

**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGIA**



**Actividad antimicrobiana mediante tratamiento  
combinado de aceite esencial de romero  
(*Rosmarinus officinalis* L.), ajo (*Allium sativum*) y  
ácido láctico para la bioconservación de carne de  
cuy (*Cavia porcellus*).**

**Tesis para optar el Título Profesional de  
Licenciado en Biología**

**Br. José Marko Andree Portal Arbieto**

**Lima, Perú**

**2019**

## **Dedicatoria**

Mi tesis la dedico con todo amor y cariño a mi Hijo Antuan Portal, por ser mi fuente de inspiración y motivación para poder superarme cada día más y así poder luchar para que la vida nos depara un futuro mejor.

## **Agradecimientos**

Al Señor, nuestro Dios, por fortalecer mi alma, guiarme, iluminarme todos los días de mi vida.

A mi Hijo, por ser quien me motiva a seguir ante las adversidades y dificultades que se presentan en la vida.

A mis Padres y familiares, por su apoyo, comprensión y ayuda cada vez que lo necesito.

A Juan Carlos Ramos, por su asesoría, apoyo y conocimientos transmitidos y por la dirección en el desarrollo del proyecto.

A mis amigos, por su amistad incondicional, su compañía y palabras de aliento en los momentos más difíciles.

A la Universidad Ricardo Palma, especialmente al laboratorio de Microbiología y de Biología y Genética Molecular, por el préstamo de las instalaciones y equipos, para la realización de mi proyecto.

## RESUMEN

Se determinó la acción antibacteriana que ejercen los aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis* L.), ajo (*Allium sativum*) y ácido láctico sobre los Mesófilos aerobios totales, Coliformes totales, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* presentes en la carcasa de cuy para su biopreservación. Se obtuvieron 50 carcasas de cuy (*Cavia porcellus*) procedentes del Mercado Minorista de la Parada de la Provincia de Lima, del distrito de La Victoria. Se colocó ¼ de carcasa de cuy en bolsas de polipropileno a las cuales se le agregó los aceites esenciales de romero y ajo; ácido láctico, tanto de forma individual como combinada en diferentes concentraciones 0.3%, 0.5%, 0.7% y 1% y se comparó con los resultados de un control, durante tres días: tiempo 0 y tres periodos de 24 h, 48 h y 72 h. Para el recuento de Microorganismos de las carcasas de cuy se utilizaron placas Petrifilm y placas Petri. Para el análisis del comportamiento de la actividad antibacteriana de los conservantes naturales (aceites esenciales) se procesó los datos en el paquete estadístico SPSS22.0. Se determinó que el tratamiento individual con aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* "romero" y *Allium sativa* "ajo" no tienen actividad bactericida frente a Mesófilos aerobios totales, *S. aureus*, *E. coli* y Coliformes totales presentes en la carcasa de cuy. Sin embargo, se comprobó que el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* "romero" tuvo una actividad bacteriostática frente a *Staphylococcus aureus* en concentraciones de 1% y frente a *Escherichia coli* en concentraciones de 0.7% y 1%. Por otro lado, el aceite esencial de *Allium sativum* "ajo" tuvo una actividad bacteriostática frente a *Staphylococcus aureus* en concentraciones de 0.3; 0.5; 0.7 y 1% y frente a *Escherichia coli* en concentraciones de 0.3; 0.5; 0.7 y 1%. Por otro lado, El tratamiento combinado de aceites esenciales de romero y ajo con ácido láctico tuvo una actividad bactericida frente Mesófilos aerobios totales, *S. aureus*, *E. coli* y Coliformes totales en concentraciones de 0.7% y 1%. Sin embargo, frente a Coliformes totales tuvo una acción bacteriostática en concentraciones de 0.3%; 0.5%; 0.7% y 1%.

**PALABRAS CLAVES:** Bioconservación, aceites esenciales, *Rosmarinus officinalis* L., *Allium sativum*, ácido láctico, Mesófilos aerobios totales, *E. coli*, Coliformes totales, *Staphylococcus aureus*.

## ABSTRACT

The antibacterial action was determined that exerted by the essential oils of rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*), garlic (*Allium sativum*) and Lactic acid over the total Aerobic mesophiles, total coliforms, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* present in the carcass of guinea pig for its bio preservation. It was obtained 50 guinea pig carcasses (*Cavia porcellus*) from the retail market of the province of Lima, from district of La Victoria. It was placed ¼ of carcasses of guinea pig in polypropylene bags to which were added the essential oil of rosemary and garlic; lactic acid, both individually and in combination at different concentrations 0.3%, 0.5%, 0.7% y 1% and it was compared with the results of a control, during three days: time 0 and three periods of 23 h, 48 h and 72 h. For the collection of microorganisms from the guinea pig carcasses were used plates Petrifilm and plates Petri. For the analysis of the behavior of the antibacterial activity of natural preservatives (essential oil) the data is processed in statistical package SPSS22.0. On the individual activity of *Rosmarinus officinalis* essential oil "rosemary" it was determined that a concentration of 1% presented a bacteriostatic activity against *Staphylococcus aureus* and concentrations of 0.7 / and 1% against *Escherichia coli*. However, there is no bactericidal activity against the microorganisms studied: total aerobic mesophiles, *S. aureus*, *E. coli* and total coliforms present in the guinea pig carcass. On the other hand, on the individual activity of the essential oil of *Allium sativum* "garlic" it was determined that a concentration of 0.3; 0.5; 0.7 and 1% had a bacteriostatic activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. However, there is no bactericidal activity on any microorganism studied: total aerobic mesophiles, *S. aureus*, *E. coli* and total coliforms present in the guinea pig carcass. Finally, the combined treatment of essential oils of *Rosmarinus officinalis* "rosemary" and *Allium sativum* "garlic" with lactic acid at concentrations of 0.3% and 0.5% had a bacteriostatic activity against total Coliforms. However, it was determined that concentrations of 0.7% and 1% had a bactericidal activity against total aerobic Mesophiles, *S. aureus*, *E. coli* and Coliformes.

**KEYWORDS:** Bioconservacion. Essential oil, *Rosmarinus officinalis L.*, *Allium sativum*, Lactic acid, Mesofilos aerobios, *E. coli*, Total coliforms, *Staphylococcus aureus*.

## ÍNDICE

	<b>Pág.</b>
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
III. OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo General	19
3.2 Objetivos Específicos	19
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	21
4.1 Lugar de la experimentación	21
4.2 Material Biológico	21
4.3 Aceites esenciales	21
4.4 Ácido Láctico	21
4.5 Preparación de las muestras con Aceite Esenciales y Ácido láctico	21
4.6 Estudio <i>in vitro</i> de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de <i>Rosmarinus officinali</i> L. "Romero", <i>Allium sativum</i> "ajo" y Ácido Láctico	22
4.7 Recuento de Microorganismos	22
4.8 Diseño Experimental de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. "Romero", <i>Allium sativum</i> "ajo" y Ácido Láctico	25
4.9 Análisis estadísticos e Interpretación de datos	30
V. RESULTADOS	31
5.1 Sobre la actividad antibacteriana del aceite esencial de romero ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	31
5.2 Sobre la actividad antibacteriana del aceite esencial de ajo ( <i>Allium sativum</i> ).	36
5.3 Sobre la actividad antibacteriana del ácido láctico	41
5.4 Sobre la actividad antibacteriana del combinado de los aceites esenciales de romero ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.) y de ajo ( <i>Allium sativum</i> ) y ácido láctico	46
VI. DISCUSION	52
VII. CONCLUSIONES	56
VIII. RECOMENDACIONES	58
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
IX. ANEXOS	62

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla N°1:</b> Los datos estadísticos descriptivos asociados a la actividad bacteriana del aceite esencial de romero ( <i>Rosmarinus officinalis L.</i> ) sobre la concentración microbiana (en log UFC/mL) de Mesófilos aerobios Totales, <i>Staphylococcus aureus</i> , Coliformes totales y <i>Escherichia coli</i> a concentraciones de 0,3; 0,5; 0,7 y 1% y un control.	31
<b>Tabla N°2:</b> Datos estadísticos descriptivos asociados a la actividad bacteriana del aceite esencial de ajo ( <i>Allium sativum</i> ) sobre la concentración microbiana (en UFC/mL de Mesófilos aerobios totales, <i>Staphylococcus aureus</i> , Coliformes totales y <i>Escherichia coli</i> a concentraciones de 0,3; 0,5; 0,7 y 1% y un control.	36
<b>Tabla N°3:</b> Datos estadísticos descriptivos asociados a la actividad bacteriana del ácido láctico sobre la concentración microbiana (en UFC/mL) Mesófilos aerobios totales, <i>Staphylococcus aureus</i> , coliformes totales y <i>Escherichia coli</i> a concentraciones de 0,3; 0,5; 0,7 y 1% y un control.	41
<b>Tabla N°4:</b> Datos estadísticos descriptivos asociados a la actividad bacteriana del combinado de los aceites esenciales de romero ( <i>Rosmarinus officinalis L.</i> ) y de ajo ( <i>Allium sativum</i> ) y ácido láctico sobre la concentración microbiana (en UFC/mL) de Mesofilos aerobios totales, <i>Staphylococcus aureus</i> , Coliformes totales y <i>Escherichia coli</i> a concentraciones de 0,3; 0,5; 0,7 y 1% y un control.	44
<b>Tabla N°5:</b> Recuento de Mesofilos aerobios totales (UFC/mL) según control, concentración de aceites esenciales, ácido láctico y tiempo de exposición.	84
<b>Tabla N°6:</b> Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/mL) según control, concentración de aceites esenciales, ácido láctico y tiempo de exposición.	85
<b>Tabla N°7:</b> Recuento de <i>Escherichia coli</i> (UFC/mL) según control, concentración de aceites esenciales, ácido láctico y tiempo de exposición.	86
<b>Tabla N°8:</b> Recuento de Coliformes totales (UFC/mL) según control, concentración de aceites esenciales, ácido láctico y tiempo de exposición.	87

## ÍNDICE DE GRAFICOS

	Pág.
<b>Gráfico N°1:</b> Actividad antibacteriana del aceite esencial de romero ( <i>Origanum vulgare</i> ) a concentraciones de 0.3, 0.5, 0.7 y 1% y un control sobre Mesófilos aerobios totales.	32
<b>Gráfico N°2:</b> Actividad antibacteriana del aceite esencial de romero ( <i>Origanum vulgare</i> ) a concentraciones de 0.3, 0.5, 0.7 y 1% y un control sobre <i>Staphylococcus aureus</i> .	33
<b>Gráfico N°3:</b> Actividad antibacteriana del aceite esencial de romero ( <i>Origanum vulgare</i> ) a concentraciones de 0.3, 0.5, 0.7 y 1% y un control sobre Coliformes totales.	34
<b>Gráfico N°4:</b> Actividad antibacteriana del aceite esencial de romero ( <i>Origanum vulgare</i> ) a concentraciones de 0.3, 0.5, 0.7 y 1% y un control sobre y <i>Escherichia coli</i> .	35
<b>Gráfico N°5:</b> Actividad antibacteriana del aceite esencial de ajo ( <i>Allium sativum</i> ) a concentraciones de 0.3, 0.5, 0.7 y 1% y un control sobre Mesófilos aerobios totales.	37
<b>Gráfico N°6:</b> Actividad antibacteriana del aceite esencial de ajo ( <i>Allium sativum</i> ) a concentraciones de 0.3, 0.5, 0.7 y 1% y un control sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	38
<b>Gráfico N°7:</b> Actividad antibacteriana del aceite esencial de ajo ( <i>Allium sativum</i> ) a concentraciones de 0.3, 0.5, 0.7 y 1% y un control sobre Coliformes totales.	39
<b>Gráfico N°8:</b> Actividad antibacteriana del aceite esencial de ajo ( <i>Allium sativum</i> ) a concentraciones de 0.3, 0.5, 0.7 y 1% y un control sobre <i>Esherishia coli</i> .	40
<b>Gráfico N°9:</b> Actividad antibacteriana individual del ácido láctico a concentraciones de 0.3, 0.5, 0.7 y 1% y un control sobre Mesófilos aerobios totales.	42
<b>Gráfico N°10:</b> Actividad antibacteriana individual del ácido láctico a concentraciones de 0.3, 0.5, 0.7 y 1% y un control sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	43
<b>Gráfico N°11:</b> Actividad antibacteriana individual del ácido láctico a concentraciones de 0.3, 0.5, 0.7 y 1% y un control sobre Coliformes totales.	44
<b>Gráfico N°12:</b> Actividad antibacteriana individual del ácido láctico a concentraciones de 0.3, 0.5, 0.7 y 1% y un control sobre <i>Escherichia coli</i> .	45



<b>Gráfico 13:</b> Actividad antibacteriana del combinado de los aceites esenciales de romero ( <i>Rosmarinus officinalis L.</i> ) y de ajo ( <i>Allium sativum</i> ) y ácido láctico a concentraciones de 0.3, 0.5, 0.7 y 1% y un control sobre mesófilos aerobios.	47
<b>Gráfico 14:</b> Actividad antibacteriana del combinado de los aceites esenciales de romero ( <i>Rosmarinus officinalis L.</i> ) y de ajo ( <i>Allium sativum</i> ) y ácido láctico a concentraciones de 0.3, 0.5, 0.7 y 1% y un control sobre <i>Staphylococcus aureus</i> .	48
<b>Gráfico 15:</b> Actividad antibacteriana del combinado de los aceites esenciales de romero ( <i>Rosmarinus officinalis L.</i> ) y de ajo ( <i>Allium sativum</i> ) y ácido láctico a concentraciones de 0.3, 0.5, 0.7 y 1% y un control sobre <i>Coliformes totales</i> .	49
<b>Gráfico 16:</b> Actividad antibacteriana del combinado de los aceites esenciales de romero ( <i>Rosmarinus officinalis L.</i> ) y de ajo ( <i>Allium sativum</i> ) y ácido láctico a concentraciones de 0.3, 0.5, 0.7 y 1% y un control sobre <i>Escherichia coli</i> .	50

## ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

	Pág.
<b>Fotografía N° 1:</b> Sacrificio de los 50 Cuyes ( <i>Cavia porcellus</i> ).	73
<b>Fotografía N° 2:</b> Corte en ¼ de los 50 Cuyes ( <i>Cavia porcellus</i> ).	73
<b>Fotografía N° 3:</b> Aceite esencial de Romero ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.), Ajo ( <i>Allium sativum</i> ) y ácido láctico.	74
<b>Fotografía N° 4:</b> Concentraciones al 0.3; 0.5; 0.7 y 1% de aceite esencial de Romero ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.), Ajo ( <i>Allium sativum</i> ), ácido láctico y la combinación de los 3.	74
<b>Fotografía N° 5:</b> ¼ de los Cuyes ( <i>Cavia porcellus</i> ) almacenadas con sus respectivas Concentraciones.	75
<b>Fotografía N° 6:</b> Placas Petri y Petrifilm rotuladas.	75
<b>Fotografía N° 7:</b> Recuento de Mesofilos aerobios totales con el tratamiento de aceite esencial de romero – concentración control a 24 h.	76
<b>Fotografía N° 8:</b> Recuento de Mesofilos aerobios totales con el tratamiento de aceite esencial de romero – concentración 0.7% a 24 h.	76
<b>Fotografía N° 9:</b> Recuento de Coliformes totales y <i>E. coli</i> con el tratamiento de aceite esencial de romero – concentración control a 24 h.	76
<b>Fotografía N° 10:</b> Recuento de Coliformes totales y <i>E. coli</i> con el tratamiento de aceite esencial de romero – concentración 0.7% a 24 h.	76
<b>Fotografía N° 11:</b> Recuento de <i>S. aureus</i> con el tratamiento de aceite esencial de romero – concentración 1% a 48 h.	77
<b>Fotografía N° 12:</b> Recuento de <i>S. aureus</i> con el tratamiento de aceite esencial de romero – concentración 1% a 72 h.	77
<b>Fotografía N° 13:</b> Recuento Mesofilos aerobios con el tratamiento de aceite esencial de ajo – concentración control a 24 h.	78
<b>Fotografía N° 14:</b> Recuento de Mesofilos aerobios con el tratamiento de aceite esencial de ajo – concentración 1% a 24 h.	78
<b>Fotografía N° 15:</b> Recuento de Coliformes totales y <i>E. coli</i> con el tratamiento de aceite esencial de ajo – concentración 0.7% a 24 h.	78
<b>Fotografía N° 16:</b> Recuento de Coliformes totales y <i>E. coli</i> con el tratamiento de aceite esencial de ajo – concentración 1% a 24 h.	78

<b>Fotografía N° 17:</b> Recuento de <i>S. aureus</i> con el tratamiento de aceite esencial de ajo – concentración 1% a 24 h.	79
<b>Fotografía N° 18:</b> Recuento de <i>S. aureus</i> con el tratamiento de aceite esencial de ajo – concentración 1% a 48 h.	79
<b>Fotografía N° 19:</b> Recuento de Mesofilos con el tratamiento de aceite esencial de ajo – concentración control a 0 h.	80
<b>Fotografía N° 20:</b> Recuento de Mesofilos aerobios con el tratamiento de aceite esencial de ajo – concentración 1% a 0 h	80
<b>Fotografía N° 21:</b> Recuento de Coliformes totales y <i>E. coli</i> con el tratamiento de aceite esencial de Ac. Láctico – concentración 0.7% a 24 h.	80
<b>Fotografía N° 22:</b> Recuento de Coliformes totales y <i>E. coli</i> con el tratamiento de aceite esencial de Ac. Láctico – concentración 0.7% a 24 h.	80
<b>Fotografía N° 23:</b> Recuento de <i>S. aureus</i> con el tratamiento de ac. láctico – concentración 1% a 48 h.	81
<b>Fotografía N° 24:</b> Recuento de <i>S. aureus</i> con el tratamiento de ac. láctico – concentración 1% a 72 h.	81
<b>Fotografía N° 25:</b> Recuento de Mesofilos aerobios con el tratamiento combinado de aceites esenciales y Ac. Láctico – concentración control a 0 h	82
<b>Fotografía N° 26:</b> Recuento de Mesofilos aerobios con el tratamiento combinado de aceites esenciales y Ac. Láctico – concentración control a 0 h	82
<b>Fotografía N° 27:</b> Recuento de Coliformes totales y <i>E. coli</i> con el tratamiento combinado de aceites esencial y Ac. Láctico – concentración 1% a 24 h	82
<b>Fotografía N° 28:</b> Recuento de Coliformes totales y <i>E. coli</i> con el tratamiento combinado de aceites esencial y Ac. Láctico – concentración 1% a 48 h	82
<b>Fotografía N° 29:</b> Recuento de <i>S. aureus</i> con el tratamiento combinado de aceite esencial y Ac. Láctico – concentración 1% a 0 h.	83
<b>Fotografía N° 30:</b> Recuento de <i>S. aureus</i> con el tratamiento combinado de aceite esencial y Ac. Láctico – concentración 1% a 48 h.	83

## I. INTRODUCCION

El cuy (*Cavia porcellus*) roedor doméstico originario de los Andes, se cría especialmente en Perú, Ecuador, Bolivia y el sur de Colombia. La carne de cuy ha sido el alimento principal del poblador andino desde tiempo inmemorable hasta la actualidad, su consumo se ha extendido hacia otras regiones y Lima ciudad. En la actualidad, existen numerosas granjas cuyeras que se dedican a su crianza y comercialización. Sin embargo, la mayoría de ellos son informales, lo que trasciende negativamente en la productividad y genera bajos niveles de calidad e inocuidad de la carcasa de cuy. El principal problema de las granjas cuyeras es el riesgo de salubridad y descomposición causados no solo por los malos procesos de sacrificio, almacenado y comercialización de la carne cruda de cuy. Sino, también por vulnerabilidad de la carne cruda de cuy de ser fácilmente contaminada por bacterias deterioradoras ambientales y generar el crecimiento de patógenos, lo que desencadena en graves enfermedades transmitidas por los alimentos. La refrigeración es el método de conservación más común de la carne y productos cárnicos crudos, tiene la finalidad de prolongar el tiempo de vida útil de la carne refrigerada. En vista que la seguridad de los aditivos alimentarios sintéticos está siendo cuestionada, los consumidores demandan cada vez más el uso de productos naturales como bioconservante alternativos incorporados en los alimentos. Los extractos naturales de hierbas y especias se han utilizado desde hace muchos años en las carnes como agentes aromatizantes. Siendo los aceites esenciales de plantas los que presentan actividad antimicrobiana al interferir y desestabilizar el funcionamiento de la bicapa fosfolipídica de la membrana plasmática y sus sistemas enzimáticos. Además, funcionan como una barrera de protección alimentaria sobre el recuento bacteriano de Mesófilos Aerobios Totales, Coliformes Totales, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* como indicadores de gestión de la inocuidad alimentaria indicada en la normatividad nacional e internacional que es de gran interés para la industria cárnica.

Es por ello que en la presente investigación se plantea evaluar la acción antimicrobiana del aceite esencial de romero, aceite esencial de ajo y ácido láctico en tratamientos individuales y combinados a diferentes concentraciones y refrigerado logrando generar barreras de protección mediante la reducción de los recuentos bacterianos y permitiendo aumentar el tiempo de vida y utilización de la carcasa de cuy.

## II. ANTECEDENTES

Burt, S. 2004. En estudios sobre "*Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - A review*" *in vitro* ha demostrado la actividad antibacteriana de los aceites esenciales contra *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157: H7, *Shigella dysenteriae*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* a niveles entre 0,2 y 10  $\mu\text{l mL}^{-1}$ . Organismos Gram-negativas son ligeramente menos susceptibles que las bacterias grampositivas. Un número de componentes de los aceites esenciales ha sido identificado como antibacterianos eficaces, por ejemplo, carvacrol, timol, eugenol, perilaldehído, cinamaldehído y ácido cinámico, que tienen concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de 0,05-5  $\mu\text{l mL}^{-1}$  *in vitro*. Se necesita una concentración más alta para lograr el mismo efecto en los alimentos. Los estudios con la carne fresca, los productos cárnicos, pescado, leche, productos lácteos, verduras, frutas y arroz cocido han demostrado que la concentración necesaria para lograr un efecto antibacteriano significativo es de alrededor de 0,5 a 20  $\mu\text{L g}^{-1}$  en los alimentos y sobre 0,1 a 10  $\mu\text{l mL}^{-1}$  en soluciones para el lavado de frutas y verduras. Los aceites esenciales comprenden un gran número de componentes y es probable que su modo de acción implique varios objetivos en la célula bacteriana. La hidrofobicidad de las aceites esenciales les permite Partición en los lípidos de la membrana celular y las mitocondrias, haciéndolos permeable y que conduce a la fuga de contenido de la celda. Las condiciones físicas que mejoran la acción de de los aceites esenciales son de bajo pH, baja temperatura y niveles bajos de oxígeno. El sinergismo se ha observado entre carvacrol y su precursor *p*-cimeno y entre cinamaldehído y eugenol. También se ha observado sinergia entre los componentes de aceites esenciales y métodos de conservación suaves. Algunos componentes aceites esenciales están legalmente aromas en la UE y los EE.UU. registradas. Organolépticas indeseables efectos pueden ser limitados por la selección cuidadosa de las OE de acuerdo con el tipo de alimento.

Benkeblia, N. 2004. En su investigación "*Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (Allium cepa) and garlic (Allium sativum)*" se investigó la actividad antimicrobiana de diferentes concentraciones (50, 100, 200, 300 y 500 mL/ $\mu$ L) de extractos de aceites esenciales de tres tipos de cebollas (verde, amarillo y rojo) y ajo contra dos bacterias, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* y tres hongos, *Aspergillus niger*, *Penicillium cyclopium* y *Fusarium oxysporum*. El aceite esencial extraído de estas *Allium* plantas (ajo y cebollas) mostraron actividad antibacteriana marcada, mostrando con el ajo la más alta inhibición y con cebolla verde el más bajo. Comparativamente, 50 y 100 mL/ $\mu$ L concentraciones de extractos de cebollas eran menos inhibitoria de 200, 300 y 500 mL/ $\mu$ L concentraciones. Sin embargo, con el extracto de ajo, se observó una alta actividad inhibitoria para todas las concentraciones ensayadas. *S. aureus* mostró menor sensibilidad hacia los aceites esenciales, sin embargo *S. enteritidis* fue fuertemente inhibida por extractos de cebolla y ajo rojos. El hongo *F. oxysporum* mostró la sensibilidad más baja hacia los extractos de aceite esencial, mientras que *A. niger* y *P. cyclopium* se inhibió significativamente a bajas concentraciones. En conclusión, cuando se desea condimentos, los extractos de aceites esenciales de la cebolla y el ajo pueden ser utilizados como aditivos antimicrobianos naturales para la incorporación en diversos productos alimenticios.

Oussalah, M. et al. 2007. En su investigación "*Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: E. coli O157:H7, Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes*" se evaluaron veintiocho aceites esenciales por sus propiedades antibacterianas, contra cuatro bacterias patógenas (*Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* 2812, *Salmonella typhimurium* SL 1344 y *Staphylococcus aureus*). Los aceites esenciales se introdujeron en agar infusión de cerebro corazón (BHI) (15 mL) a una concentración de 0,003%, 0,006%, 0,013%, 0,025%, 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,4% y 0,8% (vol/vol) para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración máxima tolerada (MTC) para cada bacteria patógena evaluada. Los resultados

mostraron que los aceites esenciales más activos contra las bacterias ensayadas fueron *Corydothymus capitatus*, *Cinnamomum cassia*, *Origanum heracleoticum*, *Satureja montana* y *Cinnamomum verum* (corteza). Estos mostraron una MIC  $\leq$  0,05% (vol/vol) para todas las bacterias probadas. Con la excepción de *S. typhimurium* y *L. monocytogenes* donde se observó un MTC de 0,025% (vol/vol) en presencia de *Cinnamomum verum* y *Cinnamomum cassia*, respectivamente, también se observó un MTC  $\leq$  0,013% (vol/vol) para todas las demás bacterias y los otros tres aceites esenciales más activos. Los tres aceites esenciales (*Satureja hortensis*, *Thymus vulgaris carvacroliferum*, *Origanum compactum*) mostraron una MIC  $\leq$  0,1% (vol/vol) para todas las bacterias probadas. Siete aceites (*Thymus vulgaris*, *Thymus serpyllum*, *Thymus satureioides*, *Cymbopogon martinii*, *Pimenta dioica*, *Cinnamomum verum* (hoja), *Eugenia caryophyllus*) mostraron una actividad antimicrobiana inferior que muestra una MIC  $\leq$  0,4% (vol/vol) en contra de las cuatro bacterias probadas. Finalmente, 13 aceites esenciales eran menos activos que muestra un valor MIC  $\geq$  0,8% (vol/vol) contra al menos una bacteria.

Sandri, I. et al. 2008. Determinaron en su investigación "Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus *Cunila* against foodborne pathogens and spoiling bacteria" que los aceites esenciales de las partes aéreas de seis especies brasileñas del género *Cunila* Mill (Lamiaceae) utiliza actualmente en bebidas y preparación de alimentos, y en la medicina popular, se obtiene por destilación de vapor y se analizó por GC y GC/MS. Los principales componentes de los aceites fueron: *Cunila galioides* (citral- 77,9%), *C. galioides* (mentha- trans -2,8-dienol -20,0%, -13,6% limoneno, trans -ocimene -13,0%), *C. incisa* (1,8-cineol - 42,9 %,  $\alpha$ -terpineol - 14,0 %), *C. spicata* (1,8-cineol - 47,9 %,  $\alpha$ -terpineol 37,5 %), *C. menthoides* (menteno - 77,8 %), *C. angustifolia* (sabineno - 41,4 %,  $\gamma$  - terpineno - 11,4 %), y *C. microcephala* (mentofurano - 94,90 %). Estos aceites se seleccionaron para la actividad antibacteriana contra 15 especies bacterianas. El aceite de *C. galioides* controló de manera eficiente el crecimiento de *Bacillus* sp., *L. monocytogenes*,



*S. aureus*, *A. hydrophila* y *E. faecalis*, mostrando tanto el contacto y la actividad gaseosa. Aunque menos eficiente, los otros aceites esenciales estudiados fueron eficaces contra *Bacillus* especies, *S. aureus*, y otras bacterias específicas. Valores de CIM y MCC apoyan su uso popular, e indican que pueden ser una alternativa eficaz para el control de transmisión alimentaria y las bacterias que estropean.

Solomakos, N. *et al.* 2008. En su investigación sobre "*The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against Listeria monocytogenes in minced beef during refrigerated storage*" determinaron el efecto antimicrobiano de aceite esencial de tomillo en 0,3%, 0,6%, o 0,9%, la nisina a 500 o 1.000 UL/g, y su combinación contra *Listeria monocytogenes* se examinó tanto en caldo de soja tríptico (TSB) y carne picada de vacuno. El aceite esencial de Tomillo en el 0,3% poseía una débil actividad antibacteriana contra el patógeno en TSB, mientras que en el 0,9% mostró propiedades organolépticas inaceptables en la carne picada. Por lo tanto, sólo el nivel de 0,6% de aceite esencial se examinó adicionalmente contra el patógeno en carne picada. El tratamiento de la carne de vacuno picada con nisina a 500 o 1.000 UL/g mostró actividad antibacteriana frente a *L. monocytogenes*, que era dependiente en el nivel de concentración de nisina y las cepas utilizadas. El tratamiento de la carne de vacuno picada con aceite esencial en el 0,6% mostró actividad inhibitoria fuerte contra *L. monocytogenes* que el tratamiento con nisina a 500 o 1.000 UL/g. Todos los tratamientos mostraron fuerte actividad inhibidora contra los patógenos a 10 °C que a 4°C. La adición combinada de aceite esencial en 0,6% y la nisina a 500 o 1.000 UL/g mostró una actividad sinérgica contra el patógeno. Más eficiente entre tratamientos fue la combinación de EO en el 0,6% con nisina a 1000 UL/g, que disminuyó la población de *L. monocytogenes* por debajo del límite oficial de la Unión Europea recientemente fijado en 2 log UFC/g, durante el almacenamiento a 4°C.

Solomakos, N. *et al.* 2008. En su investigación sobre "*The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against Escherichia coli O157:H7 in minced beef during refrigerated storage*" determinaron que el efecto antimicrobiano de aceite esencial de tomillo (EO) en los niveles de suplementación de 0,3%, 0,6% o 0,9%, la nisina a 500 o 1.000 UL/g, y su combinación, en *Escherichia coli* O157:H7 se examinó tanto en caldo de soja triptico (TSB) y la carne de res picada. EO en el 0,3% poseía una débil actividad antibacteriana contra el patógeno en TSB, mientras que en el 0,9% mostró propiedades organolépticas inaceptables en la carne picada. Por lo tanto, sólo el nivel de 0,6% de aceite esencial se examinó en contra de los agentes patógenos en la carne picada. El tratamiento de la carne de vacuno picada con aceite esencial en el 0,6% mostró una actividad inhibitoria contra *E. coli* O157: H7 durante el almacenamiento a 10°C, pero no a 4°C. El tratamiento de la carne de res picada o TSB con la nisina en 500 o 1.000 UL/g no mostró ninguna actividad antibacteriana contra *E. coli* O157: H7. La combinación de EO en 0,6% y la nisina a 500 o 1.000 UL/g mostró un efecto aditivo contra el patógeno, que fue superior durante el almacenamiento a 10°C que a 4°C.

Nedorostova, L. *et al.* 2009. En su investigación sobre "*Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria*" identificaron las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales en la fase de vapor. *In vitro* actividad antibacteriana contra cinco bacterias transmitidas por los alimentos (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* y *Staphylococcus aureus*) se evaluaron mediante el método de la volatilización del disco. Los resultados se expresaron como concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) en  $\mu\text{L}/\text{cm}^3$  de aire. Trece de los 27 aceites esenciales eran activos contra al menos una cepa bacteriana en el rango de concentraciones ensayadas (0,0083-0,53  $\mu\text{L}/\text{cm}^3$ ). Los mejores resultados se muestran mediante *Armoracia rusticana* (MIC 0,0083  $\mu\text{L}/\text{cm}^3$ ) contra todas las cepas, seguida de *Allium sativum* > *Origanum vulgare* > *Thymus vulgaris* > *Satureja montana*, *Timo pulegioides* > *Timo serpyllum* > *Origanum majorana* >

*Caryopteris x clandonesis*, *Hyssopus officinalis*, *Mentha villosa*, *Nepeta x faassenii*, *Ocimum basilicum*. En conclusión, ciertos aceites esenciales son altamente efectivos en fase de vapor y podrían ser utilizados en el control de patógenos bacterianos transmitidos por los alimentos.

Estella, M. 2011. El presente trabajo de investigación se realizó con el objetivo de elaborar un nuevo producto a base de carne de cuy mediante el proceso de madurado y ahumado, determinado el tiempo de conservación y el aporte nutricional en comparación a la carne de cuy fresca. Se utilizó el método de curado húmedo con el porcentaje de sal como variable para la formulación de salmuera y se sometió a diferentes temperaturas de secado (45°C, 50°C y 55°C); se determinó la formulación correcta de salmuera siendo de 4% de sal, y la temperatura de secado de 55°C por 24 horas, se obtuvo un producto de buena calidad en cuanto a sus características de olor, sabor, color y textura. La preparación de la salmuera para el estudio tecnológico de carne de cuy madurada y ahumada se basó en tomar como variable únicamente la sal y como ingredientes complementarios el agua, azúcar, nitrito, pimienta negra, ajo y humo líquido. Se dejó al producto por un tiempo de conservación de 30 días, en el cual se realizaron análisis microbiológicos a los 8, 15 y 30 días de elaborado el producto, así como también de la carne de cuy fresca, de igual manera se realizaron análisis bromatológicos y se determinó que el aporte nutricional de la carne de cuy seca disminuye en comparación con la carne de cuy fresca, esto es debido a que la proteína contenida en la carne de cuy al ser sometida a temperaturas elevadas se desnaturaliza y se pierde en el líquido evaporado (sangre y fluido intersticial) disminuyendo su valor biológico, aún con esta pérdida el contenido proteico es considerable. Al comparar la carne de cuy fresca con la madurada y ahumada se obtuvo un descenso en varios macro nutrientes en especial en la proteína y un aumento en cuanto a energía los cuales son: para la proteína de 60.03% a 40,49%, grasa de 4.6% a 5,25% y un aporte calórico de 494 KJ/100g a 932 KJ/100g, dando un producto altamente calórico y un aporte nutricional considerable.

Settanni, *et al.* 2012. Determinaron que en su investigación "Inhibition of foodborne pathogen bacteria by essential oils extracted from citrus fruits cultivated in Sicily" la actividad antagonista de los aceites esenciales extraídos por hidrodestilación de la cáscara de la fruta de varios genotipos de cítricos (pomelo, toronja, naranja, kumquat, mandarina y limón) se evaluó frente a bacterias patógenas transmitidas por los alimentos (43 cepas de *Listeria monocytogenes*, 35 cepas de *Staphylococcus aureus* y 14 cepas de *Salmonella enterica*). Cinco aceites esenciales comerciales se utilizaron para la comparación. La mayoría de los aceites esenciales eran más eficaces contra las bacterias Grampositivas en vez de *Salmonella*. Los aceites esenciales de genotipos de limón 14 y 15 mostraron los mejores resultados en términos de número de cepas inhibidas y diámetro de la zona de inhibición. La cepa más susceptible de cada especie (*L. monocytogenes* 133, *St. aureus* 473 y *Salmonella Newport* 50404) se utilizó como indicador para la evaluación de la concentración de inhibición mínima (MIC) los dos últimos de los aceites esenciales 14 y 15. El aceite esencial 16 (que muestra poder de inhibición más débil entre los aceites esenciales de limón), y el aceite esencial comercial de Limón se analizó por su composición química. Un total de 30 compuestos principales fueron identificados por espectrometría de masa de cromatografía de gases (GC/MS) y los monoterpenos oxigenados se sugirieron estar implicado en el proceso de inhibición bacteriana por aceites esenciales de cítricos.

Turgis, M. *et al.* 2012. En la presente investigación "Combined antimicrobial effect of essential oils and bacteriocins against foodborne pathogens and food spoilage bacteria" se determinó el potencial antimicrobiano de seis aceites esenciales (*Origanum vulgare*, *Cinnamomum cassia*, *Brassica hirta*, *Thymus vulgaris*, *Satureja Montagna* y *Cymbopogon nardus*) y cuatro bacteriocinas (nisina, pediocina, y dos bacteriocinas que produjo nuestros aislados de *Enterococcus faecium* MT104 y MT162) contra cinco bacterias patógenas y dos bacterias de descomposición. También se evaluó el efecto sinérgico de los agentes antimicrobianos combinados sobre bacterias patógenas. La actividad antimicrobiana se determinó mediante la evaluación de la concentración

mínima inhibitoria (MIC) de los agentes antimicrobianos probados. Cada agente se puso a prueba en contra de siete patógenos bacterianos transmitidos por los alimentos (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*) y dos de deterioro de los alimentos (*Lactobacillus sakei* y *Pseudomonas putida*) en microplacas de 96 pocillos. La técnica de tablero de ajedrez se utilizó para evaluar los posibles efectos sinérgicos entre los agentes antimicrobianos contra cada bacteria. El valor MIC de 500 ppm se obtuvo cuando los aceites esenciales de *C. cassia* y *O. vulgare* se ensayaron frente a *B. cereus*, *E. coli* O157:H7, y *L. sakei* y cuando el aceite esencial de *B. hirta* fue probado contra *P. putida* y *S. aureus*. La combinación de nisina con el aceite esencial de *O. vulgare* indujo un efecto sinérgico contra *L. monocytogenes* mientras que la combinación de nisina con el aceite esencial de *T. vulgaris* causó un efecto sinérgico contra *S. typhimurium*. Pediocina cuando se combina con el aceite esencial de *S. montagna* causó un efecto sinérgico contra *E. coli* O157:H7. Las combinaciones de las bacteriocinas pueden actuar sinérgicamente para eliminar importantes patógenos transmitidos por alimentos y bacterias de descomposición. Este estudio demostró el potencial del uso de diferentes combinaciones de compuestos antimicrobianos naturales para controlar los patógenos transmitidos por los alimentos de manera eficaz.

Bajpai, *et al.* 2012. En su investigación científica "*Control of Salmonella in foods by using essential oils: A review*" señalaron que durante los últimos años, límite de *Salmonella* infecciones se ha superado de forma espectacular. A pesar de conseguir una infección de baja tasa de *Salmonella* infecciones, este microbio se ha convertido en un desafío en la industria alimentaria debido a su amplia distribución en todo el mundo. *Salmonella* bacterias no sólo son responsables de infecciones leves a severos, pero también causan infecciones que amenazan la vida. *Salmonella* son bacterias zoonóticas en la naturaleza y la calidad de los alimentos dificulta gravemente, además de ser peligroso para la sociedad humana. Existen varios tipos de *Salmonella* serotípica; sin embargo, en menor número son responsables patógenos de la infección. Aumento de las infecciones transmitidas por los alimentos causadas por tipos *Salmonella* se

produce principalmente debido al desarrollo de nuevas características en la mayoría de *Salmonella*, lo que les permite adaptarse en cualquier condición ambiental. También las alteraciones reciente en la sociedad humana con el procesamiento de alimentos y la metodología de marketing con criadores vivos contribuyen a facilitar estos brotes. *Salmonella* es resistentes a los antibióticos comerciales ha surgido como una gran preocupación de salud a los consumidores. Las encuestas han revelado que la infección con *Salmonella* resistentes a los antibióticos ha jugado un papel vital a la mayor tasa de enfermedades infecciosas transmitidas por los alimentos. El uso extensivo de antibióticos en la industria de los alimentos frente a los patógenos transmitidos por los alimentos o los modelos de los alimentos ha dado lugar a la resistencia a antibióticos adicional a *la Salmonella*, que se ha convertido en un asunto de gran preocupación para la salud pública. Hay multitud de posibles sustancias bioactivos útiles que se derivan de las plantas. La importancia de las drogas no se puede enfatizar demasiado con la tendencia reciente de alto porcentaje de resistencia de los microorganismos a los antibióticos presentes días. Esta revisión proporciona los datos de la literatura informativa sobre la eficacia antibacteriana de los aceites esenciales de plantas (AEPs) y sus compuestos volátiles. Además, la idoneidad de AEP y sus componentes volátiles para sus aplicaciones prácticas en los alimentos o productos alimenticios contra *Salmonella*, una causa común de intoxicación alimentaria salmonelosis también se ha centrado. El conocimiento actual de los aceites volátiles y contenidos en el sistema modelo de alimentos para el control de *Salmonella* se ha discutido. También una breve descripción sobre los aspectos legales sobre el uso de los aceites volátiles en el sistema alimentario se ha presentado, y se ha propuesto la zona para futuras investigaciones. A modo de acción antibacteriana de AEP junto con su naturaleza química también se ha descrito. Aunque algunos datos sobre *Salmonella* se presentan problemas -relacionado, esta revisión se centró principalmente en in vivo utilización práctica de los aceites y los componentes volátiles de plantas de alimentos modelo de sistema como naturales agentes anti-*Salmonella*.

Teixeira, B. *et al.* 2013. En su trabajo de investigación "*Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils*" determinaron la eficacia de los 17 aceites esenciales para inhibir el crecimiento de siete deterioro transmitidas por los alimentos y las cepas bacterianas patógenas (*Brochothrix thermosphacta*, *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas putida*, *Salmonella typhimurium* y *Shewanella putrefaciens*). Además, se evaluó la actividad antioxidante (por la actividad captadora de radicales libres y poder reductor férrico) y la composición química de estos aceites esenciales. Todos los aceites esenciales inhibieron el crecimiento de al menos cuatro bacterias ensayadas, y los valores más bajos de concentración inhibitoria mínima ( $<3,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ) se necesitaron para inhibir *P. putida*. Las reducciones más altas ( $8,0 \text{ log UFC mL}^{-1}$ ) se lograron con cilantro, orégano y aceites esenciales de romero para *L. innocua*, así como con aceite esencial de tomillo para ambas cepas de *Listeria*. Los resultados mostraron que para la evaluación de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de plantas, recuentos de bacterias se realizaron en lugar de las lecturas de absorbancia cuando se utilizan métodos de microdilución. En cuanto a la actividad antioxidante, clavo y orégano aceites esenciales mostraron las propiedades antioxidantes fuertes. Los aceites esenciales mostraron una gran variedad de compuestos en sus composiciones químicas, algunos de aquellos con antibacteriano conocido y propiedades antioxidantes. En conclusión, todos los aceites esenciales probados tienen muy fuerte aplicabilidad potencial como agentes antibacterianos y antioxidantes para las industrias alimentaria y farmacéutica.

Jordán, M. *et al.* 2013. En su investigación "Effect of bioclimatic area on the essential oil composition and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L." sobre el rendimiento de aceite esencial, el perfil volátil y actividad antimicrobiana de *Rosmarinus officinalis* L. Se estudiaron los arbustos que crecen silvestres en las distintas áreas bioclimáticas de la provincia de Murcia (España). Un bajo índice de termicidad favoreció la producción de aceite esencial; Sin embargo, hay diferenciación relacionada con un quimiotipo específica dependía del origen geográfico. En las plantas individuales, también



se determinó el efecto de la orden de abundancia entre los componentes que definen el quimiotipo aceite esencial de romero (eucaliptol, alcanfor,  $\alpha$ -pineno), sobre la actividad antimicrobiana. Todos los quimotipos mostraron una fuerte actividad antibacteriana contra cuatro agentes patógenos transmitidos por los alimentos. Determinación del diámetro de inhibición en *Salmonella typhimurium* señaló un efecto contribución positiva de eucaliptol y  $\alpha$ -pineno. Una alta proporción de  $\alpha$ -pineno aumenta la eficacia del aceite contra *Staphylococcus aureus*, mientras que la presencia de eucaliptol, como el compuesto más abundante, disminuye considerablemente la eficiencia de aceite de romero. En contraste, la eficacia de estos aceites contra *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* no fue afectada por esta condición. En cuanto a la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentraciones bactericidas mínimas (MBC), las actividades fuertes exhibida por estos aceites esenciales (<0,5  $\mu$ L/mL) no permitió que los quimotipos y actividades antibacterianas que pueden diferenciar.

Jayasena, D. *et al.* 2013. En su investigación bibliográfica sobre "*Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products*" hacen mención a la producción de carne y productos cárnicos de calidad e inocuidad y con la demanda reciente de los consumidores de etiqueta orgánica totalmente natural y es un reto. Los aceites esenciales derivados de plantas (AEs) han demostrado una notable potencia antimicrobiana contra el deterioro y microorganismos patógenos en la carne y los productos cárnicos. En esta revisión, fundamentos de deterioro microbiano de la carne y sus productos y métodos de conservación tradicionales usados primero se discuten seguidos por modo de acción y el alcance de la aplicación de las organizaciones de empleadores de estos productos. Aplicación de las OE está parcialmente limitada debido a su intenso aroma pero tecnologías avanzadas se pueden combinar para mejorar tanto la estabilidad microbiana y la calidad sensorial.

Pesavento, G. *et al.* 2015. En su investigación "*Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oils against Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes in beef meatballs*" evaluaron la actividad



antimicrobiana de los cinco aceites esenciales se investigó hasta 72 horas frente a los patógenos transmitidos por los alimentos (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni*) a través de difusión en disco y la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria. La actividad antimicrobiana más activa fueron *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare*, seguido de *Cinnamomum zeylanicum*, *Rosmarinus officinalis* y *Salvia officinalis*. La actividad antimicrobiana de *O. vulgare*, *Rosmarinus officinalis* y *T. vulgaris* fue investigado contra cinco productores de enterotoxinas de *S. aureus* y cinco cepas de *L. monocytogenes* para diferentes tiempos (hasta 14 días), a 4°C en las albóndigas. Las concentraciones de 2% y 1% restringieron el crecimiento tanto de los patógenos, pero, como resultado de las pruebas de panel, alterado el sabor de la carne. Las albóndigas cocidas que contienen 0,5% de aceites esenciales eran aceptables en términos de sabor, y los aceites fueron capaces de suprimir concentraciones de  $<10^2$  UFC/g de los patógenos, revelando el uso potencial de *R. officinalis*, *T. vulgaris* y *O. vulgare* como conservantes de alimentos en esta concentración.

Jeong-Eun, *et al.* 2015. En esta investigación sobre las "Preservative effectiveness of essential oils in vapor phase combined with modified atmosphere packaging against spoilage bacteria on fresh cabbage" que realizaron para investigar los efectos antibacterianos de varios aceites esenciales contra patógenos utilizando el método de la volatilización en disco. Además, se evaluaron los efectos combinados de las actividades antimicrobianas en fase de vapor y atmósferas modificadas para reducir los niveles de microorganismos mesófilos totales en la col fresca. Las actividades de la fase de vapor de aceite esencial (tomillo-1, orégano-1, hierba de limón-1, y hierba de limón-2) observaron fuertes efectos inhibitorios. Los resultados mostraron que la atmósfera modificada de CO<sub>2</sub> para envases de gas al 100% se redujo significativamente los niveles de microorganismos mesófilos totales en col y rábano, y su nivel de reducción fue de 1,55 y 2,26 log<sub>10</sub> UFC/g en comparación con el control después de 21 días de almacenamiento ( $p \leq 0,05$ ). Basándose en los resultados anteriores, los efectos combinados de

aceites esenciales en fase de vapor y atmosfera modificada (100% CO<sub>2</sub>) mostraron que el aceite de limón-2 en 20 discos mostró inactivación completa por  $<1,0 \log_{10}$  UFC/g después de 14 días de almacenamiento. Estos resultados podrían proporcionar información útil para el desarrollo de método de preservación alternativa para mejorar la frescura y la vida útil de los productos frescos utilizando antimicrobianos naturales.

Cetin-Karaca, *et al.* 2015. El presente estudio "*Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against Salmonella and Escherichia coli*" se evaluó la eficacia antimicrobiana de compuestos fenólicos naturales (PC) extraídos de vegetales, frutas, hierbas y especias; para inhibir el crecimiento de bacterias Gramnegativas transmitidas por los alimentos que se define como la concentración mínima inhibitoria (MIC). Las cepas de especies *Escherichia coli* y *Salmonella* fueron tratados con PCs naturales incluyendo; ácido clorogénico, la curcumina, (-) epicatequina, eugenol, miricetina, quercetina, rutina, timol, timoquinona, y xantohumol. Las concentraciones de 5, 10, 15, y 20 ppm de cada compuesto se evaluó mediante un método de micro-dilución en caldo y los MICs se determinaron mediante el uso de densidad óptica después de 24 y 60 horas de incubación. Alteraciones estructurales en bacterias tratadas se observaron mediante microscopía electrónica de barrido. Para *E. coli*, timoquinona mostró la mayor inhibición, seguido de rutina, (-) epicatequina y miricetina (MIC  $<20$  ppm para todos), mientras *Salmonella* era más sensible a la (-) epicatequina (MIC  $<15$  ppm), seguido por timoquinona, rutina y miricetina (MIC  $<20$  ppm para todos) siguiente 60 horas de incubación. Los resultados demostraron que las PCs tienen diferentes actividades antimicrobianas contra patógenos transmitidos por los alimentos después de 24 y 60 horas de períodos de incubación. Las fuentes naturales de PCs contienen principales componentes antibacterianos y tienen un gran potencial para ser utilizado como antimicrobianos naturales y conservantes de alimentos, durante el almacenamiento a largo plazo. Este estudio pone de relieve la eficacia antimicrobiana de algunos nuevos PCs que pueden sustituir antimicrobianos y conservantes químicos en los alimentos o en la industria farmacéutica para inhibir parcial o totalmente el crecimiento de bacterias.

Parra Huertas, R. 2010. En esta tesis sobre las “Bacterias Acido Lácticas: Papel Funcional en los Alimentos” que realizaron para repasar la considerable contribución al valor de estos productos. Ya que por varios de sus propiedades metabólicas, las bacterias acido lácticas desempeñan un papel importante en la industria alimentaria, por su contribución significativa al sabor, olor, textura, características sensoriales, propiedades terapéuticas y valor nutricional de los productos alimentarios. También mencionan detalladamente los géneros productores de ácido láctico, tales como *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*. Finalmente, mencionan algunas funciones algunos de los metabolitos producidos por este tipo de bacterias como ácidos orgánicos, sustancias preservantes, polisacáridos, vitaminas, endulzantes, olores y sabores entre otros. Esta revisión se enfoca en estudiar la importancia de las bacterias acido lácticas en los alimentos.

Rojas Rodríguez, 2007. En su investigación “Evaluación de cuatro desinfectantes sobre *Listeria monocytogenes* aislada en productos cárnicos crudos de una planta de procesados en Bogotá” evaluó cuatro desinfectantes, como principio activo a base de amonio cuaternario (200 y 400 ppm), alquil amin betaina (0.25% v/v y 0.5%), hipoclorito de sodio (500 y 250 ppm) y ácido láctico (1% v/v y 2% v/v) sobre cepas de *L. monocytogenes* aislada de la materia prima (carne de res, carne de cerdo) y de productos procesados crudos (chorizo, chorizo antioqueño y carne de hamburguesa) de una planta de procesados cárnicos ubicada en Bogotá. La evaluación de los desinfectantes se llevó a cabo mediante la técnica de porcentaje de inhibición, a tres tiempos de contacto (5, 10 y 15 minutos). En las condiciones de ensayo evaluadas se obtuvo un porcentaje de inhibición del 100% para los desinfectantes con principio activo a base de amonio cuaternario (400 ppm y 200 ppm), hipoclorito de sodio (500 ppm) y alquil amin betaina (0.5 % v/v). En el caso de la evaluación de los desinfectantes con principio activo a base de hipoclorito de sodio (250 ppm) y alquil amin betaina(0.25 % v/v), se obtuvo un porcentaje de inhibición del 99.99% para cada uno de los tiempo evaluados, con un  $p < 0.05$ . El ácido láctico una concentración del 2% v/v mostro un 99.57% de inhibición

a los tres tiempos de contacto (5, 10 y 15 min), mientras que a una concentración del 1% se obtuvo un porcentaje de inhibición del 99.64; 99.58; 99.67% a los 5, 10 y 15 minutos del contacto, respectivamente, con un  $p < 0.05$ . Los resultados del presente estudio demostraron que los desinfectantes evaluados, a diferentes concentraciones fueron efectivos sobre las cepas de *L. monocytogenes*, ya que se obtuvieron un porcentaje de inhibición  $>$  del 90%.

Vásquez M., *et al.* 2009. En su estudio “Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de carne”, actualizaron la información correspondiente al uso de ácido láctico como biopreservantes de alimentos por su capacidad para controlar los microorganismos patógenos y de deterioro. Esta revisión involucra aspectos de la biopreservación de alimentos y específicamente de carne y productos cárnicos susceptibles de alteraciones y ataques de diversos microorganismos. Se detallan metodologías de biopreservación de uso común en los alimentos, así como aspectos destacados de los metabolitos producidos por Bacterias Ácido Lácticas, haciendo especial hincapié en bacteriocinas, sustancias antimicrobianas que han demostrado su eficacia para controlar diversos microorganismos y han tenido una aplicación exitosa en los alimentos. El uso de la biopreservación es revisado, considerado como una barrera tecnológica que combinada con otros métodos de conservación como la refrigeración y las buenas prácticas de fabricación pueden ser una opción interesante para disminuir la adición de conservantes químicos, proporcionando alimentos seguros con preservantes naturales.

Lax Vivancos, Vanesa. 2014. En esta investigación “Estudio de la Variabilidad química, propiedades Antioxidantes y Biocidas de poblaciones espontáneas de *Rosmarinus officinalis* L. en la región de Murcia”. Evaluaron la actividad biológica de los metabolitos secundarios de *Rosmarinus officinalis*, específicamente de aceite esencial y del extracto polifenólico. Determinaron que la actividad biológica depende de la variación de los quimitipos de las plantas, la variación en la actividad la atribuyen principalmente al lugar de

origen, fecha de siega, estado fenológico de la planta, método de extracción y fase de desarrollo de la planta.

### III. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo General:

- Determinar la acción antibacteriana individual y combinada de aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* L. (romero), *Allium sativum* (ajo) y ácido láctico que ejercen sobre los Mesófilos Aerobios Totales, Coliformes Totales, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* que presenta la carcasa de cuy para su biopreservación.

#### 3.2 Objetivos Específicos:

- Evaluar la acción antibacteriana individual que ejerce el aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) a concentraciones de 0.3, 0.5, 0.7 y 1% como un control microbiológico del crecimiento de los Mesófilos Aerobios Totales, Coliformes Totales, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* que presenta la carcasa de cuy para su biopreservación.
- Evaluar la acción antibacteriana individual que ejerce el aceite esencial de ajo (*Allium sativum*) a concentraciones de 0.3, 0.5, 0.7 y 1% como un control microbiológico del crecimiento de los Mesófilos Aerobios Totales, Coliformes Totales, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* que presenta la carcasa de cuy para su biopreservación.
- Evaluar la acción antibacteriana individual que ejerce el ácido láctico a concentraciones de 0.3, 0.5, 0.7 y 1% como un control microbiológico del crecimiento de los Mesófilos Aerobios Totales, Coliformes Totales, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* que presenta la carcasa de cuy para su biopreservación.
- Evaluar la acción antibacteriana combinada que ejerce el aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis* L.), ajo (*Allium sativum*) y ácido láctico a concentraciones de 0.3, 0.5, 0.7 y 1% como un control microbiológico del crecimiento de los Mesófilos Aerobios Totales,

Coliformes Totales, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* que presenta la carcasa de cuy para su biopreservación.

## **IV. MATERIALES Y METODOS**

### **4.1 Lugar de la experimentación.**

La investigación se realizó en los laboratorios: Laboratorio de Microbiología y Laboratorio de Biología y Genética Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma, ubicada en la Avenida Benavides 5440 Santiago de Surco.

### **4.2 Material Biológico.**

Se trabajó con 50 cuyes (*Cavia porcellus*) procedente del Mercado Minorista de la Parada, Provincia de Lima, del distrito de La Victoria. Estos fueron sacrificados, pelados, eviscerados y trozados. Finalmente, se trabajó con sus carcasas. Cada carcasa de cuy pesaba aproximadamente 400g.

### **4.3 Aceites esenciales.**

Los aceites esenciales comerciales de “romero” y “ajo” con pureza especificada, método de extracción por arrastre de vapor y de grado alimentario, fueron adquiridos en la Compañía Plant therapy – USA. (Anexos: ficha técnica).

### **4.4 Ácido Láctico**

El ácido láctico de grado alimentario fue adquirido de la compañía de alimentos Montana S.A.C (Anexos: ficha técnica).

### **4.5 Preparación de las muestras con Aceites Esenciales y Ácido láctico**

Para la preparación de los tratamientos (TT) combinados e individuales de los aceites esenciales y ácido láctico se utilizaron frascos de dilución de 500 mL donde se colocaron diferentes volúmenes de aceite esencial y ácido láctico de 1.5, 2.5, 3.5 y 5 mL que fueron completados con agua peptonada hasta obtener 500 mL (v/v) en cada tratamiento. De esta forma se obtuvo las concentraciones de ensayo de 0.3, 0.5, 0.7 y 1 %.



Posteriormente, se colocaron las concentraciones obtenidas en bolsas de polipropileno estériles y se introdujo un ¼ de carcasa de cuy por cada bolsa. Finalmente, Se obtuvo 50 bolsas con ¼ de carcasa de cuy con las concentraciones de los tratamientos individual y combinado estudiados, las cuales fueron llevadas a refrigeración 4°C durante 72 horas para su posterior análisis microbiológico.

#### **4.6 Estudio *in vitro* de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* L. “Romero”, *Allium sativum* “ajo” y Acido Lactico.**

Los ensayos microbiológicos se realizaron en placas petrifilm 3M para Mesófilos Aerobios Totales, *Escherichia coli* y Coliformes totales. Sin embargo, para los ensayos microbiológicos de *Staphylococcus aureus* se utilizó el medio agar Baird-Parker marca Merck. Para las placas Petrifilm 3M y placas Petri, se sembraron las muestras provenientes de las bolsas con las diferentes concentraciones de los tratamientos individual y combinado de aceite esencial y ácido láctico: 0.3%, 0,5%, 0.7% y 1.0% . Se realizaron cinco repeticiones por cada tratamiento individual y combinado de cada concentración de los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* L. “Romero”, *Allium sativum* “ajo” y ácido láctico más sus respectivos controles.

#### **4.7 Recuento de Microorganismos.**

El recuento de microorganismos se basó en la metodología de los siguientes instructivos:

- Recuento de Microorganismos Aerobios Mesófilos Mediante Técnica Petrifilm AOAC Official Method 990.12

- a. Preparar muestra

- ✓ Asépticamente se pesó a lo menos (manteniendo relación 1:10 con el diluyente)  $10 \pm 0.1$  g de muestra representativa dentro de una bolsa estéril de polipropileno.

- ✓ Se agregó 90 mL de diluyente. Esta dilución es denominada  $10^{-1}$ .
- ✓ Se homogenizó la muestra por 1 minuto a velocidad media.
- ✓ Luego se depositó 1 mL de esta dilución de acuerdo a lo descrito en el protocolo de trabajo.
- ✓ Se tomó 1 mL de la dilución y se depositó en un tubo que contenga 9 mL de diluyente Butterfield 's Tamponado. Esta dilución es denominada  $10^{-2}$ . Con estas dos diluciones se continúa con el protocolo de trabajo.

b. Protocolo de Trabajo

- ✓ Se rotuló las placas Petrifilm con la identificación de las muestras y dilución correspondiente.
- ✓ Se colocó la placa Petrifilm recuento de microorganismos Aerobios Mesofilos en una superficie plana.
- ✓ Se levantó el Film superior e inocular 1 mL de la dilución decimal apropiada en el centro del film interior.
- ✓ Se bajó cuidadosamente el film superior encima de la muestra, evitando la formación de burbujas de aire.
- ✓ Se colocó el aplicador con la cara lisa hacia arriba en el centro de la placa.
- ✓ Se presionó ligeramente el centro del aplicador para distribuir la muestra uniformemente. Distribuir el inóculo por toda el área de crecimiento del Petrifilm antes de que se forme el gel. No deslizar el aplicador por el film.
- ✓ Se sacó el aplicador y esperar al menos un minuto para permitir que solidifique el gel.
- ✓ Por cada dilución existente se sembró en una o dos placas.
- ✓ Se incubaron las placas en posición horizontal, cara arriba, en pilas de hasta 20 placas. La incubadora debe estar humidificada.
- ✓ Se incubaron las placas Petrifilm recuento de Microorganismos Aerobios Mesofilos por  $48 \pm 3$  horas a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

- c. Cálculo y expresión de los resultados
  - ✓ Se contabilizó todas las colonias rojas de borde regular, independiente del tamaño o intensidad en el color.
  - ✓ Cuando toda el área de crecimiento se volvía rosada o roja, era indicador de altas cargas bacterianas.
  
- Recuento de Coliformes y *E. coli* Mediante la Técnica Petrifilm AOAC Official Method 991.14 o 998.08
  - a. Preparar de muestra
    - ✓ Asépticamente se pesó a lo menos (manteniendo relación 1:10 con la solución APT)  $10 \pm 0.1$  g de muestra representativa dentro de una bolsa estéril de polipropileno.
    - ✓ Se agregó 90 mL de APT para tener una relación de 1:10. Esta dilución es denominada  $10^{-1}$ .
    - ✓ Luego se depositó 1 mL de esta dilución de acuerdo a lo descrito en protocolo de trabajo.
    - ✓ Se homogenizó la muestra por 1 minuto a velocidad media.
    - ✓ Luego se depositó 1 mL de esta dilución de acuerdo a lo descrito en el protocolo de trabajo.
  - b. Protocolo de Trabajo
    - ✓ Se colocó la placa Petrifilm para Recuento de *E.coli* y Coliformes, en una superficie plana.
    - ✓ Se levantó el film superior sobre la muestra evitando que se forme burbujas de aire.
    - ✓ Se colocó el aplicador con la cara lisa hacia abajo en el centro de la placa.
    - ✓ Se presionó ligeramente el centro del aplicador para distribuir la muestra uniformemente. Se distribuyó el inóculo por toda el área de crecimiento del Petrifilm antes de que se forme el gel. No deslizar el aplicador por el film.
    - ✓ Sacar el aplicador y dejar la placa en reposo durante al menos un minuto para que el gel solidifique.
    - ✓ Por cada dilución existente se sembró de una o dos placas.

- ✓ Se incubaron las placas en posición horizontal, cara arriba, en pilas de hasta 20 placas.
- c. Cálculo y Expresión de los Resultados
  - ✓ Para la obtención del recuento de *E. coli* confirmados, se deben enumerar las colonias azul a rojo-azuladas asociadas al gas atrapado, independientemente del tamaño o intensidad de color.
  - ✓ Las colonias rojas y asociadas a burbujas de gas correspondieron a Coliformes.
- Técnica de diseminación en superficie de Agar para el recuento de *Staphylococcus aureus*
  - a. Preparar de muestra
    - ✓ Se preparó una dilución de la muestra de carcasa de cuy. Se pesó la muestra (dentro de una bolsa de polipropileno estéril).
    - ✓ Se adicionó el diluyente tampón Butterfield (tampón IDF fosfato, 0.0425 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y con pH ajustado a 7.2).
    - ✓ Se homogenizó la muestra por 1 minuto a velocidad media.
    - ✓ De cada dilución transfirió 1 mL de suspensión a tres placas de agar Baird Parker distribuyendo 1 mL equitativamente en las tres placas (0,3 , 0,3 y 0,4 mL).
    - ✓ Se extendió el inóculo mediante rastrillo estéril, hasta que la superficie estuviera seca. Retener las placas en posición no invertida hasta que el inóculo se absorba (aprox. 10 minutos).
    - ✓ Si el inóculo no estaba completamente absorbido, se dejaron las placas sin invertir en la incubadora por 1 hora. Se incubaron las placas invertidas a 35 ° C durante 45-48 horas.

#### **4.8 Diseño Experimental de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* L. “Romero”, *Allium sativum* “ajo” y Ácido Láctico.**

La acción de los tratamientos individuales y combinados de los aceites esenciales comerciales frente al crecimiento de las bacterias consistió en

un Diseño Experimental al azar con cinco tratamientos y cinco repeticiones, los mismos que fueron realizados de la siguiente manera:

- **La primera etapa** evaluó la acción de aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) en diversas concentraciones frente a la reducción del número bacteriano de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Coliformes Totales* y *Mesófilos Aerobios* totales en diferentes frecuencias de tiempo y a una temperatura de refrigeración de 5°C.

Tiempo (horas)	Concentraciones de aceite esencial de romero ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.)				Control
	0.3%	0.5%	0.7%	1%	0%
0	1/4 de carcasa de	1/4 de carcasa de	1/4 de carcasa de	1/4 de carcasa de	1/4 de carcasa de
24	cuy.	cuy.	cuy.	cuy.	cuy.
48	5 repeticiones por tratamiento.	5 repeticiones por tratamiento.	5 repeticiones por tratamiento.	5 repeticiones por tratamiento.	5 repeticiones por tratamiento.
72	Recuento bacteriano UFC/mL: <i>Staphylococcus aureus</i> .	Recuento bacteriano UFC/mL: <i>Staphylococcus aureus</i> .	Recuento bacteriano UFC/mL: <i>Staphylococcus aureus</i> .	Recuento bacteriano UFC/mL: <i>Staphylococcus aureus</i> .	Recuento bacteriano UFC/mL: <i>Staphylococcus aureus</i> .
	<i>Escherichia coli</i> .	<i>Escherichia coli</i> .	<i>Escherichia coli</i> .	<i>Escherichia coli</i> .	<i>Escherichia coli</i> .
	<i>Coliformes Totales</i> .	<i>Coliformes Totales</i> .	<i>Coliformes Totales</i> .	<i>Coliformes Totales</i> .	<i>Coliformes Totales</i> .
	<i>Mesófilos Aerobios Totales</i> .	<i>Mesófilos Aerobios Totales</i> .	<i>Mesófilos Aerobios Totales</i> .	<i>Mesófilos Aerobios Totales</i> .	<i>Mesófilos Aerobios Totales</i> .

- **La segunda etapa** evaluó la acción de Aceite Esencial el aceite esencial de ajo (*Allium sativum*) en diversas concentraciones frente a la reducción del número bacteriano de *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Coliformes Totales* y *Mesófilos Aerobios* totales en diferentes frecuencias de tiempo y a una temperatura de refrigeración de 5°C.

Tiempo (horas)	Concentraciones de aceite esencial de ajo ( <i>Allium sativum</i> )				Control
	0.3%	0.5%	0.7%	1%	0%
0	1/4 de carcasa de cuy.	1/4 de carcasa de cuy.	1/4 de carcasa de cuy.	1/4 de carcasa de cuy.	1/4 de carcasa de cuy.
24	5 repeticiones por tratamiento.	5 repeticiones por tratamiento.	5 repeticiones por tratamiento.	5 repeticiones por tratamiento.	5 repeticiones por tratamiento.
48					
72	Recuento bacteriano UFC/mL: <i>Staphylococcus aureus</i> . <i>Escherichia coli</i> . <i>Coliformes Totales</i> . <i>Mesófilos Aerobios Totales</i> .	Recuento bacteriano UFC/mL: <i>Staphylococcus aureus</i> . <i>Escherichia coli</i> . <i>Coliformes Totales</i> . <i>Mesófilos Aerobios Totales</i> .	Recuento bacteriano UFC/mL: <i>Staphylococcus aureus</i> . <i>Escherichia coli</i> . <i>Coliformes Totales</i> . <i>Mesófilos Aerobios Totales</i> .	Recuento bacteriano UFC/mL: <i>Staphylococcus aureus</i> . <i>Escherichia coli</i> . <i>Coliformes Totales</i> . <i>Mesófilos Aerobios Totales</i> .	Recuento bacteriano UFC/mL: <i>Staphylococcus aureus</i> . <i>Escherichia coli</i> . <i>Coliformes Totales</i> . <i>Mesófilos Aerobios Totales</i> .

- **La tercera etapa** evaluó la acción del ácido láctico en diversas concentraciones frente a la reducción del número bacteriano de *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Coliformes Totales* y *Mesófilos Aerobios* totales en diferentes frecuencias de tiempo y a una temperatura de refrigeración de 5°C.

Tiempo (horas)	Concentraciones de ácido láctico				Control
	0.3%	0.5%	0.7%	1%	0%
0	1/4 de carcasa de cuy.	1/4 de carcasa de cuy.	1/4 de carcasa de cuy.	1/4 de carcasa de cuy.	1/4 de carcasa de cuy.
24	5 repeticiones por tratamiento.	5 repeticiones por tratamiento.	5 repeticiones por tratamiento.	5 repeticiones por tratamiento.	5 repeticiones por tratamiento.
48					
72	Recuento bacteriano UFC/mL: <i>Staphylococcus aureus</i> . <i>Escherichia coli</i> . <i>Coliformes Totales</i> . <i>Mesófilos Aerobios Totales</i> .	Recuento bacteriano UFC/mL: <i>Staphylococcus aureus</i> . <i>Escherichia coli</i> . <i>Coliformes Totales</i> . <i>Mesófilos Aerobios Totales</i> .	Recuento bacteriano UFC/mL: <i>Staphylococcus aureus</i> . <i>Escherichia coli</i> . <i>Coliformes Totales</i> . <i>Mesófilos Aerobios Totales</i> .	Recuento bacteriano UFC/mL: <i>Staphylococcus aureus</i> . <i>Escherichia coli</i> . <i>Coliformes Totales</i> . <i>Mesófilos Aerobios Totales</i> .	Recuento bacteriano UFC/mL: <i>Staphylococcus aureus</i> . <i>Escherichia coli</i> . <i>Coliformes Totales</i> . <i>Mesófilos Aerobios Totales</i> .

- **La cuarta etapa** evaluó la acción combinada que ejerce el aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis* L.), ajo (*Allium sativum*) y ácido láctico en diversas concentraciones frente a la reducción del número bacteriano de *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, Coliformes Totales y Mesófilos Aerobios totales en diferentes frecuencias de tiempo y a una temperatura de refrigeración de 5°C.

Tiempo (horas)	Concentraciones de aceite esencial de romero ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.), ajo ( <i>Allium sativum</i> ) y ácido láctico.				Control
	0.3%	0.5%	0.7%	1%	0%
0	1/4 de carcasa de cuy.	1/4 de carcasa de cuy.	1/4 de carcasa de cuy.	1/4 de carcasa de cuy.	1/4 de carcasa de cuy.
24	5 repeticiones por tratamiento.	5 repeticiones por tratamiento.	5 repeticiones por tratamiento.	5 repeticiones por tratamiento.	5 repeticiones por tratamiento.
48					
72	Recuento bacteriano UFC/mL: <i>Staphylococcus aureus</i> . <i>Escherichia coli</i> . Coliformes Totales. Mesófilos Aerobios Totales..	Recuento bacteriano UFC/mL: <i>Staphylococcus aureus</i> . <i>Escherichia coli</i> . Coliformes Totales. Mesófilos Aerobios Totales.	Recuento bacteriano UFC/mL: <i>Staphylococcus aureus</i> . <i>Escherichia coli</i> . Coliformes Totales. Mesófilos Aerobios Totales.	Recuento bacteriano UFC/mL: <i>Staphylococcus aureus</i> . <i>Escherichia coli</i> . Coliformes Totales. Mesófilos Aerobios Totales.	Recuento bacteriano UFC/mL: <i>Staphylococcus aureus</i> . <i>Escherichia coli</i> . Coliformes Totales. Mesófilos Aerobios Totales.



Los factores experimentales son:

#### **Variables Independientes**

- Concentración de aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. “romero”
- Concentración de aceite esencial de *Allium sativum* “ajo”
- Concentración de ácido láctico
- Concentración combinada de aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* “romero”, *Allium sativum* “ajo” y ácido láctico.
- Tiempo

#### **Variables dependientes**

- Recuento de bacterias Mesófilos Aerobios Totales
- Recuento de bacterias Coliformes Totales
- Recuento de *Escherichia coli*
- Recuento de *Staphylococcus aureus*

### **4.9 Análisis estadísticos e Interpretación de datos**

A partir de los datos recopilados, se procedió a construir una base de datos que fue procesada con el soporte del paquete estadístico SPSS 22.0.

Para analizar los datos se procedió con un análisis descriptivo calculando e interpretando las medias y desviación estándar que muestren el comportamiento de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de romero y de ajo; como del ácido láctico sobre Mesófilos aerobios, *Staphylococcus aureus*, Coliformes totales y *Escherichia coli* tanto de forma individual como combinada, en sus cuatro niveles de concentración (0,3%, 0,5%, 0,7% y 1%). Los valores obtenidos fueron comparados con los valores de los controles (0%), asimismo describió el comportamiento de la actividad durante los tres primeros días (tiempo 0 y tres periodos de tiempo de exposición: 24 h, 48 h y 72 h). Para ello se considera importante el uso de gráficos de líneas múltiples que complementan los estadísticos descriptivos para una adecuada interpretación de los resultados.

## V. RESULTADOS

### Según el Análisis descriptivo

#### 5.1 Sobre la actividad antibacteriana del aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis L.*)

	Aerobios mesófilos				S. aureus			
	0 h	24 h	48 h	72 h	0 h	24 h	48 h	72 h
	PROMEDIO ± DE				PROMEDIO ± DE			
<b>Control</b>	3.2±0.00	3.2±0.00	3.2±0.00	3.2±0.00	1.8±0.25	3±0.03	3.2±0.00	3.2±0.00
<b>0,3%</b>	3.2±0.00	3.2±0.00	3.2±0.00	3.2±0.00	1.4±0.19	2.7±0.10	3.2±0.00	3.2±0.00
<b>0,5%</b>	3.2±0.00	3.2±0.00	3.2±0.00	3.2±0.00	1.0±0.63	2.7±0.05	3.2±0.00	3.2±0.00
<b>0,7%</b>	3.1±0.06	3.2±0.00	3.2±0.00	3.2±0.00	0.8±0.45	2.2±0.44	3.2±0.00	3.2±0.00
<b>1,0%</b>	2.9±0.06	3.2±0.00	3.2±0.00	3.2±0.00	0.1±0.16	1.3±0.26	2.9±0.05	3.2±0.00
	Coliformes totales				E. coli			
	0 h	24 h	48 h	72 h	0 h	24 h	48 h	72 h
	PROMEDIO ± DE				PROMEDIO ± DE			
<b>Control</b>	2.9±0.00	3.2±0.00	3.2±0.00	3.2±0.00	2±0.10	2.3±0.00	3.2±0.00	3.2±0.00
<b>0,3%</b>	2.7±0.00	3.2±0.00	3.2±0.00	3.2±0.00	1.7±0.10	1.4±0.10	3.2±0.00	3.2±0.00
<b>0,5%</b>	2.6±0.00	3.2±0.00	3.2±0.00	3.2±0.00	1.6±0.10	1.2±0.10	3.2±0.00	3.2±0.00
<b>0,7%</b>	2.4±0.00	3.2±0.00	3.2±0.00	3.2±0.00	0.1±0.10	1.2±0.10	3.2±0.00	3.2±0.00
<b>1,0%</b>	2.1±0.00	2.6±0.00	3.2±0.00	3.2±0.00	0±0.00	1.2±0.00	3.2±0.00	3.2±0.00

**Tabla N°1: Los datos estadísticos descriptivos asociados a la actividad bacteriana del aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis L.*) sobre la concentración microbiana (en log UFC/mL) de Mesófilos aerobios Totales, *Staphylococcus aureus*, Coliformes totales y *Escherichia coli* a concentraciones de 0,3; 0,5; 0,7 y 1% y un control.**

- En Mesófilos aerobios totales, se observó que las cuatro concentraciones tienen una carga bacteriana igual o mayor al control de 3.2 log UFC/mL en todos los recuentos. Excepto en la concentración de 1% a las 0 Horas, donde se obtuvo una carga bacteriana de 2.9 log UFC/mL (Ver Gráfico N°1).

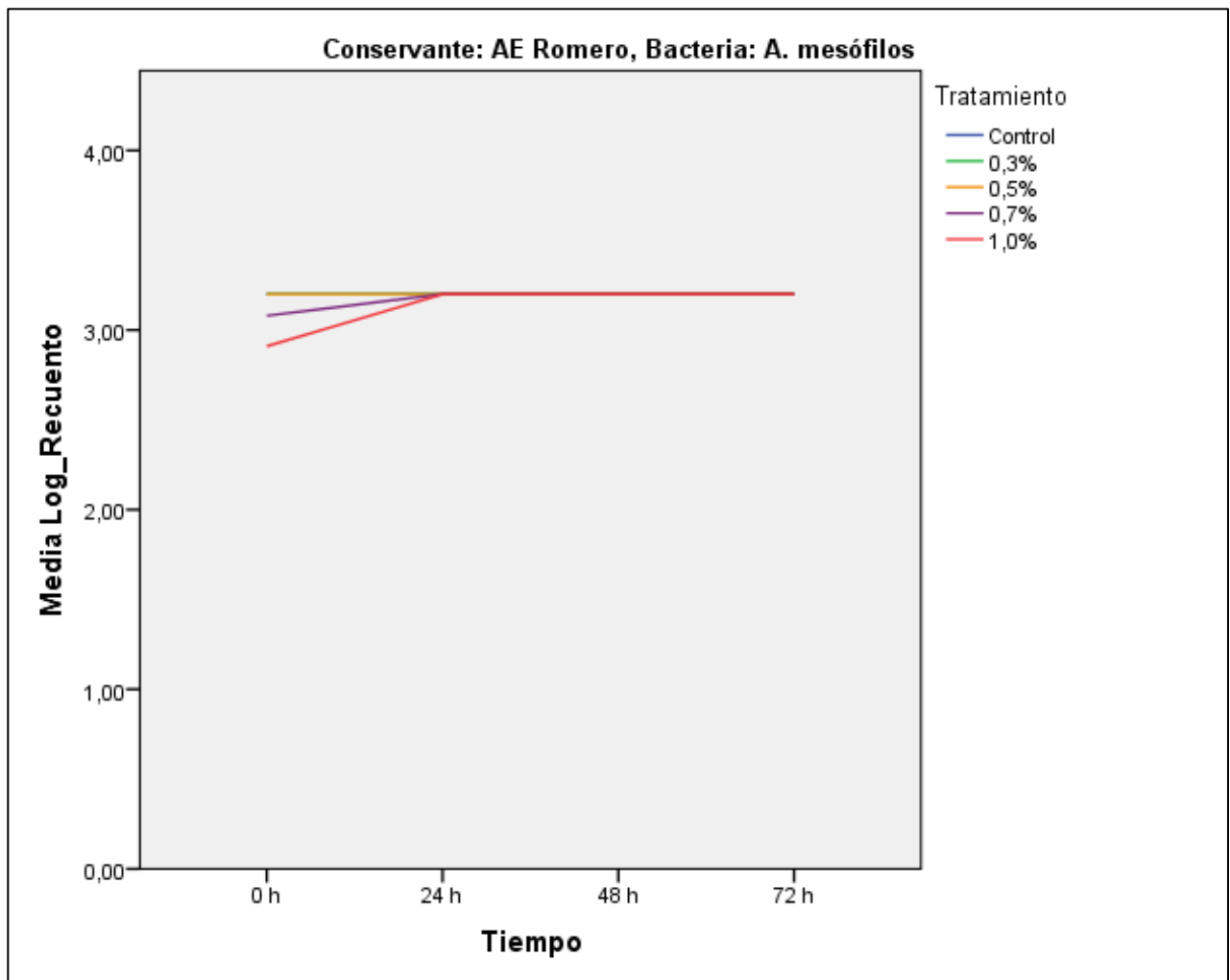


Gráfico N°1: Actividad antibacteriana del aceite esencial de romero (*Origanum vulgare*) a concentraciones de 0.3, 0.5, 0.7 y 1% y un control sobre Mesófilos aerobios totales.

- En *Staphylococcus aureus*, se observó que el promedio de carga bacteriana durante las primeras 24 horas fueron menores a los valores del control. Siendo la concentración de 1% la que inhibió el crecimiento de la carga microbiana significativamente a las 0 horas (0.1 log UFC/mL). A partir de las 24 horas en adelante, todas las concentraciones presentan un crecimiento bacteriano que llega a 3.2 log UFC/mL, siendo igual o mayor que el control (**Ver Gráfico N°2**).

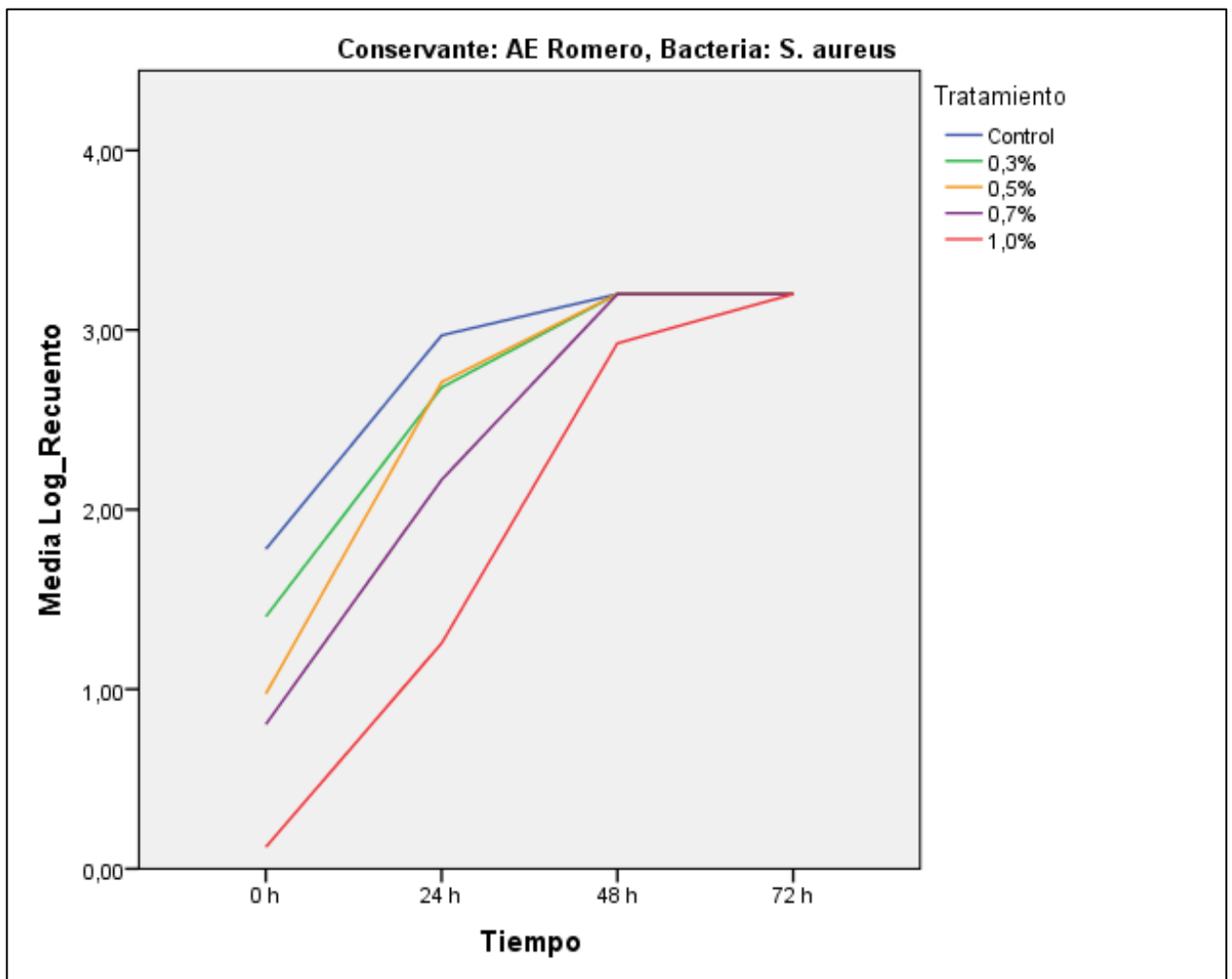
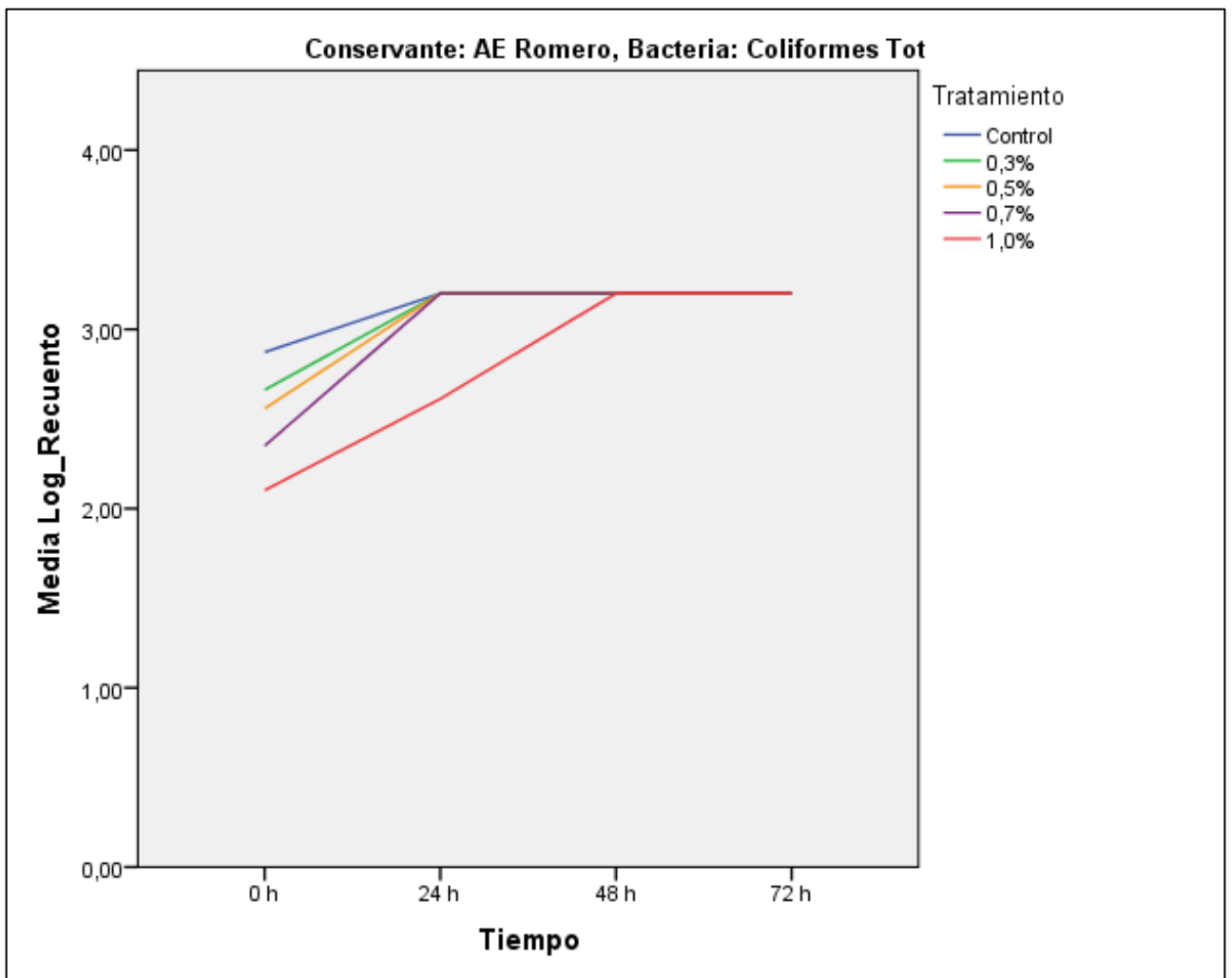


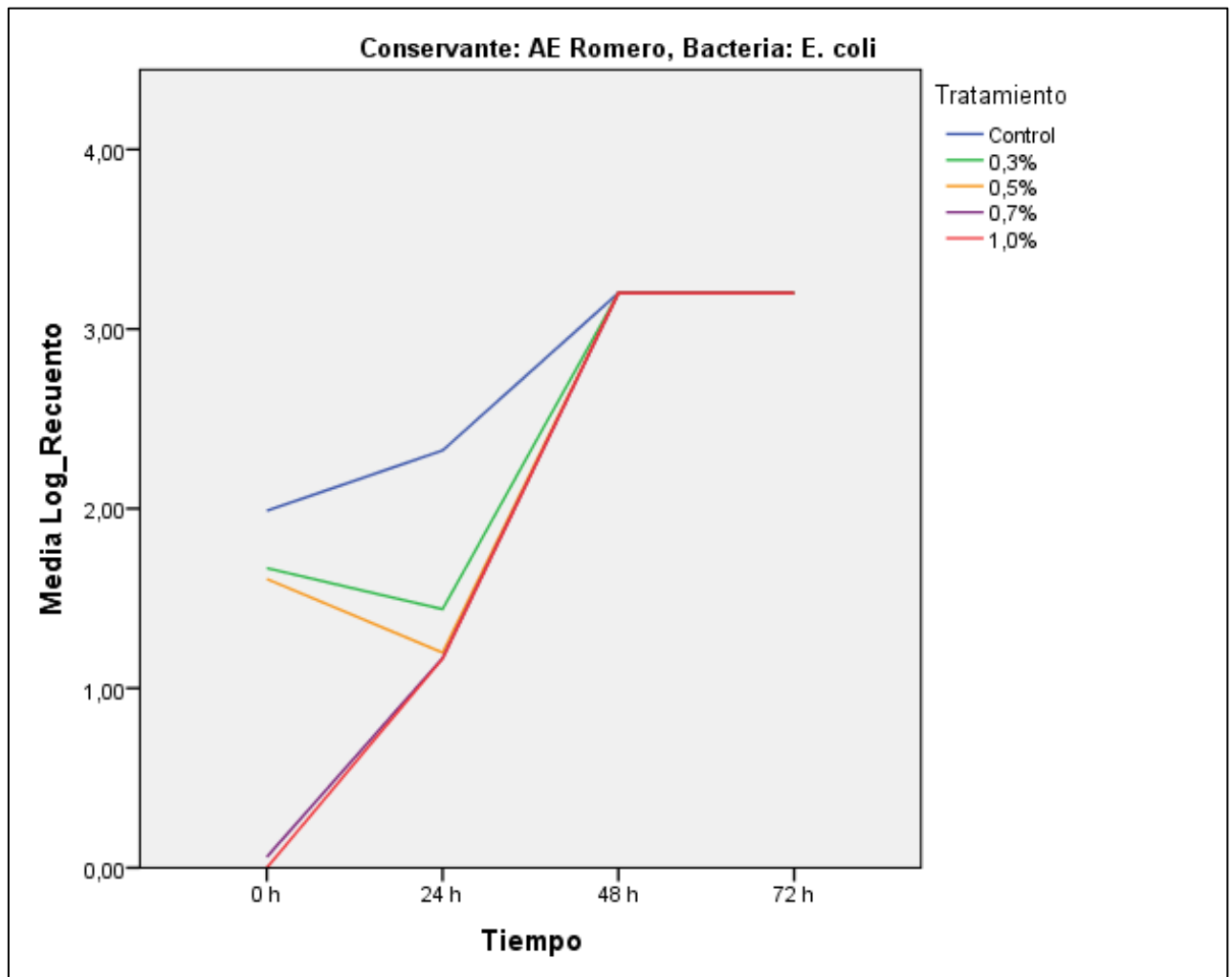
Gráfico N°2: Actividad antibacteriana del aceite esencial de romero (*Origanum vulgare*) a concentraciones de 0.3, 0.5, 0.7 y 1% y un control sobre

- En *Coliformes totales*, se observó durante el recuento de las 0 horas valores menores a 2.9 log UFC/mL (control) en las cuatro concentraciones de aceite esencia de romero. Sin embargo, a partir de las 24 horas todas las concentraciones tienen cargas bacterianas igual o mayor al control que es de 3.2 log UFC/mL (**Ver Gráfico N°3**).



**Gráfico N°3: Actividad antibacteriana del aceite esencial de romero (*Origanum vulgare*) a concentraciones de 0.3, 0.5, 0.7 y 1% y un control sobre Coliformes totales.**

- En *Escherichia coli*, el recuento a 0 horas presenta una carga bacteriana de 0.1 log UFC/mL y 0 log UFC/mL en las concentraciones de 0.7% y 1%, respectivamente. Posteriormente, en los recuentos de 48 y 72 horas la carga bacteriana llega a ser igual o mayor que el control 3.2 log UFC/mL (**Ver Gráfico N°4**).



**Gráfico N°4: Actividad antibacteriana del aceite esencial de romero (*Origanum vulgare*) a concentraciones de 0.3, 0.5, 0.7 y 1% y un control sobre *Escherichia coli*.**

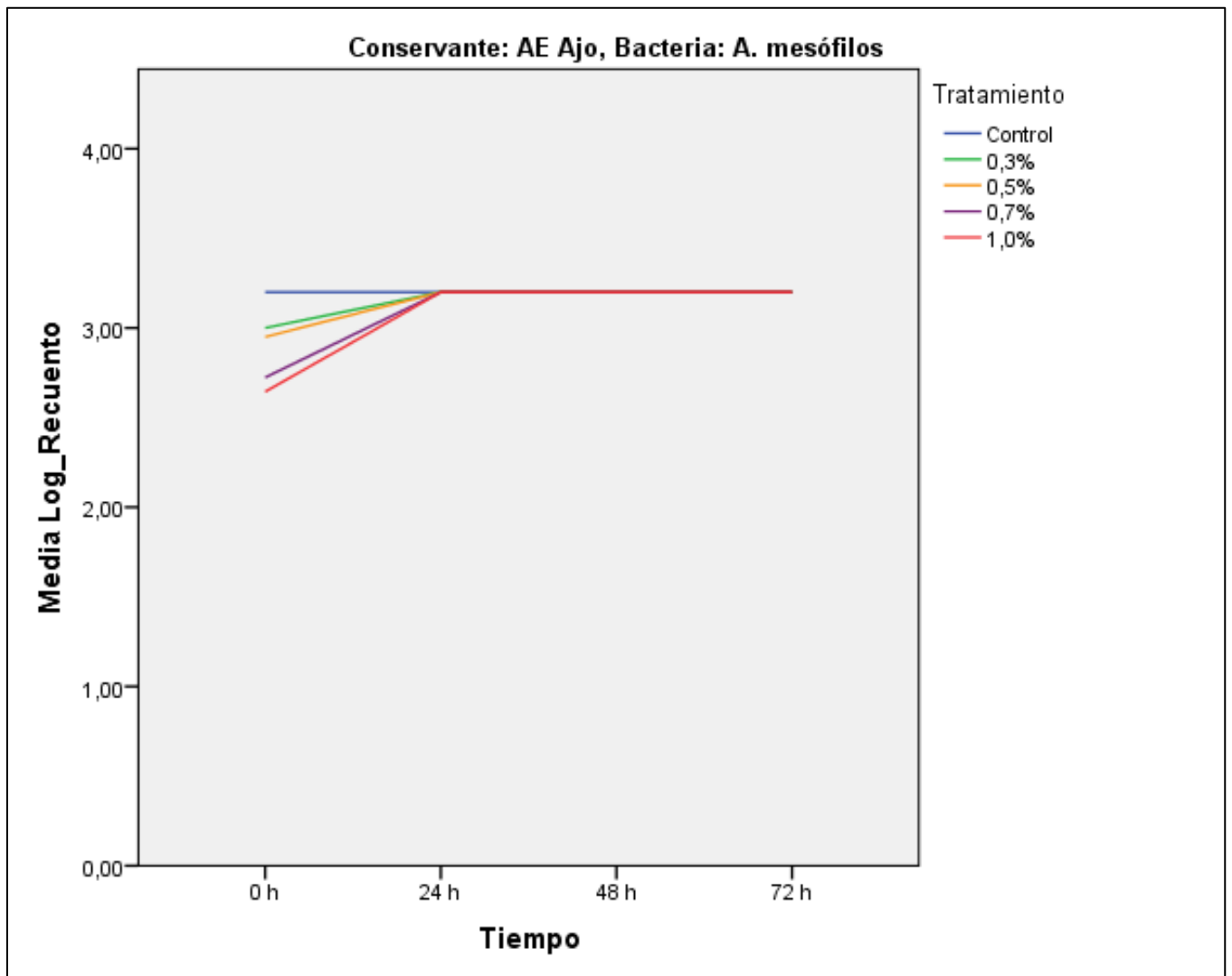
- Según la Tabla 1 y los Gráficos N°1, N°2, N°3 y N°4; el efecto inhibitorio del aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre el crecimiento de Mesófilos aerobios totales, Coliformes totales, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en este estudio ha sido mayor que el de los controles, sin embargo este aceite esencial durante las 72 horas no pudo detener el aumento de la concentración microbiana.

## 5.2 Sobre la actividad antibacteriana del aceite esencial de ajo (*Allium sativum*)

	Aerobios mesófilos				S. aureus			
	0 h	24 h	48 h	72 h	0 h	24 h	48 h	72 h
	PROMEDIO ± DE				PROMEDIO ± DE			
Control	3.2±0.00	3.2±0.00	3.2±0.00	3.2±0.00	1.5±0.10	3±0.02	3.2±0.00	3.2±0.00
0,3%	3±0.03	3.2±0.00	3.2±0.00	3.2±0.00	0±0.00	2±0.10	3.2±0.00	3.2±0.00
0,5%	3±0.02	3.2±0.00	3.2±0.00	3.2±0.00	0.1±0.21	1.9±0.06	3.2±0.00	3.2±0.00
0,7%	2.7±0.09	3.2±0.00	3.2±0.00	3.2±0.00	0.1±0.13	1.7±0.30	2.9±0.08	3.2±0.00
1,0%	2.6±0.10	3.2±0.00	3.2±0.00	3.2±0.00	0±0.00	1.4±0.28	2.9±0.04	3.2±0.00
	Coliformes totales				E. coli			
	0 h	24 h	48 h	72 h	0 h	24 h	48 h	72 h
	PROMEDIO ± DE				PROMEDIO ± DE			
Control	2.8±0.05	3.2±0.00	3.2±0.00	3.2±0.00	2.1±0.04	2.4±0.04	3.2±0.00	3.2±0.00
0,3%	2.5±0.03	3.2±0.00	3.2±0.00	3.2±0.00	1.7±0.08	1.3±0.16	3.2±0.00	3.2±0.00
0,5%	2.4±0.04	3.2±0.00	3.2±0.00	3.2±0.00	1.6±0.08	1.3±0.11	3.2±0.00	3.2±0.00
0,7%	2.2±0.04	3.2±0.00	3.2±0.00	3.2±0.00	1.5±0.12	1.2±0.09	3.2±0.00	3.2±0.00
1,0%	2.2±0.17	2.7±0.02	3.2±0.00	3.2±0.00	1.4±0.09	1.2±0.07	3.2±0.00	3.2±0.00

Tabla N°2: Datos estadísticos descriptivos asociados a la actividad bacteriana del aceite esencial de ajo (*Allium sativum*) sobre la concentración microbiana (en UFC/mL de Mesófilos aerobios totales, *Staphylococcus aureus*, Coliformes totales y *Escherichia coli* a concentraciones de 0,3; 0,5; 0,7 y 1% y un control.

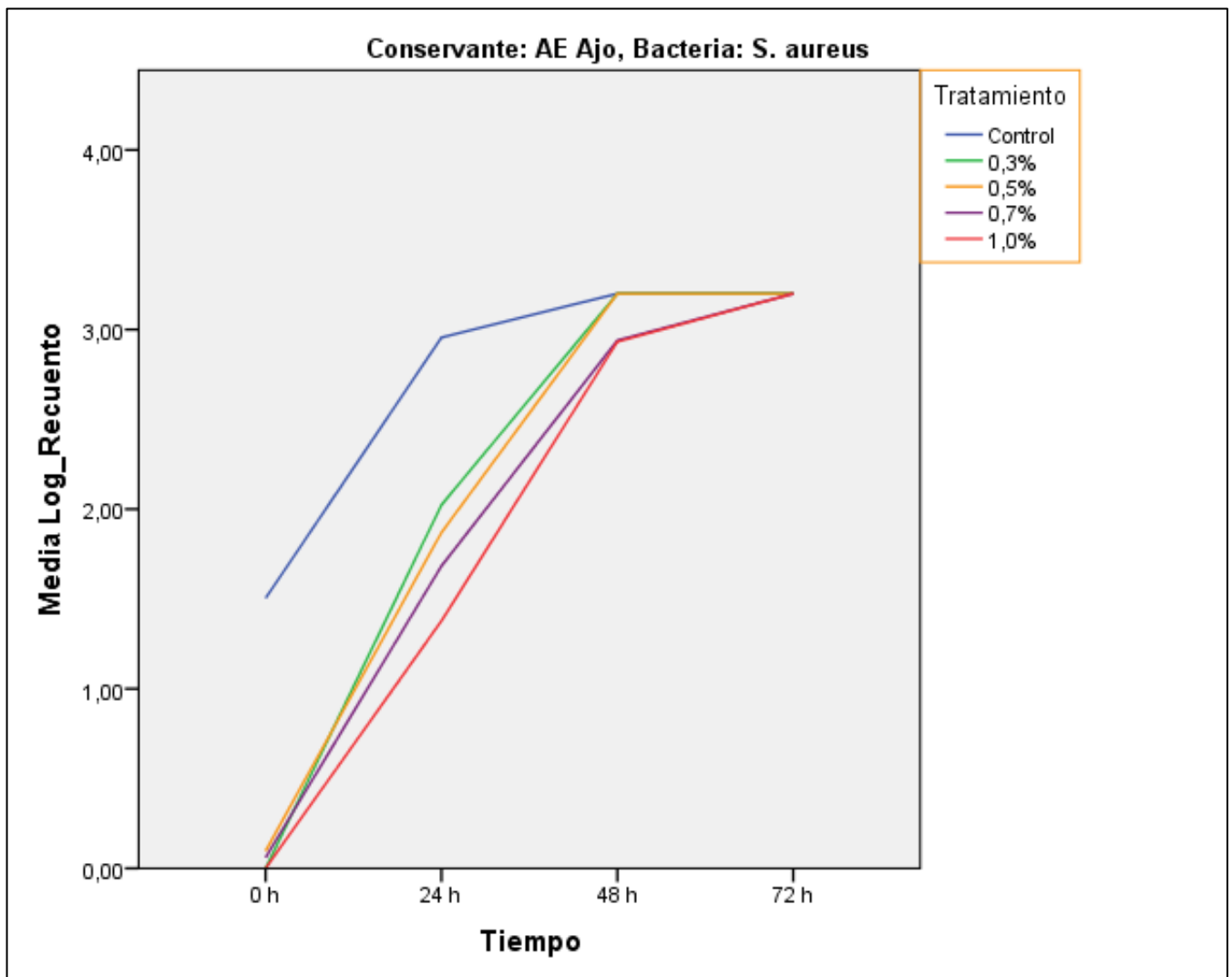
- En Mesófilos aerobios totales, se observó que las cuatro concentraciones tienen una carga bacteriana igual o mayor al control de 3.2 log UFC/mL en todos los recuentos. Excepto en la concentración de 0.7% y 1% a las 0 Horas, donde se obtuvo una carga bacteriana de 2.7 y 2.6 log UFC/mL (**Ver Gráfico N°5**).



**Gráfico N°5: Actividad antibacteriana del aceite esencial de ajo (*Allium sativum*) a concentraciones de 0.3, 0.5, 0.7 y 1% y un control sobre Mesófilos aerobios totales.**

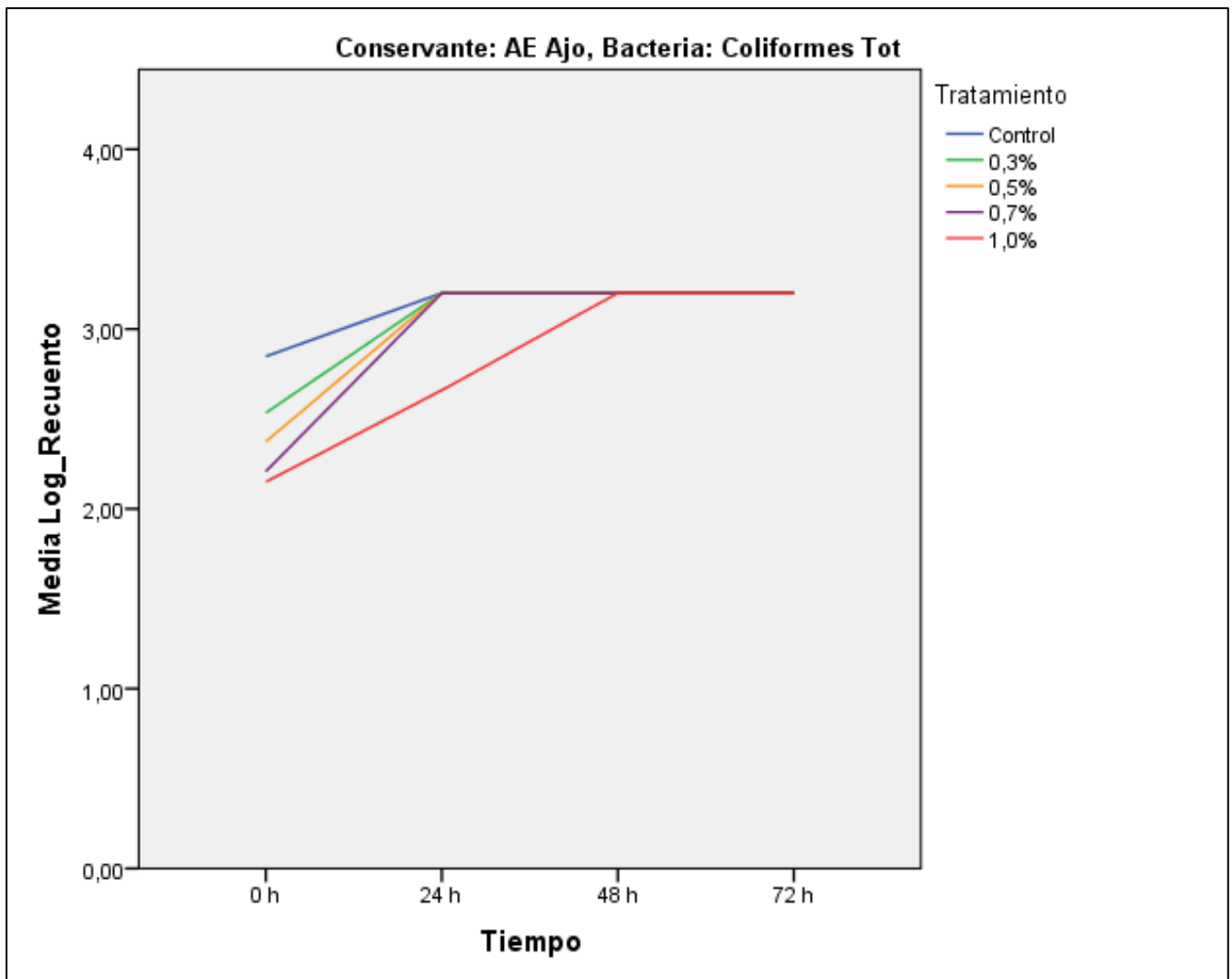


- En *Staphylococcus aureus*, se observó que en el recuento a la 0 horas la carga microbiana fue de 0.1 log UFC/mL en las concentraciones de 0.5% y 0.7% y 0 log UFC/mL en las concentraciones de 0.3% y 1%. Posteriormente, la carga microbiana crece a las 24 horas y 48 horas significativamente en todas las concentraciones. Sin embargo, a las 72 horas la carga microbiana es igual o mayor que el control 3.2 log UFC/mL. **(Ver Gráfico N°6).**



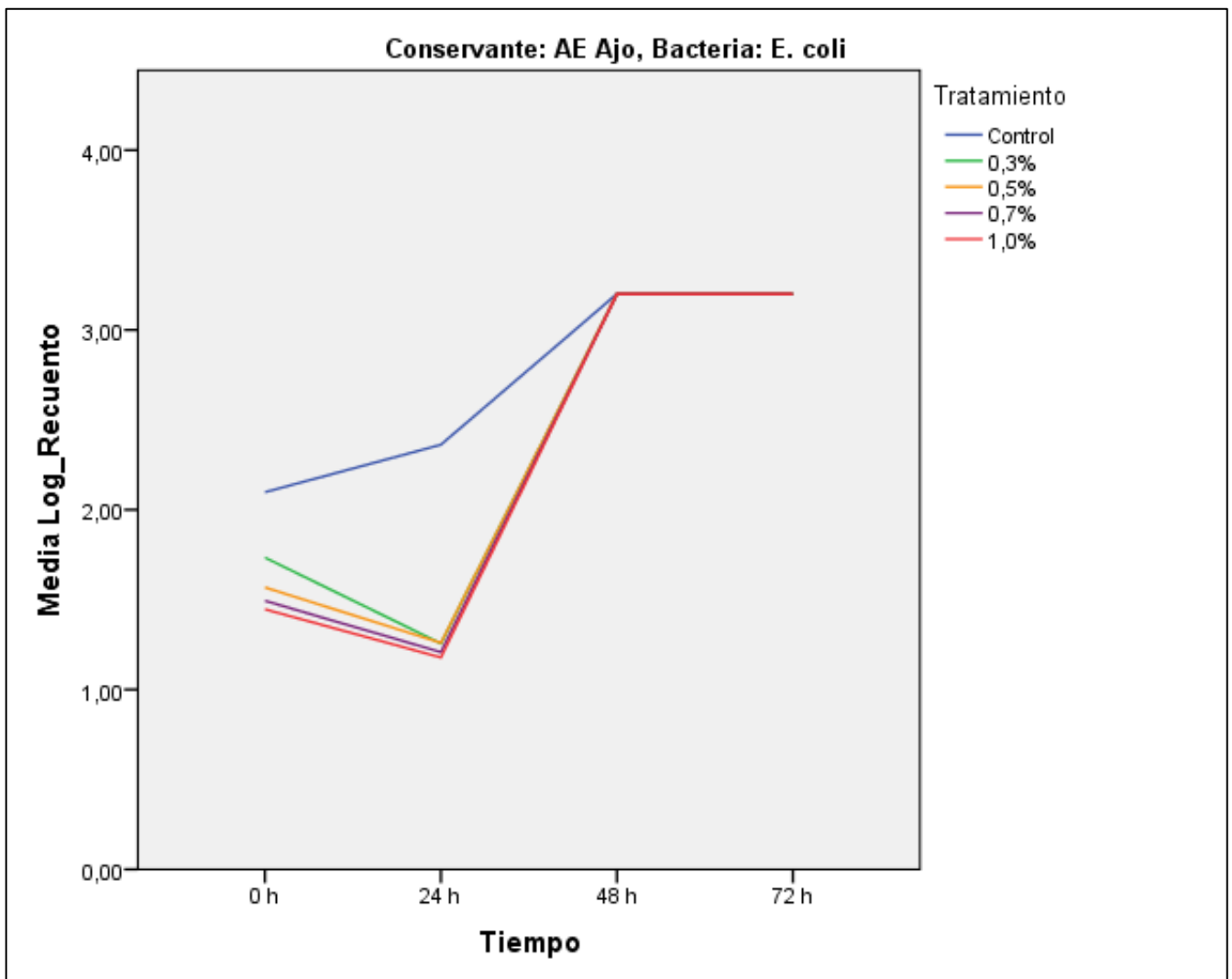
**Gráfico N°6: Actividad antibacteriana del aceite esencial de ajo (*Allium sativum*) a concentraciones de 0.3, 0.5, 0.7 y 1% y un control sobre *Staphylococcus aureus***

- En Coliformes totales, se observó durante el recuento a la 0 horas valores menores a 2.8 log UFC/mL (control) en las cuatro concentraciones de aceite esencia de romero. Sin embargo, a partir de las 24 horas en adelante, todas las concentraciones tienen valores igual o mayor al control que es de 3.2 log UFC/mL, excepto la concentración de 1 % a las 24 horas que presenta una carga bacteriana de 2.7 log UFC/mL (**Ver Gráfico N°7**).



**Gráfico N°7: Actividad antibacteriana del aceite esencial de ajo (*Allium sativum*) a concentraciones de 0.3, 0.5, 0.7 y 1% y un control sobre *Coliformes totales*.**

- En *Escherichia coli*, se observó durante el recuento a 0 horas y 24 horas cargas microbianas menores a 2.1 log UFC/mL y 2.4 log UFC/ml respectivamente, en todas las concentraciones de aceite esencial de ajo. Posteriormente, en los recuentos de 48 y 72 horas la carga bacteriana llega a ser igual o mayor que el control 3.2 log UFC/mL (**Ver Gráfico N°8**).



**Gráfico N°8: Actividad antibacteriana del aceite esencial de ajo (*Allium sativum*) a concentraciones de 0.3, 0.5, 0.7 y 1% y un control sobre *Esherishia coli*.**

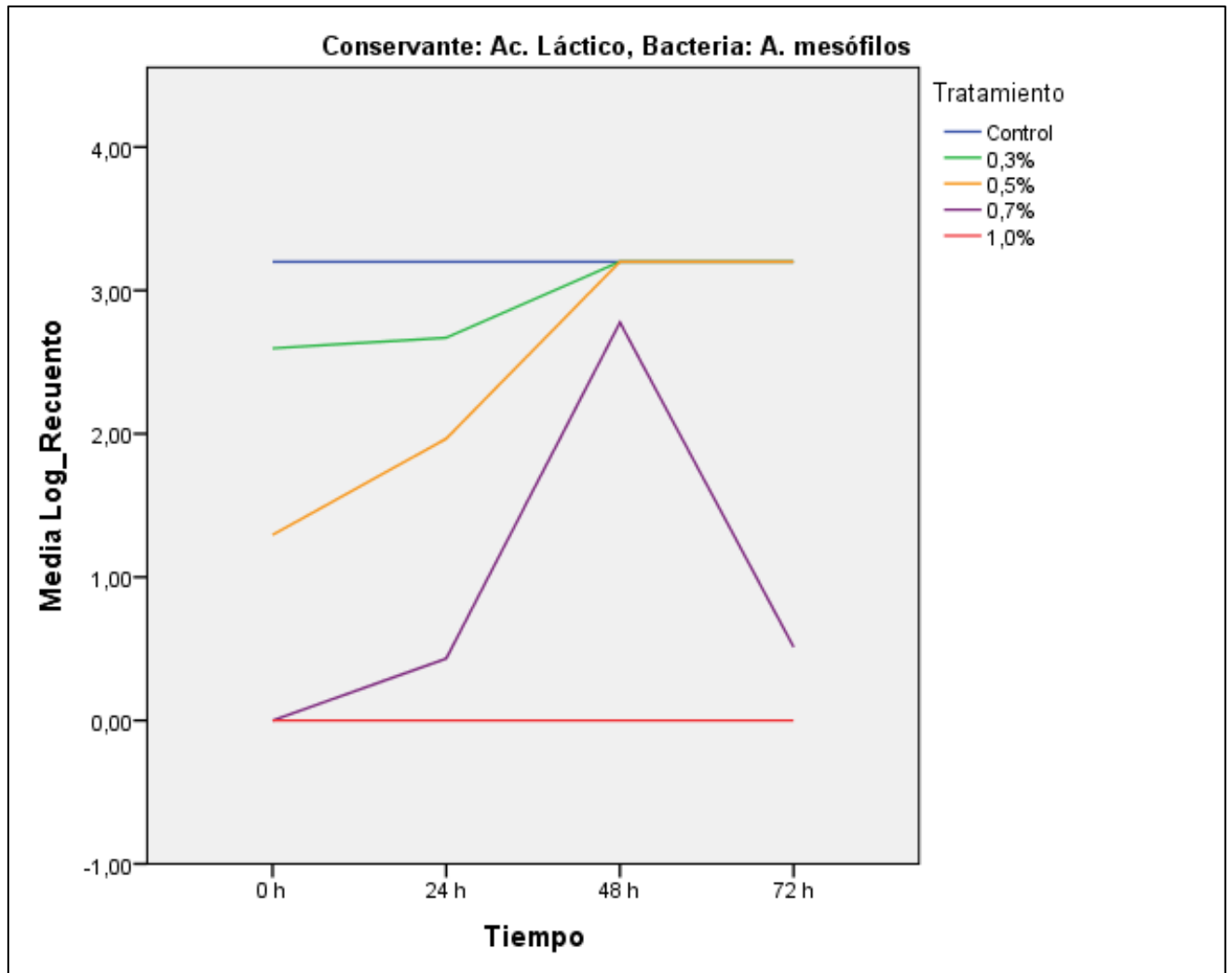
- Según la Tabla 2 y los Gráficos N°5, N°6, N°7 y N°8; el efecto inhibitorio del aceite esencial de ajo (*Allium sativum*) sobre el crecimiento de Mesófilos aerobios totales, Coliformes totales, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en este estudio ha sido mayor que el de los controles, sin embargo este aceite esencial durante las 72 horas no pudo detener el aumento de la concentración microbiana.

### 5.3 Sobre la actividad antibacteriana del ácido láctico.

	Aerobios mesófilos				S. aureus			
	0 h	24 h	48 h	72 h	0 h	24 h	48 h	72 h
	PROMEDIO ± DE				PROMEDIO ± DE			
<b>Control</b>	3.2±0.00	3.2±0.00	3.2±0.00	3.2±0.00	1.5±0.12	3±0.01	3.2±0.00	3.2±0.00
<b>0,3%</b>	2.6±0.13	2.7±0.08	3.2±0.00	3.2±0.00	0±0.00	0.1±0.16	3.1±0.04	3.2±0.00
<b>0,5%</b>	1.3±0.20	2±0.09	3.2±0.00	3.2±0.00	0±0.00	0.6±0.40	2.5±0.24	2.7±0.07
<b>0,7%</b>	0±0.00	0.4±0.30	2.8±0.10	0.5±0.39	0±0.00	0±0.00	1.4±0.23	2.3±0.05
<b>1,0%</b>	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00
	Coliformes totales				E. coli			
	0 h	24 h	48 h	72 h	0 h	24 h	48 h	72 h
	PROMEDIO ± DE				PROMEDIO ± DE			
<b>Control</b>	2.9±0.03	3.2±0.00	3.2±0.00	3.2±0.00	2.1±0.10	2.4±0.04	3.2±0.00	3.2±0.00
<b>0,3%</b>	1±0.14	2.7±0.02	3.2±0.00	3.2±0.00	0±0.00	0±0.00	0.1±0.13	1.2±0.09
<b>0,5%</b>	0.7±0.13	2.7±0.04	3.2±0.00	3.2±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0.1±0.13
<b>0,7%</b>	0.4±0.25	1.3±0.07	3.2±0.00	3.2±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00
<b>1,0%</b>	0.1±0.21	0.1±0.21	0.3±0.38	0.3±0.29	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00

**Tabla N°3: Datos estadísticos descriptivos asociados a la actividad bacteriana del ácido láctico sobre la concentración microbiana (en UFC/mL) Mesófilos aerobios totales, *Staphylococcus aureus*, coliformes totales y *Escherichia coli* a concentraciones de 0,3; 0,5; 0,7 y 1% y un control.**

- En Mesófilos aerobios totales, se observó que el ácido láctico en concentración de 0,3% y 0,5% no redujo la carga bacteriana, pero que a concentraciones de 0,7% creció las primeras 48 h y luego se redujo a las 72 h, mientras que al 1% la dosis fue letal durante las 72 h (**Ver Gráfico N°9**).



**Gráfico N°9: Actividad antibacteriana individual del ácido láctico a concentraciones de 0.3, 0.5, 0.7 y 1% y un control sobre Mesófilos aerobios totales.**

- En *Staphylococcus aureus*, se observó que en el recuento de 0 horas el ácido láctico inhibió el crecimiento de la carga bacteriana en todas las concentraciones. Posteriormente, en los siguientes recuentos bacterianos se observó que en las concentración de 0,3%, 0,5% y 0,7% no redujo la carga bacteriana, más bien esta fue aumentando durante las 72 h, sin embargo a concentraciones del 1% el ácido láctico tuvo una acción bactericida durante las 72 h (Ver Gráfico N°10).

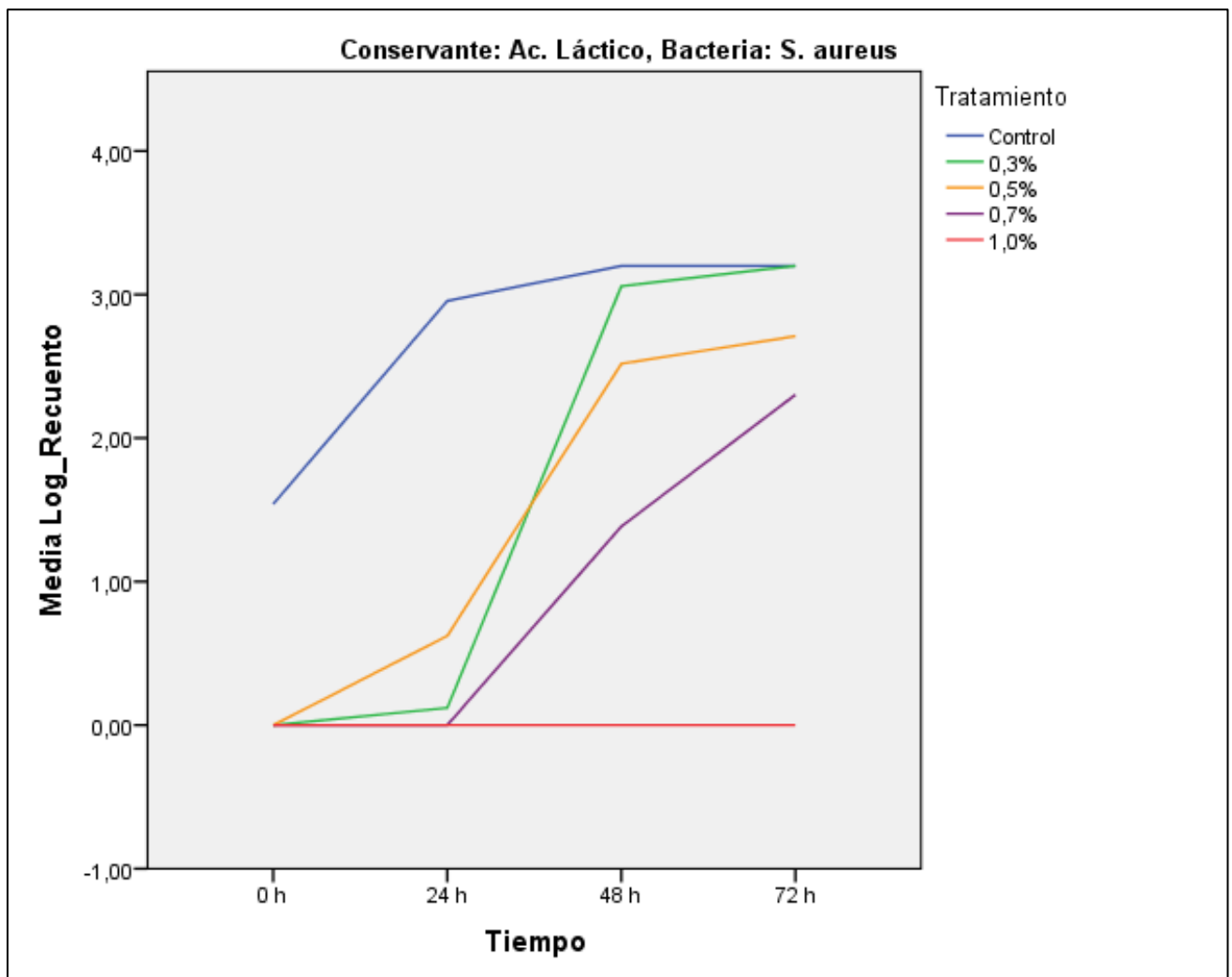
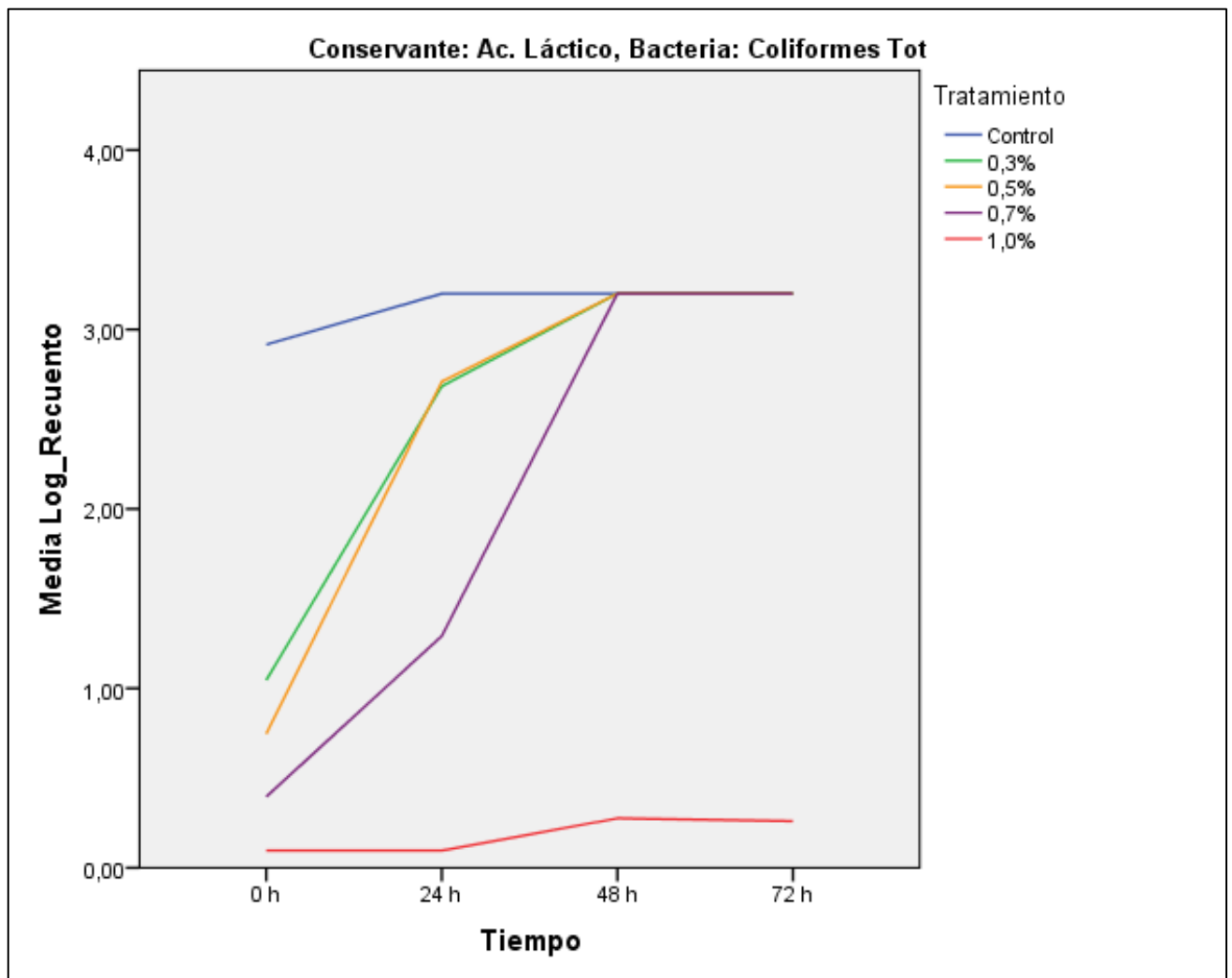


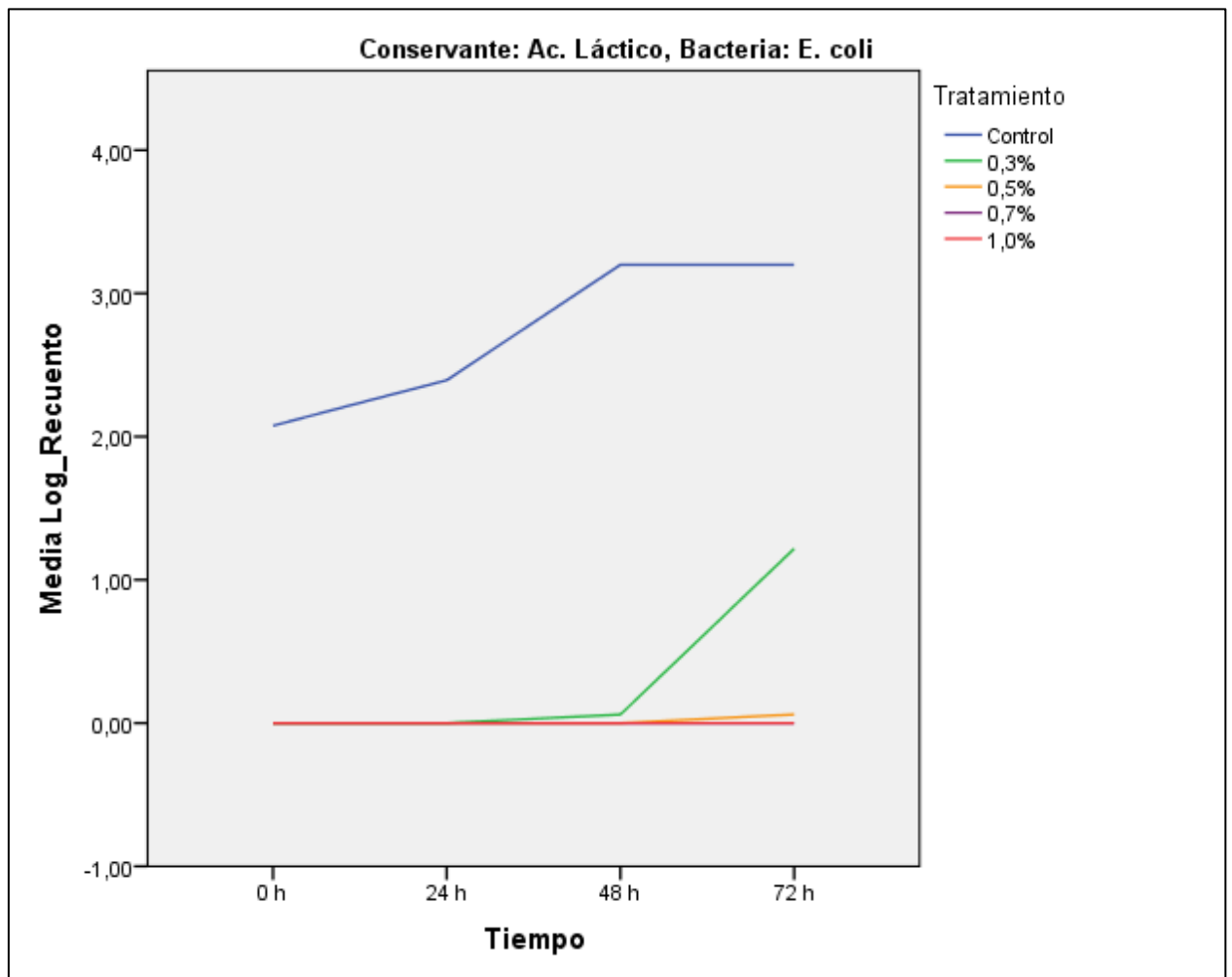
Gráfico N°10: Actividad antibacteriana individual del ácido láctico a concentraciones de 0.3, 0.5, 0.7 y 1% y un control sobre *Staphylococcus aureus*.

- En *Coliformes totales*, se observó que el ácido láctico en concentración de 0,3%, 0,5% y 0,7% el aceite no redujo la carga bacteriana, más bien esta fue aumentando durante las 72 h, pero que con una concentración del 1% el ácido láctico tuvo una acción bactericida durante las 72 h (**Ver Gráfico N°11**).



**Gráfico N°11: Actividad antibacteriana individual del ácido láctico a concentraciones de 0.3, 0.5, 0.7 y 1% y un control sobre *Coliformes totales*.**

- En *Escherichia coli*, se observó que el ácido láctico en concentración de 0,3% inhibió el crecimiento de la carga bacteria hasta las 48 horas, a las 72 horas el valor de la carga bacteriana es de 1.2 log UFC/mL. Sin embargo, el ácido láctico con una dosis del 0.5%, 0.7% y 1% el ácido láctico tuvo una acción bactericida durante las 72 h (Ver Gráfico N°12).



**Gráfico N°12: Actividad antibacteriana individual del ácido láctico a concentraciones de 0.3, 0.5, 0.7 y 1% y un control sobre *Escherichia coli*.**

- Según la Tabla 3 y los Gráficos N°9, N°10, N°11 y N°12; el efecto inhibitorio del ácido láctico sobre el crecimiento de Mesófilos aerobios totales, *Staphylococcus aureus*, coliformes totales y *Escherichia coli* en estudio ha sido mayor que el del control, y con



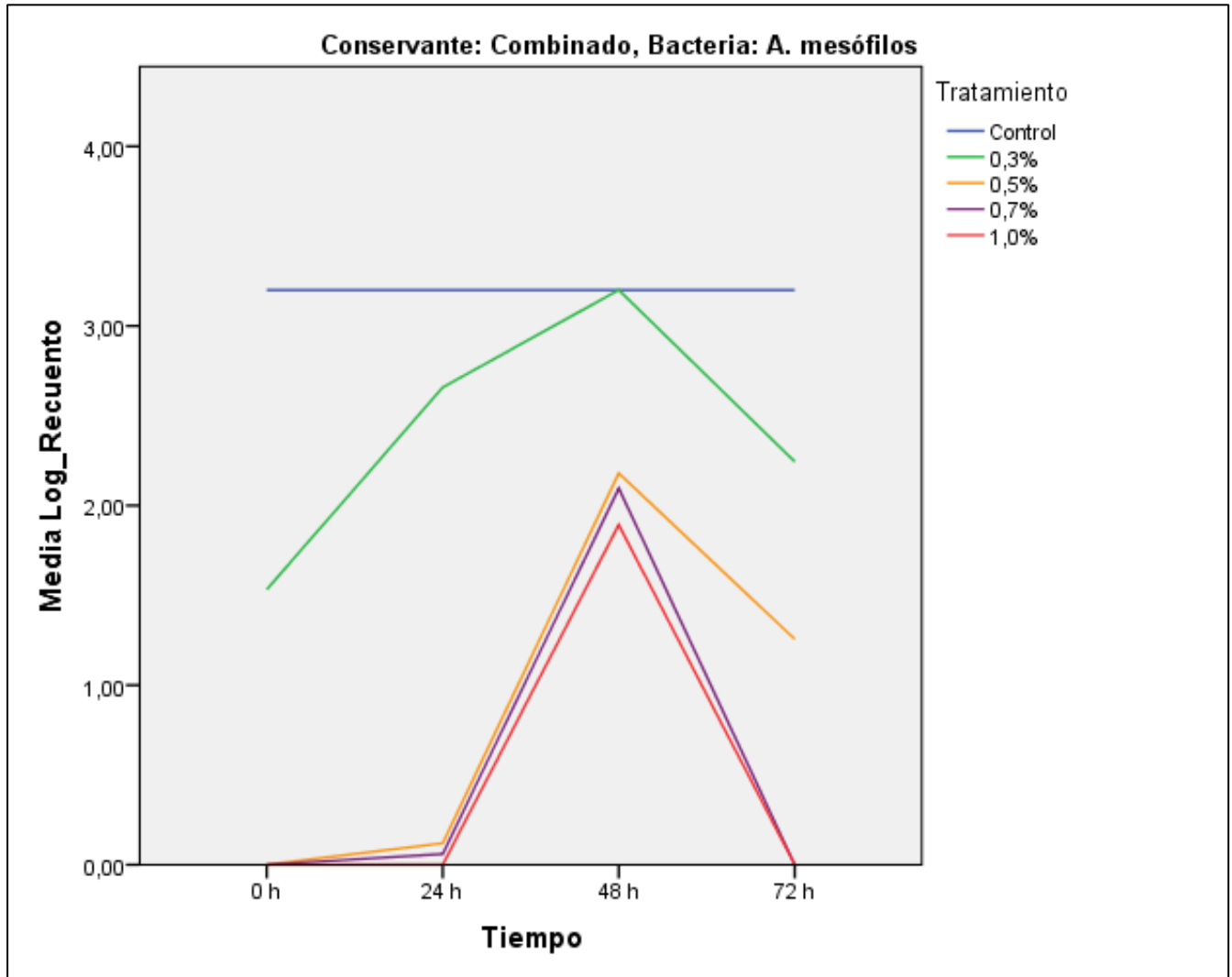
un dosis del 1% el aceite láctico ha tuvo un actividad bactericida, no presentándose crecimiento bacteriano durante las 72 horas.

#### 5.4 Sobre la actividad antibacteriana del combinado de los aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis L.*) y de ajo (*Allium sativum*) y ácido láctico.

	Aerobios mesófilos				S. aureus			
	0 h	24 h	48 h	72 h	0 h	24 h	48 h	72 h
	PROMEDIO ± DE				PROMEDIO ± DE			
Control	3.2±0.00	3.2±0.00	3.2±0.00	3.2±0.00	1.6±0.13	3±0.02	3.2±0.00	3.2±0.00
0,3%	1.5±0.15	2.7±0.05	3.2±0.00	2.2±0.04	0±0.00	0.3±0.20	2.2±0.04	2.3±0.03
0,5%	0±0.00	0.1±0.16	2.2±0.06	1.3±0.12	0±0.00	0.4±0.38	0.5±0.36	1.6±0.08
0,7%	0±0.00	0.1±0.13	2.1±0.03	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0.7±0.13
1,0%	0±0.00	0±0.00	1.9±0.42	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00
	Coliformes totales				E. coli			
	0 h	24 h	48 h	72 h	0 h	24 h	48 h	72 h
	PROMEDIO ± DE				PROMEDIO ± DE			
Control	2.9±0.04	3.2±0.00	3.2±0.00	3.2±0.00	2.1±0.02	2.4±0.03	3.2±0.00	3.2±0.00
0,3%	0.7±0.16	1.8±0.05	3.2±0.00	3.2±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	1.1±0.12
0,5%	0.3±0.41	0.1±0.13	1.3±0.20	1.6±0.18	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00
0,7%	0±0.00	0.3±0.35	1.1±0.14	1.3±0.13	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00
1,0%	0±0.00	0.3±0.36	0.2±0.25	0.2±0.22	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00

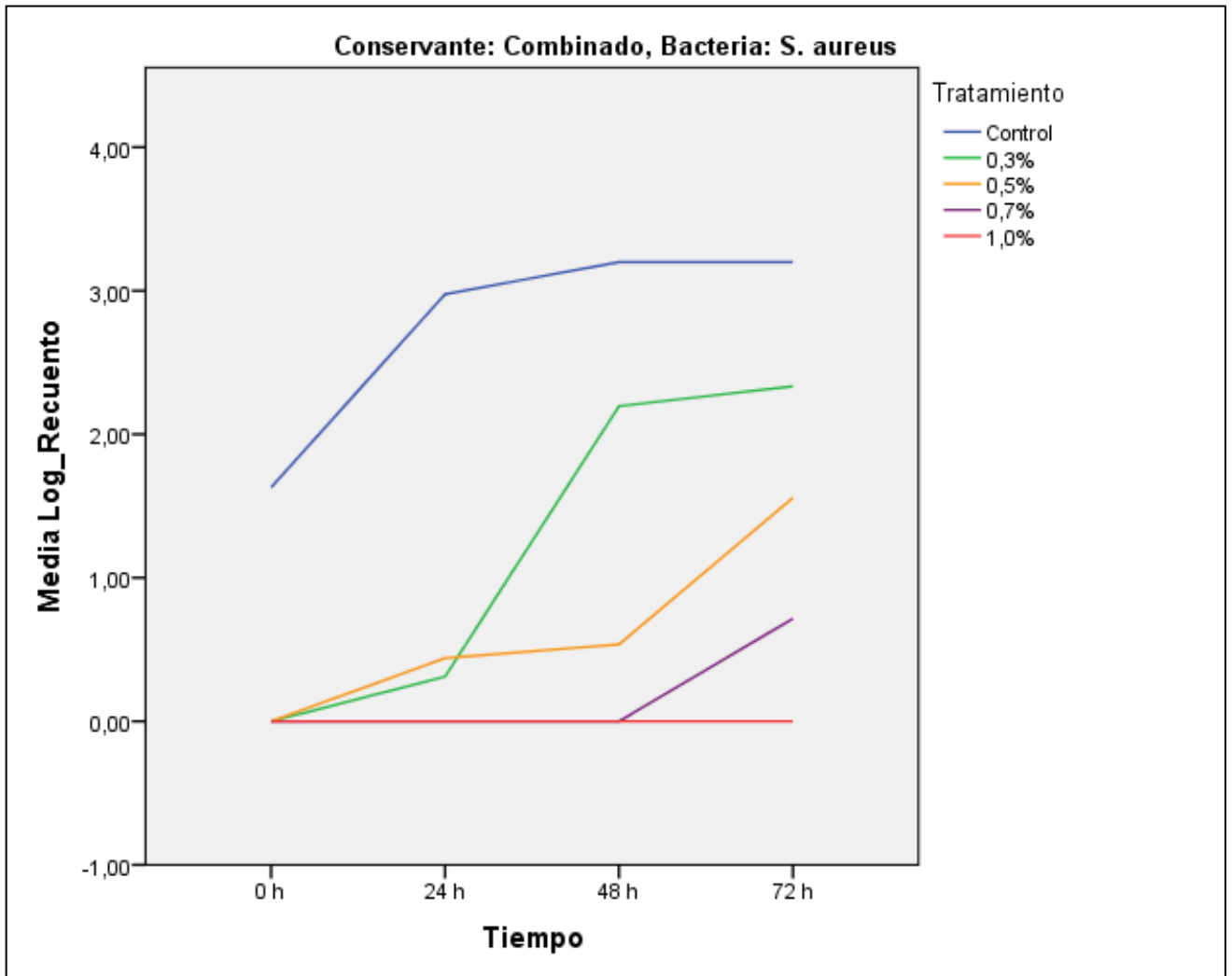
Tabla N°4: Datos estadísticos descriptivos asociados a la actividad bacteriana del combinado de los aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis L.*) y de ajo (*Allium sativum*) y ácido láctico sobre la concentración microbiana (en UFC/mL) de Mesofilos aerobios totales, *Staphylococcus aureus*, Coliformes totales y *Escherichia coli* a concentraciones de 0,3; 0,5; 0,7 y 1% y un control.

- En Mesófilos aerobios totales, se observó que las placas de 0,3% no redujo la carga bacteriana, en cambio con las otras concentraciones creció las primeras 48 h y luego se redujo a las 72 h y luego se redujo a las 72 h (Ver Gráfico N°13).



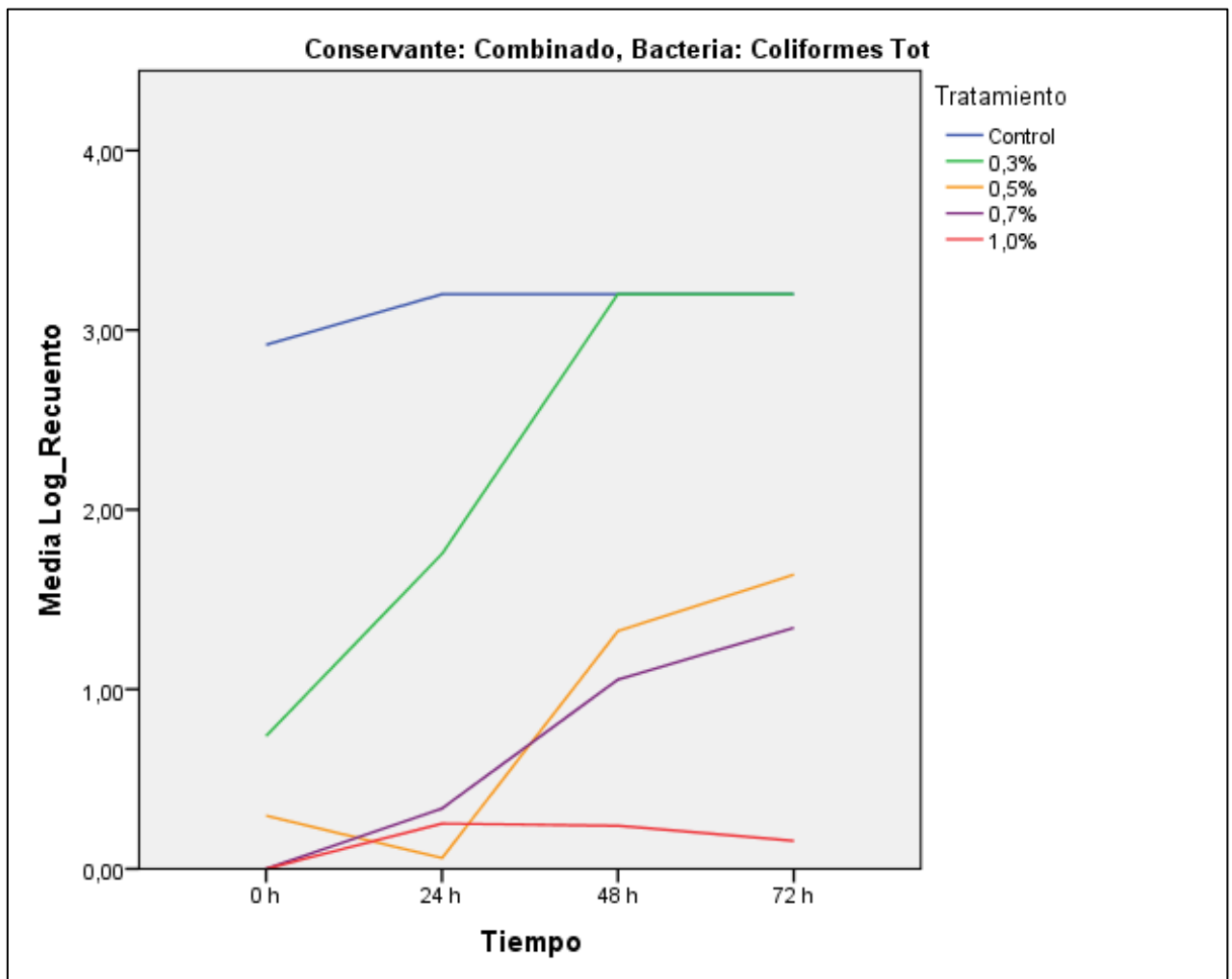
**Gráfico 13: Actividad antibacteriana del combinado de los aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis L.*) y de ajo (*Allium sativum*) y ácido láctico a concentraciones de 0.3, 0.5, 0.7 y 1% y un control sobre mesófilos aerobios.**

- En *Staphylococcus aureus*, se observó que el tratamiento combinado de aceites y ácido láctico en concentraciones de 0,3%, 0,5% y 0,7% no redujo la carga bacteriana, más bien esta fue aumentando llegando a valores picos de 2.3 log UFC/ml; 1.6 UFC/ml y 0.7 UFC/ml, respectivamente durante las 72 h, pero en dosis del 1% el tratamiento combinado fue letal durante las 72 h (Ver Gráfico N°14).



**Gráfico 14: Actividad antibacteriana del combinado de los aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis L.*) y de ajo (*Allium sativum*) y ácido láctico a concentraciones de 0.3, 0.5, 0.7 y 1% y un control sobre *Staphylococcus aureus*.**

- En Coliformes totales, se observó que los tratamientos combinados de aceites y ácido láctico en concentraciones de 0,3%, 0,5% y 0,7% tuvo una acción bacterioestatica, no redujo la carga bacteriana, más bien esta fue aumentando durante las 72 h, llegando a valores picos de 3.2 log UFC/mL; 1.6 UFC/mL y 1.3 UFC/mL respectivamente, pero que con una dosis del 1% del tratamiento combinado tuvo una acción bactericida durante las 72 h (Ver Gráfico N°15).



**Gráfico 15: Actividad antibacteriana del combinado de los aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) y de ajo (*Allium sativum*) y ácido láctico a concentraciones de 0.3, 0.5, 0.7 y 1% y un control sobre *Coliformes totales*.**

- En *Escherichia coli*, se observó que el tratamiento combinado de aceites y ácido láctico en concentración de 0,3%, no redujo la carga bacteriana, más bien esta fue aumentando durante las 72 h, llegando a valores picos de 1.1 log UFC/mL pero que con las dosis de 0.5%,0.7% y 1% el tratamiento combinado tuvo una acción bactericida durante las 72 h (Ver N° Gráfico16).

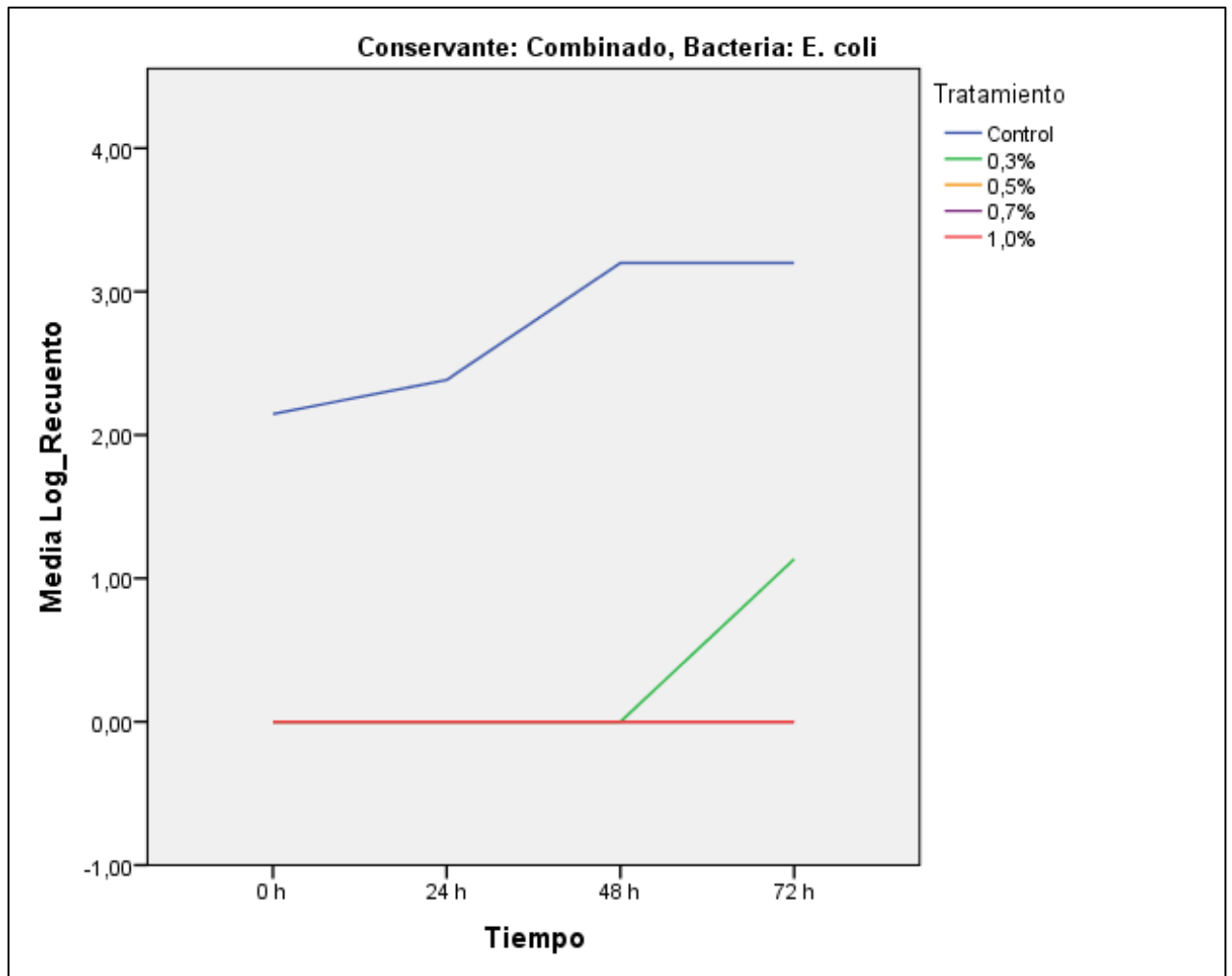


Gráfico 16: Actividad antibacteriana del combinado de los aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis L.*) y de ajo (*Allium sativum*) y ácido láctico a concentraciones de 0.3, 0.5, 0.7 y 1% y un control sobre *Escherichia coli*.

- Según la Tabla N°4 y el Gráficos N°4, el efecto antibacteriano del tratamiento combinado de aceites esenciales de romero y de ajo y ácido láctico de sobre el crecimiento de Mesofilos aerobios totales, Coliformes totales, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en estudio ha sido mayor que el del control, y con un dosis del 1% el combinado ha sido letal durante las 72 horas.

## VI. DISCUSION

El estudio mostro que el aceite esenciales de Romero (*Rosmarinus officinalis*) no presenta actividad antibacteriana frente a *Mesofilos aerobios*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Coliformes* totales; en las concentraciones evaluadas. Esto podría apoyarse en estudios previos, donde se cuestiona la eficacia de los extractos de romero sobre patógenos de alimentos, así, mientras algunos investigadores opinan que los extractos de romero poseen una baja actividad frente a bacterias como *E. coli*, *S. aureus* o *M. cattarhalis* (Celiktas et al., 2007; Rasheed y Thajuddin, 2011), otro grupo de autores atribuyen la actividad antioxidante y antimicrobiana a la actividad sinérgica entre los componentes del aceite esencial (Wu et al., 2011). Otros afirman que elevadas concentraciones de los componentes principales purificados son más activos que las mezcla de componentes presentes en el aceite (Bernardes et al. 2010 (a); Klančnik et al., 2010).

Cineol, alcanfor y verbenona son los principales componentes fenólicos mayoritarios del aceite esencial de romero. Zaouali et al., (2010) describieron la existencia de variaciones en la actividad antibacteriana de romero procedente de Tunez (*R. officinalis* var. *typicus* y var *Troglodytorum*) que dependen de la variación cuantitativa de los componentes de aceite esencial, es por ello que algunos autores han correlacionado determinados quimiotipos de aceites esencial de romero y su baja actividad antibacteriana. Los factores principales influyentes asociados a esta variación en la actividad se atribuyen principalmente al lugar de origen (Jamshidi et al., 2009), fecha de siega (Celiktas et al., 2007), estado fenológico de la planta (Singh y Guleria et al., 2013) método de extracción (Okoh et al., 2010; Ivanovic et al., 2012; Rogriguez – Rojo et al., 2012; Visentin et al., 2012) y fase de desarrollo de la planta (Zaouali et al., 2013).

Por otro lado, se mostró que el aceite esenciales de Ajo (*Allium sativum*) tampoco presenta actividad antibacteriana frente a *Mesofilos aerobios*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Coliformes* totales; en las

concentraciones evaluadas. La baja actividad antibacteriana del ajo se puede apoyar por el trabajo de Benkeblia *et al.*, (2004) donde mostro algunas bacterias como el *S. aureus* son menos sensibles a la actividad inhibidora del aceite esencial de cebolla y ajo. Sin embargo, otras son más sensibles como *S. enteritidis* en las mismas concentraciones evaluadas (Benkeblia *et al.*, 2004). Así mismo, Kyung Kim, Park y Kim (2002) reportaron que la alicina de extracto de ajo mostro una fuerte actividad antibacteriana contra *S. aureus* en 1.5% de concentración. Según estos autores, la alta actividad antibacteriana se debe al calentamiento del extracto de ajo a 121°C durante 40 min.

Los Alliums contienen sulfoxidos y numerosos compuestos fenólicos de gran interés (Rivlin, 2001; Griffiths, Trueman, Crowther, Thomas y Smith, 2002). Siendo los componente mayoritarios la alicina, alipropil disulfito y citral. La alicina ha sido reportada por presentar una fuerte actividad antibacteriana contra una gran variedad de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (Whitemore y Naidu, 2000). Han, Lawson, Han y Han (1995) informaron que la actividad antibiótica de 1mg de alicina ((+) -S-metil-L-cisteina sulfoxido) equivale a 15 ul de penicilina. Por lo tanto, la eficacia de la actividad antibacteriana del aceite esencial de ajo (al igual que el romero) está relacionada con los quimiotipos dominantes del ajo utilizado (Benkeblia *et al.*, 2004).

Es conocido el uso de ácido láctico en la industria alimentaria como uno de los conservantes más usados Lopez, L., et al 2002. Por lo que se evaluó su acción antibacteriana frente a *Mesofilos aerobios*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Coliformes* totales; esto nos permitió comparar la eficacia de los aceites esenciales de romero y ajo; y como estas pueden ser potenciadas con la adición del ácido láctico. Por lo que se evidencio que el ácido láctico a concentración del 1% presenta actividad antibacteriana frente a *Mesofilos aerobios*, *S. aureus* y *E. coli*. Sin embargo, a la misma concentración solo presenta acción bacteriostática frente a *Coliformes* totales. La actividad antibacteriana a concentración 1% es apoyada por el estudio de Ozdemir, H., et al 2006, reportaron que el ácido láctico a 1 y al 2% fue efectivo para la



reducción de *L. monocytogenes* y *Salmonella typhimurium* en carne contaminada. Mientras, que escasa sensibilidad de los *Coliformes totales* frente al ácido láctico como antibacteriano coincide con los resultados obtenidos en el estudio realizado por Lopez, L., *et al* 2002, quienes evaluaron la eficacia germinicida (%) *in vitro* del extracto de toronja (400 ppm) el ácido peracético (2000 ppm) y el ácido láctico (20000 ppm) a los tiempos recomendados por el fabricante y otros tiempos adicionales frente a microorganismos de prueba, como *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. auruginosa*. Siendo los microorganismos Gram positivos los que presentaron una mayor sensibilidad a la acción del ácido láctico.

El presente estudio mostro que los aceites esenciales de romero y ajo combinados con el ácido láctico, lograron potenciar la acción antibacteriana frente a las bacterias seleccionadas en el presente estudio. Se evidencio que la combinación de ambos aceites esenciales con el ácido láctico fue letal para *Mesofilos aerobios totales*, *S. aureus* y *E. coli* a concentraciones de 0.7%, sin embargo, no tuvo el mismo poder antibacteriano frente a *Coliformes totales*. Algunos autores indican que la baja actividad de los aceites esenciales se puede potenciar con el uso de diferentes compuestos, otros extractos u otros antioxidantes de origen sintético (*Romano et al.*, 2009; *Weerakkody et al.*, 2010). Burt (2004) también sugiere que la combinación de componentes principales de los aceites esenciales presenta una mayor actividad, ya que pueden tener un efecto aditivo o sinérgico.

El presente estudio también mostró que la combinación de los aceites esenciales y el ácido láctico a concentraciones de 0.7 y 1% tienen una acción antibacteriana frente *Mesofilos aerobios totales*, *S. aureus* y *E. coli*. Sin embargo, presentan variaciones en las características organolépticas respecto al color, olor y sabor. A concentraciones de 0.7% las propiedades organolépticas de la carcasa de cuy eran aceptables manteniendo el color, olor y textura; mientras que concentraciones de 1% las propiedades organolépticas eran inaceptables, pues hubo variación en la textura, olor y color de la carcasa de cuy. Finalmente, a concentraciones 0.5% tampoco se evidencio cambios en

las propiedades organolépticas, sin embargo esta concentración no posee acción bactericida. Estudios anteriores son consistentes con los hallazgos actuales; también han demostrado que las altas concentraciones de aceites esenciales logran una acción antibacteriana contra patógenos transmitidos por los alimentos, pero que no pueden ser aplicables a los alimentos debido a las propiedades organolépticas adversas (Burt, 2004; holley y Patel, 2005). Las propiedades organolépticas en los otros tratamientos y/o concentraciones no fueron evaluados, ya que los resultados mostraron que no poseían una actividad antibacteriana contra Mesofilos aerobios totales, *S. aureus*, *E. coli* y *Coliformes totales*.

## VII. CONCLUSIONES

- Se determinó que el tratamiento individual con aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* "romero" y *Allium sativa* "ajo" no tienen actividad bactericida frente a Mesofilos aerobios totales, *S. aureus*, *E. coli* y Coliformes totales presentes en la carcasa de cuy. Además, se determinó que el tratamiento individual con ácido láctico a concentraciones de 1% si presenta actividad bactericida frente a Mesofilos aerobios totales, *S. aureus* y *E. coli* presentes en la carcasa de cuy. Más no con coliformes totales. Finalmente, se determinó que el tratamiento combinado de *Rosmarinus officinalis* "romero" y *Allium sativa* "ajo" con ácido láctico a concentraciones de 0.7% y 1% si presenta actividad bactericida frente a *Mesofilos aerobios*, *S. aureus*, *E. coli* presentes en la carcasa de cuy. Más no con coliformes totales.
- Se comprobó que el tratamiento individual con aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* "romero" tuvo una actividad bacteriostática frente a *Staphylococcus aureus* en concentraciones de 1% y frente a *Escherichia coli* en concentraciones de 0.7% y 1%, durante las primeras 24 h en ambos casos. Además, se comprobó que el tratamiento individual con aceite esencial de *Allium sativum* "ajo" tuvo una actividad bacterioestática frente a *Staphylococcus aureus* en concentraciones de 0.3; 0.5; 0.7 y 1% y frente a *Escherichia coli* en concentraciones de 0.3; 0.5; 0.7 y 1%, durante las primeras 24 h en ambos casos. Finalmente, se confirmó que el tratamiento individual con ácido láctico tuvo una actividad bacterioestática frente a Mesofilos aerobios totales en concentraciones de 0.3%; 0.5% y 0.7% durante las primeras 24 horas para las dos primeras concentraciones y 72 horas, para 0.7%. Mientras que en concentraciones de 1% tuvo una acción bactericida.
- Se confirmó que el tratamiento individual con ácido láctico tuvo una actividad bacterioestática frente a *Staphylococcus aureus* en concentraciones de 0.3%; 0.5% y 0.7% durante las primeras 24 h, 48 h y 72 h; respectivamente. Mientras que en concentraciones de 1% tuvo una acción bactericida. Además, se confirmó que el tratamiento individual con ácido láctico tuvo una actividad bacterioestática frente a *Coliformes totales* en concentraciones de 0.3%; 0.5% y 0.7%. durante las primeras 24 horas. Sin embargo, a concentraciones de 1% presento una actividad bacteriostática durante las 72 horas. Finalmente, se confirmó que el tratamiento individual con ácido láctico tuvo una actividad bacterioestática frente a *Escherichia coli* en concentraciones de 0.3% y 0.5% durante las 72 h para las dos concentraciones. Mientras que en concentraciones de 0.7% y 1% tuvo una acción antibacteriana.

- Se comprobó que el tratamiento combinado de aceites esenciales de romero y ajo con ácido láctico tuvo una actividad bacterioestática frente a Mesofilos aerobios totales en concentraciones de 0.3% y 0.5% durante las primeras 24 horas para ambas concentraciones. Mientras que en concentraciones de 0.7% y 1% tuvo una acción bactericida. Además, se comprobó que el tratamiento combinado de aceites esenciales de romero y ajo con ácido láctico tuvo una actividad bacterioestática frente a *Staphylococcus aureus* en concentraciones de 0.3%; 0.5% durante las 72 h. Mientras que en concentraciones de 0.7% 1% tuvo una acción bactericida. También, se comprobó que el tratamiento combinado de aceites esenciales de romero y ajo con ácido láctico tuvo una actividad bacterioestática frente a Coliformes totales en concentraciones de 0.3%; 0.5%; 0.7% y 1% durante las 24 horas para 0.3% y durante las 72 horas para las tres últimas concentraciones. Finalmente, se comprobó que el tratamiento combinado de aceites esenciales de romero y ajo con ácido láctico tuvo una actividad bacterioestática frente a *Escherichia coli* en concentraciones de 0.3% durante las 72 h. Mientras que en concentraciones de 0.5%; 0.7% y 1% tuvo una acción bactericida.

## VIII. RECOMENDACIONES

- Al momento de la adquisición de las carcasas de *Cavia porcellus*, es necesario verificar que la manipulación de la muestra no haya pasado por un proceso de desinfección, ya que esto podría afectar cuantitativamente los resultados en el recuento de las bacterias y confundirse con la ausencia total de la misma en la muestra.
- Realizar estudios sobre otros aceites naturales de plantas de la biodiversidad peruana para tomar como referencia y realizar mayores contribuciones y dar un mayor valor agregado al producto. Debido a que es producto de alta demanda en el mercado nacional por su valor nutricional es necesario que llegue seguro al consumidor, por lo que se debe implementar métodos de conservación naturales y/o orgánicos para prolongar la vida útil de este producto y no sea perjudicial para la salud humana.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS ANEXOS

- Bajpai, Vivek K.; Baek, Kwang-Hyun and Kang, Sun-Chul. 2012. Control of Salmonella in foods by using essential oils: A review. Food Research International. 45 (2012), 722–734.
- Benkeblia, N. 2004. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). Lebensm.-Wiss. u.-Technol. 37 (2004), 263–268.
- Burt, Sara. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International Journal of Food Microbiology. 94 (2004), 223 – 253.
- Cetin-Karaca, Hayriye and Newmann, Melissa C. 2015. Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against Salmonella and Escherichia coli. Food Bioscience. 11 (2015), 8–16.
- Chirinos, Octavio; Muro Mesones, Krishna; Concha, Willy Álvaro; Otiniano, Javier; Quezada, José Carlos; Ríos, Víctor. 2008. Crianza y comercialización de cuy para el mercado limeño. – Lima: Universidad ESAN, 2008. – 192 p. – (Gerencia Global ; 8).
- Estrella Jaramillo, Mónica Gabriela. 2011. estudio tecnológico para el desarrollo de carne de cuy madurada y ahumada. TESIS. Universidad Tecnológica Equinoccial.
- Jayasena, Dinesh D. and Jo, Cheorun. 2013. Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. Trends in Food Science & Technology 34 (2013) 96-108.
- Jeong-Eun Hyun, Young-Min Bae, Jae-Hyun Yoon, Sun-Young Lee. 2015. Preservative effectiveness of essential oils in vapor phase combined with modified atmosphere packaging against spoilage bacteria on fresh cabbage. 2015. Food Control. 51 (2015), 307-313.
- Jordán, María J.; Lax, Vanesa; Rota, María C.; Lorán, Susana and Sotomayor, José A.. 2013. Effect of bioclimatic area on the essential oil composition and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. Food Control. 30 (2013), 463-468.
- Lax Vivanco, V. 2014. Estudio de la Variabilidad Química, Propiedades Antioxidantes y Biocidas de Poblaciones Espontaneas de *Rosmarinus Officinalis* L. en la Region de Murcia. Instituto Murciano de Investigacion y Desarrollo Agrario y Alimentario (2014), 1-152.

- Nedorostova, Lenka; Kloucek, Pavel; Kokoska, Ladislav; Stolcova, Miluse and Pulkrabek, Josef. 2009. Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. 2009. Food Control. 20 (2009), 157–160.
- Oussalah, Mounia; Caillet, Stéphane; Saucier, Linda and Lacroix, Monique. 2007. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: E. coli O157:H7, Salmonella Typhimurium, Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes. Food Control. 18 (2007), 414–420.
- Parra Huertas, R. 2010. Bacterias Acido Lácticas: Papel Funcional en los Alimentos Facultad de Ciencias Agropecuarias, Vol 8 No. 1 (2010), 94 – 105.
- Pesavento, G.; Calonico, C.; Bilia, A.R.; Barnabei, M.; Calesini, F.; Addona, R.; Mencarelli, L.; Carmagnini, L.; Di Martino, M.C. and Lo Nostro, A. 2015. Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oils against Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes in beef meatballs. Food Control. 54 (2015), 188-199.
- Sandri, I.G.; Zacaria, J.; Fracaro, F.; Delamare, A.P. and Echeverrigaray, S.. 2008. Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus Cunila against foodborne pathogens and spoiling bacteria. Food Chemistry, Volumen 103, Número 3, 2007, páginas 823-828.
- Settanni, Luca; Palazzolo, Eristanna; Guarrasi, Valeria; Aleo, Aurora; Mammina, Caterina; Moschetti, Giancarlo and Germanà, Maria Antonietta. 2012. Inhibition of foodborne pathogen bacteria by essential oils extracted from citrus fruits cultivated in Sicily. Food Control, 26(2012), 326-330.
- Solomakos, N.; Govaris, A.; Koidis, P. and Botsoglou, N. 2008. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against Escherichia coli O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. Meat Science. 80 (2008), 159–166.
- Solomakos, N.; Govarisa, A.; Koidisb, P. and Botsoglou, N. 2012. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against Listeria monocytogenes in minced beef during refrigerated storage. Food Microbiology 25 (2008) 120–127.
- Rojas Rodríguez, C. 2007. Evaluación de cuatro desinfectantes sobre *Listeria monocytogenes* aislada de productos cárnicos crudos de una planta procesados en Bogota. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias Microbiología Industrial. (2007) 1 – 104.

- Teixeira, Bárbara; Marques, António; Ramos, Cristina; Neng, Nuno R.; Nogueira, José M.F.; Saraiva, Jorge Alexandre and Nunes, Maria Leonor. 2013. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial Crops and Products*. 43 (2013), 587–595.
- Turgis, Mélanie; Dang Vu, Khanh; Dupont, Claude and Lacroix, Monique. 2012. Combined antimicrobial effect of essential oils and bacteriocins against foodborne pathogens and food spoilage bacteria. 2012. *Food Research International*. 48 (2012), 696–702.
- Vásquez, S. *et al.* 2009. Utilización de sustancias Antimiicrobianas producidas por Bacterias Acido Lácticas en la conservación de la Carne. **Rev Chil Nutr Vol. 36, N°1 (2009), 64 – 71.**
- Ramos Gorbeña, J.C. 2011. Biopreservación: Conchas de Abanico con Ácido Láctico y Yogurt Natural. Editorial Académica Española. ISBN-13:978-3-8465-6735-7.
- Ramos Gorbeña, J.C. 2015. Tratamientos combinados de nisina y ácido láctico para el aseguramiento de la calidad microbiológica de conchas de abanico (*Argopecten purpuratus* L. 1819). Tesis. Universidad Ricardo Palma. Lima – Perú.



## IX. ANEXOS

### A. Ficha técnica del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* “romero”



GC/MS BATCH NUMBER: R50103

---

**ESSENTIAL OIL:** ORGANIC ROSEMARY  
**BOTANICAL NAME:** ROSMARINUS OFFICINALIS  
**ORIGIN:** TUNISIA

KEY CONSTITUENTS PRESENT IN THIS BATCH OF ORGANIC ROSEMARY OIL	%
1,8-CINEOLE	47.5
CAMPHOR	10.9
$\alpha$ -PINENE	10.7
$\beta$ -PINENE	6.8
$\beta$ -CARYOPHYLLENE	4.2
CAMPHENE	4.0
BORNEOL	2.8
$\alpha$ -TERPINEOL	1.9
MYRCENE	1.4
LIMONENE	1.3
para-CYMENE	1.3
BORNYL ACETATE	0.9
LINALOOL	0.8

Comments from Robert Tisserand: Nice fresh, green odor. Very slightly low on 1 of 13 key ISO constituents (limonene) but this is not a concern.

**Date :** March 11, 2016

*SAMPLE IDENTIFICATION*

**Internal code :** 16C01-PTH3-1-HM

**Customer identification :** Organic Rosemary - Tunisia - R501 0356R

**Type :** Essential oil

**Source :** *Rosmarinus Officinalis*

**Customer :** Plant Therapy

*ANALYSIS*

**Method :** PC-PA-001-15E06, "Analysis of the composition of a liquid essential oil by GC-FID" (in French).

**Analyst :** Sylvain Mercier, M. Sc., chimiste

**Analysis date :** 2016-03-07

Checked and approved by :



Alexis St-Gelais, M. Sc., chimiste 2013-174

*Note: This report may not be published, including online, without the written consent from Laboratoire PhytoChemia.*

*This report is digitally signed, it is only considered valid if the digital signature is intact.*

IDENTIFIED COMPOUNDS

Identification	Column: BP5			Column: WAX			Molecular Class
	R.T.	R.I.	%	%	R.I.	R.T.	
cis-Hex-3-en-1-ol	2.01	865	0.02	0.01	1342	5.08	Aliphatic alcohol
Tricydene	2.62	912	0.15	0.14	920	0.85	Monoterpene
$\alpha$ -Thujene	2.72	918	0.27	0.34	959	0.97	Monoterpene
$\alpha$ -Pinene	2.83	925	10.69	10.50	952	0.95	Monoterpene
Camphene	3.08*	941	4.09	3.97	1014	1.18	Monoterpene
$\alpha$ -Fenchene	3.08*	941	[4.09]	0.07	1006	1.12	Monoterpene
Thuja-2,4(10)-diene	3.16	946	0.02	0.13	1069	1.62*	Monoterpene
Sabinene	3.50	967	0.07	[0.13]	1069	1.62*	Monoterpene
$\beta$ -Pinene	3.55	971	6.77	6.76	1053	1.50	Monoterpene
Myrcene	3.85	990	1.36	1.36	1121	2.14	Monoterpene
Octan-3-one	3.89	992	0.05	0.05	1206	3.15	Aliphatic ketone
$\alpha$ -Phellandrene	4.08*	1004	0.37	0.17	1114	2.05	Monoterpene
$\Delta^3$ -Carene	4.08*	1004	[0.37]	0.21	1100	1.89	Monoterpene
$\alpha$ -Terpinene	4.27	1015	0.46	0.43	1127	2.21	Monoterpene
1,8-Cineole	4.62*	1034	49.92	47.54	1162	2.62	Monoterp. ether
Limonene	4.62*	1034	[49.92]	1.32	1149	2.47	Monoterpene
para-Cymene	4.62*	1034	[49.92]	1.27	1214	3.27	Monoterpene
cis- $\beta$ -Ocimene	4.70	1039	0.03	0.84	1195	3.01*	Monoterpene
trans- $\beta$ -Ocimene	4.86	1048	0.03	0.03	1208	3.17	Monoterpene
$\gamma$ -Terpinene	5.03	1058	0.80	[0.84]	1195	3.01*	Monoterpene
cis-Sabinene hydrate	5.38	1078	0.12	0.12	1416	6.23	Monoterp. alcohol
Terpinolene	5.48	1083	0.37	0.38	1227	3.45	Monoterpene
Fenchone	5.60	1090	0.01	0.01	1326	4.85	Monoterp. ketone
para-Cymenene	5.71	1096	0.03	0.03	1373	5.55	Monoterpene
trans-Sabinene hydrate	5.96	1107	0.04	0.06	1492	7.68	Monoterp. alcohol
Linalool	6.01	1109	0.84	0.84	1507	7.95	Monoterp. alcohol
endo-Fenchol	6.37	1126	0.05	0.04	1527	8.56	Monoterp. alcohol
Camphor	6.79	1145	10.88	10.96	1431	6.52*	Monoterp. ketone
Camphene hydrate	7.00	1154	0.04	0.04	1529	8.63	Monoterp. alcohol
Pinocarvone	7.10	1159	0.01	0.02	1486	7.55	Monoterp. ketone
Borneol	7.54	1179	2.82	2.58	1628	11.88	Monoterp. alcohol
Terpinen-4-ol	7.64	1184	0.88	0.79	1535	8.81	Monoterp. alcohol
$\alpha$ -Terpineol	8.25	1205	1.91	1.93	1633	12.12	Monoterp. alcohol
Bornyl acetate	10.90	1276	0.87	0.83	1511	8.07	Monoterp. ester
Carvacrol	13.44	1327	0.03	0.02	2150	39.47	Monoterp. alcohol
Citronellyl acetate	14.49	1345	0.06	0.19	1612	11.19*	Monoterp. ester
$\alpha$ -Copaene	14.89	1352	0.22	[10.96]	1431	6.52*	Sesquiterpene
$\beta$ -Caryophyllene	17.49	1397	4.23	4.17	1523	8.45	Sesquiterpene
$\alpha$ -Humulene	19.92	1429	0.44	0.48	1583	10.25	Sesquiterpene
$\gamma$ -Murolene	21.84	1454	0.16	[0.19]	1612	11.19*	Sesquiterpene
$\alpha$ -Murolene	23.89	1481	0.04	0.04	1645	12.63	Sesquiterpene

$\gamma$ -Cadinene	24.84	1493	0.09	0.10	1667	13.63	Sesquiterpene
$\beta$ -Bisabolene	25.02	1495	0.07	0.06	1657	13.21	Sesquiterpene
$\delta$ -Cadinene	25.46	1500	0.24	0.22	1673	13.92	Sesquiterpene
Caryophyllene oxide	30.19	1556	0.11	0.11	1847	24.13	Sesquiterp. ether
<b>Total identified</b>			<b>99.66%</b>	<b>99.16%</b>			

\*: Two or more compounds are coeluting on this column

[xx]: Duplicate percentage due to coelutions, not taken account in the identified total

Note: no correction factor was applied

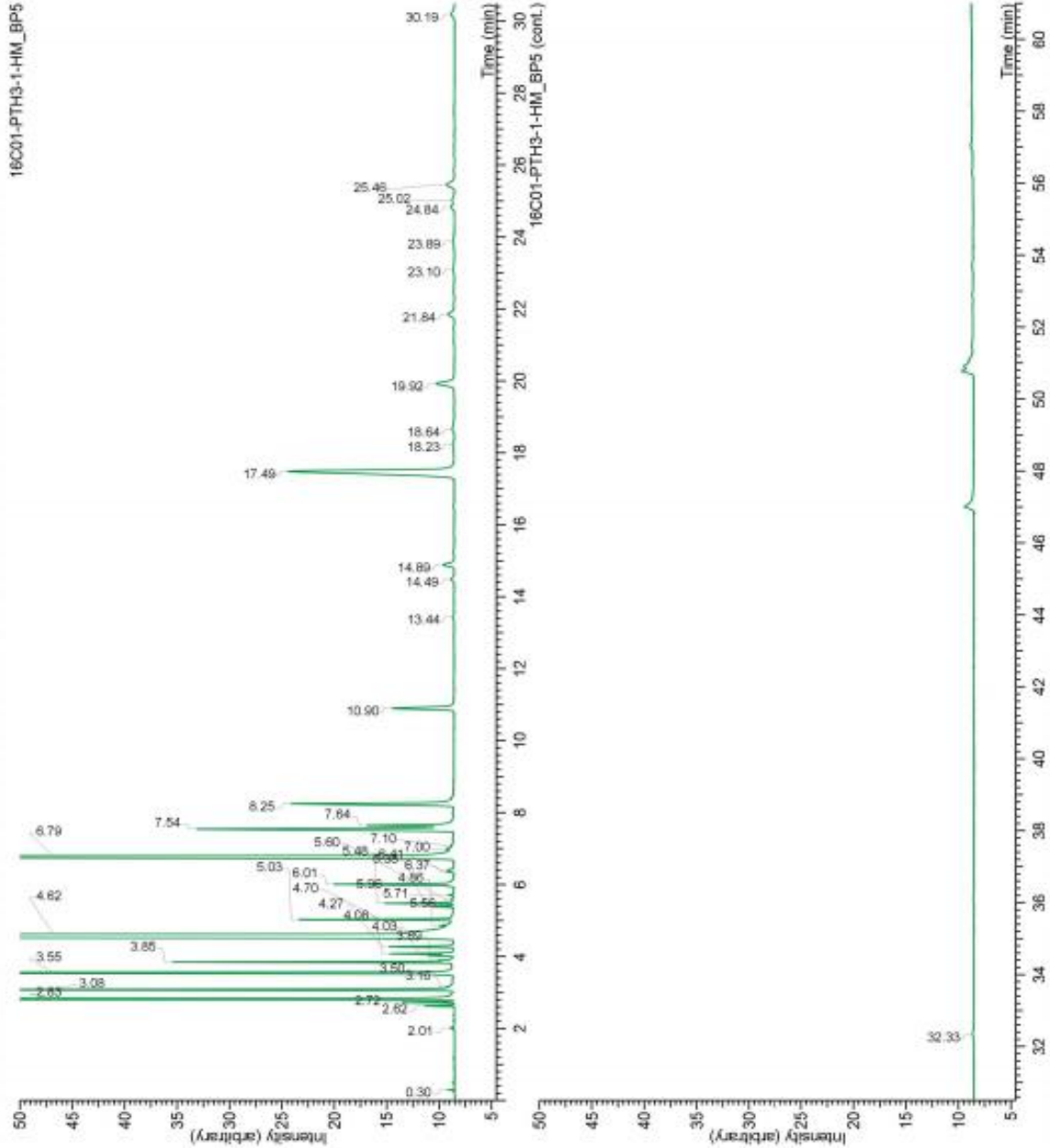
#### OTHER DATA

**Physical aspect** : Clear liquid

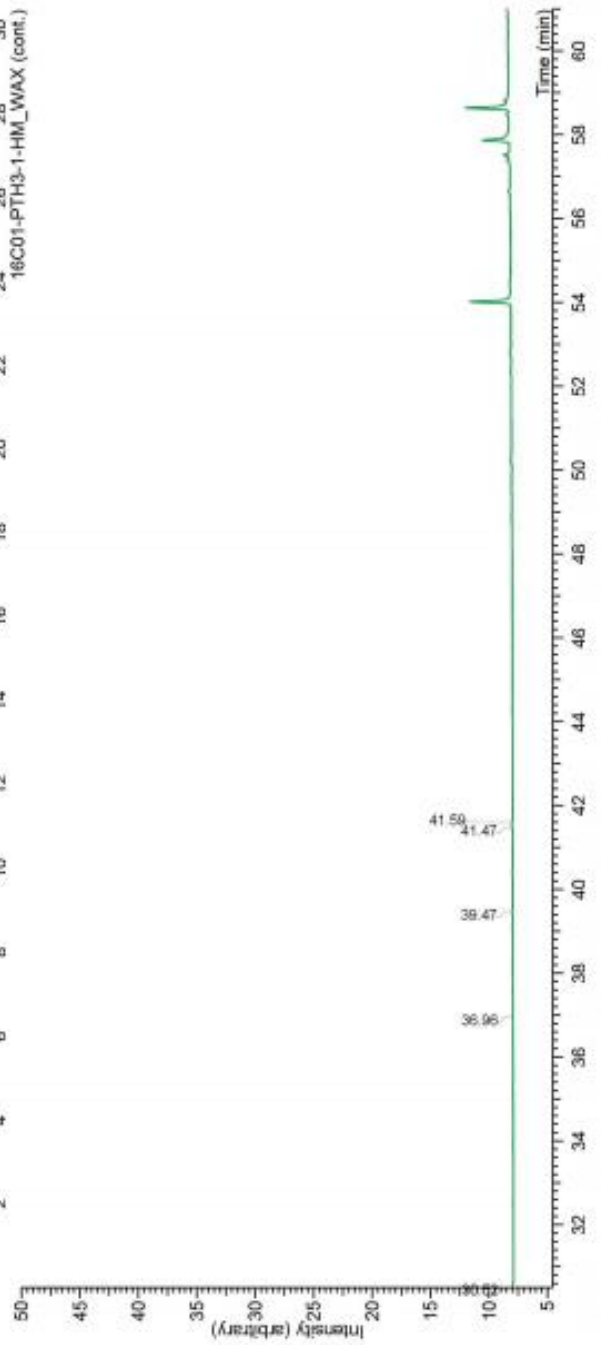
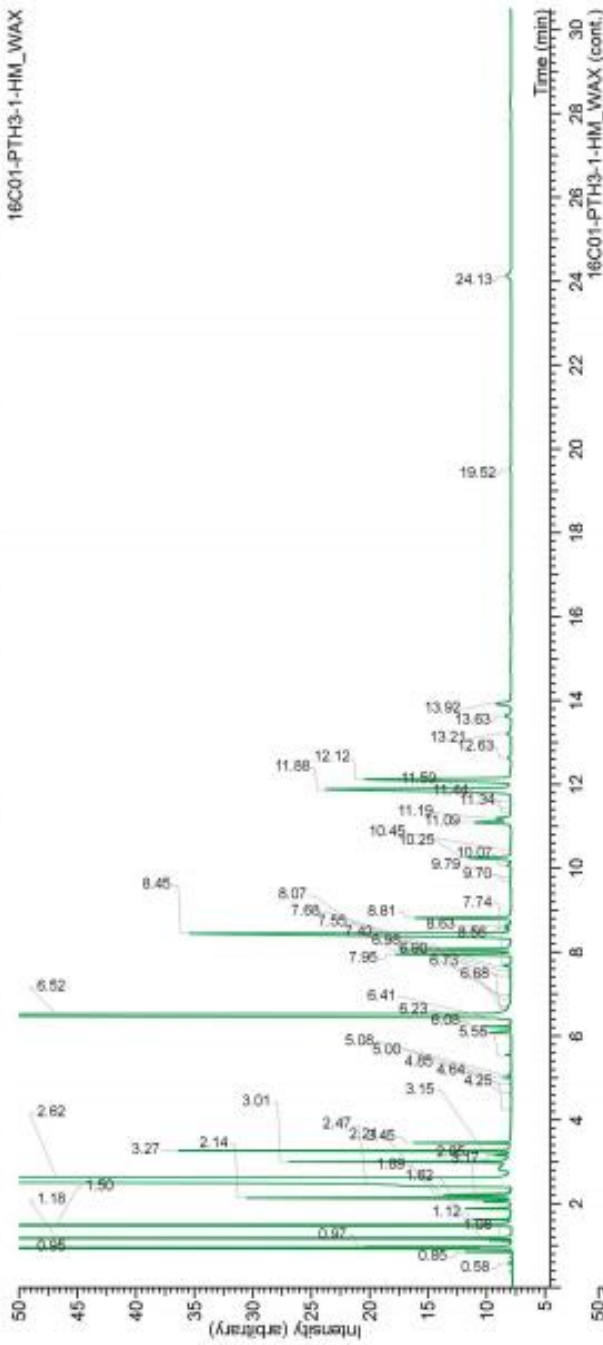
**Refractive index** :  $1.4670 \pm 0.0003$  (20 °C)

#### CONCLUSION

No adulterant, contaminant or diluent were detected using this method. This sample is of the 1,8-cineole chemotype.



16C01-PTH3-1-HM\_WAX





## B. Ficha técnica del aceite esencial de *Allium sativa* “ajo”



GC/MS BATCH NUMBER: G10101

---

**ESSENTIAL OIL:** GARLIC  
**BOTANICAL NAME:** ALLIUM SATIVUM  
**ORIGIN:** CHINA

KEY CONSTITUENTS PRESENT IN THIS BATCH OF GARLIC OIL	%
DIALLYL DISULPHIDE	24.8
DIALLYL TRISULFIDE (ALITRIDIN)	20.4
METHYL ALLYL TRISULFIDE	13.6
DIALLYL SULFIDE	9.6
METHYL ALLYL DISULFIDE	5.8
DIALLYL DISULPHIDE ISOMER B	3.3
METHYL ALLYL SULFIDE	2.8
DIALLYL DISULPHIDE ISOMER A	2.8
DIALLYL TETRASULFIDE	2.5
2-VINYLSULFIDE	2.0
DIMETHYL TRISULFIDE	1.5
1,3,5-TRITHIANE	1.3
2-OXAZOLIDINETHIONE	1.2
METHYL 1-PROPENYL DISULFIDE	1.0

Comments from Robert Tisserand: Not quite as intense as some, but still very garlicky. The constituents look good.

Analyzed by : Dr. Robert S. Pappas  
 Analyzed : 1/24/2015 12:25:32 AM  
 Sample Type : Essential Oil  
 Sample Name : Garlic China  
 Sample ID : 98100-1  
 Injection Volume : 0.20  
 Data File : C:\GCMSsolution\Data\EOU\Garlic\Garlic China 98100-1.qgd

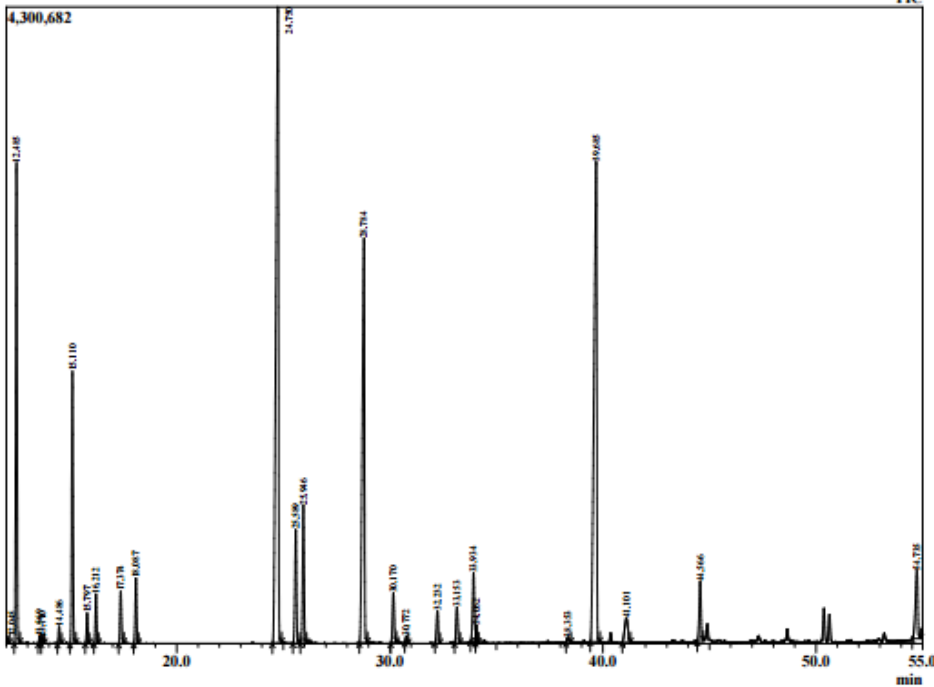
Sample Information



Peak Report TIC

R.Time	Name	Area%
8.019	Sulfide, allyl methyl	2.80
9.015	Disulfide dimethyl	0.63
12.045	Dithiolane	0.13
12.485	Diallyl sulfide	9.55
13.569	Di ( Propen-1-yl)sulfide Cis	0.14
13.710	Di ( Propen-1-yl)sulfide Trans	0.13
14.486	2,4-Dimethylthiophene	0.34
15.110	Allyl methyl disulfide	5.83
15.797	Disulfide, methyl 1-propenyl <cis>	0.64
16.212	Disulfide, methyl 1-propenyl <trans>	1.03
17.374	2-Oxazolidinethione	1.23
18.087	Dimethyl trisulfide	1.45
24.750	Diallyl disulphide	24.79
25.589	Diallyl disulphide isomer A	2.80
25.946	Diallyl disulphide isomer B	3.30
28.784	Allyl methyl trisulfide	13.57
30.170	1,3,5-Trithiane	1.33
30.772	1-Nonen-4-ol, 3,4-dimethyl-	0.14
32.232	3-ethenyl-3,4-dihydrodithiin	0.84
33.153	Unidentified	1.00
33.934	2-vinyl-4H-1,3-dithiin	1.98
34.062	Tetrasulfide, dimethyl	0.38
38.353	Unidentified	0.16
39.685	Allitridin	20.42
41.101	Allitridin isomer	1.23
44.566	Unidentified	1.75
54.735	Tetrasulfide <diallyl->	2.45
		100.00

Chromatogram Garlic China C:\GCMSsolution\Data\EOU\Garlic\Garlic China 98100-1.qgd



Comments:

Typical Ranges of Main Components:



## C. Ficha técnica del Ácido láctico



### Specification

1.00366.2500 (S)-Lactic acid about 90% suitable for use as excipient EMPROVE® exp  
Ph Eur, BP, E 270

	Specification	
Assay (alkalimetric)	88.0 - 92.0	%
Assay (stereochemical purity of (S)-lactic acid)	≥ 95.0	%
Identity (IR-spectrum)	passes test	
Identity (pH)	passes test	
Identity (Density)	passes test	
Identity (Lactate)	passes test	
Identity (assay)	passes test	
Appearance	clear, oily liquid, not more intense in color than reference solution Y <sub>s</sub>	
Ether-insoluble substances	passes test	
Citric, oxalic and Phosphoric acids	passes test	
Density (d 20/20)	1.200 - 1.210	
Chloride (Cl)	≤ 0.2	%
Sulphate (SO <sub>4</sub> )	≤ 200	ppm
Heavy metals (as Pb)	≤ 10	ppm
As (Arsenic)	≤ 0.0003	%
Ca (Calcium)	≤ 200	ppm
Fe (Iron)	≤ 0.001	%
Hg (Mercury)	≤ 0.0001	%
Pb (Lead)	≤ 0.0005	%
Ethanol	≤ 5000	ppm
Acetic acid	≤ 5000	ppm
Methanol	≤ 50	ppm
Other residual solvents (ICH Q3C)	excluded by manufacturing process	
Sugars and other reducing substances	passes test	
Sulfated ash (600 °C)	≤ 0.10	%
Bacterial endotoxins	≤ 5	I.U./g

Residues of metal catalysts or metal reagents acc. to EMEA/CHMP/SWP/4446/2000  
are not likely to be present.

Corresponds to Ph Eur, BP, E 270

Conforms to the purity criteria on food additives according to European Commission directive 2008/64/EC.

Dr. Christian Urban

Responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature.

Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64283 Darmstadt (Germany); +49 6151 73-0  
EMD Millipore Corporation - a subsidiary of Merck KGaA, Darmstadt, Germany  
290 Concord Road, Billerica, MA 01821, USA, Phone: (978) 715-4321  
SALSA Version 01/05 (000000000000) Date: 13.10.2016

Page 1 of 1



## MERCK Use Information Sheet

Catalogue No. 100366

Print Date: 01.03.2017

Product name (S)-Lactic acid about 90% suitable for use as excipient  
EMPROVE® exp Ph Eur, BP, E 270

**Free short title:** Use descriptors related to the industrial use (Pharmaceutical production, Cosmetic raw material)

**Identified use descriptors:** SU 3 - Industrial uses: Uses of substances as such or in preparations at industrial sites  
SU 10 - Formulation [mixing] of preparations and/ or re-packaging (excluding alloys)  
PROC1, PROC2, PROC3, PROC4, PROC5, PROC8a, PROC8b, PROC9, PROC14, PROC15  
ERC1, ERC2, ERC4, ERC8a, ERC8b  
PC19, PC39

### Exposure driving use descriptors

#### Process Categories

PROC1 Use in closed process, no likelihood of exposure  
PROC2 Use in closed, continuous process with occasional controlled exposure  
PROC3 Use in closed batch process (synthesis or formulation)  
PROC4 Use in batch and other process (synthesis) where opportunity for exposure arises  
PROC5 Mixing or blending in batch processes for formulation of preparations and articles (multistage and/ or significant contact)  
PROC8a Transfer of substance or preparation (charging/ discharging) from/ to vessels/ large containers at non-dedicated facilities  
PROC8b Transfer of substance or preparation (charging/ discharging) from/ to vessels/ large containers at dedicated facilities  
PROC9 Transfer of substance or preparation into small containers (dedicated filling line, including weighing)  
PROC14 Production of preparations or articles by tableting, compression, extrusion, pelletisation  
PROC15 Use as laboratory reagent

#### Environmental Release Categories

ERC1 Manufacture of substances  
ERC2 Formulation of preparations  
ERC4 Industrial use of processing aids in processes and products, not becoming part of articles  
ERC8a Industrial use resulting in manufacture of another substance (use of intermediates)  
ERC8b Industrial use of reactive processing aids

#### Product Categories

PC19 Intermediate  
PC39 Cosmetics, personal care products

Follow the link below to open an Interactive Form which allows you to report additional uses.

<http://www.merckmillipore.com/collectingform>

An example how to fill in the form is available here:

<http://www.merckmillipore.com/formexample>

---

**Free short title:** Use descriptors related to the professional use (Pharmaceutical

## MERCK Use Information Sheet

Catalogue No. 100368  
Product name (S)-Lactic acid about 90% suitable for use as excipient EMPROVE® exp Ph Eur, BP, E 270

---

production, Cosmetic raw material)

Identified use descriptors: SU 22 - Professional uses: Public domain (administration, education, entertainment, services, craftsmen)

ERC8a, ERC8d

PC39

Exposure driving use descriptors

Environmental Release Categories

ERC8a Wide dispersive indoor use of processing aids in open systems

ERC8d Wide dispersive outdoor use of processing aids in open systems

Product Categories

PC39 Cosmetics, personal care products

Follow the link below to open an Interactive Form which allows you to report additional uses.

<http://www.merckmillipore.com/collectingformeach>

An example how to fill in the form is available here:

<http://www.merckmillipore.com/formforeach>

---

Free short title: Use descriptors related to the consumer use (Pharmaceutical production, Cosmetic raw material)

Identified use descriptors: SU 21 - Consumer uses: Private households (= general public = consumers)

ERC8a, ERC8d

PC39

Exposure driving use descriptors

Environmental Release Categories

ERC8a Wide dispersive indoor use of processing aids in open systems

ERC8d Wide dispersive outdoor use of processing aids in open systems

Product Categories

PC39 Cosmetics, personal care products

Follow the link below to open an Interactive Form which allows you to report additional uses.

<http://www.merckmillipore.com/collectingformeach>

An example how to fill in the form is available here:

<http://www.merckmillipore.com/formforeach>

---

The information contained herein is based on the present state of our knowledge. It characterises the product with regard to the appropriate safety precautions. It does not represent a guarantee of any properties of the product.

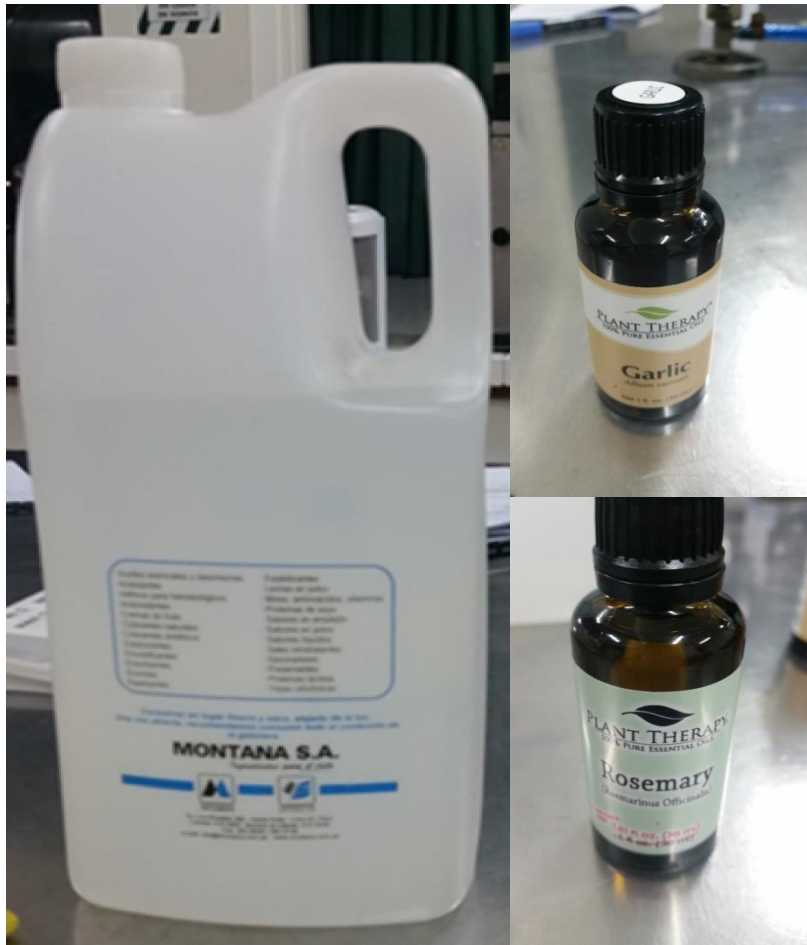
## D. Fotografías



Fotografía N° 1: Sacrificio de los 50 Cuyes (*Cavia porcellus*)



Fotografía N° 2: Corte en  $\frac{1}{4}$  de los 50 Cuyes (*Cavia porcellus*)



Fotografía N° 3: Aceite esencial de Romero (*Rosmarinus officinalis* L.), Ajo (*Allium sativum*) y Ácido Láctico

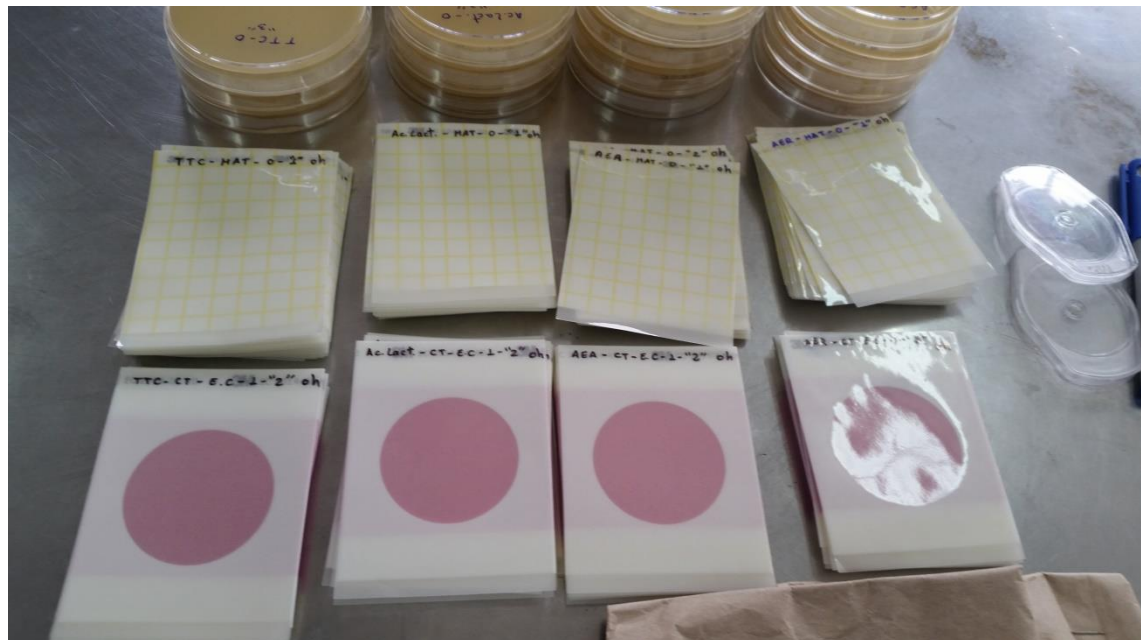


Fotografía N° 4: Concentraciones al 0.3; 0.5; 0.7 y 1% de Aceite esencial de Romero (*Rosmarinus officinalis* L.), Ajo (*Allium sativum*), Ácido Láctico y la combinación de los 3

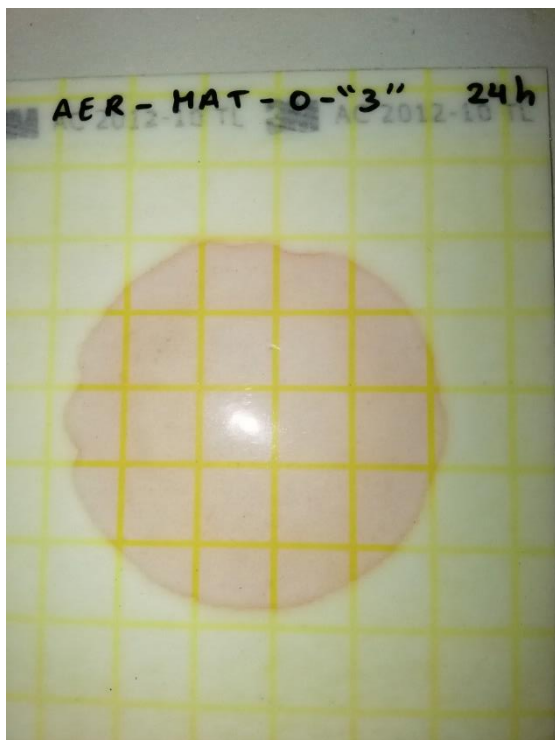




Fotografía N° 5:  $\frac{1}{4}$  de los Cuyes (*Cavia porcellus*) almacenadas con sus respectivas concentraciones



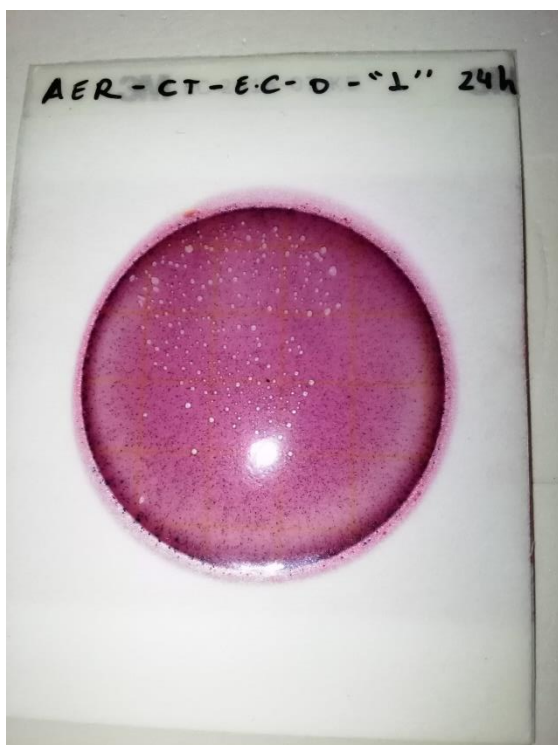
Fotografía N° 6: Placas Petri y Petrifilm rotuladas



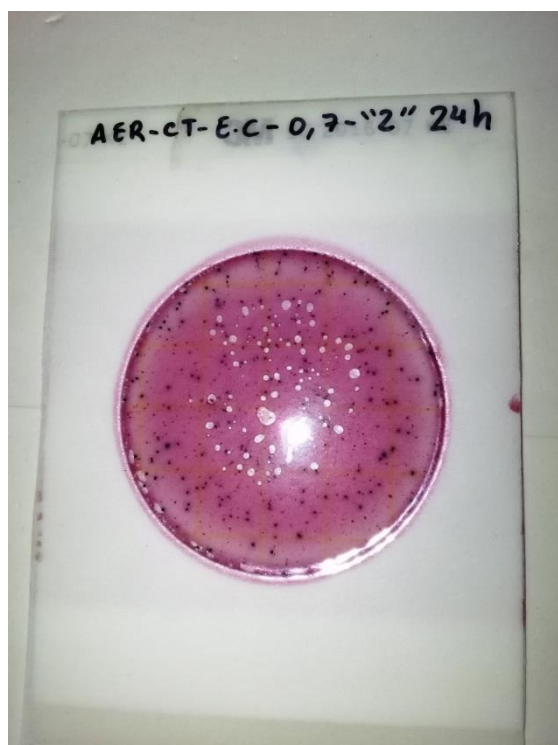
Fotografía N° 7: Recuento de Mesofilos aerobios con el tratamiento de aceite esencial de romero – concentración control a 24 h



Fotografía N°8: Recuento de Mesofilos aerobios con el tratamiento de aceite esencial de romero – concentración 0.7% a 24 h

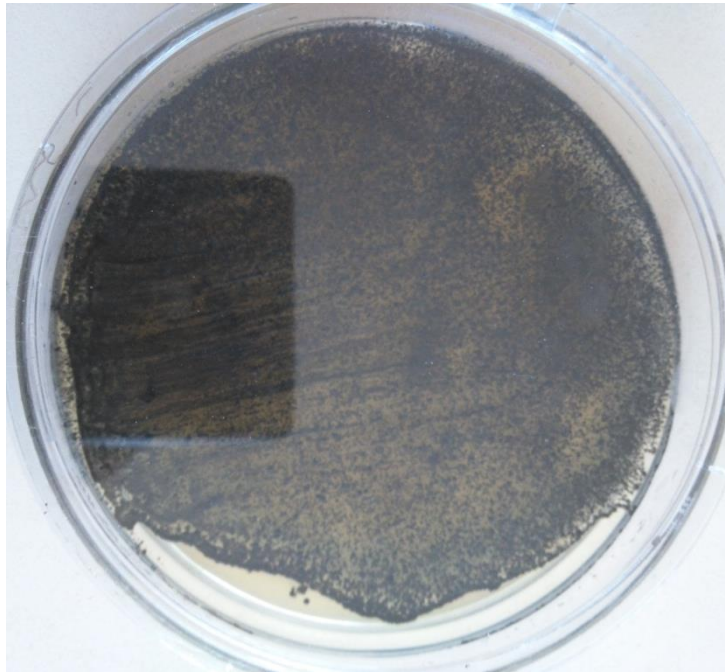


Fotografía N° 9: Recuento de Coliformes totales y *E. coli* con el tratamiento de aceite esencial de romero – concentración control a 24 h

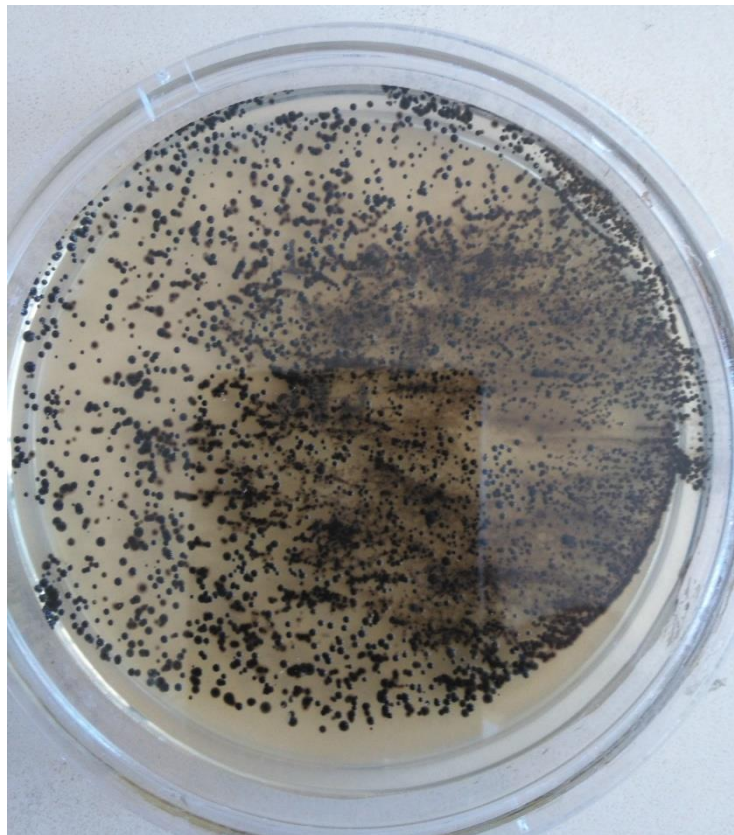


Fotografía N° 10: Recuento de Coliformes totales y *E. coli* con el tratamiento de aceite esencial de romero – concentración 0.7% a 24 h



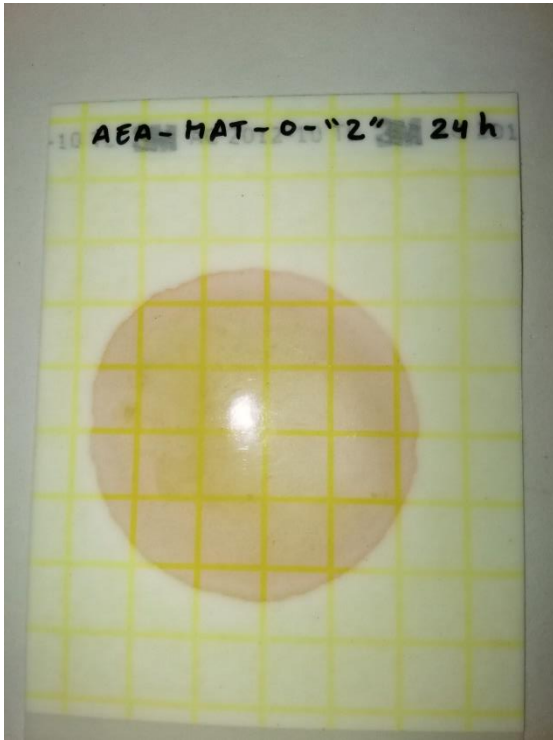


**Fotografía N° 11: Recuento de *S. aureus* con el tratamiento de aceite esencial de romero – concentración 1% a 48 h**

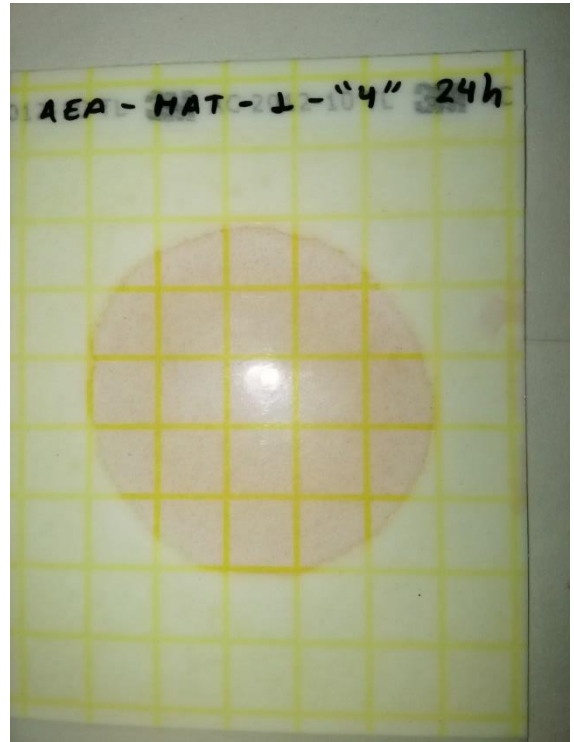


**Fotografía N° 12: Recuento de *S. aureus* con el tratamiento de aceite esencial de romero – concentración 1% a 72 h**

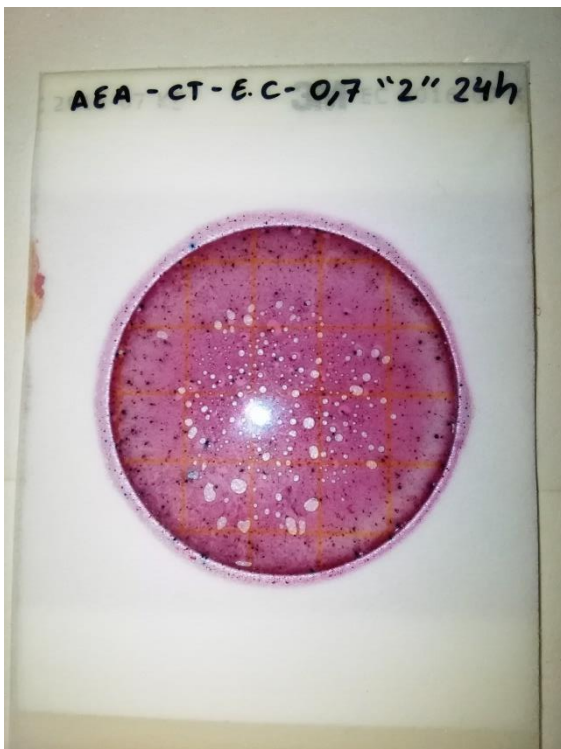




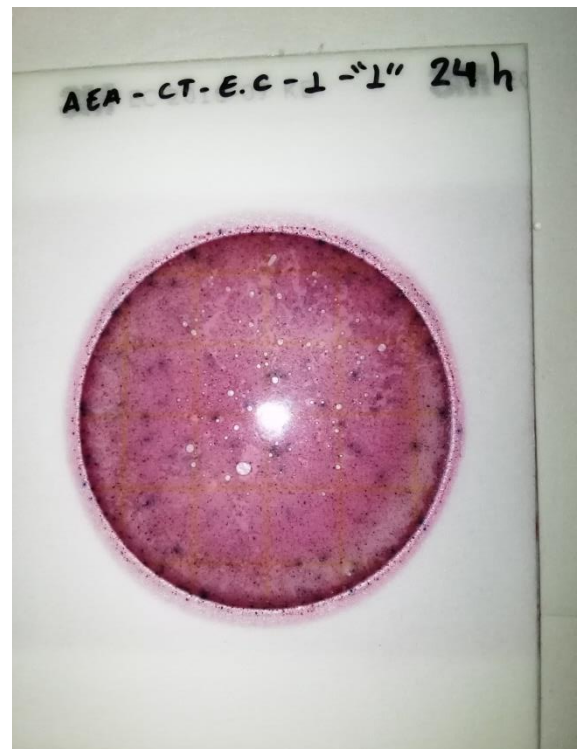
Fotografía N° 13: Recuento Mesofilos aerobios con el tratamiento de aceite esencial de ajo – concentración control a 24 h



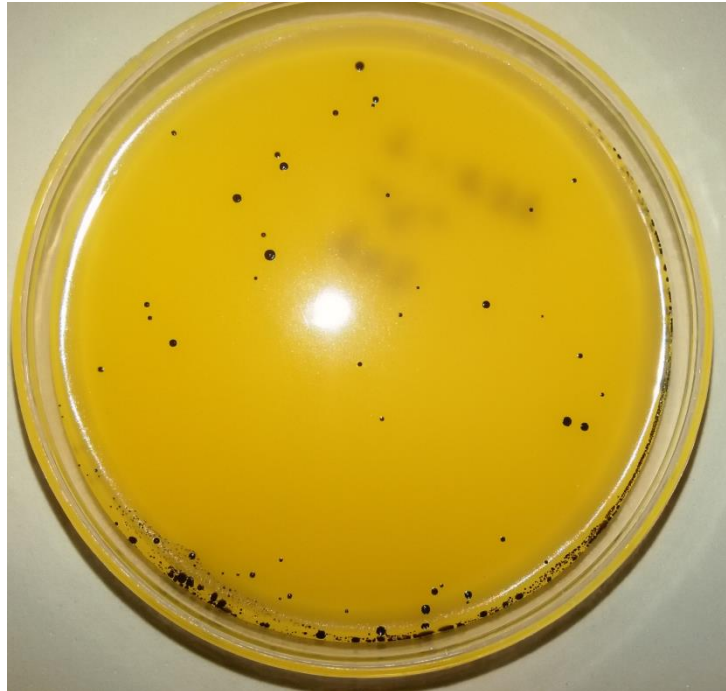
Fotografía N° 14: Recuento de mesofilos aerobios con el tratamiento de aceite esencial de ajo – concentración 1% a 24 h



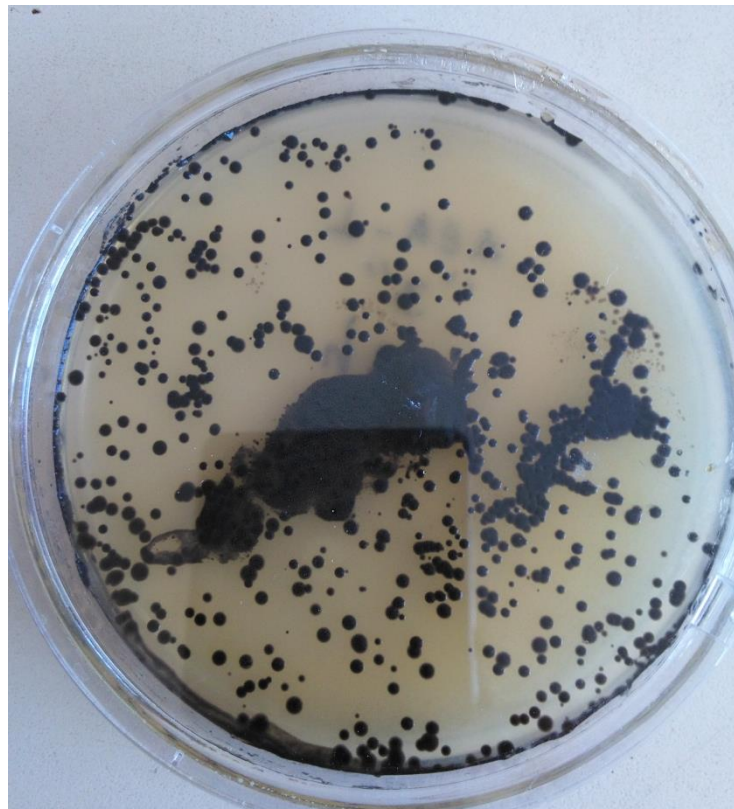
Fotografía N° 15: Recuento de Coliformes totales y *E. coli* con el tratamiento de aceite esencial de ajo – concentración 0.7% a 24 h



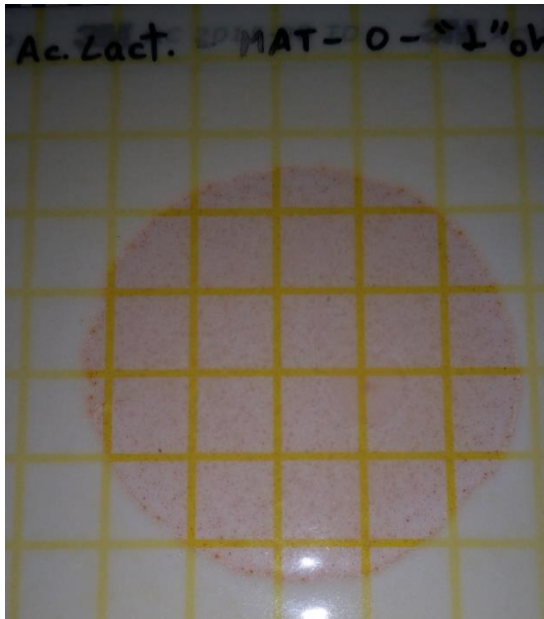
Fotografía N° 16: Recuento de Coliformes totales y *E. coli* con el tratamiento de aceite esencial de ajo – concentración 1% a 24 h



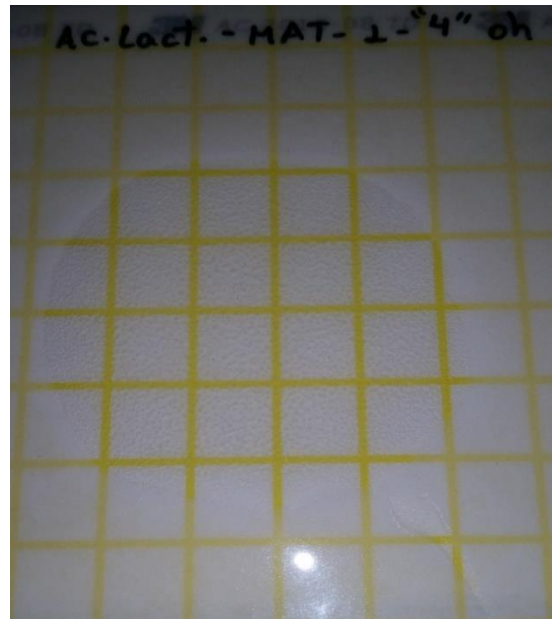
Fotografía N° 17: Recuento de *S. aureus* con el tratamiento de aceite esencial de ajo – concentración 1% a 24 h



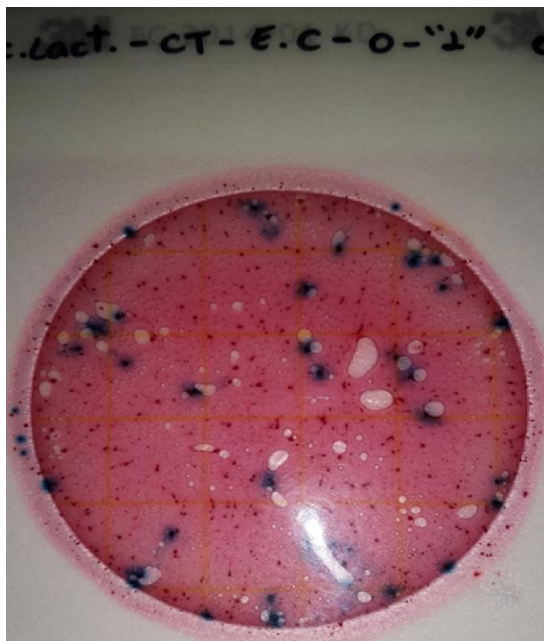
Fotografía N° 18: Recuento de *S. aureus* con el tratamiento de aceite esencial de ajo – concentración 1% a 48 h



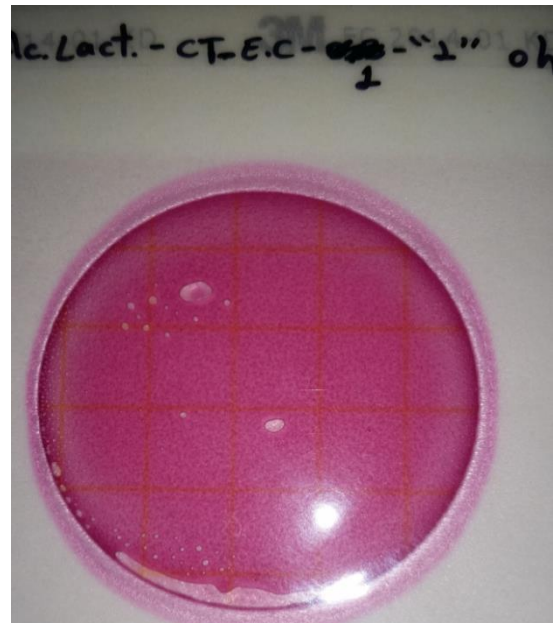
Fotografía N° 19: Recuento de Mesofilos con el tratamiento de aceite esencial de ajo – concentración control a 0 h



Fotografía N° 20: Recuento de Mesofilos aerobios con el tratamiento de aceite esencial de ajo – concentración 1% a 0 h



Fotografía N° 21: Recuento de Coliformes totales y *E. coli* con el tratamiento de aceite esencial de Ac. Láctico – concentración 0.7% a 24 h

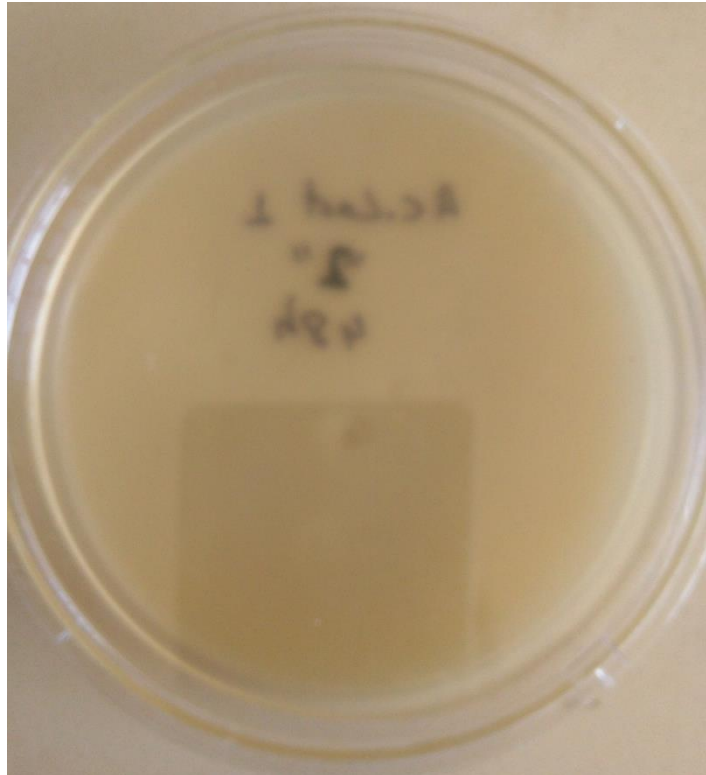


Fotografía N° 22: Recuento de Coliformes totales y *E. coli* con el tratamiento de aceite esencial de Ac. Láctico – concentración 0.7% a 24 h

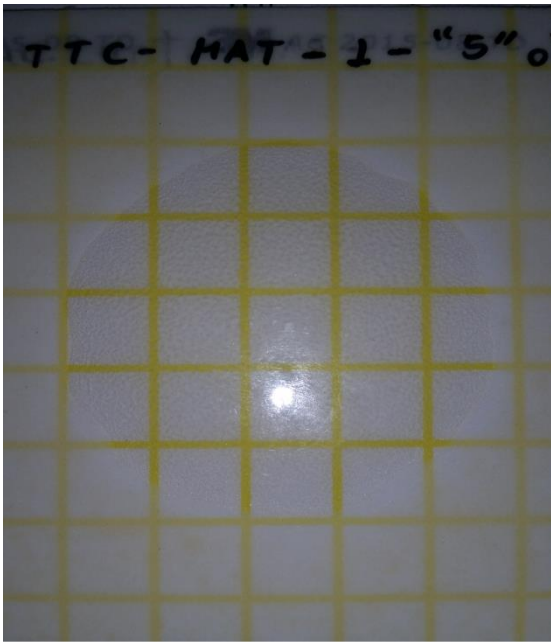




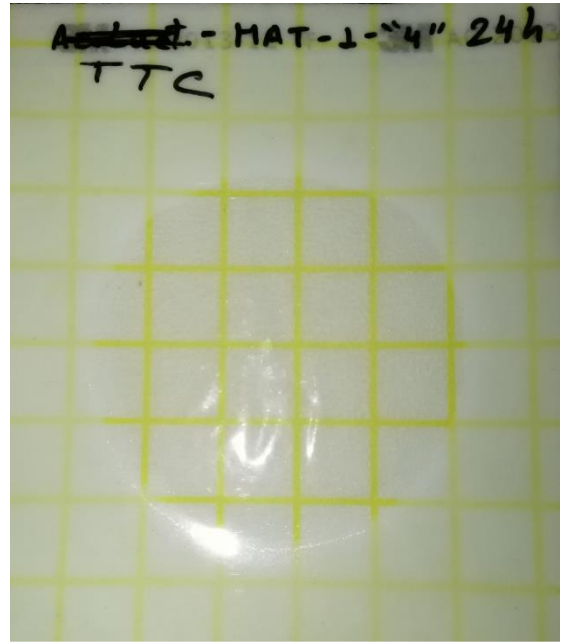
**Fotografía N° 23: Recuento de *S. aureus* con el tratamiento de ac. láctico  
– concentración 1% a 48 h**



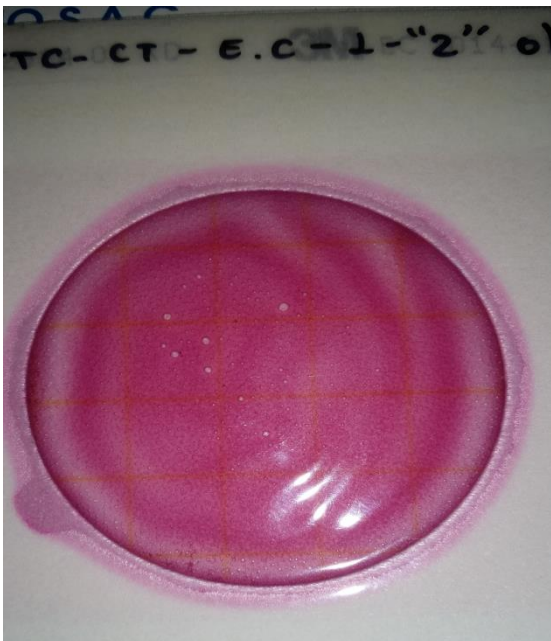
**Fotografía N° 24: Recuento de *S. aureus* con el tratamiento de ac. láctico  
– concentración 1% a 72 h**



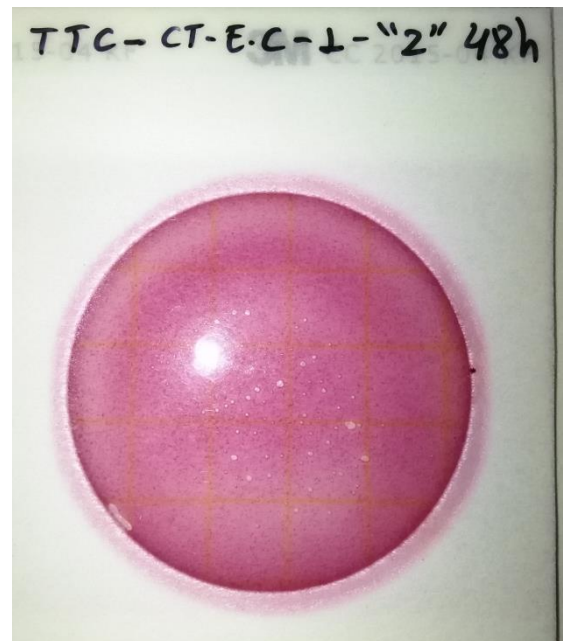
Fotografía N° 25: Recuento de Mesofilos aerobios con el tratamiento combinado de aceites esenciales y Ac. Láctico – concentración control a 0 h



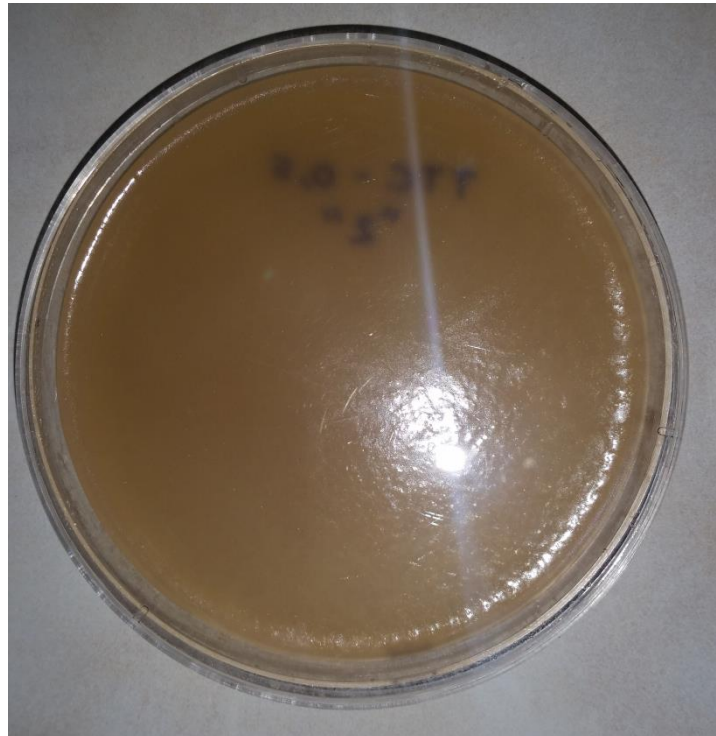
Fotografía N° 26: Recuento de Mesofilos aerobios con el tratamiento combinado de aceites esenciales y Ac. Láctico – concentración control a 0 h



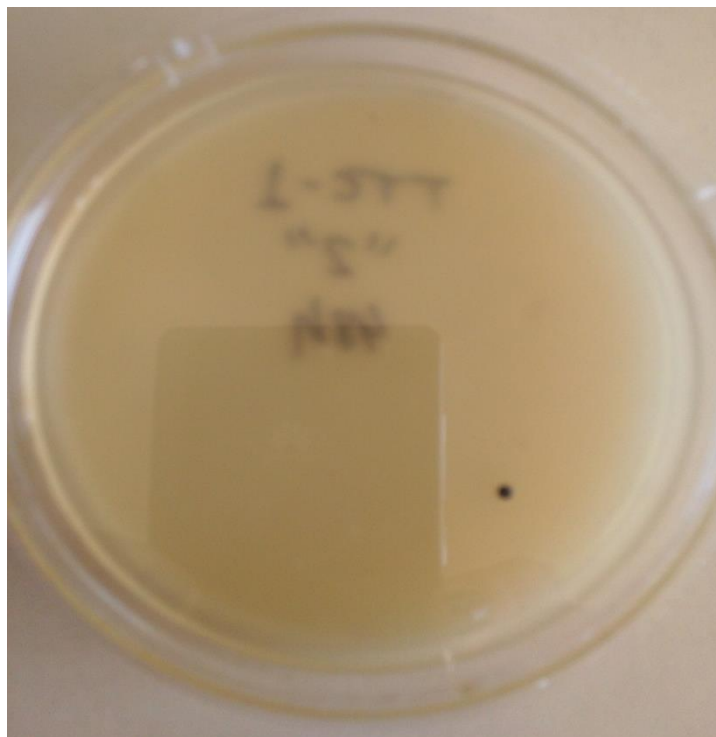
Fotografía N° 27: Recuento de Coliformes totales y *E. coli* con el tratamiento combinado de aceites esencial y Ac. Láctico – concentración 1% a 24 h



Fotografía N° 28: Recuento de Coliformes totales y *E. coli* con el tratamiento combinado de aceites esencial y Ac. Láctico – concentración 1% a 48 h



**Fotografía N° 29: Recuento de *S. aureus* con el tratamiento combinado de aceite esencial y ac. láctico – concentración 1% a 0 h**



**Fotografía N° 30: Recuento de *S. aureus* con el tratamiento combinado de aceite esencial y ac. láctico – concentración 1% a 48 h**

## E. Tablas de Recuentos Bacterianos

RECUESTO DE BACTERIAS AEROBIAS MESOFILOS TOTALES (UFC/mL) SEGÚN CONTROL, CONCENTRACIONES DE ACEITES ESENCIALES, ACIDO LACTICO Y TIEMPO DE EXPOSICION																				
Tiempo (Horas)	Aceite Esencial de Romero (AER) N (UFC/mL)					Aceite Esencial de Ajo (AEA) N (UFC/mL)					Acido Lactico (AL) N (UFC/mL)					Tratamiento Combinado (TTC) N (UFC/mL)				
	CONCENTRACION																			
	0 (%)	0.3 (%)	0.5 (%)	0.7 (%)	1 (%)	0 (%)	0.3 (%)	0.5 (%)	0.7 (%)	1 (%)	0 (%)	0.3 (%)	0.5 (%)	0.7 (%)	1 (%)	0 (%)	0.3 (%)	0.5 (%)	0.7 (%)	1 (%)
0	> 1600	> 1600	> 1600	950	646	> 1600	1004	928.1	686	548	> 1600	290	29	0	0	> 1600	51	0	0	0
	> 1600	> 1600	> 1600	1224	868	> 1600	978	908.8	548	544	> 1600	463	10	0	0	> 1600	47	0	0	0
	> 1600	> 1600	> 1600	1232	814	> 1600	1090	889.5	380	324	> 1600	598	31	0	0	> 1600	22	0	0	0
	> 1600	> 1600	> 1600	1358	906	> 1600	941	870.2	528	396	> 1600	384	21	0	0	> 1600	30	1	0	0
	> 1600	> 1600	> 1600	1288	852	> 1600	993	850.9	547	423	> 1600	308	16	0	0	> 1600	29	0	0	0
24	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	560	74	4	0	> 1600	380	0	0	0
	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	428	105	6	0	> 1600	485	2	0	0
	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	545	123	2	0	> 1600	462	1	0	0
	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	375	89	1	0	> 1600	507	2	2	0
	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	456	79	3	0	> 1600	446	0	0	0
48	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	610	0	> 1600	> 1600	150	123	95
	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	456	0	> 1600	> 1600	185	126	110
	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	822	0	> 1600	> 1600	142	114	125
	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	640	0	> 1600	> 1600	158	139	14
	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	515	0	> 1600	> 1600	127	124	155
72	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	2	0	> 1600	170	16	0	0
	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	10	0	> 1600	160	12	0	0
	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	6	0	> 1600	168	21	0	0
	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	3	0	> 1600	180	20	0	0
	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	0	0	> 1600	200	24	0	0

Tabla N°5: Recuento de Mesofilos aerobios totales (UFC/mL) según control, concentración de aceites esenciales, ácido láctico y tiempo de exposición.



RECUENTO DE BACTERIAS STAPHYLOCOCCUS AUREUS (UFC/mL) SEGÚN CONTROL, CONCENTRACIONES DE ACEITES ESENCIALES, ACIDO LACTICO Y TIEMPO DE EXPOSICION																				
Tiempo (Horas)	Aceite Esencial de Romero (AER) N (UFC/mL)					Aceite Esencial de Ajo (AEA) N (UFC/mL)					Acido Lactico (AL) N (UFC/mL)					Tratamiento Combinado (TTC) N (UFC/mL)				
	CONCENTRACION																			
	0 (%)	0.3 (%)	0.5 (%)	0.7 (%)	1 (%)	0 (%)	0.3 (%)	0.5 (%)	0.7 (%)	1 (%)	0 (%)	0.3 (%)	0.5 (%)	0.7 (%)	1 (%)	0 (%)	0.3 (%)	0.5 (%)	0.7 (%)	1 (%)
0	41	21	0	11	0	30	0	0	0	0	40	0	0	1	0	50	0	0	0	0
	29	19	5	9	2	48	0	3	0	0	52	0	0	0	0	65	0	0	0	0
	92	17	34	12	2	29	0	0	0	0	26	1	1	0	0	34	0	0	0	0
	115	50	20	1	0	31	0	1	2	0	29	0	0	0	0	40	1	0	0	0
	64	31	22	9	1	26	0	1	1	0	32	0	1	1	0	32	1	0	0	0
24	876	488	486	26	32	956	86	63	87	9	913	1	10	0	0	991	2	10	0	0
	954	530	432	352	8	831	142	89	16	19	887	2	3	0	0	886	3	2	0	0
	1021	325	526	203	12	890	128	77	82	48	862	0	0	0	0	956	0	0	0	0
	925	566	521	198	26	915	89	67	45	26	905	2	7	0	0	977	3	2	0	0
	897	531	600	184	24	940	96	76	53	37	938	1	6	0	0	904	2	4	0	0
48	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	980	> 1600	> 1600	> 1600	1003	984	> 1600	1116	569	11	0	> 1600	169	0	1	0
	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	912	> 1600	> 1600	> 1600	950	866	> 1600	1338	478	47	0	> 1600	176	4	0	1
	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	710	> 1600	> 1600	> 1600	640	742	> 1600	1025	138	21	0	> 1600	139	10	1	1
	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	830	> 1600	> 1600	> 1600	879	824	> 1600	1094	297	32	0	> 1600	156	4	0	0
	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	812	> 1600	> 1600	> 1600	925	881	> 1600	1145	346	24	0	> 1600	148	3	1	0
72	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	470	200	0	> 1600	199	40	8	0
	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	520	240	0	> 1600	232	35	4	0
	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	600	170	0	> 1600	226	31	6	0
	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	420	210	0	> 1600	220	48	4	0
	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	570	190	0	> 1600	205	30	5	0

Tabla N°6: Recuento de Staphylococcus aureus (UFC/mL) según control, concentración de aceites esenciales, ácido láctico y tiempo de exposición.



RECUENTO DE BACTERIAS AEROBIAS ECHERICHIA COLI (UFC/mL) SEGÚN CONTROL, CONCENTRACIONES DE ACEITES ESENCIALES, ACIDO LACTICO Y TIEMPO DE EXPOSICION																				
Tiempo (Horas)	Aceite Esencial de Romero (AER) N (UFC/mL)					Aceite Esencial de Ajo (AEA) N (UFC/mL)					Acido Lactico (AL) N (UFC/mL)					Tratamiento Combinado (TTC) N (UFC/mL)				
	CONCENTRACION																			
	0 (%)	0.3 (%)	0.5 (%)	0.7 (%)	1 (%)	0 (%)	0.3 (%)	0.5 (%)	0.7 (%)	1 (%)	0 (%)	0.3 (%)	0.5 (%)	0.7 (%)	1 (%)	0 (%)	0.3 (%)	0.5 (%)	0.7 (%)	1 (%)
0	94	55	43	2	0	117	65	42	33	35	141	0	0	0	0	131	0	0	0	0
	112	65	32	1	0	141	51	33	46	21	106	0	0	0	0	137	0	0	0	0
	106	34	37	0	0	135	56	28	31	29	86	0	0	0	0	145	0	0	0	0
	85	47	52	1	0	110	41	46	29	25	133	0	0	0	0	141	0	0	0	0
	92	39	41	0	0	126	61	39	22	32	142	0	0	0	0	144	0	0	0	0
24	210	27	22	19	14	255	21	22	17	16	275	0	0	0	0	215	0	0	0	0
	186	21	10	11	17	243	26	25	14	14	262	1	0	0	0	262	0	0	0	0
	195	36	16	13	13	210	14	14	21	18	232	0	0	0	0	252	0	0	0	0
	245	41	14	14	15	214	11	18	12	12	249	0	1	0	0	239	0	0	0	0
	222	19	20	18	14	228	23	14	18	16	218	1	0	0	0	248	0	0	0	0
48	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	0	0	0	0	>1600	0	0	0	0
	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	1	0	0	0	>1600	0	0	0	0
	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	0	0	0	0	>1600	0	0	0	0
	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	2	0	0	0	>1600	0	0	0	0
	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	0	0	0	0	>1600	0	0	0	0
72	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	21	1	0	0	>1600	20	1	0	0
	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	18	2	0	0	>1600	15	0	0	0
	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	12	0	1	0	>1600	10	1	0	0
	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	16	0	1	0	>1600	11	1	0	0
	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600	17	1	0	0	>1600	14	0	0	0

Tabla N°7: Recuento de *Escherichia coli* (UFC/mL) según control, concentración de aceites esenciales, ácido láctico y tiempo de exposición.

RECUESTO DE BACTERIAS DE COLIFORMES TOTALES (UFC/mL) SEGÚN CONTROL, CONCENTRACIONES DE ACEITES ESENCIALES, ACIDO LACTICO Y TIEMPO DE EXPOSICION																				
Tiempo (Horas)	Aceite Esencial de Romero (AER) N (UFC/mL)					Aceite Esencial de Ajo (AEA) N (UFC/mL)					Acido Lactico (AL) N (UFC/mL)					Tratamiento Combinado (TTC) N (UFC/mL)				
	CONCENTRACION																			
	0 (%)	0.3 (%)	0.5 (%)	0.7 (%)	1 (%)	0 (%)	0.3 (%)	0.5 (%)	0.7 (%)	1 (%)	0 (%)	0.3 (%)	0.5 (%)	0.7 (%)	1 (%)	0 (%)	0.3 (%)	0.5 (%)	0.7 (%)	1 (%)
0	696	412	362	198	139	632	356	262	163	145	834	9	9	4	3	898	5	0	0	1
	746	492	369	244	109	623	312	206	152	73	757	16	5	2	0	812	4	1	1	0
	805	470	343	221	125	759	346	251	144	166	905	12	4	1	1	930	7	6	1	0
	787	486	378	225	117	726	365	225	181	171	771	7	6	4	1	726	4	0	0	0
	684	445	350	236	146	812	341	246	169	189	854	14	5	3	0	793	9	5	1	1
24	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	468	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	467	> 1600	463	464	24	3	> 1600	53	1	4	6
	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	369	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	432	> 1600	462	585	19	0	> 1600	61	0	6	3
	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	418	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	444	> 1600	480	463	15	0	> 1600	58	2	0	0
	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	401	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	475	> 1600	503	509	21	0	> 1600	65	0	2	1
	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	395	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	462	> 1600	512	538	20	1	> 1600	49	1	1	0
48	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	0	> 1600	> 1600	35	14	4
	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	6	> 1600	> 1600	28	9	2
	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	1	> 1600	> 1600	25	17	2
	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	4	> 1600	> 1600	14	8	0
	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	0	> 1600	> 1600	12	11	1
72	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	1	> 1600	> 1600	25	20	2
	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	0	> 1600	> 1600	32	18	3
	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	2	> 1600	> 1600	48	16	0
	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	5	> 1600	> 1600	59	31	1
	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	> 1600	2	> 1600	> 1600	68	29	1

Tabla N°8: Recuento de Coliformes totales (UFC/mL) según control, concentración de aceites esenciales, ácido láctico y tiempo de exposición.