



ESTUDIO PRELIMINAR DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE UN DESINFECTANTE A BASE DE ACEITE ESENCIAL DE CLAVO DE OLOR SOBRE EL *STAPHYLOCOCCUS COAGULASA POSITIVA* AGENTE DE MASTITIS BOVINA

PRELIMINARY STUDY OF THE ANTIMICROBIAL EFFECT OF A CLOVE ESSENTIAL OIL-BASED DISINFECTANT ON *STAPHYLOCOCCUS COAGULASA POSITIVE* AGENT OF BOVINE MASTITIS

¹ Luz Marina Pulido Peñaloza

² Alfredo Martínez Jaraba

Recibido: junio 12, 2020;
Aceptado: diciembre 14, 2020

Resumen

La mastitis bovina es una enfermedad que reduce la producción de leche en todo el mundo. Existen diversas causas, como las de origen bacteriano, principalmente por *Staphylococcus coagulasa positivo*. El tratamiento con antibióticos es la opción y la desinfección de las áreas de ordeño es la herramienta de prevención. El uso de sustancias naturales con características antimicrobianas se ha incorporado a los procesos de desinfección para minimizar la toxicidad de productos químicos.

El objetivo de este estudio fue evaluar la efectividad de un desinfectante a base de aceite esencial de clavo de olor sobre *S. coagulasa positiva*, causante de la mastitis bovina. El estudio fue experimental y se realizó en el laboratorio de microbiología del Sena-Cedagro; por triplicado, se desarrollaron extracciones de aceite esencial de clavo de olor por hidrodestilación. A partir de estas, se prepararon tres soluciones de diferentes concentraciones: 50 mg/ml (T3), 100 mg/ml (T2) y 150 mg/ml (T1). La acción bactericida *in vitro* se evaluó mediante difusión en agar frente a cepas de *Escherichia coli*, *S. aureus* y *Salmonella typhimurium* sobre discos de papel filtro. Se observaron halos de inhibición de mayor diámetro

1 Colombiana. Bacterióloga- Universidad Metropolitana. Especialista en Gestión de la Calidad- Magíster en Seguridad alimentaria y Nutricional- Universidad del Atlántico. Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA), Centro para el desarrollo agroecológico y agroindustrial – Sabanalarga (Atlántico)- Colombia. Instructor investigador Grupo de investigación GIPAMA. Líneas de investigación o Red de Conocimiento: Agroindustrial. Domicilio: calle 63B #15-66 (Barranquilla- Atlántico); 035-3043345; 3005033339; Email: lpulidop@sena.edu.co

2 Colombiano. Médico Veterinario y Zootecnista- Universidad de Córdoba. Especialista en Gerencia agroempresarial Universidad Santo Tomás. Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA) - Centro para el Desarrollo Agroecológico y Agroindustrial (CEDAGRO), Regional Atlántico. Sabanalarga (Atlántico)- Colombia Instructor- Investigador SENNOVA. Líneas de investigación o Red de Conocimiento: Pecuaria. Domicilio: Calle 41 #13-58 (Soledad- Atlántico); 3136150138. Email: amartinez@sena.edu.co

para *S. aureus* y *E. coli* que para *S. tiphymurium* en la concentración de 150 mg/ml. Se preparó un desinfectante de aceite esencial al 15% y se utilizó en superficies del área de ordeño donde el ganado vacuno tiene contacto directo con los equipos de la finca El Caney, así como el comúnmente utilizado hipoclorito de sodio a 100 ppm. Se tomaron hisopados antes y después de la desinfección, mostrando una disminución en el crecimiento de *S. coagulasa positiva* en ambos casos.

Estadísticamente, hubo diferencias significativas entre los resultados microbiológicos de las dos etapas experimentadas: en la acción bactericida del aceite esencial de clavo de olor sobre los microorganismos *S. aureus*, *E. coli* y *S. tiphymurium* y en los análisis microbiológicos en los que se utilizaron soluciones de clavo de olor e hipoclorito de sodio para la desinfección.

Palabras clave: Desinfección, microbicida, efectividad, ganadería, prevención

Abstract

Bovine mastitis is a disease that reduces milk production worldwide. There are several causes, such as those of bacterial origin, mainly *Staphylococcus coagulasa positive*. Antibiotic treatment is the option and disinfection of the tidying areas is the prevention tool. The use of natural substances with antimicrobial characteristics has been incorporated into disinfection processes to minimize the toxicity of chemical products. The objective of the study was to evaluate the effectiveness of disinfectant based on clove essential oil on *S. coagulasa positive*, the cause of bovine mastitis. The study was experimental and was carried out in the microbiology laboratory of SENA-CEDAGRO; in triplicate, extractions of clove essential oil were developed by hydrodesorption. From these, three solutions of different

concentrations were prepared: 50 mg / ml (T3), 100 mg / ml (T2) and 150 mg / ml (T1). The in vitro bactericidal action was evaluated by agar diffusion against *Escherichia coli*, *S. aureus* and *Salmonella tiphymurium* strains on filter paper discs. Inhibition halos of larger diameter were observed for *S. aureus* and *E. coli* than for *S. tiphymurium* at the concentration of 150 mg / ml. A 15% essential oil disinfectant was prepared and used on surfaces in the sorting area where cattle have direct contact with equipment on the El Caney farm, as well as the commonly used sodium hypochlorite at 100 ppm. Swabs were taken before and after disinfection, showing a decrease in the growth of *S. coagulasa positive* in both cases. Statistically, there were significant differences between the microbiological results of the two stages tested: in the bactericidal action of clove essential oil on *S. aureus*, *E. coli* and *S. tiphymurium* microorganisms and in the microbiological analyses in which clove and sodium hypochlorite solutions were used for disinfection.

Keywords: Disinfection, microbicide, effectiveness, livestock, prevention

1. Introducción

La mastitis bovina es una enfermedad que se caracteriza por causar importantes pérdidas económicas en la ganadería. Es causada por la inflamación de la glándula mamaria con múltiples síntomas para el animal, una disminución de la producción de leche de hasta el 60% y la trasmisión de microorganismos patógenos a los consumidores (Acosta Moreno, Mira Hernández, & Posada Arias, 2017). Hay que tener en cuenta que es una enfermedad multifactorial, pero en la mayoría de los casos su etiología corresponde a microorganismos patógenos presentes en las manos del ordeñador, en el agua y el entorno. Algunos autores afirman



que microorganismos *Gram positivos* como el *Streptococcus agalactiae*, pueden presentarse en el 23,9% y *Staphylococcus aureus* en el 10,2% (Ramírez, 2001). Existen dos tipos de mastitis subclínica y clínica (Gonzalo & Morales C, 2017).

Existen programas para prevenir y controlar de la mastitis, una vez diagnosticada la enfermedad, el tratamiento de elección es la aplicación de antibióticos de amplio espectro.

La presencia de *S. aureus* puede prevenirse garantizando unas buenas prácticas pecuarias, la limpieza y desinfección de los elementos de ordeño, así como el correcto lavado de manos de los trabajadores.

Los métodos de desinfección incluyen sustancias químicas como el cloro, el yodo y los amonios cuaternarios, todos estos productos se relacionan con la contaminación química de los alimentos cuando por excesos dejan residuos en las superficies desinfectadas. Por ello, en la actualidad se utilizan cada vez más productos naturales con propiedades antimicrobianas.

A las especias se les atribuyen propiedades bactericidas, antifúngicas y antivirales, que han dejado resultados favorables y por ello han sido ampliamente utilizadas en la industria de médica, cosmética y alimentaria (Aguilar González & López Malo, 2013).

De las sustancias con esas características, tenemos los aceites esenciales y sus componentes cuyas propiedades antibacterianas están siendo utilizadas en diversas áreas, el efecto parece estar relacionado con su carácter lipofílico, que lleva a la acumulación en las membranas y, posteriormente, a eventos asociados como el agotamiento de la energía. Presentan un efecto antibacteriano contra las bacterias *Gram negativas*, ya que ellas tienen una membrana externa rica en lipopolisacáridos que proporciona

una superficie hidrofílica (Granados, 2014).

Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), alimentaria (condimentos y saborizantes) y farmacéutica, (Argote, Suarez, Tobar, Perez, & Hurtado, 2017).

El clavo de olor, conocido por su gran aroma a picante, se ha utilizado como condimento y en la medicina herbaria. Siendo oriundo de Indonesia y de áreas remotas de Asia llamadas Islas de las Especies y Molucas (Sánchez, 2013).

Su aceite esencial ha sido ampliamente investigado debido a su popularidad, amplia disponibilidad y alto rendimiento. De hecho, el aceite de esta ha sido considerado por sus propiedades medicinales. Además, con base en lo que cita González (2013), posee efectos muy variados dentro de los que se destacan el antiséptico, analgésico, antibacteriano, antifúngico, anestésico y antimutagénico (Adeyinka, 2015).

El clavo de olor se ha utilizado en los alimentos por sus características organolépticas, como conservante (Mompíe, Pascual, M. Cunha, & De La Paz Lorente, 2015), condimento y en medicina herbaria, (Sánchez, 2013). Además, con base en lo que citan González y Malo (2013), destacan el poder antiséptico, analgésico, antibacteriano, antifúngico, anestésico y antimutagénico. Entre los compuestos que posee el aceite esencial de clavo de olor están: eugenol, acetato de eugenilo, alfa-humuleno, beta- cariofileno, (Cotés-Rojas, De Souza, & Oliveira, 2014).

Entre los compuestos mayoritarios que posee el aceite esencial de clavo de olor están: eugenol, acetato de eugenilo, alfa- humuleno, beta- cariofileno, en menor proporción beta- pineno,

limonene, farsenol, timol, carvacrol, benzaldehído, 2- heptanona, hexanoato de etilo (Cotés-Rojas, 2014).

En este estudio se realizó una investigación preliminar del efecto antimicrobiano del clavo de olor sobre el *S. aureus*, utilizado como desinfectante en superficies de áreas pecuarias de la finca El Caney del Sena-Cedagro.

2. Materiales y Métodos

El estudio realizado es de tipo experimental de laboratorio. Las pruebas se realizaron por triplicado.

Se manejaron variables independientes cuantitativas como la extracción del aceite esencial de clavo de olor, la preparación de las soluciones de clavo de olor y la concentración inhibitoria del aceite de clavo de olor frente a *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* y *E. coli*. Las variables dependientes que se manejaron fueron de naturaleza cuantitativa como el recuento de *Staphylococcus aureus* pre y pos desinfección con hipoclorito a 100 ppm y clavo de olor al 15%.

Extracción del aceite esencial

El clavo de olor se compró en el mercado de Sabanalarga, Atlántico. El experimento se realizó en el laboratorio de microbiología del centro para el desarrollo agroecológico y agroindustrial Sena-Cedagro, Regional Atlántico. Se pesaron 50 g del clavo de olor y estos se colocaron en el equipo de destilación por vapor para realizar la extracción, la cual duró aproximadamente dos horas en el proceso. Esta operación se realizó varias veces hasta obtener 50 ml del aceite, esta misma metodología fue utilizada por Jácome Jurado (2019). Se aplica ampliamente en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria por su alto rendimiento y bajo coste (Ortuño, 2014).

Preparación de las soluciones del aceite esencial

Del aceite esencial obtenido de la extracción, se pesaron 5 g y se aforó hasta 100 ml con agua destilada estéril para obtener una concentración de 50 mg/ml (T3), de manera similar con las concentraciones de 100 mg/ml (T2) y 150 mg/ml (T1). Autores como Yenis Ibeth Pastrana y Puche (2015) utilizaron una metodología semejante.

Definición de la concentración inhibitoria

Una vez preparadas las soluciones de clavo de olor, se realizó la prueba de inhibición en agar utilizando placas de agar Müeller Hinton. Para ello, se tomaron inóculos de los microorganismos previamente preparados en caldo BHI, se hicieron los repiques tomando alícuotas del cultivo de *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhimurium* en solución salina estéril y se compararon con el 0,5 escala de Mac Farland (1,5 x 10⁸ UFC). Las especificaciones de los microorganismos con líneas estandarizadas ATCC (American Type Culture Collection) con especificaciones: para *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 lote 363-231-4, para *Escherichia coli* ATCC 25922 lote 335-164-3, para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 lote 360-256-1.

Posteriormente, se tomaron las cajas de Petri provistas del agar Mueller Hinton y se sembraron masivamente en la superficie con hisopados de los microorganismos mencionados. Previamente, se impregnaron discos de papel filtro whatman N° 3 estériles (5 mm de diámetro) con 10 µl y con las concentraciones del clavo de olor establecidas.

Estos discos se colocaron en las placas previamente inoculadas. Además, se contó con un Blanco (disco sin adición de compuestos). Todas las placas se llevaron a incubación por 24 h a 37 °C.



La figura 1 ilustra el procedimiento.

Figura 1. Test de inhibición en placas de agar



Análisis de pH

Se realizó el análisis del pH al aceite esencial obtenido. Se utilizó un pH- metro digital de mesa con electrodo plástico, ref: 28.520.131.

Preparación del desinfectante

Se tomó el aceite esencial y se preparó el desinfectante al 15% en la siguiente proporción:

- Aceite esencial de clavo de olor 30 g
- Agua destilada estéril 200 ml

Se prepararon en frascos color ámbar con un volumen de 200 ml cada uno.

Aplicación del desinfectante de clavo de olor en el área pecuaria de la finca el Caney

Se realizaron dos tipos de procedimientos de desinfección y muestreo en el área de ordeño, específicamente en la máquina de ordeño: uno

utilizando un desinfectante habitual como es el hipoclorito de sodio a 100 ppm y se tomaron cinco muestras antes de la desinfección y cinco muestras después de la desinfección por el método del hisopado y siembra masiva en superficie en agar yema de huevo con telurito para la detección de *S. aureus*.

En el otro, utilizando desinfectante de clavo de olor (15%), se tomaron cinco muestras antes y cinco muestras después de la desinfección por el método del hisopado y siembra masiva en superficie en agar yema de huevo con telurito para la detección de *S. aureus*.

Adicionalmente, se utilizaron placas petrifilm para *Staphylococcus aureus*, que es un medio cromogénico de Baird Parker modificado en placa, es selectivo y diferencial y el *S. aureus* aparece como una colonia roja violeta en la placa.

Ambos se incubaron a 35 °C +/- 2 °C por 24h y 48h, luego se realizaron las lecturas correspondientes.

Al cabo de la incubación se tomaron las colonias negras con halo transparente, se les realizó coloración de Gram, a los Gram positivos se les realizó prueba de catalasa y a los que dieron positiva se les realizó la prueba de la coagulasa con plasma de conejo deshidratado (Rangel, Rodríguez, Bernate & Velilla, 2011).

Análisis estadísticos

Los resultados obtenidos se organizaron en una hoja de Excel y fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA de dos factores, test de media de Tukey al nivel del 5% de probabilidad.

3. Resultados

Extracción de los aceites esenciales

El aceite esencial extraído presentó un color amarillo y un olor característico.

Preparación de las soluciones del aceite esencial

Las soluciones preparadas se conservaron en refrigeración.

Definición de la concentración inhibitoria

Transcurrido el tiempo de incubación, se midieron los halos de inhibición (tabla 1), obteniendo que la concentración de 150 mg/ml presentó mayor eficacia, ya que en este experimento fue la única que inhibió la *Salmonella* y obtuvo un promedio de 7 mm en la lectura

del halo de inhibición, siendo esta la escogida como la concentración inhibitoria. El aceite esencial presentó mayor actividad frente *S. aureus* y *E. coli* que para *Salmonella sp.*, que fue similar a lo obtenido por Jácome Jurado (2019), Aguilar- González y López-Malo (2013) y Yenis Ibeth Pastrana y Puche (2015).

Tabla 1. Promedios de halos de inhibición

	150 mg/ml (T1)	100 mg/ml (T2)	50 mg/ml (T3)	Blanco
<i>Salmonella typhi</i> - <i>murium</i>	7.0*	0.0	0.0	0.0
<i>Escherichia coli</i>	16.0	14.0	13.0	0.0
<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	20.0	18.0	16.0	0.0

Tabla 2. Análisis de varianza halos de inhibición

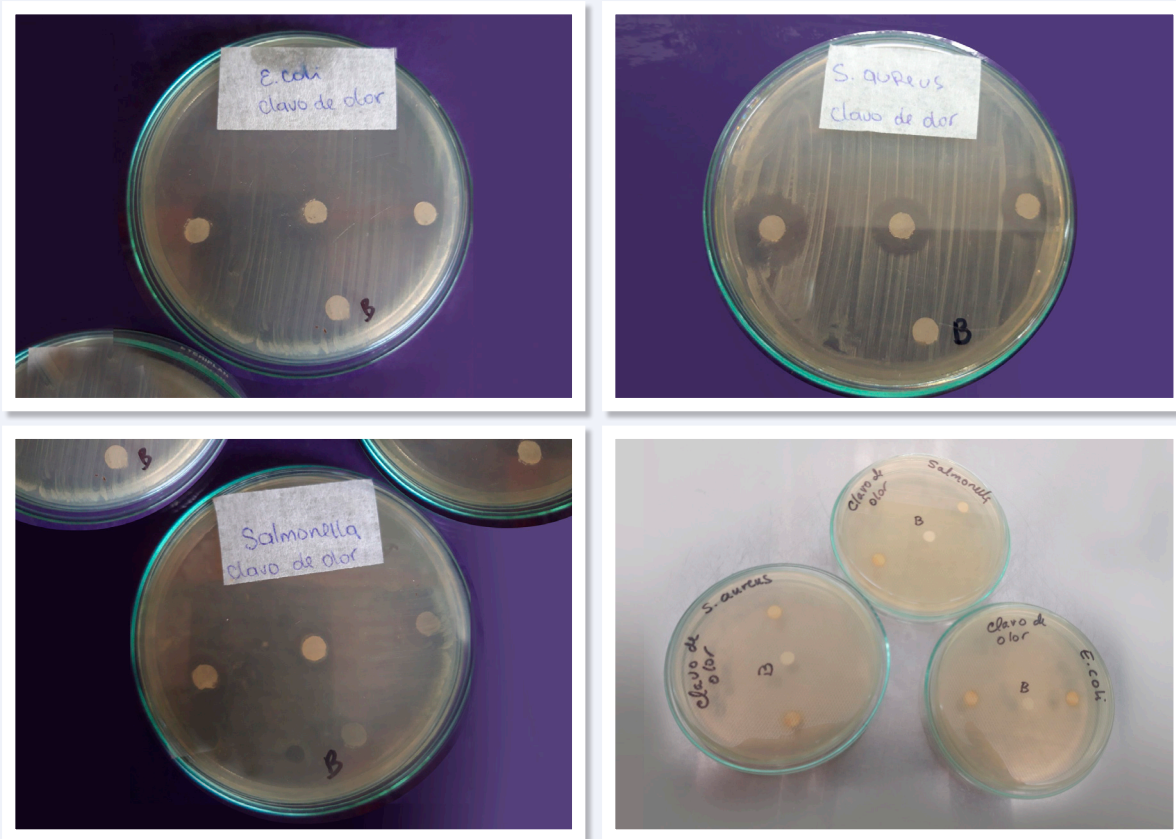
Análisis de Varianza						
Origen de la Variaciones	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Promedio de los Cuadrado	F	Probabilidad	Valor Crítico para F
Entre Grupos	1051,59375	3	350,531	10,415	9E-05	2,9466853
Dentro de los Grupos	942,375	28	33,6563			
Total	1993,96875	31				

F 10
p 0.00009



En la figura 2 se muestran los halos de inhibición

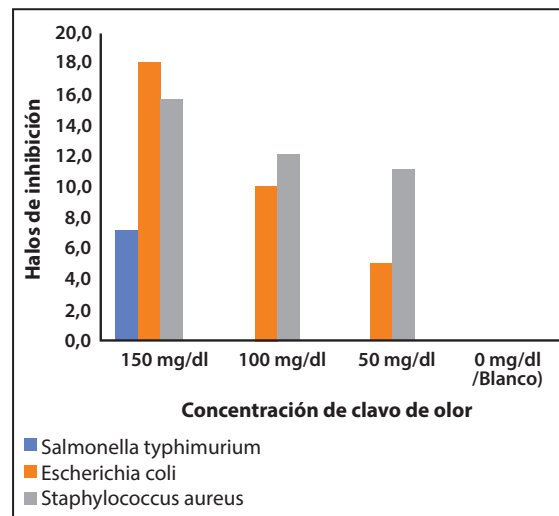
Figura 2. Halos de inhibición



En el análisis de varianza se obtuvo que $p < 0.05$, por lo tanto, nuestra hipótesis alternativa tiene validez. Aplicando el test de Tukey se hallaron diferencias significativas entre grupos y microorganismos, entre T1 y T2 y entre T1 y T3, no siendo así entre T2 y T3.

En cuanto a los microorganismos se presentaron diferencias significativas con *S. typhimurium* (figura 3).

Figura 3. Gráfico halos de inhibición



Análisis de pH

Se realizó análisis de pH el cual mostró un promedio de 4.0.

Resultados de la aplicación del desinfectante de clavo de olor en el área pecuaria de la finca el Caney

Figura 4. Resultados después de desinfección con clavo de olor 15% (izq.) y con hipoclorito de sodio 100 ppm (der.). Medio Petrifilm



Los resultados de los análisis microbiológicos de superficie se describen en la tabla 3.

Tabla 3. Resultados microbiológicos antes y después de desinfección

Desinfectante	Antes de desinfección UFC	Después de desinfección UFC
Hipoclorito de sodio 100 ppm	14	3
Hipoclorito de sodio 100 ppm	12	0
Hipoclorito de sodio 100 ppm	10	0
Hipoclorito de sodio 100 ppm	8	0
Hipoclorito de sodio 100 ppm	15	2
Clavo de olor al 15%	8	1
Clavo de olor al 15%	10	1
Clavo de olor al 15%	9	2
Clavo de olor al 15%	12	0
Clavo de olor al 15%	9	2

Los números reportados corresponden a unidades formadoras de colonias (UFC) obtenidas en agar Baird Parker y que según morfología y pruebas de coagulasa positiva en plasma de conejo corresponden al *S. coagulasa positiva*, en las placas de Petri film se buscaron colonias rojo violeta.

La desinfección con clavo de olor al 15% mostró disminución en el crecimiento del *S. coagulasa positiva* tras la desinfección, y lo mismo ocurrió con el desinfectante habitual (hipoclorito de sodio a 100ppm).

Estadísticamente, en el análisis de varianza se obtuvo $p > 0.05$ lo que apoya la hipótesis nula de que en este experimento no hubo diferencias entre la acción del desinfectante con clavo



de olor al 15% y el hipoclorito de sodio a 100 ppm. En cuanto al análisis microbiológico antes y después de la desinfección, hubo diferencias significativas entre los dos grupos del antes y el después según el test de Tukey.

4. Discusión

En este experimento se demostró la acción bactericida *in vitro* del aceite esencial de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) contra *E. coli*, *Salmonella* y *S. aureus in vitro*, debido a la actividad *in vitro* que presentó, lo cual también se constató en investigaciones anteriores (Leonard, Virijecvic, Regnier & Combrinck, 2010; Yenis Ibeth Pastrana & Puche, 2015).

En general, los halos de inhibición de mayor tamaño se presentaron con el microorganismo Gram positivo *S. aureus*, seguido de *E. coli*. De forma similar García Caramillo (2006) presentó resultados parecidos.

El microorganismo que presentó mayor resistencia al aceite esencial fue *S. typhimurium*, ya que solamente presentó halo de inhibición en la mayor concentración aplicada 150 mg/ml y de solo 7 mm de diámetro. Otros autores como Yenis Ibeth Pastrana y Puche (2015), mostraron poca efectividad del aceite esencial sobre la *Salmonella*.

El pH ácido del aceite esencial de clavo de olor potencializa el efecto antibacteriano, ya que a pH bajo, los componentes activos de los aceites esenciales están disociados, lo que también les permite penetrar en la bacteria y matarla (Helvoirt & Dijk, 2009).

El desinfectante a base de clavo de olor al 15% utilizado, presentó la misma acción bactericida cuando se comparó con el hipoclorito de sodio a 100 ppm, lo que nos permite pensar en una

opción de desinfección sin residuales químicos.

Según los resultados obtenidos en este experimento preliminar, podemos concluir que el aceite esencial de clavo de olor puede ser utilizado como principio activo de desinfectantes en áreas pecuarias al tener importante acción bactericida, principalmente sobre *S. aureus* y *S. coagulasa positiva* para la prevención de la aparición de mastitis, de igual forma, como parte de biopelículas, como agregado en dietas de animales, resaltando la realización de pruebas complementarias como el análisis sensorial en los alimentos una vez aplicado.

Se debe profundizar con un mayor número de pruebas microbiológicas para dar mayor validez a la investigación, como la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB). Además, deben realizarse pruebas añadiendo aceites esenciales con efecto bactericida conocido para potencializar su acción y mejorar la efectividad.

5. Referencias

- Acosta Moreno, A., Mira Hernández, J., & Posada Arias, S. (2017). Tópicos en mastitis bovina: desde la etiología hasta algunas terapias alternativas. *Revista de Ciencias Agrícolas y Animales*, Vol. 6, (1), 42- 58. Obtenido de <http://hdl.handle.net/10567/1840>
- Adeyinka, A. R. (2015). Application of phytochemical extracts and essential oils in food products: A review. *International Journal of Biotechnology and Food Science*, 31- 35.
- Aguilar- González, A., & Y López- Malo, A. (2013). Extractos y aceites esenciales de clavo de olor y su potencial aplicación como agente antimicrobiano. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 3-5.
- Aigaje, A. (2 de ISSN: 2477-8818 de 2017). *Efectividad antimicrobiana del aceite esencial de Minthostachys mollis (tipo) al 25, 50, 100 % frente a Porphyromonas*

- gingivalis*. Recuperado el 2020, de Alexis I. Aigaje Sierra, Myriam K. Zurita Solís: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5802909>
- Argote, F. E., Suarez, Z. J., Tobar, M. E., Perez, J. A., & Hurtado, A. M. (2017). Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en staphylococcus aureus y escherichia coli. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, Vol. 15(2)*, 52-60.
- Calderón, A. M. (2009). Determination of Protection Factors for Bovine Mastitis in Farms Managed Under the Double Purpose System in the Municipality of Montería. *Medicina Veterinaria 12*, 61- 68.
- Carrera Q., H. R. (2016). Evaluación del extracto etanólico de propóleo como conservante en queso cabaña. *bdigital.zamorano.edu*, 36. Obtenido de <http://hdl.handle.net/11036/5947>
- Cotés- Rojas, D. D. (2014). Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. *Asian Pacific. Journal of tropical Biomedicine*, 20- 22.
- García-Caramillo, E. Q. (2006). Actividad antifúngica de aceites esenciales de canela y orégano y su efecto sobre la producción de aflatoxinas en nuez pecanera. *Revista Mexicana de fitopatología*, 8-12.
- González, A. A. (2013). Extractos y aceite esencial de clavo de olor y su potencial utilización como agente antimicrobiano en alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 35- 41.
- Gonzalo, V. T., & Morales C, S. (2017). Resistencia anti-biótica de patógenos bacterianos aislados de mastitis clínicas en bovinos de crianza intensiva. *Revista electrónica de veterinaria*, Volumen 18, No 12 pp 1- 12.
- Granados, C. &. (2014). Evaluación de la Actividad Antioxidante del Aceite Esencial Foliar de Myrcianthes leucoxylla de Norte de Santander (Colombia). *Información tecnológica*, 25(3), 11- 16.
- Helvoirt, G. V., & Dijk, A. V. (1 de 1 de 2009). https://www.3tres3.com/articulos/aceites-esenciales-y-acidos-organicos-contra-e-coli-1-1=3_2550/. Obtenido de https://www.3tres3.com/articulos/aceites-esenciales-y-acidos-organicos-contra-e-coli-1-1=3_2550/: https://www.3tres3.com/articulos/aceites-esenciales-y-acidos-organicos-contra-e-coli-1-1=3_2550/
- Jácome Jurado, J. A. (1 de 05 de 2019). <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/10707>. Obtenido de Repositorio universidad de las Américas: <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/10707>
- Leonard, C., Virijecvic, S., Regnier, T., & Combrinck. (2010). Bioactivity of selected essential oils and some components on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Spath African journal of Botany*, 76, 676- 680. Ramírez, N. G. (2001). Prevalencia de mastitis en vacas lecheras lactantes en el municipio de San Pedro de los Milagros, Antioquia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 14(1), 76– 87.
- Rangel, A. C., Rodríguez, V. R., Bernate, g. A., & Velilla, S. M. (2011). Prevalencia de mastitis bovina en sistemas de doble propósito en Montería (Colombia): etiología y susceptibilidad antimicrobiana. *Revista Colombiana de ciencias pecuarias*: 24, 19- 28.
- Sánchez, M. (2013). *Bazar de Especies*. New York: Palibrio.
- Torrenegra, M. E. (2017). Actividad antibacteriana in vitro de aceites esenciales de diferentes especies del género Citrus. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 46(2), 160- 175. doi:<http://dx.doi.org/10.15446/rcciquifa.v46n2.67934>
- Yenis Ibeth Pastrana-Puche1, A. M.-V.-C. (2015). Efecto antimicrobiano del clavo y la canela sobre los patógenos. *Biotechnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, Vol 15* (No. 1), (56-65). doi:[http://dx.doi.org/10.18684/BSAA\(15\)56-65](http://dx.doi.org/10.18684/BSAA(15)56-65)