

**Evaluación de los aceites esenciales (Alfa
Pino y Limoneno) contra el crecimiento de
Staphylococcus aureus productores de
enterotoxinas *in vitro***

Donaldo Enrique Cruz Villeda

**Escuela Agrícola Panamericana Zamorano,
Honduras**
Octubre, 2014

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Evaluación de los aceites esenciales (Alfa
Pino y Limonene) contra el crecimiento de
Staphylococcus aureus productores de
enterotoxinas *in vitro***

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el Grado
Académico de Licenciatura

Presentado por:

Donaldo Enrique Cruz Villeda

Zamorano, Honduras

Octubre, 2014

Evaluación de los aceites esenciales (Alfa Pineno y Limonene) contra el crecimiento de *Staphylococcus aureus* productores de toxinas *in vitro*

Presentado por:

Donaldo Enrique Cruz Villeda

Aprobado:

Mayra Márquez, Ph.D.
Asesora Principal

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Director
Departamento de Agroindustria
Alimentaria

Jorge Cardona, Ph.D.
Asesor

Raúl H. Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Evaluación de los aceites esenciales (Alfa Pineno y Limonene) contra el crecimiento de *Staphylococcus aureus* productores de toxinas *in vitro*

Donaldo Enrique Cruz Villeda

Resumen: Dentro de los diversos factores de virulencia que produce *Staphylococcus aureus* se encuentran las enterotoxinas, que están directamente relacionadas con intoxicación alimentaria. Utilizando la técnica de reacción en cadena de polimerasa se detectó al menos uno de los genes productores de toxinas *seA-seE* y *seG*, *seH* y *seI* en diez cepas analizadas. Por otra parte, la industria alimentaria está en busca de nuevos antimicrobianos para el control de *S. aureus* debido a que esta bacteria ha desarrollado resistencia a un considerable número de antibióticos en las últimas décadas. El objetivo de esta sección fue evaluar el efecto de dos aceites esenciales (α -pineno y limoneno), a una concentración de 0.5 y 1.5%, solos y en combinación, para determinar cuál de los dos presenta un mayor efecto inhibitorio sobre las diferentes cepas de *S. aureus* a dos temperaturas (37 y 25 °C). Todos los tratamientos mostraron inhibición contra el microorganismo. En ambas temperaturas fue más notable la acción inhibitoria de alfa pineno a una concentración de 1.5%. A 37 °C α -pineno aumentó el tiempo de generación en promedio a 9.6 horas en cepas resistentes a antibióticos (MRSA) y 7 horas en cepas sensibles (MSSA). A 25 °C el compuesto prolongó el tiempo de generación de 5 a 17 horas para las cepas MRSA y de 4.6 a 13 horas para las cepas MSSA. En este experimento ocurrió antagonismo por parte de limoneno para α -pineno. Es necesario realizar más investigaciones para incorporar de manera definitiva estos antimicrobianos en productos alimenticios.

Palabras clave: Antimicrobiano, enterotoxinas, resistencia antibióticos, tiempo de generación.

Abstract: Enterotoxins are found among the different virulence factors produced by *Staphylococcus aureus*, which are closely related to food borne diseases. *Staphylococcal* genes *seA-seE* and *seG*, *seH* and *seI* were identified in most of *S. aureus* strains using the Polymerase Chain Reaction technique. Conversely, food industry is in the search of new antimicrobials for the control of *S. aureus* due that this microorganism has developed multi-antibiotic resistance in the last decades. The objective of this section was to evaluate the effect of two essential oils in concentrations of 0.5 and 1.5%, alone and in combination, to determine which has a higher inhibitory effect against the different *S. aureus* strains at two temperatures (37 °C and 25 °C). All treatments showed inhibition against the microorganism. At both temperatures, α -pinene at 1.5 % had a higher inhibition than limonene and the combinations. At 37 °C, α -pinene increased the strains' specific growth rate up to 9.6 hours (MRSA) and 7 hours (MSSA) and at 25 °C it increased the specific growth rate up to 17 hours (MRSA) and 13 hours (MSSA). Antagonism was observed when combining essential oils. It is necessary to do more research to definitely incorporate these antimicrobials in food products.

Key words: Antimicrobial, enterotoxins, antibiotic resistances, growth rate.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	v
1 INTRODUCCIÓN	1
2 MATERIALES Y MÉTODOS	3
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	6
4 CONCLUSIONES	12
5 RECOMENDACIONES	13
6 LITERATURA CITADA	14
7 ANEXOS.....	18

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Página
1. Formulación de los reactivos para amplificación de ADN de las cepas de <i>S. aureus</i>	4
2. Descripción de los tratamientos del crecimiento de <i>S. aureus</i> en presencia de aceites esenciales.	5
3. Caracterización vía PCR de los genes que codifican para la producción de enterotoxina en diferentes cepas de <i>S. aureus</i>	7
4. Tiempo de generación (en horas) de <i>Staphylococcus aureus</i> en presencia de los compuestos de aceites esenciales a 37 °C.	9
5. Tiempo de generación (en horas) de <i>Staphylococcus aureus</i> en presencia de los compuestos de aceites esenciales a 25 °C.	10
Anexos	Página
1. Interacción de factores que tuvieron influencia en el comportamiento de las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> utilizando los compuestos α -pineno y R-(+)-limonene.	18
2. Gráficas de crecimiento de cepas de <i>S. aureus</i> #24 en presencia de aceites esenciales y su combinación a 37 °C.	19
3. Gráficas de crecimiento de cepas de <i>S. aureus</i> #36 en presencia de aceites esenciales y su combinación a 37 °C.	20
4. Gráficas de crecimiento de cepas de <i>S. aureus</i> ATCC 6538 en presencia de aceites esenciales y su combinación a 37 °C.	21
5. Gráficas de crecimiento de cepas de <i>S. aureus</i> ATCC 25923 en presencia de aceites esenciales y su combinación a 37 °C.	22
6. Gráficas de crecimiento de cepas de <i>S. aureus</i> #56 en presencia de aceites esenciales y su combinación a 37 °C.	23
7. Gráficas de crecimiento de cepas de <i>S. aureus</i> Mu50 en presencia de aceites esenciales y su combinación a 37 °C.	24
8. Gráficas de crecimiento de cepas de <i>S. aureus</i> COL en presencia de aceites esenciales y su combinación a 37 °C.	26

Anexos	Página
9. Gráficas de crecimiento de cepas de <i>S. aureus</i> ATCC 6538 en presencia de aceites esenciales y su combinación a 25 °C.	27
10. Gráficas de crecimiento de cepas de <i>S. aureus</i> ATCC 25923 en presencia de aceites esenciales y su combinación a 25 °C.	28
11. Gráficas de crecimiento de cepas de <i>S. aureus</i> #24 en presencia de aceites esenciales y su combinación a 25 °C.	29
12. Gráficas de crecimiento de cepas de <i>S. aureus</i> #36 en presencia de aceites esenciales y su combinación a 25 °C.	30
13. Gráficas de crecimiento de cepas de <i>S. aureus</i> #56 en presencia de aceites esenciales y su combinación a 25 °C.	31
14. Gráficas de crecimiento de cepas de <i>S. aureus</i> Mu50 en presencia de aceites esenciales y su combinación a 25 °C.	32
15. Gráficas de crecimiento de cepas de <i>S. aureus</i> N315 en presencia de aceites esenciales y su combinación a 25 °C.	33
16. Gráficas de crecimiento de cepas de <i>S. aureus</i> COL en presencia de aceites esenciales y su combinación a 25 °C.	34

1. INTRODUCCIÓN

Staphylococcus aureus es un microorganismo Gram positivo, coagulasa positivo o negativo, oportunista (Walker *et al.* 2013) y miembro de la familia *Micrococcaceae*. Esta bacteria es altamente adaptativa, siendo capaz de crecer bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas (Francois *et al.* 2014). *S. aureus* es responsable de un amplio espectro de enfermedades en seres humanos incluyendo desde infecciones benignas en la piel hasta enfermedades que atentan contra la vida como septicemia (Francois *et al.* 2014). Además, la intoxicación estafilocócica es una de las causas más comunes de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) debido al consumo de alimentos contaminados con enterotoxinas producidas por la bacteria (Stressl y Wagner 2013). El desarrollo de resistencia a antibióticos y la habilidad para colonizar e infectar a los humanos y productos alimenticios, por parte de *S. aureus*, se ha convertido en una seria amenaza para la salud humana y la industria de alimentos (Pegram 1981).

Las toxinas estafilocócicas son toxinas eméticas, clasificadas como miembros de la familia pirogénica súperantígena debido a su actividad biológica y su cercana relación estructural (Blaiotta *et al.* 2004). Es de mucha importancia recalcar que no todas las toxinas producidas por *S. aureus* cumplen la misma función. Entre las más importantes se encuentran las hemolisinas, las leucocidinas, toxinas exfoliativas, toxina del síndrome de shock tóxico (TSST, por sus siglas en inglés) y las enterotoxinas (Fueyo 2005). Es muy importante mencionar que la patogénesis o etiología de *S. aureus* está directamente relacionada a la abundante excreción de enterotoxinas, causando daño incluso en las células inmunológicas del huésped (Enany *et al.* 2013, Francois *et al.* 2014).

Por otra parte, es de vital importancia conocer que estas proteínas están directamente asociadas a la intoxicación estafilocócica en alimentos, la cual ocurre después de haber sido ingerido el alimento, manifestándose particularmente en carnes procesadas y productos lácteos (Argudín *et al.* 2010). Entre las enterotoxinas más comunes en las intoxicaciones se encuentran: SEA-SEE, SEG, SEH, SEI, SER-SET (Blaiotta *et al.* 2004, Klotz *et al.* 2003). Adicionalmente, las enterotoxinas, al ser proteínas, producen compuestos que se asocian a la pared celular de las células del huésped. Aunque esto no es requerido para su crecimiento o división celular bajo condiciones ordinarias, permiten al microorganismo a adaptarse a condiciones de medio especiales, incluyendo varios tipos de estrés así como diferente tipos de sustratos nutricionales (Herbert *et al.* 2001). Estas secreciones constituyen un reservorio de factores de virulencia (Kusch y Engelmann 2014), los cuales son necesarios para la bacteria pueda colonizar el tejido del huésped y adquirir protección contra cualquier defensa del huésped (Enany *et al.* 2013). Estas secreciones constituyen un reservorio de factores de virulencia (Kusch y Engelmann 2014), los cuales son necesarios para la bacteria pueda colonizar el tejido del huésped y adquirir protección contra cualquier defensa del huésped (Enany *et al.* 2013).

Las cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos son más conocidas como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA, por sus siglas en inglés), siendo estas más difíciles de controlar (Walker *et al.* 2013). De acuerdo al Instituto Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales (NNIS, por sus siglas en inglés) (2002) el 52.3% de las infecciones nosocomiales en las unidades de cuidados intensivos en los hospitales de Estados Unidos se deben a MRSA. Esto demuestra un incremento de 37% de 1994 hasta 1998, lo que refleja un serio problema en el control de este microorganismo. Los costos de hospitalización asociados a infecciones causados por MRSA ascienden hasta \$ 35,000/infección (Ravipaty y Reilly 2010). La Autoridad Europea para la Inocuidad de Alimentos (EFSA, por sus siglas en inglés) informó acerca de la presencia una cepa MRSA (CC398) en animales de producción de carne para consumo humano (cerdos, terneros y pollos) (Mulders *et al.* 2010), sin embargo esto no se ha asociado a enfermedades transmitidas por alimentos. Aun cuando no todas estas infecciones son causadas por MRSA en alimentos, la industria alimentaria está obligada a buscar nuevas alternativas a los antibióticos convencionales.

Es debido a esto que surge una nueva alternativa a los antibióticos convencionales, los aceites esenciales. Los aceites esenciales, también llamados esencias aromáticas de plantas, son sustancias aceitosas, volátiles, producidas por un amplio espectro de familia de plantas que demuestran tener propiedades antimicrobianas. Para los propósitos de este estudio, se utilizaron dos aceites esenciales, R-(+)-limonene y α -Pinenol. R-(+)-limonene es un aceite esencial extraído en su mayoría de plantas cítricas, es parte de una larga lista de compuestos llamados hidrocarburos terpénicos monocíclicos. Estos compuestos han demostrado poseer características antibacterianas, antifúngicos e insecticidas (Carson y Hammer 2011). Este aceite se ha mostrado activo frente a bacterias que contaminan alimentos (Imbesi y De Pasquale 2003). Por otra parte, α -Pinenol es considerado el monoterpeno más abundante y químicamente explotado por la industria, el cual es extraído de una gran variedad de pinos (Liu 2005).

En el presente proyecto se caracterizaron genéticamente diez cepas de *S. aureus* para identificar el tipo de enterotoxinas que producen y se demuestra el efecto de los aceites esenciales en el crecimiento de diez cepas de *S. aureus*.

Los objetivos de este proyecto fueron:

- Detectar los genes de producción de enterotoxinas en diversas cepas de *Staphylococcus aureus*.
- Evaluar el efecto de compuestos aceites esenciales puros (R-(+)-limonene y α -Pinenol) en el crecimiento de *Staphylococcus aureus*.
- Evaluar el efecto de combinaciones de compuestos de aceites esenciales (R-(+)-limonene y α -pineno) en el crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del ensayo. El estudio se llevó a cabo en el Centro de Investigación de Biomasa, en el departamento de Ciencia de Alimentos de la Universidad de Arkansas, localizada en Fayetteville, Arkansas, Estados Unidos de América.

Cepas bacterianas. *S. aureus* ATCC 25923 y *S. aureus* ATCC 6538 (sensibles a antibióticos), *S. aureus* N315 (MRSA), *S. aureus* COL (MRSA) y *S. aureus* MU50 (Resistente intermedio a Vancomicina) facilitadas por el Laboratorio Dr. Wilkinson de la Universidad Estatal de Illinois. Las cepas restantes *S. aureus* #24, #36, #37, #43 (sensibles a antibióticos) y #56 (MRSA) procedentes de aislados de hisopos nasales, fueron facilitadas por el Dr. Dave Gilmore de la Universidad Estatal de Arkansas.

Cultivo de bacterias. Los inóculos de *Staphylococcus* fueron preparados en 5 ml de caldo de soya tríptico (CST) adicionándole una colonia extraída de las placas de agar soya tríptico (AST), las cuales contenían las cepas. Los cultivos fueron incubados a 37 °C y 150 RPM durante 24 horas.

Extracción de ADN. Al siguiente día, se tomó 1 ml de cada cultivo y se transfirieron a tubos de microcentrífuga. Los cultivos fueron centrifugados a 10 °C a 10,000 X g por 10 minutos para obtener el pellet de células de la bacteria. Luego de centrifugar, se lavó el pellet utilizando 100 µl de buffer TE (Tris-EDTA) y se suspendió en 200 µl del mismo buffer. La extracción del ADN genómico se realizó siguiendo el protocolo del fabricante (QiAGEN DNA mini kit). La porción final de ADN se disolvió en 100 µl de buffer TE y fue almacenada a en el congelador a -22 °C. La concentración de ADN genómico en las muestras se midió al siguiente día utilizando el espectrofotómetro (Nanodrop 1000) obteniendo un resultado en ηg/L.

Detección de los genes en las cepas bacterianas. Se realizó la detección utilizando la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). En un tubo de microcentrífuga se agregaron los reactivos necesarios para la amplificación (Cuadro 1).

Cuadro 1. Formulación de los reactivos para amplificación de ADN de las cepas de *S. aureus*.

Reactivos	Volumen (μl)
Taq polimerasa	12.5
Potenciador 360 GC	0.5
F Primer 10 μM	0.5
R Primer 10 μM	0.5
Agua desionizada estéril	9.0
Muestra de ADN	2.0
Volumen total	25.0

Posteriormente se colocaron las muestras en el termociclador (Artik Cycler), utilizando un programa de amplificación con las siguientes condiciones: 5 minutos a 95 °C para la etapa inicial, 40 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 52 °C y 30 segundos a 72 °C para la etapa de desnaturalización y 5 minutos a 72 °C para la etapa de elongación y extensión. Luego, se agregaron las muestras extraídas del termociclador a un gel de agarosa (1.5%) para llevar a cabo la electroforesis, la cual se programó a 50 V durante 2 horas.

Preparación de aceites esenciales. Los aceites a utilizar, R-(+)-limonene (Sigma Aldrich) y α-Pineno (Sigma Aldrich), se prepararon en dos concentraciones (0.5 y 1.5% v/v). Estos aceites se prepararon en Tween 80 debido a que no son hidrosolubles. Para la concentración 0.5% se agregaron 50 μl del aceite esencial (α-pineno o R-(+)-limonene) en 10 ml de Tween 80. Para la concentración de 1.5% se agregaron 150 μl del aceite esencial en 10 ml de Tween 80. La combinación de los aceites se realizó tomando 5 ml de cada stock de los aceites previamente preparados y se mezclaron en un tubo nuevo, para cada una de las concentraciones.

Crecimiento de *S. aureus* en presencia de aceites esenciales. Se realizó un precultivo de cada cepa, este se llevó a cabo tomando una colonia de la cepa e inoculándola en 5 ml de CST a 37 °C con una agitación de 150 RPM. Al siguiente día, se tomó 1 ml de cada cultivo y se diluyó en 25 ml de CST para obtener así una baja densidad óptica (DO~0.2 @ 600nm). La incubación de las cepas se llevó a cabo utilizando el lector de microplacas TECAN®. Se realizaron un total de 4 rondas de incubación. Se colocaron 5 cepas por cada ronda de incubación a 37 °C durante 48 h y 25 °C durante 72 h de modo de que todas las cepas recibieran todos los tratamientos (Cuadro 2).

Cuadro 2. Descripción de los tratamientos del crecimiento de *S. aureus* en presencia de aceites esenciales.

Ronda	Cepas	Condiciones
1	24, 36, 37, 43 and 56	37 °C durante 48 horas
2	24, 36, 37, 43 and 56	25 °C durante 72 horas
3	N315, Col, Mu50, ATCC 6538, ATCC 25923	25 °C durante 72 horas
4	N315, Col, Mu50, ATCC 6538, ATCC 25923	37 °C durante 48 horas

Después de la incubación se realizaron las curvas de crecimiento y se calcularon los tiempos de generación para cada cepa para compararlos con los tiempos de generación de los controles positivos.

Para el cálculo del tiempo de generación se calculó el tiempo de duplicación (t_d) de las células en relación a la densidad óptica (DO) y el tiempo. Esto se realizó utilizando la ecuación 1 planteada por Widdel (2007):

$$t_d = \frac{2.303(\log OD_2 - \log OD_1)}{(t_2 - t_1)} \quad [1]$$

Una vez calculado t_d , se insertó en la ecuación 2 para obtener el tiempo de generación de cada cepa:

$$\mu = \frac{\ln 2}{t_d} \quad [2]$$

Diseño experimental. Se utilizó el programa estadístico SAS® versión 9.3, se realizó un Diseño Completamente al Azar (DCA), un análisis de varianza (ANOVA) con un arreglo factorial de 2×3×2 (2 tipos de cepas, 3 aceites esenciales, 2 concentraciones) con dos repeticiones para cada una de las temperaturas (37 °C y 25 °C), separación de medias LS means con un nivel de significancia de 0.05.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Detección de los genes estafilocócicos en las cepas bacterianas. Los resultados de los ensayos de PCR en las cepas de *S. aureus* se muestran en el cuadro 3. Se pudo observar que la mayoría de las cepas sometidas a la prueba fueron positivas para la mayoría de los genes estafilocócicos (GE) clásicos (*seA-seE*), con la excepción de los genes *seB* y *seD* para los cuales ninguna fue positiva a excepción del control positivo. Para el gen *seA* fueron positivas 9 cepas (90%), exceptuando la cepa #37. Los resultados del gen *seC* demostraron que las 9 cepas (90%) menos 1 (#37) fueron positivas y para el gen *seE* 8 cepas (80%) fueron positivas, excluyendo las cepas ATCC 6538 y N315. Los genes que codifican la enterotoxina estafilocócica G (*seG*) fueron detectados en las 10 cepas (100%) analizadas en este ensayo. Por su parte, el gen *seH* solamente se detectó en 2 cepas (20%) Mu50 y #43 y el gen *seI* se manifestó en 8 cepas exceptuando ATCC 6538 y N315.

De las siete enterotoxinas incluídas en la investigación, la enterotoxina del serotipo A es la que está relacionada más cercanamente con los brotes por intoxicación alimentaria, siguiéndole en orden decreciente las C, B, D y E (Bécquer *et al.* 1996 y Normanno *et al.* 2007). Se observó que solo una cepa (10%) fue positiva para la enterotoxina B, Márquez (2012) detectó la enterotoxina B en el 11% de muestras de queso blanco artesanal se analizaron en su investigación. La enterotoxina C ha sido identificado en la mayoría de las cepas en esta investigación y Normanno *et al.* (2007) estudió previamente que este gen está sumamente asociado a intoxicaciones por consumo de productos lácteos contaminados.

El 80% de las cepas sometidas a la detección fueron positivas para la enterotoxina E. En muchos casos la enterotoxina E ha sido detectada en muestras de pollo (Jarraud *et al.* 1999). Por su parte las enterotoxinas del serotipo G, H e I han demostrado ser inductoras de síndromes gastroentéricos en las personas que resultan intoxicadas por estas (Klotz *et al.* 2003). De acuerdo a Sakai *et al.* (2008), la enterotoxina del tipo H es muy similar a la enterotoxina A, por lo cual se supone que está involucrada en casos de intoxicación alimentaria por *Staphylococcus*.

Cuadro 3. Caracterización vía PCR de los genes que codifican para la producción de enterotoxina en diferentes cepas de *S. aureus*.

Cepas	Tipo	seA	seB	seC	seD	seE	seG	seH	seI
56	MRSA	+	-	+	-	+	+	-	+
COL	MRSA	+	+	+	-	+	+	-	+
Mu50	MRSA	+	-	+	-	+	+	+	+
N315	MRSA	+	-	+	-	-	+	-	-
24	MSSA	+	-	+	-	+	+	-	+
ATCC 6538	MSSA	+	-	+	-	-	+	-	-
43	MSSA	+	-	+	-	+	+	+	+
37	MSSA	-	-	+	-	+	+	-	+
36	MSSA	+	-	-	-	+	+	-	+
ATCC 25923	MSSA	+	-	+	-	+	+	-	+
NRS 382	-				+				
NRS 123	-							+	
NRS 111	-					+			

(*): Cepas de referencia utilizadas como control positivo.

se: gen estafilocócico

MSSA: *Staphylococcus aureus* sensible a antibióticos.

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a antibióticos.

Crecimiento de *S. aureus* en presencia de aceites esenciales. En el análisis del efecto de los aceites sobre el crecimiento de las diez cepas de *S. aureus* se pudo observar que los aceites, puros y en combinación, tuvieron un efecto inhibitorio en el crecimiento de las cepas. A 37 °C, siendo la temperatura óptima de crecimiento de las bacterias, el aceite que mostró la mejor acción inhibitoria fue α -pineno a una concentración de 1.5%. Este tratamiento aumentó el tiempo de generación en promedio a 9.6 horas (MRSA) y 7 horas (MSSA), aproximadamente a 4 veces más que el control positivo. También tuvo un efecto considerable en el tiempo de generación el compuesto R-(+)-limonene a una concentración de 1.5%, hubo una mejor respuesta de las cepas tipo MRSA al tratamiento, dando como resultado un tiempo de generación de 6 horas en promedio.

Como se esperaba ambos aceites a una concentración de 0.5% fueron menos efectivos en la inhibición del crecimiento de las bacterias dando como resultado tiempos de generación en un rango de 3-3.6 horas de tiempo de generación para ambos tipos de cepa. No hubo diferencias significativas entre en los tratamientos a 0.5% y el control (Cuadro 4). Al combinar los compuestos, la concentración que tuvo mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la bacteria fue la de 1.5%, pero mostró menor inhibición que el compuesto

α - pineno puro a 1.5% y un comportamiento estadísticamente igual al (-D) limonene a 1.5%.

En los ensayos a 25 °C los tiempos de generación de las bacterias aumentaron significativamente como era esperado. El compuesto que mostró mejor inhibición fue α - pineno puro a 1.5 % prolongando el tiempo de generación de 5 a 17 horas en promedio para las cepas MRSA y de 4.6 a 13 horas para las cepas MSSA, siendo estadísticamente diferente a los demás tratamientos y al control. El tratamiento con (-D) limonene a 1.5% fue menos efectivo que α - pineno a 1.5% (10.7 y 7.5 horas de tiempo de generación para MRSA y MSSA, respectivamente) pero también mostró un aumento significativo en el tiempo de generación con respecto al control. El tratamiento con los compuestos en combinación a 1.5% fue estadísticamente igual al tratamiento con (-D) limonene a 1.5% pero fue a su vez inferior al tratamiento con α - pineno a 1.5%. Los tratamientos con los compuestos concentrados al 0.5% fueron significativamente inferiores a los tratamientos a 1.5% como se esperaba. Los resultados de todos los tratamientos para las cepas MRSA fueron mayores que para las cepas MSSA (Cuadro 5).

Se atribuye la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales a los diversos efectos que estos pueden causar en la célula del microorganismo como ser: cambios en la morfología, inhibición de la respiración de la célula, ruptura de la pared celular de la célula y división de la célula (Al Yousef 2014, Medeiros 2007). Se ha demostrado que la mayor parte de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales proviene de los terpenos oxigenados (terpenos fenólicos y alcoholes), siendo α - pineno y (-D) limonene parte de estos (Bassolé y Juliani 2012). α - pineno y otros aceites esenciales han demostrado tener actividad inhibitoria contra MRSA en experimentos previos (Raman *et al.* 1995, Rivas *et al.* 2012, Dhar *et al.* 2014). El compuesto (-D) limonene también ha demostrado tener actividad inhibitoria contra *S. aureus* en estudios previos, siendo siempre menos efectivo que α - pineno (Imbesi y De Pasquale 2002, Lee 2007). La razón de poseer una menor actividad inhibitoria se puede atribuir a que potencialmente exista un contenido demasiado alto de hidrocarburos en este compuesto (Bassolé y Juliani 2012).

Cuadro 4. Tiempo de generación (en horas) de *Staphylococcus aureus* en presencia de los compuestos de aceites esenciales a 37 °C.

Tipo de Cepa	R-(+)-limonene			α -pineno		α -pineno + R-(+)-limonene	
	Control (+)	0.5 %	1.5%	0.5 %	1.5 %	0.5 %	1.5 %
		Media \pm DE	Media \pm DE	Media \pm DE	Media \pm DE	Media \pm DE	Media \pm DE
MRSA	2.44 \pm 0.207 ^{Ay}	3.45 \pm 0.48 ^{Ay}	6.14 \pm 1.20 ^{Ax}	3.50 \pm 0.53 ^{Ay}	9.64 \pm 1.39 ^{Aw}	3.62 \pm 0.69 ^{Ay}	7.02 \pm 1.34 ^{Ax}
MSSA	2.28 \pm 0.242 ^{Ay}	2.97 \pm 0.23 ^{Ay}	4.09 \pm 0.23 ^{Bx}	3.17 \pm 0.30 ^{Ay}	6.93 \pm 1.20 ^{Bw}	3.28 \pm 0.38 ^{Axy}	5.06 \pm 0.74 ^{Bx}
CV (%)	9.85	13.61	15.33	23.40	20.80	16.42	24.06

MSSA: *Staphylococcus aureus* sensible a antibióticos.

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a antibióticos.

DE: Desviación estándar

CV: Coeficiente de variación

Medias con letras mayúsculas diferentes en cada columna (A-B) son estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$) y letras minúsculas diferentes en cada fila (w-y) son estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$).

Cuadro 5. Tiempo de generación (en horas) de *Staphylococcus aureus* en presencia de los compuestos de aceites esenciales a 25 °C.

Tipo de Cepa	R-(+)-limonene			α -pineno		α -pineno + R-(+)-limonene	
	Control (+)	0.5 %	1.5%	0.5 %	1.5 %	0.5 %	1.5 %
		Media \pm DE	Media \pm DE	Media \pm DE	Media \pm DE	Media \pm DE	Media \pm DE
MRSA	5.02 \pm 0.67 ^{Az}	7.88 \pm 1.92 ^{Ay}	10.79 \pm 3.30 ^{Ax}	8.16 \pm 3.01 ^{Ay}	17.082 \pm 3.02 ^{Aw}	7.98 \pm 1.85 ^{Ay}	12.08 \pm 1.34 ^{Ax}
MSSA	4.64 \pm 0.29 ^{Ayz}	5.45 \pm 0.45 ^{By}	7.45 \pm 1.18 ^{By}	6.28 \pm 0.30 ^{By}	15.216 \pm 0.00 ^{Bw}	5.86 \pm 0.48 ^{By}	9.21 \pm 2.39 ^{Bx}
CV (%)	11.10	11.04	18.06	6.60	22.02	20.21	20.10

MSSA: *Staphylococcus aureus* sensible a antibióticos.

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a antibióticos.

DE: Desviación estándar

CV: Coeficiente de variación

Medias con letras mayúsculas diferentes en cada columna (A-B) son estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$) y letras minúsculas diferentes en cada fila (w-y) son estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$).

Al combinar los compuestos de aceites esenciales se debe tener en cuenta que pueden ocurrir cuatro fenómenos producto de la combinación, estos son: antagonismo, indiferencia, adición y sinergismo (Burt 2004). Se puede decir que en este experimento ocurrió antagonismo por parte de R-(+)-limonene para α -pineno. Es decir, al combinarlos el efecto inhibitorio fue menor al que mostró α -pineno individualmente. El efecto de antagonismo puede ocurrir dependiendo de la proporción en que se utilicen los aceites esenciales (Van Vuuren *et al.* 2009, Bassolé y Juliani 2012)

En todos los tratamientos de los compuestos de aceites esenciales al 1.5 % existió diferencia significativa en el tiempo de generación entre los tipos de cepa (MRSA y MSSA) demostrando mayor sensibilidad al compuesto las cepas resistentes. No hubo diferencia para el tiempo de generación en los tratamientos a 0.5%. Esto se puede atribuir potencialmente, a la alta sensibilidad que poseen algunas cepas de *S. aureus* a diferentes aceites como ser el de eucalipto, oréganos y romero, estando compuesto este último en mayor porcentaje por α -pineno, 1,8 cineole y alcanfor (Smith-Palmer *et al.* 1998, Issabeagloo *et al.* 2012)

Se ha demostrado que un amplio espectro de aceites esenciales posee actividad antimicrobiana ante una diversidad de microorganismos, sin embargo, su aplicación en alimentos sigue careciendo de investigación (Edward-Jones *et al.* 2004). Una de las principales características de un alimento que se verían afectadas por el uso de aceites esenciales sería el sabor, por lo cual se ha planteado utilizar estos aceites en bajas concentraciones para minimizar el efecto antes mencionado (Reyes-Jurado *et al.* 2012). Debido a que su uso se da principalmente en fragancias y como saborizantes, también existe poca información acerca de la regulación del uso los aceites esenciales como antimicrobianos en la industria alimentaria (Brud 2010).

El Código de Regulaciones Federales de Estados Unidos (CFR, por sus siglas en inglés), establece que para sustancias producidas naturalmente se debe aplicar el criterio "... no debe provocar que el alimento se vuelva dañino a la salud" (CFR 2013). Los aceites esenciales, en su mayoría, son extraídos de plantas o fuentes comestibles pero no son comestibles por su cuenta (Adams y Taylor 2010), por lo cual al momento de ser reguladas resulta difícil aplicar un estándar para garantizar que el compuesto es seguro para el consumo.

4. CONCLUSIONES

- Se detectaron la mayoría de los genes que codifican a las enterotoxinas directamente relacionadas con intoxicaciones alimentarias en la mayoría de las cepas analizadas.
- El α -pineno a 1.5% tuvo el mejor efecto inhibitorio en las cepas de *S. aureus* a 37 °C y 25 °C.
- Las cepas resistentes a antibióticos (MRSA) mostraron una mayor sensibilidad a los compuestos de aceites esenciales.
- Los resultados de inhibición utilizando los compuestos en combinación, resultó en antagonismo de los aceites esenciales, mostrando menor inhibición que α -pineno utilizado individualmente.
- Los aceites esenciales α -pineno y R-(+)-limonene, en forma individual, podrían ser utilizados en la industria de alimentos como compuestos antimicrobianos.

5. RECOMENDACIONES

- Realizar ensayo de detección de factores de virulencia como ser el *agr* (gen regulador) y el *egc* (grupo de genes de enterotoxinas) para obtener mayor información acerca de las cepas analizadas.
- Evaluar la efectividad de los mejores tratamientos de los compuestos de aceites esenciales a temperaturas de refrigeración
- Determinar la aplicabilidad de los compuestos de aceites esenciales de forma directa en alimentos.

6. LITERATURA CITADA

Adams, T. y Taylor, S. 2010. Handbook of Essential Oils: Safety Evaluation of Essential Oils: a Constituent-Based approach. Ed. K. Hüsni y G. Buchbauer. USA. Editorial CRC press. 185-208 p.

Al Yousef, S. 2014. Essential oils: their antimicrobial activity and potential application against pathogens by gaseous contact – a review. Egypt. Acad. J. Biolog. Sci. Vol. 6 (1): 37 – 54 p.

Argudín, M., Mendoza, M. y Rodicio, M. 2010. Food Poisoning and Staphylococcus aureus Enterotoxins. Toxins. Vol. 2(7): 1751–1773.

Bassolé, I. y Juliani, R. 2012. Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. Molecules. Vol. 17: 3989-4006 p.

Bécquer, A., Mota de la Garza, L. y Lara, C., 1996. Importancia de la detección de enterotoxinas estafilocócicas. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. Revista Cubana Aliment Nutr. Vol. 10.

Blaiotta, G., Ercolini, D., Pennacchia, C., Fusco, V., Casaburi, A., Pepe, O., Villani, F. 2004. PCR Detection of Staphylococcal Enterotoxin Genes in Staphylococcus spp. Strains Isolated from Meat and Dairy Products. Evidence for New Variants of seG and seI in S. aureus AB-8802. Journal of Applied Microbiology. Napoles, Italy. Vol. 97: 719-730 p.

Brud, W. 2010. Handbook of Essential Oils: Industrial Uses of Essential Oils. Ed. K. Hüsni y G. Buchbauer. USA. Editorial CRC press. 843-854 p.

Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review in press. International Journal of Food Microbiology. Vol. 94 (3). 223–253 p.

Carson, C. y Hammer, K. 2011. Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents. Ch. 11: Antimicrobial Essential Oils. Ed. H. Thormar. John Wiley & Sons. United Kingdom.

Code of Federal Regulations. 2013. Food and Drugs (en línea). 21. CFR.172.30 y 21.CFR.172.20. Vol. 3. Disponible en: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=172&showFR=1&subpartNode=21:3.0.1.1.3.1>

- Cosgrove, S., Sakoulas, G., Perencevich, E., Schwaber, M., Karchmer, A. y Carmeli, Y. 2003. Comparison of Mortality Associated with Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia: A Meta-analysis. *Clinical Infectious Disease*. 53-59 p.
- Dhar, P., Chang, P., Cohen, D., Khawam, F., Gibbons, S., Snyder-Leiby, T., Dickstein, E., Rai, P. y Watal G. 2014. Synthesis, antimicrobial evaluation, and structure-activity relationship of α -pinene derivatives. *J Agric Food Chem*. Vol. 62(16): 3548-3452 p.
- Enany, S., Yoshida, Y., Magdeldin, S., Bo, X., Zhang, Y., Enany, M. y Yamamoto, T. 2013. Two dimensional electrophoresis of the exo-proteome produced from community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* belonging to clonal complex 80. *International Journal of Medical Microbiology*. Elsevier. Japan. Vol. 168: 504-511 p.
- Edward-Jones, V., Buck, R., Shawcross, S., Dawson, M. y Dunn, K. 2004. The Effect of Essential Oils on Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using a Dressing Model. *Elsevier*. Vol. 30 (8): 772-777 p.
- Francois P., Scherl, A., Hochstrasser, D., Schrenzel D. y Schrenzel, J. 2014. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Protocols. Ch. 14: Proteomic Approach to Investigate Pathogenicity and Metabolism of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Methods in Molecular Biology*. Springer Science+Business Media. Vol. 1085: 231-250 p.
- Fueyo, J. 2005. Frecuencia y tipos de toxinas superantígenos en *Staphylococcus aureus* de diferentes orígenes: relaciones con tipos genéticos. Tesis Ph.D. Oviedo, España. Universidad de Oviedo. Colección Tesis Doctoral. 104 p.
- Herbert, S., Barry, P., Novick, R. 2001. Subinhibitory Clindamycin Differentially Inhibits Transcription of Exoproteins Genes in *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*. Vol. 69. No. 5: 2996-3003 p.
- Imbesi, A. y De Pasquale, A. 2003. The Biological Activity of Essential Oils. *Citrus: The Genus Citrus*. Ed. G. Dugo and A. Di Giacomo. CRC Press. London, UK. 603-605 p.
- Issabeagloo, E., Kermanizadeh, P., Taghiziadeh, M. y Forughi, R. 2012. Antimicrobial effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oils against *Staphylococcus* spp. *African Journal of Microbiology*. Vol. 6(23): 5039-5042 p.
- Jarraud, S., Cozon, G., Vandenesch, F., Bes, M., Etienne, J. y Lina, G. 1999. Involvement of Enterotoxins G and I in Staphylococcal Toxic Shock Syndrome and Staphylococcal Scarlet Fever. *J. Clin Microbiol*. Vol. 37. No. 8: 2446-2449 p.
- Klotz, M., Opper, S., Heeg, K. y Zimmerman, S. 2003. Detection of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins A to D by Real-Time Fluorescence PCR Assay. *J. Clin. Microbiol*. Vol. 41. No. 10. 4683-4687 p.

- Kusch, H. y Engelmann, S. 2014. Secrets of the Secretome in *Staphylococcus aureus*. International Journal of Medical Microbiology. Elsevier. Germany. Vol. 304 (3): 133-141 p.
- Lee, S., Hyun, K., Nam, S., Altantsetseg, S., Shatar, S., Sarangerel, O. y Won, C. 2007. The Antimicrobial Activity of Essential Oil from *Dracocephalum foetidum* against Pathogenic Microorganisms. Journal of Microbiology. Vol. 45 (1): 53-57 p.
- Liu, W. 2005. Terpenes: Expansion of the Chiral Pool. Handbook of Chiral Chemicals. Ed. D. Ager. NSC Technologies. Illinois, USA. 83-87 p.
- Márquez, J. 2012. Recuento de *Staphylococcus aureus* y detección de enterotoxinas estafilocócicas en queso blanco venezolano artesanal tipo “telita” expendido en mercados de la ciudad de Caracas. Rev. Soc. Ven. Microbiol. Vol. 32 No. 2: 112-115 p.
- Medeiros, A., de Oliveira, E., de Souza, E., Formiga, M., Nogueira, V. y Almeida, I. 2007. Inhibitory effect of β -pinene, α -pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. Vol. 43 (1): 122-126 p.
- Mulders, M., Haenen, A., Geenen, P., Vesseur, P., Poldervaart, E., Bosch, T., Huijsdens, X., Hengelveld, P., Dam-Deisz, W., Graat, E., Mevius, D., Voss, A. y Van de Giessen, A. 2010. Prevalence of livestock associated MRSA in broiler flocks and risk factors for slaughterhouse personnel in The Netherlands. Cambridge University Press. Epidemiol. Infect. Vol. 138: 743-755 p.
- National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS). 1999. System report, data summary from January 1990–May 1999. Am J Infect Control. 520–532 p.
- Normanno, G., La Salandra, G., Dambrosio A., Quaglia, N.C., Corrente, M., Parisi, A., Santagada, G., Firinu, A., Crisetti, E. y Celano, G. V. 2007. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. International Journal of Food Microbiology. Vol. 115: 290-296 p.
- Omoe, K., Ishikawa, M., Shimoda, Y., Hu, D.L., Ueda, S. y Shinagawa, S. 2002. Detection of seg, seh, and sei genes in *Staphylococcus aureus* Isolates and Determination of the Enterotoxin Productivities of *S. aureus* Isolates Harboring seg, seh, or sei Genes. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 40 (3): 857-862 p.
- Pegram, P.S. 1981. *Staphylococcus aureus* Antibiotic Resistance. Am. Fam. Physician. Vol. 24 (3): 165-170 p.
- Raman, A., Weir, U. y Bloomfield, F. 1995. Antimicrobial effects of tea-tree oil and its major components on *Staphylococcus aureus*, *Staph. epidermidis* and *Propionibacterium acnes*. Letters in Applied Microbiology. Vol. 21: 242-245 p.

Ravipaty, S., Reilly, J. 2010. Comprehensive Characterization of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* COL Secretome by Two-dimensional Liquid Chromatography and Mass Spectrometry. Indiana University. MCP Papers. 1898-1919 p.

Reyes-Jurado, F., Palou, E. y López-Malo, A. 2012. Vapores de aceites esenciales: alternativa de antimicrobianos naturales. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*. Vol. 6 (1): 29-39 p.

Rivas da Silva, A., Monteiro, P., Barros, M., Machado, D., Sales, C. y Sales, D. 2012. Biological Activities of Alpha-Pinene and Beta-Pinene Enantiomers. *Molecules*. Vol. 17: 6305-6316 p.

Sakai, F., Ihara, H., Aoyama, K., Igarashi, H., Yanahira, S., Ohkubo, T., Asao, T. y Kozaki, S. 2008. Characteristics of enterotoxin H-producing *Staphylococcus aureus* isolated from clinical cases and properties of the enterotoxin productivity. *J Food Prot*. Vol. 71. No. 9: 1855-1860 p.

Smith-Palmer, A., Stewart, J. y Fyfe, L. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*. Vol. 26: 118–122 p.

Stressl, B. y Wagner, M. 2013. Real-time PCR Detection of Food-borne Pathogenic *Staphylococcus aureus*. Ed. D Rodriguez-Lazaro. Norfolk, UK. Caister Academic Press. 148-152 p.

Van Vuuren, S., Suliman, S. y Viljoen, A. 2008. The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. *Letters in Applied Microbiology*. Vol. 48 (4): 440-446 p.

Walker, J., Crosby, H., Spaulding, A., Salgado-Pabón, W., Malone, C., Rosenthal, C., Schlievert, P., Boyd, J. y Horswill, A. 2013. The *Staphylococcus aureus* ArlRS Two-Component System Is a Novel Regulator of Agglutination and Pathogenesis. *PLOS Pathogens*. Vol. 9(12): 1-17 p.

Wang, W., Li, N., Luo, M., Zu, Y. y Efferth, T. 2012. Antibacterial Activity and Anticancer Activity of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil compared to that of its Main Components. *Molecules*. Vol. 17: 2704-2713 p.

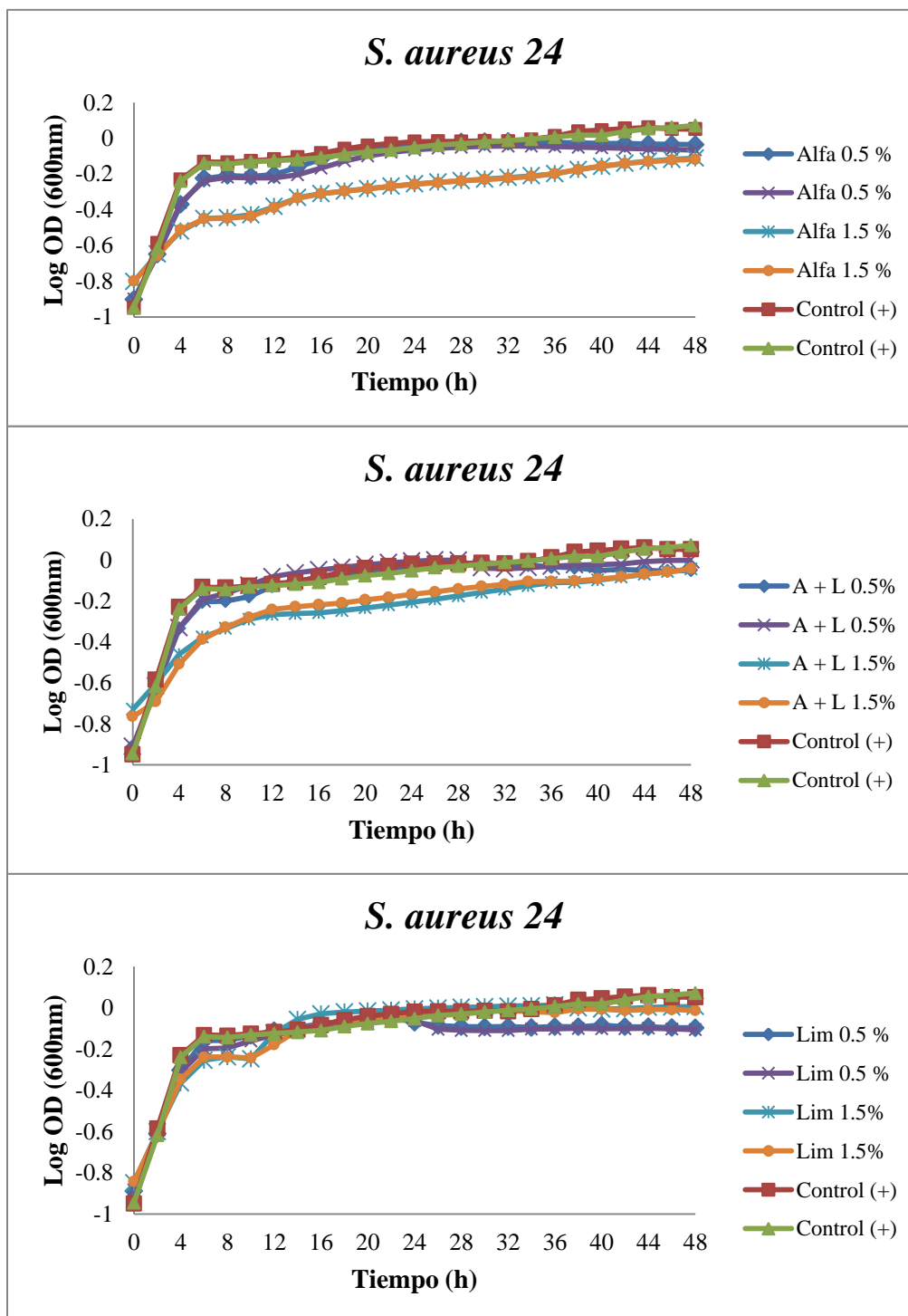
Widdel, F. 2007. Theory and Measurement of Bacterial Growth (en línea). Consultado el 4 de junio de 2014. Universitat Bremen. Disponible en: <https://www.mpi-bremen.de/Binaries/Binary13037/Wachstumsversuch.pdf>

7. ANEXOS

Anexo 1. Interacción de factores que tuvieron influencia en el comportamiento de las cepas de *Staphylococcus aureus* utilizando los compuestos α -pineno y R-(+)-limonene.

INTERACCIÓN	P \leq 0.05
TEMP	<.0001
CEPA	<.0001
ACEITE	<.0001
CONC	<.0001
REP	0.2647
TEMP*CEPA*ACEIT*CONC	<.0001

Anexo 2. Gráficas de crecimiento de cepas de *S. aureus* #24 en presencia de aceites esenciales y su combinación a 37 °C.



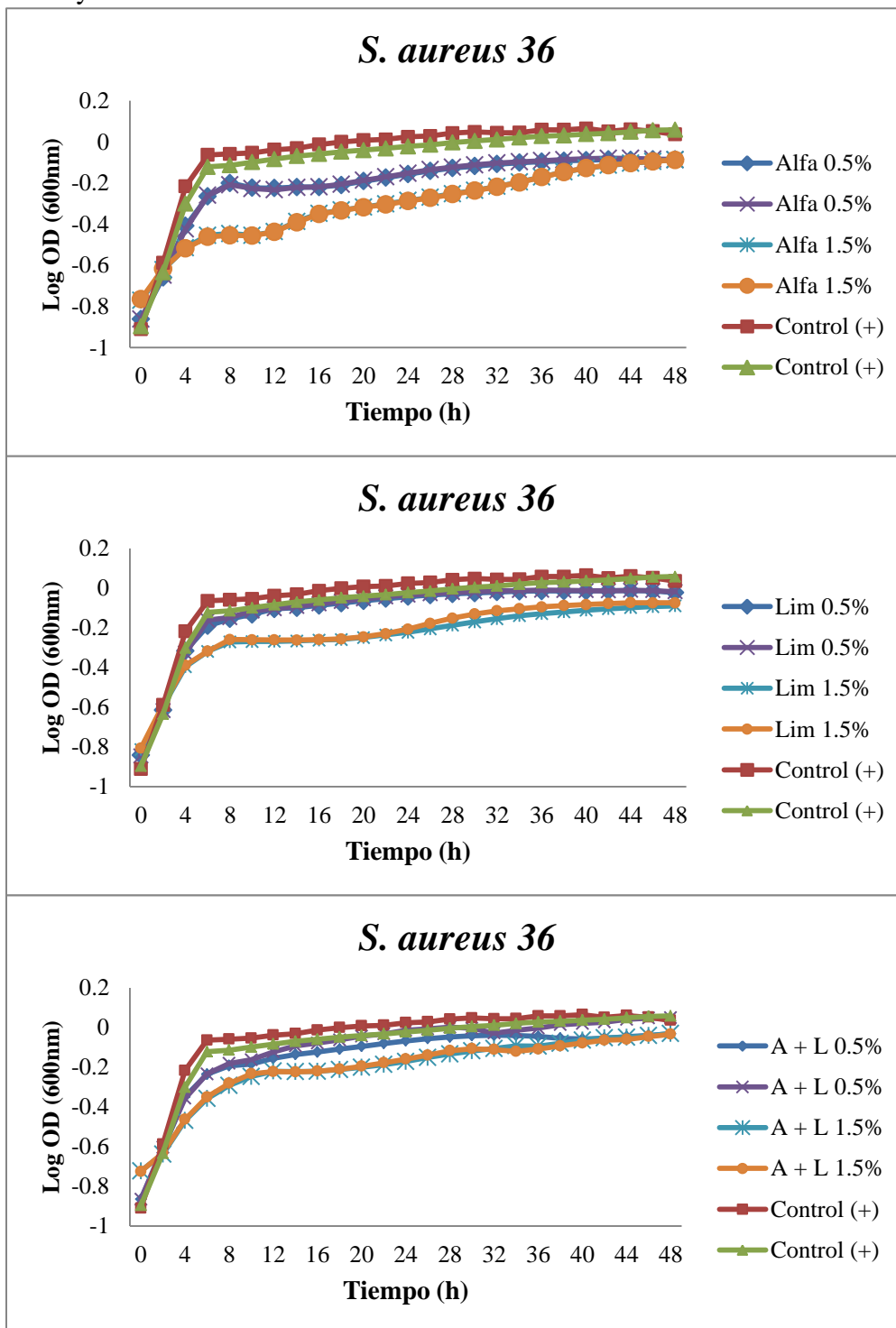
OD: Densidad óptica.

Alfa: α -pineno

Lim: R-(+)-limonene

A + L: α -pineno + R-(+)-limonene

Anexo 3. Gráficas de crecimiento de cepas de *S. aureus* #36 en presencia de aceites esenciales y su combinación a 37 °C.



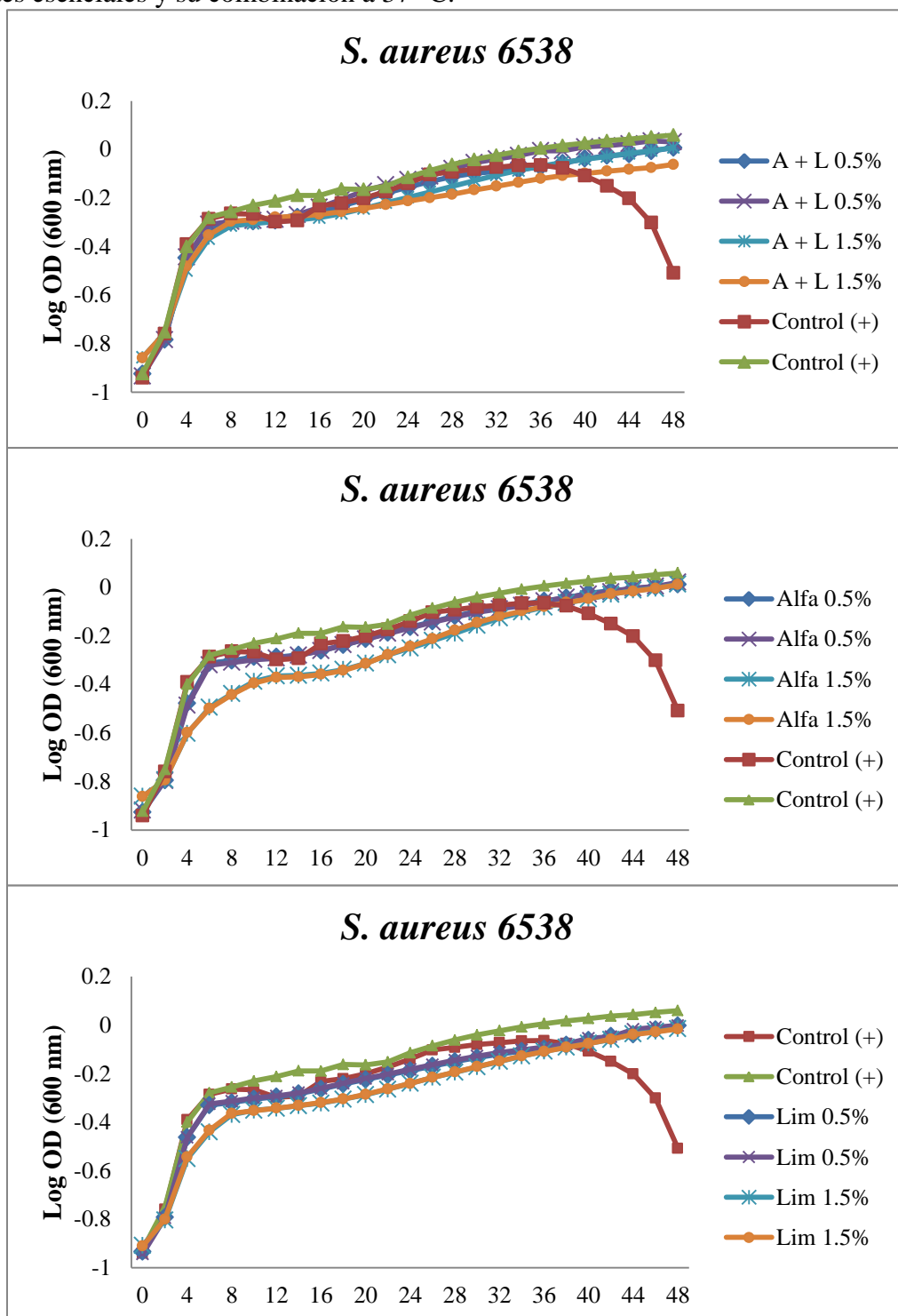
OD: Densidad óptica.

Alfa: α -pineno

Lim: R-(+)-limonene

A + L: α -pineno + R-(+)-limonene

Anexo 4. Gráficas de crecimiento de cepas de *S. aureus* ATCC 6538 en presencia de aceites esenciales y su combinación a 37 °C.



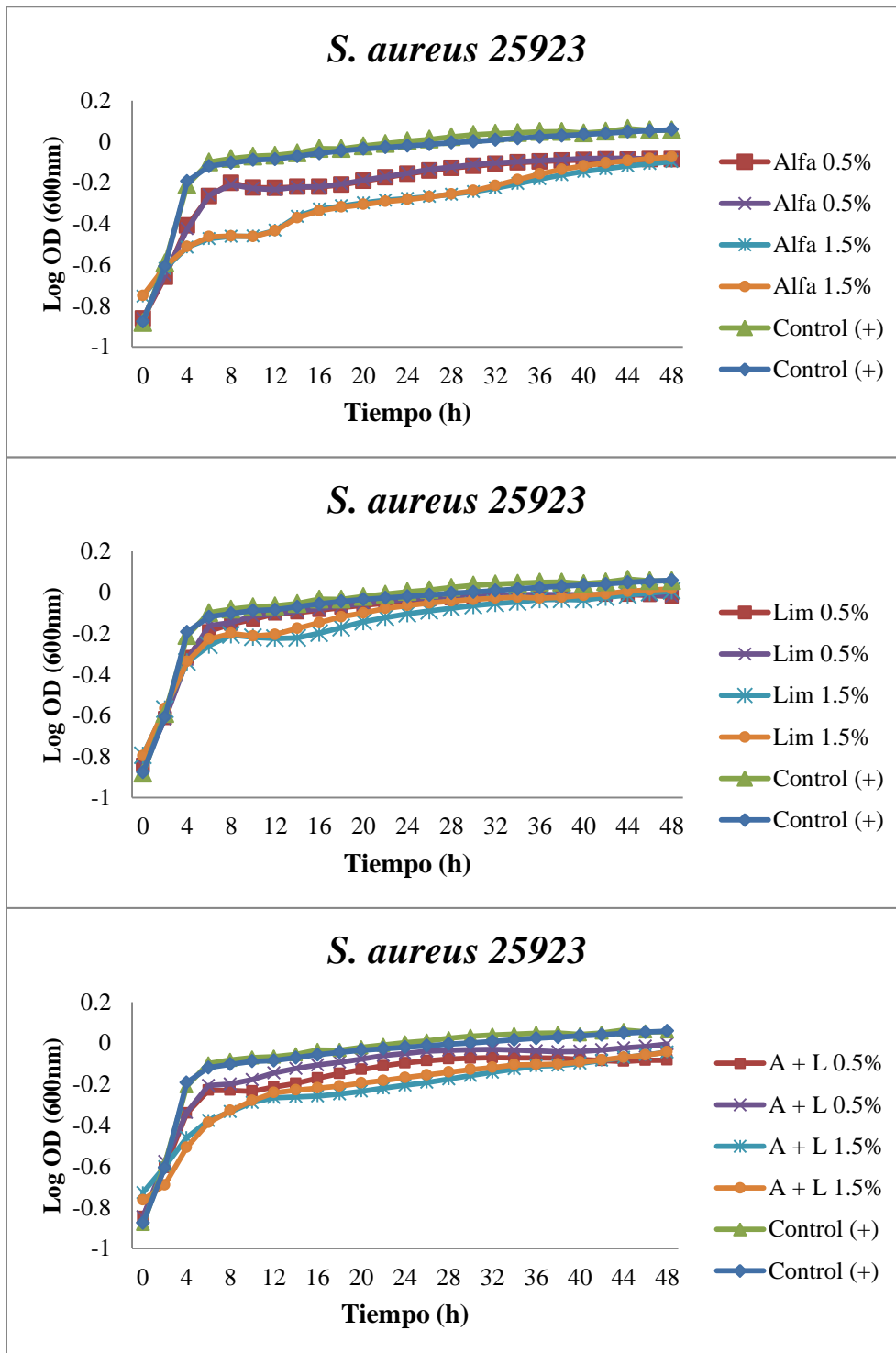
OD: Densidad óptica.

Alfa: α -pineno

Lim: R-(+)-limonene

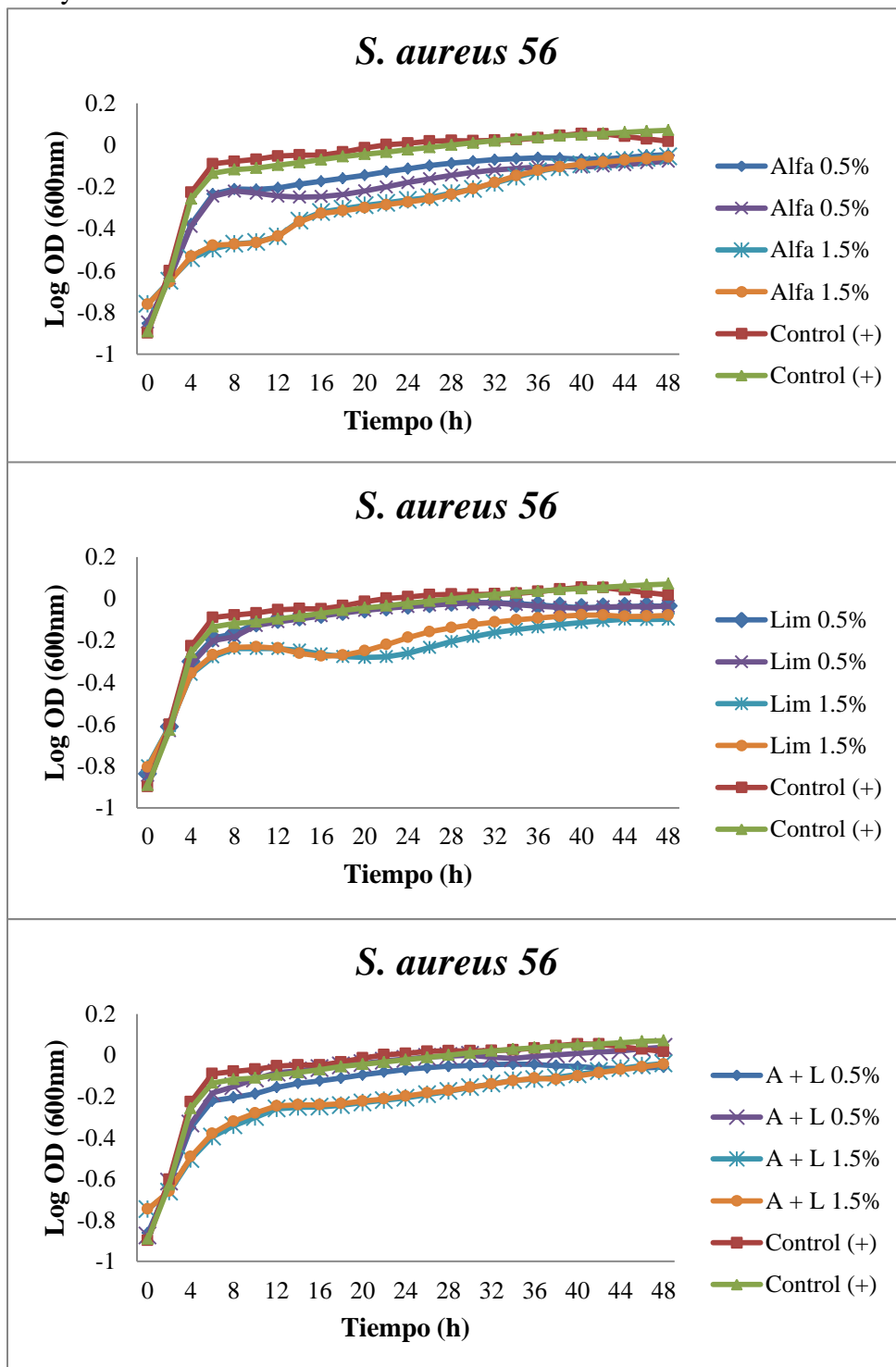
A + L: α -pineno + R-(+)-limonene

Anexo 5. Gráficas de crecimiento de cepas de *S. aureus* ATCC 25923 en presencia de aceites esenciales y su combinación a 37 °C.



OD: Densidad óptica.
 Alfa: α -pineno
 Lim: R-(+)-limonene
 A + L: α -pineno + R-(+)-limonene

Anexo 6. Gráficas de crecimiento de cepas de *S. aureus* #56 en presencia de aceites esenciales y su combinación a 37 °C.



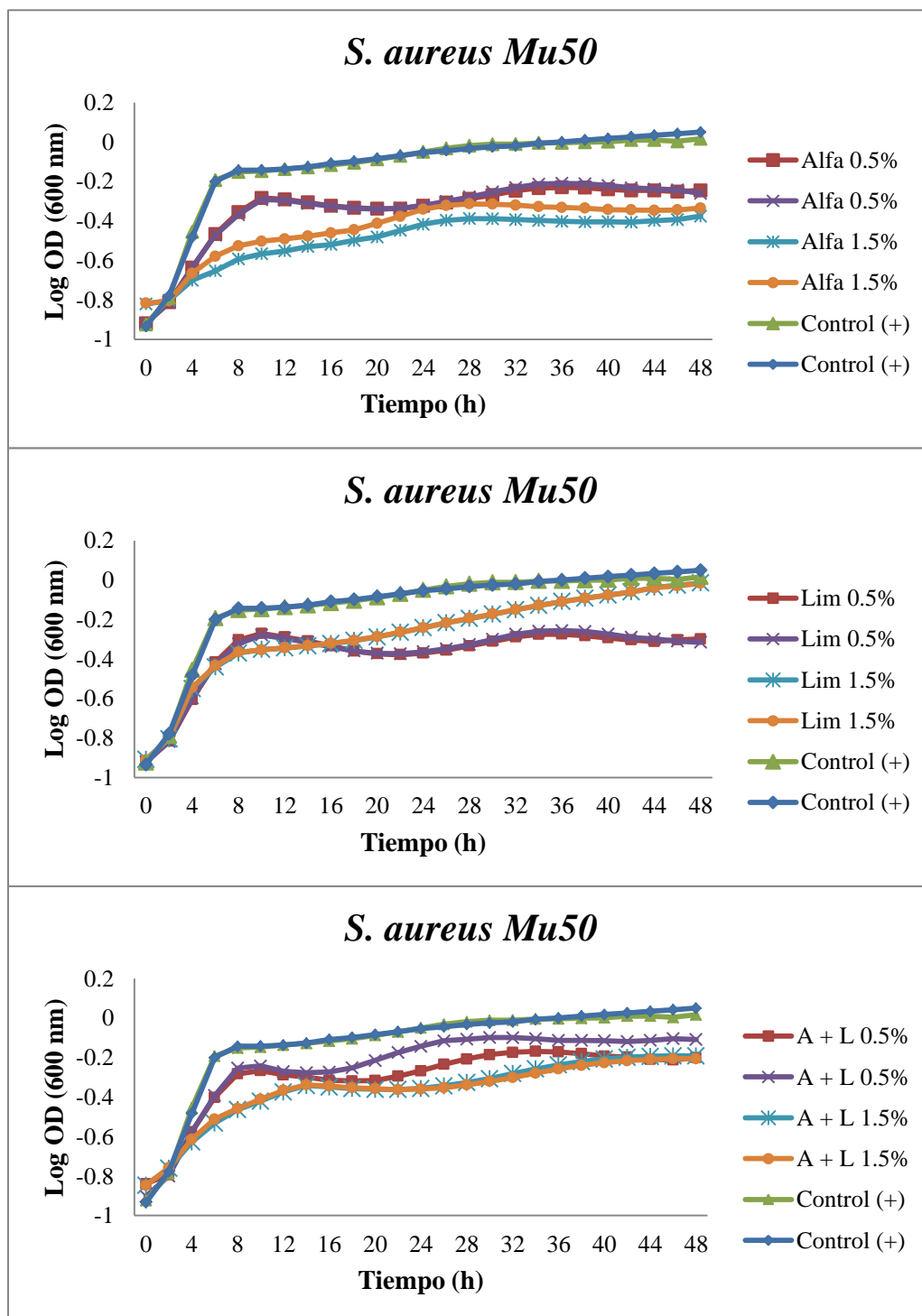
OD: Densidad óptica.

Alfa: α -pineno

Lim: R-(+)-limonene

A + L: α -pineno + R-(+)-limonene

Anexo 7. Gráficas de crecimiento de cepas de *S. aureus* Mu50 en presencia de aceites esenciales y su combinación a 37 °C.



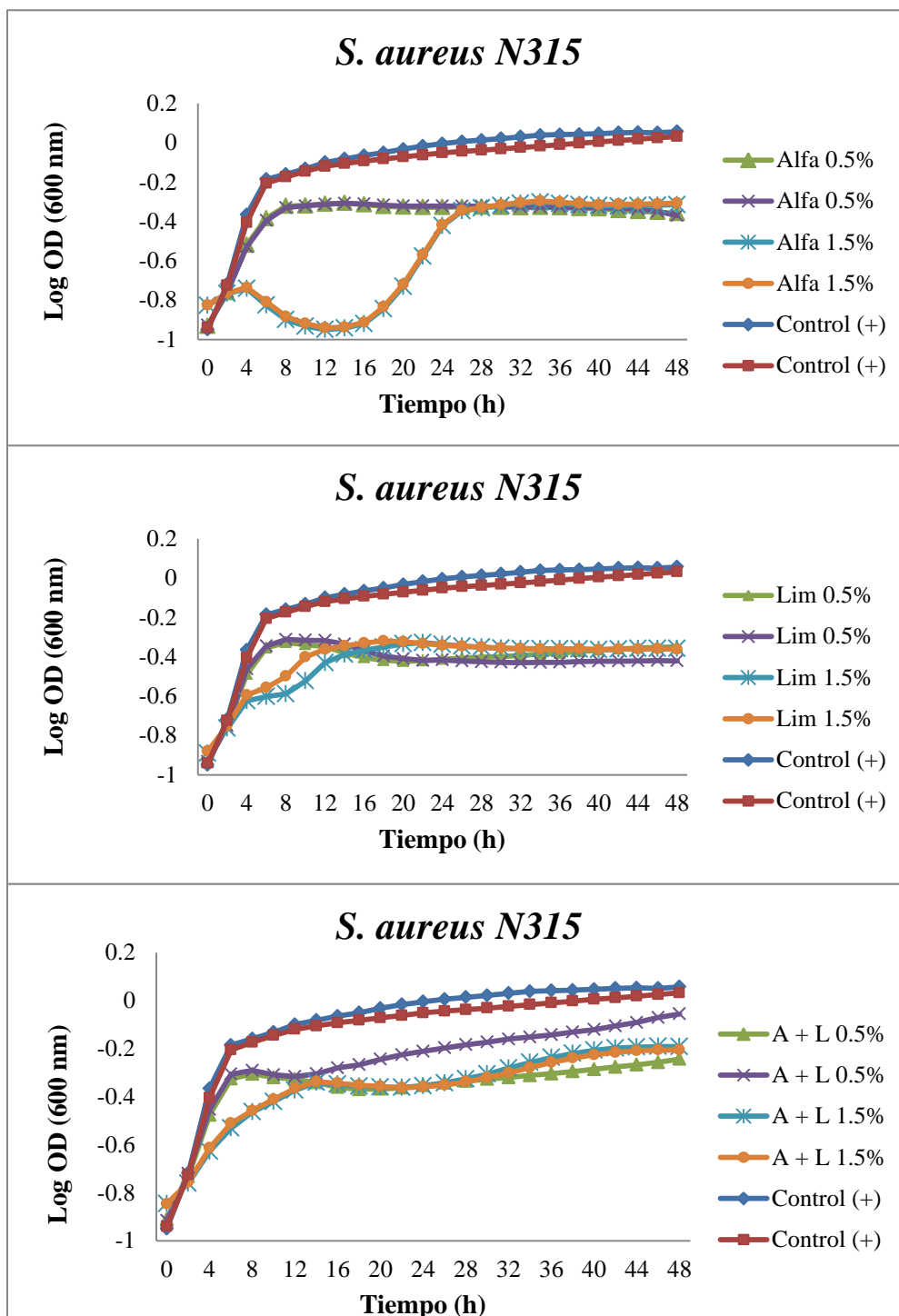
OD: Densidad óptica.

Alfa: α -pineno

Lim: R-(+)-limonene

A + L: α -pineno + R-(+)-limonene

Anexo 8. Gráficas de crecimiento de cepas de *S. aureus* N315 en presencia de aceites esenciales y su combinación a 37 °C.



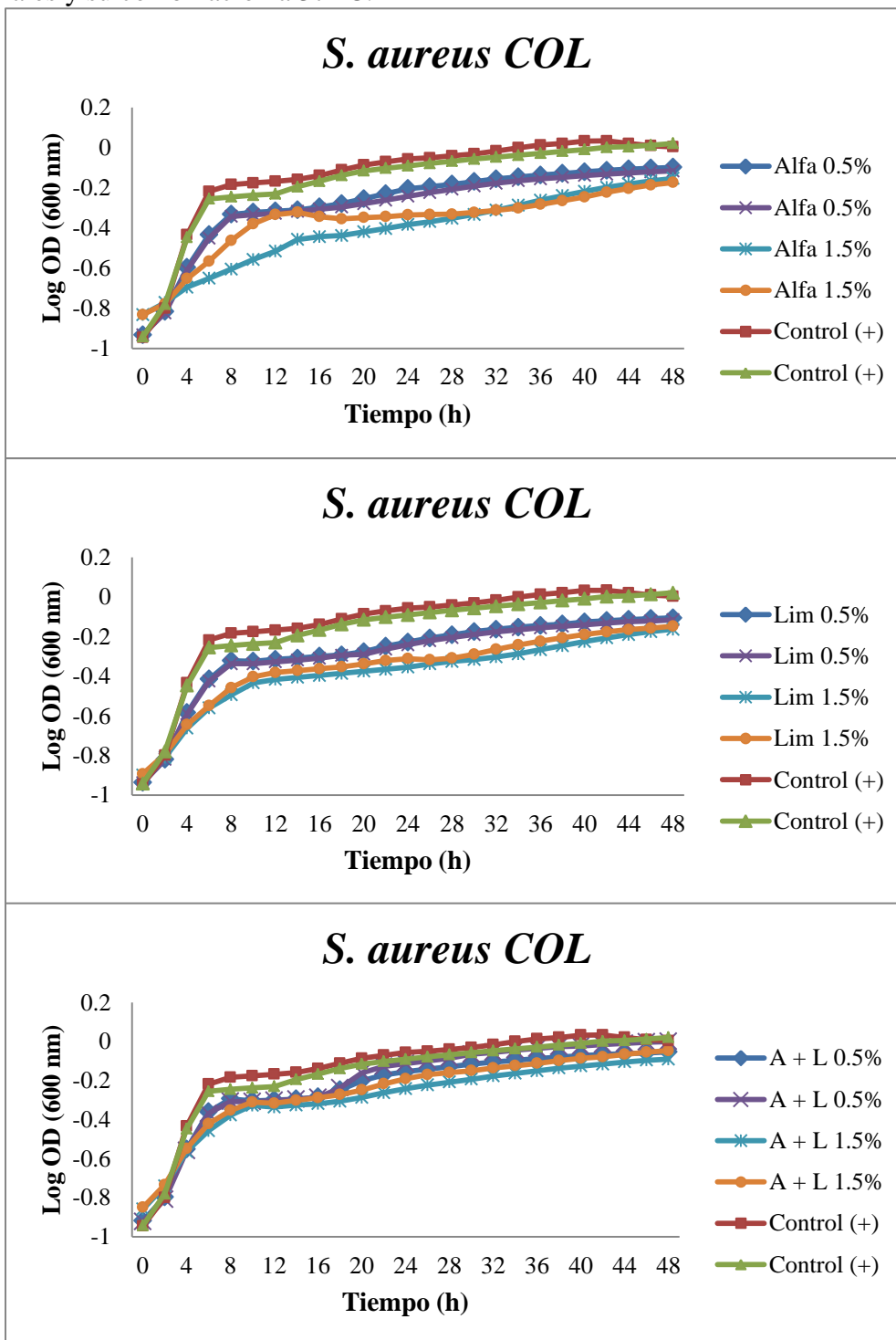
OD: Densidad óptica.

Alfa: α -pineno

Lim: R-(+)-limonene

A + L: α -pineno + R-(+)-limonene

Anexo 9. Gráficas de crecimiento de cepas de *S. aureus* COL en presencia de aceites esenciales y su combinación a 37 °C.



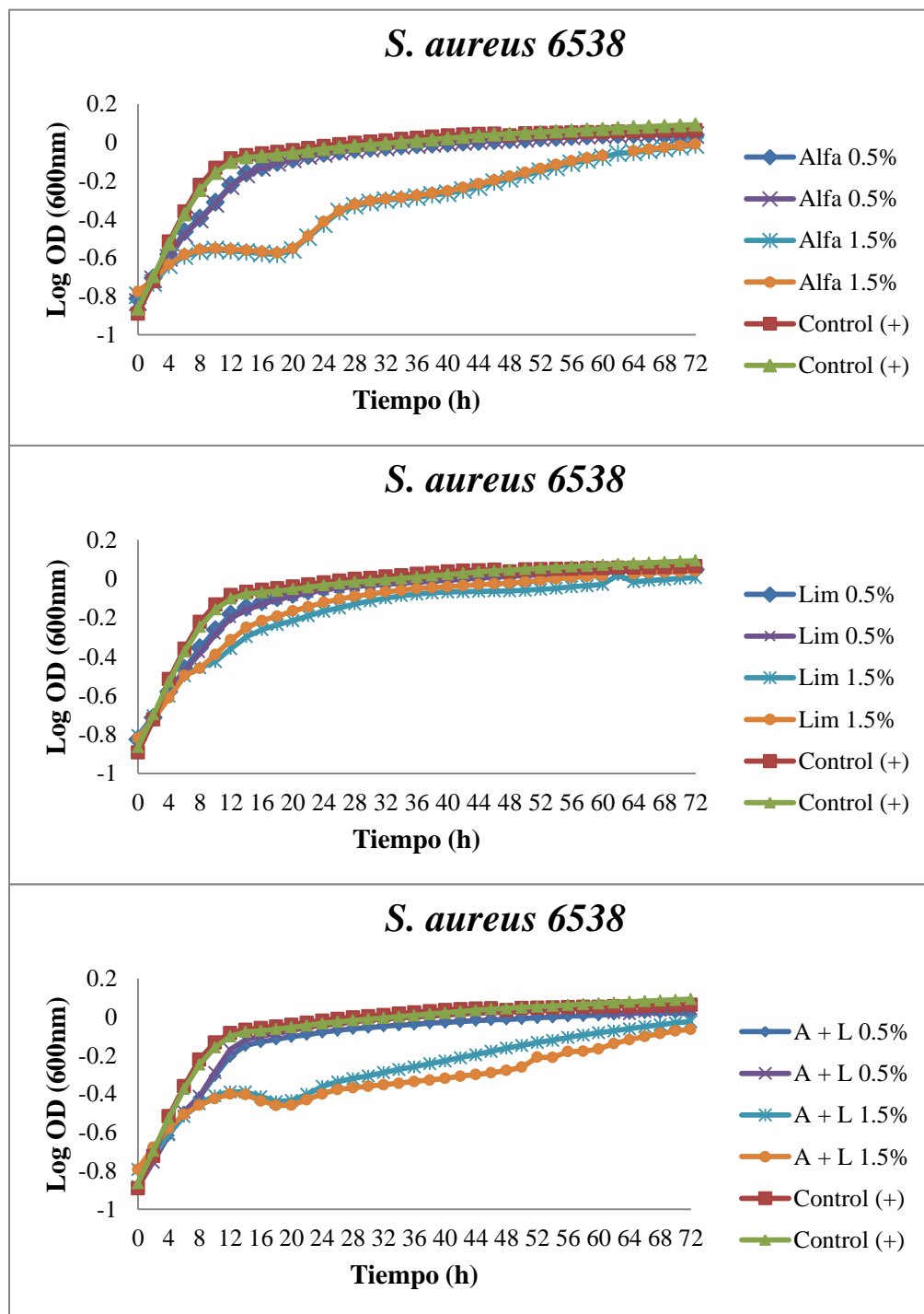
OD: Densidad óptica.

Alfa: α -pineno

Lim: R-(+)-limonene

A + L: α -pineno + R-(+)-limonene

Anexo 10. Gráficas de crecimiento de cepas de *S. aureus* ATCC 6538 en presencia de aceites esenciales y su combinación a 25 °C.



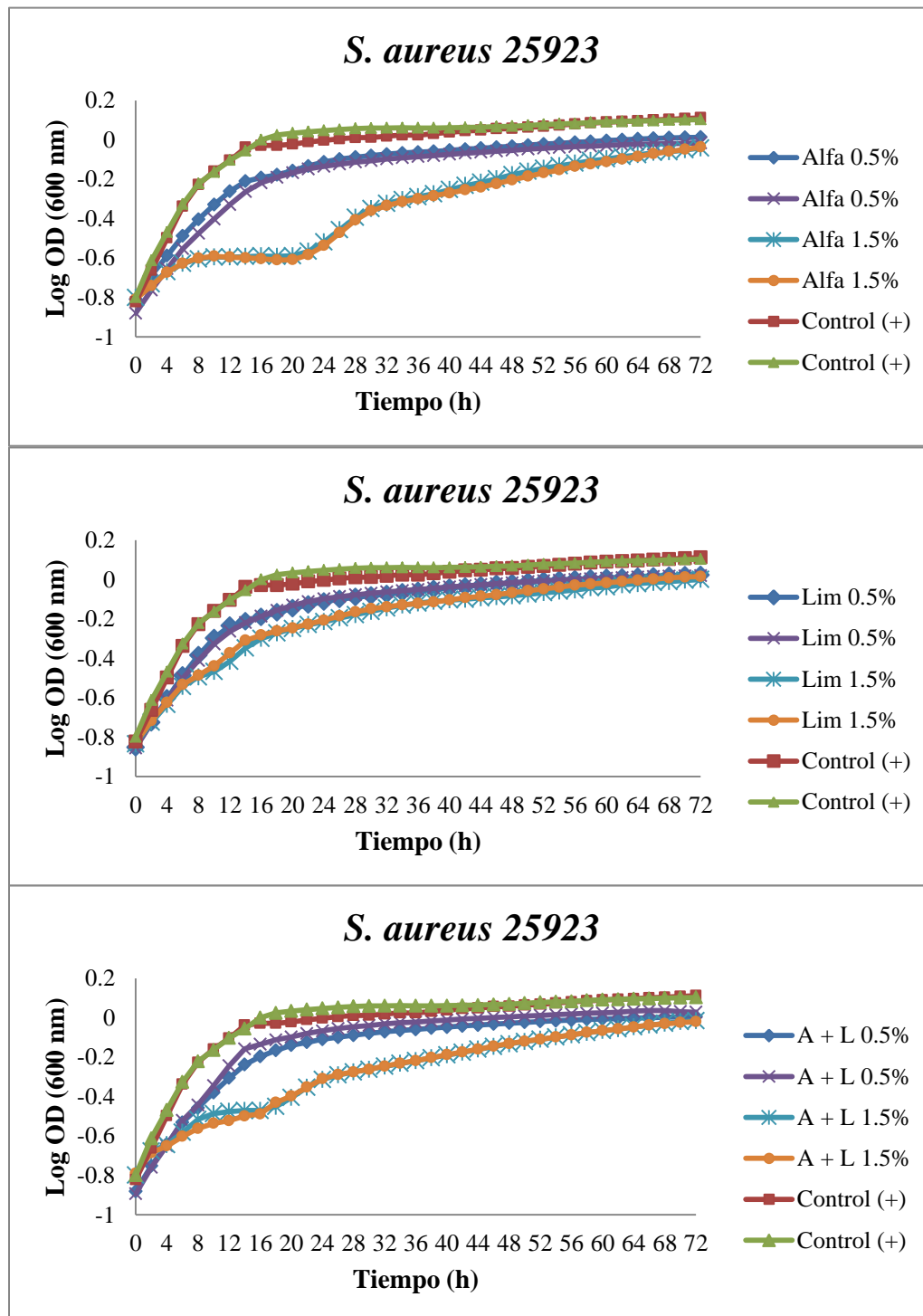
OD: Densidad óptica.

Alfa: α -pineno

Lim: R-(+)-limonene

A + L: α -pineno + R-(+)-limonene

Anexo 11. Gráficas de crecimiento de cepas de *S. aureus* ATCC 25923 en presencia de aceites esenciales y su combinación a 25 °C.



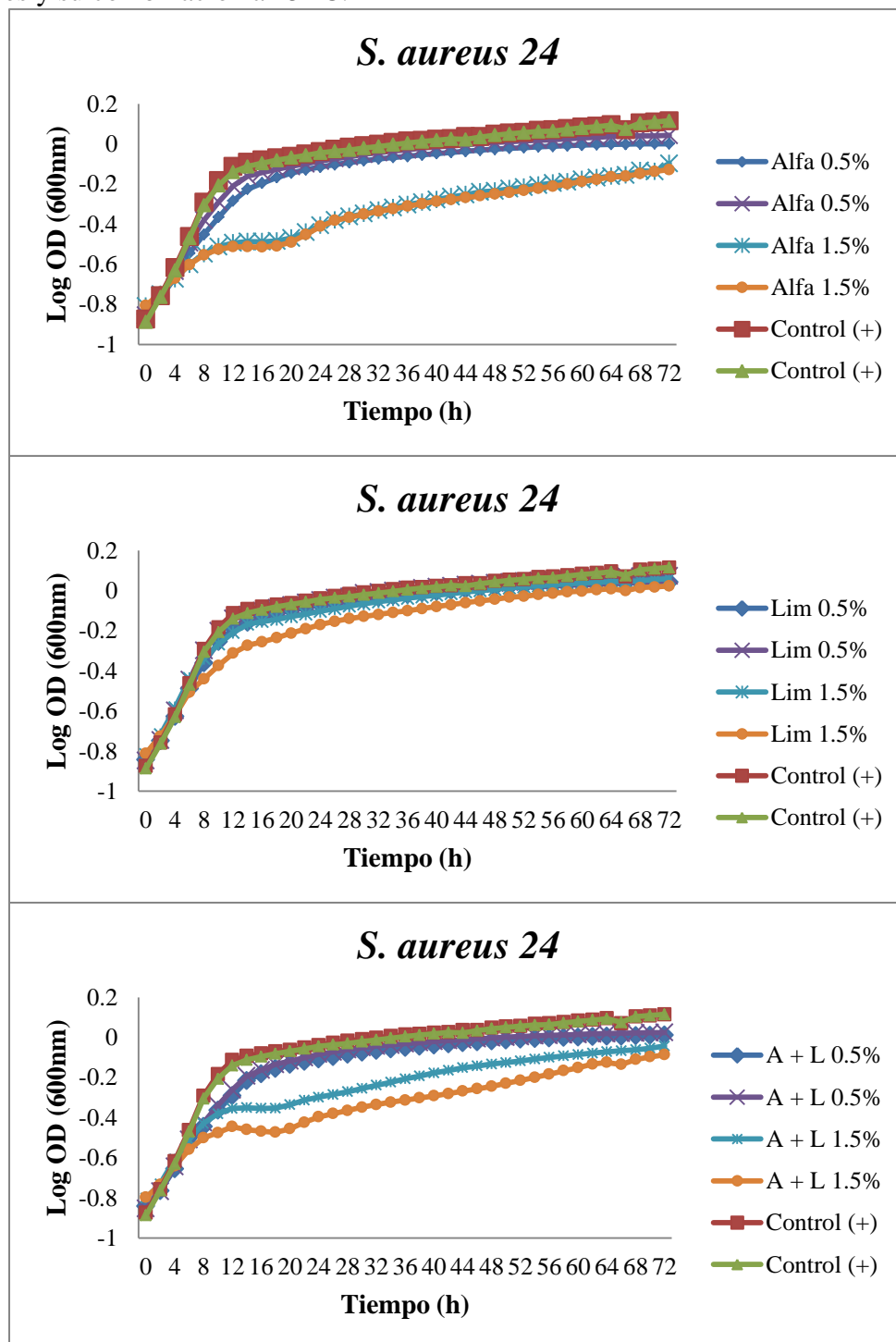
OD: Densidad óptica.

Alfa: α -pineno

Lim: R-(+)-limonene

A + L: α -pineno + R-(+)-limonene

Anexo 12. Gráficas de crecimiento de cepas de *S. aureus* #24 en presencia de aceites esenciales y su combinación a 25 °C.



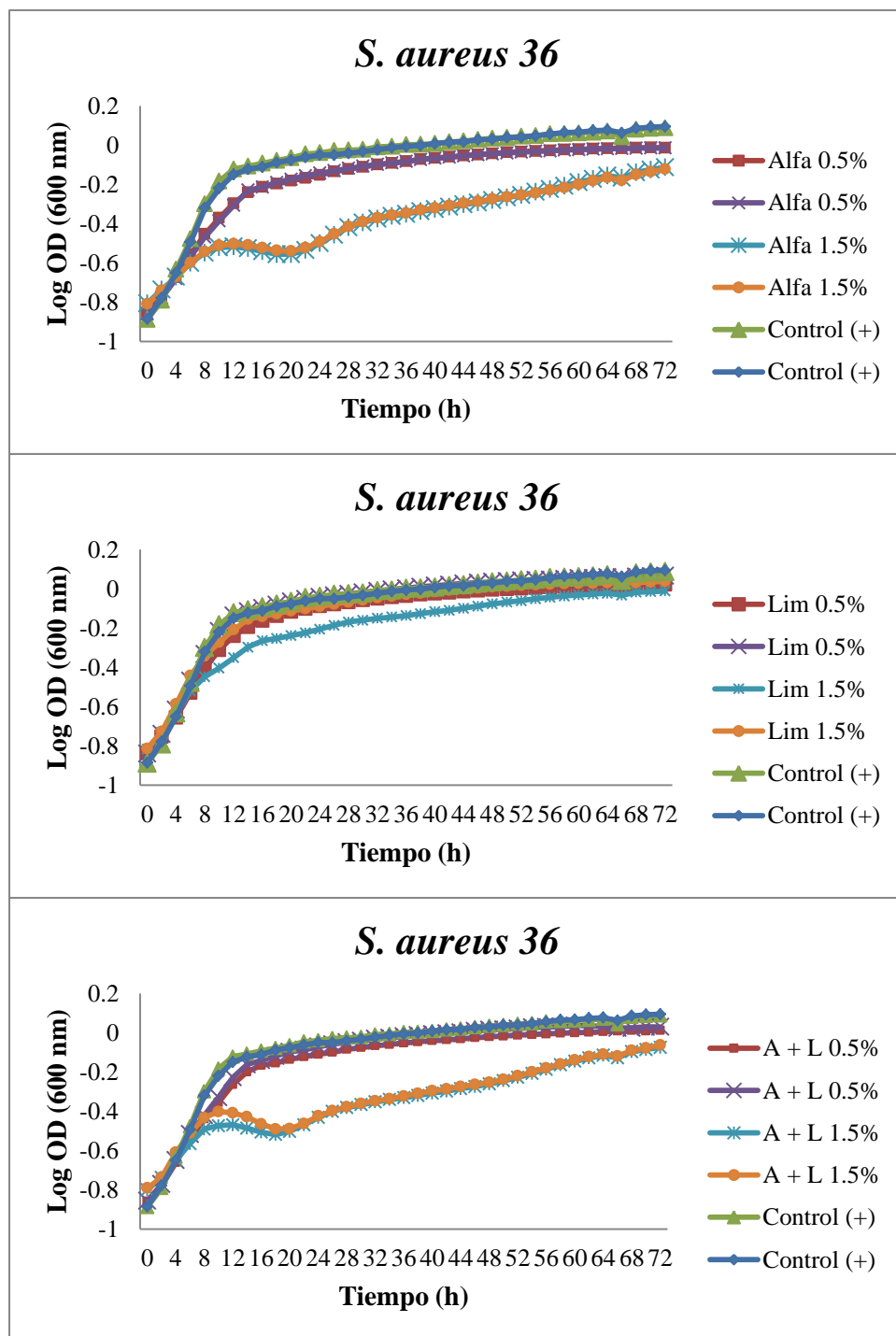
OD: Densidad óptica.

Alfa: α -pineno

Lim: R-(+)-limonene

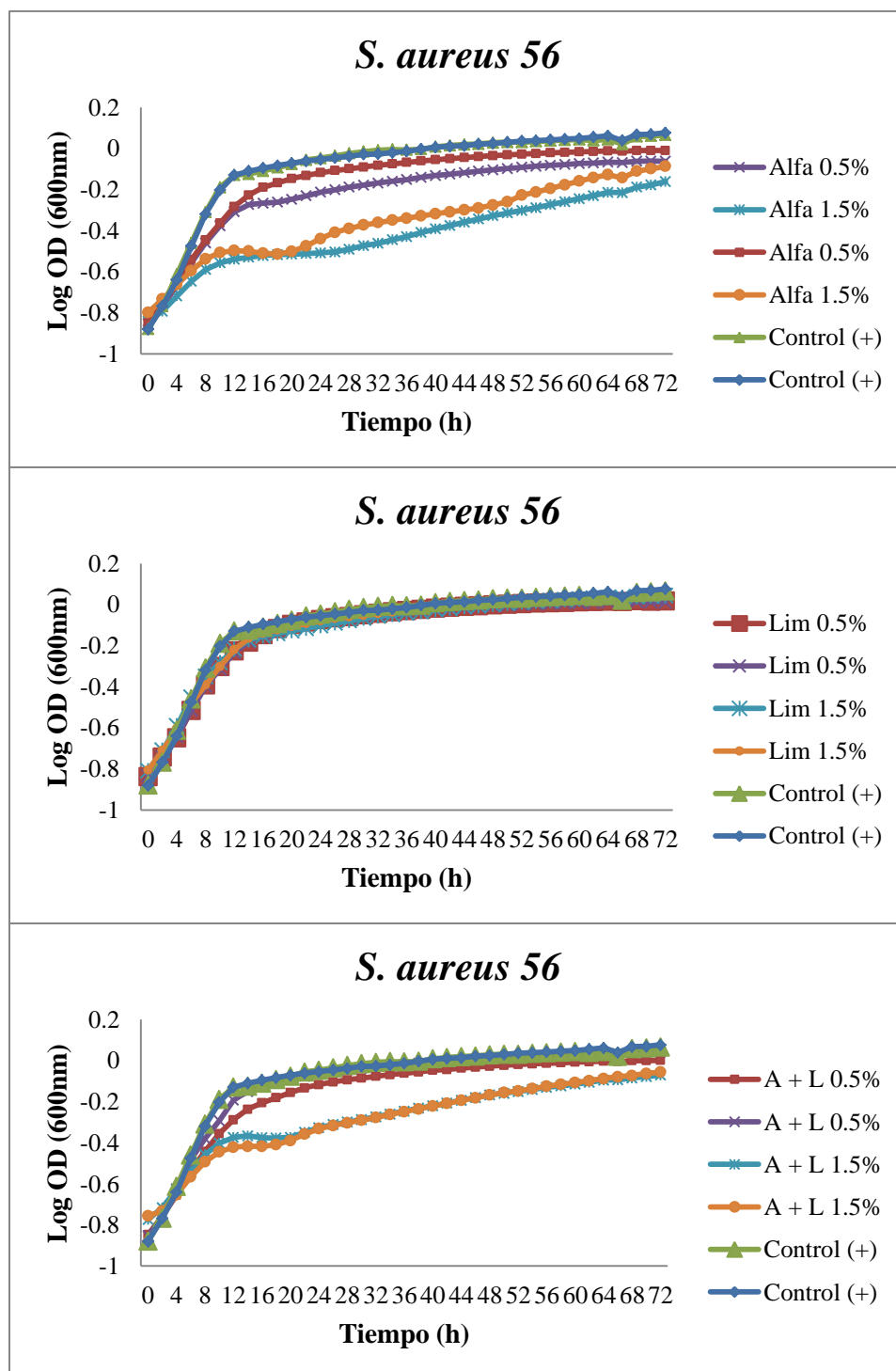
A + L: α -pineno + R-(+)-limonene

Anexo 13. Gráficas de crecimiento de cepas de *S. aureus* #36 en presencia de aceites esenciales y su combinación a 25 °C.



OD: Densidad óptica.
 Alfa: α -pineno
 Lim: R-(+)-limonene
 A + L: α -pineno + R-(+)-limonene

Anexo 14. Gráficas de crecimiento de cepas de *S. aureus* #56 en presencia de aceites esenciales y su combinación a 25 °C.



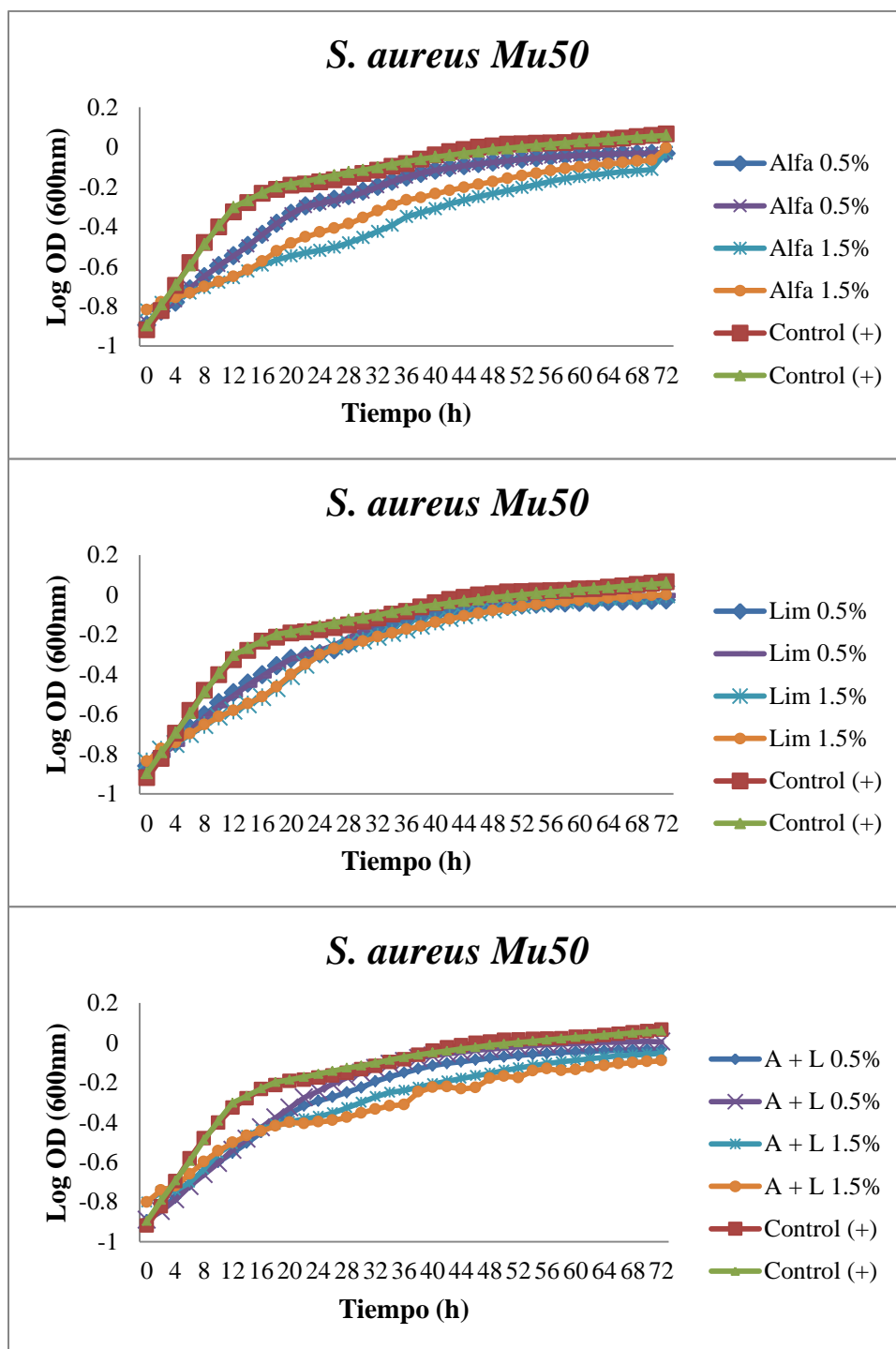
OD: Densidad óptica.

Alfa: α -pineno

Lim: R-(+)-limonene

A + L: α -pineno + R-(+)-limonene

Anexo 15. Gráficas de crecimiento de cepas de *S. aureus* Mu50 en presencia de aceites esenciales y su combinación a 25 °C.



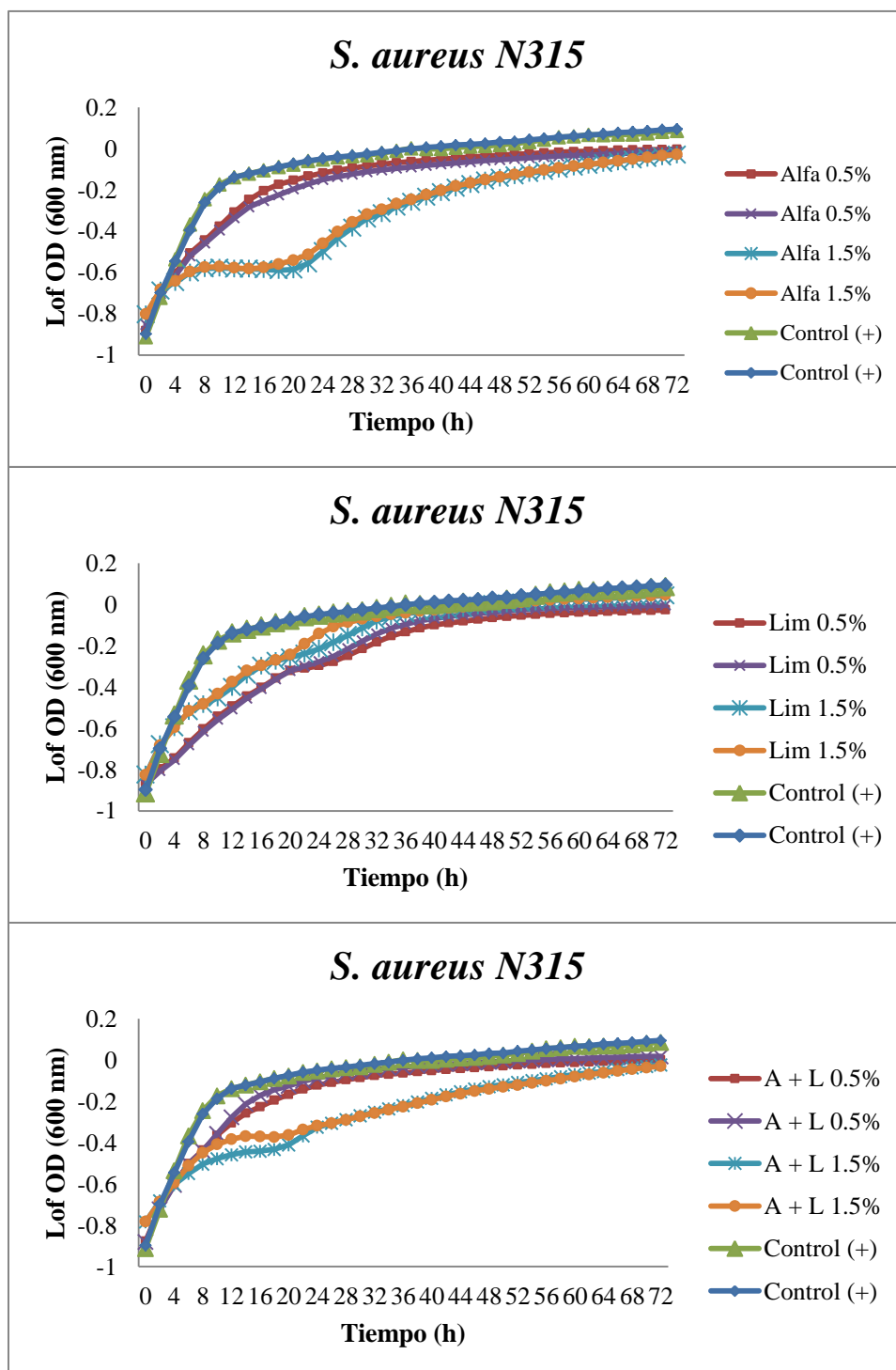
OD: Densidad óptica.

Alfa: α -pineno

Lim: R-(+)-limonene

A + L: α -pineno + R-(+)-limonene

Anexo 16. Gráficas de crecimiento de cepas de *S. aureus* N315 en presencia de aceites esenciales y su combinación a 25 °C.



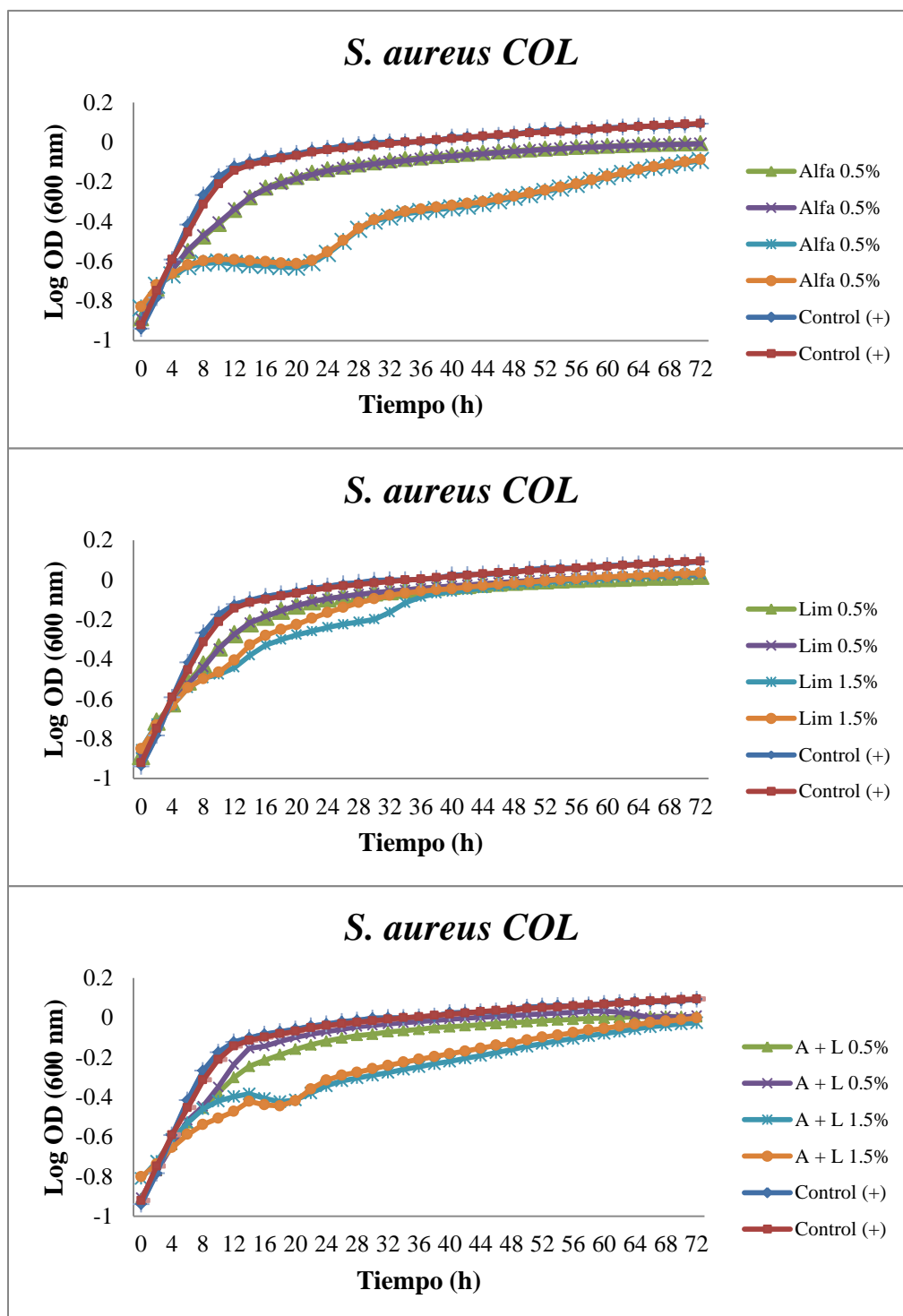
OD: Densidad óptica.

Alfa: α -pineno

Lim: R-(+)-limonene

A + L: α -pineno + R-(+)-limonene

Anexo 17. Gráficas de crecimiento de cepas de *S. aureus* COL en presencia de aceites esenciales y su combinación a 25 °C.



OD: Densidad óptica.

Alfa: α -pineno

Lim: R-(+)-limonene

A + L: α -pineno + R-(+)-limonene