

## Actividad antibacteriana de aceites esenciales de plantas cultivadas en Cuba sobre cepas de *Salmonella enterica*



### Antibacterial activity of essential oils from plants grown in Cuba on *Salmonella enterica* strains

<http://opn.to/a/nITgL>

Annie Rubio-Ortega <sup>1\*</sup>, María del Carmen Travieso-Novelles <sup>1</sup>, Yamilka Riverón-Alemán <sup>3</sup>, Ailin Martínez-Vasallo <sup>3</sup>, Joan Peña-Rodríguez <sup>3</sup>, Ivette Espinosa-Castaño <sup>2</sup>, Oriela Pino-Pérez <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Ecología Química, Grupo Plagas Agrícolas, Dirección de Sanidad Vegetal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, CP 32 700, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

<sup>2</sup>Laboratorio de Bacteriología, Dirección de Salud Animal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, CP 32 700, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

<sup>3</sup>Laboratorio de Ensayos para el Control de la Calidad e Inocuidad de los Alimentos (CENLAC), Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Apartado 10, CP 32 700, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

**RESUMEN:** Las infecciones por *Salmonella* spp. (salmonelosis) son la segunda causa mayoritaria de enfermedades transmitidas por alimentos a nivel mundial. Ante la creciente emergencia de cepas resistentes a antibióticos, se buscan alternativas para el tratamiento; los aceites esenciales son productos que se destacan por sus potencialidades como antimicrobianos. El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antibacteriana de aceites esenciales de plantas cultivadas en Cuba sobre cepas de *Salmonella enterica*. Los aceites esenciales se obtuvieron por hidrodestilación o expresión. Se realizó la evaluación de la acción antibacteriana de 15 aceites por difusión en agar; se seleccionaron los promisorios y se les determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y mínima bactericida (CMB) por la técnica de diluciones seriadas. Los aceites esenciales de *Ocimum gratissimum* L., *Lippia graveolens* (Kunth) y *Thymus vulgaris* L. inhibieron el crecimiento de las cepas de *Salmonella enterica*, incluyendo cepas resistentes a antibióticos. Los valores de CMI y CMB de los aceites oscilaron entre 0,5 mg/mL y 1 mg/mL, respectivamente. Estos aceites esenciales son candidatos promisorios para el desarrollo de productos antibacterianos destinados al control de la salmonelosis.

**Palabras clave:** aceite esencial, salmonelosis, cepas resistentes.

**ABSTRACT :** Infections caused by *Salmonella* spp. (salmonellosis) are very frequent, being the second major cause of foodborne diseases worldwide. Given the growing emergence of antibiotic-resistant strains, alternatives are sought for treatment using essential oils as products that stand out for their potential as antimicrobials. The objective of this work was to determine the antibacterial activity of essential oils from plants grown in Cuba on *Salmonella enterica* strains. The essential oils were obtained by hydrodistillation or expression. The evaluation of the antibacterial action of 15 oils was carried out by agar diffusion. The promising ones were selected and the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined by the serial dilution technique. The essential oils of *Ocimum gratissimum* L., *Lippia graveolens* (Kunth) and *Thymus vulgaris* L. inhibited the growth of *Salmonella enterica* strains, including antibiotic-resistant strains. MIC and MBC values of the oils ranged between 0.5 mg/mL and 1 mg/mL. These essential oils are promising candidates for the development of antibacterial products for the control of salmonellosis.

**Key words:** essential oil, salmonellosis, resistant strains.

\*Autor para correspondencia: Annie Rubio-Ortega. Correo electrónico: [annie@censa.edu.cu](mailto:annie@censa.edu.cu)

Recibido: 10/08/2018

Aceptado: 03/10/2018

## INTRODUCCIÓN

La infección por *Salmonella* spp. (salmonelosis) es un problema de gran atención para la Organización Mundial de la Salud (OMS), ya que constituye la segunda causa de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) a nivel mundial (1). En países desarrollados, como los miembros de la Unión Europea, la infección por cepas de *Salmonella* spp. tuvo una tasa de incidencia de 20,4 por cada 100 000 habitantes en 2016 (2), mientras que en Estados Unidos causa 1,2 millones de infecciones y 450 muertes anuales (3). En América Latina, en la región del Caribe las cepas de *Salmonella* spp. se encuentran dentro de las tres bacterias patógenas de mayor incidencia como ETAs, con un incremento en la información de casos en los últimos 20 años (4).

Existen más de 2 500 serovares de *Salmonella enterica* (5), con un amplio rango de hospederos (6); en su mayoría provocan afectaciones gastrointestinales en el ser humano, infección sistémica en el ratón y un cuadro crónico asintomático en aves (7). Además, pueden ser transportadas en frutas, hortalizas y vegetales (8). Se conoce que el serovar Typhimurium puede ser encontrado en el tracto gastrointestinal de varias especies de animales, e incluso, puede replicarse en tejidos de algunas plantas (9). El surgimiento de cepas de *Salmonella* spp. resistentes a una gama de antimicrobianos, y su capacidad de formar biopelículas, hacen que en la actualidad representen un grave problema de salud humana y animal en países desarrollados y en países en vías de desarrollo (10-12). Esta bacteria posee riesgo de adquirir y transferir factores determinantes de resistencia ante la exposición a antibióticos, lo que es específico de cada cepa y del lugar de procedencia (13).

En Cuba se han identificado cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, aisladas de carnes de aves importadas, resistentes a antibióticos como la ceftriaxona y la tetraciclina, que son medicamentos de primera elección para el tratamiento de salmonelosis (14). Además, se han informado cepas de *Salmonella* aisladas de humanos, con elevados porcentajes de resistencia a la tetraciclina, ampicilina, doxiciclina, amoxicilina/ácido clavulánico y las sulfas (15).

En el periodo de 2008-2009 se identificaron 178 cepas de *S. enterica* aisladas de alimentos en diferentes regiones de Cuba, que presentaron resistencia a antibióticos como la tetraciclina (70,7 %), ampicilina (22,7 %) y ácido nalidíxico (14,7 %) (16), por lo que se hace necesario mantener la vigilancia sobre este patógeno y, en especial, la búsqueda de alternativas para su tratamiento.

Los aceites esenciales, mezclas naturales usualmente formadas por numerosos metabolitos secundarios, poseen actividad como antifúngicos, antivirales y antibacterianos, incluyendo la actividad sobre cepas resistentes a antibióticos (17,18). Entre las plantas aromáticas, los aceites de las familias Lamiaceae y Verbenaceae han sido ampliamente estudiados por sus propiedades farmacológicas para el tratamiento de problemas respiratorios y desórdenes gastrointestinales (17). Además, se conoce que los aceites esenciales de *Ocimum gratissimum* L., *Lippia graveolens* (Kunth) y *Thymus vulgaris* L. poseen propiedades antimicrobianas sobre un gran número de bacterias, tanto Gram positivas como Gram negativas (19).

El desarrollo de nuevos antimicrobianos a partir de aceites esenciales requiere de investigaciones sobre sus potencialidades en las condiciones existentes en cada país; se deben tomar en consideración dos elementos principales: i) la variabilidad química de estos productos naturales, debido a la existencia de quimiotipos, diferencias en las condiciones edafoclimáticas y los métodos de obtención, entre otros factores (17) y ii) la variación en la susceptibilidad entre cepas de una misma especie de microorganismo, existente de manera intrínseca o asociada al desarrollo de resistencia adquirida (13). El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antibacteriana de aceites esenciales de plantas cultivadas en Cuba sobre cepas de *Salmonella enterica*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención de aceites esenciales

Se utilizaron aceites esenciales obtenidos a partir de *Piper aduncum* subsp. *ossanum* (C. DC.) Saralegui, *Piper aduncum* L. subsp. *aduncum*, *Mentha piperita* L., *Mentha spicata* L., *Ocimum basilicum* var. *genovese* L. *Ocimum*

*gratissimum* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Thymus vulgaris* L., *Melaleuca quinquenervia* (Cav) S.T. Blake, *Eugenia axillaris* L., *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, *Citrus paradisi* Macfad, *Curcuma longa* L., *Lippia graveolens* (Kunth). Todos los aceites se extrajeron por el método de hidrodestilación durante tres horas, empleando un equipo Clevenger (20,21), excepto los aceites de *Citrus* obtenidos por el método de expresión (17).

### Cepas

Se utilizaron las siguientes cepas: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC14028 del cepario del Laboratorio de Ensayos para el Control de la Calidad e Inocuidad de los Alimentos (CENLAC), *Salmonella enterica*, del cepario de Bacteriología Animal del CENSA, aislada de muestra clínica de cerdo (Scl) y cinco cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* del cepario del CENLAC (S02, S04, S06, S08, S10); estas últimas resistentes a antibióticos como la ampicilina, cefazolina, y cefoxitina (datos no publicados). Las cepas se identificaron mediante técnicas morfológicas y bioquímicas.

### Actividad antibacteriana de aceites esenciales

Las bacterias se sembraron en medio Agar Triptona Soya (Biocen) y se incubaron a 37°C durante 24 horas. A partir de las colonias obtenidas, se prepararon suspensiones bacterianas en solución salina estéril (NaCl (Merck), 8,5 mg/mL), a una concentración de inóculo de  $21 \times 10^9$  ufc/mL, equivalente a una densidad óptica de 0,45 a una longitud de onda de 620 nm en un espectrofotómetro (T90 +UV/Vis Spectrometer PG Instruments Ltd), verificada por conteo de viables sobre Agar Triptona Soya.

La sensibilidad de estos microorganismos a cada aceite esencial se evaluó por el método de difusión en agar, según la técnica estandarizada por el Instituto de Estándares de Laboratorios y Clínicas (CLSI-2016) (22). Para ello, a partir de la suspensión bacteriana se tomaron alícuotas de 100  $\mu$ L y se sembraron con espátulas de Drigalski en placas Petri estériles de 9 cm con 20 mL del medio cultivo Agar Triptona Soya.

Seguidamente, cuatro discos de papel de filtro (Whatman1) de 6 mm de diámetro se colocaron

de forma equidistante sobre el medio inoculado con las suspensiones bacterianas; dos tratados con 10  $\mu$ L del aceite y dos discos control (sin aceite) por placa. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo se midió el halo de inhibición del crecimiento y se clasificó la actividad antibacteriana en fuerte (diámetro del halo de inhibición  $> 20$  mm), intermedia ( $12,0 <$  diámetro del halo de inhibición  $\leq 20,0$  mm) y débil (diámetro del halo de inhibición  $\leq 12,0$  mm) (23). Se seleccionaron como promisorios los aceites que provocaron una inhibición fuerte. La evaluación se realizó por cuatuplicado para cada tratamiento.

La actividad de los 15 aceites se determinó sobre las cepas ATCC14028 y Scl de *Salmonella enterica*. Los aceites que fueron efectivos en el primer ensayo se seleccionaron para la evaluación de su actividad a dosis de 10 y 5  $\mu$ L sobre las cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, resistentes a antibióticos  $\beta$  lactámicos. Se utilizó como control positivo ciprofloxacina (Liofilchem, 5  $\mu$ g/ $\mu$ L)

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y concentraciones mínimas bactericidas (CMB) se determinaron mediante el método de las diluciones seriadas en medio base caldo rojo fenol (Biolife) y maltosa (Merck) a 1 mg/mL. Al medio se le adicionó DMSO 4 % (Merck) para facilitar la solubilización del aceite. Las concentraciones de aceite evaluadas fueron 2 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL y 0,125 mg/mL. La prueba se realizó por triplicado y se incluyeron los siguientes controles: medio de cultivo, DMSO (40  $\mu$ L/mL) en medio de cultivo, DMSO (40  $\mu$ L/mL) y aceite (2 mg/mL) en el medio y el medio inoculado con la cepa correspondiente conteniendo DMSO (40  $\mu$ L/mL). Los tubos con las diluciones de los aceites se inocularon con 100  $\mu$ L y las suspensiones bacterianas con concentración de  $10^8$  ufc/mL, para una concentración final por tubo de  $10^5$  ufc/mL. Se incubaron a 37°C y se determinó la concentración mínima inhibitoria del crecimiento (CMI) después de 24 h. La CMI se estableció como la mínima concentración del aceite que inhibió el crecimiento visible del microorganismo después de la incubación. En aquellos casos

donde se observó inhibición, se tomó una asada y se sembró en una placa de Agar Triptona Soya, libre del agente antimicrobiano. La CMB fue la más baja concentración del aceite que resultó en un subcultivo negativo.

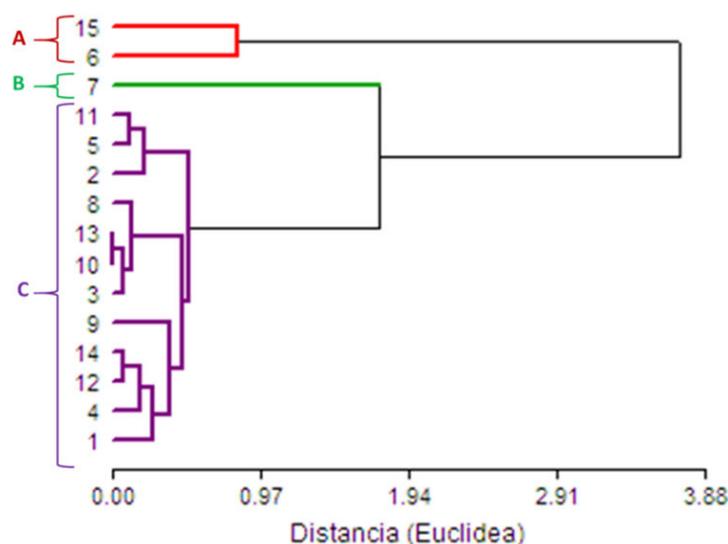
### Análisis estadístico

Para el proceso de selección de los aceites promisorios, se agruparon los aceites según los valores de los halos de inhibición obtenidos con 10 µL de los aceites; para ello se realizó un análisis de conglomerados Jerárquico con distancia Euclidea por el método promedio (UPGMA). Los datos de 5 y 10 µL de los aceites promisorios y el antibiótico control se compararon estadísticamente mediante un análisis de varianza simple, y las medias se contrastaron con la prueba de comparación de rangos múltiples de Duncan a una probabilidad de error 5 %. Se empleó el paquete estadístico InfoStat/L, 2016.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los 15 aceites evaluados por difusión en agar mostraron diferentes halos de inhibición sobre las cepas de *Salmonella* ATCC14028 y Scl. El análisis de la actividad antimicrobiana de los aceites sobre las dos cepas evaluadas en conjunto, representado en un dendograma jerárquico como parte del análisis de conglomerados (Fig. 1), mostró la distribución de estos aceites en tres grupos (A, B y C), con grado de coeficiente cofenético de 0,973, lo que indica una buena representación.

Los grupos obtenidos se correspondieron con la clasificación de la actividad antibacteriana de estos aceites según la escala propuesta por Mazzarrino (23). Los aceites en el grupo A (aceite esencial de *T. vulgaris* y *L. graveolens*) evidenciaron una actividad antibacteriana clasificada como fuerte, en el grupo B (aceite esencial de *O. gratissimum*) intermedia y en el grupo C con actividad débil (*P. aduncum* subsp.



**FIGURA 1.** Agrupamiento jerárquico de quince aceites esenciales según halos de inhibición del crecimiento bacteriano de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (cepa ATCC14028) y *Salmonella enterica* (cepa Scl). Código de aceites esenciales: 1 *Piper aduncum* subsp. *ossanum* (C. DC.) Saralegui, 2 *Piper aduncum* L. subsp. *aduncum*, 3 *Piper auritum* (Kunth), 4 *Ocimum basilicum* var. *genovese* L., 5 *Melaleuca quinquenervia* (Cav) S.T. Blake, 6 *Thymus vulgaris* L., 7 *Ocimum gratissimum* L., 8 *Curcuma longa* L., 9 *Mentha spicata* L., 10 *Eugenia axillaris* L., 11 *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, 12 *Rosmarinus officinalis* L., 13 *Citrus paradisi* Macfad, 14 *Mentha piperita* L., 15 *Lippia graveolens*. /Hierarchical grouping of fifteen essential oils according to the inhibition halos of the bacterial growth of *S. enteric* serovar *Typhimurium* (ATCC14028 strain) and *S. enterica* (Scl strain). Code of essential oils: 1 *Piper aduncum* subsp. *ossanum* (C. DC.) Saralegui, 2 *Piper aduncum* L. subsp. *aduncum*, 3 *Piper auritum* (Kunth), 4 *Ocimum basilicum* var. *Genovese* L., 5 *Melaleuca quinquenervia* (Cav) S.T. Blake, 6 *Thymus vulgaris* L., 7 *Ocimum gratissimum* L., 8 *Curcuma longa* L., 9 *Mentha spicata* L., 10 *Eugenia axillaris* L., 11 *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, 12 *Rosmarinus officinalis* L., 13 *Citrus paradisi* Macfad, 14 *Mentha piperita* L., 15 *Lippia graveolens*.

*ossanum*, *P. aduncum* subsp. *aduncum*, *M. piperita*, *M. spicata*, *R. officinalis*, *M. quinquenervia*, y *C. sinensis*) o no inhibitoria (*O. basilicum* var. *genovese*, *E. axillaris*, *C. paradisi* y *C. longa*).

Los halos de inhibición, que provocaron los aceites de *R. officinalis* y *O. basilicum* sobre la cepa ATCC14028, coinciden con los datos observados por Texeira *et al.* (24). El aceite esencial de *M. piperita* inhibió débilmente a las cepas de *Salmonella* utilizadas, mientras que *C. paradisi* no inhibió el crecimiento, lo que se corresponde con lo informado para el aceite esencial de *M. piperita* destilado en Turquía (25) y el aceite comercial de *C. paradisi* del Centro de Investigaciones de las Producciones de Cítricos en Italia (23).

La actividad antibacteriana de aceites esenciales de *M. spicata*, *M. piperita*, *R. officinalis* y *O. basilicum* de plantas cultivadas en Colombia se evidenció sobre cepas de *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC14028 y serovar Enteritidis ATCC13076; sin embargo, estos aceites no inhibieron el crecimiento de las cepas de *Salmonella* utilizadas en el ensayo de difusión en agar. Las diferencias pudieran deberse a que este efecto depende de los componentes de los aceites, que pueden variar en correspondencia con los quimiotipos de las especies vegetales de donde proceden (17), las condiciones edafoclimáticas en que se desarrollan las plantas y/o la susceptibilidad de las cepas de *Salmonella* spp.

Es conocida la actividad inhibitoria de los aceites de *T. vulgaris* de origen español, de *O. gratissimum* desarrollado en Brasil y de *L. graveolens* de plantaciones mexicanas sobre cepas de *S. enterica* (24,26,27). Los resultados demuestran que las esencias de estas plantas cultivadas en Cuba poseen una actividad inhibitoria fuerte sobre cepas de esta especie. No obstante, en la literatura no se encontraron datos de la actividad de estos aceites sobre cepas de *S. enterica* resistentes a antibióticos. La determinación de las potencialidades de aplicación práctica de los tres aceites bioactivos sobre cepas de *Salmonella* circulantes en el país requiere la evaluación de sus efectos sobre un grupo de cepas que mostraron resistencia a los antibióticos ( $\beta$  lactámicos).

Los tres aceites bioactivos seleccionados inhibieron el crecimiento de las siete cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (Tabla 1); su espectro de acción incluyó cepas resistentes a  $\beta$  lactámicos. Las aplicaciones de 10  $\mu$ L de los aceites provocaron halos superiores o similares a los obtenidos con 5  $\mu$ L.

El aceite de *T. vulgaris* con aplicaciones de 10  $\mu$ L mostró halos de inhibición, en un rango de 46,0 a 60,0 mm, significativamente superiores a los obtenidos por la ciprofloxacina para todas las cepas evaluadas. A esta dosis, los aceites de *O. gratissimum* y *L. graveolens* también provocaron una mayor o similar inhibición del crecimiento bacteriano que el antibiótico empleado en el ensayo para todas las cepas, excepto *O.*

**TABLA 1.** Actividad antibacteriana de diferentes dosis de aceites esenciales de *Thymus vulgaris*, *Ocimum gratissimum* y *Lippia graveolens* sobre cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. / Antibacterial activity of different doses of *Thymus vulgaris*, *Ocimum gratissimum* and *Lippia graveolens* essential oils on *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strains.

Cepas de <i>Salmonella</i>	Halo de inhibición (mm)						Ciprofloxacina (5 $\mu$ g)
	<i>Ocimum gratissimum</i>		<i>Lippia graveolens</i>		<i>Thymus vulgaris</i>		
	5 $\mu$ L	10 $\mu$ L	5 $\mu$ L	10 $\mu$ L	5 $\mu$ L	10 $\mu$ L	
ATCC14028	23,7 $\pm$ 1,2 <sup>C</sup>	26,0 $\pm$ 1,2 <sup>BC</sup>	22,0 $\pm$ 1,2 <sup>C</sup>	44,0 $\pm$ 2,0 <sup>A</sup>	45,3 $\pm$ 1,2 <sup>A</sup>	46,0 $\pm$ 1,7 <sup>A</sup>	31,0 $\pm$ 1,0 <sup>B</sup>
Scl	16,7 $\pm$ 0,3 <sup>E</sup>	21,7 $\pm$ 2,0 <sup>DE</sup>	24,7 $\pm$ 0,9 <sup>D</sup>	40,3 $\pm$ 1,6 <sup>B</sup>	35,0 $\pm$ 1,7 <sup>BC</sup>	47,3 $\pm$ 0,6 <sup>A</sup>	34,0 $\pm$ 1,0 <sup>C</sup>
S02	33,7 $\pm$ 0,9 <sup>BCD</sup>	37,3 $\pm$ 0,9 <sup>B</sup>	22,0 $\pm$ 1,5 <sup>E</sup>	35,7 $\pm$ 0,7 <sup>BC</sup>	28, $\pm$ 1,5 <sup>D</sup>	53,0 $\pm$ 1,0 <sup>A</sup>	30,5 $\pm$ 0,5 <sup>CD</sup>
S04	34,3 $\pm$ 1,2 <sup>C</sup>	56,7 $\pm$ 1,7 <sup>A</sup>	24,3 $\pm$ 1,2 <sup>D</sup>	43,3 $\pm$ 1,3 <sup>B</sup>	50,3 $\pm$ 2,2 <sup>A</sup>	50,3 $\pm$ 0,6 <sup>A</sup>	25,5 $\pm$ 0,5 <sup>D</sup>
S06	31,7 $\pm$ 0,9 <sup>CDE</sup>	44,3 $\pm$ 1,9 <sup>B</sup>	24,0 $\pm$ 1,5 <sup>E</sup>	37,3 $\pm$ 1,5 <sup>BC</sup>	35,7 $\pm$ 0,7 <sup>CD</sup>	60 $\pm$ 2,5 <sup>A</sup>	28,0 $\pm$ 1,0 <sup>DE</sup>
S08	32,0 $\pm$ 0,6 <sup>C</sup>	50,0 $\pm$ 0,6 <sup>A</sup>	20,7 $\pm$ 0,7 <sup>E</sup>	41,7 $\pm$ 0,3 <sup>B</sup>	34,3 $\pm$ 2,2 <sup>C</sup>	53,0 $\pm$ 0,6 <sup>A</sup>	26,5 $\pm$ 0,5 <sup>D</sup>
S10	35,7 $\pm$ 0,3 <sup>CD</sup>	55,0 $\pm$ 0,6 <sup>A</sup>	29,7 $\pm$ 2,2 <sup>E</sup>	46,0 $\pm$ 1,5 <sup>B</sup>	41,3 $\pm$ 2,2 <sup>BC</sup>	57,3 $\pm$ 0,9 <sup>A</sup>	32,0 $\pm$ 1,0 <sup>E</sup>

Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

*gratissimum* sobre la cepa proveniente de una muestra clínica de cerdo.

Ante la presencia de cepas de *Salmonella* resistentes a antibióticos  $\beta$  lactámicos, se hace recurrente el uso de flouroquinolonas como la ciprofloxacina (28), antibiótico sintético de segunda generación de amplio espectro de acción (29). La propuesta de desarrollo de un antibacteriano competitivo, basado en los aceites seleccionados, debe partir de que los niveles de actividad demostrados sean iguales o superiores a los antibióticos disponibles, como la ciprofloxacina. Además, sería de gran importancia si presentara un modo de acción novedoso, lo que estaría en correspondencia con la variedad de componentes presentes en cada aceite esencial y la posibilidad de que cada componente interactúe en diferentes sitios dianas, o uno mismo sobre varias dianas. Esto permitiría lograr un control efectivo de la enfermedad causada por cepas resistentes de este microorganismo.

Se conoce que los aceites esenciales pueden actuar sobre membrana citoplasmática, lípidos, complejos enzimáticos, ácidos nucleicos, provocan la pérdida de iones necesarios en el funcionamiento celular, modifican el pH intracelular, disminuyen ATP interno, incluso, pueden actuar sin afectar la morfología de la célula por sus características lipídicas (30,31). Los resultados responden a la necesidad de nuevos medicamentos con acción igual o superior a los disponibles. Estudios posteriores deberán profundizar en el modo de acción de estos aceites sobre las cepas de *Salmonella*.

En la determinación de la CMI y CMB (Tabla 2), el aceite de *L. graveolens* causó daño letal a las células, a la mitad de concentración que los aceites de *O. gratissimum* y *T. vulgaris*, sobre las siete cepas, coincidiendo los valores de CMI y CMB, con excepción de la cepa S04. En el caso del aceite de *O. gratissimum*, las CMI y CMB coincidieron en todas las cepas, siendo mayores para las bacterias resistentes a antibióticos que para las cepas *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 y *S. enterica*, muestra clínica de cerdo. Mientras que, el aceite de *T. vulgaris* provocó un efecto similar en todas las cepas, exceptuando a *S. enterica* muestra clínica de cerdo y a la cepa resistente S10 que

fueron sensibles a concentraciones menores de este.

Los tres aceites evaluados provocaron la inhibición del crecimiento del 50 (CMI50) y 90 % (CMI90) de las cepas evaluadas a igual concentración; para *L. graveolens* fue 0,5 mg/mL, mientras que para *O. gratissimum* y *T. vulgaris* fue de 1 mg/mL. La esencia de *T. vulgaris* fue menos activa que las de *O. gratissimum* y *L. graveolens* sobre *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC14028; aunque la CMI (1 mg/mL), que se obtuvo para el aceite destilado a partir del material vegetal cubano, fue similar a la CMI (1,25 mg/mL) informada para la especie cultivada en Colombia (32) e inferior a la CMI (10 mg/mL) para el de la planta desarrollada en España (24). Estas diferencias en la actividad biológica pudieran estar asociadas a cambios en la composición química de este aceite y en las cepas evaluadas (33).

De todas las cepas evaluadas, la cepa más susceptible a la acción de los tres aceites esenciales fue *S. enterica* aislada de una muestra clínica de cerdo, seguida de la cepa de referencia *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC14028. Entre las cepas resistentes a antibióticos, la más susceptible a los tres aceites bioactivos fue la S10.

En la literatura consultada no se refiere la acción antibacteriana de los aceites de *O. gratissimum* y *L. graveolens* sobre *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC14028. *O. gratissimum* inhibió el crecimiento de *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis (Smith) CCT4296, a una concentración de 0,6 mg/mL (26), valor que se encuentra en el rango de CMI determinado para las cepas evaluadas, lo que indica que esta subespecie podría manifestar una susceptibilidad similar al aceite cubano; mientras que Hernández *et al.* (27) demostraron la actividad de la esencia de *L. graveolens* sobre *Salmonella enterica* serovar Typhi con valores de CMI (0,125 mg/mL) y CMB (0,250 mg/mL), inferiores a los obtenidos para las cepas evaluadas. A valores mayores de concentración es de esperarse mayor efecto inhibitorio; sin embargo, estos datos reflejan y reafirman la importancia de evaluar cada producto natural con diferente origen y

**TABLA 2.** Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de los aceites de *Thymus vulgaris*, *Ocimum gratissimum* y *Lippia graveolens* sobre cepas de *Salmonella enterica*. / Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the oils from *Thymus vulgaris*, *Ocimum gratissimum* and *Lippia graveolens* on *Salmonella enterica* strains.

Cepas de <i>Salmonella enterica</i>	<i>Ocimum gratissimum</i>		<i>Lippia graveolens</i>		<i>Thymus vulgaris</i>	
	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)
ATCC14028	0,5	0,5	0,5	0,5	1,0	1,0
Scl	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
S02	1,0	1,0	0,5	0,5	1,0	1,0
S04	1,0	1,0	0,5	1,0	1,0	1,0
S06	1,0	1,0	0,5	0,5	1,0	1,0
S08	1,0	1,0	0,5	0,5	1,0	1,0
S10	1,0	1,0	0,5	0,5	0,5	1,0

método de obtención, con cepas microbianas que posean variabilidad en la susceptibilidad intrínseca de la especie y que, además, puedan adquirir nuevas susceptibilidades como la resistencia a antibióticos.

Al ser una mezcla de compuestos, los aceites esenciales tienen la capacidad de actuar sobre diferentes sitios dianas (30,34). El efecto antibacteriano puede deberse a que un mismo componente puede actuar por disímiles vías y/o a la acción aditiva o sinérgica de varios constituyentes sobre uno o múltiples sitios diana, lo que implica que los compuestos que se encuentren en concentraciones menores potencien la actividad de otros (35,36). Esto representa una ventaja para la utilización de estos compuestos como antibióticos, pues es menor la probabilidad de desarrollo de resistencia.

Aunque los tres aceites poseen actividad inhibitoria, al analizar entre métodos los resultados, el candidato más promisorio no coincide, ya que *T. vulgaris* es por difusión en agar y *L. graveolens* por el método de dilución seriada. La prueba por difusión en agar se utilizó como ensayo inicial, pues permite evaluar simultáneamente numerosos aceites que pueden ser aplicados directamente a los discos, utilizando pequeñas cantidades de muestra y sin necesidad de usar disolventes; sin embargo, posee limitantes asociadas a la poca capacidad de propagación en el medio agarizado de los componentes con baja polaridad, que en gran medida forman parte de los aceites esenciales. Además, la interpretación de los resultados se ve

influenciada por factores relacionados con el disco de la sustancia a evaluar (tamaño, cantidad de compuesto impregnado, adsorción) (37). Los resultados indican las potencialidades de los aceites seleccionados de inhibir el crecimiento de cepas que circulan en Cuba, independientemente de sus capacidades para difundir en el agar.

Según la Farmacopea Europea, la prueba por dilución seriada para la determinación de la CMI es el ensayo recomendado para determinar actividad antimicrobiana de productos naturales. Su aplicación para el estudio de los aceites también tiene desventajas: mayor tiempo de duración del ensayo, mayor número de recursos y poca solubilidad del aceite en el medio acuoso (37). Para eliminar esta última desventaja, se incorpora un disolvente que permite una mayor homogeneidad de la concentración de la sustancia a evaluar en el medio de ensayo. El DMSO empleado como disolvente no interfiere en el ensayo de dilución. Por estas características, la técnica de dilución se utilizó para el estudio de los aceites que se seleccionaron como promisorios.

En el campo alimentario se están dando pasos para la incorporación de los aceites esenciales en el tratamiento de patógenos capaces de provocar ETAs. Estos productos naturales se han evaluado en carnes, leche, vegetales, frutas y jugos (8,38). Componentes como trans-cinamaldehído, carvacrol, eugenol y el ácido 2,4 dihidroxibenzoico reducen las poblaciones de *Salmonella* spp. en tomates cuando se introducen en el agua de lavado (39), y la presencia de

alguno(s) de ellos en los aceites bioactivos estudiados pudiera asociarse al efecto observado. Aunque en Cuba se han realizado estudios de actividad antibacteriana de aceites esenciales, los trabajos consultados no abordan directamente su introducción en los modelos alimentarios, tema que deberá ser objeto de otros estudios.

Los aceites esenciales de *O. gratissimum*, *L. graveolens* y *T. vulgaris* de origen cubano mostraron actividad antibacteriana sobre cepas de *Salmonella enterica*, incluso sobre cepas resistentes a antibióticos  $\beta$  lactámicos. Este resultado constituye un criterio importante para la selección en la etapa inicial de investigación y continuar su desarrollo hasta la posible obtención de un producto antibacteriano para combatir la salmonelosis. La compleja composición química de estos aceites aumenta sus posibilidades de tener varios modos de acción y, por tanto, disminuir el peligro de aparición de resistencia en los organismos diana, elementos importantes para la obtención de antimicrobianos competitivos en el mercado.

### AGRADECIMIENTOS

Se agradece la disposición y la colaboración de los laboratorios de Bacteriología Animal, CENLAC y del Laboratorio de Microbiología de Control de la Calidad del CENSA, en especial a la Dra. Amalia Núñez Drake por facilitarnos los medios de cultivo. Además, se agradece a la Dra. C. Ileana Miranda Cabrera por su apoyo en el análisis estadístico y al trabajo técnico realizado por Cecil González en la extracción de los aceites esenciales.

### REFERENCIAS

1. OMS. Estimaciones de la OMS sobre la carga mundial de enfermedades de transmisión alimentaria. World Health Organization. 2015;14.
2. EFSA-ECDC. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. 2017.
3. CDC. Salmonella. [cdc.gov/salmonella](http://cdc.gov/salmonella). Atlanta, Georgia, USA. 2016.
4. Mendes-Guerra MM, de Almeida AM, Willingham AL. An overview of food safety and bacterial foodborne zoonoses in food production animals in the Caribbean region. *Trop Anim Health Prod*. 2016;48(6):1095-1098.
5. Boore AL, Hoekstra RM, Iwamoto M, Fields PI, Bishop RD, Swerdlow DL. Salmonella enterica infections in the United States and assessment of coefficients of variation: A Novel approach to identify epidemiologic characteristics of individual serotypes, 1996-2011. *PLoS One*. 2015;10(12):1-11.
6. Dougnon TV, Boris L, Deuguenon E, Hounmanou G, Agbankpe J, Amadou A, et al. Pathogenicity, Epidemiology and Virulence Factors of Salmonella species: A Review. *Not Sci Biol*. 2017;9(4):460.
7. Uzzau S, Brown DJ, Wallis T, Rubino S, Leori G, Bernard S, et al. Host adapted serotypes of Salmonella enterica. *Epidemiol Infect*. 2000;125(2):229-255.
8. Bajpai VK, Baek KH, Kang SC. Control of Salmonella in foods by using essential oils: A review. *Food Research International*. 2012.
9. Schikora A, Carreri A, Charpentier E, Hirt H. The dark side of the salad: Salmonella typhimurium overcomes the innate immune response of Arabidopsis thaliana and shows an endopathogenic lifestyle. *PLoS One*. 2008;3(5).
10. Cardoen S, Van Huffel X, Berkvens D, Quoilin S, Ducoffre G, Saegerman C, et al. Evidence-based semiquantitative methodology for prioritization of foodborne zoonoses. *Foodborne Pathog Dis*. 2009;6:1083-1096.
11. Doyle M, Acheson D, Newland J, Dwelle T, Flynn W, Scott HM, et al. Enhancing practitioner knowledge about antibiotic resistance: connecting human and animal health. *Food Prot Trends*. 2016;36:390-394.
12. Morganti M, Bolzoni L, Pongolini S, Scaltriti E, Casadei G, Carra E, et al. Rise and fall of outbreak-specific clone inside endemic pulsotype of Salmonella 4,[5],12:i:-; insights from high-resolution molecular surveillance in Emilia-Romagna, Italy, 2012 to 2015. *Eurosurveillance*. 2018; Special ed:42-52.

13. Smith RA, Nkuchia MM, Read AF, Smith RA, Nkuchia MM, Read AF, et al. Antibiotic Resistance?: a primer and call to action. *Health Commun.* 2015;30(2):203-208.
14. Sonali M, Corona R, Granda AE, Felipe L, Bonachea H. Resistencia antimicrobiana en cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* aisladas en carnes de aves importadas. 2012;34(2):120-126.
15. Puig-Peña Y, Espino-Hernández M, Leyva-Castillo V. Resistencia antimicrobiana en *Salmonella* y *E. coli* aisladas de alimentos: revisión de la literatura. *Panor Cuba y Salud.* 2011;6(1):30-38.
16. Puig-Peña Y, Espino-Hernández M, Leyva-Castillo V, Aportela-López N, Machín-Díaz M, Soto-Rodríguez P. Serovariedades y patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos de cepas de *Salmonella* aisladas de alimentos en Cuba. *Rev Panam Salud Publica.* 2011;30(6):561-565.
17. Preedy VR. *Essential Oils in Food.* 2016.
18. Miladi H, Zmantar T, Kouidhi B, Chaabouni Y, Mahdouani K, Bakhrouf A, et al. Use of carvacrol, thymol, and eugenol for biofilm eradication and resistance modifying susceptibility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains to nalidixic acid. *Microbial Pathogenesis.* 2017; 104:56-63.
19. Swamy MK, Akhtar MS, Sinniah UR. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2016. p. 21.
20. Santos AS, Alves S de M, Figueiredo FJC, Da Rocha Neto OG, Figueirêdo FJC, Neto OG da R. Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. *Ministério da Agric Pecuária e Abast.* 2004; (91):1-6.
21. Pino O, Sánchez Y, Rojas MM, Abreu Y, Correa TM. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Pimpinella anisum* L. *Rev Protección Veg.* 2012;27(3):181-187.
22. CSLI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. In: 26th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2016.
23. Mazzarrino G, Paparella A, Chaves-López C, Faberi A, Sergi M, Sigismondi C, et al. *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* inactivation dynamics after treatment with selected essential oils. *Food Control.* 2015;50:794-803.
24. Teixeira B, Marques A, Ramos C, Neng NR, Nogueira JMF, Saraiva JA, et al. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Ind Crops Prod.* 2013;43:587-595.
25. Akdemir Evrendilek G. Empirical prediction and validation of antibacterial inhibitory effects of various plant essential oils on common pathogenic bacteria. *Int J Food Microbiol.* 2015;202:35-41.
26. Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian J Microbiol.* 2004;35(4):275-280.
27. Caballero S, Lira J, Rafael, Verbenaceae HBK(. Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lippia graveolens*. 2009;8(84):295-300.
28. CLSI. M100 Performance Standards for Antimicrobial. 28th Editi. 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA: Clinical and Laboratory Standas Institute. 2018.
29. Álvarez-Hernández DA, Garza-Mayén GS, Vázquez-López R. Quinolonas. Perspectivas actuales y mecanismos de resistencia. *Rev Chil Infectol.* 2015;32(5):499-504.
30. Svampa ML. Notas sobre La promesa en el pensamiento de Friedrich Nietzsche y Hannah Arendt. *Top.* 2014;(46):75-93.
31. Bajpai VK, Baek K-H, Kang SC. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. *Food Res Int.* 2012;45:722-34.
32. Roldán LP, Díaz GJ, Durringer JM. Composition and antibacterial activity of

- essential oils obtained from plants of the Lamiaceae family against pathogenic and beneficial bacteria. *Rev Colomb Cienc Pecu (Revista Colombna Ciencias Pecu )*. 2010;23:451-61.
33. Rojas Fernández I MM, López MC, Sánchez Pérez Y, Brito I D, Montes De Oca I R, Martínez I Y, et al. Actividad antibacteriana de aceites esenciales sobre *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. *Rev Protección Veg*. 2014;29(3):197-203.
34. Calo JR, Crandall PG, O'Bryan CA, Ricke SC. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. *Food Control*. 2015.
35. Langeveld WT, Veldhuizen EJA, Burt SA. Synergy between essential oil components and antibiotics: A review. *Crit Rev Microbiol*. 2014;40(1):76-94.
36. Saad NY, Muller CD, Lobstein A. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour Fragr J*. 2013;28(5):269-279.
37. Pauli A, Schilcher H. In vitro antimicrobial activities of essential oils monographed in the european pharmacopoeia 8th edition. In: *Handbook of Essential Oils*. 2015.
38. Tornuk F, Yilmaz MT, Ozturk I, Sagdic O, Arici M, Durak MZ, et al. Multiple response optimization of the effect of thyme essential oil against *Listeria monocytogenes* in ground meat at different times and temperatures. *Med Weter*. 2016;72(7):435-447.
39. Mattson TE, Johnny AK, Amalaradjou MAR, More K, Schreiber DT, Patel J, et al. Inactivation of *Salmonella* spp. on tomatoes by plant molecules. *Int J Food Microbiol*. 2011;144(3):464-468.

Los autores de este trabajo declaran no presentar conflicto de intereses.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

La mención de marcas comerciales de equipos, instrumentos o materiales específicos obedece a propósitos de identificación, no existiendo ningún compromiso promocional con relación a los mismos, ni por los autores ni por el editor.