



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
E.A.P. DE BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA



TESIS

ACCIÓN DESINFECTANTE DEL ACEITE ESENCIAL DE *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) SOBRE SUPERFICIES DE LABORATORIOS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO - BIOTECNÓLOGO

PRESENTADO POR:

BACH. MÓNICA LISSET QUISPE CRUZ

ASESORA:

DRA. MBLGA. CLAUDIA CAROLINA RODRÍGUEZ ULLOA

CO-ASESORA:

DRA. Q. F. JÉSSICA NATHALIE BARDALES VALDIVIA

CAJAMARCA – PERÚ

2023

COPYRIGHT©
MÓNICA LISSET QUISPE CRUZ
Todos los derechos reservados

FICHA CATALOGRÁFICA

Quispe, C. 2023. **Acción desinfectante del aceite esencial de Rosmarinus officinalis L. (Romero) sobre superficies de laboratorios** / Mónica Lisset Quispe Cruz.

Escuela Académico Profesional de Biología y Biotecnología

Asesora: Dra. Mblga. Claudia Carolina Rodríguez Ulloa

Co Asesora: Dra. Q. F. Jéssica Nathalie Bardales Valdivia

Disertación académica para obtener el título profesional de Biólogo Biotecnólogo –
UNC 2023

ACCIÓN DESINFECTANTE DEL ACEITE ESENCIAL DE *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) SOBRE SUPERFICIES DE LABORATORIOS

AUTOR: Bach. Mónica Lisset Quispe Cruz.

ASESOR: Dra. . Mblga. Claudia Carolina Rodríguez Ulloa

CO ASESOR: Dra. Q. F. Jéssica Nathalie Bardales Valdivia

Tesis evaluada y aprobada para la obtención del Título Profesional de Biólogo Biotecnólogo de la Universidad Nacional de Cajamarca, por los siguientes jurados.

JURADO EVALUADOR



.....

Presidente

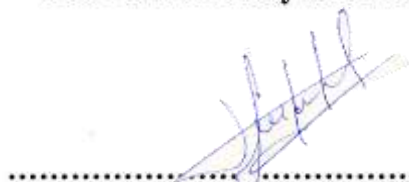
M. Cs. Rodolfo Raúl Orejuela Chirinos



.....

Secretaria

Dra. Carmen Eddy Medina Rodríguez



.....

Vocal

M. Cs. Luis Felipe Valdez Núñez

Cajamarca, 2023 - Perú



MODALIDAD "A"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO

En Cajamarca, siendo las diez del 19 de Junio del 2023, los integrantes del Jurado Evaluador para la revisión y sustentación de la tesis, designados en Consejo de Facultad a propuesta del Departamento Académico, reunidos en el ambiente 11-305 de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca, dan inicio a la sustentación de tesis denominada: Acción Desinfectante del aceite esencial de Rosmarinus officinalis L (Romero) sobre superficies de laboratorios

dél (a) Bachiller en Ciencias Biológicas:
Mónica Lisset Quipe Cruz

Siendo las once de la mañana del mismo día, se da por finalizado el proceso de evaluación, el Jurado Evaluador da su veredicto en los siguientes términos: APROBADA, con el calificativo de 17, con lo cual el (la) Bachiller en Ciencias Biológicas, se encuentra APTA para la obtención del Título Profesional de: BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO.

Table with 2 columns: Miembros Jurado Evaluador (Nombres y Apellidos) and Firma. Rows include Presidente (M.Cs. Rodolfo Raúl Orjuela Chirinos), Secretario(a) (Dra. Carmen Eddy Medina Rodríguez), Vocal (M.Cs. Isis Felipe Valdez Núñez), Accesitaria (Dr. Demetrio Cieza Yrigoin), Asesor (a) (Dra Mblga. Claudia Carolina Rodríguez), and Co Asesor (a) (Mg Q.F. Jessica Paredes Valdini).

Términos de Calificación:
EXCELENTE (19-20)
REGULAR (12-13)

MUY BUENO (17-18)
REGULAR BAJO (11)

BUENO (14-16)
DESAPROBADO (10 a menos)

“Un poco de ciencia aleja de Dios, pero mucha ciencia devuelve a Él”.

Louis Pasteur

Agradecimiento

A Dios por darme la fuerza y voluntad necesaria para culminar esta meta académica. A mis padres, y hermanos por su apoyo, consejos y ánimos, y a las personas que han sido soporte para hacer posible esta tesis.

A mis asesoras, Dra. Claudia Rodríguez Ulloa y la Dra. Q.F. Jéssica Nathalie Bardales Valdivia, por su preocupación, dedicarme su valioso tiempo, compartir sus conocimientos y colaborar en la dirección de la presente tesis.

Tabla de contenido

ACCIÓN DESINFECTANTE DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Romero) SOBRE SUPERFICIES DE LABORATORIO	xii
Resumen	xiii
Abstract	xiv
CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN	1
2.2.1. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (romero)	5
2.2.2 Metabolitos de las plantas	7
2.2.3. Aceites esenciales	8
2.2.4. Microorganismos de superficies	13
2.2.5. Desinfectantes	13
CAPÍTULO III	17
DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS	17
3.1. Nivel de Investigación	17
3.2. Tipo y diseño de estudio	17
3.3. Material biológico	17
3.4. Unidades de estudio	17
3.5. Lugar de muestreo	17
3.6. Toma de muestras	18
3.6.1. Muestras vegetales	18
3.6.2. Muestras de superficies de mesas	18
3.7. Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos	19
3.7.1 Extracción de aceites esenciales	19
3.7.2. Aislamiento e identificación de bacterias de superficies de mesas de laboratorios	19
3.7.3. Evaluación de la eficiencia bactericida (Método del coeficiente fenólico modificado) del aceite esencial de romero	20
3.7.4. Evaluación bactericida del desinfectante sobre superficie	21
3.7.4.1. Consideraciones Preliminares	21
3.7.4.2. Preparación de solución neutralizante	22
3.7.4.3. Preparación del desinfectante a base de aceite esencial de romero	22
3.7.4.4. Evaluación bactericida del desinfectante a base de aceite esencial de romero	23
3.8. Técnicas de Procesamiento y Análisis de Datos	25

CAPÍTULO IV	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
4.1. Resultados.....	26
4.1.1. Identificación de bacterias de superficies de mesas de laboratorios	26
4.1.2. Evaluación de la eficiencia bactericida (Método del coeficiente fenólico modificado) del aceite esencial de romero	27
4.1.3. Evaluación de la eficiencia bactericida del desinfectante a base de aceite esencial de romero al 50 %	28
4.2. Discusión	29
CAPÍTULO V	35
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	35
5.1 Conclusiones.....	35
5.2 Recomendaciones	35
REFERENCIAS.....	36
ANEXOS Y APÉNDICES	42
ANEXOS.....	42
Anexo 1. Constancia taxonómica del vegetal.....	42
APÉNDICES.....	43
APÉNDICE 1. Lugar de recolección de vegetal.	43
APÉNDICE 2. Obtención de aceite esencial de romero mediante destilación por arrastre de vapor de agua.	44
APÉNDICE 3. Caracterización fenotípica y bioquímica de las bacterias aisladas de las mesas de los laboratorios.	45
APÉNDICE 4. Evaluación de la eficiencia bactericida (Método del coeficiente fenólico modificado)	46
APÉNDICE 5. Preparación del desinfectante a base de aceite esencial de romero.....	51
APÉNDICE 6. Evaluación de la eficiencia bactericida sobre superficie.	52
APÉNDICE 7. Pruebas de hipótesis.....	54

Lista de abreviaciones

AE: aceite esencial

AER: aceite esencial de romero

DAER: Desinfectante a base de aceite esencial de romero

DMSO: dimetilsulfóxido

MIC: concentración mínima inhibitoria

MBC: mínima concentración bactericida

Ppm: partes por millón

Glosario

Aceite esencial: Son líquidos volátiles aceitosos e hidrofóbicos como mezclas de alcoholes, aldehídos, cetonas y terpenoides que se encuentran altamente concentrados generados por diferentes partes de la planta (raíces, frutas, hojas, semillas, brotes, rizomas, flores y plantas enteras) pertenecientes a una especie botánica distinta, los cuales son los responsables de los olores y sabores característicos de algunos vegetales (Ávalos García and Pérez-Urria, 2010; Rouf *et al.*, 2020).

Coefficiente fenólico, coeficiente fenol o coeficiente de Lancet: Es una técnica de estandarización para comparar el poder bactericida de un compuesto en relación con el fenol. El resultado representa el número que indica las veces que el desinfectante es más potente que el fenol (AOAC, 2000).

Eficiencia germicida: Es el porcentaje de microorganismos que son destruidos por la acción del desinfectante (Mamani Urquizo, 2008).

Fenol: Es uno de los más antiguos de los antisépticos quirúrgicos, hoy en día ya no es utilizado como desinfectante por sus efectos corrosivos (Lastra Bello, 2016).

Metabolito primario: Son moléculas de aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos, comunes en todas las células y son necesarias para su funcionamiento y el de los organismos, están presentes en todas las plantas y desempeñando las mismas funciones (Ávalos García and Pérez-Urria, 2010).

Metabolito secundario: Son moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, en la planta (Ávalos García and Pérez-Urria, 2010).

Terpenos: Son los constituyentes principales de los aceites esenciales, son un grupo de productos naturales que incluyen todas aquellas sustancias químicas que derivan biosintéticamente del ácido mevalónico (AMV) (Palá Paúl, 2002).

ACCIÓN DESINFECTANTE DEL ACEITE ESENCIAL DE *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) SOBRE SUPERFICIES DE LABORATORIO

Resumen

En este estudio se determinó la acción bactericida del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) para ser usado como desinfectante sobre superficies de mesas de los laboratorios del Área de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional de Cajamarca. Se obtuvo el aceite esencial de romero (AER) mediante destilación por arrastre de vapor de agua. Se evaluó la eficiencia bactericida del AER al 10 %, 50 % y 100 %, usando como diluyente dimetilsulfóxido (DMSO) y ceftriaxona como control positivo; también se evaluó la eficiencia bactericida sobre superficie de una formulación desinfectante de AER, en un tiempo de contacto de 5 minutos, sobre microorganismos aislados de las superficies de las mesas de los laboratorios utilizando como control positivo hipoclorito de sodio al 0,5 %. En el ensayo de la eficiencia bactericida del AER, las concentraciones del AER al 50 % y 100 % con tiempo de contacto de 1 minuto presentaron una eficiencia bactericida del 100 % en todos los aislamientos bacterianos probados; sin embargo, el AER al 10 % solo demostró eficiencia bactericida de 100 % en el aislamiento M8(1). En contraste, cuando se aplicó el AER al 10 % con un tiempo de contacto de 5 minutos, se observó eficiencia del 100 % en la mayoría de aislamientos, excepto en el aislamiento M6(1) donde se determinó una eficiencia del 90,38 %. En el ensayo de la eficiencia bactericida del desinfectante de AER al 50 % presentó una eficiencia bactericida sobre *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* del 99,9 % y en *Staphylococcus aureus* y *Bacillus* spp. una eficiencia de 79,13 % y 76,47 %, respectivamente. Se concluye que el desinfectante en base a AER al 50 % mostró una notable actividad antibacteriana, lo que sugiere su potencial uso como desinfectante.

Palabras clave: Aceite esencial, *Rosmarinus officinalis* L, eficiencia bacteriana, desinfectante, destilación por arrastre de vapor.

Abstract

This study, the bactericidal action of *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) essential oil was determined for use as a disinfectant on the surfaces of the tables in the laboratories of the Microbiology and Parasitology Area of the National University of Cajamarca. Rosemary essential oil (REO) was obtained by steam distillation. The bactericidal efficiency of REO was evaluated at 10 %, 50 % and 100 %, using dimethyl sulfoxide (DMSO) as diluent and ceftriaxone as positive control; the bactericidal efficiency was also evaluated on the surface of a disinfectant formulation of REO, in a contact time of 5 minutes, on microorganisms isolated from the surfaces of the laboratory tables using 0,5 % sodium hypochlorite as positive control. In the test of the bactericidal efficiency of REO, the concentrations of 50 % and 100 % REO with a contact time of 1 minute showed a bactericidal efficiency of 100 % on all the bacterial isolates tested; however, 10 % REO only showed a bactericidal efficiency of 100 % on isolate M8(1). In contrast, when 10 % REO was applied with a contact time of 5 minutes, 100 % efficiency was observed in most isolates, except for isolate M6(1) where 90,38 % efficiency was determined. In the test of bactericidal efficiency of the REO disinfectant at 50 %, it presented a bactericidal efficiency on *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* of 99,9 % and on *Staphylococcus aureus* and *Bacillus* spp. an efficiency of 79,13 % and 76,47 %, respectively. According to the results, the 50 % REO disinfectant showed a remarkable antibacterial activity, suggesting its potential use as a disinfectant.

Key words: essential oil, *Rosmarinus officinalis* L., bacterial efficiency, disinfectant, steam distillation.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Los laboratorios de microbiología son el lugar donde se realizan prácticas y los estudiantes manejan muestras biológicas como: orina, heces, sangre, suero, plasma, saliva, exudados faríngeos; así como bacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp. *Shigella* spp, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, entre otras. Por tal motivo hay un alto riesgo de contaminación del ambiente, así como de las superficies inertes y vivas, cuando no se aplican medidas de limpieza y desinfección que forman parte de las principales medidas de bioseguridad que se tienen que realizar al finalizar el trabajo en el laboratorio.

Las superficies inertes como las mesas de los laboratorios son las zonas más susceptibles a la contaminación continua; sin embargo, existen procedimientos como la desinfección que reducen o eliminan los microorganismos que permanecen en las superficies después de la limpieza. Este proceso requiere el uso de sustancias activas químicas que causen inhibición o muerte de las células microbianas como hipoclorito de sodio y etanol (70 ° y 96 °) los cuales son desinfectantes utilizados con frecuencia en los laboratorios debido a su actividad antimicrobiana de amplio espectro (McDonnell and Russell, 1999).

Un desinfectante actúa sobre los elementos vitales del microorganismo y logra su reducción o muerte, lo cual es fundamental para prevenir la transmisión de patógenos infecciosos desde superficies contaminadas. Además, un desinfectante ideal se caracteriza por poseer un amplio espectro de acción antimicrobiano en poco tiempo, presentar mínima toxicidad, no dañar las superficies sobre las cuales se aplica, tener

efecto residual, funcionar en superficies con restos de carga biológica, ser de fácil aplicación, presentar poco olor y ser de bajo costo (Gutiérrez *et al.*, 2008; Martínez Bagur, 2013).

Si bien los desinfectantes comerciales inhiben el desarrollo de microorganismos, pueden ocasionar daños si no se usan adecuadamente ya que sus componentes pueden resultar muy tóxicos para nuestro organismo produciendo irritaciones, infecciones y alergias (MINSA, 2002). Hoy en día se pretende reemplazar estas sustancias químicas por productos naturales debido a los beneficios que podrían proporcionar, así tenemos que los aceites esenciales poseen un buen potencial antimicrobiano, antifúngico, antiparasitario, antioxidantes, antiinflamatorias, cicatrizantes, anticancerígenos, entre otros (Sharifi *et al.*, 2017; Flores Villa *et al.*, 2020; Rouf *et al.*, 2020; Dolghi *et al.*, 2022).

Rosmarinus officinalis L. conocido comúnmente como “romero” es una de las plantas de mayor importancia dentro de la familia *Lamiaceae*, es una planta aromática que presenta propiedades terapéuticas y debido a su alto contenido de aceites esenciales como: α -pineno, β -pineno, canfeno, ésteres terpénicos como el 1,8-cineol, alcanfor, linalol, verbinol, carnosol, rosmanol, β -cariofileno tiene efecto desinfectante (Hussain *et al.*, 2010; Satyal *et al.*, 2017).

El propósito de este estudio fue determinar la acción bactericida del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) para ser usado como desinfectante sobre superficies de mesas de los laboratorios del Área de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional de Cajamarca.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la investigación

Gonzales *et al.* analizaron la presencia de microorganismos en superficies inertes (mesas, charolas y microscopios) de los laboratorios de enseñanza en México con el método del hisopo empleando una plantilla de 25 x 25 cm. Encontraron mayor frecuencia de desarrollo bacteriano en las mesas e identificaron *Salmonella paratyphi A* y *Salmonella* spp. como bacterias patógenas y también aislaron bacterias patógenas oportunistas *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus epidermis*, *Micrococcus luteus*, *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter* spp., *Providencia alcalifaciens* y bacilos no fermentadores (González Herrera, Lozada Méndez and Santiago Roque, 2014)

Jardak *et al.* (2017) evaluaron la actividad antibacteriana del aceite esencial de romero por el método de microdilución, mostrando inhibición y efecto bactericida contra *Staphylococcus aureus* ATCC 9144 y *S. epidermidis* S61, con una concentración inhibitoria mínima (MIC) de 1,25 - 2,5 y de 0,312 - 0,625 $\mu\text{L}/\text{mL}$ respectivamente, y la concentración bactericida mínima (MBC) fue de 5 y 2,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, respectivamente; así mismo, este aceite mostró una inhibición de la biopelícula de *S. epidermidis*.

Un estudio para determinar la composición química y propiedades antimicrobianas de aceite esencial de romero sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli in vitro*, realizado por Abolfazl Jafari y Pashazadeh, usaron 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 y 0,312 % de aceite esencial para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la mínima concentración bactericida (MBC). Donde obtuvieron MIC y MBC en *S. aureus* (0,625 y 1,25 %) y *E. coli* (1,25 y 2,5 %) respectivamente. Demostrando que el aceite esencial de romero tiene una notable actividad antibacteriana (Abolfazl and Pashazadeh, 2020).

Una investigación realizada por Elyemni *et al.* tuvo como objetivo la evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial (AE) de *R. officinalis* recolectado de plantas cultivadas y silvestres de dos regiones diferentes de Marruecos (Fez y Figuig). Utilizando los métodos de dilución en caldo contra levaduras, cuatro cepas bacterianas y dos mohos. Ambos AE mostraron una buena actividad antimicrobiana hacia bacterias gram positivas (MIC 0,315–1,25 mg/mL) y sobre bacterias gram negativas (MIC 1.25–5 mg/mL), siendo *P. aeruginosa* el microorganismo menos sensible al AE de romero con 2,5 y 5 mg/mL de MIC, finalmente concluyeron que los AE de *R. officinalis* tienen uso potencial como antimicrobiano natural en las industrias de alimentos y productos farmacéuticos (Elyemni *et al.*, 2022).

En Colombia, (Castaño *et al.*, 2010) determinaron la actividad antimicrobiana del aceite esencial de romero, mostrando un amplio espectro de acción antimicrobiana tanto para bacterias gram positivas como gram negativas con MIC entre 512 – 4096 ppm; sin embargo, un estudio realizado en Pakistán por Hussain *et al.* (2010), mostró que el aceite esencial de romero posee muy buenos efectos antimicrobianos sobre bacterias gram positivas (IZ (zona de inhibición) 18,0 – 24,2; MIC 0,20 - 0,48 mg/mL) que sobre bacterias gram negativas (IZ 12,8 – 17,5 ; MIC 1,16 – 1,72 mg/mL) (Castaño *et al.*, 2010).

Otra investigación comparó el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* (canela) y *R. officinalis* L. (romero) al 50 % en la desinfección de conductos radiculares contaminados con *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Seleccionó 40 dientes premolares y los dividió en cuatro grupos experimentales, grupo 1: aceite esencial de canela y romero al 50 %, grupo 2: aceite esencial de canela al 50 %, grupo 3: aceite esencial de romero al 50 %, grupo 4: hipoclorito al 3 % (Hiposol®: marca de uso odontológico). Obtuvo el mayor promedio de la diferencia de las unidades formadoras de

colonias (UFC) con el aceite esencial de romero al 50 % (607 700 UFC), mientras que el menor promedio fue con el aceite esencial de canela y romero al 50 % (360540 UFC). Los resultados demostraron que el efecto antimicrobiano de ambas soluciones aceites esenciales tuvo efectividad sobre *E. faecalis*, pero no presentó sinergismo, siendo más efectivo el aceite esencial de romero al 50 % e hipoclorito al 3 % (Vega Otiniano, 2020).

Un estudio evaluó el uso del aceite esencial de romero como desinfectante de la carga bacteriana en la cáscara de huevo y su efecto sobre los parámetros de eclosión. Utilizaron un total de 200 huevos de codorniz y fueron divididos en tres grupos: control (huevos no desinfectados) y dos tratamientos con huevos desinfectados con 10 µL/mL y 100 µL/mL de aceite esencial de romero (AEs/agua destilada). Los resultados mostraron que los grupos tratados con AE de romero tenían la carga bacteriana más baja. Además, la incubabilidad de los huevos aumentó significativamente en el grupo de 10 µL/mL. Sin embargo, la mayor tasa de mortalidad embrionaria se observó en el grupo de 100 µL/mL. Los grupos tratados con AE de romero mostraron ambos los mayores promedios sobre el peso corporal del pollito. Se concluye que el AE de romero a 10 µL/mL puede ser una alternativa interesante como desinfectante natural y seguro de la cáscara del huevo (Aberbour *et al.*, 2022).

2.2. Bases teóricas

2.2.1. *Rosmarinus officinalis* L. (romero)

Rosmarinus officinalis L., conocido comúnmente como "romero", es un arbusto aromático de hojas perennes en forma de aguja, pequeñas y abundantes (Cutillas Gomariz, 2017). Es nativo del Mediterráneo y Asia (Satyal *et al.*, 2017). Tiene una corola

bilabiada de color rosa, blanco o ligeramente violeta. Crece en todo tipo de suelos, sobre todo en los arenosos y permeables (Cutillas Gomariz, 2017).

Pertenece a la familia *Lamiaceae*, que es bien conocida por sus aceites esenciales biológicamente activos, como por ejemplo en albahaca, lavanda, menta, salvia y tomillo. Existen estudios que reportan que en las plantas de esta familia hay una gran variedad de compuestos como terpenos, iridoides, flavonoides y compuestos fenólicos. Algunas especies de plantas de la familia *Lamiaceae* contienen en grandes cantidades ácidos fenólicos, como ácido rosmarínico, los cuales presentan propiedades antibacterianas, antivirales, antioxidantes y antiinflamatorias (Andrade *et al.*, 2018).

R. officinalis L. es una de las especies del género *Rosmarinus* nombrada por Carl Linnaeus, como se muestra a continuación en la tabla 1 (Andrade *et al.*, 2018).

Tabla 1. Clasificación científica de *Rosmarinus officinalis* L.

Clasificación taxonómica	
Reino:	<i>Plantae</i>
División:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase:	<i>Asteridae</i>
Orden:	<i>Lamiales</i>
Familia:	<i>Lamiaceae</i>
Género:	<i>Rosmarinus</i> .
Especie:	<i>R. officinalis</i>
Nomenclatura binomial:	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.

2.2.2 Metabolitos de las plantas

Las plantas contienen numerosos compuestos orgánicos denominados metabolitos primarios, necesarios para el desarrollo de la planta, entre ellos tenemos los azúcares o carbohidratos, que se producen como resultado de la fotosíntesis. Por otra parte, sintetizan en muy pequeñas cantidades diferentes compuestos químicos denominados en general como metabolitos secundarios, dado que no intervienen directamente en su metabolismo (Ávila Hernández and Molina Torres, 2017). Los metabolitos secundarios son producidos en diversas partes de la planta (semillas, flores, frutos, raíces, hojas y corteza) (Cutillas Gomariz, 2017).

Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular que participan en la protección contra herbívoros, bacterias, hongos, virus e incluso otras plantas competidoras. Además, algunas plantas utilizan metabolitos secundarios como señales para la comunicación entre plantas y microorganismos simbióticos, y también para atraer polinizadores y dispersores de semillas; la síntesis del metabolito secundario depende de la etapa de desarrollo de la planta (Sepúlveda Jiménez, Porta Ducoing and Rocha Sosa, 2003; Yang *et al.*, 2018).

2.2.2.2 Factores que intervienen en la producción de metabolitos

Para la mayoría de las plantas, los factores externos como la luz, temperatura, agua del suelo, fertilidad del suelo y salinidad pueden afectar significativamente su capacidad de sintetizar metabolitos secundarios, lo que produce cambios en los perfiles fitoquímicos que intervienen en la producción de sustancias bioactivas. En otras palabras, los metabolitos secundarios de las plantas pueden generarse gradualmente en respuesta al

estrés ambiental y, por lo tanto, el metabolismo secundario de las plantas debe considerarse como un comportamiento de las plantas, que es en parte la capacidad de adaptación y supervivencia en respuesta a los estímulos ambientales durante la vida. Debido a que las plantas medicinales tienen una composición química compleja y variable, el tipo y la cantidad de metabolitos secundarios, y los efectos biológicos, se determinan a menudo de acuerdo con las condiciones ambientales (Yang *et al.*, 2018). Sin embargo, según Satyal *et al.* (2017), los monoterpenoides en aceites de romero permanecen relativamente constantes independientemente de los factores ambientales (Satyal *et al.*, 2017).

2.2.3. Aceites esenciales

Muchas plantas producen mezclas de alcoholes, aldehídos, cetonas y terpenoides denominadas aceites esenciales, estos son los responsables de olores y sabores característicos de las plantas, algunos actúan como repelentes de insectos o insecticidas (Ávalos García and Pérez-Urria, 2010). Los aceites esenciales son fracciones líquidas volátiles, responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), alimentaria (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (principios activos y saborizantes) (Palá Paúl, 2002).

Los aceites esenciales pueden tener la naturaleza química: compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), terpenoides (monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos) y fenilpropanoides (Palá Paúl, 2002). Tienen propiedades antimicrobianas contra un amplio rango de bacterias y hongos (Bastidas, Valencia and Oliva, 2017) y pueden ser extraídos mediante métodos físicos como la destilación a vapor o hidrodestilación (Torrenegra Alarcón, Nerlis Pájaro and León Méndez, 2017). La composición de los aceites esenciales dependerá de la planta de

origen (factores genéticos) y de factores exógenos como el clima, el tipo de suelo y las técnicas de cultivo (Cutillas Gomariz, 2017).

2.2.3.1. Composición química del aceite esencial de romero

La composición química de los aceites esenciales varía según su localización de la planta, factores ambientales y su genoma. Los principales constituyentes del aceite esencial de romero son alcanfor (5,0–21 %), 1,8-cineol (15–55 %), α -pineno (9,0–26 %), borneol (1,5–5,0 %), canfeno (2,5 –12 %), β -pineno (2,0–9,0 %) y limoneno (1,5–5,0 %), los cuales pueden variar según el estado vegetativo y las condiciones bioclimáticas; otros compuestos importantes son los terpenos.(Andrade *et al.*, 2018).

Un estudio comparativo sobre la composición química de los aceites esenciales de romero proveniente de Australia, Estados Unidos, Sudáfrica, Kenia, Nepal y Yemen mostraron en mayor porcentaje (+) - α -pineno (13,5 % - 37,7 %), 1,8 cineol (16,1 % - 29,3 %), (+) - verbenona (0,8 % - 16,9 %), (+) - borneol (2,1 % - 6,9 %), (+) - alcanfor (0,7 % - 7,0 %) y limoneno racémico (1,6% - 4,4 %). Sin embargo, el compuesto verbenona fue relativamente abundante en las muestras de EE. UU., Kenia y Yemen. La muestra de Yemen, presentó contenido de verbenona relativamente alto (18,6 %) y contenido relativamente bajo de α -pineno (13,5 %), junto con el cineinato de 1,8 (20,6 %) y el alcanfor (7,0 %) (Satyal *et al.*, 2017).

En Pakistán determinaron que los principales componentes del aceite esencial de *R. officinalis* L. fueron 1,8-cineol, alcanfor, α -pineno, limoneno, canfeno, y linalool. Los grupos de componentes químicos consistían principalmente de monoterpenos oxigenados (67,0 %), seguidos por hidrocarburos monoterpénicos (26,0 %) (Hussain *et al.*, 2010).

En Cuba, los componentes del aceite esencial de romero fueron α -pineno, camfeno, mirceno, limoneno, 1,8 cineol, alcanfor, borneol y cariofileno, encontrándose en mayor proporción 1,8 cineol con 21,5 %, alcanfor con 18,0 % y α -pineno con 15,3 % (Romeu, Botta and Díaz, 2007).

En Colombia, encontraron la presencia de veinte compuestos de aceite esencial de romero, los componentes mayoritarios corresponden a piperitona, linalool, y α -pineno, además este aceite contenía 11 monoterpenos oxigenados, 6 monoterpenos no oxigenados, 2 sesquiterpenos oxigenados y 1 no oxigenado (Coy and Eunice, 2013).

2.2.3.2. Terpenos

Los terpenos o terpenoides son los principales componentes de los aceites esenciales, suelen ser insolubles en agua, los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno (C5) que contienen: los monoterpenos con esqueleto C10, sesquiterpenos con esqueleto C15, diterpenos con esqueleto C20 y triterpenos con esqueleto C30, los tetraterpenos tienen 40 C y se habla de politerpenos cuando contienen más de 8 unidades de isopreno (Ávalos García and Pérez-Urria, 2010). Los terpenos superiores y sus derivados oxigenados están presentes en concentraciones muy bajas en los aceites esenciales (Andrade *et al.*, 2018).

Los terpenos tienen dos rutas biosintéticas, una es la ruta del mevalonato que se lleva a cabo en el citoplasma y la otra se denomina como ruta del metileritritol fosfato (MEP), la cual es independiente de la del mevalonato y que se realiza en los cloroplastos. Los sesquiterpenos, triterpenos y politerpenos se producen en el citosol y en el retículo endoplásmico, mientras que los monoterpenos, diterpenos, tetraterpenos y algunas quinonas

preniladas se originan en los cloroplastos (Ávalos García and Pérez-Urria, 2010; Ávila Hernández and Molina Torres, 2017).

2.2.3.3. Extracción de aceites esenciales

Existen diferentes técnicas para la extracción de aceites esenciales. La destilación por arrastre con vapor utiliza vapor de agua como elemento penetrante en la materia vegetal. En este caso, el material vegetal se coloca sobre una malla a cierta distancia del agua, que se encuentra en el fondo del destilador o en una caldera previa. Tras el calentamiento del agua se genera vapor de agua que atravesará el material vegetal, extrayendo el aceite esencial. Al igual que en la hidrodestilación, el vapor de agua y el aceite esencial se condensan y se separan por diferencias de densidad (Cutillas Gomariz, 2017). El aceite esencial de romero obtenido por destilación al vapor de las hojas (hasta un 2,5 %) es de incoloro a amarillo claro, insoluble en agua y con un aroma característico a alcanfor (Andrade *et al.*, 2018).

2.2.3.4. Actividad antimicrobiana

Estudios demuestran la actividad antimicrobiana del aceite esencial de hojas de romero con un amplio espectro de acción, tanto para bacterias gram positivas como gram negativas (Castaño *et al.*, 2010). Jardak *et al.* (2017) menciona que el aceite esencial de romero muestra mayor actividad antibacteriana contra bacterias gram positivas (Jardak *et al.*, 2017).

El carácter hidrofóbico de los aceites esenciales (Luna *et al.*, 2015; Torrenegra Alarcón, Nerlis Pájaro and León Méndez, 2017) le permite atravesar la pared celular de bacterias gram negativas a través de porinas, localizadas en la membrana externa y facilitan el transporte de nutrientes y sustancias de bajo peso molecular dentro de la célula, incluyendo agentes antimicrobianos (Torrenegra Alarcón, Nerlis Pájaro and León Méndez, 2017). Los aceites esenciales podrían ejercer actividad antibacteriana por la acumulación de sus componentes en la bicapa lipídica de la membrana del citoplasma causando el incremento de su permeabilidad (Mattos de Oliveira *et al.*, 2009; Torrenegra Alarcón, Nerlis Pájaro and León Méndez, 2017); cuando los aceites esenciales están en bajas concentraciones destruyen el sistema de enzimas, incluyendo las que implican la producción de energía celular (fuerza motriz de protones) y de respiración bacteriana; mientras que a altas concentraciones, provocarían daños severos de los componentes estructurales de la célula bacteriana, como la pérdida de homeóstasis o inactivando o destruyendo el material genético, dando lugar a la muerte celular (Torrenegra Alarcón, Nerlis Pájaro and León Méndez, 2017).

Los terpenos son los componentes activos con propiedades antimicrobianas contenidos en el aceite esencial de romero, los cuales dañan a la membrana celular bacteriana incrementando su permeabilidad y afectando su estructura debido a que interactúan con las moléculas de la membrana desestabilizando la bicapa lipídica, lo que genera daño a las bacterias (Castaño *et al.*, 2010). El aceite esencial de romero es rico en compuestos monoterpenos, los cuales cuentan con actividades antimicrobianas (Castaño *et al.*, 2010; Jardak *et al.*, 2017). La riqueza del aceite especialmente en hidrocarburos monoterpénicos como el 1,8-cineol, se caracteriza por su fuerte actividad antimicrobiana contra varias bacterias (Cutillas Gomariz, 2017; Jardak *et al.*, 2017).

Los compuestos principales, al igual que otros componentes menores del aceite esencial romero, tienen actividad antimicrobiana (Bouaziz *et al.*, 2009; Jardak *et al.*, 2017), como germacrene-D, cariofileno, óxido de cariofileno, terpineno-4-ol; de hecho, se ha informado que estos compuestos podrían actuar sinérgicamente y, en consecuencia, ser responsables de la actividad antibacteriana (Jardak *et al.*, 2017).

2.2.4. Microorganismos de superficies

Los microorganismos que se encuentran en distintas zonas inertes son diferentes en recuento y tipo. Aunque muchos de estos microorganismos no causan daño en la salud humana, algunos si pueden hacerlo. (Holgado and Irina, 2016).

En un estudio realizado en los laboratorios de la Facultad de Bioanálisis, en México, se encontró mayor frecuencia de desarrollo bacteriano en las mesas e identificaron bacterias patógenas como *Salmonella paratyphi A* y *Salmonella* spp., también aislaron bacterias patógenas oportunistas *Staphylococcus epidermis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, bacilos no fermentadores, entre otros (González Herrera, Lozada Méndez and Santiago Roque, 2014)

2.2.5. Desinfectantes

Los desinfectantes son productos químicos que se usan para la eliminación de microorganismos patógenos en superficies inertes, existen diversos niveles de desinfección, desde una esterilización química, a una mínima reducción del número de microorganismos contaminantes. Los desinfectantes son utilizados para disminuir infecciones, contaminaciones y enfermedades (Cuervo and Vanegas, 2017).

2.2.5.1. Tipos de desinfectantes

Los desinfectantes de laboratorio de uso común incluyen hipoclorito de sodio y etanol (70 %, vol / vol) (Weir *et al.*, 2002). En el mercado se comercializan diferentes tipos de desinfectantes, siendo los más comunes el hipoclorito de sodio (desinfectante universal, más antiguo y utilizado de los derivados clorados), ácido peracético, alcohol etílico (etanol), alcohol isopropílico (isopropanol), aldehídos, compuestos de amonio, compuestos fenólicos, yodo, entre otros.

Alcoholes

Los alcoholes son antimicrobianos efectivos, el etanol, alcohol, alcohol isopropílico y *n*-propanol son los más utilizados. Los alcoholes presentan una actividad rápida y amplio espectro antimicrobiano contra bacterias vegetativas, virus y hongos, pero no son esporicidas. Debido a la falta de actividad esporicida, los alcoholes no se recomiendan para la esterilización, pero se usan ampliamente tanto para la desinfección de superficies duras como para la antisepsia de la piel. También se pueden usar concentraciones más bajas como conservantes y para potenciar la actividad de otros biocidas (McGerald and Russell, 1999).

Fenoles

Estos agentes antimicrobianos se han utilizado durante mucho tiempo por sus propiedades antisépticas, desinfectantes o conservantes, según el compuesto. Los compuestos fenólicos dañan las paredes celulares y las membranas, precipitan las proteínas e inactivan a las enzimas. Poseen propiedades antifúngicas y antivirales; su acción antifúngica probablemente implica daño a la membrana plasmática, lo que resulta en una fuga de componentes intracelulares. El fenol ya no es utilizado como desinfectante, debido a sus

efectos corrosivos sobre el tejido, a su toxicidad en caso de absorción y a sus efectos carcinogénicos (McGerald and Russell, 1999; Guevara, 2009).

Hipoclorito de sodio

Tiene la capacidad de producir cambios en la membrana celular y su mecanismo de acción se centra en la inhibición de enzimas esenciales por oxidación de los grupos S-H. Su acción bactericida disminuye cuando aumenta el pH y aumenta con la temperatura de la solución desinfectante y pierde actividad bactericida en presencia de materia orgánica. Las bacterias gram positivas y gram negativas no formadoras de esporas son altamente susceptibles al cloro (McGerald and Russell, 1999).

2.2.5.2 Factores que influyen en la eficiencia de desinfección

Existen factores que pueden alterar la eficiencia de un desinfectante, por lo que puede permitir la sobrevivencia de los microorganismos. Así tenemos: el pH, naturaleza del microorganismo, tiempo de contacto, temperatura, presencia de material extraño.

Efecto del pH.

Cuando un desinfectante se encuentra en un pH óptimo es más eficiente, dado que afecta el enlace iónico del desinfectante con la pared celular de una bacteria; logrando que una mayor cantidad de moléculas del desinfectante se adhieran a un mayor número de microorganismos, de lo contrario, el producto pierde efectividad (Cuervo and Vanegas, 2017).

Naturaleza del microorganismo.

Cada microorganismo varía su resistencia a los desinfectantes debido principalmente a la genética del microorganismo o a agentes externos como resistencia a antibióticos por su uso frecuente (Cuervo and Vanegas, 2017).

Tiempo de contacto y concentración del agente.

El tiempo de contacto es uno de los factores más importantes en la eficiencia de los desinfectantes dado que determina el tiempo en que va actuar el desinfectante. Además, dependerá de la concentración del ingrediente activo del desinfectante (Cuervo and Vanegas, 2017; Jang *et al.*, 2017).

Temperatura.

Esta variable afecta la tasa de reacción, muchos desinfectantes son poco eficientes a bajas temperaturas y son más efectivos y de acción rápida a una mayor temperatura (Jang *et al.*, 2017).

Presencia de materiales extraños.

La materia orgánica e inorgánica alteran la eficiencia de los desinfectantes, pueden formar una barrera protectora, protegiendo a los microorganismos de la acción de los desinfectantes (Galán, 2003).

CAPÍTULO III

DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS

3.1. Nivel de Investigación

El nivel de investigación es descriptivo.

3.2. Tipo y diseño de estudio

El tipo de investigación es descriptivo.

El diseño de estudio es observacional.

3.3. Material biológico

- Hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (romero)
- Bacterias aisladas de las superficies de mesas de los laboratorios.

3.4. Unidades de estudio

Concentración de aceite esencial de romero con acción desinfectante.

3.5. Lugar de muestreo

Las hojas de romero fueron recolectadas del Caserío Shidin, distrito de Jesús, Provincia de Cajamarca, ubicado a 2844 m.s.n.m., latitud de 7° 16'19''S y longitud de 78°22'50''O (Apéndice 1).

Las bacterias se aislaron de todas las mesas de trabajo de los laboratorios del Área de Microbiología y Parasitología (1D-102, 1D-106 y 1D-201) de la Universidad Nacional de Cajamarca.

3.6. Toma de muestras

3.6.1. Muestras vegetales

Se colectó un espécimen completo de la planta de romero y se llevó al Herbario “Isidoro Sánchez Vega” de la Universidad Nacional de Cajamarca para su identificación taxonómica (ANEXO 1). Posteriormente se recolectó 10 kg de ramas de romero en floración, y se transportó al Laboratorio de Tecnología Farmacéutica de la Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo donde se lavaron las ramas de romero con agua mineral y se desojaron obteniendo 7 kg de hojas. Las hojas se conservaron entre 25°C a 30°C al aire libre y sin desecar, almacenándose un día para luego iniciar la extracción del aceite esencial (Sánchez Tito, Cartagena Cutipa and Collantes Díaz, 2021).

3.6.2. Muestras de superficies de mesas

- **Selección de las áreas de muestreo**

De cada mesa de trabajo se seleccionaron 3 áreas de muestreo: la primera área correspondió al control negativo (área N), que fue el área al cual no se le aplicó ninguna solución desinfectante, la segunda área fue el control positivo (área P) y se le aplicó hipoclorito de sodio al 0,5 %, a la tercera área de muestreo se aplicó la solución desinfectante de aceite esencial de romero a una concentración de 50 %.

- **Toma de muestras de las superficies de mesas**

Se aplicó la técnica de frotación con hisopo. Se colocó una plantilla estéril de cartulina (10 cm x 10 cm) sobre la superficie a muestrear, el hisopo fue humedecido en suero fisiológico 0,9 % durante cinco segundos. Luego con el hisopo inclinado en un ángulo

de 30 °, se frotó sobre el área de muestreo en varios sentidos: vertical, horizontal y diagonal, durante 20 segundos. Posteriormente se colocó el hisopo en el tubo con suero fisiológico y se homogenizó por dos minutos, constituyendo la primera dilución (Espino, 2006; Sánchez *et al.*, 2015). Se llevó a incubación durante 18 horas. Este procedimiento se realizó por duplicado.

3.7. Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos

3.7.1 Extracción y conservación de aceites esenciales

Se enjuagó las hojas de romero con agua destilada estéril (Sepehri Z., Javadian F., Khammari D., 2016). Se pesaron 7 kg de hojas de romero y se colocaron en el recipiente para la muestra, se agregó 20 L de agua en el tanque generador de vapor, posteriormente se acoplaron los tres componentes del equipo, se dejó correr el agua por el refrigerante, se extrajo los aceites esenciales, por un tiempo de 4 horas aproximadamente. Transcurrido el tiempo de extracción, se agregó sulfato de sodio para atrapar los restos de agua. Posteriormente se recolectó los aceites esenciales en un frasco de color ámbar con tapa rosca y se mantuvo bajo refrigeración a una temperatura de $4 \pm 0,2$ °C en oscuridad (Castaño *et al.*, 2010), durante el tiempo que duró la investigación para evitar su oxidación y volatilización.

Las diluciones del aceite esencial de romero al 10 % y 50 % se realizaron con dimetilsulfóxido 5 % (DMSO 5 %).

3.7.2. Aislamiento e identificación de bacterias de superficies de mesas de laboratorios

A partir del hisopado en el área N se realizó el aislamiento e identificación bacteriana.

Los tubos de las diluciones primarias se incubaron a 37 °C durante 24 horas y en los casos

donde se presentó turbidez, se inocularon con un asa bacteriológica por el método de estrías en placas con agar McConkey y agar sangre y se incubaron a 37 °C durante 24 - 48 horas. Luego se identificaron las colonias con características macroscópicas diferentes (color, tamaño, pigmento) y se realizó coloración Gram.

Posteriormente se sembraron en placas con agar nutritivo y se incubaron a 37 °C durante 24 horas, luego se realizaron las pruebas de catalasa, coagulasa e identificación bioquímica: Citrato de Simmons, TSI, LIA, SIM, MIO, urea, MR-VP para el caso de *Pseudomonas aeruginosa* se sembró en Agar King A y King B, para evidenciar su pigmentación característica en cada medio; luego también se sembró en viales con agar nutritivo y caldo BHI para tener aislamientos bacterianos puros gram positivos y gram negativos, y se conservaron a -4 °C hasta su posterior evaluación.

3.7.3. Evaluación de la eficiencia bactericida (Método del coeficiente fenólico modificado) del aceite esencial de romero

Se evaluó la eficiencia bactericida de aceite esencial de romero en concentraciones diferentes (10 %, 50 %, 100 %), fue probado por separado partiendo de una carga microbiana de $1,5 \times 10^8$ (Tubo N° 0,5 de escala McFarland) y realizando una dilución hasta 10^{-8} sobre dos bacterias gram negativas *E. coli* (M12(1)) y *P. aeruginosa* (M6(1)) y dos bacterias gram positivas *S. aureus* (M10(1)) y *Bacillus* spp.(M8(1)), aisladas de las mesas de los laboratorios de microbiología de la Universidad Nacional de Cajamarca, en un tiempo de contacto de 1 y 5 minutos.

En dos crioviales estériles se agregó 500 uL de aceite esencial de romero al 10 %, otros dos crioviales con 500 uL del aceite a la concentración de 50 %, y en los últimos dos crioviales a una concentración del 100 %. A cada uno de los seis crioviales con los aceites

esenciales se añadieron 500 uL de inóculo. Se agitaron los crioviales y a partir de ese momento se empezó a contabilizar los tiempos de contacto de un minuto y cinco minutos.

Posteriormente según se cumplía el tiempo se retiró 1 mL de las muestras de cada criovial y se colocaron en placas de Petri y luego se adicionó el medio de cultivo Agar Recuento en Placa, se homogenizó realizando cinco movimientos circulares en el mismo sentido que las agujas del reloj y cinco en sentido contrario, cinco de forma vertical y cinco en horizontal, luego se dejó solidificar. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó un recuento en placa para la bacteria gram negativa y para la bacteria gram positiva. Este procedimiento se llevó a cabo en todos los casos por duplicado, asimismo también se evaluó como control negativo la solución de DMSO (5 %) y un control positivo que fue el antibiótico ceftriaxona (1g) (Latour Toro, 2013), los resultados se expresaron como la media entre ellos.

3.7.4. Evaluación bactericida del desinfectante sobre superficie

3.7.4.1. Consideraciones Preliminares

Se reactivó los microorganismos en agar nutritivo a 37 °C durante 24 horas, luego con el asa de siembra, se suspendió de 2 a 3 colonias en un tubo con 10 mL de solución fisiológica estéril y se agitó en vortex aproximadamente por 20 segundos para obtener una suspensión bacteriana homogénea. Se ajustó las suspensiones con el tubo N° 0,5 de escala McFarland que es una concentración aproximada de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (Díaz Enriquez *et al.*, 2017). Se realizó diluciones seriadas de cada aislado en tubos con 9 mL de solución salina fisiológica (SSF) hasta la dilución 10^{-8} en microorganismos gram positivos y hasta la dilución 10^{-11} en microorganismos gram negativos.

3.7.4.2. Preparación de solución neutralizante.

Neutralizante para hipoclorito de sodio

Tabla 2. Proporciones de reactivos para preparar neutralizante para hipoclorito de sodio.

Reactivo	v/v
Tiosulfato de sodio	1%
NaCl 0,85 %	cs

Se pesó y añadió los componentes en un matraz, y a continuación, se agregó el diluyente (NaCl 0,85 %) y se homogenizó hasta su disolución. Finalmente se ajustó a pH 7 con una solución de NaOH y se esterilizó en autoclave a 121°C, 1 atm durante 15 minutos (Flamenco Santos and Guevara Avalos, 2011).

3.7.4.3. Preparación del desinfectante a base de aceite esencial de romero.

Tabla 3. Proporciones de los reactivos a utilizar para preparar el desinfectante a base de aceite esencial de romero.

Reactivo	v/v
Aceite esencial de romero	50 %
Aceite de ricino	2
Ácido esteárico	0,5
Betaína de coco	0,8
Alcohol 90°	0,5
Agua destilada estéril	cs

Se pesó ácido esteárico, y se colocó en un beaker 1 (B1), se calentó a 60 °C hasta que el ácido esteárico se derritió. Luego se midió agua destilada estéril en cantidad suficiente más betaína de coco, se mezcló en un beaker (B2) y se lleva a 60 °C. Después se midió aceite esencial de romero más aceite de ricino y etanol 90 ° y se mezcló en un beaker 3 (B3) para posteriormente calentar a 60 °C. Luego se vertió despacio el contenido del

beaker 2 (B2) en el B1, se agitó constantemente, seguidamente se vertió despacio el contenido del B3 en el B1 y se agitó constantemente. Después de mezclar durante 5 minutos se detuvo la agitación. Posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente y envasó en un frasco limpio (Castellos, Hernández and Sandoval, 2019).

3.7.4.4. Evaluación bactericida del desinfectante a base de aceite esencial de romero

Se marcó las mesas de los laboratorios a ensayar con seis cuadrantes de 25 cm² en posiciones aleatorias, dos de los cuales correspondieron al control negativo, dos al control positivo (hipoclorito de sodio 0,5 %) y los otros dos al grupo experimental (desinfectante a base de aceite esencial de romero) (Díaz Enriquez *et al.*, 2017).

Posteriormente se inoculó en cada cuadrante de la superficie 0,1 mL del microorganismo a ensayar, a partir de la dilución específica, y se dejó secar el inóculo en la superficie a temperatura ambiente por 10 minutos (Díaz Enriquez *et al.*, 2017).

Al control negativo no se aplicó ningún tipo de desinfectante. En los cuadrantes de control positivo se aplicó por el método de aspersion, usando un pulverizador a una distancia de 20 cm, con un volumen aproximado de 0,1 mL (rociado 4 veces) el hipoclorito de sodio 0,5 % y para el grupo experimental se aplicó el desinfectante a base de aceite esencial de romero utilizando el mismo método de aspersion. Se dejó actuar durante 5 minutos contabilizando el tiempo con ayuda de un cronómetro (Díaz Enriquez *et al.*, 2017).

Concluido el tiempo, se recolectó la carga mediante dos hisopos, el primero humedecido con SSF (0,85 % NaCl) durante cinco segundos, y el segundo seco, se frotó sobre el área de muestreo en varios sentidos: vertical, horizontal y diagonal, durante 20 segundos, luego se introdujo los hisopos en un tubo con 1 mL de una solución neutralizante, y se homogenizó en vortex durante 2 minutos (Fuster, 2006).

Posteriormente según se cumplía el tiempo, se retiró 1 mL de las muestras de cada tubo y se colocó en placas de Petri, luego se adicionó el medio de cultivo Agar Recuento en Placa (técnica vertida en placa), se homogenizó realizando cinco movimientos circulares en el mismo sentido que las agujas del reloj y cinco en sentido contrario, cinco de forma vertical y cinco en horizontal, luego se dejó solidificar. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó un recuento en placa para la bacteria gram negativa y para la bacteria gram positiva. Este procedimiento se llevó a cabo en todos los casos por duplicado, los resultados se expresaron como la media entre ellos.

Para determinar el porcentaje de bacterias que mueren al contacto con el desinfectante, se realizó el cálculo mediante la siguiente fórmula Eficiencia Germicida Porcentual: (Mamani Urquizo, 2008).

$$E = \left(\frac{N_0 - N_t}{N_0} \right) \times 100$$

Donde:

E = Eficiencia Germicida Porcentual

N_0 = Número de microorganismos iniciales

N_t = Número de microorganismos sobrevivientes a tiempo t.

3.8. Técnicas de Procesamiento y Análisis de Datos

Los datos fueron ingresados y procesados en una base de datos del software estadístico IBM SPSS Statistics versión 25.

Para las variables cuantitativas se realizó el cálculo de la media aritmética. Debido a que los datos no presentaron distribución normal, de acuerdo al test de Shapiro-Wilks, se realizó la comparación de las eficiencias bactericidas entre los grupos problemas y control mediante la prueba de Kruskal-Wallis y para comparar la eficiencia bactericida entre el desinfectante comercial y el desinfectante a base de aceite de romero se utilizó la prueba de prueba U de Mann-Whitney. El nivel de significación estadística fue $p \leq 0,05$.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

4.1.1. Identificación de bacterias de superficies de mesas de laboratorios

A partir de los hisopados de superficies de las mesas en los laboratorios de microbiología se aislaron colonias con pigmentación y morfología macroscópica diferente, obteniéndose un total de 20 aislamientos, de los cuales 13 fueron gram negativos y 7 gram positivos. Mediante las pruebas bioquímicas se pudo identificar 18 de los aislamientos (Tabla 4, Apéndice 3), debido a la pandemia de Covid-19, dos de los aislados no se lograron identificar. Las bacterias patógenas oportunistas identificadas fueron *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pantoea agglomerans* (antes *Enterobacter agglomerans*), *Hafnia alvei*, *Cronobacter* spp.; también se aislaron bacterias que forman parte de la microbiota normal *Bacillus* spp., estafilococos coagulasa negativos y una bacteria ambiental *Erwinia persicina* que es un patógeno vegetal.

Tabla 4. Identificación de las bacterias aisladas de las superficies de los laboratorios de microbiología.

Código	Bacteria	Coloración Gram
M2(1)	<i>Staphylococcus</i> coagulasa negativo	gram positivo
M2(2)	<i>Staphylococcus</i> coagulasa negativo	gram positivo
M4(1)	<i>Staphylococcus</i> coagulasa negativo	gram positivo
M4(2)	<i>Staphylococcus</i> coagulasa negativo	gram positivo
M5(1)	<i>Staphylococcus</i> coagulasa negativo	gram positivo
M5(2)	<i>Pantoea agglomerans</i>	gram negativo
M5(4)	<i>Pantoea agglomerans</i>	gram negativo
M6(1)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	gram negativo
M7(1)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> .	gram negativo

M8(1)	<i>Bacillus</i> spp.	gram positivo
M9(1)	<i>Hafnia alvei</i>	gram negativo
M9(2)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> .	gram negativo
M10(1)	<i>Staphylococcus aureus</i>	gram positivo
M11(1)	<i>Erwinia persicina</i>	gram negativo
M11(2)	<i>Hafnia alvei</i>	gram negativo
M12(1)	<i>Escherichia coli</i>	gram negativo
M13(1)	<i>Cronobacter</i> spp.	gram negativo
M13(2)	<i>Hafnia alvei</i>	gram negativo

4.1.2. Evaluación de la eficiencia bactericida (Método del coeficiente fenólico modificado) del aceite esencial de romero

Las concentraciones del aceite de romero al 50 % y 100 % con tiempo de contacto de 1 minuto presentaron una eficiencia bactericida del 100 % en todos los aislamientos bacterianos probados. Sin embargo, el aceite al 10 % solo demostró eficiencia bactericida de 100 % en el aislamiento M8(1) (Tabla 5). En contraste, cuando se aplicó el aceite esencial al 10 % con un tiempo de contacto de 5 minutos, se observó eficiencia bactericida del 100 % en la mayoría de aislamientos, excepto en el aislamiento M6(1) donde se determinó una eficiencia bactericida del 90,38 % (Tabla 6).

Tabla 5. Eficiencia bactericida porcentual del aceite esencial de romero al 10 %, 50 % y 100 %, con un tiempo de contacto de 1 minuto.

Gram	Código	Eficiencia bactericida porcentual			
		CRO ^a	AER 10 % ^b	AER 50 % ^a	AER 100 % ^a
+	M10(1)	100	74,34	100	100
+	M8(1)	100	100	100	100
-	M12(1)	100	77,68	100	100
-	M6(1)	100	81,31	100	100

CRO: Ceftriazona 1g; AER 10 %: Aceite esencial de romero al 10 %; AER 50 %: Aceite esencial de romero al 50 %; AER 100 %: Aceite esencial de romero al 100 %.

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) para la prueba Kruskal-Wallis.

Tabla 6. Eficiencia bactericida porcentual del aceite esencial de romero al 10 %, 50 % y 100 %, con un tiempo de contacto de 5 minutos.

Gram	Código	Eficiencia bactericida porcentual			
		CRO ^a	AER 10 % ^a	AER 50 % ^a	AER 100 % ^a
+	M10(1)	100	100	100	100
+	M8(1)	100	100	100	100
-	M12(1)	100	100	100	100
-	M6(1)	100	90,38	100	100

CRO: Ceftriazona 1g; AER 10 %: Aceite esencial de romero al 10 %; AER 50 %: Aceite esencial de romero al 50 %; AER 100 %: Aceite esencial de romero al 100 %.

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($p > 0,05$) para la prueba Kruskal-Wallis.

4.1.3. Evaluación de la eficiencia bactericida del desinfectante a base de aceite esencial de romero al 50 %

Se elaboró un desinfectante a base de aceite esencial de romero al 50 % (DAER 50 %), los resultados de la evaluación de la eficiencia bactericida de este desinfectante en un tiempo de contacto de 5 minutos sobre superficies, se recopilaron en una tabla (Apéndice 6) y se realizó el promedio de los datos y se utilizaron para calcular la eficiencia bactericida porcentual (Tabla 7), obteniendo una eficiencia bactericida porcentual del 99,99 % en bacterias gram negativas M12(1) y M6(1), y en las bacterias gram positivas la eficiencia fue de 79,13 % sobre el aislamiento M10(1) y 76,47 % sobre el aislamiento M8(1).

Tabla 7. Eficiencia bactericida porcentual del desinfectante a base de aceite esencial de romero al 50 %, en un tiempo de contacto de 5 minutos.

Gram	Código de aislamiento	Eficiencia bactericida porcentual*	
		DC	DAER 50 %
+	M10(1)	91,88	79,13
+	M8(1)	97,65	76,47
-	M12(1)	99,99	99,99
-	M6(1)	99,99	99,99

DC: Desinfectante comercial; DAER 50 %: Desinfectante a base de aceite esencial de romero al 50 %. * Prueba U de Mann-Whitney ($p > 0,05$).

4.2. Discusión

Los desinfectantes químicos se están utilizando en gran medida para la desinfección de superficies inertes y ambientes; durante la pandemia de COVID-19 han demostrado su efectividad antimicrobiana, su conveniencia, asequibilidad y fácil disponibilidad; sin embargo, preocupa que el uso inadecuado de estos pueda ocasionar efectos negativos en salud humana y los ecosistemas (MINSA, 2002; Dhama *et al.*, 2021). Por ello existe una necesidad de desarrollar tecnologías ecológicas con métodos de desinfección más seguros y amigables con el medio ambiente como el uso de aceites esenciales, particularmente de romero que ha demostrado efectos antimicrobianos (Sharifi *et al.*, 2017; Nieto, Ros and Castillo, 2018; Flores Villa *et al.*, 2020; Rouf *et al.*, 2020; Dolghi *et al.*, 2022).

La identificación de diversas bacterias aisladas de las mesas en los diferentes laboratorios del Área de Microbiología y Parasitología (Tabla 4) se atribuye al uso frecuente de estas superficies por parte de los estudiantes y tesisistas, además de la ausencia de limpieza y desinfección adecuada, dado que la presencia de materia orgánica puede inactivar algunos desinfectantes como el hipoclorito de sodio, por lo que es muy importante como paso previo la limpieza de la superficie antes de aplicar el desinfectante (Elias Paredes, 2017).

Entre las bacterias identificadas se encuentra *P. aeruginosa* aislada de una de las mesas del laboratorio 1D-106, ambiente donde los estudiantes realizan sus prácticas; mientras que *E. coli*, y *S. aureus* fueron aisladas de las mesas de trabajo del laboratorio 1D-201, donde generalmente los tesisistas trabajan con estos microorganismos como parte de sus proyectos de investigación y los cuales forman parte de la microbiota gastrointestinal y tracto respiratorio, respectivamente (Acosta Triana and Tavera Camacho, 2015). También se aisló estafilococos coagulasa negativos que son microorganismos habituales de la piel y mucosas (Couto, Dendi and Sobrero, 2021) y *Klebsiella pneumoniae* que forma parte de la microbiota de la boca, la piel y los intestinos (Tártara, 2013).

Asimismo se aislaron bacterias como: *Erwinia persicina*, microorganismo habitual del ambiente y agente patógeno de vegetales (Mohamaden *et al.*, 2019); *Hafnia alvei* es una bacteria que se encuentra en diversos ambientes: agua, suelo, aire; pero también forma parte de la microbiota del tracto intestinal del ser humano (Ramos Vivas, 2020); *Pantoea agglomerans* (antes *Enterobacter agglomerans*) cuyo hábitat frecuente son las plantas, el agua y las heces de animales y humanos (Decuadro *et al.*, 2015; Ramona Martín, 2019); *Cronobacter* spp. habita en el entorno vegetal (Ling *et al.*, 2018) y al igual que *Bacillus* spp. son microorganismos generalmente ambientales.

La mayoría de bacterias aisladas en el presente estudio corresponden a microorganismos oportunistas (Tabla 4), de manera similar una investigación en el laboratorio de una escuela dental en Irán identificó sobre mesas y otras superficies la presencia de *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* y *Streptococcus viridans* (Glazer Peres *et al.*, 2020). Por el contrario, una investigación realizada en mesas y otras superficies de los laboratorios de la Facultad de Bioanálisis de la Universidad Veracruzana en México identificó bacterias de microbiota normal como *Bacillus* spp, bacterias oportunistas *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus epidermis*, *Micrococcus luteus*, *E. coli*, *Enterobacter aerógenes*,

Citrobacter spp., *Providencia alcalifaciens* y bacilos no fermentadores, además se logró identificar la bacteria patógena *Salmonella paratyphi* (González Herrera, Lozada Méndez and Santiago Roque, 2014)

Cabe destacar que, si bien las superficies inertes tienen un riesgo mínimo de transmitir directamente una infección, contribuyen de manera importante con la contaminación cruzada secundaria al entrar en contacto con superficies vivas como piel, boca, nariz o con otras superficies inertes (González Herrera, Lozada Méndez and Santiago Roque, 2014). En el presente estudio, la mayoría de las especies bacterianas aisladas fueron oportunistas, lo que significa que pueden volverse patógenas bajo ciertas condiciones, como en caso de inmunodeficiencia (TaHERi *et al.*, 2021).

Cuando se aplicó las diferentes concentraciones de aceite de romero sobre los aislamientos seleccionados, se pudo determinar que las concentraciones del aceite al 50 y 100 % presentaron una eficiencia bactericida del 100 % en todos los aislamientos bacterianos, pero en la concentración de aceite al 10 % su eficiencia varió entre 74,34 a 100 % después de 1 minuto de contacto y de 90,38 a 100 % con 5 minutos de contacto (Tablas 5 y 6), lo que demostraría que a mayor concentración del aceite esencial y a mayor tiempo de contacto con el microorganismo, entonces mayor sería su eficiencia bactericida (García Horna, 2020).

Las bajas concentraciones del aceite esencial de romero, sobre una bacteria gram positiva, se adhieren a la superficie bacteriana alterando su morfología superficial, y a medida que se eleva las concentraciones, la pared celular se rompe, se produce un daño en la membrana celular y una evacuación del citoplasma, provocando así la muerte bacteriana. Al aumentar el tiempo de exposición, se daña la pared celular provocando la muerte

bacteriana. A altas concentraciones el aceite esencial puede dañar el ADN a medida que se daña la pared celular y la membrana celular (Fu *et al.*, 2007).

En el presente estudio, se evidenció la eficiencia bactericida del aceite esencial de romero sobre las bacterias evaluadas gram positivas (*S. aureus* y *Bacillus* spp.) y gram negativas (*E. coli* y *P. aeruginosa*) (Tablas 5 y 6), por lo que se demuestra que este aceite esencial no tiene actividad selectiva por algún tipo de bacteria evaluada y tendría un amplio espectro de acción, coincidiendo con un estudio en el cual el aceite esencial de romero exhibió un amplio espectro de acción antimicrobiana tanto para bacterias de interés alimentario gram positivas como gram negativas (Castaño *et al.*, 2010).

Por el contrario, algunas investigaciones demostraron el efecto antibacteriano del aceite esencial de romero sobre bacterias gram positivas como *S. aureus*, *B. cereus*, *B. subtilis* y *S. epidermidis* (Castaño P. *et al.*, 2010; Hussain *et al.*, 2010; Jardak *et al.*, 2017; Abolfazl Jafari y Pashazadeh, 2020). Asimismo, otro estudio determinó que el aceite esencial de romero tendría un mayor efecto antimicrobiano frente a bacterias gram negativas (*E. coli*, *Salmonella typhi*, *S. enteritidis*, *Shigella sonnei*) (Bozin *et al.*, 2007).

Una de las bacterias que sería menos sensible a la acción del aceite esencial de romero al 10 % sería *P. aeruginosa* (M6(1)) con una eficiencia del 90,8 % (Tabla 6), lo que coincide con varios estudios donde se mostró una resistencia de *P. aeruginosa* al aceite esencial de romero (Elyemni *et al.*, 2022), (Cutillas Gomariz, 2017). Esto podría deberse al hecho de que las bacterias gram negativas contienen polisacáridos hidrofóbicos (lipopolisacáridos) que crean una barrera hacia las macromoléculas y los compuestos hidrofóbicos, mostrando una baja sensibilidad a la actividad antimicrobiana de los compuestos terpénicos presentes en el aceite esencial de romero (Bellumori *et al.*, 2021), además *P. aeruginosa* tiene mecanismos de resistencia natural como escasa

permeabilidad de la membrana externa, expresión de bombas de expulsión, mutaciones del sitio de acción de algunos antibióticos y a la inactivación enzimática (Espinoza Pesantez and Esparza Sánchez, 2021).

La prueba estadística Kruskal-Wallis demostró que las eficiencias bactericidas de los aceites de romero al 50 %, 100 % y del antibiótico, después de 1 minuto de contacto, fueron similares, solo la eficiencia del aceite al 10 % fue significativamente menor ($p \leq 0,05$) (Tabla 5). Si bien cuando se analizó los resultados a los 5 minutos de contacto, todas las concentraciones de aceite de romero junto con el antibiótico presentaron eficiencias similares ($p > 0,05$) (Tabla 6), se consideró trabajar con el aceite esencial de romero al 50 % para elaborar el desinfectante.

Se evaluó la eficiencia bactericida del desinfectante a base de aceite esencial de romero al 50 % sobre las superficies de las mesas y se evidenció que esta presentación tuvo mayor efecto sobre bacterias gram negativas (*E. coli* y *P. aeruginosa*) (Tabla 7). Dado que este desinfectante es más acuoso por los componentes agua destilada estéril y emulsificantes usados para su formulación, lo que es probable que el entorno hidrofílico mejore su actividad antimicrobiana en bacterias gram negativas (Garzoli *et al.*, 2021). Aunque se observó que para algunos aislamientos la eficiencia bactericida fue mayor con el desinfectante comercial, luego de realizar la prueba de U de Mann-Whitney se determinó que la eficiencia no fue significativamente diferente ($p > 0,05$) entre el desinfectante comercial y el desinfectante a base del aceite de romero, por tanto, debido a que sus eficiencias fueron similares, el desinfectante a base de romero sería una mejor opción debido a sus componentes naturales y su actividad antimicrobiana de amplio espectro. Sin embargo, es necesario realizar pruebas físicas y de toxicidad para poder elaborar la ficha técnica de este desinfectante.

Las diferencias en los resultados con diversos estudios podrían ser influenciadas por el diseño experimental, el origen de las cepas utilizadas y la composición de los aceites esenciales, los cuales varían con la época del año de recolección del vegetal, los fertilizantes utilizados, la posición geográfica, el genotipo, el método de extracción, entre otros factores que influyen en la expresión de metabolitos secundarios (Bonilla *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2018).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- El aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) tiene acción bactericida sobre superficies de mesas de los laboratorios del Área de Microbiología y Parasitología, con un tiempo de contacto de 5 minutos, por lo que puede ser usado como desinfectante.
- Se logró aislar 20 bacterias de las superficies de las mesas de los laboratorios, de los cuales 13 fueron gram negativos y 7 gram positivos, identificándose solo 18 bacterias.
- El aceite esencial de *R. officinalis* L. (romero) tiene una eficiencia bactericida de amplio espectro por su efecto sobre bacterias gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus* spp.) y gram negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*).
- El desinfectante a base de aceite esencial de *R. officinalis* L. (romero) al 50 % presentó una eficiencia similar al desinfectante comercial.

5.2 Recomendaciones

Realizar más estudios de la formulación desarrollada, que consideren tiempo de vida útil, homogeneidad, estabilidad, corrosividad, riesgo de contacto, capacidad desodorante, para realizar su ficha técnica.

Evaluar su eficiencia bactericida del desinfectante a concentraciones del 50% y 99%.

REFERENCIAS

- Aberbour, A. *et al.* (2022) 'Rosemary essential oil as a natural disinfectant in Japanese quail Eggs (*Coturnix Coturnix Japonica*): effect on the bacterial load and hatchability characteristics', *OHID*, pp. 1–54. Available at: <https://doi.org/10.23919/eumc.2019.8910961>.
- Abolfazl, S. and Pashazadeh, M. (2020) 'Study of chemical composition and antimicrobial properties of Rosemary (*Rosmarinus Officinalis*) essential oil on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in vitro', 3(1), pp. 62–69. Available at: <https://doi.org/10.38001/ijlsb.693371>.
- Acosta Triana, L. and Tavera Camacho, M.M. del P. (2015) 'Bacterias oportunistas causantes de infecciones oculares', *Universidad de La Salle*, p. 27.
- Andrade, J. *et al.* (2018) 'Rosmarinus officinalis L.: an update review of its phytochemistry and biological activity.', *Future science OA*, 4(4).
- AOAC (2000) *Official methods of analysis, Chemical and Functional Properties of Food Saccharides*. Available at: <https://doi.org/10.7312/seir17116-004>.
- Ávalos García, A. and Pérez-Urria, E. (2010) 'Metabolismo secundario de plantas', 2(3), pp. 1–23.
- Ávila Hernández, C. and Molina Torres, J. (2017) '¿Es hptlc una alternativa para la cuantificación de metabolitos secundarios?: cuantificación de ácido salicílico en árboles silvestres de la familia Salicaceae ubicados en el estado de Guanajuato', *Jóvenes en la Ciencia*, 3(2)(1), pp. 294–299.
- Bastidas, P., Valencia, U. and Oliva, R. (2017) 'Efecto antimicrobiano de la vitamina C, vitamina E y aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) en salchichas de pollo tipo frankfurt', *Industrial Data*, 20(2), pp. 27–36.
- Bellumori, M. *et al.* (2021) 'Within-plant variation in *Rosmarinus officinalis* L. terpenes and phenols and their antimicrobial activity against the rosemary phytopathogens *Alternaria alternata* and *Pseudomonas viridiflava*', *Molecules*, 26(11), pp. 1–19. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules26113425>.
- Bonilla, D. *et al.* (2016) 'Efecto del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* sobre *Porphyromonas gingivalis* cultivada in vitro', *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 45(2), p. 275. Available at: <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v45n2.59942>.
- Bouaziz, M. *et al.* (2009) 'Disinfectant properties of essential oils from *Salvia officinalis* L. cultivated in Tunisia', *Food and Chemical Toxicology*, 47(11), pp. 2755–2760.
- Bozin, B. *et al.* (2007) 'Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils.', *J Agric Food Chem.*, 55(19), pp. 7879–85. Available at: <https://doi.org/10.1021/jf0715323>.

- Castaño, P. *et al.* (2010) ‘Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre algunas bacterias de interés alimentario’, 17, pp. 149–154.
- Castellos, M., Hernández, J. and Sandoval, A. (2019) *Formulación y evaluación de la actividad bactericida de un desinfectante para superficies obtenidas a partir de aceite esencial de eucalipto (Eucalyptus globulus labil)*. Universidad de El Salvador.
- Couto, E., Dendi, Á. and Sobrero, H. (2021) ‘Staphylococcus coagulasa negativos como causantes de endocarditis en un recién nacido pretérmino’, *Archivos de Pediatría del Uruguay*, 92(2), p. e306. Available at: <https://doi.org/10.31134/AP.92.2.6>.
- Coy, C. and Eunice, G. (2013) ‘Actividad antibacteriana y determinación de la composición química de los aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y cúrcuma (*Curcuma longa*) de Colombia.’, *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(2), pp. 237–246.
- Cuervo, D. and Vanegas, J. (2017) *Diseño de un producto antibacterial para superficies procedente de extractos vegetales de *Drimys granadensis* L.F a nivel laboratorio*. Fundación Universidad De América.
- Cutillas Gomariz, A. (2017) *Metabolómica de aceites esenciales de mejoranas, romeros y salvias con aplicaciones biotecnológicas*. Universidad de Murcia.
- Decuadro, A. *et al.* (2015) ‘Pneumonia in cat caused by *Enterobacter (Pantoea) agglomerans*, a case report.’, *Neumonia en gato causada por Enterobacter (Pantoea) agglomerans, reporte de un caso clinico.*, 51(198), pp. 26–31.
- Dhama, K. *et al.* (2021) ‘The role of disinfectants and sanitizers during COVID-19 pandemic: advantages and deleterious effects on humans and the environment’, *Environmental Science and Pollution Research*, 28(26), pp. 34211–34228. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14429-w>.
- Díaz Enriquez, E. *et al.* (2017) ‘Determinación de la eficacia de los desinfectantes empleados en las áreas asépticas de un centro productor de biofarmacéuticos’, *VacciMonitor*, 26(2), pp. 54–59.
- Dolghi, A. *et al.* (2022) ‘Chemical and antimicrobial characterization of *Mentha piperita* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils and in vitro potential cytotoxic effect in human colorectal carcinoma cells’, *Molecules* [Preprint].
- Eliás Paredes, J. (2017) *Evaluación de la actividad bactericida de los desinfectantes green desinfectant, forward e hipoclorito de sodio en cepas ATCC y cepas aisladas de superficies de áreas quirúrgicas de dos clínicas de Lima*. Universidad Nacional De Cajamarca.
- Elyemni, M. *et al.* (2022) ‘Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of wild and cultivated *Rosmarinus officinalis* from two Moroccan localities’, *Journal of Ecological Engineering*, 23(3), pp. 214–222. Available at: <https://doi.org/10.12911/22998993/145458>.

- Espino, L. (2006) *Recuento de bacterias aerobias mesofilas totales en canales bovinas mediante el método de hisopado en un camal de Lima Metropolitana*.
- Espinoza Pesantez, D. and Esparza Sánchez, F. (2021) ‘Resistencia enzimática en *Pseudomonas aeruginosa*, aspectos clínicos y de laboratorio’, *Revista chilena de infectología*, 38(1), pp. 69–80.
- Flamenco Santos, J. and Guevara Avalos, G. (2011) *Formulación de tres productos desinfectantes y evaluación de su actividad antimicrobiana*. Universidad De El Salvador.
- Flores Villa, E. *et al.* (2020) ‘Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): su origen, importancia y generalidades de sus metabolitos secundarios’, *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 23, pp. 1–17. Available at: https://doi.org/10.1007/978-0-85729-323-7_1483.
- Fuster, N. (2006) *Importancia del control higiénico de las superficies alimentarias mediante técnicas rápidas y tradicionales para evitar y/o minimizar las contaminaciones cruzadas*. Universidad Autónoma De Barcelona.
- Fu, Y. *et al.* (2007) ‘Investigation of antibacterial activity of Rosemary essential oil against *Propionibacterium acnes* with atomic force microscopy’, *Planta Medica*, 73(12), pp. 1275–1280. Available at: <https://doi.org/10.1055/s-2007-981614>.
- Galán, L. (2003) *Desarrollo de métodos rápidos para verificar la eficacia fungicida de sustancias desinfectantes*. Universidad Autónoma de Barcelona.
- García Horna, J. (2020) *Efecto antibacteriano del aceite esencial de Rosmarinus Officinalis (Romero) sobre Streptococcus Pyogenes ATCC 19615 comparado con amoxicilina in vitro., Efectividad del ejercicio terapéutico en el Síndrome de Fatiga Crónica: Revisión sistemática*. Universidad César Vallejo.
- Garzoli, S. *et al.* (2021) ‘Headspace/gc–ms analysis and investigation of antibacterial, antioxidant and cytotoxic activity of essential oils and hydrolates from *Rosmarinus officinalis* L. and *Lavandula angustifolia* miller’, *Foods*, 10(8). Available at: <https://doi.org/10.3390/foods10081768>.
- Glazer Peres, K. *et al.* (2020) ‘Covid-19-related challenges in dental education: Experiences from Brazil, the USA, and Australia’, *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*, 20, pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.1590/pboci.2020.130>.
- González Herrera, S., Lozada Méndez, M. and Santiago Roque, I. (2014) ‘Análisis bacteriológico de superficies inertes’, *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52(3), pp. 314–320.
- Guevara, A. (2009) *Comparación de la capacidad bactericida del alcohol etílico 95%, amonio cuaternario y pvp - iodine como ingredientes activos de los desinfectantes por el método del coeficiente fenólico*. Universidad De San Carlos De Guatemala.
- Gutiérrez, S. *et al.* (2008) ‘Evaluación microbiológica de la desinfección en unidades odontológicas (estudio piloto) microbiological evaluation of the disinfection in dental units (pilot study).’, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm*, 37(2), pp. 133–149.

- Holgado, R. and Irina, E. (2016) *Análisis del crecimiento bacteriano en diversas zonas vivas e inertes*.
- Hussain, A. *et al.* (2010) ‘Rosmarinus officinalis essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities.’, *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(1517–8382), pp. 1070–1078.
- Jang, Y. *et al.* (2017) ‘Efficacy evaluation of commercial disinfectants by using Salmonella enterica serovar Typhimurium as a test organism’, *Journal of Veterinary Science*, 18(2), pp. 209–216.
- Jardak, M. *et al.* (2017) ‘Chemical composition, anti-biofilm activity and potential cytotoxic effect on cancer cells of Rosmarinus officinalis L. essential oil from Tunisia’, *Lipids in Health and Disease*, 16(1), p. 190.
- Lastra Bello, S.M. (2016) ‘Hoja de datos de seguridad del Fenol’, *CIEMTO*, (574), pp. 1–13.
- Latour Toro, L. (2013) *Eficacia de un desinfectante biodegradable a base de cítricos en el control del crecimiento de Escherichia coli y Staphylococcus aureus*. Universidad Nacional Del Centro Del Perú.
- Ling, N. *et al.* (2018) ‘Prevalence and molecular and antimicrobial characteristics of Cronobacter spp. Isolated from raw vegetables in China’, *Frontiers in Microbiology*, 9(JUN), pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01149>.
- Luna, M. *et al.* (2015) ‘Eficiencia de la desinfección con aceites esenciales y ultrasonido sobre Escherichia coli inoculada en frutos de tomate y el impacto sobre la actividad antioxidante’, *Revista Argentina de Microbiología*, 47(3), pp. 251–255.
- Mamani Urquiza, I. (2008) *Evaluación del efecto bactericida de los desinfectantes en cepas bacterianas ATCC y cepas aisladas del área de fabricación de productos estériles, realizando pruebas de dilución “In Use” en laboratorios Bagó de Bolivia S.A.* Universidad Mayor De San Andres.
- Martínez Bagur, L. (2013) ‘Guía de antisépticos y desinfectantes’, *Hospital Universitario de Ceuta*, p. 27.
- Mattos de Oliveira, M. *et al.* (2009) ‘Disinfectant action of Cymbopogon sp . essential oils in different phases of biofilm formation by Listeria monocytogenes on stainless steel surface’, *Food Control*, 21(4), pp. 549–553.
- Mcdonnell, G. and Russell, D. (1999) ‘Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance’, *Clinical Microbiology Reviews*, 12(1), pp. 147–179.
- McGerald, D. and Russell, D. (1999) ‘Antiseptics and disinfectants : Activity , action , and resistance’, *Clin Microbiol Rev.*, 12(1), pp. 147–179.
- MINSA (2002) *Manual de desinfección y esterilización hospitalaria*, Ministerio de Salud. Lima, Perú.
- Mohamaden, W.I. *et al.* (2019) ‘Experimental infection in mice with Erwinia persicina’, *Microbial Pathogenesis*, 130, pp. 38–43.

- Nieto, G., Ros, G. and Castillo, J. (2018) ‘Antioxidant and Antimicrobial Properties of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): A Review’, *Medicines*, 5(3), p. 98. Available at: <https://doi.org/10.3390/medicines5030098>.
- Palá Paúl, J. (2002) *Contribución Al Conocimiento De Los Aceites Esenciales Del Género “Eryngium” L, En La Península Ibérica*. Universidad Complutense de Madrid.
- Ramona Martín, M. (2019) ‘Infección del tracto urinario por *Pantoea agglomerans*: ¿un patógeno de pacientes inmunodeprimidos?’, *Rev Pediatric Aten Primaria*, 21, pp. 201–203.
- Ramos Vivas, J. (2020) ‘Microbiología de *Hafnia alvei*’, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 38(Supl 1), pp. 1–6.
- Romeu, C., Botta, E. and Díaz, Y. (2007) ‘Caracterización fitoquímica del aceite esencial de Romero (*Rosmarinus officinalis* L.) y evaluación In Vitro de su actividad acaricida’, *Fitosanidad*, 11(2), pp. 75–78.
- Rouf, A. *et al.* (2020) ‘An updated and comprehensive review of the antiviral potential of essential oils and their chemical constituents with special focus on their mechanism of action against various influenza and coronaviruses.’, *Microbial Pathogenesis* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104620>.
- Sánchez, R. *et al.* (2015) ‘Efecto de desinfectantes químicos y extractos de plantas sobre la carga bacteriana en carcasas de cuyes (*Cavia porcellus*)’, *Rev Inv Vet Perú*, 26(2), pp. 235–244.
- Sánchez Tito, M., Cartagena Cutipa, R. and Collantes Díaz, I. (2021) ‘Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Griseb) L. frente a *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*’, *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 40(3), pp. 961–975.
- Satyal, P. *et al.* (2017) ‘Chemotypic characterization and biological activity of *Rosmarinus officinalis*.’, *Foods*, 6(3), p. 20.
- Sepehri Z., Javadian F., Khammari D., H.M. (2016) ‘Antifungal effects of the aqueous and ethanolic leaf extracts of *Echinophora platyloba* and *Rosmarinus officinalis*.’, *Curr Med Mycol*, 2(1), pp. 30–35.
- Sepúlveda Jiménez, G., Porta Ducoing, H. and Rocha Sosa, M. (2003) ‘La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas’, *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3), pp. 355–363.
- Sharifi, J. *et al.* (2017) *Biological activities of essential oils: From plant chemoecology to traditional healing systems*, *Molecules*. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules22010070>.
- Taheri, S. *et al.* (2021) ‘Investigation of microbial contamination in the clinic and laboratory of the prosthodontics department of dental school’, *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*, 21, pp. 1–7. Available at: <https://doi.org/10.1590/pboci.2021.021>.

Tártara, S. (2013) ‘Klebsiella pneumoniae productora de carbapenemasas (KPN- KPC)’, *Nefrología, Diálisis y Trasplante*, 33 (2), pp. 103–109.

Torrenegra Alarcón, M., Nerlis Pájaro, P. and León Méndez, G. (2017) ‘Actividad antibacteriana in vitro de aceites esenciales de diferentes especies del género Citrus’, 46(2), pp. 160–175.

Vega Otiniano, A. (2020) *Efecto del aceite esencial de Ninnamomum zeylanicum y Rosmarinus officinalis al 50% en la desinfección de conductos radiculares contaminados con Enterococcus faecalis*. Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote.

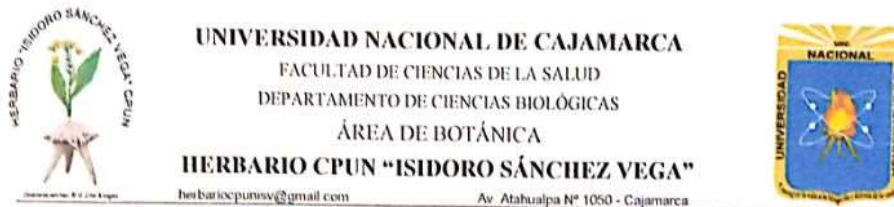
Weir, S. *et al.* (2002) ‘Efficacy of common laboratory disinfectants on the infectivity of Cryptosporidium parvum Oocysts in cell culture’, *Applied And Environmental Microbiology*, 68(5), pp. 2576–2579.

Yang, L. *et al.* (2018) ‘Response of plant secondary metabolites to environmental factors’, *Molecules*, 23 (4), pp. 1–26.

ANEXOS Y APÉNDICES

ANEXOS

Anexo 1. Constancia taxonómica del vegetal.



EL CURADOR DEL HERBARIO CPUN "ISIDORO SÁNCHEZ VEGA", DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA – PERÚ

HACE CONSTAR:

Que, la muestras botánica procedente del Caserío Shidin, distrito de Jesús, provincia y departamento de Cajamarca, ubicado a 2844 msnm, con coordenadas 7° 16' 19" L.S. 78° 22' 50" L.O., presentada por la Bachiller: **Mónica Lisset Quispe Cruz**, de la Escuela Académico Profesional de Biología y Biotecnología de la Universidad Nacional de Cajamarca. Es parte del Proyecto: "Acción desinfectante del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) sobre superficies de laboratorio".

Las cuales fueron analizadas y determinadas científicamente en nuestra institución como:

- Especie: *Rosmarinus officinalis* L.
- Género: *Rosmarinus*
- Familia: Lamiaceae
- Orden: Lamiales
- Clase: Magnoliopsida
- División: Magnoliophyta

Se expide el presente para los fines que sean necesarios.

Cajamarca, 23 de noviembre del 2021

The image shows a blue circular stamp of the 'UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA HERBARIO CPUN PERU' and a handwritten signature. Below the signature is the text: 'Ing. Juan F. Montoya Quino', 'Curador del Herbario "Isidoro Sánchez Vega"', and 'CPUN-UNC'.

cc: Secretaria del Herbario.

APÉNDICES

APÉNDICE 1. Lugar de recolección de vegetal.



Figura 1. Cultivo de romero en el Caserío Shidin, Jesús, Cajamarca.

Tabla 8. Coordenadas de geolocalización de cultivo de romero, ubicado a 2844 m.s.n.m. en el caserío Shidin, Jesús, Cajamarca

Parámetro	Coordenadas		
Latitud	- 7°	16'	19''
Longitud	- 78°	22'	50''

APÉNDICE 2. Obtención de aceite esencial de romero mediante destilación por arrastre de vapor de agua.



Figura 2. Selección de muestra vegetal



Figura 3. Sistema de extracción de aceite esencial por destilación por arrastre de vapor.



Figura 4. Obtención de aceite esencial de romero.

APÉNDICE 3. Caracterización fenotípica y bioquímica de las bacterias aisladas de las mesas de los laboratorios.

Tabla 9. Características fenotípicas y bioquímicas de los aislamientos.

Código del Aislamiento	Fenotípicas					Pruebas Bioquímicas													
	Morfología	Tinción Gram	Espora	Hemólisis	Catalasa	Citrato	Glucosa	Lactosa	Sacarosa	Ureasa	VP	RM	H ₂ S	Movilidad	LDC	ODC	Indol	Gas	Pigmento piocianina
M2(1)	c	+	-	β	+	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	-
M2(2)	c	+	-	β	+	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	-
M4(1)	c	+	-	β	+	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	-
M4(2)	c	+	-	γ	+	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	-
M5(1)	c	+	-	γ	+	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	-
M5(2)	b	-	-	γ	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
M5(4)	b	-	-	γ	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
M6(1)	b	-	-	β	+		+	+					+						+
M7(1)	b	-	-	γ	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
M8(1)	b	+	+	γ	+	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	-
M9(1)	b	-	-	γ	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
M9(2)	b	-	-	γ	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
M10(1)	c	+	-	γ	+	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	-
M11(1)	b	-	-	γ	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
M11(2)	b	-	-	γ	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
M12(1)	b	-	-	γ	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-
M13(1)	b	-	-	γ	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-			+	+	-
M13(2)	b	-	-	γ	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-

VP: prueba Voges-Proskauer; RM: prueba de Rojo de Metilo; b: bacilo; c: coco; sc: sin crecimiento; +: positivo; -: negativo; LDC: Descarboxilación de la lisina; ODC: Ornitina descarboxilasa

APÉNDICE 4. Evaluación de la eficiencia bactericida (Método del coeficiente fenólico modificado)



Figura 5. Coloración Gram de los aislamientos: Azul violeta.

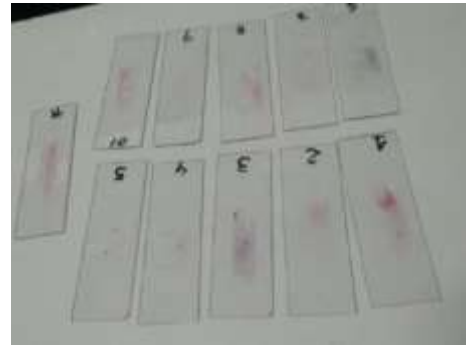


Figura 6. Laminas coloreadas por tinción Gram listas para observar en microscopio



Figura 7. Aislamiento M12(1) bacilos Gram negativos, observación a 1000x.

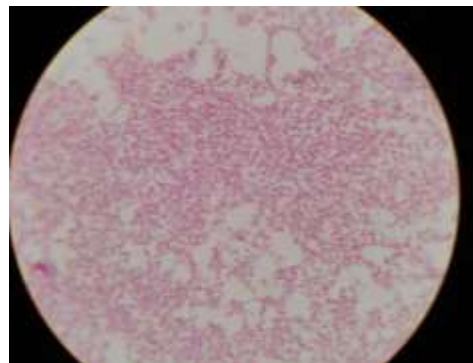


Figura 8. Aislamiento M6(1) Bacilos cortos Gram negativos, Observación a 1000x.

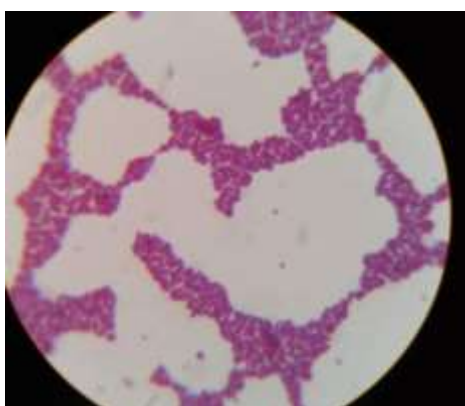


Figura 9. Aislamiento M10(1) Cocos agrupados en racimos Gram positivos, Observación a 1000x.



Figura 10. Aislamiento M10(1) en Agar sangre. Colonias blancas, sin hemólisis.



Figura 11. Aislamiento M6(1) en agar King A, coloración verdosa por el pigmento piocianina, típico de *Pseudomonas aeruginosa* en este medio de cultivo.

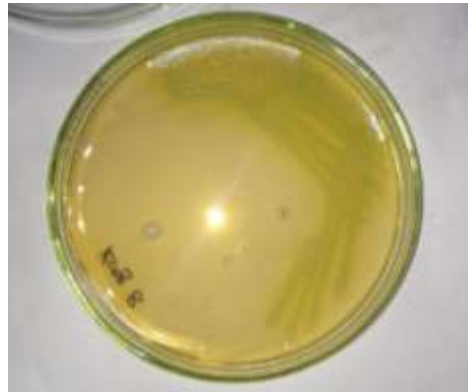


Figura 12. Aislamiento M6(1) en agar King B, permite la producción de pigmento pioverdina. coloración amarillo-verdoso en *P. aeruginosa*.



Figura 13. Aislamiento M10(1) en agar McConkey, colonias rosadas, por la fermentación de la lactosa.



Figura 14. Prueba de catalasa, formación de burbujas (catalasa positiva)



Figura 15. Aislamiento M10(1) Coagulasa positivo, evidenciando la presencia de la enzima coagulasa.



Figura 16. Prueba bioquímica del aislamiento M12(1).



Figura 17. Ajuste de turbidez del inóculo con el tubo N° 0.5 de la escala Mc Farland.



Figura 18. Diluciones de inóculos hasta 10^{-8}



Figura 19. De izquierda a derecha, Control positivo (Ceftriaxona 1g), Control Negativo (DMSO 5 %) y concentraciones de AER 10 %,50 % y 100 %.



Figura 20. Siembra de 1mL de muestra tratada en placa de Petri.



Figura 21. Incorporación de medio de cultivo Agar Recuento en Placa



Figura 22. Aislamiento M10(1) expuesto por 1 minuto a AER 10 % (Izquierda placa 1, derecha placa 2).



Figura 23. Aislamiento m8(1) expuesto por 1 minuto a Ceftriaxona (Control positivo).



Figura 24. Aislamiento M12(1) expuesto a AER al 10 % por 5 minutos. (Izquierda placa 1, derecha placa 2).

Tabla 10. Recuento de colonias de la eficiencia bactericida del aceite esencial de romero (AER) a 10 %, 50 % y 100 %, en un tiempo de contacto de 1 minuto.

	Tiempo	Código de aislamiento	CRO	C-	AER 10 %	AER 50 %	AER 100 %
PLACA 1	1 min	M10(1)	0	620	0	0	0
	1 min	M8(1)	0	28	0	0	0
	1 min	M12(1)	0	173	46	0	0
	1 min	M6(1)	0	94	16	0	0
PLACA 2	1 min	M10(1)	0	584	309	0	0
	1 min	M8(1)	0	70	0	0	0
	1 min	M12(1)	0	181	33	0	0
	1 min	M6(1)	0	104	21	0	0

CRO: Ceftriaxona 1g; C-: Dimetilsulfóxido 5% (DMSO 5%)

Tabla 11. Recuento de colonias de la eficiencia bactericida del AER a 10 %, 50 % y 100 %, en un tiempo de contacto 5 minutos.

	TIEMPO	Código de aislamiento	CRO	C-	AER 10 %	AER 50 %	AER 100 %
PLACA 1	5 MIN	M10(1)	0	115	0	0	0
	5 MIN	M8(1)	0	74	0	0	0
	5 MIN	M12(1)	0	71	0	0	0
	5 MIN	M6(1)	0	59	5	0	0
PLACA 2	5 MIN	M10(1)	0	118	0	0	0
	5 MIN	M8(1)	0	78	0	0	0
	5 MIN	M12(1)	0	81	0	0	0
	5 MIN	M6(1)	0	45	5	0	0

CRO: Ceftriaxona 1g; C-: Dimetilsulfóxido 5%

APENDICE 5. Preparación del desinfectante a base de aceite esencial de romero.



Figura 25. Calentando a 60°C: ácido esteárico en beaker 1(B1) y agua destilada con betaina de coco en beaker 2 (B2).



Figura 26. Mezcla de componentes a 60°C.



Figura 27. Desinfectante al 50% de aceite esencial de romero.

APENDICE 6. Evaluación de la eficiencia bactericida sobre superficie.



Figura 28. Mesas marcadas con cuadrantes de 25x25cm.



Figura 29. Inoculación de cuadrantes con 0.1mL de microorganismos a ensayar.



Figura 30. Aplicación de desinfectante por método de aspersión.



Figura 31. Recolección de carga microbiana con hisopos.



Figura 32. Siembra de 1 mL de carga microbiana con neutralizante.



Figura 13. Incorporación de medio PCA, por técnica vertido en placa.



Figura 34. Placa 1 de control positivo del aislamiento M6(1) con un tiempo de contacto de 5 minutos.



Figura 35. Placa 1 de control negativo del aislamiento M6(1) con un tiempo de contacto de 5 minutos.



Figura 36. Placa 1 de grupo experimental (Desinfectante AER) del aislamiento M6(1) con un tiempo de contacto de 5 minutos.



Figura 37. Placa 2 de grupo experimental (Desinfectante AER) del aislamiento M8(1) con un tiempo de contacto de 5 minutos.

Tabla 12. Recuento de colonias para la evaluación bactericida del desinfectante a base de aceite esencial de romero al 50 % con un tiempo de contacto de 5 minutos.

	Tiempo	Gram	Código de aislamiento	C +	C -	DAER
Placa 1	5 min	+	M10(1)	3	35	5
	5 min	+	M8(1)	0	22	4
	5 min	-	M12(1)	4	9	2
	5 min	-	M6(1)	1	280	9
Placa 2	5 min	+	M10(1)	4	34	13
	5 min	+	M8(1)	1	12	6
	5 min	-	M12(1)	4	16	4
	5 min	-	M6(1)	1	304	5

C+: Hipoclorito de sodio 0.5%; C-: Control Negativo; DAER: Desinfectante a base de aceite esencial de romero al 50 %.

APENDICE 7. Pruebas de hipótesis

Prueba de Kruskal-Wallis

a) Hipótesis estadísticas:

Ho: No existen diferencias entre las eficiencias bactericidas en los diferentes grupos de tratamiento a 1 minuto de contacto.

Ha: Existen diferencias entre las eficiencias bactericidas en los diferentes grupos de tratamiento a 1 minuto de contacto.

b) Nivel de significación: $p \leq 0,05$

c) Estadístico de prueba: Kruskal-Wallis

Rangos			
	Tratamiento	N	Rango promedio
eficiencia	AER 100 %	4	10,00
	AER 50 %	4	10,00
	AER 10 %	4	4,00
	CRO	4	10,00
	Total	16	

Estadísticos de prueba^{a,b}

	Eficiencia
H de Kruskal-Wallis	10,253
gl	3
Sig. asintótica	,017

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: tratamiento

d) Decisión:

$p > 0,05 \rightarrow$ No se rechaza la hipótesis nula.

$p \leq 0,05 \rightarrow$ Se rechaza la hipótesis nula

e) Conclusión:

Existen diferencias entre las eficiencias bactericidas en los diferentes grupos de tratamiento a 1 minuto de contacto.

Pruebas post hoc:

Comparaciones por parejas de tratamiento

Sample 1-Sample 2	Estadístico de prueba	Desv. Error	Desv. Estadístico de prueba	Sig.	Sig. ajustada ^a
AER 10 %-AER 100 %	6,000	2,295	2,614	,009	,054
AER 10 %-AER 50 %	6,000	2,295	2,614	,009	,054
AER 10 %-CRO	-6,000	2,295	-2,614	,009	,054
AER 100 %-AER 50 %	,000	2,295	,000	1,000	1,000
AER 100 %-CRO	,000	2,295	,000	1,000	1,000
AER 50 %-CRO	,000	2,295	,000	1,000	1,000

Cada fila prueba la hipótesis nula que las distribuciones de la Muestra 1 y la Muestra 2 son iguales.

Se visualizan las significaciones asintóticas (pruebas bilaterales). El nivel de significación es de ,05.

a. Los valores de significación se han ajustado mediante la corrección Bonferroni para varias pruebas.

Prueba de Kruskal-Wallis

a) Hipótesis estadísticas:

Ho: No existen diferencias entre las eficiencias bactericidas en los diferentes grupos de tratamiento a 5 minutos de contacto.

Ha: Existen diferencias entre las eficiencias bactericidas en los diferentes grupos de tratamiento a 5 minutos de contacto.

b) Nivel de significación: $p \leq 0,05$

c) Estadístico de prueba: Kruskal-Wallis

Resumen de prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes

N total	16
Estadístico de prueba	3,000 ^{a,b}
Grado de libertad	3
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,392

a. Las estadísticas de prueba se ajustan para empates.

b. No se realizan múltiples comparaciones porque la prueba global no muestra diferencias significativas en las muestras.

d) Decisión:

$p > 0,05 \rightarrow$ No se rechaza la hipótesis nula.

$p \leq 0,05 \rightarrow$ Se rechaza la hipótesis nula

e) Conclusión:

No existen diferencias entre las eficiencias bactericidas en los diferentes grupos de tratamiento a 5 minutos de contacto.

Prueba de U de Mann Whitney

a) Hipótesis estadísticas:

Ho: No existen diferencias entre las eficiencias bactericidas del desinfectante comercial y el desinfectante a base de aceite de romero al 50 %.

Ha: Existen diferencias entre las eficiencias bactericidas del desinfectante comercial y el desinfectante a base de aceite de romero al 50 %.

b) Nivel de significación: $p \leq 0,05$

c) Estadístico de prueba: U de Mann Whitney

Resumen de prueba U de Mann-Whitney de muestras independientes

N total	8
U de Mann-Whitney	6,000
W de Wilcoxon	16,000
Estadístico de prueba	6,000
Error estándar	3,251
Estadístico de prueba estandarizado	-,615
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,538
Sig. exacta (prueba bilateral)	,686

d) Decisión:

$p > 0,05 \rightarrow$ No se rechaza la hipótesis nula.

$p \leq 0,05 \rightarrow$ Se rechaza la hipótesis nula

e) Conclusión:

Ho: No existen diferencias entre las eficiencias bactericidas del desinfectante comercial y el desinfectante a base de aceite de romero al 50 %.