

ACEITES ESENCIALES EN EL CONTROL DE LAS PATOLOGÍAS AVIARES

Dra. Belén Huerta Lorenzo

Profesora del Departamento de Sanidad Animal

Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba

Introducción

Los aceites esenciales (AE) son sustancias olorosas obtenidas a partir de plantas y especias, comercializadas para su administración en el pienso como conservantes y aditivos alimentarios. Entre sus propiedades beneficiosas para el metabolismo animal destacan:

- Aumento del consumo de pienso y la digestibilidad de los nutrientes, por estimulación de la secreción de enzimas digestivas y la motilidad gastrointestinal.
- Mayor retención de nitrógeno.
- Efecto antioxidante y antiinflamatorio.
- Estimulación inespecífica del sistema inmune.
- Efecto coccidiostático.
- Propiedades antibacterianas, antivíricas y antifúngicas (Quiles y Hevia, 2007).

La presencia de una o más de estas propiedades en un AE viene determinada por su composición química (o quimiotipo), en la que intervienen un amplio número de compuestos volátiles, como terpenos, alcoholes, aldehidos, cetonas o fenoles. La proporción en la que está presente cada uno de estos principios depende a su vez de la variedad vegetal y el órgano de la planta (raíz, hojas, flores), el estado de maduración, las condiciones de cultivo y extracción, y la forma de almacenamiento del aceite (Panizzi y cols., 1993). Así por ejemplo, es posible encontrar hasta 3 quimiotipos del aceite de romero con propiedades biológicas, aplicaciones médicas e índices de toxicidad totalmente diferentes (*Rosmarinus officinalis* quimiotipo alcanfor: con

propiedades antiinflamatorias; *Rosmarinus officinalis* quimiotipo cineol: usado como antiséptico y mucolítico del aparato respiratorio, *Rosmarinus officinalis* quimiotipo verbenona: hepatoprotector) (Peñalver, 2005).

Si bien el nombre del quimiotipo hace referencia al compuesto presente en mayor concentración, algunos estudios demuestran que son los principios presentes en trazas los que determinan, por un efecto sinérgico, su actividad antimicrobiana, de tal forma que el AE completo tiene mayor eficacia que cualquiera de sus componentes de forma aislada. Así mismo, para que un producto comercial alcance todas las propiedades beneficiosas debe combinar varios AE, e incluso en este caso, se recomienda utilizarlo con otros aditivos naturales (prebiótico, probióticos, ácidos orgánicos, etc.) a fin de disminuir los niveles de aceite en el pienso y reducir el coste y el riesgo de toxicidad (Mourey y Canillac, 2002; Burt, 2004; Lahlou, 2004).

Ensayos de sensibilidad *in vitro*

Hasta la fecha, la mayoría de los estudios realizados sobre las propiedades antimicrobianas de los AE se han centrado en microorganismos patógenos para el hombre y microorganismos presentes en los alimentos, por su implicación en toxiinfecciones alimentarias y su capacidad para alterar las propiedades organolépticas de los alimentos (Hammer y cols. 1999; Rota y cols., 2004). Todos ellos destacan la mayor sensibilidad de las bacterias gram positivas, especialmente *S. aureus* y *L. monocytogenes*, en comparación con las bacterias gram negativas, encontrando dentro de este grupo notables diferencias dependiendo de la cepa y la variedad de aceite utilizados en el estudio (Carson y cols., 1995; Kalemba y Kunicka, 2003). Nuestros trabajos utilizando cepas de *E. coli*, *Salmonella Enteritidis*, *Pseudomona aeruginosa* y *Mannheimia haemolytica*, aisladas de brotes clínicos e infecciones subclínicas en broilers, han confirmado los resultados hallados por estos investigadores sobre la resistencia de *P. aeruginosa* a los aceites esenciales, y la eficacia de los aceites de canela, clavo, orégano y tomillo (variedad *Thymus zygis*) frente a las cepas de *Salmonella Enteritidis* y *M. haemolytica* (CMB < 0'2% y 0'5% v/v, respectivamente). *Tabla 1.*

Tabla 1. Valores de CMB (% v/v) obtenidos frente a las cepas tipo de *Salm. Enteritidis* (CECT 7159 y 7160), *M. haemolytica* y *E. coli*.

ACEITE ESENCIAL	S. Enteritidis 7159	S. Enteritidis 7160	<i>M. haemolytica</i>	<i>E. coli</i>
Ajedrea (Albania)	0,437	0,375	ND	2
Ajedrea (España)	> 4	> 4	ND	0,25
Alcaravea	0,140	0,25	4	> 4
Árbol del té	0,5	0,375	ND	ND
Cajeput (Vietnam)	1,125	0,75	ND	ND
Canela hojas	0,085	0,093	ND	4
Cilantro	0,187	0,187	2	2
Clavo (Indonesia)	0,085	0,125	0,06	2
Clavo (Madagascar)	0,218	0,140	ND	4
Comino	1,25	1,5	4	> 4
Cúrcuma	> 4	> 4	ND	> 4
Estragón	0,109	0,187	1	2
Geranio (Egipto)	4	4	ND	> 4
Mejorana	2,5	0,5	0,5	4
Menta piperita	2,75	0,5	4	4
Mostaza	0,140	0,25	0,03	0,25
Mostaza amarilla	0,140	0,125	ND	1
Niaouli	3	4	ND	ND
Nuez moscada	> 4	> 4	4	2
Orégano	0,187	0,093	ND	4
Palmarosa	0,875	0,375	ND	> 4
Paprika	> 4	> 4	ND	ND
Pimienta	> 4	> 4	> 4	> 4
Resinoide de Benjuí	> 4	4 ± 0	ND	> 4
Romero	3,5	2,125	0,5	> 4
Tomillo salsero	0,343	0,25	ND	4
Verbena	1,375	0,5	2	4

Sin embargo, los resultados de estos ensayos realizados con más de 27 aceites esenciales, mostraron una escasa inhibición de la cepa de *E. coli*. Todos los AE con excepción de la mostaza y la ajedrea de origen español, presentaron una CMB > 2%, valores muy superiores a los descritos para las cepas de referencia y las cepas aisladas de alimentos y humana. No obstante, en varias ocasiones en las que se han remitido a nuestro Servicio de Diagnóstico animales con problemas entéricos causados por cepas multirresistentes de *E. coli*, la utilización de un producto comercial elaborado a base de aceite esencial de clavo logró controlar la infección y mejorar el crecimiento de los animales (Comunicación personal).

Al analizar los resultados de nuestros estudios observamos asimismo que algunos aceites, como la mejorana y la menta piperita, varían significativamente su comportamiento dependiendo de la bacteria. Así, en los ensayos con la cepa 7159 de *S. Enteritidis* la inhibición del crecimiento se producía a una concentración menor del 0'75%, mientras que la CMB se incrementaba hasta niveles potencialmente tóxicos al enfrentarlos a la cepa 7160 (CMB >2,5%). Al igual que sucede que con los antibióticos, la utilización de los AE como antimicrobianos exige la realización de un ensayo de sensibilidad previo frente a las bacterias implicadas en los problemas entéricos.

Valoración del efecto inóculo

No obstante, debemos recordar que la actividad *in vitro* de un antimicrobiano puede no corresponderse siempre con su eficacia *in vivo*. Es posible que como consecuencia de la dilución y absorción del fármaco en estómago, intestino y sangre, la concentración alcanzada a nivel de intestino delgado por el constituyente activo sea sólo 1/20 o menos de la dosis inicial. Así mismo, la virulencia y sensibilidad de la bacteria frente al antimicrobiano y el número de microorganismos presentes en el sitio de infección puede variar significativamente la eficacia de un producto, de forma que un aumento de la dosis infectante haga necesario concentraciones mayores para lograr la inhibición (Palavecino, 1997).

En el caso de las salmoneras, se sabe que aunque son muy elevadas las tasa de animales portadores, la enfermedad clínica no suele manifestarse hasta que se produce una multiplicación de la bacteria en el intestino, como consecuencia de un factor estresante, alcanzando dosis de 10^6 a 10^8 .

Nuestros ensayos realizados para valorar el efecto que sobre la actividad antimicrobiana podría tener un incremento en la concentración del inóculo hasta dosis de 10^8 ufc/ml, mostraron que todos de los aceites menos la canela sufrían un descenso en su capacidad de inhibición, con un incremento en la CMB de dos, e incluso cuatro diluciones. *Tabla 2.*

Tabla 2. CMB de los aceites de canela, clavo y orégano frente a los dos inóculos de *Salm. Enteritidis*.

	CMB (% v/v)			
	Canela	Clavo Indonesia	Clavo Madagascar	Orégano
10^6 ufc/ml cepas 7159 / 7160	0,085 / 0,093	0,085 / 0,125	0,218 / 0,140	0,187 / 0,093
10^8 ufc/ml cepas 7159 / 7160	1,125 / 0,75	1,312 / 0,625	2 / 0,5	4 / 0,5

Los buenos resultados de los aceites esenciales de canela, clavo y orégano para ambos inóculos de *S. Typhimurium*, apoyan su posible aplicación a dosis única tanto en la profilaxis, para disminuir la carga microbiana de los animales portadores (10^6 ufc/mL), como en el tratamiento de los animales enfermos (Gutiérrez, 2006).

Ensayos *in vivo*

Las conclusiones de este estudio sirvieron como referencia en diversas pruebas clínicas y de campo con gallinas ponedoras infectadas con *Salmonella Enteritidis*, a las que se les administró un preparado aromático elaborado a base de aceite de clavo. Los resultados de ambos ensayos mostraron una

reducción en la infección experimental (con 10^3 ufc/ml) del 4% y la ausencia total de salmonelas en las heces de las gallinas alimentadas con este compuesto (Huerta y cols., 2005). Trabajos similares realizados por Mitsch y cols. (2004) con diversos aceites frente a *Clostridium perfringens* señalan un descenso de hasta el 20% en la colonización intestinal por este microorganismo.

No obstante, un estudio realizado recientemente por Dušan y cols. (2006) para valorar la actividad antimicrobiana frente a *E. coli*, así como la citotoxicidad de los aceites de canela, clavo, tomillo y orégano, establece que la administración de los mismos a dosis superiores al 0'05% ocasiona daños importantes en la estructura celular, recomendando reducir la cantidad al 0'01%. A esta concentración, los aceites disminuían significativamente el efecto citotóxico ocasionado por *E. coli* sobre las líneas celulares, y en el caso del orégano, lograba además la inhibición de su crecimiento. Sin embargo, tanto el orégano como el tomillo incrementaban el porcentaje de muerte celular, si bien las células dañadas serían posiblemente sustituidas mediante apoptosis. Ni el clavo ni la canela causaron lesiones significativas sobre las células.

Las variaciones descritas en la eficacia de los AE vienen a confirmar la necesidad de utilizarlos de forma combinada y de realizar estudios de sensibilidad específicos para cada proceso, teniendo en cuenta que factores como la cepa bacteriana y el origen del aceite (y en consecuencia su quimiotipo) influyen notablemente en su actividad antimicrobiana. Debemos recordar asimismo, que los valores de CMI y CMB obtenidos *in vitro* deben tomarse siempre como una referencia para el cálculo de su administración en pienso, siendo necesarios ensayos clínicos y pruebas de campo para determinar tanto su eficacia y palatabilidad, como la presencia de residuos y efectos adversos sobre el organismo.

Validez de los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*

Las pruebas *in vitro* constituyen por tanto, el primer paso en la valoración de cualquier aceite esencial, y sin embargo, no existe actualmente un protocolo

de trabajo estándar. Dependiendo del autor, los ensayos de dilución en caldo se realizan con distintos emulsionantes, aplicando diferentes criterios para la determinación de la CMI y CMB (en ocasiones consideran ambos términos equivalentes) y expresando los resultados en unidades de medida muy dispares (% v/v, % p/v, µl/ml, g/ml). En estas condiciones, la comparación de datos se hace muy difícil.

Al comenzar nuestra línea de investigación, constatamos asimismo que no existía ningún trabajo sobre la fiabilidad de las técnicas de ensayo, y en consecuencia sobre la validez de los resultados hallados. Con este fin, iniciamos un estudio epidemiológico del método de microdilución en caldo, en el que comprobamos que si bien la fiabilidad de la técnica era considerablemente alta al determinar la CMB (valor kappa $0'695 \pm 0'065$), la turbidez mostrada por algunos aceites al mezclarlos con el caldo dificultaba la determinación de la CMI con los procedimientos habituales de densidad óptica y colorimetría. Diversos estudios publicados en este sentido proponen actualmente la utilización de técnicas de impedancia para determinar el crecimiento bacteriano en el caldo (Marino y cols., 2001).

Conclusiones

- Los aceites esenciales pueden constituir una alternativa eficaz a los antimicrobianos tradicionales en el control de las infecciones animales, con la ventaja de carecer de efectos secundarios y residuos alimentarios, si bien es fundamental realizar ensayos de sensibilidad previos.
- Debemos ser conscientes de la necesidad de progresar en la puesta a punto de las técnicas utilizadas para valorar la eficacia *in vitro* de estas sustancias.
- Los ensayos clínicos y pruebas de campo iniciales demuestran la eficacia de los aceites esenciales en la inmunoestimulación y control de las infecciones animales, recomendándose sin embargo su continuidad para valorar aspectos como toxicidad, dosis de administración, interacción con otros antimicrobianos, efecto sobre la flora microbiana del intestino, etc.

BIBLIOGRAFÍA

- BURT, SARA. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. *International Journal of Food Microbiology* 94: 223-253
- CARSON C.F., HAMMER K.A., RILEY T.V. 1995. Broth micro-dilution method for determining the susceptibility of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Microbios* 82: 181-185
- DUŠAN F., SABOL M., DOMARACKA K. AND BUJNAKOVA D. 2006. Essential oils: their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. *Toxicology in vitro* 20: 1435-1445
- GUTIÉRREZ J. 2006. Estudio de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales frente a diferentes serotipos de *Salmonella* spp. *Tesina de Licenciatura*. Universidad de Córdoba
- HAMMER K.A., CARSON C.F. AND RILEY T. V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* 86: 985-990
- HUERTA B., F. PONSÁ, G. ORDÓÑEZ, N. FERNÁNDEZ Y P. PEÑÁLVER. 2005. Estudio de eficacia de aceites esenciales ante una infección experimental de *Salmonella* Enteritidis en gallinas ponedoras en producción. XLII Symposium de Avicultura Científica. Cáceres, España.
- KALEMBA D. and KUNICKA A. 2003. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry* 10: 813-829
- LAHLOU M. 2004. Methods to study the Phytochemistry and Bioactivity of Essential Oils. *Phytotherapy Research* 18: 435-448
- MARINO M., BERSANI C. AND COMI G. 2001. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *International Journal of Food Microbiology* 67 (3): 187-95
- MITSCH, P., ZITTERL-EGLESEER, K., KOHLER, B., GABLER C., LOSA R. AND ZIMPERNIK I. 2004. The effect of two different blends of essential oil components on the proliferation of *Clostridium Perfringens* in the intestines of broiler chickens. *Poultry Science* 83 (4): 669-75
- MOUREY A. AND CANILLAC N. 2002. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food Control* 13: 289-292
- PALAVECINO E. 1997. Interpretación de los estudios de susceptibilidad antimicrobiana. Boletín Escuela de Medicina. *Pontificia Universidad Católica de Chile* 26: 156-160
- PANIZZI L., FLAMINI G., CIONI P.L. AND MORELLI I. 1993. Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae. *Journal of Ethnopharmacology* 39: 167-170
- PEÑÁLVER P. 2005. Aromaterapia. 1ª Edición. Ed. Lidervet S.L. Tarragona. España.
- QUILES A. Y HEVIA M.L. 2007. Claves para abordar con éxito la prohibición de los APC en porcino: Estrategias nutricionales. *Producción Animal* 228:33-51
- ROTA C., CARRAMIÑANA J., BURILLO J. AND HERRERA A. 2004. *In Vitro* Antimicrobial Activity of Essential Oils from Aromatic Plants against Selected Foodborne Pathogens. *Journal of Food Protection* 6 (67): 1252–1256