

Evaluación de la actividad inhibitoria de aceites esenciales contra bacterias patógenas presentes en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) responsables de enfermedades transmitidas por alimentos *

Evaluation of inhibitory activity of essential oils against pathogenic bacteria present in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) responsible for foodborne diseases

ARGOTE-VEGA, FRANCISCO¹; SUÁREZ-MONTENEGRO, ZULLY²; HURTADO-BENAVIDES, ANDRES³; ARTEAGA-CABRERA, ESTEBAN⁴; LÓPEZ-SUÁREZ, ANGELA⁵; PÉREZ-ÁLVAREZ, JOSE⁶; CHÁVEZ-LÓPEZ, CLEMENCIA⁷

Historial del artículo

Recibido para evaluación: 21 de Junio 2020

Aprobado para publicación: 21 de Septiembre 2022

* Proyecto de origen: "Estudio *in situ* de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis*) y orégano silvestre (*Lippia origanoides* H.B.K.) en filete de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*)". Financiación: Sistema de Investigaciones, Universidad de Nariño.

1 Universidad Miguel Hernández -Universidad de Nariño. Grupo Industrialización de Productos de Origen Animal - Tecnologías Emergentes en Agroindustria. Doctorando en Recursos y Tecnologías Agrarias, Agroambientales y Alimentarias. Pasto, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-4024-423X>

2 Universidad de Nariño. Grupo Tecnologías Emergentes en Agroindustria. Ph.D. Ciencias de la Alimentación. Pasto, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-2901-0053>

3 Universidad de Nariño. Grupo Tecnologías Emergentes en Agroindustria. Ph.D. Ciencia y Tecnología de Alimentos e Ingeniería. Pasto, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-8898-8804>

4 Universidad de Nariño. Grupo Tecnologías Emergentes en Agroindustria. Ingeniero Agroindustrial. Pasto, Colombia. <https://orcid.org/0000-0001-7283-167X>

5 Universidad de Nariño. Grupo Tecnologías Emergentes en Agroindustria. Ingeniera Agroindustrial. Pasto, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-8486-0045>

6 Universidad Miguel Hernández. Grupo Industrialización de Productos de Origen Animal (IPOA). Ph.D. Ciencia e Ingeniería de Alimentos. Alicante, España. <https://orcid.org/0000-0002-1143-5646>

7 Università Degli Studi Di Teramo. Grupo de Investigación Biotecnología. Ph.D. Biotecnologie degli Alimenti. Giulianova, Italia. <https://orcid.org/0000-0001-7373-7888>

RESUMEN

Esta investigación evaluó el efecto inhibitorio de aceites esenciales (AE) de romero y orégano silvestre contra bacterias patógenas encontradas en trucha arcoiris, promotoras de enfermedades transmitidas por alimentos. Los AE fueron extraídos mediante fluidos supercríticos y se determinó su densidad, índice de refracción (IR), y compuestos orgánicos volátiles. Las bacterias se identificaron con el sistema Phoenix® y la susceptibilidad por Kirby-Bauer. Las actividades antimicrobianas y bactericida ejercida por AE contra *S. aureus* y *B. cereus*, se determinaron por microdilución. Como resultados se obtuvo una densidad de 0,89 y 0,93 g/cm³; IR de 1,46 y 1,40; humedad de 8,42 % y 8,34 % y rendimiento global de 2,42 % y 2,05 % para el aceite esencial de romero (AER) y el aceite esencial de orégano (AEO), respectivamente. La caracterización química por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas determinó como compuestos representativos alcanfor (26,95 %) y trans-cariofileno (22,80 %) para el AER y timol (76,25 %) para el AEO. El AER ejerció un mayor efecto antimicrobiano y antibacteriano contra *S. aureus* (CMI y CMB= 28480 µg/mL) en comparación con el AEO, no obstante AEO presentó una mejor respuesta antimicrobiana (CMI= 44640 µg/mL) y antibacteriana (CMB=59520 µg/mL) contra *B. cereus* frente a AER, lo que sugiere un potencial efecto bioprotector de estos aceites esenciales como conservantes naturales de productos cárnicos.

PALABRAS CLAVE:

Fluido supercrítico; Lippia organoides H.B.K.; Rosmarinus officinalis L.; Oncorhynchus mykiss; Concentración Mínima Inhibitoria; Concentración Mínima Bactericida.

ABSTRACT

This work evaluated the inhibition effect of essential oils (EO) from *rosmarinus* and wild oregano against pathogenic bacteria present in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) that promote foodborne diseases. EO extraction was carried out using supercritical fluids; EO were characterized by density, refractive index (RI), and volatile organic compounds. The identification of bacteria present in rainbow trout was carried out with the Phoenix® system and susceptibility by Kirby-Bauer. The antimicrobial and bactericidal activities exerted by EO against *S. aureus* and *B. cereus* were determined by microdilution. As a results: density of 0,89 and 0,93 g/cm³; RI of 1,46 and 1,40; moisture of 8,42 % and 8.34 % and total yield of 2,42 % and 2,05 % for rosemary essential oil (REO) and oregano essential oil (OEO), respectively. The chemical characterization by

KEYWORDS:

Supercritical fluid; Lippia organoides H.B.K.; Rosmarinus officinalis L.; Oncorhynchus mykiss; Minimum Inhibitory Concentration; Minimum Bactericidal Concentration.

Correspondencia: argote_71@hotmail.co

Cómo citar este artículo

ARGOTE-VEGA, FRANCISCO; SUÁREZ-MONTENEGRO, ZULLY; HURTADO-BENAVIDES, ANDRES; ARTEAGA-CABRERA, ESTEBAN; LÓPEZ-SUÁREZ, ANGELA; PÉREZ-ÁLVAREZ, JOSE; . CHÁVEZ-LÓPEZ, CLEMENCIA. Evaluación de la actividad inhibitoria de aceites esenciales contra bacterias patógenas presentes en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) responsables de enfermedades transmitidas por alimentos. Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, v. 21, n. 2, 2023, p. 87-98. Doi: <https://doi.org/10.18684/rbsaa.v21.n2.2023.1817>

gas chromatography coupled to mass spectrometry showed that the representative compounds of REO were camphor (26.95 %) and trans-caryophyllene (22.80 %), and thymol (76,25 %) was representative in OEO. The REO exerted a greater antimicrobial and bactericidal effect against *S. aureus* (MIC and MBC=28480 µg/mL) compared to the OEO, however OEO presented a better antimicrobial (MIC=44640 µg/mL) and bactericidal (MBC=59520 µg/mL) against *B. cereus* compared to REO, suggesting a potential bioprotective effect of these essential oils as natural preservatives in meat products.

INTRODUCCIÓN

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, estimó que la producción mundial de pescado fue de 179 millones de toneladas de los cuales aproximadamente el 87 % se destinó para consumo humano. Esto indica que, para muchos países, en especial aquellos con menor desarrollo, el pescado es considerado la base de su seguridad alimentaria (FAO, 2020).

El Departamento de Nariño (Colombia), registró una producción de 2.585 ton/año de trucha arcoíris (Burbanco-Gallardo *et al.*, 2021), concentrada en un 70 % en el Lago Guamuez (Suárez *et al.*, 2020), constituyendo la base económica y nutricional de la mayoría de las familias rurales. No obstante, tras la captura de la trucha, la postproducción es realizada con precario nivel tecnológico lo cual conlleva un enorme riesgo para la salud del consumidor debido a la baja calidad e inocuidad del producto.

La pérdida y desperdicio de carnes y productos de origen animal a lo largo de la cadena de suministro fue de un 12 % a nivel mundial (FAO, 2019). El pescado es una fuente rica en macro y micronutrientes como proteínas (19-23 %), ácidos grasos esenciales (4-7 %), vitaminas y minerales (Central Lechera Asturiana, 2021). La riqueza composicional sumada a unas inadecuadas prácticas de sacrificio, manipulación, almacenamiento y distribución, contribuyen a la reducción de la calidad (Domínguez *et al.*, 2019), y al incremento de la pérdida y desperdicio de este alimento.

El carácter altamente perecedero del pescado y las inadecuadas prácticas de postproducción son determinantes en la incidencia y prevalencia de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). La Organización Mundial de la Salud estableció que, durante los últimos tres años, 600 millones de personas fueron afectadas por ETA y aproximadamente 420.000 individuos (el 30% fueron niños menores de 5 años), murieron a causa de la ingesta de alimentos contaminados por microorganismos (WHO, 2021).

Las plantas producen metabolitos secundarios con promisorio bioactividad, los cuales pueden ser utilizados para evitar ETA. Los aceites esenciales han sido utilizados para contrarrestar algunos brotes transmitidos por productos cárnicos, considerados de alto riesgo para la salud (Al-Hijazeen, 2022). Además, los AE pueden mejorar los atributos sensoriales y nutricionales de los alimentos; exhiben propiedades terapéuticas como agentes antioxidantes y antiinflamatorios y limitan el crecimiento de bacterias como *Pseudomonas spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Escherichia spp.* y *Salmonella spp.*, entre otras (Putnik *et al.*, 2019).

No obstante la bioactividad de determinados analitos puede afectarse de acuerdo con el método de obtención. La extracción con fluidos supercríticos es una técnica ecoeficiente debido al uso de solventes gras (*generally recognized as safe*), tiempo de extracción y consumo de energía reducidos. Además aumenta la pureza del aceite, la conservación del aroma y la selectividad de los compuestos bioactivos (Suárez-Montenegro *et al.*, 2021).

Más de 20 especies de orégano y productos derivados de romero han demostrado propiedades conservantes en alimentos, aplicables en la industria pesquera (Al-Hijazeen, 2022), debido principalmente a algunas actividades funcionales atribuidas a los monoterpenos (presentes en un 95%), y sesquiterpenos (entre 2-5 %) (Dupas *et al.*, 2020).

Este estudio investigó el efecto antimicrobiano y bactericida ejercido por los aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) y orégano silvestre (*Lippia origanoides* H.B.K.), extraídos con fluidos supercríticos, frente a bacterias patógenas aisladas de filetes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), responsables de ETA. Con estos hallazgos se pretende contribuir a la búsqueda de alternativas para la conservación de productos cárnicos a través del uso de ingredientes naturales de alta disponibilidad y bajo costo, en reemplazo de los tradicionales aditivos químicos.

MÉTODO

Extracción de aceites esenciales

Esta investigación aplicó la extracción con CO₂ supercrítico debido a la naturaleza lipofílica de los AE. Se utilizó un equipo SFE-500 marca Waters con celda de 500 mL, bomba de alta presión, dos separadores, tiempo de extracción de 150 minutos y flujo de CO₂ de 30 g/min. Para evaluar el efecto de las variables presión (entre 150 y 300 bar) y temperatura (entre 40 y 60 °C) en el rendimiento global (Ecuación. 1), se aplicó un diseño experimental 2² con cuatro repeticiones por tratamiento y un criterio de significancia p < 0,05. El rendimiento se optimizó mediante un modelo central compuesto rotacional con metodología de superficie de respuesta. Se utilizaron lotes de 150 g de material vegetal seco al que se le determinó la humedad de acuerdo con la Norma Internacional AOAC (Official Methods of Analysis). El material se trituró en un molino industrial (TRF 400 Súper, Brasil) y se tamizó hasta un diámetro promedio de partícula de 0,6 mm. Índice de refracción y densidad se calcularon de acuerdo con las normas NTC 289 y 336, respectivamente (ICONTEC, 2019, 2016). Los AE se almacenaron a 4±0,5 °C.

$$\text{Rendimiento \%} = \frac{\text{Aceite g}}{\text{Peso muestra g}} * 100 \quad (\text{Ec.1})$$

Composición de los aceites esenciales

La composición química se determinó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas utilizando un cromatógrafo Shimadzu QP2010S, columna J&W Scientific DB5-MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm); detector selectivo de masas, modo full scan; interface a 280 °C; inyector a 250 °C, modo split 1:50; fase móvil Helio UAP a flujo de 1,0 mL/min. La identificación tentativa de los compuestos se logró mediante comparación de los espectros de masas, utilizando las bases de datos ADAMS 2004 y NIST. Se utilizó una mezcla de n-alcenos para calcular los índices de retención lineal.

Formulación de emulsiones

Se preparó una mezcla de aceite esencial y medio de cultivo bacteriano caldo de soja tripticaseína (TSB) de acuerdo con (Argote-Vega *et al.*, 2017). Los rangos de concentración (μg de AE/mL de emulsión) estudiados fueron de 890 a 64080 para AER y de 930 a 66960 para AEO.

Aislamiento e identificación de microorganismos

Se tomó una muestra aleatoria (Ecuación.2) de 45 ejemplares de trucha en tres expendios de El Encano-Nariño, con un nivel de confianza del 95 % y margen del error del 5 % (Sucasaire, 2022). Las muestras se transportaron hasta la Universidad de Nariño en bolsas estériles de polietileno a 4 °C.

$$n = \frac{NZ^2 pq}{(N - 1) d^2 + Z^2 pq} \quad (\text{Ec.2})$$

Donde:

n= tamaño de muestra

N= población

Z= nivel de confianza

p= proporción del fenómeno en estudio en la población de referencia

q= proporción de la población de referencia que no presenta el fenómeno en estudio

d= precisión absoluta

El aislamiento de las bacterias se realizó mediante frotis de la superficie externa de cada ejemplar, inmersión en un tubo de ensayo con agua peptonada buferada estéril e incubación (37 °C, 24 h). Posteriormente, se prepararon diluciones seriadas 10^{-2} a 10^{-6} , se sembraron en medios de cultivo agar sangre y MacConkey e incubación (37 °C, 24-48 h). Las bacterias purificadas y aisladas, se preservaron con glicerol-Fisher Chemical® al 15 % v/v y medio de cultivo tioglicolato a -20 °C. Para la identificación inicialmente se realizó la tinción de gram y test de catalasa. Luego, las cepas se cultivaron en medio agar soya tripticasa con 5 % de sangre de carnero e incubación (35 °C, 18-24 h); seguidamente, se inocularon las tarjetas y los páneces del sistema automatizado Phoenix® (Becton Dickinson, nivel de confianza del 99 %) con colonias de un cultivo puro estandarizado a 0,5 de MacFarland e incubación a 35 °C (Fagundo-Sierra *et al.*, 2007).

Actividad antimicrobiana y bactericida de los aceites esenciales de romero y orégano

Preparación del inóculo. Para garantizar viabilidad celular, las cepas se activaron en TSB suplementado al 0,1% de glucosa e incubación (37 °C, 24 h). Luego de 24 horas de crecimiento, las células se centrifugaron (5 min, 6000 rpm) y se lavaron tres veces con PBS (50 mM, pH 7). Las células se resuspendieron en TSB hasta obtener inóculos estandarizados a 0,5 de densidad óptica (aproximadamente 5×10^8 células/mL escala Mcfarland).

Ensayo de inhibición. Este se realizó en caja de Elisa de 96 pozos y volumen de 350 μ L. Como control negativo, a cierto número de pozos se adicionó sólo la cepa y TSB, mientras que aquellos con solo medio de crecimiento TSB fueron utilizados como control de esterilidad. La inhibición microbiana se evaluó adicionando en cada pozo 200 μ L de la cepa activada, a una concentración de 0,5 de absorbancia, y 100 μ L de la emulsión del aceite esencial. La estimación de la inhibición se realizó adicionado a cada pozos, 20 μ L de solución al 0,1 % de TTC (cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio) e incubación (37 °C, 1 h). El color rojo indica las cepas metabólicamente activas.

Análisis estadístico. Los datos se analizaron con el programa Statgraphics Centurión XVII y los resultados representan el promedio \pm la desviación estándar. Las diferencias estadísticas se compararon con análisis de varianza y test de múltiples rangos de Tukey a un valor $p < 0,05$. Las pruebas *in vitro* de inhibición bacteriana se evaluaron mediante un diseño completamente al azar con dos factores y las diferencias significativas se compararon con la prueba de kruskall Wallis a valor $p < 0,05$.

RESULTADOS

Características fisicoquímicas

Los resultados de las pruebas fisicoquímicas de los AE estudiados (cuadro 1), arrojaron que ninguna de las variables presenta diferencias significativas entre ellas. El diseño de superficie de respuesta indica que el mayor rendimiento en AER (2,42 %) se obtuvo a 60 °C y 300 bar, mientras que el de AEO (2,05 %) fue a 50 °C y 225 bar (Fig. 1A y 1B).

Cuadro 1. Características fisicoquímicas y rendimiento de los AE extraídos con fluidos supercríticos.

Parámetros	Aceites esenciales	
	Romero	Orégano
Densidad (g/cm ³)	0,89±0,03a	0,93±0,02a
Índice de refracción	1,46±0,01a	1,47±0,03a
Humedad (%)	8,42±1,67a	8,34±0,45a
Rendimiento (%)	2,42±0,07 a*	2,05±0,26 a**

Letras minúsculas diferentes en filas representan diferencias significativas con prueba de Tukey a $p < 0,05$. Condiciones de operación: *T=60 °C, presión=300 bar **T=50 °C, presión=225 bar

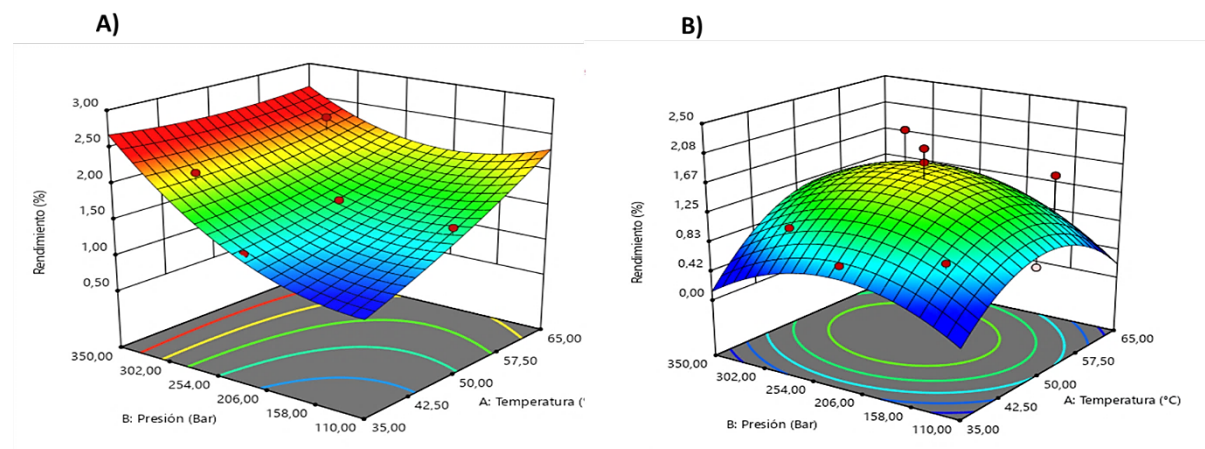


Figura 1. Diagramas de superficie de respuesta del rendimiento global de A) AER y B) AEO.

La diferencia en el rendimiento entre los AE puede ser atribuida a la temperatura de extracción. En condición supercrítica, la temperatura promueve un incremento de la difusividad y el poder de solvatación del CO₂ incrementando la solubilidad del analito (Bueno, 2020). Además, el CO₂ supercrítico se alcanza a baja temperatura (31,1 °C) siendo idóneo para la extracción de compuestos termolábiles. La presión influye favorablemente en el rendimiento puesto que a mayor presión se consigue una mayor solubilidad de los analitos; no obstante su selectividad disminuye (Suárez-Montenegro *et al.*, 2021). Otros autores recomiendan presiones bajas, mientras que otros optan por presiones altas, para lograr mayor transferencia de masa y liberación de aceite, sin embargo, es necesario tener varios separadores para realizar el fraccionamiento de los compuestos coextraídos (Györi *et al.*, 2019; Yousefi *et al.*, 2019). Además, se deben considerar otros factores en el rendimiento como el uso de cosolventes, flujo de CO₂, tiempo y método de extracción y pretratamiento aplicado al material vegetal, entre otros.

Algunos estudios reportaron un rendimiento de 2,53 % de AER con extracción supercrítica (172,4 bar, 40 °C) comparado con hidrodestilación (0,35 %) y destilación (2,35 %), en 90 minutos de extracción (Conde-Hernández *et al.*, 2017) hidrodistillation (HYDRO), mientras que (Baj *et al.*, 2018), consiguieron un rendimiento de 13,40 %, de AEO a 40 °C, 100 bar y flujo de cosolvente etanol (8 g/min), indicando la importancia de la inclusión de

cosolvente para incrementar tanto el espectro de polaridad de los compuestos extraídos como el rendimiento global. Otra investigación sugiere que el rendimiento de los aceites no alcanza a superar el 5 % y depende de las características hidrofóbicas de las moléculas y la utilización de solventes orgánicos (Giacometti *et al.*, 2018).

Composición de aceites

El cuadro 2, indica los principales metabolitos encontrados en los aceites estudiados. Esta investigación determinó que en AER predominaron alcanfor (26,95 %) y trans-cariofileno (22,80 %), lo cual está en línea con lo reportado por (Baj *et al.*, 2018; Giacometti *et al.*, 2018), quienes encontraron α y β -pineno, 1,8-cineol, eucaliptol, β -cariofileno y alcanfor como principales compuestos terpénicos en romero. En relación al AEO, este estudio encontró que el timol es el compuesto más abundante (76,25 %), valor comparable con lo reportado por (Acosta *et al.*, 2019) quienes obtuvieron un 83 % de este compuesto así como p-cimeno, mirceno, γ -terpineno y carvacrol, en menor proporción. Las variaciones en la abundancia de los compuestos se debe aspectos de tipo climático y geográfico de cultivo, a las partes de la planta, a las condiciones de secado y de extracción, así como a los métodos analíticos aplicados (Achour *et al.*, 2018).

Cuadro 2. Composición de los aceites esenciales estudiados.

Aceites esenciales	Quimiotipo	Composición promedio (%)
Romero	β -mirceno	6,15 \pm 0,6
	Eucaliptol	9,60 \pm 0,3
	Alcanfor	26,95 \pm 1,1
	Verbenona	4,50 \pm 0,5
	Acetato de Isoborneol	7,50 \pm 0,1
	Trans-cariofileno	22,80 \pm 0,5
	α -humuleno	6,10 \pm 0,7
Orégano	Timol	76,25 \pm 0,1
	p-cimeno	7,30 \pm 0,1
	Mirceno	3,31 \pm 0,2
	γ -terpineno	2,75 \pm 0,1
	Carvacrol	1,70 \pm 0,1

Estudio de las emulsiones

La composición y microestructura de las emulsiones se encuentra influenciada por fenómenos de transferencia de masa, gradientes en la presión osmótica, temperatura y pH (Rasia *et al.*, 2019). Los ensayos determinaron que la relación 1:2 entre AE y Tween 20, mostró estabilidad hasta 48 horas con un diámetro de partícula comprendido entre 4,233 a 8,205 micras. Las características fisicoquímicas de la emulsión fueron: pH = 7,13 \pm 0,3; IR = 1,1540 \pm 0,04 y densidad = 1,661 \pm 0,11 g/cm³. Estudios previos de este grupo determinaron similares características para emulsiones formadas a partir de aceite de eucalipto, mandarina y limón, para un diámetro de partícula entre 40 y 63 micras y una relación aceite/Tween 20 de 1:1 (Argote-Vega *et al.*, 2017).

Microorganismos Identificados en trucha arcoiris

Se aislaron 135 cepas, 90 gram positivas (coagulasa y catalasas positivas) y 45 gram negativas. Con el método Phoenix® (Becton Dickinson) se logró identificar dos bacterias patógenas, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, del total de las muestras analizadas. *S. aureus* representa un alto riesgo en productos acuáticos (Rong *et al.*, 2017), debido a su capacidad para formar biopelículas, definidas como “un consorcio multicelular con estructura tridimensional formado sobre una superficie biológica o abiótica” (Ou *et al.*, 2020). Esta bacteria se deposita en

diferentes superficies de procesamiento de alimentos, constituyendo un grave foco de ETA debido a la secreción α -hemolisina asociada con la intoxicación alimentaria, las patogénesis y resistencia a biocidas. *B. cereus* es una bacteria capaz de adaptarse fácilmente en diferentes entornos para liberar potentes toxinas como cereulida, hemolisina BL, enterotoxina no hemolítica y citotoxina K, promoviendo un alto número de intoxicaciones alimentarias (Jovanovic *et al.*, 2021).

Esta investigación sugiere que la presencia de estas bacterias en los filetes de trucha puede estar asociada a factores como un inadecuado sacrificio; utilización de agua proveniente del Lago Guamuéz sin ningún tratamiento de potabilización; inadecuadas operaciones de postproducción, contaminación cruzada, escasos refrigeradores para almacenamiento o ruptura de la cadena de frío, entre otros.

El cuadro 3 indica los resultados frente a la susceptibilidad antimicrobiana de las bacterias, expresada como resistencia (R) o sensibilidad (S) frente a diez agentes antimicrobianos.

Cuadro 3. Antibiograma de *S. Aureus* y *B. Cereus* aisladas de trucha arco iris.

Antibióticos	Bacterias /Susceptibilidad			
	Staphylococcus aureus		Bacillus cereus	
Amoxicilina	21	S	6	R
Ampicilina	16	S	19	S
Cefalexina	13	R	6	R
Ceftriaxona	21	S	25	S
Ciprofloxacina	20	S	6	R
Clindamicina	18	S	6	R
Oxacilina	9	R	7	R
Penicilina	20	R	10	R
Tetraciclina	21	S	8	R
Tobramicina	16	S	9	R

Los números representan los halos de inhibición en mm, de acuerdo a la técnica de Kirby Bauer

Esta investigación encontró que *S. aureus* aislada de la trucha arcoiris ejerció una mayor resistencia a penicilina, cefalexina y oxacilina, mientras que presentó sensibilidad a amoxicilina, ceftriaxona, tetraciclina y ciprofloxacina, principalmente. Esto se encuentra en línea con lo reportado por Ou *et al.*, (2020) quienes hallaron que un 12,1 % de la contaminación general de alimentos de origen animal por *S. aureus*, se manifestó en productos acuáticos. El estudio también concluyó que un 90,3 % de los aislamientos de *S. aureus* presentaron resistencia a al menos un agente antimicrobiano, un 39,4 % a múltiples fármacos y un 64,8 % de los aislados tenían una fuerte capacidad de formación de biopelículas. *B. cereus* presentó una resistencia a prácticamente todos los antibióticos probados, siendo sensible solo a ceftriaxona y a Ampicilina (Ou *et al.*, 2020). Otra investigación encontró similares resultados de resistencia de *B. cereus* a los antibióticos de tipo β -lactámicos como penicilina, cefalosporinas y combinación de amoxicilina/ácido clavulánico y ampicilina, obtenidos de diferentes tipos de alimentos. Dicho estudio también reportó que la mayoría de las cepas de *B. cereus* exhibieron una sensibilidad superior al 90 % para ciprofloxacina, cloranfenicol, amikacina y eritromicina (Fiedler *et al.*, 2019).

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los aceites esenciales de romero y orégano silvestre

El cuadro 4 muestra los resultados de las CMI y CMB de los AE frente a las cepas patógenas estudiadas.

Cuadro 4. CMI y CMB de los aceites esenciales de romero y orégano en las bacterias aisladas en este estudio.

Aceite esencial	CMI (µg/mL)		CMB (µg/mL)	
	S. aureus	B. cereus	S. aureus	B. cereus
Romero	28480a	56960a	28480a	64080a
Orégano silvestre	37200b	44640b	52080b	59520b

Letras minúsculas diferentes en columnas representan diferencias significativas de los tratamientos con los aceites esenciales frente a la bacteria estudiada, prueba de kruskall Wallis a $p < 0,05$.

Los resultados mostraron una mejor respuesta del AER frente a la inhibición de *S. aureus*, representada en una CMI menor en un 23,4 % con respecto al AEO. La CMB exhibida por el AER frente a esta bacteria patógena es 45,3 % menor en comparación con el AEO, lo cual sugiere un significativo efecto bactericida del aceite esencial de romero.

El comportamiento de los aceites estudiados contra *B. cereus* fue contrario al exhibido en *S. aureus* debido a que el AEO demostró un mayor efecto antimicrobiano y bactericida con concentraciones 21,6 % y 7,1 % menores, respectivamente, en comparación con el AER.

Similares estudios del aceite de romero probado en bacterias *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* determinaron un efecto inhibidor a concentración de 200 y 270 µg/mL, respectivamente, representando valores más bajos que los descritos en esta investigación, para *S. aureus* y *B. cereus* (Santomauro *et al.*, 2018). En relación al AEO, algunos estudios reportaron inhibición para *B. subtilis* y *S. aureus* a 313 y 640 µg/mL, respectivamente, con una CMB ≥ 2560 µg/mL (Boskovic *et al.*, 2015). El efecto antimicrobiano y antioxidante se encuentra asociado a los compuestos carvacrol y timol, cuya eficiencia se corroboró frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Shigabacillus* y *Bacillus enteritidis* (Leal *et al.*, 2019). Algunos investigadores atribuyen propiedades terapéuticas de estos aceites contra el cáncer, oxidación, diabetes, inflamaciones, hongos y depresión, debido a la presencia de algunos metabolitos presentes en los aceites esenciales como los fenoles, flavonoides y terpenos (Sueishi *et al.*, 2018).

Los mecanismos de inhibición de los aceites esenciales son aún desconocidos, sin embargo algunos estudios lo atribuyen a la interacción electrostática, cambios en la permeabilidad de la membrana debido a la naturaleza hidrofóbica de los compuestos e interrupción súbita de las funciones principales del metabolismo celular, relacionado con la síntesis de proteínas y otras funciones vitales del patógeno. De igual forma se observa mayor eficiencia de los quimiotipos en bacterias grampositivas que en gramnegativas, debido a las diferencias estructurales de la membrana celular (Pisoschi *et al.*, 2018).

CONCLUSIONES

La extracción con fluidos supercríticos aplicada en este estudio permitió la obtención de aceites esenciales libres de solventes, siendo una técnica adecuada para la obtención de compuestos naturales con aplicación alimentaria. La investigación reveló que tanto el rendimiento como la bioactividad de los compuestos de interés presentes en los aceites esenciales de romero y orégano silvestre, se encuentran influenciados por los parámetros de extracción como la temperatura, la presión y el tipo de solvente. Este estudio sugiere que los compuestos terpénicos encontrados en los aceites esenciales de romero y orégano podrían ejercer un efecto antimicrobiano contra las bacterias patógenas *S. aureus* y *B. cereus* aisladas de la trucha arcoiris en una relación dosis-respuesta.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Sistema de Investigaciones de la Universidad de Nariño (Colombia) por la financiación del proyecto.

REFERENCIAS

- ACOSTA J.; ARANGO O.; ÁLVAREZ D.; HURTADO A. Actividad biocida del aceite esencial de *lippia origanoides* H.B.K sobre *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Información Tecnológica, v. 30, n. 6, 2019, p. 45–54.
<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642019000600045>
- ACHOUR M.; MATEOS R.; BEN FREDJ M.; MTIRAOU I A.; BRAVO L.; SAGUEM S. A comprehensive characterisation of rosemary tea obtained from *Rosmarinus officinalis* L. collected in a sub-humid area of Tunisia. Phytochemical Analysis, v. 29, n. 1, 2018, p. 87–100.
<https://doi.org/10.1002/pca.2717>
- AL-HIJAZEEN M. Anti-bacterial effect of *Rosmarinus officinalis* Linn. extract and *Origanum syriacum* L. essential oil on survival and growth of total aerobic bacteria and *Staphylococcus aureus* using cooked chicken meat. Food Science Technology, v. 42, 2022, p. 1–9.
<https://doi.org/10.1590/fst.60720>
- ARGOTE-VEGA, F.; SUÁREZ-MONTENEGRO, Z.; TOVAR-DELGADO, M.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J.; HURTADO-BENAVIDES, A.; DELGADO-OSPINA, J. Evaluation of the inability capacity of essential oils in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, v. 15, 2017, p. 52–60.
[https://doi.org/10.18684/bsaa\(v15\)edicionespecialn2.578](https://doi.org/10.18684/bsaa(v15)edicionespecialn2.578)
- BAJ, T.; BARYLUK, A.; SIENIAWSKA, E. Application of mixture design for optimum antioxidant activity of mixtures of essential oils from *Ocimum basilicum* L., *Origanum majorana* L. and *Rosmarinus officinalis* L. Industrial Crops and Products, v. 115, 2018, p. 52–61.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.006>
- BOSKOVIC, M.; ZDRAVKOVIC, N.; IVANOVIC J.; JANJIC, J.; DJORDJEVIC, J.; STARCEVIC, M.; BALTIC, M. Antimicrobial activity of Thyme (*Tymus vulgaris*) and Oregano (*Origanum vulgare*) essential oils against some foodborne microorganisms. Procedia Food Science, v. 5, 2015, p. 18–21.
<https://doi.org/10.1016/j.profoo.2015.09.005>
- BUENO M. Compressed Fluids for Food By-product Biorefinery. In Nanotechnology in the Life Sciences (Springer, Cham), 2020, p. 219–238.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-44984-1_10
- BURBANO-GALLARDO, E.; NIVIA-DUQUE, G.; IMUES-FIGUEROA, M.; GONZÁLEZ-LEGARDA, E.; GÓMEZ-DELGADO, M.; PANTOJA-DÍAZ, J. Efecto de cultivos piscícolas en los sedimentos y la proliferación de comunidades bacterianas nitrificantes en el lago Guamuez, Colombia. Ciencia & Tecnología Agropecuaria, v. 22, n. 2, 2021, p. 4–15.
https://doi.org/10.21930/rcta.vol22_num2_art:1581
- CENTRAL LECHERA ASTURIANA. (2021). Valores nutricionales Carnes, Pescados y Huevos. Carne, Fuente de Proteínas de Alto Valor Biológico. <https://www.centralecheraasturiana.es/nutricionysalud/nutricion/grupos-de-alimentos/carnes-pescados-y-huevos/> [consultado diciembre 11 de 2022].
- CONDE-HERNÁNDEZ, L.; ESPINOSA-VICTORIA, J.; TREJO, A.; GUERRERO-BELTRÁN, J. CO₂-supercritical extraction, hydrodistillation and steam distillation of essential oil of rosemary (*Rosmarinus officinalis*). Journal of Food Engineering, v. 200, 2017, p. 81–86.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.12.022>
- DOMÍNGUEZ, R.; PATEIRO, M.; GAGAOUA, M.; BARBA, F.; ZHANG, W.; LORENZO, J. A comprehensive review on lipid oxidation in meat and meat products. Antioxidants, v. 8, n. 10, 2019.
<https://doi.org/10.3390/antiox8100429>
- DUPAS, C.; MÉTOYER, B.; EL HATMI, H.; ADT, I.; MAHGOUB, S.; DUMAS, E. Plants: A natural solution to enhance raw milk cheese preservation?. Food Research International, v. 130, 2020, p. 108883.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108883>
-

- FAGUNDO-SIERRA, R.; CERROS-SANTOS, M.; PÉREZ-JÁUREQUI, J. Evaluación del instrumento automatizado Phoenix en la identificación y antibiograma de bacterias de origen clínico. *Bioquímica*, v. 32, n. 2, 2007, p. 39-48
- FIEDLER, G.; SCHNEIDER, C.; IGBINOSA, E.; KABISCH, J.; BRINKS, E.; BECKER, B.; STOLL, D.; CHO, G.; HUCH, M.; FRANZ, C. Antibiotics resistance and toxin profiles of *Bacillus cereus*-group isolates from fresh vegetables from German retail markets. *BMC Microbiology*, v. 19, n. 1, 2019, p. 1–13.
<https://doi.org/10.1186/s12866-019-1632-2>
- GIACOMETTI, J.; BURSAC-KOVAČEVIĆ, D.; PUTNIK, P.; GABRIĆ, D.; BILUŠIĆ, T.; KREŠIĆ, G.; STULIĆ, V.; BARBA, F.; CHEMAT, F.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.; REŽEK-JAMBRAK, A. Extraction of bioactive compounds and essential oils from mediterranean herbs by conventional and green innovative techniques: A review. *Food Research International*, v. 113, 2018, p. 245–262.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.036>
- GYÓRI, E.; VARGA, A.; FÁBIÁN, I.; LÁZÁR I. Supercritical CO₂ extraction and selective adsorption of aroma materials of selected spice plants in functionalized silica aerogels. *Journal of Supercrit Fluids*, v. 148, 2019, p. 16–23.
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.02.025>
- INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACION (ICONTEC).2016. Grasas y aceites animales y vegetales. Método de la determinación de la densidad (masa por volumen convencional). Disponible en: <https://tienda.icontec.org/gp-grasas-y-aceites-animales-y-vegetales-metodo-de-la-determinacion-de-la-densidad-masa-por-volumen-convencional-ntc336-2016> [Consultado agosto 20 de 2022].
- INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACION (ICONTEC).2019. Grasas y aceites animales y vegetales. Método de la determinación del índice de refracción. Disponible en: <https://tienda.icontec.org/gp-grasas-y-aceites-animales-y-vegetales-determinacion-del-indice-de-refraccion-ntc289-2019> [Consultado agosto 20 de 2022].
- (ITALIA). ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN (FAO). El estado mundial de la agricultura y la alimentación. Progresos en la lucha contra la pérdida y el desperdicio de alimentos. 2019. ISBN 978-92-5-131854-6
- (ITALIA). ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN (FAO). The state of world fisheries and aquaculture 2020. Sustainability in action. 2020.
<https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- JOVANOVIĆ, J.; ORNELIS, V.; MADDER, A.; RAJKOVIĆ, A. *Bacillus cereus* food intoxication and toxicoinfection. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 20, n. 4, 2021, p. 3719–3761.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12785>
- LEAL, A.; BRAGA, A.; DE ARAÚJO, B.; RODRIGUES, A.; DE CARVALHO, T. Antimicrobial action of essential oil of *Lippia organoides* H.B.K. *Journal of Clinical Microbiology and Biochemical Technology*, v. 5, n. 1, 2019, p. 007–012.
<https://dx.doi.org/10.17352/jcmbt.000032>
- OU, C.; SHANG, D.; YANG, J.; CHEN, B.; CHANG, J.; JIN, F.; SHI, C. Prevalence of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* isolates with strong biofilm formation ability among animal-based food in Shanghai. *Food Control*, vol. 112, 2020, p. 107106.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107106>
- PISOSCHI, A.; POP, A.; GEORGESCU, C.; TURCUȘ, V.; OLAH, N.; MATHE, E. An overview of natural antimicrobials role in food. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 143, 2018, p. 922–935.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.095>
- PUTNIK, P.; GABRIĆ, D.; ROOHINEJAD, S.; BARBA, F.; GRANATO, D.; MALLIKARJUNAN, K.; LORENZO, J.; BURSAC-KOVAČEVIĆ, D. An overview of organosulfur compounds from *Allium* spp.: From processing and preservation to evaluation of their bioavailability, antimicrobial, and anti-inflammatory properties. *Food Chemistry*, v. 276, 2019, p. 680–691.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.068>

- RASIA, M.; CASTAGNINI, J.; PEREYRA, F.; CAPODOGLIO, D.; GERARD, J.; SAN MIGUEL, S.; PAGANI, C. Estudio de emulsiones pickering para la microencapsulación de aceites esenciales cítricos y su estabilización por liofilización. *Ciencia, Docencia y Tecnología*, v. 9, n. 9, 2019, p. 94–110.
<https://pcient.uner.edu.ar/index.php/Scdyt/article/view/661>
- RONG, D.; WU, Q.; XU, M.; ZHANG, J.; YU, S. Prevalence, virulence genes, antimicrobial susceptibility, and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* from retail aquatic products in China. *Frontiers Microbiology*, v. 8, 2017, p. 1–10.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00714>
- SANTOMAURO, F.; SACCO, C.; DONATO, R.; BELLUMORI, M.; INNOCENTI, M.; MULINACCI, N.; The antimicrobial effects of three phenolic extracts from *Rosmarinus officinalis L.*, *Vitis vinifera L.* and *Polygonum cuspidatum L.* on food pathogens. *Natural Products Research*, v. 32, n. 22, 2018, p. 2639–2645.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1375920>
- SUÁREZ, K.; MELO, D.; FLÓREZ, M.; MACÍAS, J.; RÍOS L. Aporte socioeconómico y valorización de residuos de trucha en El Encano (Municipio de Pasto). *Semestre Económico*, v. 23, n. 55, 2020, p.331-352.
<https://doi.org/10.22395/seec.v23n55a15>
- SUÁREZ-MONTENEGRO, Z.; ÁLVAREZ-RIVERA, G.; MENDIOLA, J.; IBÁÑEZ, E.; CIFUENTES, A. Extraction and mass spectrometric characterization of terpenes recovered from olive leaves using a new adsorbent-assisted supercritical CO₂ process. *Foods*, v. 10, 2021, p. 1301.
<https://doi.org/10.3390/foods10061301>
- SUCASAIRE, J. Orientaciones para la selección y el cálculo del tamaño de la muestra en investigación. 2022. In *Paper Knowledge . Toward a Media History of Documents*. http://repositorio.concytec.gob.pe/bitstream/20.500.12390/3096/1/Orientaciones_para_seleccion_y_calculo_del_tamaño_de_muestra_de_investigacion
- SUEISHI, Y.; SUE, M.; MASAMOTO, H. Seasonal variations of oxygen radical scavenging ability in rosemary leaf extract. *Food Chemistry*, v. 245, 2018, p. 270–274.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.085>
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Estimating the burden of foodborne diseases: a practical handbook for countries. 2021. In World Health Organization.
<https://www.who.int/publications/i/item/9789240012264>
- YOUSEFI, M.; RAHIMI-NASRABADI, M.; POURMORTAZAVI, S.; WYSOKOWSKI, M.; JESIONOWSKI, T.; EHRLICH, H.; MIRSADEGHI, S. Supercritical fluid extraction of essential oils. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 118, 2019, p. 182–193.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.038>