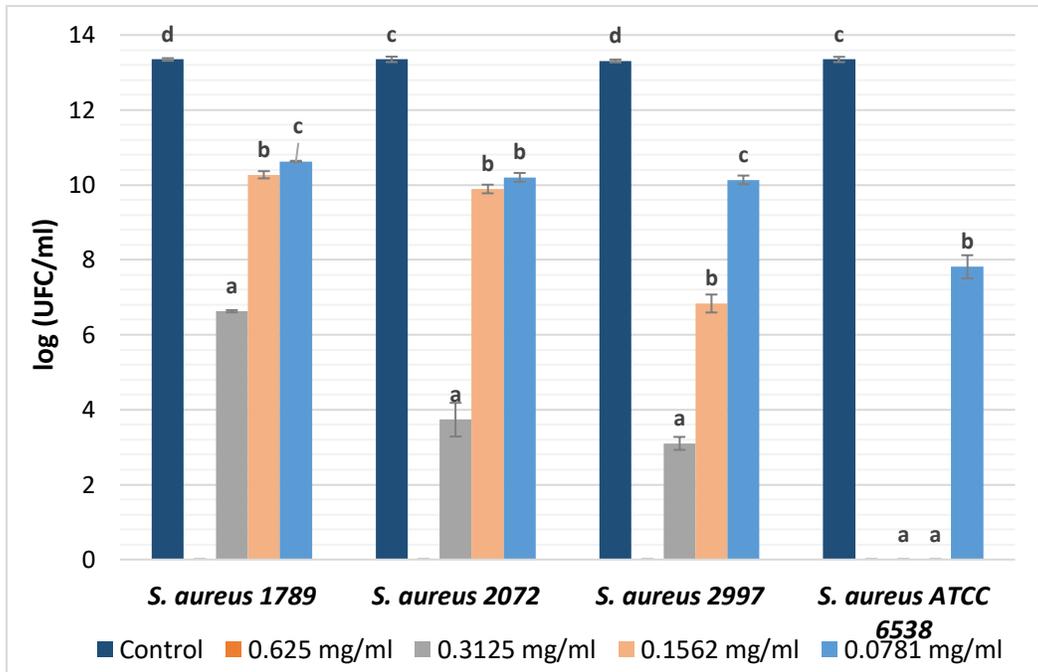


Figura 2. Cuentas de crecimiento de los distintos *S. aureus* expresados en log (UFC/mL) expuestos a diferentes concentraciones del aceite esencial de canela. Distintas literales en cada cepa bacteriana indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante Tukey-Kramer en las cuentas de crecimiento entre concentraciones.

Por otra parte, la figura 3 nos muestra las cuentas de los *S. coagulasa* positivos ante las distintas concentraciones del aceite esencial de canela. El crecimiento se observa a partir de la concentración de 0.325 mg/mL para las tres bacterias. El *S. coagulasa* positivo 9067 (3V) presentó las cuentas de crecimientos más elevadas a las concentraciones de 0.3125 y 0.0781 mg/mL, mientras que para la concentración de 0.1562 mg/mL fue para el *S. aureus* 7631 (2V). Los análisis estadísticos indicaron que existió diferencia ($p < 0.05$) en los crecimientos de todas las concentraciones probadas en cada bacteria (Figura 3).

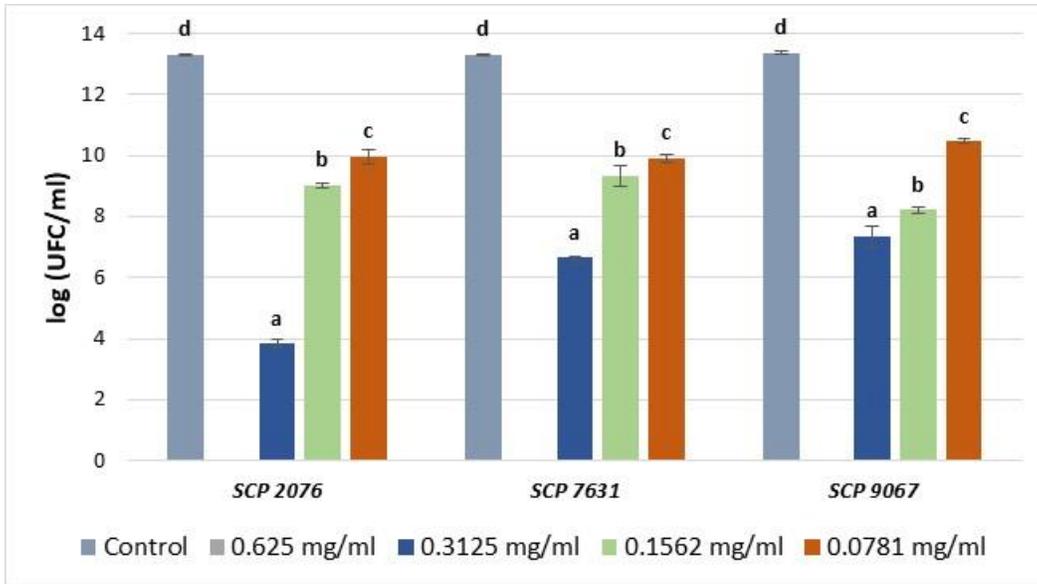


Figura 3. Cuentas de crecimiento de los distintos *S. coagulans* positivos expresados en log (UFC/mL) expuestos a diferentes concentraciones del aceite esencial de canela. Distintas literales en cada cepa bacteriana indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante Tukey-Kramer en las cuentas de crecimiento entre concentraciones.

6.3.2 Efecto de la concentración del aceite esencial de té de árbol sobre las UFC/mL

La figura 4 muestra que los crecimientos bacterianos se presentan hasta la concentración de 0.625 mg/mL. La bacteria más sensible ($p < 0.05$) al efecto del aceite fue el *S. aureus* ATCC 6538, cuya cuenta a la concentración más baja del aceite (0.1562 mg/mL) fue de $\log 8.00 \pm 0.05$ UFC/mL.

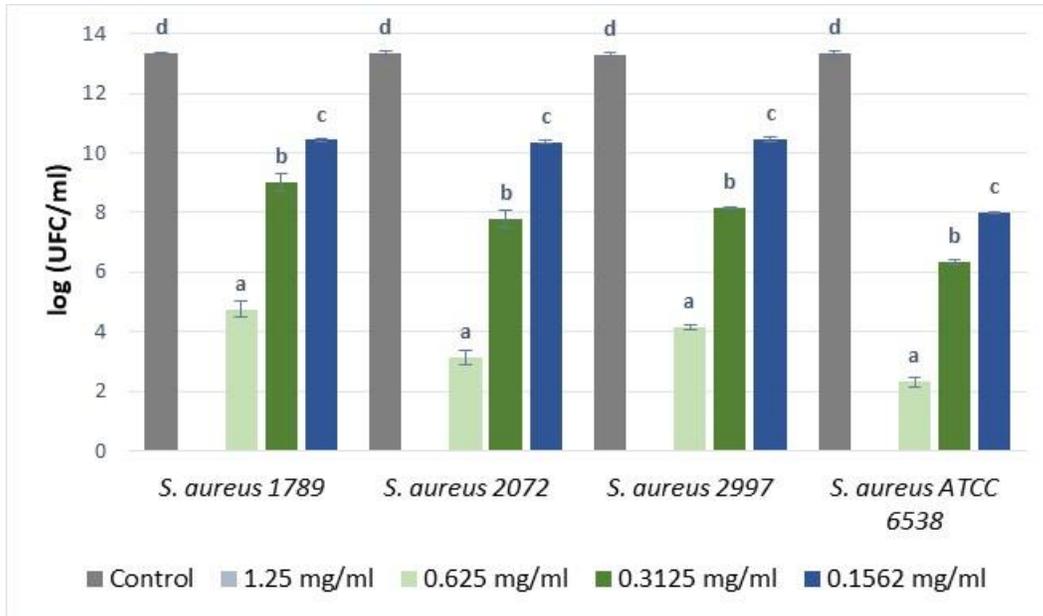


Figura 4. Cuentas de crecimiento de los distintos *S. aureus* expresados en log (UFC/mL) expuestos a diferentes concentraciones del aceite esencial de té de árbol. Distintas literales en cada cepa bacteriana indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante Tukey-Kramer en las cuentas de crecimiento entre concentraciones.

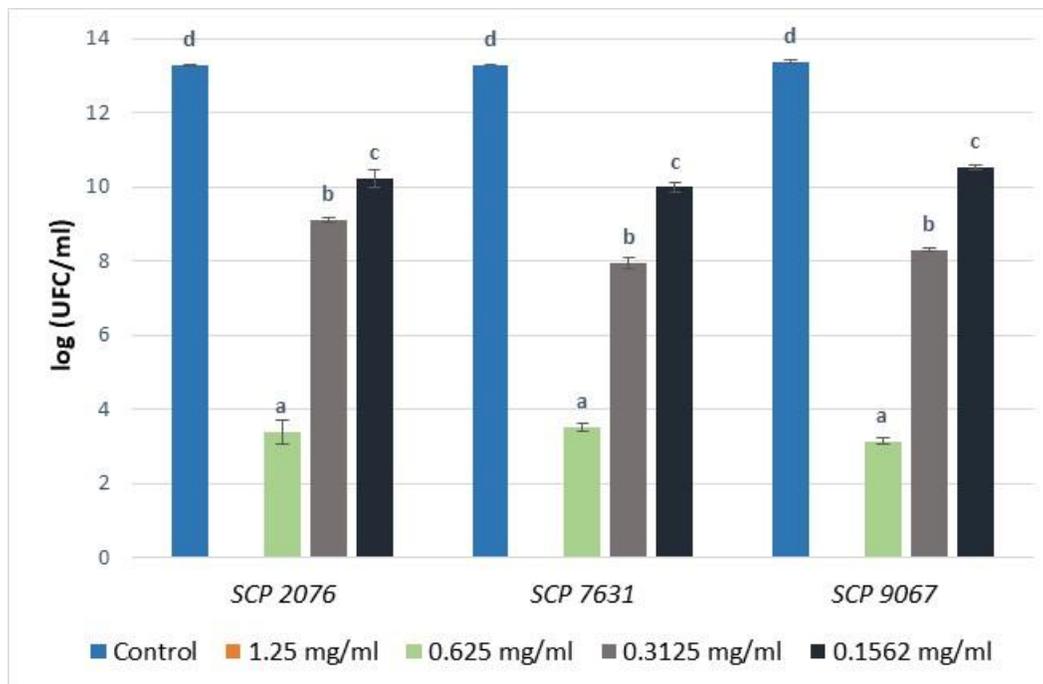


Figura 5. Cuentas de crecimiento de los distintos *S. coagulans* positivos expresados en log (UFC/mL) expuestos a diferentes concentraciones del aceite esencial de té de árbol. Distintas literales en cada cepa bacteriana indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante Tukey-Kramer en las cuentas de crecimiento entre concentraciones.

Por otro lado, la cuenta más elevada la presentó *S. aureus* 2997 (13V) ($\log 10.45 \pm 0.08$ UFC/mL) a la concentración de 0.1562 mg/mL. Podemos notar que el crecimiento de los distintos *Staphylococcus* está en relación con la concentración probada, ya que a mayor concentración se observó el efecto inhibitorio del aceite esencial de té de árbol ($p < 0.05$) (Figura 4).

Igualmente, la figura 5 muestra crecimiento de los *S. coagulasa* positivos hasta la concentración de 0.625 mg/mL. La cepa *S. aureus* 9067 (3V) reportó el crecimiento más bajo y el más elevado, siendo $\log 3.14 \pm 0.07$ UFC/mL para 0.625 mg/mL y $\log 10.53 \pm 0.05$ UFC/mL para 0.1562 mg/mL respectivamente. Se observaron diferencias ($p < 0.05$) en los crecimientos entre todas las concentraciones para las tres bacterias ensayadas.

6.3.2 Efecto de la concentración del aceite esencial de romero sobre las UFC/mL

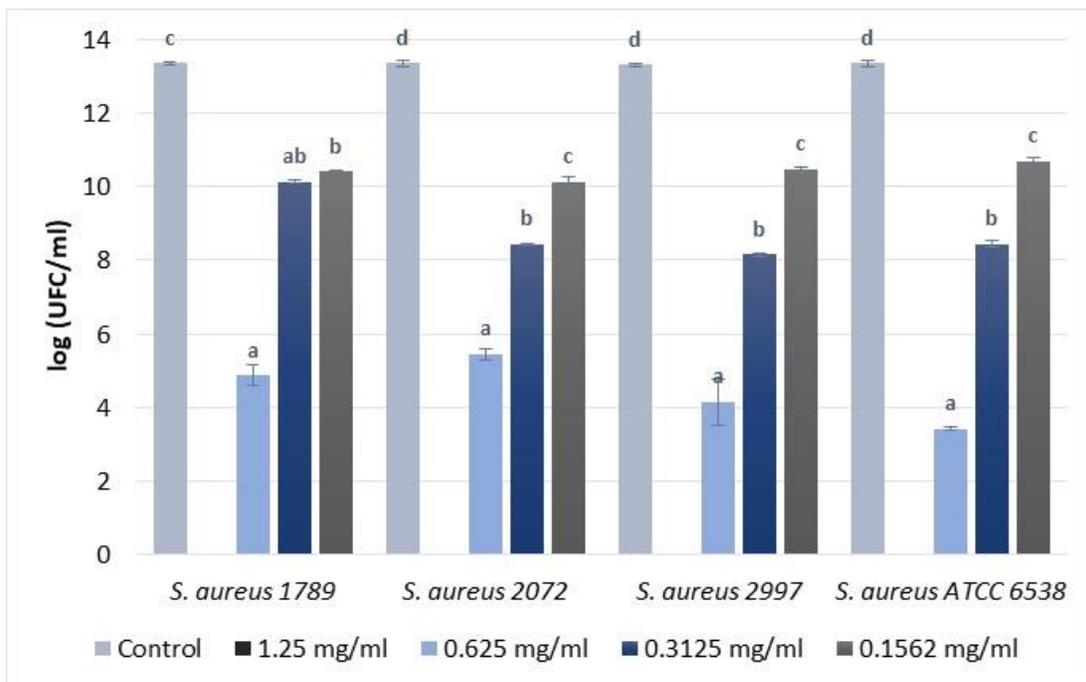


Figura 6. Cuentas de crecimiento de los distintos *S. aureus* expresados en log (UFC/mL) expuestos a diferentes concentraciones del aceite esencial de romero. Distintas literales en cada cepa bacteriana indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante Tukey-Kramer en las cuentas de crecimiento entre concentraciones.

En la figura 6 no se observó crecimiento en la concentración de 1.25 mg/mL. El comportamiento de las tres cepas, tanto de aislados y la de referencia de *S. aureus* fueron muy similares. Para los *S. aureus* 2072 (1V), *S. aureus* 2997 (13V) y *S. aureus* ATCC 6538 se observó diferencia ($p < 0.05$) en las cuentas de crecimientos entre concentraciones. Además, no se observó diferencia ($p > 0.05$) en las cuentas de *S. aureus* 1789 (10V) entre las concentraciones de 0.625 vs 0.3125 mg/mL y 0.3125 vs 0.1562 mg/mL (Figura 6).

Finalmente, todos los *S. coagulasa* positivos mostraron el más bajo crecimiento a la concentración de 0.625 mg/mL. También las tres cepas mostraron diferencia ($p < 0.05$) entre las diferentes concentraciones del aceite. (Figura 7).

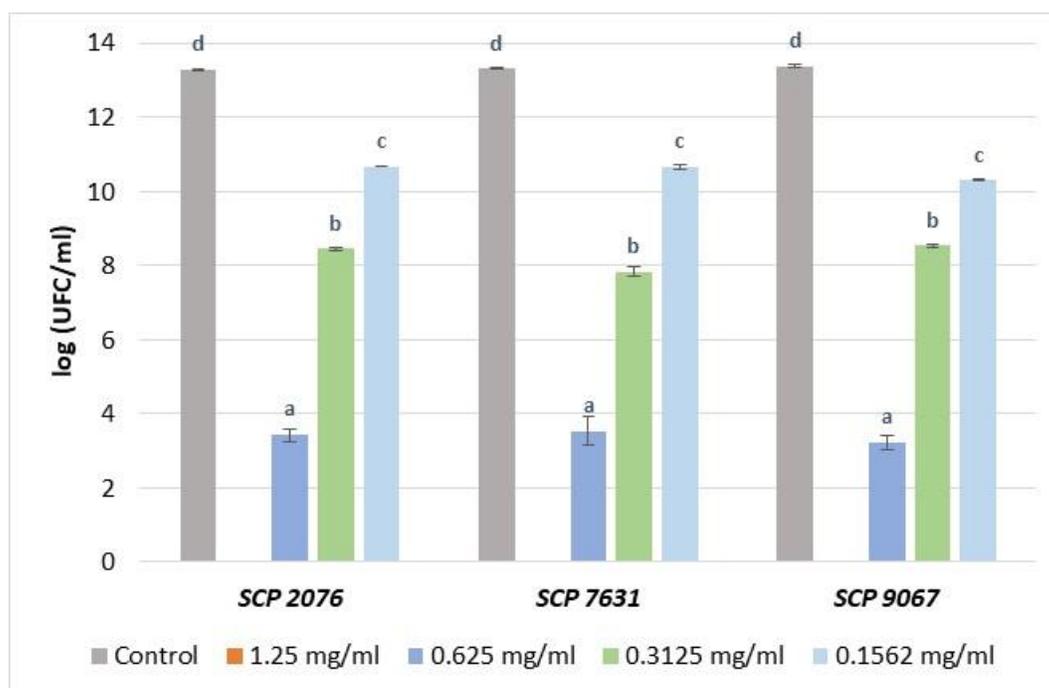


Figura 7. Cuentas de crecimiento de los distintos *S. coagulasa* positivos expresados en log (UFC/mL) expuestos a diferentes concentraciones del aceite esencial de romero. Distintas literales en cada cepa bacteriana indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante Tukey-Kramer en las cuentas de crecimiento entre concentraciones.

7. CONCLUSIONES

Durante la realización de este trabajo se logró satisfactoriamente la evaluación de tres aceites esenciales y su actividad antimicrobiana sobre distintas cepas bacterianas causantes de mastitis bovina. Se obtuvieron halos de inhibición entre los rangos de 8-17 mm para el aceite de canela, de 7-15 mm para el aceite de té de árbol, y de 7-14 mm para el aceite de romero. La concentración de 8.0% v/v fue la que exhibió mayor efecto inhibitorio sobre las cepas de *Staphylococcus* probados.

Las CMI y CMB encontradas contra las bacterias en el estudio fueron de 0.3125 mg/mL y 0.625 mg/mL respectivamente para el aceite esencial de canela. Por otra parte, con el aceite esencial de té de árbol se obtuvieron CMI de 0.625 mg/mL y una CMB de 1.25 mg/mL respectivamente. Finalmente, el aceite esencial de romero mostró valores de CMI y CMB idénticos al de té de árbol (0.625 y 1.25 mg/mL respectivamente). Además, *S. aureus* ATCC 6538 fue la cepa más sensible a la actividad antimicrobiana de los tres aceites en comparación con las cepas de los aislados. Dentro de nuestro estudio, el aceite esencial de canela fue el que mostró una actividad antibacteriana *in vitro* más eficaz, ya que logró inhibir el crecimiento de los *Staphylococcus* a concentraciones menores que los aceites esenciales de romero y té de árbol.

Por tanto, los resultados encontrados en el presente trabajo indican que los aceites esenciales de canela, romero y té de árbol mostraron un gran potencial para inhibir el crecimiento de bacterias del género *Staphylococcus* causantes de mastitis bovina, por lo que se sugiere continúe su estudio a futuro con el fin de poder ayudar a solventar los problemas resistencia bacteriana ante los antibióticos.

8. RECOMENDACIONES

Al trabajar con aceites esenciales se debe tener precaución en cuidar la fuente de donde se adquieren. Es decir, si es de tipo comercial hay que ser precavidos en las condiciones de almacenaje y conservación. Por otro lado, durante el proceso de extracción a partir de las plantas, se deben considerar factores como el tipo de técnica a utilizar, maduración de la planta y la pureza componentes que tiene.

Debido a las características propias de los aceites esenciales, el lugar de trabajo debe tener luz tenue o en condiciones de luz roja si es posible. Además, el almacenamiento debe realizarse bajo condiciones de oscuridad y refrigeración.

9. BIBLIOGRAFÍAS

- Abebe R., Hatiya H., Abera M., Megersa B. & Asmare K. 2016. Bovine mastitis: prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. BMC Veterinary Research. 12 (1): 270.
- Aguilar A., Bañuelos J., Pimienta E., Aguilar A. & Torres P. 2014. Prevalencia de mastitis subclínica en la región ciénega del estado de Jalisco. Abanico veterinario; 4 (1), 24-31.
- Alfassam, H. A., Aleanizy, F. S., Alqahtani, F. Y., Altalal, A. M., & Fitaihi, R. A. 2017. Household essential oils as antimicrobial agents for health and skin care. Oriental Journal of Chemistry. 33(4): 2123-2126.
- Al-Sereiti M. Abu-Amer K. & Sena P. 1999. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. Indian Journal of Experimental Biology. 37:124-130.
- Álvarez M., Ortega L., Silva B., González G. & Ayala F. 2019. Antimicrobial, antioxidant, and sensorial impacts of oregano and rosemary essential oils over broccoli florets. Journal of Food Processing and Preservation. 43(3): e13889
- Alvarez, M. V., Ortega-Ramirez, L. A., Silva-Espinoza, B. A., Gonzalez-Aguilar, G. A., & Ayala-Zavala, J. F. 2019. Antimicrobial, antioxidant, and sensorial impacts of oregano and rosemary essential oils over broccoli florets. Journal of Food Processing and Preservation. 43(3), e13889.
- Andresen H. 2001. Mastitis: prevención y control. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 12(2): 55-64.
- Argote-Vega, F., Suárez Z., Tobar M., Pérez J., Hurtado A. & Delgado J. 2017. Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. 15(spe2): 52-60.
- Armenteros M., Peña J., Pulido J. & Linares E. 2002. Caracterización de la situación de la mastitis bovina en rebaños de lechería especializada en Cuba. Revista de Salud Animal, 24 (2), 99-105.
- Ávila T. & Gutiérrez C. 2001. Epidemiología de las mastitis en hatos pequeños. III Congreso Nacional de Control de Mastitis y Calidad de la Leche. Julio 21-23, 2001. León, Gto., México. p. 61- 67.
- Barreto H., Silva E., Lima E., Coutinho H, Morais M., Tavares C & Lopes J. 2014. Chemical composition and possible use as adjuvant of the antibiotic therapy of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. Industrial Crops and Products, 59: 290-294.
- Bastos M., Damé L., de Souza L., Bender D., Alves M. & Braga de Mello, J. 2011. Actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Origanum vulgare* L. ante bacterias aisladas en leche de bovino. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 16(3): 260-266.
- Benavides, S., Villalobos-Carvajal, R. & Reyes, J. E. 2012. Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. Journal of Food Engineering. 110: 232-239.

- Bendeddouche, M. S., Benhassaini, H., Hazem, Z., & Romane, A. 2011. Essential oil analysis and antibacterial activity of *Rosmarinus tournefortii* from Algeria. *Natural Product Communications*. 6(10).
- Bhat, A. M., Soodan, J. S., Singh, R., Dhobi, I. A., Hussain, T., Dar, M. Y., & Mir, M. 2017. Incidence of bovine clinical mastitis in Jammu region and antibiogram of isolated pathogens. *Veterinary World*. 10(8): 984.
- Bhat, A. M., Soodan, J. S., Singh, R., Dhobi, I. A., Hussain, T., Dar, M. Y. & Mir, M. 2017. Incidence of bovine clinical mastitis in Jammu region and antibiogram of isolated pathogens. *Veterinary World*. 10 (8): 984-989.
- Birhanu, M., Leta, S., Mamo, G. & Tesfaye, S. 2017. Prevalence of bovine subclinical mastitis and isolation of its major causes in Bishoftu Town, Ethiopia. *BMC Research Notes*. 10(1): 767.
- Bogavac, M. A., Karaman, M. A., Suđi, J. J., Radovanović, B. B., Janjušević, L. N., Četković, N. B., & Tešanović, K. D. 2017. Antimicrobial potential of *Rosmarinus officinalis* commercial essential oil in the treatment of vaginal infections in pregnant women. *Natural Product Communications*. 12(1), 127-130.
- Bolaños, D., Muñoz M., Medina D., Iñiguez M. & Córdova I. 2004. Influencia de la mastitis subclínica bovina sobre la producción de leche, en un hato lechero en Tulancingo, Hidalgo. *Memorias XXVIII Congreso Nacional Buiatría*. Morelia, México.
- Bonetto C. (2014). Mastitis bovina causada por *Staphylococcus* coagulasa negativos (Tesis Doctoral). Universidad Nacional de la Plata. Buenos Aires, Argentina.
- Bonifaz, N. & Conlago, F. 2016. Prevalencia e incidencia de mastitis bovina mediante la prueba de California Mastitis Test con identificación del agente etiológico, en Paquiestancia, Ecuador. *Revista de Ciencias de la Vida*. 24(2): 43-52.
- Bouhdid, S., Abrini, J., Amensour, M., Zhiri, A., Espuny, M. J., & Manresa, A. 2010. Functional and ultrastructural changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Cinnamomum verum* essential oil. *Journal of Applied Microbiology*. 109(4): 1139-1149.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., & Jovin, E. 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., *Lamiaceae*) essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(19): 7879-7885.
- Bravo K. (2009). Estudio de incidencia y prevalencia de mastitis y su impacto económico en lecherías de la X Región (Tesis de Ingeniería). Facultad de ciencias agronómicas, Universidad de Chile. Santiago, Chile.
- Brophy J., Davies N., Southwell I., Stiff I. & Williams L. 1989. Gas chromatographic quality control for oil of *Melaleuca terpinen-4-ol* type (Australian tea tree). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 37:1330–1335.
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*. 94(3): 223-253.
- Calderón A. & Rodríguez V. 2008. Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundiboyacense (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 21(4): 582-589.

- Calvinho, L. F., Rafaela, E. & Esperanza, F. 2001. Tratamiento de mastitis clínicas y manejo de antibióticos en el tambo. Asociación Pro-Calidad de la Leche y sus Derivados.
- Cano C., Bonilla P., Roque M. & Ruiz J. 2008. Actividad antimicrobica in vitro y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña). Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. 25(3): 298-301.
- Carson C., Hammer, K. & Riley T. 2006. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. Clinical Microbiology Reviews. 19(1):50-62.
- Carvalho, M., Albano, H., & Teixeira, P. 2018. *In vitro* antimicrobial activities of various essential oils against pathogenic and spoilage microorganisms. Journal of Food Quality and Hazards Control. 5(2), 41-48.
- Castaño, M. (2012). Evaluación de la capacidad conservante de los aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*) y canela (*Cinnamomum verum*), sobre la levadura *Rhodotorula mucilaginosa* en leche chocolatada (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia, Medellín.
- Castillo, M., Suniaga, J., Rojas, G., Hernández, J. A., Caamaño, J., Urbina, A., & Tovar, L. 2009. Estudio de prevalencia de mastitis subclínica en la zona alta del estado Mérida. Agricultura Andina. 16: 39-48.
- Celikel N. & Kavaz G. 2008. Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. Czech journal of Food Sciences. 26(3): 174-181.
- Contreras, G. A. 2009. Alternativas en el manejo de la mastitis en novillas. Revista MVZ Córdoba. 14(1): 1642-1653.
- Corbellini, C. (2002). La mastitis bovina y su impacto sobre la calidad de leche. Argentina: Instituto de Tecnología Agropecuaria. Recuperado de: <https://www.agro.uba.ar/>
- Corral, L.A., Morales, Y.E., Pazos, R.L., Ramírez, V.A., Martínez, C.R., Muñoz, R.J. 2012. Quantification of cultivable bacteria by the “Massive Stamping Drop Plate” method. Revista Colombiana de Biotecnología. 14(2): 173-182.
- Coy C., & Acosta E. 2013. Actividad antibacteriana y determinación de la composición química de los aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y cúrcuma (*Curcuma longa*) de Colombia. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 18(2): 237-246.
- Cristani, M., D'Arrigo, M., Mandalari, G., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Micieli, D., Venuti, V., Bisignano, G., Saija, A. & Trombetta, D. 2007. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 55: 6300-6308.
- Cueva J. (2017). Actividad antimicrobiana del aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) frente al crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 in vitro (Tesis de Licenciatura). Universidad Privada Norbert Wiener, Lima, Perú.
- Deb R., Kumar A., Chakraborty S., Verma A., Tiwari R., Dhama K., & Kumar S. 2013. Trends in diagnosis and control of bovine mastitis: a review. Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS. 16(23): 1653-1661.
- Del Cura. 2014. Mastitis por *Staphylococcus* en ganado bovino. Revista de Medicina Veterinaria

Cría y Salud. 7(35): 50-52.

- Dingwell, R., Kelton, D., & Leslie, K. 2003. Management of the dry cow in control of peripartum disease and mastitis. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*. 19(1): 235-265.
- Dzia, A.W. 2016. Evaluation of the tea tree oil activity to anaerobic bacteria-in vitro study. *Acta Poloniae Pharmaceutica*. 73: 389.
- Ebrahimi, E., Haghjou, M., Nematollahi, A., & Goudarzian, F. 2020. Effects of rosemary essential oil on growth performance and hematological parameters of young great sturgeon (*Huso huso*). *Aquaculture*. 521:734909.
- Elizari, I. (2013). Actividad antibacteriana de aceites esenciales de orégano y tomillo incorporados en soluciones formadoras de films sobre la microbiota superficial de filetes de merluza (Tesis de Maestría) Universidad Pública de Navarra, España.
- Fariña N., Carpinelli L., Samudio M., Guillén R., Laspina F., Sanabria R. & de Kaspar H. 2013. *Staphylococcus* coagulasa-negativa clínicamente significativos: especies más frecuentes y factores de virulencia. *Revista Chilena de Infectología*. 30(5): 480-488.
- Fei L., Ding Y., Ye X. & Ding T. 2011. Antibacterial effect of cinnamon oil combined with thyme or clove oil. *Agricultural Sciences in China*. 10(9): 1482-1487.
- França K., Martins M., de Medeiros M., Iorio N., Fonseca-Gonçalves A., Cavalcanti Y., & Padilha W. 2017. Antibacterial activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree essential oil) on bacteria of the dental biofilm. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*. 17(1): 3857.
- Fu, Y., Zu, Y., Chen, L., Shi, X., Wang, Z., Sun, S., & Efferth, T. 2007. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phytotherapy Research*. 21(10): 989-994.
- Fuselli, S. R., de la Rosa, S. G., Gende, L. B., Eguaras, M. J., & Fritz, R. 2006. Inhibición de *Paenibacillus larvae* empleando una mezcla de aceites esenciales y timol. *Revista Argentina de Microbiología*. 38(2): 89-92.
- Gerlach, B., Arturo, F., Ayala Álvarez, F., Ballesteros, D., Francisco, G., Moreno Medina, S. & Ernesto, L. 2009. Incidencia y costo de la mastitis en un establo del municipio de Santa Ana, Sonora. *Revista Mexicana de Agronegocios*. 24: 789-792.
- Gnatta, J., Pinto, F., Bruna, C. Souza, R., Graziano, K., & Silva, M. 2013. Comparación de la eficacia antimicrobiana en la higienización de las manos: aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* versus triclosan. *Revista Latinoamericana de Enfermagem*, 21(6): 1212-1219.
- Gomes F. & Henriques M. 2016. Control of bovine mastitis: old and recent therapeutic approaches. *Current Microbiology*, 72(4): 377-382.
- Gómez A. & López A. 2009. Potencial antimicrobiano de los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare*) y canela (*Cinnamomum zeylanicum*). *Temas Selectos de Ingeniería en Alimentos*. 3(1): 33-45.
- González M.I. (2008). Materiales y cepas de referencia en laboratorios de Microbiología Ambiental. Montevideo, Uruguay: Red de Laboratorios Ambientales de Uruguay. Recuperado de: <https://www.dinama.gub.uy/rlau/>

- Guízar, J. & Bedolla, J. 2008. Determinación de la prevalencia de mastitis bovina en el municipio de Tarímbaro, Michoacán, mediante la prueba de California. *Revista Electrónica de Veterinaria*. 9(10): 1-35.
- Hossain M., Paul S., Hossain M., Islam M. & Alam M. 2017. Bovine mastitis and its therapeutic strategy doing antibiotic sensitivity test. *Austin Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry*. 4(1): 1030.
- Hussain A., Anwar F., Chatha S., Jabbar A. Mahboob S. & Nigam P. 2010. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activity. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41: 1070-1078.
- Hussein, H., El-Razik, K., Elbayoumy, M., Abdelrahman, K. & Hosein, H. 2018. Milk amyloid A as a biomarker for diagnosis of subclinical mastitis in cattle. *Veterinary World*. 11(1): 34.
- International Organization for Standardization. 2004. ISO 4730:2004. Oil of *Melaleuca*, terpinen-4-ol type (tea tree oil). International Organization for Standardization.
- International Organization for Standardization. 2013. Aromatic natural raw materials. Vocabulary (ISO Standard No. 9235:2013).
- Iraguha, B., Hamudikuwanda, H. & Mushonga, B. 2015. Bovine mastitis prevalence and associated risk factors in dairy cows in Nyagatare District, Rwanda. *Journal of The South African Veterinary Association*. 86(1): 1-6.
- Ismael A. 2018. Epidemiology of bovine mastitis in Ethiopia. *Journal of Veterinary Medicine and Health*. 2: 104.
- Jafari, A., & Pashazadeh, M. 2020. Study of chemical composition and antimicrobial properties of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oil on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in vitro. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*. 3(1): 62-69.
- Jiang, Y., Wu, N., Fu, Y. J., Wang, W., Luo, M., Zhao, C. J., & Liu, X. L. 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of rosemary. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 32(1): 63-68.
- Ju, J., Xie, Y., Guo, Y., Cheng, Y., Qian, H., & Yao, W. 2019. The inhibitory effect of plant essential oils on foodborne pathogenic bacteria in food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 59(20): 3281-3292.
- Kaskatepe, B., Kiyimaci, M., Simsek, D., Erol, H. & Erdem, S. 2016. Comparison of the contents and antimicrobial activities of commercial and natural cinnamon oils. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 78(4): 541- 546.
- Kulaksiz, B., Sevda, E. R., Üstündağ-Okur, N., & Saltan-İşcan, G. 2018. Investigation of antimicrobial activities of some herbs containing essential oils and their mouthwash formulations. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*. 15(3): 370.
- Kwieciński, J., Eick, S., & Wójcik, K. 2009. Effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on *Staphylococcus aureus* in biofilms and stationary growth phase. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 33(4): 343-347.
- Li, W. R., Li, H. L., Shi, Q. S., Sun, T. L., Xie, X. B., Song, B., & Huang, X. M. 2016. The dynamics and mechanism of the antimicrobial activity of tea tree oil against bacteria and fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100(20): 8865-8875.

- López, J. (2014). Mamitis bovina: definición, etiología y epidemiología de la enfermedad. *Ciencia Veterinaria*. 1(1).
- Lopez-Romero J., González-Ríos H., Borges A. & Simões M. 2015. Antibacterial effects and mode of action of selected essential oils components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015:795435
- Luengo M. 2008. El romero: planta aromática con efectos antioxidantes. *Offarm: Farmacia y Sociedad*. 27(7): 60-63.
- Manilal, A., Sabu, K., Shewangizaw, M., Aklilu, A., Seid, M., Merdekios, B., & Tsegaye, B. 2020. In vitro antibacterial activity of medicinal plants against biofilm-forming methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: efficacy of *Moringa stenopetala* and *Rosmarinus officinalis* extracts. *Heliyon*. 6(1): e03303.
- Marongiu B., Piras A., Porcedda S., Tuveri E., Sanjust E., Meli M. & Rescigno A. 2007. Supercritical CO₂ extract of *Cinnamomum zeylanicum*: chemical characterization and antityrosinase activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(24): 10022-10027.
- Mendoza B., Meza M., Mendoza, K., Mera, D., Vargas, A. & Riera M. 2019. Obtención de aceite esencial de romero con fines cosméticos. *Revista Prisma Tecnológico*. 10(1): 28-32.
- Mendoza J., Vera Y. & Peña L. 2017. Prevalencia de mastitis subclínica, microorganismos asociados y factores de riesgo identificados en hatos de la provincia de Pamplona, Norte de Santander. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*. 64(2): 11-24.
- Meza, J., Ramos, J., Zarzosa, A., Noria, O., Alarcón, J., Patiño, A. & Aguirre, V. 2006. Caracterización molecular de aislamientos de *Staphylococcus* spp. asociados a mastitis bovina en Tarímbaro, Michoacán. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 44(1): 91-106.
- Montero-Recalde M., Revelo J., Avilés-Esquivel D., Valle E. & Guevara-Freire D. 2017. Efecto antimicrobiano del aceite esencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) sobre cepas de *Salmonella*. *Revista de investigaciones veterinarias del Perú*. 28(4): 987-993.
- Mordmuang A. & Voravuthikunchai S. 2015. *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. leaf extract: an alternative approach for the treatment of staphylococcal bovine mastitis. *Research in Veterinary Science*. 102: 242-246.
- Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J., & Ochoa, T. 2011. Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 28: 648-656.
- Mpatswenumugabo, J., Bebora, L., Gitao, G., Mobegi, V., Iraguha, B., Kamana, O. & Shumbusho, B. 2017. Prevalence of subclinical mastitis and distribution of pathogens in dairy farms of Rubavu and Nyabihu districts, Rwanda. *Journal of Veterinary Medicine*. 2017. 1: 1-8.
- Mumu, S., & Hossain, M. 2018. Antimicrobial activity of tea tree oil against pathogenic bacteria and comparison of its effectiveness with eucalyptus oil, lemongrass oil and conventional antibiotics. *American Journal of Microbiological Research*. 6(3): 73-78.
- Murbach B., Nunes L., da Silva I & Fernandes A. 2014. Antimicrobial activity of essential oils. *Journal of Essential Oil Research*. 26(1): 34-40.
- Ondiek J., Ogore P., Shakala E. & Kaburu G. 2013. Prevalence of bovine mastitis, its therapeutics and control in Tatton Agriculture Park, Egerton University, Njoro District of Kenya. *Basic*

Research Journals of Agricultural Science and Review. 2(1): 15-20.

- Ooi, L. S., Li, Y., Kam, S. L., Wang, H., Wong, E. Y., & Ooi, V. E. 2006. Antimicrobial activities of cinnamon oil and cinnamaldehyde from the Chinese medicinal herb *Cinnamomum cassia* Blume. *The American Journal of Chinese Medicine*. 34(3): 511-522.
- Orlov, D. S., Nguyen, T., & Lehrer, R. I. 2002. Potassium release, a useful tool for studying antimicrobial peptides. *Journal of Microbiological Methods*. 49(3), 325-328.
- Pech, V., Carvajal, M. & Montes, R. 2007. Impacto económico de la mastitis subclínica en hatos bovinos de doble propósito de la zona centro del estado de Yucatán. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 7(2).
- Pellegrino M., Frola I., Odierno L. & Bogni C. 2011. Mastitis bovina: resistencia a antibióticos de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche. *Revista Electrónica de Veterinaria*. 12(7): 1-14.
- Pérez-Cano, H., & Robles-Contreras, A. 2013. Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Revista Médica MD*. 4(3): 187-192.
- Picazo, J. (2000). *Procedimientos en microbiología clínica*. Madrid, España: Comité Español del Antibiograma. Recuperado de: <http://coesant-seimc.org/>
- Pinzón, A., Vásquez, F. & Martínez, G. 2009. Efectos de la mastitis subclínica en algunos hatos de la cuenca lechera del Alto Chicamocha (departamento de Boyacá). *Revista de medicina veterinaria*, (17), 23-35.
- Ponce A., Fritz R., Del Valle C. & Roura S. 2003. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT-Food Science and Technology*. 36(7): 679-684.
- Purca T. (2013). Efectividad antibacteriana “*in vitro*” del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre flora salival (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.
- Puvaca, N., Milenković, J., Galonja Coghil, T., Bursić, V., Petrović, A., Tanasković, S., & Miljković, T. 2021. Antimicrobial activity of selected essential oils against selected pathogenic bacteria: In vitro study. *Antibiotics*. 10(5): 546.
- Raeisi, M., Tajik, H., Yarahmadi, A., & Sanginabadi, S. 2015. Antimicrobial effect of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Health Scope*. 4(4): e21808.
- Raman, A., Weir, U., & Bloomfield, S. F. 1995. Antimicrobial effects of tea-tree oil and its major components on *Staphylococcus aureus*, *Staph. epidermidis* and *Propionibacterium acnes*. *Letters in Applied Microbiology*. 21(4), 242-245.
- Ramírez N., Keefe G., Dohoo I., Sánchez J., Arroyave O., Cerón J. & Palacio L. 2014. Herd-and cow-level risk factors associated with subclinical mastitis in dairy farms from the High Plains of the northern Antioquia, Colombia. *Journal of Dairy Science*. 97(7): 4141-4150.
- Ramirez, L., & Castaño, D. 2009. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia Et Technica*. 15(42): 263-268.
- Ramírez, N., Fernández-Silva, J. & Palacio, L. 2018. Tasa de incidencia de mastitis clínica y

susceptibilidad antibiótica de patógenos productores de mastitis en ganado lechero del norte de Antioquia, Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*. (36): 75-87.

Recuperado de: <https://www.wpsa-aeca.es/>

Ríos, V. 2010. Evaluación del aceite esencial y estudio de conservación en frío del *Cymbopogon citratus* cultivado en la región del Quindío. *Revista de Investigaciones Universidad del Quindío*. 20: 24-28.

Riverón, F., Hernández, J., Ponce, L., & Machado, C. 2003. Resistencia bacteriana. *Revista Cubana de Medicina Militar*. 32(1).

Romero M., Sánchez, J., Curiel, G. & Vázquez, R. 2004. Prevalencia y determinación de bacterias causantes de mastitis en dos hatos lecheros en el valle de Huamantla. *Memorias XXVIII Congreso Buiatría*. Morelia, Michoacán, México.

Romero, A. 2004. Situación actual de la mastitis en México. Departamento Producción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNAM. México DF. 122-134

Ruiz A. (2005). Mastitis Bacteriana en Ganado Bovino: Etiología y Técnicas de Diagnóstico. CDMX, México: Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos A.C. Recuperado de: http://www.ammveb.net/articulos/Mastitis_bacteriana.pdf

Sakkas, H., Gousia, P., Economou, V., Sakkas, V., Petsios, S., & Papadopoulou, C. 2016. In vitro antimicrobial activity of five essential oils on multidrug resistant Gram-negative clinical isolates. *Journal of intercultural ethnopharmacology*, 5(3), 212.

Sánchez B. & Gutiérrez N. 2015. Frequency and antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis in dairy farms from Tolima, Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*. (30): 83-93.

Sánchez M, Gutiérrez N. & Posada I. 2018. Prevalencia de mastitis bovina en el Cañón de Anaimé, región lechera de Colombia, incluyendo etiología y resistencia antimicrobiana. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 29(1): 226-239.

Santibáñez C., Gómez O., Cárdenas L. Escobedo M. Bustinza R. & Peña J. 2013. Prevalencia y factores asociados a la mastitis subclínica bovina en los Andes peruanos. *Revista Veterinaria y Zootecnia*. 7(2): 92-104.

Saran, A. & Chaffer, M. 2000. Mastitis y calidad de leche. Buenos Aires: Ed. Inter- Médica. pp.11-25, 133-135.

Scaramelli, A. & González, Z. 2005. Epizootiología y diagnóstico de la mastitis bovina. En: González C. & Soto E. (1ra Ed). *Manual de Ganadería Doble Propósito*. Editorial Fundación Girarz, Maracaibo, Venezuela, 328-334.

Shi, C., Zhao, X., Yan, H., Meng, R., Zhang, Y., Li, W. & Guo, N. 2016. Effect of tea tree oil on *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production. *Food Control*. 62: 257-263.

Sienkiewicz, M., Łysakowska, M., Pastuszka, M., Bienias, W., & Kowalczyk, E. 2013. The potential of use basil and rosemary essential oils as effective antibacterial agents. *Molecules*. 18(8): 9334-9351.

Silveira, S., Cunha Júnior, A., Scheuermann, G., Secchi, F., & Vieira, C. 2012. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from selected herbs cultivated in the

South of Brazil against food spoilage and foodborne pathogens. *Ciência Rural*, 42(7): 1300-1306.

- Sim, J. X. F., Khazandi, M., Pi, H., Venter, H., Trott, D. J., & Deo, P. 2019. Antimicrobial effects of cinnamon essential oil and cinnamaldehyde combined with EDTA against canine otitis externa pathogens. *Journal of Applied Microbiology*. 127(1): 99-108.
- Solarte A. (2016). Aplicación de aceites esenciales para el control de *Salmonella typhimurium* aislada de casos clínicos en diferentes especies animales (Tesis de Maestría). Universidad de Córdoba, España.
- Solórzano A. Murillo E. & Pérez M. 1980. Incidencia e importancia económica de mastitis en el estado de Sonora. Centro de Investigaciones Pecuarias del Estado de Sonora A.C. México.
- Taroco, R., Seija, V., & Vignoli, R. 2006. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. Editorial Oficina del Libro FEFMUR. 2da Edición. Montevideo, Uruguay. 680 páginas.
- Teles B., Nunes L., Bérnago F., Albano M., Mores V., Sforcin J. & Fernandes A. 2016. The antibacterial effects of *Melaleuca alternifolia*, *Pelargonium graveolens* and *Cymbopogon martinii* essential oils and major compounds on liquid and vapor phase. *Journal of Essential Oil Research*. 28(3): 227-233.
- Teles B., Nunes L., da Silva I. & Fernandes A. 2014. Antimicrobial activity of essential oils. *Journal of Essential Oil Research*. 26(1): 34-40.
- Tongel, P. & Brouček, J. 2010. Influence of hygienic condition on prevalence of mastitis and lameness in dairy cows. *Slovak Journal of Animal Science*. 43: 95- 99.
- Tremblay, Y. D., Lamarche, D., Chever, P., Haine, D., Messier, S., & Jacques, M. 2013. Characterization of the ability of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms. *Journal of Dairy Science*. 96(1): 234-246.
- Trevisi, E., Zecconi, A., Cogrossi, S., Razuoli, E., Grossi, P., & Amadori, M. 2014. Strategies for reduced antibiotic usage in dairy cattle farms. *Research in Veterinary Science*. 96(2): 229-233.
- Trujillo, C. M., Gallego, A. F., Ramírez, N., & Palacio, L. G. 2011. Prevalence of mastitis in dairy herds in Eastern Antioquia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 24(1): 11-18.
- Unlu, M., Ergene, E., Unlu, G. V., Zeytinoglu, H. S. & Vural, N. 2010. Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (*Lauraceae*). *Food and Chemical Toxicology*. 48(11): 3274- 3280.
- Valle, R. (2015). Prevalencia de mastitis y su relación con los niveles séricos de vitaminas E y A en ganado doble propósito de pequeños productores de Cobachi, Sonora (Tesis de Maestría). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Hermosillo, Sonora.
- Van Vuuren, S. F., Docrat, Y., Kamatou, G. P. P., & Viljoen, A. M. 2014. Essential oil composition and antimicrobial interactions of understudied tea tree species. *South African Journal of Botany*. 92: 7-14.
- Varshney, S., Varshney, P., Dash, S. K., Gupta, M. K., Kumar, A., Bist, B., & Sharma, A. 2012. Antibacterial activity of fruits of *Terminalia chebula* and *Terminalia bellerica* against mastitis field isolates. *Medicinal Plants-International Journal of Phytomedicines and Related Industries*. 4(3): 167-169.

- Velásquez, S., Lima G., Domínguez B., Meza O. & Villagomez J. 2001. Efecto de factores intrínsecos del animal sobre la incidencia de mastitis subclínica en bovinos de doble propósito en Veracruz, México. Memorias XXV Congreso Nacional Buiatría. Veracruz, México.
- Vento D., Amaya M. & Varela J. 2008. Caracterización de la situación clínico-epizootiológica de la mastitis bovina en vacas primerizas Holstein de una lechería especializada. Revista Electrónica de Veterinaria. 9(9): 1-12.
- Vera, J. M. (2018). Evaluación del efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de jengibre (*Zingiber officinale*) y cúrcuma (*Curcuma longa*) frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC: 12600 (Tesis de Ingeniería). Universidad Politécnica Salesiana, Ecuador.
- Vila R., & Cañigüeral, S. 2006. El aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* en el tratamiento de la vulvovaginitis. Revista de Fitoterapia. 6(2): 119-128.
- Villagómez, J. & Cervantes, P. 2013. Impacto económico de la mastitis bovina en la lechería tropical. XII Curso Internacional Teórico Práctico “Diagnóstico y Control de la Mastitis Bovina”. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Veracruz, México.
- Zekaria, D. (2006). Los aceites esenciales: una alternativa a los antimicrobianos. Valladolid, España: Asociación Española de Ciencia Avícola.
- Zhang Y., Liu X., Wang Y., Jiang P., & Quek, S. 2016. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Food Control. 59: 282-289.