

Artículo Original / Original Article

Efecto ecotóxico y preventivo del uso de aceites esenciales en la mastitis bovina

[Ecotoxic and preventive effect of the use of essential oils in bovine mastitis]

Jovanna M. Suarez-Barreiro^{1,2}, Martha C. Suarez² y Fabian Parada³¹Unilabs Asesoría e Investigación S.A.S., Finca Hayuelos, Machetá-Cundinamarca, Colombia²Departamento de Salud Animal, Facultad de Veterinaria Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia³Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia**Reviewed by:**Oscar Marino Mosquera
Universidad Tecnológica de Pereira
ColombiaPedro Orihuela
Universidad de Santiago de Chile
Chile**Correspondence:**Jovanna M. SUAREZ-BARREIRO:
jmsuarez@una.edu.co**Section**

Biological activity

Received: 3 March 2021

Accepted: 8 July 2021

Accepted corrected: 20 March 2023

Published: 30 January 2024

Citation:Suarez-Barreiro JM, Suarez MC, Parada F
Efecto ecotóxico y preventivo del uso de aceites
esenciales en la mastitis bovina
Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat
23 (1): 29 - 40 (2024).
<https://doi.org/10.37360/blacpma.24.23.1.3>

Abstract: The essential oils of *Lippia citriodora* (Ort.) and *Lippia origanoides* (Kunth) have shown antimicrobial activity associated with mastitis. The objective of this study was to evaluate its ecotoxic effect with the *Artemia salina* bioassay and the prevention of mastitis through an *in vivo* test in cattle (n=20) with a product based on these oils using a conventional product as a control. Contact hypersensitivity, the effect on somatic cells, and residuality in milk samples were evaluated. The results of the *Artemia salina* bioassay were 10.05 and 19.36 (µg/mL) respectively. No negative effects or contact hypersensitivity were observed, and no residual metabolites were found in post-test milk. The somatic cell count showed 75% effectiveness in the prevention of mastitis with essential oils compared to 62.5% with the conventional product. The evaluated formulation could be used in the prevention of bovine mastitis safely, further investigation is required.

Keywords: Mastitis; Essential oils; Residuality; Hypersensitivity; *Artemia salina*

Resumen: Los aceites esenciales de *Lippia citriodora* (Ort.) y *Lippia origanoides* (Kunth), han mostrado actividad antimicrobiana asociada a la mastitis. El objetivo de este estudio fue evaluar su efecto ecotóxico con el bioensayo *Artemia salina* y la prevención de mastitis mediante un ensayo *in vivo* en bovinos (n=20) con un producto a base de estos aceites utilizando como control un producto convencional. Se evaluó la hipersensibilidad de contacto, efecto en células somáticas y residualidad en muestra de leche. Los resultados del bioensayo de *Artemia salina* fueron 10,05 y 19,36 (µg/mL) respectivamente. No se observaron efectos negativos, ni hipersensibilidad de contacto, y no se encontraron metabolitos residuales en leche posterior al ensayo. El conteo de células somáticas mostró efectividad en la prevención de mastitis del 75% con aceites esenciales frente al 62.5% del producto convencional. La formulación evaluada podría ser utilizada en la prevención de la mastitis bovina de forma segura, se requiere profundizar en la investigación.

Palabras clave: Mastitis; Aceites esenciales; Residualidad; Hipersensibilidad; *Artemia salina*

INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud ha formulado en el 2015 un Plan de Acción Mundial sobre la Resistencia a los Antimicrobianos. Uno de los objetivos principales es reducir la incidencia con medidas eficientes de saneamiento y fortalecer la investigación, dentro de los cuales se incluyen los productos a base de extractos naturales (WHO, 2016).

En este sentido, los aceites esenciales de especies como *Lippia citriodora* y *Lippia origanoides*, contienen metabolitos asociados a la actividad antimicrobiana en aislamientos de casos positivos de mastitis (Lopes et al., 2020), incluyendo cepas resistentes (Gomes et al., 2018). Esta actividad antimicrobiana se asocia al carvacrol y timol, mostrando capacidad frente a: *S. aureus*, *E. Coli* y *Salmonella*, *Pseudomonas*, entre otros (Iturriaga et al., 2012). Específicamente, frente a *Staphylococcus* spp. aislados de casos positivos de mastitis bovina (Dal Pozzo et al., 2011), incluyendo microorganismos resistentes a antibióticos convencionales, siendo un posible tratamiento (Choi et al., 2012).

El aceite esencial de la *L. origanoides* en cultivos de Colombia contiene principalmente carvacrol (2-40%), p-cimeno (13%), g-terpineno (11%) y timol (20-70%) (Stashenko et al., 2010) y es de gran interés para la industria farmacéutica. Algunos estudios concluyen que la inclusión de aceite esencial de *L. origanoides* puede ser empleados como promotores de crecimiento en pollos de engorde (Madrid-Garcés et al., 2017) y aumenta su perfil lipídico (Madrid-Garcés et al., 2018). El timol empleado en el tratamiento de la mastitis bovina (Dal Pozzo et al., 2011), en una concentración mínima inhibitoria (CIM) en un rango de 16-64 mg/mL puede reducir la internalización del *Staphylococcus aureus* en células epiteliales mamarias bovinas e inhibir la producción de óxido nítrico (Wei et al., 2014).

Igualmente, el aceite esencial *Lippia citriodora* ha mostrado capacidad antimicrobiana asociada a sus compuestos mayoritarios que varían según las condiciones de cultivo y climatológicas: Limoneno 0.6-37%, neral 11-30%, geranial 14-37%. Revelando inhibición frente a los aislados: *Escherichia coli*, *Klebsiella ozaenae*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus* sp., con valores de CIM de 10-50 µg/mL (Rojas et al., 2010). Se han evaluado los cambios morfológicos en *Staphylococcus aureus* Meticilina resistente frente a metabolitos como citral

y la mezcla geranial-neral, encontrando daños en la membrana citoplasmática que pueden ser ocasionados por la sinergia de los mecanismos de acción de los compuestos que potencializan la actividad antimicrobiana (Jareerat Aiensaard et al., 2011).

Investigaciones previas han evaluado la eficacia de un desinfectante experimental basado en el aceite esencial de *Lippia origanoides* en la prevención del desarrollo de nuevas infecciones intramamarias en vacas Holstein, concluyendo que no se presentaron casos de mastitis clínica y subclínica, ni lesiones en la mucosa de los pezones; pudiendo ser una alternativa en la prevención de mastitis (Marcelo et al., 2020).

Adicionalmente, estudios muestran que existe sinergia en la actividad antimicrobiana de plantas medicinales (Mundy et al., 2016). Para el caso de la mezcla de aceites esenciales de *L. origanoides* y *L. citriodora* se ha evidenciado sinergia frente aislados de casos positivos de mastitis bovina. La empresa Unilabs, previamente a evaluado una mezcla de estos aceites como producto desinfectante con cepas estándar de: *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y *Staphylococcus aureus* ATCC6538; con un tiempo de contacto de 5 minutos y 100% de efectividad bactericida.

Sin embargo, para desarrollar un producto a base de aceites esenciales, además de su efectividad se requiere profundizar en efectos residuales y efecto secundarios en animales. El empleo de aceites en la elaboración de productos desinfectantes con fines agroindustriales requiere de ensayos que garanticen su inocuidad y seguridad. Existen productos avalados por la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (FDA), para agricultura ecológica que emplean timol y carvacrol en casos de mastitis bovina. A pesar de ser compuestos seguros, se ha observado residualidad en plasma y leche, que requiere tiempos de espera (Mason et al., 2018) con administración intramamaria o tópica a concentraciones de aceite esencial de orégano del 3-15% para el caso del *Uddersol*, producto de uso tópico, empleado para el tratamiento de la mastitis bovina (Ralco Nutrition, 2020). Específicamente para el caso del timol se ha evaluado el producto *Phyto-Mast*, encontrando presencia en sangre hasta las primeras 4 horas, y en leche hasta 12 horas posterior al tratamiento (McPhee et al., 2011). La aplicación de este producto es intramamaria y su contenido de timol es del 10% (Karreman, 2012).

A nivel preventivo, la concentración de los aceites esenciales es inferiores al 0.5%, de acuerdo con esto, se pretende evaluar la ecotoxicidad con el Bioensayo de *Artemia salina* y la residualidad de una mezcla de aceites esenciales de *L. organoides* y *L. citriodora*, considerando su efecto sinérgico en cepas resistentes, con aplicación tópica durante post ordeño (2 veces/día), evaluando la respuesta inflamatoria mediante el conteo de células somáticas en leche, hipersensibilidad de contacto, y residualidad en muestra de leche, estudio que aún no se ha realizado a estas concentraciones para un uso preventivo de mastitis bovina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aceites esenciales y preparación de la mezcla

El material vegetal para la elaboración de los aceites tuvo como origen cultivos jóvenes del municipio de Machetá a una altura de 1850 msnm perteneciente a la colección de plantas medicinales de la empresa Unilabs. Clima templado a cálido con temperatura promedio anual de 17.8°C. Los aceites esenciales de las especies *Lippia organoides* y *Lippia citriodora* fueron obtenidos por destilación por arrastre de vapor, por ser un proceso de fácil manejo, económico

y de buen rendimiento. Para optimizar la extracción se consideraron pre-tratamientos del material vegetal con un secado parcialmente al sol (durante dos semanas) y se disminuyó el tamaño de partícula para contribuir a la extracción con trituradora a 1 cm. El análisis de los aceites esenciales se desarrolló mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS) en el Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander (Bucaramanga, Colombia), mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS); utilizando de referencia la mezcla certificada de hidrocarburos C6 - C25 (AccuStandard, New Haven, USA). El análisis cromatográfico se realizó en un cromatógrafo de gases acoplado a un detector selectivo de masas (AT6890- MSD 5975) operado en modo de barrido completo. La columna empleada en el análisis fue DB-5MS (5% -fenil-poli (dimetilsiloxano), 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Con inyección en modo (30:1), $V_{iny} = 2 \mu\text{L}$. En las Tablas N° 1 y N° 2 se relacionan los tiempos de retención, cantidad relativa y compuestos en los aceites esenciales de *Lippia citriodora* y *Lippia organoides*:

Tabla N° 1
Compuestos mayoritarios del aceite esencial de *Lippia citriodora*

tR, min	Identificación tentativa	Cantidad relativa, %
15	α -Tujeno	0,1
15,33	α -Pinene	0,7
17,09	Sabineno	0,2
17,33	β -Pinene	2,9
17,76	β -Myrcene	0,6
19,38	ρ -Cimeno	1,9
19,75	Limonene	38,6
19,78	β -Felandrene	0,1
19,79	Eucalyptol	0,1
20,75	γ -Terpinene	2,3
21,86	Terpinolene	0,1
22,4	Linalol	0,6
23,38	cis-p -Ment-2,8-dien-1-ol	0,1
23,8	cis-Limonene oxide	0,4
23,97	trans-limonene oxide	0,3
25,55	transisocitral	0,1
25,69	Terpinen-4-ol	0,5
26,24	α -terpineol	0,7
26,54	Channel	0,1
27,15	trans-Carveol	0,2
27,27	Nerol	0,1

27,9	Neral	21,6
28,14	Carvona	0,2
28,19	Geraniol	0,1
28,96	Geranial	24,8
31,85	Neryl acetate	0,6
32,57	Geranyl acetate	0,2
34,49	trans- β -Cariophyllene	0,2
34,81	trans- α -Bergamotene	0,5
37,17	α - trans-Farnesene	0,2
37,38	β -Bisabolene	0,7
39,92	Caryophyllene oxide	0,1
53,57	Oxygenated compound, N	0,1

Tabla N° 2
Compuestos mayoritarios del aceite esencial de *Lippia organoides*

tR, min	Identificación tentativa	Cantidad relativa, %
17.76	β -mirceno	10,6
18,64	Oct-1-en-3-ol	0,9
20,67	p-Cimeno	1,4
21,04	1,8-Cineol	0,8
22,08	γ -Terpineno	1,5
22,63	cis-Hidrato de sabineno	0,1
23,36	6,7-epoxi-Mirceno	0,6
23,73	Linalol	0,8
23,92	trans-Hidrato de sabineno	0,6
25,44	Ipsdienol	0,7
26,65	Umbellulona	0,8
27,11	Terpinen-4-ol	0,6
27,65	α -Terpineol	0,4
28,78	Timil metil etér	5,8
29,73	Geraniol	0,6
31.23	Timol	36,6
31.55	Carvacrol	13,8
33,03	Acetato de timilo	1,2
33,41	Eugenol	0,3
36,18	trans- β -Cariofileno	7,6
37,43	α -Humuleno	5,5
37,85	C11H16O2	10,6
40,81	epi-Globulol	1,3
41,53	Globulol	3,9
41,79	Viridiflorol	0,8
42,56	C15H26O	1,2

El producto formulado para el ensayo *in vivo* se formuló a base de aceites esenciales de *Lippia citriodora* y *Lippia organoides* con una concentración menor al 0.5%, glicerina al 50%, gel polisacárido menor al 1%, para facilitar la mezcla se

usó Dimetil sulfóxido (DMSO) al 1% y agua

Bioensayo con *Artemia salina*

Se siguió el método descrito por Meyer *et al.* (1982), usado para la investigación de productos naturales, a

fin de encontrar la concentración letal CL₅₀ en µg/mL para los aceites esenciales de *Lippia citriodora* y *Lippia origanoides*. La *Artemia franciscana*, es un crustáceo perteneciente a la familia de *Anostraca*, distribuida y adaptada en agua salada en todo el mundo. Los huevos fueron eclosionados en agua salada artificial a 26°C y oxigenación constante después de 48 h. El bioensayo consistió en la preparación de siete soluciones salinas de aceites esenciales a concentraciones de 440, 220, 110, 22, 11, 5.5 y 2.75 µg/mL disuelto en DMSO (Dimetil sulfóxido), empleando como control una solución salina de DMSO a 20 µg/mL y solución salina pura. Preparadas las soluciones se sirvieron en tubos de ensayos 3 mL de cada solución por triplicado con 10 metanauplios de *Artemia salina*. Posterior a 24 h fueron contadas los metanauplios vivos (con movimiento) y se procedió al análisis estadístico.

Ensayo in vivo: consideraciones éticas

Los estudios fueron desarrollados con el aval (CB-FMVZ-UN-15-19) del Comité de Bioética de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia

Animales

Se trabajó con razas bovinas (n=20), hembras, en un rango 2-6 años con tamaño óptimo y saludable, ubicadas en el Municipio de Chocontá, Cundinamarca con una altura sobre nivel del mar 2.650-2.900 msnm. Sin problemas visuales en la ubre y conteo máximo de células somáticas <200.000 CCS/ mL. En periodo de lactancia, con pezones funcionales y sin tratamiento de antibiótico o antiinflamatorio. Se realizó el análisis con dos grupos de animales cada uno con N:10 individuos (40 Pezones) sin diferencias significativas en el análisis de la prueba de mastitis californiana, pH, acidez, densidad y recuento de células somáticas, ordeño mecánico (dos veces en el día), alimentación con pastoreo rotacional de *Pennisetum clandestinum*, suplementado con concentrado compuesto por cereales, melaza, y complementos nutricionales (vitaminas y minerales). El grupo de estudio aplicará el producto a base de aceites esenciales mediante inmersión post ordeño y el grupo control aplicará el producto comercial a base de yodo. El protocolo para ambos grupos será de acuerdo a las directrices del producto comercial durante un periodo de 30 días. El sellador a base de yodo contiene una concentración al 1,0% yodo activo. El producto de ensayo se formuló a base de aceites esenciales de *Lippia citriodora* y *Lippia origanoides* con una concentración menor al

0.5%.

Hipersensibilidad de contacto

Fue determinada con el seguimiento al estado visual del pezón: enrojecimiento, hinchazón, apertura del orificio, grietas o fisuras, rugosidad o callosidad. El seguimiento se realizó en la aplicación post ordeño durante los 30 días.

Recuento de células somáticas por microscopía directa

El método inicia a partir de la muestra recolectada (posterior a la limpieza y despunte), debidamente homogenizada y atemperada a 24°C, se recolecta con una pipeta 0.01 mL y se distribuye en un área aforada de 1 cm³ en un portaobjetos. La muestra en el portaobjetos se seca en una estufa a 40°C durante 15 min y se realiza la tinción Diff -quik™. Se hace el recuento de células somáticas directamente en el microscopio tomando 30 a 40 campos. El promedio de células es multiplicado por el factor del microscopio (dependerá del modelo y marca) para dar el valor total de células somáticas por mL (Lagos, 1998). Las muestras se evaluaron 1 vez por semana durante un mes.

Determinación metabolitos en mezcla de aceites esenciales y residualidad en leche

El análisis de la presencia de los compuestos mayoritarios de la mezcla empleada de aceites esenciales y la residualidad de metabolitos en leche posterior al tratamiento (30 días), se desarrolló por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS). La muestra fue diluida e inyectada directamente al equipo cromatográfico en modo Split Viny=2µL. El equipo empleado es un cromatógrafo de gases AT 7890 Series Plus acoplado a un detector de masas MSD 5975, con una columna de análisis DB-5ms. La identificación de los compuestos de los aceites esenciales se realizó de acuerdo a sus espectros de masas y la base de datos de Adams, Wiley y NIS. La muestra de leche fue analizada al final del estudio en el día 30 a partir de una mezcla homogenea de cada animal en el laboratorio de cromatografía de la Universidad Industrial de Santander.

Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico IBM SPSS, para determinar diferencias significativas entre los dos tratamientos y el programa GRAMNO 7.12 para el tamaño de la muestra.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bioensayo con *Artemia salina*

El ensayo con *Artemia salina* se recomienda por su bajo costo, facilidad de implementación y bioindicador efectivo. Los efectos en la *Artemia salina* fueron registrados en proporción a las concentraciones de 440, 220, 110, 22, 11, 5.5 y 2.75 µg/mL con una correlación de R: 96.4% para *L. organoides* y 92,1% para *L. citriodora* a 24 h.

De acuerdo con lo anterior, la CL₅₀ de los aceites esenciales y la confiabilidad de esta

estimación se muestran en la Tabla N° 3, así como la CL₅₀ de algunos agentes antimicrobianos de referencia. Se puede observar que los valores CL₅₀ del aceite esencial de *Lippia organoides* en relación a otros aceites evidencia su capacidad y potencial (Pérez y Lazo, 2010). De otra parte, los valores obtenidos de los aceites esenciales de *Lippia citriodora* y *Lippia organoides* fueron similares a agentes fúngicos como el Itraconazol, y mucho menos nocivo que agentes antimicrobianos de productos comerciales como el Triclosan.

Tabla N° 3

CL₅₀ aceites esenciales y agentes antimicrobianos de referencia para la *Artemia salina*

Aceite esencial o sustancia química	CL ₅₀ µg/mL a 24h	Nivel de confianza
AE. <i>Lippia organoides</i>	19,39	96,4%
AE. <i>Lippia citriodora</i>	10,05	92,1%
Agente antimicrobiano	CL ₅₀ µg/mL a 24h	Fuente
Ketoconazol (dosis perros 10 mg/kg*d)	38.5	Iannacone et al., 2016
Clotrimazol (2.31mg/d)	37.1	
Triclosan (0.3%)	1.34	
Itraconazol	19.8	
Oxitetraciclina (dosis bovinos 10-20 mg/Kg peso vivo)	923	
DMSO	8.5	Geethaa et al., 2013

Aunque el valor esté muy por encima de antibióticos como la Oxitetraciclina, que se emplea en el tratamiento de infecciones comunes en bovinos a dosis de 10-20 mg/kg peso vivo. La concentración a las que se pretende emplear un producto desinfectante preventivo para mastitis está por debajo de los valores que se emplean los productos convencionales, haciendo la fórmula segura para el ensayo *in vivo* en bovinos productores de leche.

Ensayo *in vivo*

Para el ensayo en bovinos, el producto fue aplicado posterior al ordeño con una frecuencia de 2 veces al día. Se determinaron los metabolitos de los aceites esenciales más representativos presentes en la mezcla, siendo los de mayor relevancia: el timol, carvacrol, geranial y neral como se indica en la Tabla N° 4 y en la Figura N° 1.

Tabla N° 4

Caracterización mezcla aceites esenciales

tR, min	Identificación tentativa	Cantidad relativa, %
12,02	Dimetil sulfóxido	0,7
17,93	No identificado	0,1
27,12	Glicerina	98,2
28,74	Timol metil éter	tr
29,1	Neral	0,1
30,15	Geranial	0,1
30,96	Timol	0,4
31,29	Carvacrol	0,3
36,16	trans-β-Cariofileno	tr
37,42	α-Humuleno	tr

File :E:\OPS_Crom-Mass_2020\7\990697\200625RS\990697-06-AI-3.D
 Operator : Elena Stashenko-UIS
 Acquired : 1 Jul 2020 13:26 using AcqMethod AESPLIT.M
 Instrument : GC - 05
 Sample Name: 990697-06-AI-3
 Misc Info : MEZCLA No 1 oregano de monte + cidron en glic
 Vial Number: 17

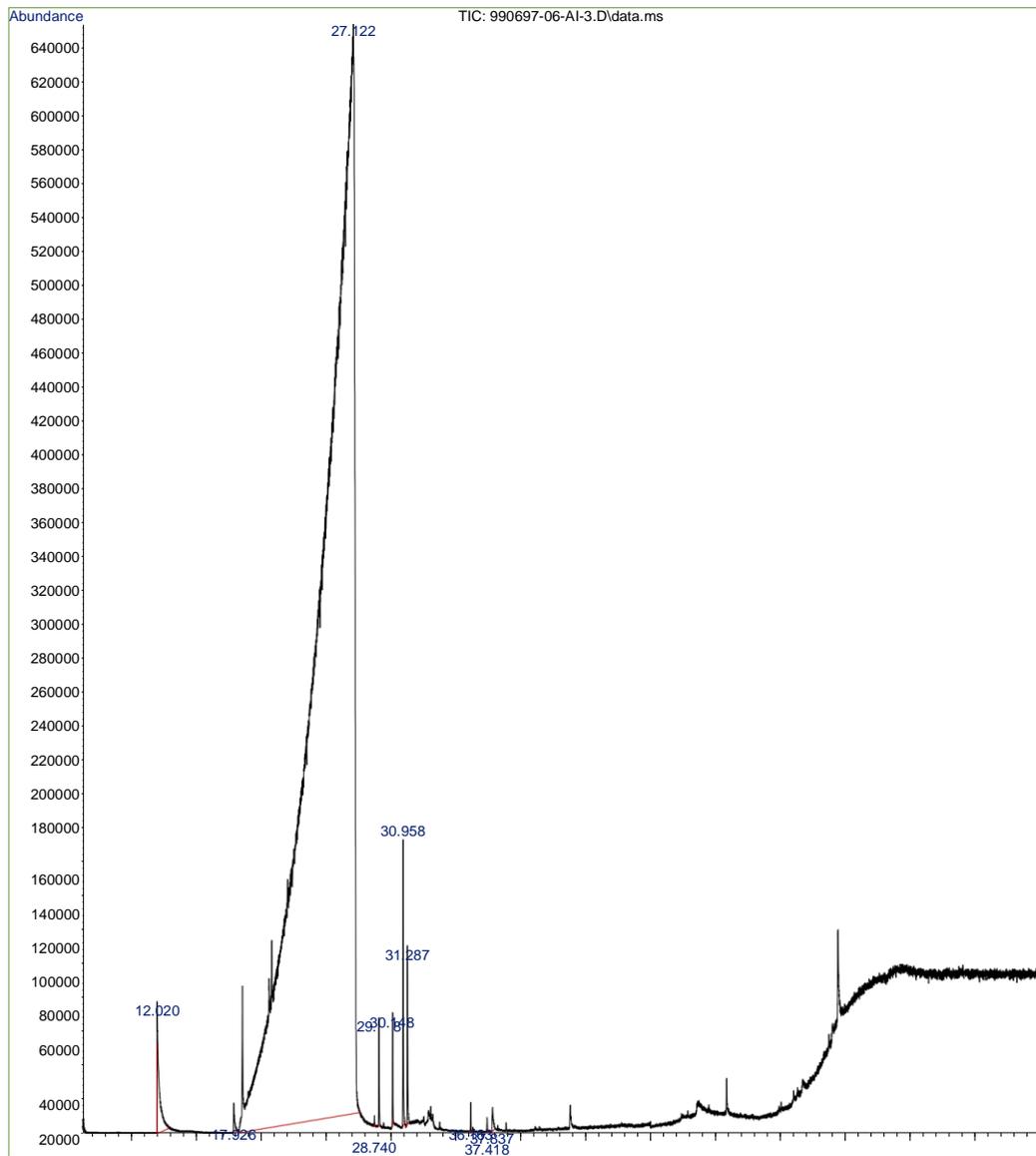


Figura N° 1
Cromatograma mezcla base aceites esenciales
columna de análisis DB-5ms - 5%Ph-PDMS 60 m*0.25 mm*0.25 µm

El seguimiento y análisis se realizó en un periodo de 30 días, a través de las siguientes variables el recuento de células somáticas con ensayo semanal, la hipersensibilidad al producto mediante la evaluación de grietas, irritación, o algún cambio nocivo post ordeño y la residualidad en leche del producto.

Se puede observar en la siguiente Figura N° 2, que el número de pezones sanos con células somáticas/mL (CCS/mL) fue menor a 200 mil durante la primera semana con el producto a base de aceites esenciales. Sin embargo, con el transcurso de las semanas el número de pezones sanos fue disminuyendo, incrementándose los casos de pezones

con leche en trazas o con alguna inflamación. A pesar de lo anterior al final del estudio 30 de los 40 pezones se mantuvieron con valores normales, 6 con valores en trazas el cual pudo ser generado por una lesión en el ordeño o infección, y 4 casos con valores altos CCS/mL; teniendo una efectividad del 75% del producto en la prevención de mastitis.

En contraste con el control a base de yodo, se evidenció que desde la primera semana había pezones con valores superiores a 200 mil CCS/mL; y al final del ensayo únicamente 25 pezones mantuvieron valores normales, es decir una efectividad del 62.5%, esto concuerda con lo reportado en otros estudios para este tipo de productos (Rodríguez, 2016).

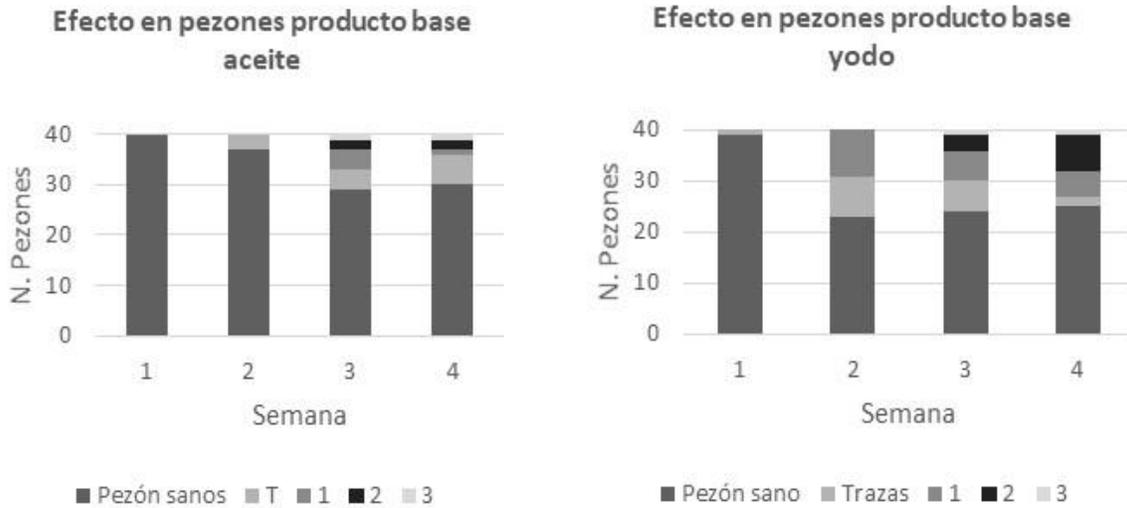


Figura N° 2

Efecto en pezones producto a base de aceites esenciales / yodo. Clasificación según CCS/mL: Pezones sanos < 200.000 CCS/mL; T (200.000-400.000); 1 (400.000 -1.200.000); 2 (1.200.000 – 5.000.000) y 3 (Mayor a 5.000.000) (Mellenberger, 2019)

Con el producto a base de yodo, 8 de 40 pezones tuvieron rango de CCS/mL superior a 1.200.000, observándose irritación en el seguimiento diario en dónde se realizaba una evaluación visual del estado. En contraste, ninguno de los pezones tratados con el producto a base de aceites esenciales mostró enrojecimiento, hinchazón, apertura del orificio, grietas o fisuras, rugosidad o callosidad durante el periodo de evaluación. Esto puede ser consecuencia al efecto corrosivo del yodo que se incrementa por las condiciones climáticas de la zona de estudio que se caracteriza por temporadas de lluvias, niebla y frío, lo cual incrementa este efecto. Lo anterior se mitiga por

la mezcla glicerol-aceite esencial dada la naturaleza antiinflamatoria de estos extractos (Armas et al., 2015).

Igualmente, se evaluó la residualidad en leche mediante una mezcla homogénea de submuestras de leche por pezón, determinando la presencia de compuestos mayoritarios de aceites esenciales en leche posterior a la aplicación durante los 30 días de ensayo. Se desarrolló por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS) como se muestra en la Figura N° 3. Sin embargo, no se encontraron metabolitos de aceites esenciales en leche.

```

File       :W:\msdchem\1\DATA\2020\GC-05\Cristian\990962 FE 2020-09-29-F
...       R 2020-11-18\200917SPS\990962-03-BO 1.D
Operator  :
Instrument : GC - 05
Acquired  : 17 Sep 2020 10:49      using AcqMethod AESPLITSPME.M
Sample Name: Muestra leche
Misc Info : Fibra rosada 65 um

```

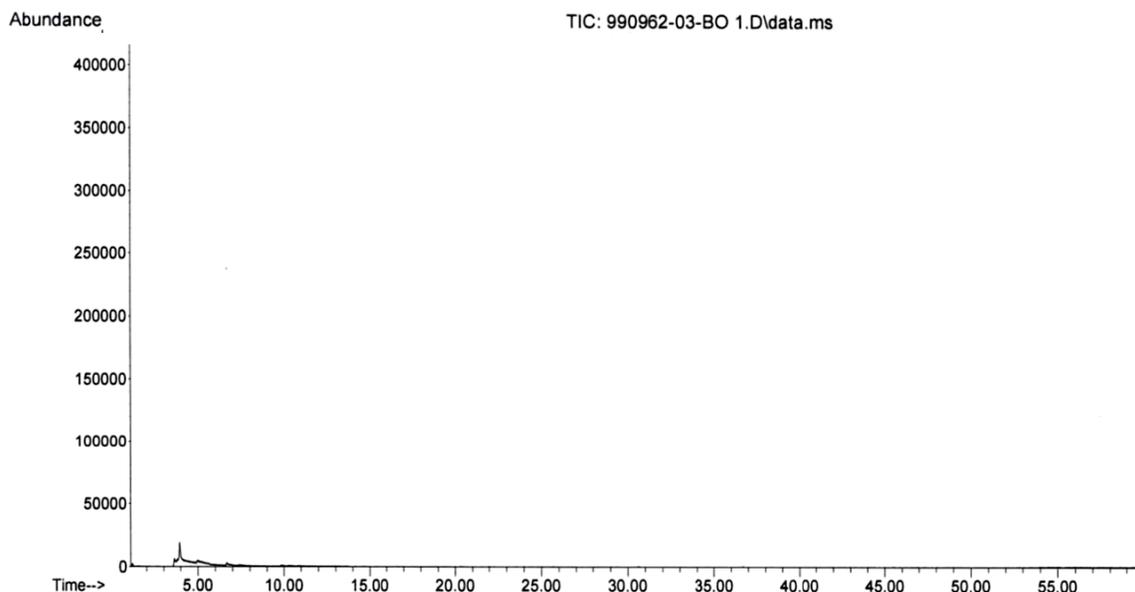


Figura 3
Cromatograma residualidad de aceites esenciales en leche
columna de análisis DB-5ms - 5%Ph-PDMS 60 m*0.25 mm*0.25 μ m

A diferencia de los productos comerciales de administración intramamaria o tópica que registran residualidad en leche, dada la baja concentración de los aceites esenciales empleados en este producto, inferior al 0.5%, es seguro y no requiere tiempos de espera, en contraste con las concentraciones de productos empleados para el tratamiento de mastitis con aceites esenciales, que son del 3-15% para el caso del *Uddersol* (Ralco Nutrition, 2020) o contenido de timol del 10% para el caso del producto *Phyto-Mast* (Karreman, 2012) que generan residualidad en plasma y leche de acuerdo con estudios previos (Mason *et al.*, 2018).

Con el propósito de encontrar diferencias significativas entre los dos tratamientos, se validó con el programa estadístico SPSS, encontrando mediante el análisis de tabla cruzada que en mayor porcentaje

de casos de CCS en valores normales se obtuvieron en el tratamiento con aceite esencial en comparación al tratamiento control a base de yodo como se observa en la Tabla N° 5.

Al evaluar el riesgo estimado (Tabla N° 6), se encuentra una ventaja en el tratamiento de aceites esenciales frente al tratamiento convencional, sin embargo, esta ventaja no es significativa (Tabla N° 7), de acuerdo con el intervalo de confianza y el nivel de significancia mayor a 0.05 en la prueba de Chi-cuadrado. Sin embargo, con los resultados obtenidos y evaluando el tamaño de la muestra en Gramno 7.12 para encontrar una diferencia significativa con un riesgo alfa de 0.05 y una odds ratio mínima de 1.8, se debe aumentar el número de pezones mínimo a 230 para poder concluir que el tratamiento con aceites esenciales es superior al tratamiento convencional.

Tabla N° 5
Cruzada VAR00001*VAR00002

Recuento		VAR00002		Total
		CCS	CCS	
		Normal	Anormal	
VAR00001	Tratamiento aceite esencial	30 _a	10 _a	40
	Tratamiento convencional Yodóforo	25 _a	15 _a	40
Total		55	25	80

Cada letra del subíndice denota un subconjunto de VAR00002 categorías cuyas proporciones de columna no difieren de forma significativa entre sí en el nivel ,05.

Tabla N° 6
Estimación de riesgo

	Valor	Intervalo de confianza de 95 %	
		Inferior	Superior
Razón de ventajas para VAR00001 (Tratamiento Aceite esencial / Tratamiento convencional Yodóforo)	1,800	,689	4,702
Para cohorte VAR00002 = CCS Normal	1,200	,890	1,619
Para cohorte VAR00002 = CCS Anormal	,667	,341	1,302
N de casos válidos	80		

Tabla N° 7
Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	1,455 ^a	1	,228		
Corrección de continuidad ^b	,931	1	,335		
Razón de verosimilitud	1,462	1	,227		
Prueba exacta de Fisher				,335	,167
Asociación lineal por lineal	1,436	1	,231		
N de casos válidos	80				

a. 0 casillas (0,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 12,50.

b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2

Finalmente, como no se encontraron diferencias significativas entre los dos tratamientos, el ensayo *in vivo* permite evidenciar que ambos tratamientos son igualmente efectivos para mantener el conteo de células somáticas en leche dentro de los rangos normales.

CONCLUSIONES

Los aceites esenciales de *Lippia origanoides* y *Lippia citriodora* pueden ser posibles alternativas para el desarrollo de productos agropecuarios con resultados prometedores para la prevención de mastitis, se requiere profundizar en las investigaciones para

confirmar que no presentan efectos nocivos en pezones, ni residualidad en leche a concentraciones inferiores al 0.5%.

AGRADECIMIENTOS

La investigación fue desarrollada gracias al apoyo financiero de Minciencias y la Universidad Nacional de Colombia y Unilabs, a través del Proyecto 66740.

REFERENCIAS

- Choi JY, Damte D, Lee SJ, Kim JC, Parkotros SC. 2012. Antimicrobial activity of lemongrass and oregano essential oil against standard antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* and field isolates from chronic mastitis cow. **Int J Phytomed** 4: 134 - 139.
- Gomes F, Martins N, Barros L, Rodrigues ME, Oliveira BPP, Henriques M, Ferreira ICFR. 2018. Plant phenolic extracts as an effective strategy to control *Staphylococcus aureus*, the dairy industry pathogen. **Ind Crops Prod** 112: 515 - 520. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.12.027>
- Iturriaga L, Olabarrieta I, Marañón IM. 2012. Antimicrobial assays of natural extracts and their inhibitory effect against *Listeria innocua* and fish spoilage bacteria, after incorporation into biopolymer edible films. **Int J Food Microbiol** 58: 58 - 64.
- Jareerat Aiemsard SA, Aromdee C, Taweechaisupapong S, Khunkitti W. 2011. The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their mechanisms of action on *Staphylococcus aureus* DMST 4745. **Res Vet Sci** 91: 31 - 37.
- Karreman HJ. 2012. **Your organic dairy herd health toolbox** <https://eorganic.info/sites/eorganic.info/files/u461/Karremane-Organic%20webinar%207-16-2012.pdf>
- Lagos CR. 1998. **Determinación de células somáticas en calostro post-parto de vacas de lechería mediante dos métodos de recuento**. Tesis, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Lopes TS, Fontoura PS, Oliveira A, Rizzo FA, Silveira S, Streck AF. 2020. Use of plant extracts and essential oils in the control of bovine mastitis. **Res Vet Sci** 131: 186 - 193. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.04.025>
- Madrid-Garcés TA, Parra-Suescún JE, López-Herrera A. 2017. La inclusión de aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides*) mejora parámetros inmunológicos en pollos de engorde. **Biotechnol Sector Agrop Agroind** 15: 75 - 83.
- Madrid-Garcés TA, López-Herrera A, Parra-Suescún JE. 2018. Efecto de la inclusión de aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides*) sobre perfil lipídico en carne de pollos de engorde. **Vitae** 25: 75 - 82.
- Marcelo NA, Andrade VA, Souza CN, Mourão RP, Mourthe MHF, Silva JMV, Xavier AREO, Xavier MAS, Faraco AAG, Almeida AC. 2020. Efficacy of novel antiseptic product containing essential oil of *Lippia origanoides* to reduce intramammary infections in cows. **Vet World** 13: 2452 - 2458. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.2452-2458>
- Mason SE, Mullen KAE, Washburn SP, Anderson KL, Baynes RE. 2018. Comparison of the pharmacokinetics of plant-based treatments in milk and plasma of USDA organic dairy cattle with and without mastitis. **Food Addit Contaminants** 35: 1716 - 1727. <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1502475>
- McPhee CS, Anderson KL, Yeatts JL, Mason SE, Barlow BM, Baynes RE. 2011. Milk and plasma disposition of thymol following intramammary administration of a phytoceutical mastitis treatment. **J Dairy Sci** 94: 1738 - 1743. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3988>
- Mellenberger R. 2019. **Hoja de información de la prueba de mastitis californiana (CMT)** https://milkquality.wisc.edu/wp-content/uploads/sites/212/2011/09/hoja-de-informacion-de-la-pruebe-de-mastitis-californiana_spanish.pdf
- Meyer B, Ferrigni N, Putnam J, Jacobsen L, Nichols D, McLaughlin J. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Med** 45: 31 - 34. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971236>
- Mundy L, Pendry B, Rahman M. 2016. Antimicrobial resistance and synergy in herbal medicine. **J Herbal Med** 6: 53 - 58.
- Pérez OP, Lazo FJ. 2010. Ensayo de artemia: Útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. **Rev Protec Veg** 25: 34 - 43.
- Dal Pozzo M, Santurio DF, Rossatto L, Vargas AC, Alves SH, Loreto ES, Viegas J. 2011. Activity of essential oils from spices against *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis. **Arq Bras Med Vet Zootec** 63: 1229 - 1232.
- Ralco Nutrition. 2020.

https://84aabc65-7eec-46d6-9519-1b970382e95c.usrfiles.com/ugd/84aabc_c7261555417b489aa1ca710cc121c1a1.pdf

- Rodríguez EV. 2016. **Evaluación de tres selladores de barrera para el control de células somáticas e incidencia de mastitis en bovinos de leche en San Rafael de vara blanca, heredia.** Tesis, Instituto Tecnológico de Costa Rica, San Carlos, Costa Rica.
- Rojas LB, Velasco J, Díaz T, Gil Otaiza R, Carmona J, Usubillaga A. 2010. Composición química y efecto antibacteriano del aceite esencial de *Aloysia triphylla* (L'Hér.) Britton contra patógenos genito-urinarios. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 9: 56 - 62.
- Stashenko EE, Martínez JR, Ruíz CA, Arias G, Durán C, Salgar W, Cala M. 2010. *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. **J Sep Sci** 33: 93 - 103. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900452>
- WHO. 2016. **Resistencia antimicrobial.** <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/es>
- Wei Z, Zhou E, Guo C, Fu Y, Yu Y, Li Y, Yao M, Zhang N, Yang Z. 2014. Thymol inhibits *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells by inhibiting NF-kB activation. **Microb Pathog** 71-72: 15 - 19. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.01.004>