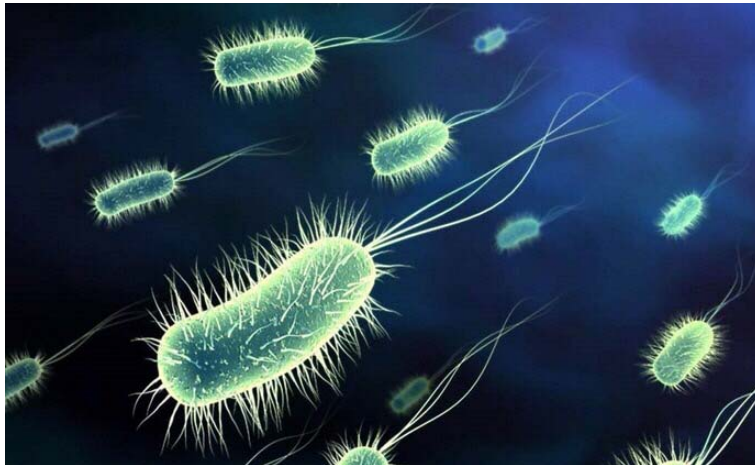


TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

APLICACIÓN DE ACEITES ESENCIALES PARA EL CONTROL DE *Salmonella* Typhimurium AISLADA DE CASOS CLÍNICOS EN DIFERENTES ESPECIES ANIMALES



Presentado por

ANA LUCIA SOLARTE PORTILLA
Master en Medicina, Sanidad y Mejora Animal
2015

DÑA. BELÉN HUERTA LORENZO

Profesora Contratada Doctor del Departamento de Sanidad Animal
Universidad de Córdoba

INFORMA:

Que el trabajo que presenta la Médica Veterinaria, Dña. Ana Lucia Solarte Portilla, con el título “Aplicación de aceites esenciales para el control de *Salmonella* Typhimurium aislada de casos clínicos en diferentes especies animales”, como requisito para la obtención del Master en Medicina, Sanidad y Mejora Animal, ha sido realizado en los laboratorios del Departamento de Sanidad Animal, bajo mi dirección y asesoramiento. Una vez redactado el presente trabajo, ha sido revisado, reuniendo a mi juicio todos los requisitos necesarios para su lectura y defensa ante tribunal. Para que conste se expide el presente informe.

Córdoba, a 3 de julio de 2015

Fdo.: Belén Huerta Lorenzo

AGRADECIMIENTOS

Llegué a la Madre Patria con grandes esperanzas e ilusiones, tan grandes como la distancia que me separa de mi querida Colombia. Con incertidumbres pero con fe en Dios asumí el reto de aprender y él con su infinito amor, puso en mi camino personas maravillosas que con sus cualidades han aportado para que esta experiencia sea trascendental para mi vida; por eso, hoy puedo decir con una sonrisa dibujada en mi rostro que todo ha “merecido la pena” y por eso, con aprecio y admiración aprovecho estas líneas para agradecer de corazón todo lo que han hecho.

A la Dra. Belén Huerta Lorenzo, por su invaluable apoyo, por su vocación de servicio y de enseñanza, por hacerme mejor profesional y mejor persona. Gracias por las horas dedicadas a este trabajo y sobre todo gracias por estar pendiente de mí y de mi familia.

Al Dr. Rafael Astorga, que con paciencia ha estado dispuesto a resolver mis dudas, y con la mayor voluntad me ha guiado en cada paso de este proyecto, sus enseñanzas y su apoyo han sido esenciales para mi formación.

A los Dres. Carmen Tarradas Iglesias, Alfonso Maldonado García e Inmaculada Luque Moreno, por forjar mi gusto y vocación por el fascinante mundo de la sanidad animal, por hacerme sentir como un miembro más de su Grupo de Investigación y sobre todo por “creer en mí”, mi admiración y gratitud para ustedes.

Agradecimientos sinceros a mis compañeros del Master con quienes día a día he aprendido que el trabajo en equipo es la mejor estrategia para crear ciencia y calidez humana; por hacer con su alegría y motivación tan amenas las horas de trabajo. A Belén, por brindarme además de su amistad, sus conocimientos y sus valiosos consejos; a Ángela por contagiarme con su carisma y brindar siempre una sonrisa, por ofrecerme su apoyo incondicional y a mi amiga Lidia por su amistad, su alegría contagiosa y su optimismo.

Un agradecimiento especial a mi madre quien a pesar de la distancia me acompaña con su amor y sus bendiciones, a ti gracias por enseñarme que con esfuerzo y dedicación todo es posible. A Luisa y a Mauricio los seres más importantes de mi vida, mis grandes amores, gracias por compartir conmigo esta aventura, por estar aquí cuando más los necesitaba, gracias por la paciencia, por su amor, gracias por sus palabras, sus silencios y por sobrellevar mis ausencias. Mi corazón siempre será suyo... Los amo!

ÍNDICE

	Pag.
RESUMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS	6
MATERIAL Y MÉTODOS	7
MATERIAL	7
Aislamientos bacterianos	7
Aceites esenciales	9
MÉTODOS	10
Preparación del inóculo	10
Método de difusión por discos	11
Método de microdilución en caldo	11
Análisis estadístico	12
RESULTADOS	13
DISCUSIÓN	18
CONCLUSIONES	21
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

**APLICACIÓN DE ACEITES ESENCIALES PARA EL CONTROL DE
Salmonella Typhimurium AISLADA DE CASOS CLÍNICOS EN DIFERENTES
ESPECIES ANIMALES**

RESUMEN

Los animales de abasto constituyen el principal reservorio de bacterias resistentes para el hombre a través del contacto directo y el consumo de alimentos. La creciente inquietud por la seguridad alimentaria “desde la granja a la mesa” ha llevado a la búsqueda de nuevas alternativas para el control de los microorganismos implicados en toxi-infecciones alimentarias, como salmonela. El presente es un ensayo *in vitro* de la actividad antimicrobiana de diez aceites esenciales frente a 23 cepas de *S. Typhimurium*, aisladas de casos clínicos en distintas especies animales. En el estudio inicial de cribado, realizado con el *Test de difusión por discos* frente a diez de las cepas, se determinó la ausencia de actividad del aceite de naranja y se seleccionaron los aceites de tomillo rojo, orégano, tomillo vulgar, clavo y canela para el estudio cuantitativo (\varnothing halo de inhibición 15,07-20,87mm). Por *Microdilución en caldo* se valoró la actividad inhibidora (CMI) y bactericida (CMB) frente al total de cepas del estudio, obteniendo los mejores resultados con el orégano, tomillo rojo y tomillo vulgar (CMIs 0,048-0,126% y CMBs 0,060-0,156%). Adicionalmente, para determinar la potencia microcida se estimó el índice CMB/CMI, encontrando en todos los casos valores muy próximos a la unidad, lo que demuestra la capacidad de estos aceites para inhibir y destruir la bacteria con una misma concentración. En ambos test de ensayo se observaron diferencias en la sensibilidad de las cepas a un mismo aceite, por lo que se calculó la CMI₅₀, CMI₉₀, CMB₅₀ y CMB₉₀, y sus respectivos índices. Destacar la capacidad del orégano para inhibir y destruir el 50% y el 90% de las cepas estudiadas a una concentración del 0,03% y 0,06%, respectivamente (CMB₅₀/CMI₅₀ y CMB₉₀/CMI₉₀ = 1). Finalmente, no se hallaron diferencias significativas entre los aislamientos sensibles y resistentes a los antimicrobianos.

Palabras claves: Aceites esenciales, *Salmonella Typhimurium*, actividad antimicrobiana, casos clínicos.

USE OF ESSENTIAL OILS TO CONTROL *Salmonella* Typhimurium FROM CLINICAL CASES IN DIFFERENT ANIMAL SPECIES

SUMMARY

Livestock are the main reservoir of resistant bacteria that may infect humans by means of direct contact and food consumption. The increasing concern about food safety "*from farm to table*" has led to the research of new alternatives in the control of microorganisms involved in food-borne infections such as *Salmonella*. This *in vitro* study has been designed to determine the antimicrobial activity of ten essential oils against 23 *S. Typhimurium* strains, isolated from different animal clinical cases. The initial screening study, conducted following the *disk diffusion test* against ten of the strains, showed the lack of activity of orange oil, whereas red thyme, oregano, common thyme, clove and cinnamon oils were selected for the quantitative study (\varnothing inhibition halo 15.07-20.87 mm). By the *Broth microdilution test*, inhibitory (MIC) and bactericidal (MBC) activities of selected oils were assessed against the total of strains under study, showing oregano, red thyme and common thyme the best results (MICs from 0.048% to 0.126% and MBCs from 0.060% to 0.156%). Additionally, to determine the microcidal power, MBC/MIC ratio was estimated, which resulted in all cases very close to unity value. This demonstrates the ability of these oils to inhibit and destroy the bacteria at the same concentration. In both tests, differences in strains sensitivity to the same oil were observed, so MIC₅₀, MIC₉₀, MBC₅₀ and MBC₉₀, and their rates were calculated. It stands out the oregano ability to inhibit and kill 50% and 90% of the studied strains at a concentration of 0.03% and 0.06%, respectively (MBC₅₀/MIC₅₀ and MBC₉₀/MIC₉₀ = 1). Finally, no significant differences between sensitive and resistant antimicrobial isolates were found.

Keywords: Essential oils, *Salmonella* Typhimurium, antimicrobial activity, clinical cases

INTRODUCCIÓN

El género *Salmonella*, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, está formado por un grupo homogéneo de bacilos gram negativos, móviles, no formadores de esporas, capaces de multiplicarse a temperaturas entre 7 °C y 45 °C y persistir durante meses sobre substratos orgánicos (Coma, 2001). En base a los estudios de ADN, se distinguen en el género dos especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella entérica*, esta última dividida a su vez en seis subespecies: *enterica*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *indica* y *salamae* (Caffer y Terragno, 2001; Echeita *et al.*, 2011). Los serotipos de *S. enterica* subsp. *enterica* tienen nombre propio, como *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* (Popoff *et al.*, 2003).

Estos microorganismos se hallan ampliamente distribuidos en la naturaleza abarcando un amplio rango de huéspedes, incluido el hombre, en los cuales producen un amplio espectro de enfermedades (Parra *et al.*, 2002; Luz *et al.*, 2014). La mayoría de los serotipos no son patógenos en su hospedador animal natural, lo que significa que estos animales permanecen como portadores asintomáticos que eliminan la bacteria en las heces durante mucho tiempo (Vadillo *et al.*, 2002).

Las toxiinfecciones alimentarias producidas por el género *Salmonella* representan uno de los principales problemas de salud pública en todo el mundo. (Peñalver *et al.*, 2005) La gran mayoría de estos procesos aparecen asociados al consumo de productos aviares contaminados con *S. Enteritidis*, si bien, en las últimas décadas se ha detectado un aumento de la frecuencia y gravedad de las infecciones producidas por el serotipo Typhimurium de origen aviar y porcino (Calvert *et al.*, 1998; Luz *et al.*, 2014). Las últimas investigaciones indican, además, que el contacto del hombre con animales, principalmente de compañía y pequeños roedores como el cobaya (*Cavia porcellus*), se considera un importante modo de transmisión que debe tenerse presente en la lucha contra la Salmonelosis (Bartholomew *et al.*, 2014).

La principal estrategia para el control de esta infección consiste en la administración de antibióticos que, si bien pueden producir la curación clínica, raramente evitan el estado de portador. Por ello tras el primer brote de salmonelosis, excepto si se instaura un plan de erradicación, es fácil que la infección se perpetúe en los lotes de engorde con una proporción elevada de animales portadores, y el consiguiente riesgo de contaminación de las canales o de los productos cárnicos destinados al consumo humano (Rautiainen *et al.*, 2002). En el año 2003, la

Unión Europea publicaba un Reglamento específico (2160/2003) que promovía sistemas de control que abarcasen toda la cadena alimentaria y destacaba el problema de las multirresistencias bacterianas, asociado por muchos autores al uso inadecuado de los antimicrobianos en medicina veterinaria (Gebreyes *et al.*, 2000; Huerta *et al.*, 2005; Martínez, 2014). Como consecuencia, en 2006, se prohibía el uso de los antimicrobianos como promotores del crecimiento animal (Reglamento 1831/2003) y comenzaba la búsqueda de nuevos antimicrobianos entre los ácidos orgánicos y los aceites esenciales (Manzanilla *et al.*, 2004; Dubois-Brissonnet *et al.*, 2011)

Los aceites esenciales son sustancias olorosas producidas en el metabolismo secundario de las plantas aromáticas y almacenadas en distintos órganos de la planta, que se obtienen mediante destilación o expresión del material vegetal (Crop, 2001; Mith *et al.*, 2014). En su composición (quimiotipo) pueden intervenir varios compuestos de aromas volátiles, como hidrocarburos (terpenos), alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, éteres y fenoles, variando en función del grado de madurez de la planta, su origen geográfico (temperatura, característica del terreno, fertilizantes, etc.), el órgano, el método de extracción, etc. (Oladimeji *et al.*, 2001; Lahlou y Berrada, 2003; Martínez, 2014).

Si bien los compuestos mayoritarios de los aceites pueden constituir hasta un 85% del total, debido al efecto sinérgico de los componentes presentes en trazas el aceite esencial en su totalidad tiene mayor actividad que sus principales principios activos (Bauer *et al.*, 2001; Burt, 2004). De igual modo, debido a su complejidad química es muy probable que el efecto antimicrobiano sea debido a la acción combinada de varios mecanismos sobre distintas localizaciones de la célula (Skandamis *et al.*, 2001; Carson *et al.*, 2002; Rota *et al.*, 2004; Said *et al.*, 2015).

Las propiedades medicinales de los aceites esenciales han sido destacadas y utilizadas de forma empírica por el hombre desde la antigüedad, si bien, es en las últimas décadas cuando se han incrementado las investigaciones sobre sus propiedades farmacológicas y antimicrobianas (Rota *et al.*, 2004; Tiwari *et al.*, 2005; Martínez 2014). Los trabajos desarrollados han demostrado, en general, una notable sensibilidad a los aceites esenciales, así como una reducción considerable de las dosis de algunos antibióticos si se usan combinados con aceites (Palaniappan y Holley, 2010; Becerril *et al.*, 2012; Yap *et al.*, 2014). Sin embargo, y a diferencia de los antibióticos, no existe un protocolo estandarizado para el estudio *in vitro* de los aceites esenciales

que permita comparar los resultados, establecer puntos de corte entre sensibilidad y resistencia y determinar la dosis adecuada de prescripción (Ross *et al.*, 2001; Peinado *et al.*, 2012).

En general, la mayoría de autores toman como referencia para el estudio de los aceites los métodos estandarizados por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* para el desarrollo de pruebas con bacterias de origen animal (CLSI, 2009). El *Test de difusión por disco*, es utilizado habitualmente como prueba de screening, (Dorman y Deans, 2000; Burt, 2004; Silva *et al.*, 2013; Fratini *et al.*, 2014), si bien encontramos notables diferencias en la bibliografía con respecto al volumen de aceite dispensado en los discos (2-50 μ l) y la concentración del inóculo (10^5 - 10^{10} UFC/ml) (Maguna *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2011; Luz *et al.* 2014; Mith *et al.*, 2014; Apolónio *et al.*, 2014). En nuestros trabajos previos comprobamos además que algunos aceites son capaces de enmascarar la actividad de otros aceites como consecuencia de la inhibición completa del inóculo por sus componentes volátiles y que, según la viscosidad del aceite, la cantidad final absorbida por el disco podía ser diferente. Recomendamos por ello, ensayar un único aceite por placa de agar en un volumen de 30 μ l por disco (Huerta *et al.*, 2014).

Los métodos seguidos para cuantificar la actividad de los aceites suelen ser la *difusión por disco* o la *dilución en caldo*, encontrando igualmente diferencias en el volumen de aceite por disco, la concentración final del inóculo (10^5 - 10^8 UFC/ml) y la adición al diluyente de sustancias emulsionantes (Silva *et al.*, 2013; Fratini *et al.*, 2014; Huerta *et al.*, 2014). La reproducibilidad de estos métodos de dilución es sólo adecuada (Kappa 0,61-0,78), debido probablemente a la dificultad para diluir los aceites en el caldo (Gutiérrez, 2006), por lo que habitualmente en cada prueba se realizan dos o más ensayos. A todos estos factores debemos unir la variabilidad observada en la actividad de un mismo aceite como consecuencia de diferencias en su composición química, asociadas al origen, época de recolección, método de extracción, etc. (Oladimeji *et al.*, 2001; Lahlou y Berrada, 2003).

La mayoría de estudios realizados con aceites se limitan a determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para una cepa de referencia o un número reducido de aislamientos clínicos. En estas circunstancias, la CMI, definida como la menor concentración de antimicrobiano que previene el crecimiento visible de microorganismos tras 18-24 horas de incubación, proporcionaría una idea de la concentración que es necesario superar en el lugar de la infección para inhibir estos aislamientos (Griffin *et al.*, 2000; Becerril *et al.*, 2012). Sin embargo, y a diferencia de los antibióticos, no se han realizado a penas estudios para determinar

la distribución de la sensibilidad en las poblaciones bacterianas (MacGowan y Wise, 2001; FAO, 2004; CLSI, 2009). Estos ensayos, realizados con 50-500 aislamientos de campo, permitirían además establecer la CMI₅₀ y la CMI₉₀, determinadas como la menor concentración de producto capaz de inhibir el crecimiento del 50% y del 90% de los aislamientos de campo estudiados (Silveira *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2013).

Otro parámetro que puede ayudar a valorar la actividad de una sustancia, raramente estimado para los aceites esenciales, es la Concentración Mínima Bactericida (CMB), definida como la menor concentración que reduce la población inicial de colonias viables en un 99,9%, después de una incubación de 18-24 horas en caldo de cultivo (Grau *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2012). La relación entre la CMB y la CMI nos permite valorar la potencia de un antimicrobiano, de forma que cuanto más se acercan los dos valores mayor es el efecto microcida. Es de suponer que en los antibióticos bactericidas, la CMI no difiera mucho de la CMB, variando habitualmente en una o dos diluciones (Grau *et al.*, 2005; Schwarz *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2013).

En el caso de *Salmonella* spp., los numerosos estudios realizados han puesto de manifiesto el potencial antimicrobiano de algunos aceites, si bien la cantidad de cepas ensayadas es en muchos casos reducido y se han observado variaciones en la CMI entre aislamientos y serotipos (Ross *et al.*, 2001; Huerta *et al.*, 2004; Peñalver *et al.*, 2005).

El principal objetivo de este TFM era valorar la actividad antimicrobiana *in vitro* de diez aceites esenciales frente a cepas clínicas de *Salmonella* Typhimurium a fin de hallar un aceite potencialmente activo para su posterior estudio *in vivo*. Para cumplir este objetivo general se plantearon **tres objetivos específicos**:

1. Estudio cualitativo de diez aceites esenciales mediante el *Test de difusión por discos* y selección de los aceites para el estudio cuantitativo.
2. Valoración de la actividad inhibitoria (CMI) y bactericida (CMB) de los aceites seleccionados, y de su posible variación en función del perfil antimicrobiano de las cepas.
3. Estudio preliminar de la distribución de la sensibilidad bacteriana a los aceites esenciales: determinación de la CMI₅₀, CMI₉₀, CMB₅₀ y CMB₉₀.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL DE ESTUDIO

Aislamientos bacterianos

En el presente trabajo se utilizaron 22 aislamientos de *Salmonella* Typhimurium de la Colección de Cultivos del Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de Córdoba, aislados entre 1997 y 2006 a partir de casos clínicos en distintas especies animales. El aislamiento, serotipificación, fagotipificación y perfil de resistencia antimicrobiana se realizó según recomendaciones del Laboratorio Nacional de Referencia de *Salmonella* y *Shigella* (LNRSE, Madrid-España), utilizando los bacteriófagos específicos suministrados por el Laboratorio Internacional de Referencia de Fagotipia en *Salmonellas* (Colindale, Londres-Reino Unido) (Astorga *et al.*, 2002; 2005). Todos los aislamientos se conservaron hasta su utilización a -20 °C en criobolas (Criobank™, Londres-Reino Unido).

Para el estudio preliminar se seleccionaron al azar 10 de las 22 cepas de *S. Typhimurium* (Tabla 1), mientras que el estudio cuantitativo se realizó con el total de aislamientos. Como control de calidad, se incluyó en todos los ensayos una cepa de *S. Typhimurium* de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT 7162), aislada por nuestro Grupo de Investigación y utilizada en numerosos ensayos por su comportamiento homogéneo con la mayoría de aceites esenciales (Tabla 1).

En la Tabla 2 se describe el perfil de resistencia de las 22 cepas utilizadas en el estudio y la cepa control frente a Enrofloxacina (5 µg), Ampicilina (10 µg), Trimetoprim Sulfametoxazol (25 µg), Gentamicina (10 µg), Cefalexina (30 µg), Cloranfenicol (30 µg), Estreptomina (10 µg), Sulfonamida (300 µg) y Tetraciclina (30 µg) (Oxoid Ltd., Hampshire-Reino Unido).

Tabla 1. Descripción de los aislamientos bacterianos de *S. Typhimurium* utilizados en el presente trabajo.

No. Cepa	Ref.	Especie	Patología	Origen	Fagotipo
1	697/98	conejo	síndrome digestivo	ciego	104b
2	698/98	caballo	síndrome digestivo	heces	104b
3	13/00	perdiz	muerte aguda	macerado	U-302
4	13/00	perdiz	muerte aguda	huevos	U-302
5	503/04	potro	artritis	L. sinovial	PNR*
6	504/04	potro	artritis	L. sinovial	PNR
7	631/03	potro	síndrome digestivo	heces	15a
8	171/04	yegua	endometritis	vagina	U302
9	733/02	perdiz	tiflitis	ciego	204a
10	397/02	perdiz	síndrome digestivo	A. digestivo	204c
11	25/00	canario	síndrome digestivo	A. digestivo	40
12	25/00	canario	síndrome digestivo	heces	40
13	168/04	cerdo	septicemia	pulmón	U302
14	510/04	perdiz	muerte aguda	macerado	193
15	151/05	lechón	enteritis	I. delgado	ND
16	173/05	lechón	enteritis	I. delgado	ND
17	590/05	lechón	síndrome digestivo	I. grueso	ND
18	148/06	perdiz	tiflitis	ciego	ND
19	148/06	perdiz	tiflitis	bazo	ND
20	148/06	perdiz	tiflitis	hígado	ND
21	592/06	cerdo	enteritis	I. delgado	ND
22	770/99	cerdo	síndrome digestivo	A. digestivo	PNR
CECT 7162	860/03	cerdo	síndrome digestivo	heces	U302

* PNR: Patrón No Reconocido; ND: No Determinado.

Tabla 2. Perfil de resistencia de los aislamientos de *S. Typhimurium* utilizados en este estudio, incluida la cepa control.

Perfil de resistencia antimicrobiana	<i>S. Typhimurium</i> (n=23)
Susceptibles a todos los antimicrobianos	4 (17,4%)
Resistente a ≥ 1 antimicrobianos	19 (82,6%)
CS	1
SSu	1
SSxT	1
TCf	1
ACSSu	2
ACSSuT	2
ASSuG	1
ASSuT	3
ASSxTT	1
ASuSxTT	1
ACSSuTCf	2
ASSuSxTT	1
ACSSxTTCf	1
ACSSxTTGEn	1

A: Ampicilina; C: Cloranfenicol; S: Estreptomina; Su: Sulfonamida; T: Tetraciclina; SxT: Trimetoprim-Sulfametoxazol; En: Enrofloxacina; G: Gentamicina; Cf: Cefalexina.

Aceites Esenciales

El ensayo se realizó con 10 aceites esenciales de origen natural, proporcionados por un único fabricante (Aromium, Barcelona, España) que garantizó una pureza del 100%. Los aceites fueron seleccionados en base a los estudios previos de nuestro Grupo de Investigación con enterobacterias y a los resultados obtenidos por otros autores (Huerta *et al.*, 2004; Peñalver *et al.*, 2005; Gutiérrez, 2006; Soković *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2013).

En la Tabla 3 se relacionan los aceites esenciales utilizados en este trabajo con sus principales componentes activos, nombre científico y nombre común.

Tabla 3. Relación de aceites esenciales utilizados en este trabajo.

No.	Nombre común	Nombre científico	Principales componentes activos
1	Ajo	<i>Allium sativum L.</i>	Dialil trisulfuro, dialil disulfuro
2	Canela (corteza)	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Cinamaldehido
3	Clavo (especia)	<i>Eugenia caryophyllata</i>	<i>Origen Indonesia:</i> Eugenol, acetato de eugenilo
4	Estragón	<i>Artemisa dracunculus</i>	Cavicol, β -ocimeno
5	Menta	<i>Mentha piperita</i>	Mentol, mentona, 1.8-cineol
6	Naranja	<i>Citrus sinensis</i>	D-limoneno, mirceno
7	Orégano vulgar	<i>Oreganum vulgare</i>	Timol, Carvacrol
8	Romero	<i>Rosmarinus officinalis</i>	* <i>Qt. alcanfor:</i> alcanfor, 1.8 cineol, a-pineno
9	Tomillo vulgar	<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Qt. timol:</i> Timol, p-cimeno, linalol, 1.8 cineol, carvacrol
10	Tomillo rojo	<i>Thymus zygis</i>	<i>Q. timol:</i> Timol, p-cimeno, g-terpineno, linalol

* *Qt.*: quimiotipo.

2. MÉTODOS

Preparación del inóculo

Previamente al inicio del ensayo se procedió a recuperar la cepa problema en agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) y en agar Tripticasa Soja (TSA) (Oxoid Ltd.) a partir de criobolas a menos 20 °C (Criobank™).

Siguiendo las normas del CLSI (2009), para el ensayo de *difusión por disco* se preparó una suspensión bacteriana con $1,5 \times 10^8$ UFC/ml, diluyendo varias colonias de un cultivo puro de 24 horas en solución salina estéril (5 ml), hasta obtener una densidad óptica a 595 nm de 0,08-0,085 (0,5 McFarland).

A partir de esta suspensión bacteriana, se preparó el inóculo con 10^6 UFC/ml para el ensayo de *microdilución en caldo*, añadiendo 100 μ l de la suspensión inicial en 9,9 ml de caldo Mueller-Hinton (MH) (Oxoid Ltd.). Ambos inóculos se utilizaron en los 15 minutos siguientes a su preparación.

Método de difusión por disco (test de Kirby-Bauer)

El estudio de cribado se realizó siguiendo el protocolo descrito por Huerta *et al.* (2014) para los ensayos con aceites esenciales, basado en las normas descritas por el CLSI (2009) con la única modificación de la cantidad de inóculo sembrada por placa.

Cada aceite se ensayó de forma individual en una placa de agar MH estéril de 5 cm de diámetro, inoculada con 30 μ l de suspensión bacteriana (1.5×10^8 UFC/ml). Sobre la placa se colocó un disco blanco estéril de 6 mm de diámetro (Oxoid Ltd), previamente impregnado con 15 μ l de aceite esencial puro. Las placas, selladas, se incubaron a 37 °C durante 24 horas y se determinó el diámetro del halo de inhibición (incluido el disco). Cada ensayo aceite-aislamiento se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como el halo medio de inhibición \pm desviación estándar (SD). Para mantener la similitud de las condiciones de ensayo, los diez aceites eran probados en el mismo día frente al mismo inóculo.

Como controles de calidad se incluyó la cepa CECT 7162 y el disco de enrofloxacin (5 μ g Oxoid, Ltd.). La correcta concentración del inóculo se comprobó en todos los casos mediante una prueba de recuento en placa.

Método de microdilución en caldo

De acuerdo con los resultados del test de Kirby-Bauer, se seleccionaron los cinco aceites con mayor halo de inhibición para la valoración de la CMI y la CMB.

Siguiendo el método recomendado por el CLSI (2009), la dilución de los aceites se realizó en tubos estériles de 15 ml. Se prepararon diluciones dobles seriadas en caldo MH (Oxoid Ltd.) en un rango del 32% al 0,0156% (v/v), de modo que la concentración final de aceite en el pocillo fuese del 16% al 0,0075% (v/v).

El ensayo se realizó en placas de microtitulación de 96 pocillos (Greiner Bio-one, Barcelona, España). Cada pareja aislamiento-aceite se probó por triplicado dispensando en cada pocillo 100 μ l de dilución de aceite y 100 μ l de inóculo bacteriano (10^6 UFC/ml), de forma que la concentración final de la bacteria en el pocillo fuese de 5×10^5 UFC/ml. Tras sellar las placas, se incubaron a 37 °C durante 24 horas. La CMI se determinó como la menor concentración de aceite capaz de inhibir el crecimiento visible de la bacteria en los pocillos. Para mantener la similitud de las condiciones de ensayo, los cinco aceites eran probados en el mismo día frente al mismo inóculo bacteriano.

En todos los ensayos se incluyó un control de crecimiento positivo (caldo inoculado sin aceite) y un control de crecimiento negativo (caldo sin aceite y sin inóculo). Como control de calidad se realizó un ensayo de la cepa problema frente a Enrofloxacin HPLC al 98% de pureza (Sigma Aldrich Co. LLC., St. Louis, EE.UU.) y un ensayo de la cepa tipo (CECT 7162) frente a cada aceite seleccionado.

Para determinar la CMB, se sembraron en agar MH 10 µl de los cuatro últimos pocillos sin crecimiento bacteriano visible. Se incubó a 37 °C durante 24 horas, y se calculó la CMB como la menor concentración de aceite capaz de destruir el 99,9% del inóculo presente en el pocillo, en base a la ausencia total de colonias en la placa de agar.

Análisis estadístico

Los cálculos estadísticos se realizaron con el Software SPSS 18.8 y la Hoja de Cálculo Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, USA).

Para todas las variables numéricas (halo de inhibición, CMI y CMB) se estableció el valor medio por aceite y cepa bacteriana, así como el valor medio final para *S. Typhimurium*. Mediante análisis de la varianza (ANOVA) y el Test de comparaciones múltiples de Tukey se determinó si existían diferencias significativas en función del aislamiento y del aceite ensayado ($P<0,05$). En base a los resultados del test de Tukey para la prueba de difusión por disco se seleccionaron los cinco aceites con mayor halo de inhibición para el estudio cuantitativo de la actividad antimicrobiana.

Se determinó el índice CMB/CMI para cada ensayo aceite-cepa, calculando a continuación la media por aislamiento y los valores finales frente a *S. Typhimurium*.

Posteriormente, se analizó la distribución de la sensibilidad de las 23 cepas a los aceites mediante estimación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida 50 y 90 (CMI₅₀ y 90, CMB₅₀ y 90).

Finalmente, mediante análisis de la varianza y el test de Tukey ($P<0,05$) se comparó la actividad antimicrobiana de los cinco aceites seleccionados en función del perfil de resistencia de los aislamientos estudiados.

RESULTADOS

Estudio preliminar de la capacidad inhibidora de diez aceites esenciales

Mediante la *Técnica de difusión por discos* se determinó el halo de inhibición de cada aceite frente a 10 de los 22 aislamientos clínicos y la cepa control, así como el halo final frente a *S. Typhimurium* (Anexo 1).

Para determinar si existían diferencias significativas en la sensibilidad de las cepas frente a un mismo aceite se compararon las medias obtenidas mediante el test ANOVA, observando que sólo en el caso de la naranja el comportamiento de los once aislamientos era semejante (Anexo 1 y Tabla 4). Para el resto de aceites, el test de Tukey permitió establecer varios grupos en base a las diferencias halladas en la sensibilidad de las cepas, agrupando en el mismo subconjunto aquellas con halos estadísticamente similares (Anexo 2). En el caso del ajo y el romero, sólo la cepa nº 2 mostró diferencia significativa con el resto de aislamientos, mientras que para el clavo, el tomillo vulgar y el orégano se encontraron al menos 4 cepas con diferente sensibilidad al mismo aceite. Se observó, asimismo, una tendencia de ciertas cepas a presentar distinta actividad que el resto para la mayoría de aceites ensayados; es el caso de las cepas nº 2 y 5 que mostraron para 6 de ellos el mayor y el menor halo de inhibición, respectivamente.

La selección de los mejores aceites para su estudio cuantitativo se realizó mediante comparación de los halos finales de inhibición obtenidos para *S. Typhimurium* mediante el test ANOVA y el test de Tukey. Considerando significativa una $P < 0.05$, el programa estadístico estableció cuatro grupos de aceites con diferente actividad inhibidora (Tabla 4 y Anexo 1). El grupo 1 incluyó los aceites sin actividad (\emptyset halo de inhibición = 6 mm), mientras que los grupos 2, 3 y 4 incluyeron los aceites que mostraron alguna actividad inhibidora, con diámetros de entre 8,00 y 20,87 mm.

De acuerdo con los valores obtenidos se seleccionaron los aceites de tomillo rojo, orégano, tomillo vulgar, canela y clavo.

Tabla 4. Grupos de aceites establecidos en base a su diferente actividad inhibidora, medida como el halo final de inhibición frente a *S. Typhimurium* (10 cepas clínicas y cepa control).

Grupo	Aceite esencial	Halo final de inhibición \pm SD	Rango de valores obtenidos
1	Naranja	$6 \pm 0,0$	[6,00 - 6,00]
	Ajo	$8 \pm 0,64$	[6,67 - 9,00]
2	Romero	$8,93 \pm 0,69$	[7,33 - 10,0]
	Estragón	$8,97 \pm 0,49$	[8,00 - 10,0]
	Menta	$9,27 \pm 0,91$	[7,67 - 10,0]
3	Canela	$15,07 \pm 0,58$	[14,33 - 16,00]
	Clavo	$15,43 \pm 0,73$	[14,33 - 16,33]
4	Tomillo vulgar	$19,50 \pm 1,40$	[16,67 - 22,00]
	Orégano	$20,60 \pm 1,97$	[18,00 - 25,67]
	Tomillo rojo	$20,87 \pm 1,63$	[18,33 - 24,00]

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB)

En el Anexo 3 se describen los resultados obtenidos en el *Test de microdilución en caldo* para la Concentración Mínima inhibitoria (CMI) de los cinco aceites estudiados frente a los 22 aislamientos clínicos y la cepa control. La comparación estadística de los valores obtenidos por aceite mostró en todos los casos diferencias significativas en la sensibilidad de algunas cepas, si bien en general, el comportamiento de los aislamientos frente a un mismo aceite fue bastante similar (Anexo 4). La variabilidad en la sensibilidad de las cepas fue máxima en el caso del tomillo vulgar, tomillo rojo y orégano, cuyas CMIs oscilaron entre 0,0204%-0,50% (Anexo 4), presentando de nuevo la cepa n° 2 la menor sensibilidad con todos los aceites.

En base a los valores finales de la CMI para *S. Typhimurium*, los aceites con mayor capacidad de inhibición fueron, el orégano, el tomillo rojo y el tomillo vulgar, para los cuales no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 5).

Tabla 5. Comparación de las CMI finales estimadas para cada aceite frente a *S. Typhimurium*. Subconjuntos homogéneos establecidos por el test de Tukey ($P < 0.05$).

Aceite	Subconjuntos homogéneos		
	3	2	1
	CMI final	CMI final	CMI final
Orégano	0,048699		
Tomillo rojo	0,051890		
Tomillo vulgar	0,062968		
Clavo		0,093299	
Canela			0,126812
Valor <i>P</i>	0,657	1,000	1,000

El estudio de la Concentración mínima bactericida mostró para la mayoría de cepas valores muy similares, e incluso idénticos, a su Concentración mínima inhibitoria, si bien, encontramos en todos los aceites cepas cuya CMB superaba significativamente la CMI, en dos y hasta en 4 diluciones (Anexo 5 y 6). La mayoría de estas cepas que presentaron un incremento en su CMB se comportaron de la misma manera con los cinco aceites (ej. cepas nº 2, 22 y CECT 7162), siendo el tomillo vulgar el aceite para el cual se observó un mayor número de cepas con diferencias en la CMB y la CMI.

Considerando los valores finales de la CMB para *S. Typhimurium*, los aceites con mayor actividad bactericida fueron el orégano, el tomillo rojo, el tomillo vulgar y el clavo ($P > 0.05$) (Tabla 6).

Tabla 6. Comparación de las CMB finales estimadas para cada aceite frente a *S. Typhimurium*. Subconjuntos homogéneos establecidos por el test de Tukey ($P < 0.05$).

Aceite	Subconjuntos homogéneos	
	2	1
	CMB final	CMB final
Orégano	0,060487	
Tomillo rojo	0,068190	
Tomillo vulgar	0,099194	
Clavo	0,112320	0,112320
Canela		0,156703
Valor <i>P</i>	0,082	0,188

Para determinar la potencia microcida de los aceites frente a *S. Typhimurium* se estimó el índice CMB/CMI a partir de los valores obtenidos para estos parámetros por ensayo y aislamiento (Anexo 7 y Tabla 7). Los valores más próximos a la unidad se obtuvieron para el orégano, el tomillo rojo y la canela, demostrando la capacidad de estos aceites para inhibir y destruir la bacteria a la misma concentración.

Tabla 7. Índice CMB/CMI obtenido para los aceites estudiados.

	Orégano	Tomillo rojo	Tomillo vulgar	Clavo	Canela
CMB/CMI	1,22 ± 0,58	1,22 ± 0,67	1,38 ± 0,61	1,26 ± 0,66	1,22 ± 0,56

El estudio de una muestra de 23 cepas de *S. Typhimurium* (incluida la cepa control) nos permitió, además, realizar una primera valoración de la distribución de la sensibilidad de esta población bacteriana a los aceites seleccionados. En la Gráfica 1 se representa el porcentaje acumulado de aislamientos inhibidos con cada una de las diluciones ensayadas por aceite. Como se aprecia en la Tabla 8, sólo el clavo y la canela lograron inhibir el 50% y el 90% de los aislamientos a la misma concentración de aceite (0,12%); resultado que fue superior en todos los casos a los valores mostrados por el orégano, tomillo rojo y tomillo vulgar (CMI₅₀ 0,03% y CMI₉₀ 0,06%).

Gráfica 1. CMI₅₀ y CMI₉₀ de los aceites esenciales seleccionados.

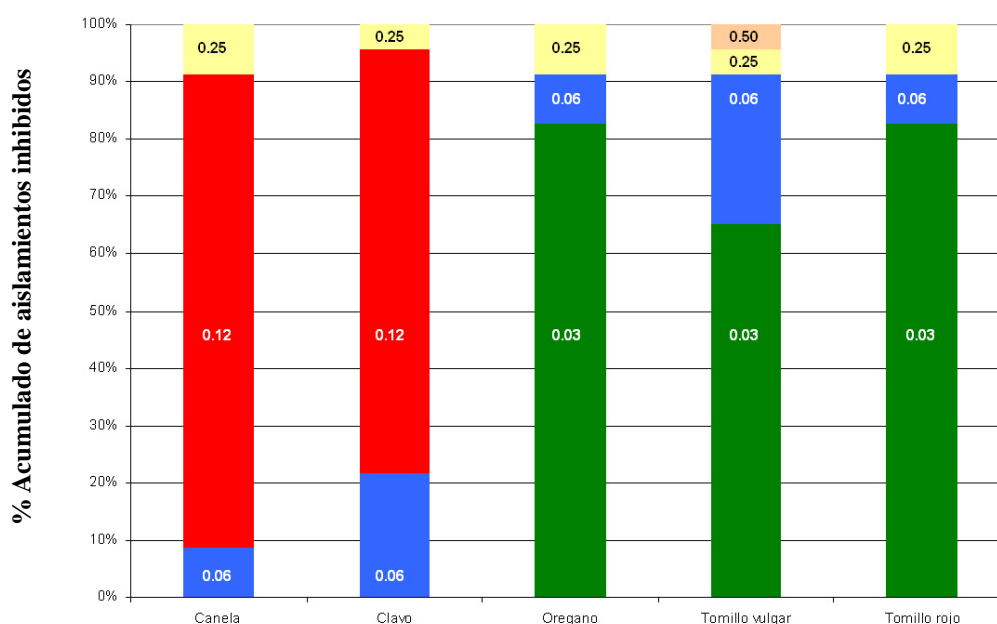
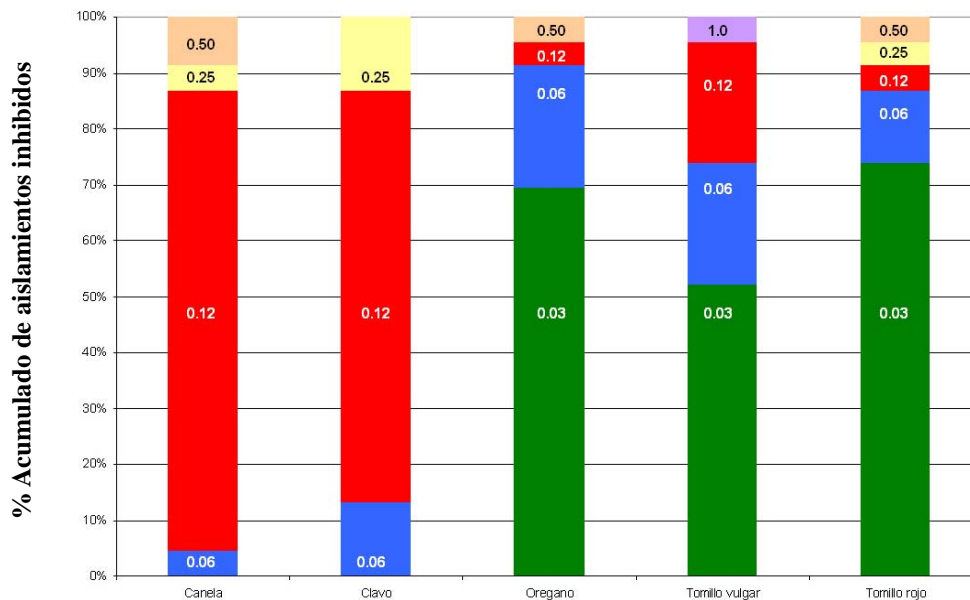


Tabla 8. Estimaciones obtenidas a partir de la CMI₅₀, CMI₉₀, CMB₅₀, CMB₉₀ de los cinco aceites seleccionados frente a las veintitrés (23) cepas de *S. Typhimurium* utilizadas en este trabajo.

Aceite esencial	CMI ₅₀	CMI ₉₀	CMB ₅₀	CMB ₉₀	$\frac{CMB_{50}}{CMI_{50}}$	$\frac{CMB_{90}}{CMI_{90}}$
Orégano	0,03	0,06	0,03	0,06	1	1
Tomillo rojo	0,03	0,06	0,03	0,12	1	2
Tomillo vulgar	0,03	0,06	0,03	0,12	1	2
Clavo	0,12	0,12	0,12	0,25	1	2
Canela	0,12	0,12	0,12	0,25	1	2

En la Gráfica 2 se representa la distribución de la CMB obtenida para los 23 aislamientos de nuestro estudio. Al igual que en la CMI, se observa diferencia entre la concentración de aceite necesaria para destruir el 50% y el 90% de las cepas, destacando los valores obtenidos para el orégano, que coinciden con los hallados para la CMI₅₀ y la CMI₉₀. Este hecho determinó que este aceite fuese el único en ofrecer un índice CMB/CMI para los valores 50 y 90, igual a 1.

Gráfica 2. CMB₅₀ y CMB₉₀ de los aceites esenciales seleccionados.



Finalmente para cumplir el último objetivo de nuestro trabajo, se comparó la actividad de estos cinco aceites (CMI y CMB) en función del perfil de resistencia de las cepas estudiadas no hallando en ningún caso diferencias significativas entre cepas sensibles, resistentes y multirresistentes ($P>0.05$).

DISCUSIÓN

La resistencia bacteriana es un grave problema asociado a múltiples causas, muchas de ellas inevitables, cuyo control requiere una actuación multidisciplinar. El riesgo más grande para la salud humana derivado de la utilización de los antibióticos en sanidad animal es la transferencia de bacterias resistentes de los animales al hombre o de genes portadores de resistencia entre las bacterias animales y humanas (FAO, 2004). Esta inquietud por la seguridad alimentaria de la “*granja a la mesa*” ha promovido la búsqueda de nuevas alternativas entre productos de origen natural (Manzanilla *et al.*, 2004; Dubois-Brissonnet *et al.*, 2011; Martínez, 2014; Mith *et al.*, 2014).

El presente trabajo se ha desarrollado dentro de nuestra Línea de Investigación dedicada al estudio de las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales frente a patógenos de origen animal (Huerta *et al.*, 2005; Peñalver *et al.*, 2005; Gutiérrez, 2006; Huerta *et al.*, 2014; Barrero, 2014). Los resultados de las primeras investigaciones, con más de 25 productos frente a varios serotipos de *Salmonella*, sirvieron de referencia para seleccionar los aceites de este TFM (Huerta *et al.*, 2005; Peñalver *et al.*, 2005; Gutiérrez, 2006).

El estudio preliminar para seleccionar los compuestos con mayor potencial frente a *S. Typhimurium* mostró una gran variabilidad en su actividad, incluida la ausencia total de inhibición con el aceite de naranja (\varnothing 6 mm). Sin embargo, este producto ha sido ensayado en forma de extracto etanólico frente a *S. Typhi* con halos de inhibición >17 mm (Martínez, 2014). Por su parte, los mejores resultados se obtuvieron con el tomillo rojo, orégano y tomillo vulgar (\varnothing 19,5-20,87 mm), resultados que difieren de los hallados por Silva *et al.* (2013) con halos de inhibición de 25,7-29,7 mm. Por el contrario, estudios similares llevados a cabo con los serotipos *S. Anatum* y *S. Enteritidis*, mostraron para estos aceites halos muy inferiores (6,6-12 mm) (Shan *et al.*, 2007; Amadio *et al.*, 2011). Como ya han referido otros autores, las diferencias observadas podrían deberse a las variaciones encontradas en el método seguido, la especie y el serotipo ensayado, la naturaleza del producto y la variedad del aceite (Rota *et al.*, 2004; Tiwari *et al.*, 2005; Becerril *et al.*, 2012).

Ante la ausencia de un punto de corte estándar que permita determinar la sensibilidad o resistencia de las cepa de *Salmonella* a los aceites esenciales, los estudios *in vitro* establecen

diferentes criterios, considerando según el caso “*no sensibles*” las cepas con halos <8 mm o <10 mm y “*muy sensibles*” los aislamientos con halos >16 mm o >20 mm (Amadio *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2013). Observamos, asimismo, que los trabajos que ensayan varias especies bacterianas utilizan los mismos valores umbral para comparar la actividad de los aceites, cuando se ha descrito una mayor sensibilidad de las bacterias gram positivas (Amadio *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2013; Martínez, 2014; Ozogul *et al.*, 2015). A ello debemos unir que en ocasiones los resultados del test con discos no reflejan la actividad inhibitoria medida con la CMI. Así, en trabajos realizados por nuestro grupo con *Staphylococcus* spp., la menta, el orégano y el tomillo alcanzaron halos de 41,5-52 mm, mientras que la CMI fue inferior a las halladas para *S. Typhimurium* (1,36%, 0,12% y 0,07%, respectivamente) (Barrero, 2014). Si bien estamos de acuerdo en la utilidad del test con discos como prueba de cribado, consideramos que su uso habitual en la práctica clínica requeriría la estandarización del método y la determinación de puntos de corte para cada aceite y microorganismo.

Para la valoración cuantitativa de la actividad de los aceites que mostraron el mayor potencial en la prueba de discos, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) (Carson *et al.*, 2002; Grau *et al.*, 2005). En base a los resultados obtenidos, los aceites con mayor actividad fueron el orégano, el tomillo rojo y el tomillo vulgar, con una potencia microcida (CMB/CMI) de 1,22-1,38. En estudios previos realizados con el mismo método frente a cepas clínicas y de referencia de *S. Typhimurium*, el orégano, el tomillo y la canela lograron inhibir y destruir casi todas las cepas a concentraciones inferiores (CMIs 0,012-0,1%; CMBs 0,012-0,15%) (Rota *et al.*, 2004; Mith *et al.*, 2014). Por el contrario, los trabajos de Peñalver *et al.* (2005), con *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Essen* y *S. Choleraesuis*, describen para el orégano y el tomillo rojo CMIs superiores a las halladas en este trabajo (0,25-2,0%). Estas diferencias podrían estar relacionadas nuevamente con la variedad de aceite y el reducido número de cepas ensayadas. Sin embargo, y al igual que en nuestro trabajo, son varios los autores que describen diferencias en la sensibilidad de las cepas de *Salmonella* para un mismo aceite, lo que apoyaría la necesidad de realizar estudios de distribución de la sensibilidad con un mayor número de aislamientos de campo (Ross *et al.*, 2001; Rota *et al.*, 2004; Peñalver *et al.*, 2005; Naveed *et al.*, 2013).

El ensayo en este TFM de un número considerable de cepas de *S. Typhimurium* aisladas en diferentes especies animales nos permitió realizar una primera valoración de la sensibilidad de esta población bacteriana, mediante el cálculo de la CMI₅₀ y ₉₀ y la CMB₅₀ y ₉₀. En base a los

resultados hallados, el orégano sería el aceite con mayor actividad antimicrobiana, capaz de inhibir y destruir al 50% y al 90% de las cepas ensayadas al 0,03% y el 0,06%, y el único que mantiene en todos los casos valores próximos al límite de citotoxicidad descrito por Dusan *et al.* (2006) para las células intestinales (0,05%).

Finalmente, al comparar la eficacia de los aceites en función del perfil de resistencia de las cepas ensayadas, no se encontraron diferencias significativas entre las bacterias sensibles y resistentes a los antimicrobianos habitualmente usados en veterinaria. Estos resultados se asemejan a los descritos por otros autores, que resaltan la eficacia de los aceites para el control de salmonelas resistentes a aminoglucósidos, como la gentamicina y kanamicina, y a macrólidos, como la azitromicina (Naveed *et al.*, 2013; Said *et al.*, 2015). Siguiendo estos hallazgos, las investigaciones actualmente se encaminan a encontrar posibles sinergias entre antibióticos y aceites esenciales, con el fin de disminuir sus dosis de administración y evitar, así, efectos adversos y resistencias.

CONCLUSIONES

1. Los aceites de orégano, tomillo rojo y tomillo vulgar mostraron en todas las pruebas la mayor actividad antimicrobiana frente a *S. Typhimurium*, con halos de inhibición >19,0 mm y Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) y Mínimas Bactericidas (CMB) <0,16%.
2. Tanto en la prueba de cribado como en el ensayo cuantitativo se observaron diferencias en la sensibilidad de las cepas a un mismo aceite, no relacionadas con su perfil de resistencia antimicrobiana, lo que justificaría la valoración *in vitro* de los aceites para cada caso clínico y el estudio de la sensibilidad de las poblaciones bacterianas para estandarizar criterios de resistencia.
3. Los primeros datos aportados en este trabajo sobre la CMI y la CMB 50 y 90, destacan la capacidad del orégano para inhibir y destruir el 50% de las cepas ensayadas a una concentración del 0,03%, e inhibir y destruir el 90% de las cepas al 0,06%, presentando, por tanto, la máxima potencia microcida (índice CMB/CMI = 1). En base a ello, consideramos que este aceite podría ser una buena alternativa para el control de las infecciones por *S. Typhimurium*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amadio C, Medina R, Dediol C, Zimmermann M, Millares S (2011). Aceite esencial de orégano: un potencial aditivo alimentario. *FCA-Uncuyo* 43(1): 237-245
- Apolónio J, Faleiro M, Miguel M, Neto L (2014). No induction of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* during continuous exposure to eugenol-citral. *FEMS-Microbiology Letters* 354: 92-101
- Astorga R, Tümmers C, Echeita A, Maldonado A, Arenas A (2005). Resistencia antimicrobiana de *Salmonella* de origen porcino aisladas en mataderos de Andalucía. *SUIS*: 24-35
- Astorga R, Usera MA, Maldonado A, Arenas A, Tarradas C, Luque I, Pérez J, Perea A (2002). Marcadores epidemiológicos y sensibilidad antimicrobiana en salmonelas de origen animal. *AVEDILA*: 21
- Barrero B (2014). Utilización de aceites esenciales en el control de las infecciones por *Staphylococcus xylosus* y *S. epidermidis* en el caballo. Trabajo de Fin de Máster-MSMA, Universidad de Córdoba
- Bartholomew M, Heffernan R, Wright J, Klos R, Monson T, Khan S, Trees E, Sabol A, Willems R, Flynn R, Deasy M, Jones B, Davis J (2014). Multistate outbreak of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis infection associated with pet guinea pigs. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 14(6): 414-421
- Bauer K, Garbe D, Surburg H (2001). *Common Fragrance and Flavor Materials: preparation, properties and uses*. Wiley-VCH, Weinheim, 293
- Becerril R, Nerín C, Gómez-Lus R (2012). Evaluation of bacterial resistance to essential oils and antibiotics after exposure to *Oregano* and *Cinnamon* essential oils. *Foodborne Pathogens and Disease*, 9(8): 699-705
- Burt S (2004). Essentials oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253

- Caffer M, Terragno R (2001). Manual de Procedimientos para la Caracterización de *Salmonella*, Servicio Enterobacterias Departamento Bacteriología-INEI, 1: 2-37
- Calvert N, Stewart W, Yreilly W (1998). *Salmonella* Typhimurium DT104 infection in people and animal in Scotland. The Veterinary Record. 143: 351-354
- Carson F, Mee B, Riley T (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 46(6): 1914-1920
- Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI (2009). Performance standards for antimicrobial disk-dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Third Edition. M3(8): 28
- Coma J (2001). Control de *Salmonella* en carne de porcino. XVII Curso Especialización FEDNA, Rebollos: 161-188
- Crop and food research (2001). Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. Broad Sheet Series n° 45, <http://www.crop.cri.nz>
- Dorman H, Deans S (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile-oils. Journal of Applied Microbiology, 88: 308-316
- Dubois-Brissonnet F, Naïtali M, Mafu A, Briandet R (2011). Induction of Fatty Acid Composition Modifications and Tolerance to Biocides in *Salmonella* Serovar Typhimurium by Plant-Derived Terpenes. Applied Environmental Microbiology, 77(3): 906-910
- Echeita M, Herrera S, Simón C (2011). Gastroenteritis invasivas, ¿Algo nuevo? Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 29(3): 55-60
- FAO (2004). Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Departamento de Agricultura, Estudio 162-Roma

- Fratini F, Casella S, Leonardi M, Pisseri F, Ebani V, Pistelli L (2014). Antibacterial activity of essential oils, their blends and mixtures of their main constituents against some strains supporting livestock mastitis. *Fitoterapia* 96: 1-7
- Gebreyes W, Davies P, Morrow W, Funk J, Altier C (2000). Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates from swine. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 4633-4636
- Grau S, Marín M, Álvarez F, Company D, Gimeno-Bayón J, Saballs P, Drobic L, Saballs M (2005). Antimicrobianos. *Farmacia Hospitalaria*, 29(5): 147-208
- Griffin S, Markham J, Leach D (2000). An agar dilution method for the determination of the MIC of essential oils. *Journal of Essential Oils Research*, 12: 249-255
- Gutiérrez J (2006). Estudio de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales frente a diferentes serotipos de *Salmonella spp.* Tesina de Licenciatura de Veterinaria, Universidad de Córdoba
- Huerta B, Barrero B, Galán A, Maldonado A, Tarradas C, Luque I (2014). Puesta a punto del método de difusión por discos para valorar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales. IXI Simposio Anual de AVEDILA. Zaragoza-España, noviembre 2014
- Huerta B, Gutiérrez J, Astorga R, Borge C, Carbonero A, García I, Perea A (2004). Actividad *in vitro* de 27 aceites esenciales frente a cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotipos Enteritidis y Typhimurium. IX Simposio Anual de AVEDILA. Córdoba-España
- Huerta B, Ponsa F, Ordóñez G, Fernández N, Peñalver P (2005). Estudio de eficacia de aceites esenciales ante una infección experimental de *Salmonella* Enteritidis en gallinas ponedoras en producción. XLII Simposium Científico de Avicultura. Cáceres, octubre 2005.
- Lahlou M, Berrada R (2003). Composition and niticidal activity of essential oils of three chemotypes of *Rosmarinus officinalis* acclimatised in Morocco. *Flavours and Fragrances Journal*, 18: 124-127

- Luz I, Melo N, Bezerra T, Madruga M, Magnani M, Souza E (2014). Sublethal amounts of *Origanum vulgare* essential oil and carvacrol cause injury and changes in membrane fatty acid of *Salmonella* Typhimurium cultivated in a meat broth. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11(5): 357-361
- MacGowan A, Wise R (2001). Establishing MIC breakpoints and the interpretation of *in vitro* susceptibility tests. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(1), 17-28
- Maguna F, Romero A, Garro O, Okulik N (2006). Actividad Antimicrobiana de un grupo de terpenoides. Universidad del Nordeste-Argentina, Comunicaciones científicas y tecnológicas, 057:1-4
- Manzanilla E, Pérez J, Martín M, Kamel C, Baucells F, Gasa J (2004). Effect of plant extracts and formic acid on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. *Journal of Animal Science*, 82: 3210-3218
- Martínez J, Pacheco M, Rada I (2013). Comparison of the minimal inhibitory concentration and the plasma cephalotin concentration through a mathematical model. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 47(2):213-224
- Martínez M (2014). Evaluación Antibacteriana y antioxidante de extractos de la cáscara de naranja (*Citrus sinensis*) variedad Valencia. Tesis de Grado, Ingeniería-Tecnología de Alimentos, Universidad Autónoma Agraria-México.
- Mith H, Dure R, Delcenserie V, Zhiri A, Daube G, Clinquart A (2014). Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Science and Nutrition*, 2(4): 403-416
- Naveed R, Hussain I, Tawab A, Muhammad T, Moazur R, Sohail H, Shahid M, Abu B, Mazhar I (2013). Antimicrobial activity of the bioactive components of essential oils from Pakistani spices against *Salmonella* and other multi-drug resistant bacteria. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13: 265

- Oladimeji F, Orafidiya O, Okeke I, Dagne E (2001). Effect of autoxidation on the composition and antimicrobial activity of essential oil of *Lippia multiflora*. *Pharmaceutical and Pharmacological Letters*, 2(11): 64-67
- Ozogul Y, Kuley E, Ucar Y, Ozogul F (2015). Antimicrobial impacts of essential oils on food borne-pathogens. *Food, Nutrition and Agriculture*, 7(1)
- Palaniappan K, Holley R (2010). Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 140(2): 164-168
- Parra M, Durango J, Mattar S (2002). Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las enfermedades producidas por *Salmonella*. Revisión de Tema. *MVZ-Córdoba*, 7(2): 187-200
- Peinado H, Green C, Herrera J, Escolero O, Delgado O, Belmonte S, Ladrón M (2012). Relationship between chloride concentration and electrical conductivity in groundwater and its estimation from vertical electrical soundings in Guasave. *Ciencia e Investigación Agraria*, 39(1): 229-239
- Peñalver P, Huerta B, Borge C, Astorga R, Romero R, Perea A (2005). Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the *Enterobacteriaceae* family. *APMIS*, 113:1-6
- Popoff M, Bockemühl J, Gheesling L (2003). Supplement 2001 to the kauffman-white scheme. *Research in Microbiology*, 154: 173-174
- Rautiainen E, Ranta J, Tuominen P, Maijala R (2002). A national *Salmonella* control programme of pork base on *Salmonella* detection in cecal lymph nodes, carcass surface swabs and crushed meta samples. *International Symposium of Salmonella & Salmonellosis*. St Briec-France: 585-586
- Reglamento 1831/2003 del Parlamento Europeo y Consejo de 22 de septiembre, sobre los aditivos en la alimentación animal. *Diario oficial UE n° L*, 268: 0029–0043

- Reglamento 2160/2003 del Parlamento Europeo y Consejo de 17 de noviembre, sobre el control de la *Salmonella* y otros agentes zoonóticos específicos transmitidos por los alimentos. Diario oficial UE nº L 325: 001-0015
- Rodríguez J, Pano J, Alvarez L, Asensio Á, Calbo E, Cercenado E, Cisneros J (2012). Programas de optimización de uso de antimicrobianos en hospitales españoles: documento de consenso GEIH-SEIMC, SEFH-SEMPSPH. *Farmacia Hospitalaria*, 36(1): 33e1-33e30
- Ross Z, O’Gara E, Hill D, Sleightholme H, Maslin D (2001). Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria: Evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder. *Applied Environmental Microbiology*, 67: 475-480
- Rota C, Carramiñana J, Burillo J, Herrera A (2004). *In vitro* antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 67(6): 1252-1256
- Said A, Zahlane K, Ghalbane I, Messoussi S, Romane A, Cavaleiro C, Salgueiro L (2015). Chemical composition and antibacterial activity of *Lavandula coronopifolia* essential oil against antibiotic-resistant bacteria. *Natural Product Research*, 29(6): 582-585
- Sánchez Y, Correa T, Abreu Y, Martínez B, Duarte Y, Pino O (2011). Caracterización química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Piper marginatum*. *Protección Vegetal*, 26(3): 170-176
- Schwarz S, Silley P, Simjee S, Woodford N, Duijkeren E, Johnson A, Gaastra W (2010). Editorial: Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 24: 1-4
- Shan B, Cai Y, Books J, Corke H (2007). The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, 117: 112-119
- Silva N, Alves S, Gonçalves A, Amaral J, Poeta P (2013). Antimicrobial activity of essential oils from mediterranean aromatic plants against several foodborne and spoilage bacteria. *Food Science and Technology International*, 19(6): 503-510

- Silveira E, González O, Medina R (2005). Actividad in vitro 2-bromo 5-furano frente a *Neisseria meningitidis* y *Hamophilus influenza*. Redvet, VI(09): 1-8
- Skandamis P, Koutsoumanis K, Fasseas K, Nychas G (2001). Inhibition of *Oregano* essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157:H7. Italian Journal of Food Science, 13(1): 65-75
- Soković M, Glamočlija J, Marin P, Brkić D, Van-Griensven L (2010). Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an *in vitro* model. Molecules, 27-15 (11): 7532-46
- Tiwari R, Bharti S, Kaur R, Dikshit R, Hoondal G (2005). Synergistic antimicrobial activity of tea and antibiotics. Indian Journal of Medical Research, 122: 80-84
- Vadillo S, Píriz S, Mateos E. Microbiología Veterinaria, 1era ed. Madrid, PA: Mc Graw Hill Interamericana; 2002: 327-329
- Yap P, Yiap B, Ping H, Lim S (2014). Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. The Open Microbiology Journal, 8:6

ANEXOS

Los anexos con el total de resultados obtenidos en este trabajo se presentan en el CD adjunto.

Anexo 1. Grupos de aceites establecidos mediante el test de ANOVA y el test de Tukey ($P < 0,05$) en base a su diferente actividad inhibidora, medida como el halo final de inhibición frente a *S. Typhimurium* (10 cepas clínicas y cepa control).

	Grupo 1	Grupo 2				Grupo 3		Grupo 4		
Nº cepa	Naranja	Ajo	Romero	Estragón	Menta	Canela	Clavo	Tomillo vulgar	Orégano	Tomillo rojo
1	6 ± 0,0	8,00 ± 0,00	9,00 ± 0,00	9,00 ± 0,00	8,33 ± 0,58	14,33 ± 0,58	14,33 ± 0,58	16,67 ± 0,58	20,00 ± 0,00	24,00 ± 0,00
2	6 ± 0,0	6,67 ± 1,15	7,33 ± 1,15	8,00 ± 0,00	7,67 ± 1,52	15,00 ± 1,00	14,67 ± 0,58	18,67 ± 1,15	18,00 ± 0,00	18,33 ± 0,58
3	6 ± 0,0	8,00 ± 0,00	9,00 ± 0,00	9,00 ± 0,00	9,67 ± 0,58	15,33 ± 0,58	15,67 ± 0,58	18,67 ± 0,58	20,00 ± 0,00	21,00 ± 0,00
4	6 ± 0,0	8,33 ± 0,58	9,00 ± 0,00	9,00 ± 0,00	9,00 ± 0,00	14,67 ± 0,58	15,00 ± 0,00	20,00 ± 0,00	19,67 ± 0,58	21,00 ± 1,00
5	6 ± 0,0	8,00 ± 0,00	10,00 ± 0,00	9,00 ± 0,00	10,00 ± 0,00	16,00 ± 0,00	16,33 ± 0,58	22,00 ± 0,00	25,67 ± 0,58	21,67 ± 0,58
6	6 ± 0,0	8,00 ± 0,00	9,00 ± 0,00	9,00 ± 0,00	10,00 ± 0,00	15,00 ± 0,00	16,00 ± 0,00	20,33 ± 0,58	20,00 ± 0,00	21,00 ± 0,00
7	6 ± 0,0	9,00 ± 0,00	9,00 ± 0,00	10,00 ± 0,00	10,00 ± 0,00	15,00 ± 0,00	16,00 ± 0,00	20,00 ± 0,00	21,33 ± 0,58	21,67 ± 0,58
8	6 ± 0,0	8,00 ± 0,00	9,00 ± 0,00	9,00 ± 0,00	10,00 ± 0,00	15,00 ± 0,00	16,00 ± 0,00	20,00 ± 0,00	21,33 ± 0,58	21,67 ± 0,58
9	6 ± 0,0	8,00 ± 0,00	9,00 ± 0,00	9,00 ± 0,00	9,00 ± 0,00	15,00 ± 0,00	15,00 ± 0,00	19,33 ± 0,58	20,33 ± 0,58	19,00 ± 0,00
10	6 ± 0,0	8,00 ± 0,00	9,00 ± 0,00	8,67 ± 0,57	9,00 ± 0,00	15,33 ± 0,58	15,67 ± 0,58	19,33 ± 0,58	19,67 ± 0,58	19,33 ± 0,58
CECT 7162	6 ± 0,0	8,00 ± 0,00	9,00 ± 0,00	9,00 ± 0,00	10,00 ± 0,00	15,00 ± 0,00	16,00 ± 0,00	20,00 ± 0,00	21,33 ± 0,58	21,67 ± 0,58
$\bar{x} \pm SD$ FINAL	6 ± 0,0	8 ± 0,64	8,93 ± 0,69	8,97 ± 0,49	9,27 ± 0,91	15,07 ± 0,58	15,43 ± 0,73	19,50 ± 1,40	20,60 ± 1,97	20,87 ± 1,63

Anexo 2. Test de Tukey. Subconjuntos de cepas con igual sensibilidad al aceite estudiado

GRUPO 2

Aceite	Cepa N°	Subconjuntos homogéneos	
Ajo		2	1
	2	6,6667	
	1		8,0000
	3		8,0000
	5		8,0000
	6		8,0000
	8		8,0000
	9		8,0000
	10		8,0000
	7162		8,0000
	4		8,3333
	7		9,0000
Sig.		1,000	0,118

Aceite	Cepa N°	Subconjuntos homogéneos	
Romero		2	1
	2	7,3333	
	1		9,0000
	3		9,0000
	4		9,0000
	6		9,0000
	7		9,0000
	8		9,0000
	9		9,0000
	10		9,0000
	7162		9,0000
	5		10,0000
Sig.		1,000	0,056

Aceite	Cepa N°	Subconjuntos homogéneos		
Estragón		3	2	1
	2	8,0000		
	10		8,6667	
	1		9,0000	
	3		9,0000	
	4		9,0000	
	5		9,0000	
	6		9,0000	
	8		9,0000	
	9		9,0000	
	7162		9,0000	
	7			10,0000
Sig.		1,000	0,440	1,000

Aceite	Cepa N°	Subconjuntos homogéneos		
Menta		3	2	1
	2	7,6667		
	1	8,3333	8,3333	
	4	9,0000	9,0000	9,0000
	9	9,0000	9,0000	9,0000
	10	9,0000	9,0000	9,0000
	3		9,6667	9,6667
	5			10,0000
	6			10,0000
	7			10,0000
	8			10,0000
	7162			10,0000
Sig.		0,123	0,123	0,440

Anexo 2. Continuación.

GRUPO 3

Aceite	Cepa N°	Subconjuntos homogéneos	
Canela		2	1
	1	14,3333	
	4	14,6667	14,6667
	2	15,0000	15,0000
	6	15,0000	15,0000
	7	15,0000	15,0000
	8	15,0000	15,0000
	9	15,0000	15,0000
	7162	15,0000	15,0000
	3	15,3333	15,3333
	10	15,3333	15,3333
	5		16,0000
	Sig.	0,279	0,053

Aceite	Cepa N°	Subconjuntos homogéneos			
Clavo		4	3	2	1
	1	14,3333			
	2	14,6667	14,6667		
	4	15,0000	15,0000	15,0000	
	9	15,0000	15,0000	15,0000	
	3		15,6667	15,6667	15,6667
	10		15,6667	15,6667	15,6667
	6			16,0000	16,0000
	7			16,0000	16,0000
	8			16,0000	16,0000
	7162			16,0000	16,0000
	5				16,3333
	Sig.	0,590	0,118	0,118	0,590

Anexo 2. Continuación.

GRUPO 4

Aceite	Cepa N°	Subconjuntos homogéneos			
		4	3	2	1
Tomillo vulgar					
	1	16,6667			
	2		18,6667		
	3		18,6667		
	9		19,3333	19,3333	
	10		19,3333	19,3333	
	4		20,0000	20,0000	
	7		20,0000	20,0000	
	8		20,0000	20,0000	
	7162		20,0000	20,0000	
	6			20,3333	
	5				22,0000
	Sig.	1,000	0,123	0,440	1,000

Aceite	Cepa N°	Subconjuntos homogéneos		
		3	2	1
Tomillo rojo				
	2	18,3333		
	9	19,0000		
	10	19,3333		
	3		21,0000	
	4		21,0000	
	6		21,0000	
	5		21,6667	
	7		21,6667	
	8		21,6667	
	7162		21,6667	
	1			24,0000
	Sig.	0,440	0,881	1,000

Aceite	Cepa N°	Subconjuntos homogéneos			
		4	3	2	1
Orégano					
	2	18,0000			
	4		19,6667		
	10		19,6667		
	1		20,0000	20,0000	
	3		20,0000	20,0000	
	6		20,0000	20,0000	
	9		20,3333	20,3333	
	7			21,3333	
	8			21,3333	
	7162			21,3333	
	5				25,6667
	Sig.	1,000	0,783	0,053	1,000

Anexo 3. Concentración Mínima Inhibitoria \pm desviación estándar (CMI % v/v) de los cinco aceites seleccionados para las 23 cepas de *Salmonella* Typhimurium utilizadas en este trabajo*

Cepa N°	Orégano	Tomillo rojo	Tomillo vulgar	Clavo	Canela
1	0,16 \pm 0,08	0,25 \pm 0,00	0,13 \pm 0,11	0,12 \pm 0,00	0,16 \pm 0,08
2	0,25 \pm 0,00	0,25 \pm 0,00	0,50 \pm 0,00	0,16 \pm 0,08	0,25 \pm 0,00
3	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,08 \pm 0,03	0,12 \pm 0,00
4	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,08 \pm 0,03	0,12 \pm 0,00
5	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,08 \pm 0,03	0,12 \pm 0,00
6	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,08 \pm 0,03	0,12 \pm 0,00
7	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,10 \pm 0,03	0,12 \pm 0,00
8	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,10 \pm 0,03	0,12 \pm 0,00
9	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,06 \pm 0,03	0,06 \pm 0,00
10	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,01	0,03 \pm 0,00	0,10 \pm 0,03	0,12 \pm 0,00
11	0,02 \pm 0,01	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,08 \pm 0,03	0,12 \pm 0,00
12	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00	0,12 \pm 0,00
13	0,03 \pm 0,01	0,03 \pm 0,00	0,02 \pm 0,01	0,04 \pm 0,02	0,12 \pm 0,00
14	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,10 \pm 0,03	0,12 \pm 0,00
15	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,08 \pm 0,03	0,12 \pm 0,00
16	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,04 \pm 0,02	0,10 \pm 0,03	0,12 \pm 0,00
17	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00	0,10 \pm 0,03	0,12 \pm 0,00
18	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,10 \pm 0,03	0,12 \pm 0,00
19	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,10 \pm 0,03	0,12 \pm 0,00
20	0,06 \pm 0,00	0,04 \pm 0,02	0,06 \pm 0,00	0,10 \pm 0,03	0,12 \pm 0,00
21	0,06 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00	0,12 \pm 0,00	0,12 \pm 0,00
22	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00	0,12 \pm 0,00
CECT 7162	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00
CMI \bar{x}	0,048699	0,051890	0,062968	0,093299	0,126812

*Los valores se han redondeado a dos decimales para presentarlos en la tabla, sin embargo todos los análisis estadísticos se realizaron con cuatro decimales.

Anexo 4. Comparación de la CMI de las 23 cepas estudiadas frente a cada uno de los cinco aceites seleccionados. Subconjuntos homogéneos establecidos por el Test de Tukey (significación estadística $P < 0.05$).

Aceite	Cepa N°	Subconjuntos homogéneos		
		3	2	1
Orégano	11	0,020433		
	13	0,025867		
	3	0,031300		
	4	0,031300		
	5	0,031300		
	6	0,031300		
	7	0,031300		
	8	0,031300		
	9	0,031300		
	10	0,031300		
	12	0,031300		
	14	0,031300		
	15	0,031300		
	16	0,031300		
	17	0,031300		
	18	0,031300		
	19	0,031300		
	22	0,031300		
	7162	0,031300		
	20	0,062500		
	21	0,062500		
	1		0,166667	
	2			0,250000
Sig.		0,155	1,000	1,000

Aceite	Cepa N°	Subconjuntos homogéneos			
		4	3	2	1
Tomillo rojo	10	0,025867			
	3	0,031300	0,031300		
	4	0,031300	0,031300		
	5	0,031300	0,031300		
	6	0,031300	0,031300		
	7	0,031300	0,031300		
	8	0,031300	0,031300		
	9	0,031300	0,031300		
	11	0,031300	0,031300		
	12	0,031300	0,031300		
	13	0,031300	0,031300		
	14	0,031300	0,031300		
	15	0,031300	0,031300		
	16	0,031300	0,031300		
	17	0,031300	0,031300		
	18	0,031300	0,031300		
	19	0,031300	0,031300		
	22	0,031300	0,031300		
	7162	0,031300	0,031300		
	20		0,041700		
	21			0,062500	
	1				0,250000
	2				0,250000
Sig.		0,993	0,318	1,000	1,000

(...)

(...) **Anexo 4.** Continuación.

Aceite	Cepa N°	Subconjuntos homogéneos		
		3	2	1
Tomillo vulgar	13	0,020433		
	3	0,031300		
	4	0,031300		
	5	0,031300		
	6	0,031300		
	7	0,031300		
	8	0,031300		
	9	0,031300		
	10	0,031300		
	11	0,031300		
	12	0,031300		
	14	0,031300		
	15	0,031300		
	18	0,031300		
	19	0,031300		
	16	0,041700		
	17	0,062500	0,062500	
	20	0,062500	0,062500	
	21	0,062500	0,062500	
	22	0,062500	0,062500	
	7162	0,062500	0,062500	
	1		0,135433	
	2			0,500000
Sig.		0,829	0,050	1,000

Aceite Clavo	Cepa N°	Subconjuntos homogéneos	
		2	1
	13	0,041700	
	9	0,062500	
	12	0,062500	
	22	0,062500	
	7162	0,062500	
	3	0,083333	0,083333
	4	0,083333	0,083333
	5	0,083333	0,083333
	6	0,083333	0,083333
	11	0,083333	0,083333
	15	0,083333	0,083333
	7	0,104167	0,104167
	8	0,104167	0,104167
	10	0,104167	0,104167
	14	0,104167	0,104167
	16	0,104167	0,104167
	17	0,104167	0,104167
	18	0,104167	0,104167
	19	0,104167	0,104167
	20	0,104167	0,104167
	1	0,125000	0,125000
	21	0,125000	0,125000
	2		0,166667
Sig.		0,272	0,272

(...)

(...) **Anexo 4.** Continuación.

Aceite Canela	Cepa N°	Subconjuntos homogéneos		
		3	2	1
	9	0,062500		
	7162	0,062500		
	3		0,125000	
	4		0,125000	
	5		0,125000	
	6		0,125000	
	7		0,125000	
	8		0,125000	
	10		0,125000	
	11		0,125000	
	12		0,125000	
	13		0,125000	
	14		0,125000	
	15		0,125000	
	16		0,125000	
	17		0,125000	
	18		0,125000	
	19		0,125000	
	20		0,125000	
	21		0,125000	
	22		0,125000	
	1		0,166667	
	2			0,250000
	Sig.	1,000	0,147	1,000

Anexo 5. Concentración Mínima Bactericida \pm desviación estándar (CMI % v/v) de los cinco aceites seleccionados para las 23 cepas de *Salmonella* Typhimurium utilizadas en este trabajo*

Cepa N°	Orégano	Tomillo rojo	Tomillo vulgar	Clavo	Canela
1	0,16 \pm 0,08	0,25 \pm 0,00	0,13 \pm 0,11	0,16 \pm 0,08	0,50 \pm 0,00
2	0,42 \pm 0,14	0,50 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	0,25 \pm 0,00	0,42 \pm 0,14
3	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,08 \pm 0,03	0,12 \pm 0,00
4	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,08 \pm 0,03	0,12 \pm 0,00
5	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,08 \pm 0,03	0,12 \pm 0,00
6	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,12 \pm 0,00	0,12 \pm 0,00
7	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,10 \pm 0,03	0,12 \pm 0,00
8	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,10 \pm 0,03	0,12 \pm 0,00
9	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00
10	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,01	0,03 \pm 0,00	0,10 \pm 0,03	0,12 \pm 0,00
11	0,06 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,10 \pm 0,03	0,08 \pm 0,03	0,12 \pm 0,00
12	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,06 \pm 0,05	0,06 \pm 0,00	0,12 \pm 0,00
13	0,03 \pm 0,01	0,03 \pm 0,00	0,02 \pm 0,01	0,04 \pm 0,02	0,12 \pm 0,00
14	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,05 \pm 0,02	0,10 \pm 0,03	0,12 \pm 0,00
15	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,08 \pm 0,03	0,12 \pm 0,00
16	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00	0,10 \pm 0,03	0,12 \pm 0,00
17	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00	0,10 \pm 0,03	0,12 \pm 0,00
18	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,10 \pm 0,03	0,12 \pm 0,00
19	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,10 \pm 0,03	0,12 \pm 0,00
20	0,06 \pm 0,00	0,04 \pm 0,02	0,06 \pm 0,00	0,12 \pm 0,00	0,12 \pm 0,00
21	0,06 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00	0,12 \pm 0,00	0,12 \pm 0,00	0,12 \pm 0,00
22	0,06 \pm 0,00	0,12 \pm 0,00	0,12 \pm 0,00	0,25 \pm 0,00	0,25 \pm 0,00
CECT 7162	0,06 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00	0,12 \pm 0,00	0,12 \pm 0,00	0,12 \pm 0,00
CMB \bar{x}	0,060487	0,068190	0,099194	0,112320	0,156703

*Los valores se han redondeado a dos decimales para presentarlos en la tabla, sin embargo todos los análisis estadísticos se realizaron con cuatro decimales.

Anexo 6. Comparación de la CMB de las 23 cepas estudiadas frente a cada uno de los cinco aceites seleccionados. Subconjuntos homogéneos establecidos por el Test de Tukey (significación estadística $P < 0.05$).

Aceite	Cepa N°	Subconjuntos homogéneos		
		3	2	1
Orégano	13	0,025867		
	3	0,031300		
	4	0,031300		
	5	0,031300		
	6	0,031300		
	7	0,031300		
	8	0,031300		
	9	0,031300		
	10	0,031300		
	12	0,031300		
	14	0,031300		
	15	0,031300		
	16	0,031300		
	17	0,031300		
	18	0,031300		
	19	0,031300		
	11	0,062500	0,062500	
	20	0,062500	0,062500	
	21	0,062500	0,062500	
	22	0,062500	0,062500	
	7162	0,062500	0,062500	
	1		0,166667	
	2			0,416667
Sig.		0,999	0,057	1,000

(...) **Anexo 6.** Continuación.

Aceite	Cepa N°	Subconjuntos homogéneos					
		6	5	4	3	2	1
Tomillo rojo	10	0,025867					
	3	0,031300	0,031300				
	4	0,031300	0,031300				
	5	0,031300	0,031300				
	6	0,031300	0,031300				
	7	0,031300	0,031300				
	8	0,031300	0,031300				
	9	0,031300	0,031300				
	11	0,031300	0,031300				
	12	0,031300	0,031300				
	13	0,031300	0,031300				
	14	0,031300	0,031300				
	15	0,031300	0,031300				
	16	0,031300	0,031300				
	17	0,031300	0,031300				
	18	0,031300	0,031300				
	19	0,031300	0,031300				
	20		0,041700				
	21			0,062500			
	7162			0,062500			
	22				0,125000		
	1					0,250000	
	2						0,500000
	Sig.	0,993	0,318	1,000	1,000	1,000	1,000

(...) **Anexo 6.** Continuación.

Aceite	Cepa N°	Subconjuntos homogéneos		
		3	2	1
Tomillo vulgar				
	13	0,020433		
	3	0,031300		
	4	0,031300		
	5	0,031300		
	6	0,031300		
	7	0,031300		
	8	0,031300		
	9	0,031300		
	10	0,031300		
	15	0,031300		
	18	0,031300		
	19	0,031300		
	14	0,052100	0,052100	
	16	0,062500	0,062500	
	17	0,062500	0,062500	
	20	0,062500	0,062500	
	12	0,062533	0,062533	
	11	0,104167	0,104167	
	21		0,125000	
	22		0,125000	
	7162		0,125000	
	1		0,135433	
	2			1,000000
	Sig.	0,054	0,057	1,000

(...) **Anexo 6.** Continuación.

Aceite Clavo	Cepa N°	Subconjuntos homogéneos		
		3	2	1
	13	0,041700		
	9	0,062500		
	12	0,062500		
	3	0,083333	0,083333	
	4	0,083333	0,083333	
	5	0,083333	0,083333	
	11	0,083333	0,083333	
	15	0,083333	0,083333	
	7	0,104167	0,104167	
	8	0,104167	0,104167	
	10	0,104167	0,104167	
	14	0,104167	0,104167	
	16	0,104167	0,104167	
	17	0,104167	0,104167	
	18	0,104167	0,104167	
	19	0,104167	0,104167	
	6	0,125000	0,125000	
	20	0,125000	0,125000	
	21	0,125000	0,125000	
	7162	0,125000	0,125000	
	1		0,166667	0,166667
	2			0,250000
	22			0,250000
	Sig.	0,193	0,193	0,193

(...)

(...) **Anexo 6.** Continuación.

Aceite Canela	Cepa N°	Subconjuntos homogéneos		
		3	2	1
	9	0,062500		
	3	0,125000		
	4	0,125000		
	5	0,125000		
	6	0,125000		
	7	0,125000		
	8	0,125000		
	10	0,125000		
	11	0,125000		
	12	0,125000		
	13	0,125000		
	14	0,125000		
	15	0,125000		
	16	0,125000		
	17	0,125000		
	18	0,125000		
	19	0,125000		
	20	0,125000		
	21	0,125000		
	7162	0,125000		
	22		0,250000	
	2			0,416667
	1			0,500000
	Sig.	0,622	1,000	0,147

Anexo 7. Cálculo del índice CMB/CMI de los cinco aceites seleccionados.

Aceite	Cepa N°	Índice MBC/MIC			Media
		Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	
Orégano	1	1	1	1	1,00
	2	2	1	2	1,67
	3	1	1	1	1,00
	4	1	1	1	1,00
	5	1	1	1	1,00
	6	1	1	1	1,00
	7	1	1	1	1,00
	8	1	1	1	1,00
	9	1	1	1	1,00
	10	1	1	1	1,00
	11	4	4	2	3,45
	12	1	1	1	1,00
	13	1	1	1	1,00
	14	1	1	1	1,00
	15	1	1	1	1,00
	16	1	1	1	1,00
	17	1	1	1	1,00
	18	1	1	1	1,00
	19	1	1	1	1,00
	20	1	1	1	1,00
	21	1	1	1	1,00
	22	2	2	2	2,00
CECT 7162	2	2	2	2,00	
					1,22 ± 0,58

Aceite	Cepa N°	Índice MBC/MIC			Media
		Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	
Tomillo rojo	1	1	1	1	1,00
	2	2	2	2	2,00
	3	1	1	1	1,00
	4	1	1	1	1,00
	5	1	1	1	1,00
	6	1	1	1	1,00
	7	1	1	1	1,00
	8	1	1	1	1,00
	9	1	1	1	1,00
	10	1	1	1	1,00
	11	1	1	1	1,00
	12	1	1	1	1,00
	13	1	1	1	1,00
	14	1	1	1	1,00
	15	1	1	1	1,00
	16	1	1	1	1,00
	17	1	1	1	1,00
	18	1	1	1	1,00
	19	1	1	1	1,00
	20	1	1	1	1,00
	21	1	1	1	1,00
	22	4	4	4	4,00
CECT 7162	2	2	2	2,00	
					1,22 ± 0,67

Anexo 7. Cálculo del índice CMB/CMI de los cinco aceites seleccionados.

Aceite	Cepa N°	Índice MBC/MIC			Media
		Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	
Tomillo vulgar	1	1	1	1	1,00
	2	2	2	2	2,00
	3	1	1	1	1,00
	4	1	1	1	1,00
	5	1	1	1	1,00
	6	1	1	1	1,00
	7	1	1	1	1,00
	8	1	1	1	1,00
	9	1	1	1	1,00
	10	1	1	1	1,00
	11	4	4	2	3,33
	12	1	4	1	2,00
	13	1	1	1	1,00
	14	1	2	2	1,67
	15	1	1	1	1,00
	16	2	1	2	1,67
	17	1	1	1	1,00
	18	1	1	1	1,00
	19	1	1	1	1,00
	20	1	1	1	1,00
	21	2	2	2	2,00
	22	2	2	2	2,00
CECT 7162	2	2	2	2,00	
					1,38 ± 0,61

Aceite	Cepa N°	Índice MBC/MIC			Media
		Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	
Clavo	1	1	1	2	1,33
	2	2	2	1	1,67
	3	1	1	1	1,00
	4	1	1	1	1,00
	5	1	1	1	1,00
	6	1	2	2	1,67
	7	1	1	1	1,00
	8	1	1	1	1,00
	9	1	1	1	1,00
	10	1	1	1	1,00
	11	1	1	1	1,00
	12	1	1	1	1,00
	13	1	1	1	1,00
	14	1	1	1	1,00
	15	1	1	1	1,00
	16	1	1	1	1,00
	17	1	1	1	1,00
	18	1	1	1	1,00
	19	1	1	1	1,00
	20	1	1	2	1,33
	21	1	1	1	1,00
	22	4	4	4	4,00
CECT 7162	2	2	2	2,00	
					1,26 ± 0,66

Anexo 7. Cálculo del índice CMB/CMI de los cinco aceites seleccionados.

Aceite	Cepa N°	Índice MBC/MIC			Media
		Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	
Canela	1	2	4	4	3,33
	2	2	2	1	1,67
	3	1	1	1	1,00
	4	1	1	1	1,00
	5	1	1	1	1,00
	6	1	1	1	1,00
	7	1	1	1	1,00
	8	1	1	1	1,00
	9	1	1	1	1,00
	10	1	1	1	1,00
	11	1	1	1	1,00
	12	1	1	1	1,00
	13	1	1	1	1,00
	14	1	1	1	1,00
	15	1	1	1	1,00
	16	1	1	1	1,00
	17	1	1	1	1,00
	18	1	1	1	1,00
	19	1	1	1	1,00
	20	1	1	1	1,00
	21	1	1	1	1,00
	22	2	2	2	2,00
	CECT 7162	2	2	2	2,00
					1,22 ± 0,56