



UNAP



FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS
ALIMENTARIAS**

TESIS

**EVALUACIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Chamaesyce thymifolia*
COMO SOLUCIÓN DESINFECTANTE NATURAL EN SUPERFICIES
INERTES EN CONTACTO CON ALIMENTOS**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

PRESENTADO POR:

JOSELYN LOURDES SÁNCHEZ MATOS

LEDY MIRELLA CARO CASANOVA

ASESORA:

Blga. JESSY PATRICIA VÁSQUEZ CHUMBE, Mgr.

IQUITOS, PERÚ

2022



UNAP

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

Escuela Profesional de
Ingeniería en Industrias Alimentarias

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N° 009-CGT-FIA-UNAP-2022

A los 30 días del mes de abril de 2022, a horas 9:20, en las instalaciones del laboratorio de ingeniería, ubicado en la Planta Piloto, sito Av. Freyre N° 610, dando inicio a la sustentación pública de la Tesis titulada : **“EVALUACIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Chamaesyce thymifolia* COMO SOLUCIÓN DESINFECTANTE NATURAL EN SUPERFICIES INERTES EN CONTACTO CON ALIMENTOS”**, presentado por las Bachilleres **JOSELYN LOURDES SÁNCHEZ MATOS** y **LEDY MIRELLA CARO CASANOVA**, para optar el Título Profesional de Ingeniero (a) en Industrias Alimentarias, que otorga la Universidad de acuerdo a Ley y Estatuto.

El Jurado Calificador y dictaminador designado mediante Resolución Decanal N° 0106-FIA-UNAP-2022 del 29 de marzo de 2022, está integrado por:

Ing. ALENGUER GERONIMO ALVA AREVALO, Dr.
Ing. MARÍA ISABEL MAURY LAURA, Dra.
Ing. CARLOS ANTONIO LI LOO KUNG, Dr.

Luego de haber escuchado con atención y formulado las preguntas necesarias, las cuales fueron respondidas: Satisfactoriamente

El Jurado después de las deliberaciones correspondientes, llego a las siguientes conclusiones:

La sustentación pública y la tesis ha sido: Aprobada con la calificación Muy buena

Estando las bachilleres aptas para obtener el Título Profesional de Ingeniero (a) en Industrias Alimentarias Siendo las 10:30 am se dio por terminado el acto de sustentación.

Presidente
Ing. ALENGUER GERONIMO ALVA AREVALO, Dr.
CIP: 45167

Miembro
Ing. MARÍA ISABEL MAURY LAURA, Dra.
CIP: 37238

Miembro
Ing. CARLOS ANTONIO LI LOO KUNG, Dr.
CIP: 75104

Asesora
Bgla. JESSY PATRICIA VÁSQUEZ CHUMBE, Mgr
CBP: 2584



JURADO CALIFICADOR

El jurado calificador certifica que el trabajo de investigación” **EVALUACIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Chamaesyce thymifolia* COMO SOLUCIÓN DESINFECTANTE NATURAL EN SUPERFICIES INERTES EN CONTACTO CON ALIMENTOS**” de la responsabilidad de las bachilleres **JOSELYN LOURDES SANCHEZ MATOS Y LEDY MIRELLA CARO CASANOVA**, han sido detalladamente revisados por los miembros del jurado quedando autorizado para la sustentación.



Ing. Alenguer Geronimo Alva Arevalo, Dr.

Presidente



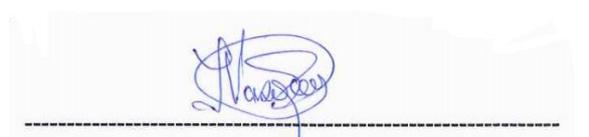
Ing. María Isabel Maury Laura, Dra.

Miembro



Ing. Carlos Antonio Li Loo Kung, Dr.

Miembro



Blga. Jessy Patricia Vásquez Chumbe, Mgr.

Asesora

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a la persona más importante para mí que es mi adorada madre **Geneveva del Rocío Matos Clausi**, que con su esfuerzo y sacrificio es que pude seguir adelante, por el apoyo constante e incondicional que me da para mejorar cada día.

A mi hermano **Joan Sánchez Matos** por sus consejos, paciencia, su apoyo incondicional y ser un ejemplo para mí.

No obstante, también tengo un aprecio especial a mi amiga **Ledy CC** por compartir el proyecto juntas y a pesar de las dificultades seguimos adelante y culminar el proyecto de tesis.

JOSELYN LOURDES SANCHEZ MATOS

Con todo mi corazón dedico este trabajo a mis padres **Rossana Casanova Guillena** y **Raúl Armando Caro Cantos**, que con bendición y protección forjaron la persona que soy en la actualidad y me motivan constantemente para alcanzar mis anhelos.

A mi hermana, amiga y confidente **Yoeisi Rossana Caro Casanova** que con amor y paciencia siempre me acompaña en cada paso importante de mi vida.

A mi compañera y amiga **Josselyn** por los buenos momentos compartidos y apoyo durante nuestro periodo de aprendizaje en nuestra carrera profesional.

A mi novio y amigo incondicional **Jesús** por las enseñanzas y motivación para mi crecimiento personal y profesional.

LEDY MIRELLA CARO CASANOVA

AGRADECIMIENTO

En el presente trabajo de investigación, agradecemos en primer lugar a Dios por guiar nuestros pasos y permitir cada uno de nuestros logros resultado de su bendición y bondad para con nosotras

A la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana por habernos dado una agradable experiencia y ser parte de ella. También a los docentes que nos brindaron su conocimiento para convertimos en profesionales.

Un agradecimiento especial al Ing. Jorge Ysaac Villacres Vallejo, porque nos permitió la utilización de su laboratorio en el Instituto de Medicina Tradicional del ESSALUD (IMET) para la concentración del extracto.

Reconocimiento por la labor conjunta en el asesoramiento del trabajo de tesis a la Blga. Jessy Patricia Vásquez Chumbe, a quien debemos gran parte de nuestro aprendizaje, desarrollo de destrezas y habilidades durante la investigación, junto a los compañeros Patricia Lizbeth, Fiorella Chávez, Yurasi Díaz y al Lic. Alexander Javier Iman Torres que con paciencia y conocimientos fueron esenciales durante el desarrollo de la ejecución de la parte experimental de la tesis.

ÍNDICE GENERAL

PORTADA	i
ACTA DE SUSTENTACION	ii
JURADO CALIFICADOR	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE GENERAL	vii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I: MARCO TEÓRICO	3
1.1 Antecedentes	3
1.2 Bases teóricas	10
1.2.1 Chamaesyce thymifolia	10
1.2.2 Higiene alimentaria	12
1.2.3 Limpieza, desinfección y saneamiento	13
1.2.4 Objetivos de la limpieza y desinfección	15
1.2.5 Vectores Contaminación cruzada	16
1.2.6 Desinfección química	18
1.2.7 Desinfectantes Naturales	19
1.2.8 Metabolitos Secundarios	19
1.2.9 Métodos de Evaluación de Desinfectantes	21
1.3 Definición de términos básicos	22
CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES	24
2.1 Formulación de la hipótesis	24
2.2 Variables y su operacionalización	24
2.2.1 Variables de estudio de la actividad antibacteriana	24
2.2.2 Variables de estudio de evaluación de la eficacia del extracto etanólico como desinfectante natural.	24

CAPITULO III: METODOLOGÍA	28
3.1 Diseño metodológico.	28
3.1.1. Tipo y diseño de investigación.	28
3.2 Diseño Muestral.	29
3.2.1 Población	29
3.2.2 Muestra	29
3.2.3 Criterios de selección	30
3.2.3.1 Criterios de Inclusión	30
3.2.3.2 Criterios de Exclusión.	30
3.3 Procedimiento de recolección de datos	30
3.3.1 Identificación de la muestra vegetal	30
3.3.2 Obtención del extracto etanólico por maceración	31
3.3.3 Rendimiento	33
3.3.4 Tamizaje Fitoquímico Cualitativo	33
3.3.5 Carga microbiana de las superficies en estudio.	33
3.3.6 Activación de las cepas bacterianas	35
3.3.7 Preparación de los agentes antimicrobianos.	36
3.3.8 Evaluación de la Actividad Antibacteriana	36
3.3.8.1. Disco Difusión (Kirby- Bauer)	37
3.3.8.2. Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	39
3.3.8.3. Determinación de Concentración Mínima Bactericida (CMB)	42
3.3.9 Determinación de la acción bactericida in vivo del desinfectante natural.	42
3.4 Procesamiento y análisis de datos	43
3.5 Aspectos éticos	43
CAPITULO IV: RESULTADOS	44
4.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO VEGETAL.	44
4.1.1 Determinación del rendimiento de <i>Chamaesyce thymifolia</i>	44
4.1.2 Identificación de Metabolitos Secundarios: Tamizaje fitoquímico.	44
4.1.3 Actividad antibacteriana de <i>Chamaesyce thymifolia</i> (pie de paloma)	45
4.1.3.1 Método Disco Difusión (Kirby Bauer)	45
4.1.3.2 Método de Macrodilución (Concentración Mínima Inhibitoria)	51

4.1.3.3 Concentración Mínima Bactericida (CMB)	52
4.1.3 Acción bactericida in vivo del extracto de <i>Chamaesyce thymifolia</i> usado como desinfectante natural.	53
4.1.3.1 Análisis de Varianza del recuento de Mesófilos Aerobios Viabes en concentración de extracto etanólico de <i>Chamaesyce thymifolia</i> en 5 minutos.	53
4.1.3.2 Análisis de Varianza del recuento de Mesófilos Aerobios Viabes en concentración de extracto etanólico de <i>Chamaesyce thymifolia</i> en 15 minutos.	54
4.1.3.3 Análisis de Varianza del recuento de Mesófilos Aerobios Viabes por concentración de extracto etanólico de <i>Chamaesyce thymifolia</i> por tiempo de 30 minutos.	55
4.1.3.4 Análisis de Varianza del recuento de Mesófilos Aerobios Viabes por tiempo de desinfección y concentración de 16 mg/mL del extracto etanólico de <i>Chamaesyce thymifolia</i> .	57
4.1.3.5 Análisis de Varianza del recuento de Mesófilos Aerobios Viabes por tiempo de desinfección y concentración de 32 mg/mL del extracto etanólico de <i>Chamaesyce thymifolia</i> .	58
4.1.3.6 Análisis de Varianza del recuento de Mesófilos Aerobios Viabes por tiempo de desinfección y concentración de 64 mg/mL del extracto etanólico de <i>Chamaesyce thymifolia</i> .	60
4.1.4 Acción bactericida in vivo del extracto de <i>Chamaesyce thymifolia</i> usado como desinfectante natural mediante la reducción logarítmica del crecimiento de mesófilos aerobios viabes.	61
CAPITULO V: DISCUSIÓN	63
CAPITULO VI: CONCLUSIONES	67
CAPITULO VI: RECOMENDACIONES	68
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	69
ANEXOS	79

RESUMEN

El trabajo surgió por necesidad de búsqueda de metabolitos secundarios a partir de plantas de la Amazonía peruana para ser estudiadas como desinfectantes naturales. El objetivo fue comprobar el efecto bactericida “*in vivo*” del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* en superficies de mesas expendedoras de pollo faenado de la casona del Mercado Belén-Iquitos. El diseño de la investigación fue un explicativo, con arreglo factorial completamente al azar. El trabajo se dividió en tres etapas: obtención del extracto etanólico y sus componentes químicos, actividad antibacteriana *in vitro* mediante disco difusión, CMI y CMB y actividad antibacteriana “*in vivo*” mediante recuento de mesófilos aerobios viables y reducciones logarítmicas. Los resultados muestran que los componentes químicos del extracto son abundantes triterpenos, esteroides, fenoles y taninos; y en forma moderada alcaloides, lactonas y cumarinas. La actividad antibacteriana *in vitro* por disco difusión demostró ser sensible para *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 e intermedio para *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 25613, y resistente para *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. La CMI estuvo entre 2 a 8 mg/mL y la CMB entre 32 y 128 mg/mL. La actividad antimicrobiana *in vivo*, muestra una alta significancia estadística ($p < 0.01$) en una concentración de 16 mg/mL y tiempo de 30 minutos y la reducción logarítmica del recuento microbiano del extracto mostró un 99,9% de eficacia. Concluyendo que el extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* puede ser utilizado como desinfectante natural en superficies.

Palabras claves: *Chamaesyce thymifolia*, actividad antibacteriana, recuento microbiano, reducción logarítmica.

ABSTRACT

This work arose from the need to search for secondary metabolites from plants in the Peruvian Amazon to be studied as natural disinfectants. The objective was to verify the *in vivo* bactericidal effect of the ethanolic extract from *Chamaesyce thymifolia* on surfaces of slaughtered chicken vending tables of the Belen market house in Iquitos. The research design was explanatory, with a completely randomized factorial arrangement. The work was divided into three stages: obtainment of the ethanolic extract and its chemical components, *in vitro* antibacterial activity by disc diffusion, MIC/MBC, *in vivo* antibacterial activity by the count of viable aerobic mesophiles, and logarithmic reductions. The results show that the chemical components of the extract are abundant in triterpenes, steroids, phenols, and tannins; and moderately in alkaloids, lactones, and coumarins. The *in vitro* antibacterial activity by disc diffusion was sensitive for *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 and intermediate for *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ATCC 25923, and resistant to *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. The MIC was between 2 to 8 mg/mL and the MBC between 32 and 128 mg/mL. The antimicrobial activity *in vivo* showed a high statistical significance ($p < 0.01$) at a concentration of 16 mg/mL and a time of 30 minutes, the logarithmic reduction of the microbial count of the extract showed 99.9% efficacy. It is concluded that the ethanolic extract of *Chamaesyce thymifolia* can be used as a natural disinfectant on surfaces.

Keywords: *Chamaesyce thymifolia*, antibacterial activity, microbial count, log reduction.

INTRODUCCIÓN

Los alimentos pueden contaminarse en cualquier eslabón de la cadena alimentaria, desde el productor, procesador, vendedor y consumidor (OMS, 2016; OPS/OMS, 2015), ocasionando la aparición de brotes de enfermedades de transmisión alimentaria que se originan por prácticas higiénicas inadecuadas. La contaminación por superficies es una de las causas comunes de contaminación en el campo alimentario y doméstico (Kusumaningrum et al., 2004).

La vigilancia de la limpieza y desinfección de las superficies de ventas, específicamente en los mercados de abastos, debe ser una prioridad, de acuerdo al Reglamento Sanitario de Funcionamiento de Mercados de Abasto (RM N°282-2003-SA/DM), que estipula en su Título IV, artículo 36 e incisos f y d, que, estos deben disponer de un Programa de Higiene y Limpieza y en caso de puestos de ventas destinado al expendio de carnes y vísceras, el proceso de limpieza y desinfección debe realizarse todos los días (Reglamento Sanitario de Funcionamiento de Mercados de Abasto, 2003). El Mercado de Belén tiene actualmente vigente el Plan de Vigilancia, Prevención y Control del Covid 19 Mercado de Abastos del Distrito de Belén, el cual establece que la limpieza y desinfección de los puestos de ventas y mobiliarios es diaria y una limpieza y desinfección profunda de todo el mercado una vez a la semana, usando una concentración de hipoclorito de sodio de 206 mL/5 litros. Observándose que la limpieza y desinfección diaria es realizada por los vendedores sin ningún protocolo o vigilancia de parte de alguna autoridad sanitaria. Los productos utilizados en el proceso de limpieza y desinfección son detergentes e hipoclorito de sodio.

Existe una percepción negativa de algunos consumidores, sobre los desinfectantes químicos, los residuos que generan y los efectos secundarios que pueden ocasionar, por tanto, la búsqueda y uso de sustancias naturales como los extractos y aceites esenciales de plantas de nuestra Amazonía Peruana son una opción ecológica y natural a los desinfectantes químicos sintéticos, por sus propiedades antibacterianas, antifúngicos (Vidacs 2018) e incluso antivirales (Swamy et al., 2016).

Debido a ello, el trabajo de investigación buscó comprobar el efecto bactericida *in vivo* del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* como desinfectante natural en superficies inertes en contacto con alimentos. La importancia del trabajo es presentar una alternativa natural y respetuosa con el medio ambiente, que ayude a minimizar el riesgo de contaminación microbiana de los alimentos por contacto con superficies, demostrado con estos primeros resultados.

El trabajo se dividió en tres etapas. La primera tuvo el alcance siguiente: identificación taxonómica de la muestra vegetal realizada en el Herbarium Amazonense AMAZ-UNAP. Obtención del extracto etanólico por maceración cuyos procesos se encuentran en la Figura 2. Así mismo, se determinó el rendimiento de la extracción y el tamizaje fitoquímico cualitativo. La segunda etapa, consistió en determinar la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico mediante el test de Kirby-Bauer (Disco Difusión), Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) resultados que determinaron las concentraciones a trabajar en la siguiente etapa. La parte final del trabajo consistió en obtener los recuentos totales de Mesófilos Aerobios Viables de las superficies de mesas de venta de pollo beneficiado del Mercado Belén, aplicando el extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* (Pie de paloma) en tres concentraciones y tres tiempos diferentes, además de un control positivo representado por el hipoclorito de sodio.

Se llegó a la conclusión principal que el extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* presenta reducción logarítmica del recuento de Mesófilos Aerobios Viables en 99,9% de eficacia.

CAPITULO I: MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes

En 2020, se desarrolló una investigación de tipo cuantitativa y experimental que buscó determinar la técnica y el disolvente que permita obtener la mayor proporción de material extractable de hojas de *Larrea tridentata*, y evaluar su uso como desinfectante para control de *Salmonella typhimurium* al aplicarlo en instalaciones avícolas. El trabajo se realizó en dos etapas bien diferenciadas. La primera, obtención, cuantificación de material extractable y estudio de susceptibilidad antimicrobiana. En la fase de extracción se utilizó tres disolventes: agua desionizada, etanol y metanol. En el estudio de susceptibilidad se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) de los extractos obtenidos de *Larrea tridentata* sobre *S. typhimurium*, siguiendo los métodos estandarizados por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). En la segunda etapa se realizó el experimento: Desinfección de instalaciones avícolas, comparando desinfección con *Larrea tridentata* (DC), desinfección de rutina (DR) y vacío sanitario (VS). Al término de la desinfección, se colectaron muestras en piso, pared, techo y cortina. A los datos obtenidos se realizó el análisis de varianza y la comparación de medias por Tukey. En cuanto a los resultados, se obtuvo el mayor porcentaje de material extractable (36,43%) usando agua y proceso de decocción con 40 minutos de extracción, la menor concentración bactericida (300 mg mL^{-1}) y halos de inhibición de 13 mm. En la pared disminuyeron las unidades formadoras de colonia (UFC) con DC, en techo y cortinas fueron similares con DC y DR, en piso fueron menores con DR. Se concluye que el extracto acuoso de hojas de Creosote Bush (*Larrea tridentata*) es una alternativa de desinfección eficaz para control de *Salmonella typhimurium* en instalaciones avícolas (López-Aguirre et al., 2020).

En 2020, se desarrolló la investigación que evalúa la actividad inhibitoria de (+) -nootkatone, una cetona sesquiterpénica que se encuentra en el pomelo, contra la biopelícula de *Staphylococcus aureus* transmitida por los alimentos resistente a múltiples fármacos y describieron su mecanismo molecular potencial. Esta cetona exhibió efectos bacteriostáticos y bactericidas a 200 y

400 µg / mL, respectivamente, contra *S. aureus* SJTUF 20758 y *S. aureus* ATCC 25923. La tinción con violeta cristal indicó que (+) - nootkatone inhibió la formación de biopelículas de *S. aureus* ($p < 0.05$) a una sub-MIC de 50 µg / mL y redujo significativamente la producción de exopolisacáridos y el grosor de las biopelículas. La curva de crecimiento de las bacterias mostró que la actividad antibacteriana de (+) - nootkatone era dosis-dependiente, y las concentraciones de sub-MIC no afectaron el crecimiento bacteriano de las células planctónicas, pero afectó la motilidad deslizante de las bacterias estudiadas. A 200 µg/mL condujo a la reducción de la masa de biopelícula preformada en un 50% y la muerte celular bacteriana del 79%, acompañada de una reducción del exopolisacárido (Farha et al., 2020).

En 2019, se realizó una investigación de enfoque exploratorio multivariante para investigar las relaciones entre los conjuntos de datos químicos y microbiológicos. El objetivo fue evaluar nueve aceites esenciales (AE) para desarrollar una solución desinfectante natural (SAN) para desinfectar las superficies en contacto con los alimentos. El trabajo consistió en recolectar, extraer y caracterizar químicamente aceites esenciales de plantas poco conocidas; examinar su actividad antimicrobiana contra patógenos *Salmonella enterica* y *Escherichia coli* en superficies de acero inoxidable, vidrio y polipropileno. Entre los aceites esenciales probados, el de *Thymbra capitata* contiene hasta un 93,31% de monoterpenos oxigenados (principalmente carvacrol) y mostró la mayor actividad antimicrobiana y, por lo tanto, se ensayó como una SAN potencial para superficies en contacto con alimentos. Para ello, se validó primero una SAN compuesta por un 1% de aceite esencial de *T. capitata* según la norma AOAC, que mostró una reducción de aproximadamente 8 log para *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* tras 30 y 60 segundos de tiempo de contacto, respectivamente. A continuación, se evaluaron en distintas concentraciones, condiciones de limpieza y tiempos de contacto en superficies de acero inoxidable, vidrio y polipropileno para su desinfección. Los resultados mostraron que el SAN que contenía un 2,5% de aceite esencial de *T. capitata*, aplicada durante 10 minutos, redujo los niveles de *E. coli* en más de 3 log y de *S. enterica* en 1 log en condiciones de limpieza en las tres superficies probadas. Estos resultados

indican que los aceites esenciales pueden utilizarse como desinfectantes naturales para descontaminar las superficies en contacto con los alimentos, reduciendo así el riesgo de transferencia indirecta de patógenos bacterianos a los alimentos o a las personas (Falcó et al., 2019).

En el 2018, se desarrolló una investigación para estudiar tratamientos a base de aceites esenciales (AE) altamente efectivos contra los biofilms de *Staphylococcus aureus* formados en acero inoxidable y poliestireno. Los AE seleccionados se aplicaron en forma individual, combinaciones binarias y combinaciones con peracético, para determinar el tratamiento más eficaz. La significancia de los datos se evaluó mediante un ANOVA de una vía. La homogeneidad de las varianzas se examinó mediante una prueba de diferencia mínima (LSD) post hoc y también una prueba T3 de Dunnett. También se realizó una prueba t de Student de muestras independientes para comparar las variables en pares. La significancia estadística se aceptó con un nivel de confianza > 95% ($P < 0,05$). Los AE de *Lippia sidoides*, *Thymus vulgaris* y *Pimenta pseudochariophyllus* mostraron una mayor eficacia que el ácido peracético y el hipoclorito de sodio contra las células planctónicas de *S. aureus* y los biofilms de 24 horas formados en poliestireno y acero inoxidable en condiciones relacionadas con los alimentos con dosis superiores a 2,75% (v/v). Las combinaciones binarias de *L. sidoides*, *T. vulgaris* y *P. pseudochariophyllus* permitieron disminuir significativamente las dosis necesarias para reducir en un 99,99% el número de células de biofilms. Además, el ácido peracético aumentó su eficacia contra los biofilms de *S. aureus* mediante la aplicación combinada con estos AE. Los tratamientos más eficaces contra los biofilms fueron los que combinaban *L. sidoides* con *T. vulgaris* o ácido peracético. Por lo tanto, estos tratamientos a base de AE pueden considerarse una alternativa eficaz y respetuosa con el medio ambiente para controlar los biofilms de *S. aureus* en las superficies en contacto con los alimentos (Vázquez-Sánchez et al., 2018)

En 2018, un estudio evaluó el efecto de eliminación de biopelículas de aceites esenciales de canela, mejorana y tomillo frente a biopelículas maduras (168 horas) e inmaduras (24 horas) de *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*

formadas en superficies de polipropileno (PP). Utilizaron el diseño experimental Box-Behnken para optimizar los parámetros de acción desinfectante. Los factores variables fueron la concentración de los aceites esenciales (1,1-15,8 mg/mL), el tiempo de desinfección (10 min) y el pH (4,5-7,5). Los desinfectantes optimizados tuvieron éxito en la eliminación de biopelículas inmaduras y maduras, excepto el aceite esencial de canela para *E. coli* donde las biopelículas se destruyeron solo parcialmente. El efecto desinfectante de las soluciones naturales a base de aceites esenciales en la mayoría de los casos fue equivalente o mejor en comparación con el desinfectante químico a base de ácido peracético y el hipoclorito de sodio utilizado en la industria alimentaria (Vidács et al., 2018).

En 2017, se exploraron las acciones antibacterianas de los aceites esenciales de salvia y menta verde (AE) contra células planctónicas y de biopelícula de *Staphylococcus aureus*, en comparación con el hipoclorito de sodio (NaOCl), un desinfectante químico de aplicación habitual. Inicialmente se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias y bactericidas (CMI, CMB) de cada mezcla de plantas con los cultivos planctónicos, tras su crecimiento a 30 °C durante 24 h. Estas bacterias planctónicas en fase estacionaria se expusieron individualmente durante 6 minutos a cada aceite esencial (aplicado a 1-2 × CMB; 2,5-5%), y también al NaOCl (250-450 ppm). Se trabajaron de la misma manera con los biofilms, estas se formaron en microplacas de poliestireno de 96 pocillos, a 30 °C durante 96 h. Los biofilms formados se expusieron durante 6 minutos a cada aceite esencial (aplicado a 2-6 × CMB; 5-15%), y al NaOCl (7500-25,000 ppm; aplicado solo o en combinación con cada aceite esencial al 5%). Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) utilizando el software estadístico STATISTICA (StatSoft Inc. v.7; Tulsa, OK 74104, EE. UU.). Todas las diferencias se informaron a un nivel de significancia de 0.05. Los resultados mostraron que ambos aceites esenciales presentaban CIM y CMB iguales a 1,25 y 2,5%, respectivamente. Como era de esperar, su aplicación a su CIM y por encima de ella inhibió de forma significativa la formación de biopelículas, mientras que el aceite esencial de menta verde seguía siendo capaz de provocarlas a la mitad de su CIM, con un CBM igual a 1,25 y 0,63% para los aceites esenciales de salvia y menta

verde, respectivamente. De forma alarmante, la aplicación de ambos aceites a 1/8 o 1/16 de su CIM aumentó aún más la formación de biofilms. En cuanto a los experimentos de desinfección de biofilms, la aplicación individual de cada aceite esencial contra las comunidades sésiles preestablecidas dio lugar a rangos de disminución logarítmica de 0,8-3 log UFC/cm², mientras que en el caso de la aplicación de NaOCl (solo o combinado con cada esencial), las reducciones observadas nunca superaron los 1,7 log UFC/cm². Estos últimos resultados ponen de manifiesto la gran persistencia antimicrobiana de las comunidades de biofilms y se encontraron que son 100 veces más resistentes al NaOCl que las planctónicas, y subrayan la necesidad urgente de seguir investigando estrategias de desinfección alternativas, adecuadas y seguras para controlarlas en el procesamiento de alimentos y otros entornos (Vetas et al., 2017).

En 2017, el estudio evaluó el uso de los aceites esenciales en la eliminación de biopelículas de *Staphylococcus aureus*. El diseño experimental estuvo dividido en tres fases:(i) evaluar la eficacia antimicrobiana de diferentes aceites esenciales en el crecimiento de *S. aureus* planctónicas y en biofilms, (ii) seleccionar los compuestos naturales más activos para formular las microemulsiones, (iii) prueba de la eficacia de las microemulsiones contra las biopelículas de *S. aureus* desarrollado en la superficie de cupones de acero inoxidable en diferentes medios de cultivo y condiciones de crecimiento. Se evaluó la concentración mínima inhibitoria (MIC), la concentración mínima bactericida (MBC), la concentración mínima de Inhibición de biofilm (MBIC), la concentración mínima de erradicación de biofilm (MBEC). Se usó once aceites esenciales puros con una concentración final al 10%. Se valoraron tres microemulsiones, *C. cassia* al 2.5%, *S. officinalis* al 5% y *C. cassia* + *S. officinalis* (2,5% + 2,5%) que se probaron contra biopelículas con tiempos de contactos de 15, 60y 90 minutos. En la estadística paramétrica se utilizó la varianza unidireccional (ANOVA) con la prueba posterior de Bonferroni; para la estadística no paramétrica se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis con la prueba de comparación múltiple de Dunn, con $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Los resultados mostraron que, los aceites esenciales de *Cinnamomum cassia* y *Salvia officinalis* mostraron las mayores propiedades antibacterianas con 1,25% MIC y MBC, 1,25% MBIC y 2,5% MBEC respectivamente. El análisis de cromatografía de gases / espectrometría de masas reveló cinamaldehído (82,66%) y metoxicinamaldehído (10,12%) como las sustancias más abundantes en el aceite esencial *Cinnamomum cassia*. Respecto a *Salvia officinalis*, se han identificado como las sustancias más abundantes cis-tuyona (23,90%), alcanfor (19,22%) y 1,8-cineol (10,62%). La eficacia de las emulsiones frente a *S. aureus* en los biofilms de 24 horas y desecados causó reducciones logarítmicas mayor de 3 y 68% de eliminación de la biopelícula después de 90 min de exposición. Los datos sugieren el uso potencial de dos aceites esenciales, solos o en combinación, para la formulación de desinfectantes como alternativa en la desinfección de superficies contaminadas (Campana et al. 2017).

En 2016, se desarrolló esta investigación que tuvo como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana del hidrosol de la especia mediterránea *Thymbra capitata* frente a células planctónicas y de biofilm de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y comparar su acción con cloruro de benzalconio (BC). La comprobación del efecto de los desinfectantes en las células planctónicas se realizó con tratamientos de 6 min a 20°C, según el procedimiento de EN 1040. El efecto bactericida contra las células de la biopelícula también se determinó comparativamente mediante evaluación *in situ* y visualización en tiempo real de la inactivación celular mediante el uso de microscopía de barrido láser confocal de lapso de tiempo (CLSM). Los resultados revelaron que el hidrosol era casi igualmente efectivo contra las biopelículas y las células planctónicas, mientras se necesitaba una concentración 200 veces mayor de BC para lograr el mismo efecto contra las biopelículas en comparación con las células planctónicas. De manera similar, CLSM de lapso de tiempo reveló la ventaja significativa del hidrosol para penetrar fácilmente dentro de la estructura de la biopelícula y matar rápidamente las células, a pesar de la estructura tridimensional (3D) de la biopelícula de *Salmonella*. Los resultados destacan la importante acción antimicrobiana de un compuesto natural, el hidrosol de *Thymbra capitata*, contra las células planctónicas y de biopelícula de un patógeno común transmitido por los alimentos. Hidrosol tiene

numerosas ventajas como desinfectante de superficies en contacto con alimentos. Es una solución acuosa que se aclara fácilmente de las superficies, no tiene el fuerte olor del aceite esencial y es un subproducto del procedimiento de destilación del aceite esencial sin ninguna aplicación industrial hasta ahora. En conclusión, el hidrosol podría ser de gran valor para combatir las biopelículas y así mejorar la seguridad del producto no solo para las industrias alimentarias sino también para muchas otras industrias que experimentan problemas relacionados con las biopelículas (Karampoula et al., 2016).

En 2008, se realizó esta investigación cuyo objetivo fue evaluar la acción antimicrobiana de tres productos de origen natural (aceite esencial, decocción e hidrosol de *Satureja thymbra*) frente a biopelículas compuestas por bacterias útiles, alterantes y patógenas (formadas como monocultivo y/o cultivo mixto) y comparar su eficacia con tres desinfectantes químicos estándar ácidos y alcalinos. Dos ácidos (clorhídrico y láctico, pH 3), un álcali (hidróxido de sodio, pH 11), el aceite esencial de *S. thymbra* (1% v/v) y los dos subproductos del procedimiento de purificación del aceite esencial (la decocción y la fracción de hidrosol del aceite esencial, 100%), se ensayaron contra las biopelículas formadas por cinco especies bacterianas, bien como monoespecie, bien como cultivo mixto de todas las especies. Las especies bacterianas ensayadas fueron *Staphylococcus simulans* y *Lactobacillus fermentum* (bacterias tecnológicas útiles), *Pseudomonas putida* (bacteria de deterioro), *Salmonella enterica* y *Listeria monocytogenes* (bacterias patógenas). Las biopelículas se formaron en los cupones de acero inoxidable durante 5 días a 16 °C, antes de aplicar los tratamientos de desinfección, durante 60 y 180 min. La eficacia de la desinfección se evaluó desprendiendo las células viables restantes de la biopelícula y enumerándolas mediante placas de agar y por conductancia automatizadas (utilizando la técnica de impedancia bacteriana rápida automatizada). Ambos métodos revelaron que el aceite esencial y el hidrosol de *S. thymbra* mostraron una fuerte acción antimicrobiana tanto contra las biopelículas mono-específicas como contra las de cultivo mixto. Sorprendentemente, la eficacia de los otros tres desinfectantes ácido-base no fue adecuada, aunque se aplicó un tratamiento antimicrobiano prolongado

(180 min). El aceite esencial de *S. thymbra* (1%), así como su fracción de hidrosol (100%), presentan un efecto bactericida suficiente sobre las biopelículas bacterianas formadas en el acero inoxidable. Estos resultados muestran que el uso de agentes antimicrobianos naturales podría proporcionar vías alternativas o complementarias para la desinfección de superficies industriales microcontaminadas (Chorianopoulos et al., 2008).

1.2 Bases teóricas

1.2.1 *Chamaesyce thymifolia*

Tabla 1 Clasificación taxonómica

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophita</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Euphorbiales</i>
Familia	<i>Euphorbiaceae</i>
Género	<i>Chamaesyce</i>
Especie	<i>Chamaesyce thymifolia</i>
Nombre botánico	<i>Chamaesyce thymifolia</i> Linn
Nombre vulgar	Pie de paloma
Sinonimia	<i>Euphorbia thymifolia</i> Linn

Fuente: (De Souza & Da Silva, 2021; Departamento de Botánica & Instituto de Biología (IBUNAM), 2011; Royal Botanic Gardens Kew, n.d.; World Checklist of Selected Plant Families (WCSP), 2016), (Anexo 1).

Es una pequeña hierba anual cuyos tallos son prostrados, divaricadamente ramificados, delgados, cilíndricos y poco vellosos. Las hojas son opuestas, muy pequeñas, numerosas, de 3-6 por 2,5-4 mm oblongas o elípticas-oblongas, redondeadas en el ápice, glabras por encima, ligeramente pubescente por debajo. Consta de un pedúnculo de 0,8 mm de longitud que es muy agudo; las cápsulas de la planta son de 1,5mm de largo obtusamente quilla, pubescentes. Los estilos son cortos. Las semillas son de 1,25 mm de largo cuadrangularmente puntiaguda con 5 o 6 surcos transversales. Las

semillas son cónicas, miden 0,5 mm de diámetro, son agudas y tienen 4 ángulos, poco arrugadas transversalmente, de color marrón rojizo y sin carúncula. Pertenece a la familia *Euphorbiaceae*, que es una de las mayores familias de plantas superiores, de la que se han descrito unos 300 géneros y 7.500 especies (I. Ali et al., 2009; M. S. Ali et al., 2008). El género cuenta con unas 2.160 especies y es una gran familia de plantas con flores (300 géneros y más de 5000 especies) (Garipelli et al., 2012).

Figura 1 *Chamaesyce thymifolia*



Chamaesyce thymifolia se usa tradicionalmente como purificador de sangre, sedante, hemostático; aromático, estimulante, astringente en diarrea y disentería, antihelmíntico, demulcente, laxante; y también en casos de flatulencia, estreñimiento; en tos crónica; como antiviral en asma bronquial, paroniquia, repelente, antifúngico, antídoto para mordedura de serpientes, se considera vulneraria y galactagoga, se usa para problemas oculares, ardor, llagas, atrofia, disentería y dolor de pecho. Promueve la concepción, posee propiedades afrodisíacas y anti edad. La planta se usa como antipirético, en catarros crónicos, trastornos menstruales, infecciones del tracto urinario, enfermedades de la piel como la lepra, el sarampión y otras erupciones

cutáneas. La planta triturada sirve como rubefaciente irritante para favorecer el crecimiento del cabello en casos de alopecia. El látex es útil en el acné vulgar y como tónico en la menorragia (Mali y Panchal, 2013). Es también antiviral, para el virus del herpes simple tipo 1 HSV-1, el virus de la diarrea viral bovina BVDV y virus de la Hepatitis C HCV (Amaral et al., 1999; Roumy et al., 2020), anticancerígeno y antioxidantes (Lin et al., 2002).

Se resume los componente químicos, en la planta entera encontramos epitaraxerol, n-hexacosanol, euforbol, 24-metileno cicloartenol, 12-deoxi-4P-hidroxi-forbol-13-dodecanoato-20-acetato, 12-deoxi-4P-hidroxi-forbol-13-fenilacetato-20-acetato, 12-deoxi-forbol-13,20-diacetato, quercetina-3P-galactósido, 12-deoxi-forbol-13,20-diacetato, 12-deoxi-4P-hidroxi-forbol-13-dodecanoato-20-acetato, nhexacosanol, ésteres, n-alcanos y esteroides (Gupta et al., 2007). Las raíces contienen taraxerol y triucalol. Las hojas y los tallos contienen 4trihidroxi flavona-7-glucósido. Las hojas contienen dímeros de elagitaninos, euforbinas G y H con 12 polifenoles (Gupta et al., 2007; Lee et al., 1990).

1.2.2 Higiene alimentaria

El término higiene tiene su origen en el griego "Hygeia", y el diccionario la define como los principios (o la ciencia) para mantener la salud y la práctica de éstos. Según esta definición, la higiene alimentaria puede interpretarse como el conjunto de principios y prácticas relativos a la alimentación que son esenciales para el mantenimiento de la salud (Motarjemi, 2016).

El Codex Alimentarius, organismo internacional que establece las normas para los alimentos, define la higiene alimentaria como "todas las condiciones y medidas necesarias para garantizar la seguridad e idoneidad de los alimentos en todas las fases de la cadena alimentaria" (Codex Alimentarius, 2020), abarcando el término dos conceptos, seguridad alimentaria e idoneidad de los alimentos.

Según el Codex Alimentarius, la seguridad alimentaria es "la garantía de que los alimentos no causarán daño al consumidor, cuando son preparados y consumidos de acuerdo con su uso previsto", mientras que la

idoneidad de los alimentos es "la garantía de que los alimentos son aceptables para el consumo humano de acuerdo con su uso previsto" (Codex Alimentarius, 2020). Implícitamente, se refiere a aspectos de calidad como: ausencia de deterioro, ausencia de cuerpos extraños, autenticidad de los alimentos, aceptabilidad cultural y religiosa.

La definición dada por el Codex Alimentarius refleja un concepto más amplio que el dado en el diccionario, ya que también incluye cualidades que aparentemente no tienen un impacto directo en la enfermedad, sin embargo, la salud es algo más que la ausencia de enfermedad y que las dos definiciones coinciden. En efecto, cuando un producto provoca angustia en los consumidores, incluso en ausencia de enfermedad física, no se respetan los principios de higiene alimentaria (Motarjemi, 2016).

Otro término que se asocia a menudo con la higiene, y que también aparece en los diccionarios, es el de "limpieza". Por lo tanto, el término higiene alimentaria se ha asociado comúnmente con la limpieza de los alimentos y su protección contra la suciedad visible. Una consecuencia de esta percepción ha sido que, en la higiene de los alimentos, tradicionalmente se ha hecho hincapié en la capacidad de limpiar y garantizar la disponibilidad de instalaciones para el lavado y la eliminación de residuos. Estas medidas, aunque esenciales, no siempre fueron suficientes para proteger la salud y prevenir adecuadamente y eficazmente las enfermedades transmitidas por los alimentos (Motarjemi, 2016).

1.2.3 Limpieza, desinfección y saneamiento

La higiene es el pilar importante en la elaboración de los alimentos y de hecho es la principal preocupación del personal que se ocupa del procesamiento de los alimentos. Las consideraciones higiénicas afectan a todas las fases del procesamiento de alimentos, incluyendo decisiones sobre el diseño de la planta, proceso, selección, selección de equipo, la especificación y manejo de los materiales primas y envases, el mantenimiento de la planta física y su entorno, selección y formación del personal a todos los niveles, el desarrollo general de las actividades y la "cultura" de una planta de procesamiento de alimentos. La importancia de la higiene se refleja en la calidad

y seguridad de los productos. No mantener las condiciones higiénicas estrictas ha sido el principal motivo de graves contratiempos comerciales en el área alimentaria (Berk, 2018).

La limpieza y desinfección se consideran una buena práctica de higiene (BPH) o una buena práctica de fabricación (BPF) y son las BPH/BPM fundamentales para garantizar la fabricación continua de alimentos seguros y saludables. La limpieza y desinfección es un requisito clave de las directrices de higiene alimentaria del *Codex Alimentarius* y es probable que sea un requisito legal en todos los países en los que la higiene alimentaria está legislada.

La limpieza es el proceso de eliminación de la suciedad del entorno de procesamiento de alimentos, del equipo de procesamiento de alimentos, de los contenedores de almacenamiento y transporte de alimentos y de cualquier otro utensilio o implemento utilizado en los procesos de fabricación, limpieza o mantenimiento. La suciedad se refiere a los restos derivados del proceso alimentario, el entorno de fabricación, los operarios del proceso y todas las actividades de mantenimiento y limpieza asociadas (Holah, 2018).

La desinfección es el proceso de reducir aún más la población microbiana de las superficies limpiadas, reduciendo la viabilidad de los microorganismos restantes (probablemente adheridos a la superficie) a un nivel que no sea perjudicial para la seguridad o la salubridad de los alimentos fabricados en el entorno de procesamiento (Holah, 2018).

La limpieza puede llevarse a cabo por sí misma como un proceso de una sola etapa o combinada con la desinfección como un proceso de dos etapas, que se conoce comúnmente como saneamiento. Ocasionalmente, en la fabricación de alimentos, y más comúnmente en el servicio de alimentos, donde la suciedad de los alimentos en las superficies puede ser mucho menor, se puede llevar a cabo un proceso de saneamiento de una sola etapa utilizando un agente químico con propiedades tanto de limpieza como de desinfección, denominados desinfectantes detergentes. La limpieza y desinfección se realiza en superficies inanimadas: la limpieza y desinfección

de la piel humana, aunque es similar, se considera bajo la higiene personal (Holah, 2018).

1.2.4 Objetivos de la limpieza y desinfección

Parafraseando a (Holah, 2018), describiremos que, los objetivos de la limpieza y la desinfección dependen de la eficacia operativa del proceso de fabricación de alimentos, de la fase en la que se encuentre el producto alimentario en su camino hacia el consumidor final (material agrícola, material procesado o producto alimentario listo para el consumo, de los riesgos alimentarios que la limpieza y la desinfección están gestionando (limpieza visual - patógenos y alérgenos) y de la salud y la seguridad de los operarios dentro del entorno de procesamiento de alimentos.

En este contexto, el saneamiento de superficies se lleva a cabo para:

- a. Proporcionar un entorno de trabajo seguro para los empleados.
- b. Proporcionar un entorno de trabajo limpio a los empleados.
- c. Prolongar la vida útil de los equipos y servicios y evitar que se dañen.
- d. Mantener los parámetros de funcionamiento de la planta durante el procesamiento de los alimentos, incluidos los parámetros de transferencia de calor y de flujo.
- e. Eliminar los materiales que puedan dar lugar a una contaminación por cuerpos extraños o que puedan servir de alimento o refugio a las plagas.
- f. Eliminar la suciedad de los alimentos que pueda ser perjudicial para la calidad organoléptica de las siguientes producciones.

El punto final de los 6 primeros objetivos de limpieza es principalmente la limpieza visible. Más allá de la limpieza visible, el programa de saneamiento está diseñado para controlar un problema o peligro específico de protección de la marca, cuya presencia en la superficie tras el programa de saneamiento se evalúa mediante una técnica analítica. Estos objetivos incluyen:

- g. Eliminar el ADN para evitar, por ejemplo, que una especie de carne (por ejemplo, la de cerdo) contamine las siguientes series de producción (por

ejemplo, la de vacuno) en una fábrica que procesa múltiples especies animales.

- h. Eliminar los microorganismos de deterioro para mantener o ampliar potencialmente la vida útil del producto.
- i. Eliminar los alérgenos para evitar la contaminación de las siguientes series de producción.
- j. Eliminar los patógenos que puedan contaminar los productos alimentarios.

1.2.5 Vectores Contaminación cruzada

La contaminación cruzada, ya sea directamente en los alimentos o en las superficies que entran en contacto con ellos, puede producirse a través de tres vectores:

1. **El contacto con el aire** (normalmente a través de la sedimentación de partículas de aerosoles generados activamente, por ejemplo, aerosoles de limpieza, de pesaje de ingredientes secos o de corte/rebanado de carnes) u otros gases (incluido el aire comprimido).
2. **Contacto con superficies.** Pueden ser superficies sólidas, como tablas de cortar, encimeras, utensilios, o superficies blandas, por ejemplo, las manos y la ropa de los operarios.
3. **Contacto con fluidos,** por ejemplo, durante las operaciones de lavado o enfriamiento del producto, por fugas en las tuberías de servicio o por fluidos dejados en las superficies de preparación que no se han drenado o secado.

Los aerosoles que se forman a partir de un evento como el corte o la limpieza tienen dos componentes: aerosoles más grandes que viajan de forma balística siguiendo la dirección en la que se generaron y aerosoles más pequeños que pueden moverse con las corrientes de aire dentro de la sala. En otras palabras, si las estaciones de trabajo estuvieran separadas por una distancia de 1 m y se utilizara un paño para la limpieza de las líneas, no debería haber contaminación cruzada por aerosoles balísticos que pudieran contener microorganismos, alérgenos o cuerpos extraños. El movimiento de los aerosoles más pequeños, para los que la dirección del aire es más importante

que la distancia del evento generador del aerosol, puede controlarse introduciendo aire fresco en la sala de preparación de alimentos para diluir los aerosoles y colocando ventiladores de extracción de aire cerca de las áreas de manipulación de alimentos sucios o crudos para maximizar la extracción de aerosoles en estas áreas.

La contaminación cruzada por contacto con las superficies se controla mediante buenas prácticas de higiene y gestión. Como ya se ha señalado, siempre que sea posible, deben utilizarse tablas de cortar, recipientes, utensilios, etc., codificados por colores para manipular los alimentos crudos y los alimentos que contienen diferentes alérgenos, y la dirección debe imponerlo. Si esto no es posible, es necesario limpiar y desinfectar a fondo las superficies de trabajo y los utensilios (preferiblemente en un lavavajillas). La dirección también debe ser consciente de los artículos o instrumentos que podrían tocar tanto los alimentos crudos como los alimentos listos para el consumo durante su uso rutinario, por ejemplo, las sondas de temperatura, y asegurarse de que se controlan adecuadamente. Las buenas prácticas de higiene y gestión también deben garantizar que el personal se lave las manos entre la manipulación de alimentos crudos y de alimentos listos para el consumo o entre los alimentos que contienen diferentes alérgenos y que, a continuación, utilice guantes, mangas, delantales, etc., del color adecuado.

Si el contacto de los alimentos con los líquidos está previsto, por ejemplo, para el lavado de los productos, se puede añadir al agua de lavado un desinfectante como el ácido hipocloroso de 50-150 ppm para ayudar a controlar sus propiedades microbiológicas. El contacto involuntario con los líquidos, por ejemplo, de las tuberías de servicio con fugas, el condensado, los líquidos de limpieza y los diferentes componentes alimentarios colocados encima/debajo en las unidades de almacenamiento/exhibición, se controla mediante buenas prácticas de higiene, procedimientos de mantenimiento e inspecciones periódicas de las instalaciones de preparación y almacenamiento de alimentos. (Holah et al., 2016).

1.2.6 Desinfección química

Perez et al., (2017), describe que la desinfección química está basada en la acción biocida de los desinfectantes sobre las superficies de la industria alimentaria. Ésta influenciada por numerosos factores entre los que destacan, el tiempo de contacto, temperatura de aplicación, concentración, tensión superficial de la solución desinfectante, pH, número y localización de los microorganismos o tipo de microorganismo objetivo. En la práctica, además de los factores enumerados, también influye enormemente la eficacia de la fase de limpieza previa de las superficies de trabajo que deben ser desinfectadas. El hecho de que un microorganismo sea separado de su soporte aumenta la superficie de contacto con el desinfectante, e incrementa su eficacia biocida. Así, mientras que la limpieza es capaz de eliminar el 80% de la carga microbiana, la desinfección de las superficies debe conseguir una reducción de la contaminación microbiana de alrededor del 95%.

Los requisitos más importantes que deben reunir los agentes desinfectantes son varias, aunque ningún desinfectante presenta todas a la vez. Las propiedades que debe reunir un buen desinfectante son:

- a. Fuerte acción biocida frente a bacterias Gram positivas, Gram negativas, virus, esporas de mohos y esporas bacterianas.
- b. Estable en presencia de residuos orgánicos y aguas duras.
- c. Estable en forma concentrada e incluso cierta estabilidad en forma diluida.
- d. Facilidad de arrastre por aclarado y no dejar residuos tras el mismo.
- e. No corrosivo y escasa toxicidad.
- f. No teñir las superficies ni dejar olores persistentes.
- g. Económico

A continuación, se describen los componentes presentes con mayor frecuencia en los medios desinfectantes y sus características. La clasificación de los desinfectantes está basada, esencialmente, en la materia activa biocida con la que se formulan. Es necesario saber el tipo de superficie a limpiar para seleccionar los agentes desinfectantes más adecuados para el supuesto práctico. No olvidar que, en una misma formulación pueden encontrarse dos materias activas. Entre los componentes mayormente

utilizados tenemos: Halógenos y sus compuestos (cloro, yodo); agentes oxidantes productores de oxígeno (peróxido de hidrógeno, perácidos orgánicos, percompuestos orgánicos); aldehídos (formaldehídos, glutaraldehído); compuestos superficieactivos o ténsidos (amonio cuaternario, ténsidos anfóteros), guanidinas; compuestos fenólicos (cresoles, xilenoles y derivados halogenados); ácidos orgánicos halogenados (ácido fórmico, acético, propiónico, benzoico, ácido monocloroacético; compuestos de metales pesados (plata); álcalis y ácidos; alcoholes (etanol, isopropanol) (Perez et al., 2017).

1.2.7 Desinfectantes Naturales

Este tipo de desinfectantes provienen del mundo vegetal, son capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos o de eliminarlos. En las plantas los principios activos se hallan siempre biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias que van a potencializar entre sí, de forma que, en general no se acumulan en el organismo, y sus efectos indeseables están limitados. Sin embargo, a pesar de que han aumentado las investigaciones y estudios científicos de las plantas, todavía no se conocen muchos de los principios activos a los que deben las plantas sus extraordinarias cualidades. Estos principios activos denominados metabolitos secundarios, constituyen una fuente alternativa y útil en el control de microorganismos, y ser amigable con en el medio ambiente (Arenas et al., 2007).

La actividad biológica de un desinfectante natural depende en primer lugar del principio o principios activos mayoritarios que contiene la planta o el extracto que será empleado, pero éstos suelen estar acompañados de otros principios que potencian o modulan la acción de los primeros (Estrada, 2010).

1.2.8 Metabolitos Secundarios

Además de producir metabolitos primarios que es común a todas las células para su funcionamiento, las plantas convierten una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos metabólicos

esenciales, denominados metabolitos secundarios, que se conoce también como productos secundarios o productos naturales. Su distribución en las plantas no es común a todos, está restringida a ciertas familias, géneros e incluso especies vegetales. Tienen funciones específicas, puede ser repelentes, pigmentos, antimicrobianos, pesticidas naturales, etc. Tienen especial valor medicinal y económico en la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética (Ávalos García & Pérez-Urria Carril, 2009).

Se clasifican en tres principales grupos: el primero, compuestos fenólicos de los cuales se conocen aproximadamente 8.000 y provienen de las llamadas vías biosintéticas de shikimato o acetato, el segundo los terpenoides de estos se conocen cerca de 25.000, estos derivados del isopentenil difosfato por medio de la ruta de ácido mevalónico y por último encontramos los alcaloides de los cuales se conocen 12.000, estos metabolitos contienen uno o más átomos de nitrógeno y derivan de aminoácidos principalmente (Castro et al., 2013).

Los compuestos fenólicos tienen gran importancia por su actividad antioxidante (Balasundram et al., 2006; Heim et al., 2002), están conformadas por estructuras aromáticas con hidroxilos sustituyente y están presentes como moléculas fenólicas simples hasta altamente polimerizadas (Bravo, 1998). En este grupo encontramos fenilpropanos, lignanos, cumarinas, flavonoides, antraquinonas.

Los terpenoides tienen estructura variadas y son muy numerosas (Castro et al., 2013) y entre ellos tenemos monoterpenos (aceites esenciales), sesquiterpenos (aceites esenciales, fitoalexinas, repelentes), diterpenos (fitol, ácidos resinosos, fitoalexinas, forscolina y otros metabolitos), triterpenos (brasinosteroides, fitoesteroles, fitoalexinas, algunos compuestos de las ceras).

Los alcaloides son compuestos orgánicos de origen natural nitrogenados, se derivan principalmente de aminoácidos, con propiedades farmacológicas. Se encuentran en hojas, frutos, semillas, corteza y raíz.

1.2.9 Métodos de Evaluación de Desinfectantes

Un desinfectante es eficaz cuando reduce rápidamente el número de microorganismos patógenos a niveles que sean seguros para la salud pública, a la concentración y tiempo utilizada. Se debe tener en cuenta tres aspectos para evaluar un desinfectante: la eficiencia inmediata de la formulación, persistencia antimicrobiana de la efectividad y las propiedades residuales antimicrobianas de la formulación (Troya, 2007). Evaluar estas características requiere algunos de los métodos que se exponen:

a) Coeficiente Fenólico

Es una técnica de estandarización para determinar la eficiencia bactericida de un compuesto químico fenólico. Es una comparación aproximada de la actividad desinfectante de un producto desconocido frente al fenol. Usa el método de dilución en tubos, donde se prepara al menos tres diluciones, la que proporciona el fabricante, una más concentrada y una menos concentrada, valorando en tiempos de 5, 10 y 15 minutos, realizando el recuento posterior a la aplicación. La utilización de este método requiere que los mecanismos de la disminución microbiana sean similares al fenol. La desventaja de este método es que hay microorganismos con diferentes susceptibilidades al fenol (Troya, 2007).

b) Recuento en Placa

Las diluciones de los microorganismos se vierten en un medio de cultivo junto con una concentración del desinfectante y se incuban. Después se valoran la ausencia o disminución del crecimiento microbiano, para determinar posteriormente la concentración del desinfectante sobre una cantidad de microorganismos conocidos (Troya, 2007).

c) Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Es una prueba de dilución seriada semicuantitativa. Determina la actividad bacteriostática mediante una serie de diluciones decrecientes del desinfectante en un caldo nutritivo e inoculando los tubos con una solución de bacterias. Tras la incubación a 37°C por 24 horas se observa cual es la mínima concentración que inhibe el crecimiento microbiano (Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), 2012).

d) **Eficacia *in vivo***

Intenta comprobar la eficacia del desinfectante en las condiciones reales de uso, se observa o no el crecimiento de colonias tras la siembra en placas de agar de una dilución microbiana en el desinfectante (Irma, 2008).

Las bacterias que más se utilizan en los diferentes métodos de valoración de los desinfectantes son referenciadas y pertenecen a colecciones internacionales, entre ellas tenemos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Enterococcus hirae*, *Streptococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*.

1.3 Definición de términos básicos

Antibacterial: “Sustancia, o mezcla de ellas, que elimina o destruye bacterias en un ambiente inanimado” (González, 2016).

Bacteriostático: Sustancia o mezcla de ellas, que inhibe el crecimiento de bacterias en un ambiente inanimado (González, 2016)

Biocida/Microbiocida/Producto con acción antimicrobiana: “Sustancia o mezcla de ellas, que destruye un número de microorganismos vivos en un ambiente inanimado” (González, 2016).

Buenas prácticas de higiene (BPH): Medidas y condiciones fundamentales aplicadas en cualquier fase de la cadena alimentaria para proporcionar alimentos inocuos e idóneos (Codex Alimentarius, 2020).

Cepa: “conjunto de microorganismos derivados de las múltiples divisiones de una célula inicial” (Valencia, 2017).

Colonia: “es la asociación de organismos que proceden de un mismo progenitor y están claramente unidos entre sí” (Valencia, 2017).

Concentración inhibitoria mínima (CIM): Corresponde a la concentración más débil de un antibiótico capaz de inhibir el crecimiento visible de una cepa bacteriana al cabo de 18 – 24 horas de incubación (Sacsquispe & Velásquez, 2002).

Contaminación cruzada: Presencia o introducción de un contaminante en los alimentos listos para consumo, generada por el contacto con alimentos sin

procesar, superficies, equipos o utensilios contaminados, o falta de higiene por parte del manipulador de alimentos o por su condición de enfermo o portador (Reglamento Sanitario de Funcionamiento de Mercados de Abasto, 2003).

Desinfección: Reducción por medio de agentes biológicos o químicos, o por métodos físicos, de la cantidad de microorganismos viables en las superficies, el agua o el aire hasta un nivel que no comprometa la inocuidad o la idoneidad del alimento (Codex Alimentarius, 2020).

Extracto: Un **extracto** es una sustancia obtenida por extracción de una parte de una materia prima, a menudo usando un solvente como etanol o agua (Meireles et al., 2016)

Higiene de los alimentos: "Todas las condiciones y medidas necesarias para garantizar la seguridad e idoneidad de los alimentos en todas las fases de la cadena alimentaria" (Codex Alimentarius, 2020).

Ingrediente activo, Sustancia Activa o Principio Activo: Componente presente en la formulación que confiere la acción biológica esperada a un desinfectante o sanitizante y otorga la eficacia al producto según su propósito (González, 2016)

Limpieza: Eliminación de tierra, residuos de alimentos, suciedad, grasa u otras materias objetables (Codex Alimentarius, 2020).

Sistema de higiene de los alimentos: Programas de prerrequisitos complementados con medidas de control en los PCC, según corresponda, que, en su conjunto, garantizan que los alimentos son inocuos y aptos para su uso previsto (Codex Alimentarius, 2020).

Programa de higiene y saneamiento: Procedimientos y medidas sanitarias llevadas a cabo para asegurar la inocuidad de los alimentos, y aplicadas a la estructura física, el ambiente, los servicios, los materiales y equipos, las materias primas, el personal, y el control de plagas y animales domésticos (Reglamento Sanitario de Funcionamiento de Mercados de Abasto, 2003)

CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES

2.1 Formulación de la hipótesis

El extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* es eficaz como desinfectante natural aplicado en superficies en contacto con alimentos, al disminuir significativamente el crecimiento bacteriano.

2.2 Variables y su operacionalización

2.2.1 Variables de estudio de la actividad antibacteriana

- a) Variable Independiente
 - Extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia*
- b) Variable Dependiente
 - Actividad antibacteriana

2.2.2 Variables de estudio de evaluación de la eficacia del extracto etanólico como desinfectante natural.

- a) Variable Independiente
 - Concentración del desinfectante
 - Tiempo de aplicación
- b) Variable Dependiente
 - Recuento Microbiano (Mesófilos Aerobios Viables)

2.2.3 Operacionalización de variables

2.2.3.1 Método de Difusión en disco (Kirby-Bauer)

Variable Independiente	Definición	Tipo por su naturaleza	Indicadores	Escala de medición	Categoría	Valores de la Categorías	Medio de Verificación
Extracto etanólico de <i>Chamaesyce thymifolia</i>	Producto obtenido mediante el método de extracción con etanol por rotavapor	Cuantitativa	Concentración del extracto etanólico <i>Chamaesyce thymifolia</i>	Continua	A B C D E F	1000 mg/mL 900 mg/mL 800 mg/mL 700 mg/mL 600 mg/mL 500 mg/mL	Registro de resultados
Variable Dependiente (Y)	Definición	Tipo por su naturaleza	Indicadores	Escala de medición	Categoría	Valores de la Categorías	Medio de Verificación
Actividad antibacteriana	Capacidad de matar/destruir/inactivar bacterias, impedir su proliferación y/o impedir su acción patógena. Se mide mediante el tamaño de los halos de inhibición.	Cualitativa	Grado de sensibilidad	Ordinal	<u>Gentamicina 10 ug:</u> Resistente (R) Intermedio (I) Sensible (S) <u>Ciprofloxacino 5ug:</u> Resistente (R) Intermedio (I) Sensible (S)	≤ 12 mm 13-14 mm ≥ 15 mm ≤ 15 mm 16-20 mm ≥ 21 mm	Registro de resultados

2.2.3.2 Método de Macrodilución

Variable Independiente	Definición	Tipo por su naturaleza	Indicadores	Escala de medición	Categoría	Valores de la Categorías	Medio de Verificación
Extracto etanólico de <i>Chamaesyce thymifolia</i>	Producto obtenido mediante el método de extracción con etanol por rotavapor	Cuantitativa	Concentración del extracto etanólico <i>Chamaesyce thymifolia</i> en mg/mL	Continua	T1 T2 T3 T4 T5 T6 T7 T8	128 mg/mL 64 mg/mL 32 mg/mL 16 mg/mL 8 mg/mL 4 mg/mL 2 mg/mL 1 mg/mL	Registro de resultados
Variable Dependiente (Y)	Definición	Tipo por su naturaleza	Indicadores	Escala de medición	Categoría	Valores de la Categorías	Medio de Verificación
Actividad antibacteriana	Capacidad de matar/destruir/inactivar bacterias, impedir su proliferación y/o impedir su acción patógena.	Cualitativa	Grado de turbidez	Ordinal	Ausencia de turbidez Ligera turbidez Inhibición aparente Ligera inhibición	Inhibición del 100% Inhibición del 75% Inhibición del 50% Inhibición del 25%	Registro de resultados

2.2.3.3 Evaluación de la eficiencia del desinfectante a base de extracto de *Chamaesyce thymifolia*

Variable Independiente	Definición	Tipo por su naturaleza	Indicadores	Escala de medición	Categoría	Valores de la Categorías	Medio de Verificación
Concentración del desinfectante	Cantidad de sustancia que se usa para destruir microorganismos, como bacterias y otros microbios que causan infecciones y enfermedades.	Cuantitativa	Concentración del extracto etanólico <i>Chamaesyce thymifolia</i> en mg/mL (Dosificación)	Continua	CE1 CE2 CE3	16 mg/mL 32 mg/mL 64 mg/mL	Registro de resultados
Tiempo de aplicación del desinfectante	Es la cantidad de tiempo en minutos que se dejará al desinfectante en contacto con los microorganismos.	Cuantitativa	Tiempo de aplicación en minutos	Continua	T1 T2 T3	5 min 15 min 30 min	
Variable Dependiente (Y)	Definición	Tipo por su naturaleza	Indicadores	Escala de medición	Categoría	Valores de la Categorías	Medio de Verificación
Recuento microbiano	Número de unidades formadoras de colonia (UFC) crecidas en un área de una superficie.	Cuantitativa	Recuento de mesófilos aerobios viables Reducción logarítmica	Continua	-	Número de UFC por cm ² ≥ 3 ciclos logarítmicos	Registro de resultados

CAPITULO III: METODOLOGÍA

3.1 Diseño metodológico.

3.1.1. Tipo y diseño de investigación.

El estudio requirió dos experimentos, el primero, la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico y el segundo la evaluación del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* como desinfectante natural. Describiendo a ambos como una investigación de tipo experimental. El primero, utilizó grupos experimentales, control positivo y negativo. Usándose diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* cuyo efecto se vio en la actividad antibacteriana probada mediante la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), Disco difusión (Kirby-Bauer) y Concentración Mínima Bactericida (CMB).

El segundo experimento, utilizó diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* como desinfectante natural, su efecto se vio en la variable dependiente, recuento microbiano, verificadas mediante el recuento de mesófilos aerobios viables y reducción logarítmica.

Se considera que ambos son de nivel explicativo, porque son estudios que explican el comportamiento de una variable en función de la otra (estudios de causa-efecto) y requieren control (Hernández-Sampieri y Mendoza, 2018).

El primero utilizó un diseño completamente al azar (D.C.A.) y el segundo un diseño factorial con dos factores y 3 niveles. Se muestran en las Tablas 2, 3 y 4 los diseños experimentales utilizados en la investigación.

Tabla 2 Diseño Experimental para Disco Difusión (Kirby-Bauer) frente a bacterias

Repet.	Control Negativo	Control Positivo	Extracto Etanólico <i>Chamaesyce thymifolia</i> (mg/mL)						Total
			1000	900	800	700	600	500	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	8
2	1	1	1	1	1	1	1	1	8
3	1	1	1	1	1	1	1	1	8
Total	3	3	3	3	3	3	3	3	24

Tabla 3 Diseño Experimental para determinar la CMI frente a bacterias

Repet.	Control	Control	Extracto Etanólico <i>Chamaesyce thymifolia</i> (mg/mL)								Total	
	Negativo	Positivo	128	64	32	16	8	4	2	1		
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10
Total	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	30

Tabla 4 Diseño Experimental para evaluar el desinfectante natural

Tiempo de aplicación del desinfectante (minutos)	Concentración del desinfectante (extracto etanólico de <i>Chamaesyce thymifolia</i>) en mg/mL		
	16	32	64
5	T1	T2	T3
15	T4	T5	T6
30	T7	T8	T9

*Se trabajó dos controles positivos y un control negativo, 9 unidades experimentales, con 3 repeticiones cada uno.

3.2 Diseño Muestral.

3.2.1 Población

La primera población estuvo conformada por las plantas de *Chamaesyce thymifolia* ubicadas en la ciudad de Iquitos, a una latitud de -3.74912 y una longitud de -73.25383, Provincia de Maynas – Departamento de Loreto, Perú.

La segunda población estuvo conformada por las superficies de mayólicas de cuatro mesas de venta de pollo beneficiado, que hacen un total de 27,88 m², ubicados en la casona del Mercado Belén, sobre las cuáles se aplicaron la solución del extracto de *Chamaesyce thymifolia* a diferentes concentraciones para probar su efectividad como desinfectante natural.

3.2.2 Muestra

La cantidad de muestra utilizada para la preparación del extracto de *Chamaesyce thymifolia* fue de 20 kg de planta fresca.

Para la evaluación del desinfectante natural (extracto de *Chamaesyce thymifolia*) *in vivo*, se utilizó las superficies de mayólica de tres mesas

de mayor venta de pollo beneficiado, ubicados en la casona del Mercado Belén. Por cada tratamiento aplicado se utilizó una superficie 1 m² teniendo en cuenta los criterios de inclusión y exclusión.

El muestreo de las plantas y las superficies se hizo completamente al azar, y los tratamientos aplicados tanto de los grupos experimentales, control positivo y control negativo se realizó por triplicado.

3.2.3 Criterios de selección

3.2.3.1 Criterios de Inclusión

Planta *Chamaesyce thymifolia* en buen estado de desarrollo (10-20 cms de largo y color rojizo), sin signos de enfermedad y daño físico, exento de otros contaminantes visibles.

Las superficies de estudio revestidas con mayólicas en buen estado, no despostilladas, roturas visibles y acumulación de suciedad visible.

3.2.3.2 Criterios de Exclusión.

Planta *Chamaesyce thymifolia* que no presenta buen estado de desarrollo (10-20 cms de largo y color rojizo), con signos de enfermedad, daño físico y otros contaminantes visibles.

Las superficies de estudio no revestidas con mayólicas, con deterioro visible, despostilladas e incompletas, y con acumulación de suciedad visible.

3.3 Procedimiento de recolección de datos

3.3.1 Identificación de la muestra vegetal

Se identificó taxonómicamente la especie recolectada, cuyo nombre científico quedó establecido en la Constancia N°037-2021-AMAZ-UNAP, emitida por el Centro de Investigación de Recursos Naturales, Herbarium Amazonense AMAZ, cuyo botánico responsable Juan Celidonio Ruiz Macedo determinó que la planta utilizada en el trabajo de investigación corresponde a

la Familia *Euphorbiaceae*, especie *Chamaesyce thymifolia* (L.) Millsp. (Anexo 1).

3.3.2 Obtención del extracto etanólico por maceración

Se realizó de acuerdo al siguiente procedimiento (Figura 2 y Anexo 2):

Recolección de la materia prima: Se recolectaron plantas enteras que mostraron un buen desarrollo (10 a 20 cm de longitud y color rojizo), en los meses de mayo, junio y julio entre las 7 a 10 am. El lugar de recolección se llevó a cabo en el Distrito de Iquitos ubicada a una latitud de -3,74912, longitud de -73,25383 y altitud de 106 m.s.n.m. La planta colectada se trasladó a la Planta Piloto para la siguiente etapa.

Pretratamiento: Selección, limpieza y secado. La selección de la muestra se realizó de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión. Luego se eliminó las partículas de tierra y se lavó con abundante agua potable y un último enjuague con agua destilada. El secado se realizó en bandejas de acero inoxidable, a temperatura ambiente (25-30°C) por 7 días.

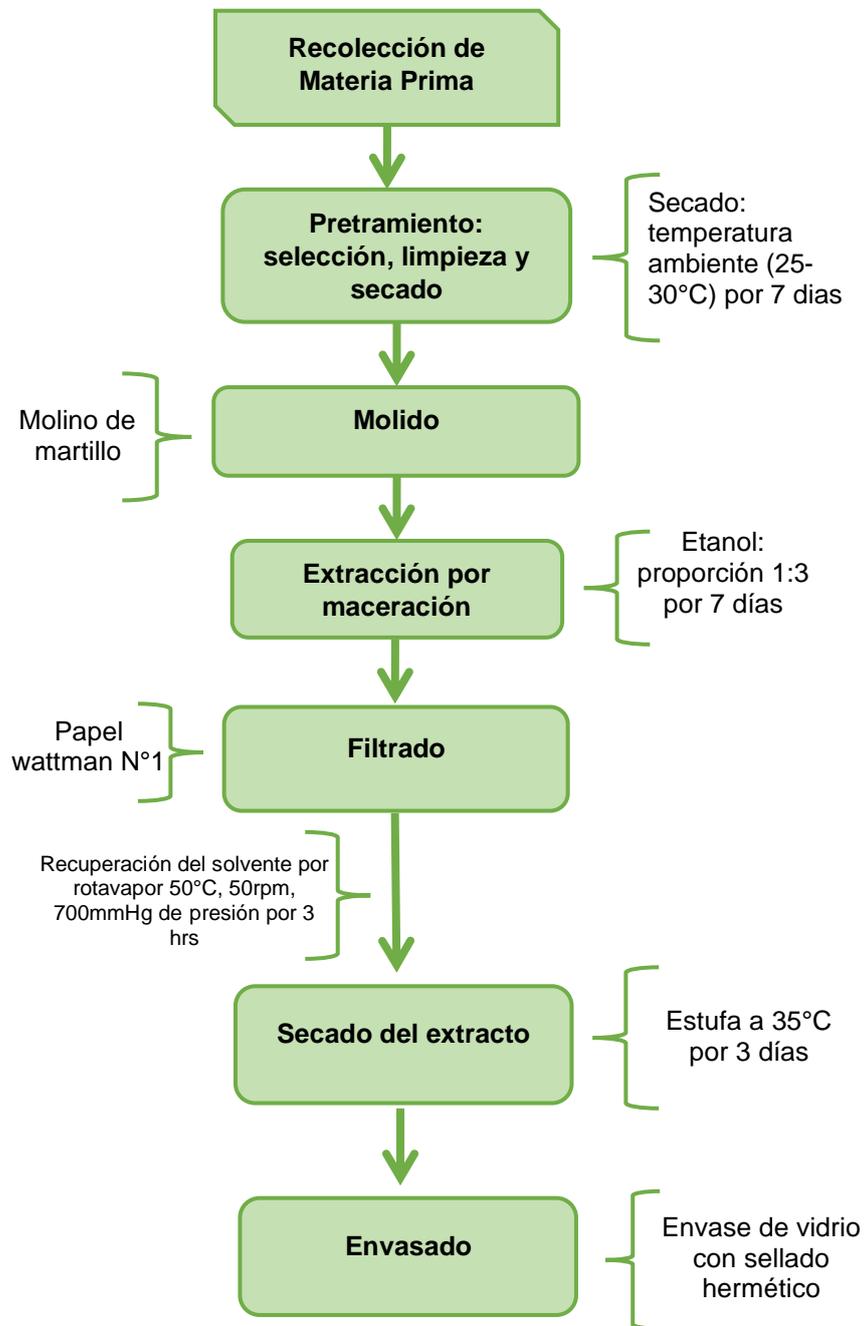
Molido: La trituración de las plantas secas en partículas pequeñas se llevó a cabo con un molino de martillo, para facilitar el contacto máximo entre el principio activo y el disolvente (Kuklinski, 2000). Una vez molido se pesó y envasó en bolsas de polietileno para ser usado posteriormente.

Extracción por maceración: Se realizó por maceración, que es un método de extracción sólido-líquido estático de acuerdo a (Gonzales, 2004; Kuklinski, 2000), utilizando la proporción de 1:3 p/v de muestra:Etanol 96°, a temperatura ambiente por 7 días, con constantes agitaciones durante todo el proceso de maceración.

Filtrado: La separación del solvente conteniendo los principios activos se realizó por filtración con un papel Whatman N° 1.

Después del Filtrado se concentra el extracto mediante evaporación del solvente con la ayuda de un rotavapor modelo Rova-100, a 50 rpm, 50°C y presión reducida de 700 mmHg, por 3 horas.

Figura 2 Flujograma de extracción y trabajo del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia*.



Secado del extracto: Una vez obtenido el extracto concentrado se seca en estufa marca Memert a 35°C por 3 días.

Envasado: El extracto seco se guarda en envases de vidrios con tapa hermética, a temperatura ambiente hasta su uso en las diversas pruebas.

3.3.3 Rendimiento

Con el peso de la muestra fresca y el peso del extracto seco se procedió a determinar rendimiento en unidades porcentuales de acuerdo a Benítez-Benítez et al., (2020), aplicando la siguiente ecuación:

$$\%R = \frac{w_i - w_f}{w_f} \times 100$$

Donde:

%R= porcentaje de rendimiento

w_i = peso inicial

w_f = peso final después de obtención del extracto seco

3.3.4 Tamizaje Fitoquímico Cualitativo

Se emplearon técnicas simples, rápidas y selectivas para la determinación de los diferentes metabolitos secundarios. El tamizaje fitoquímico preliminar se hizo a partir de extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* de acuerdo a Lock (2016). Se realizaron los ensayos: Drangendorff (Alcaloides), Liebermann-Burchard (Triterpenos y Esteroides), Borntrager (Quinonas), Baljet (Lactonas y Cumarinas), Fehling (Azúcares Reductores), Espuma (Saponinas), Cloruro Férrico (Fenoles y Taninos), Ninhidrina (Aminoácidos y Aminas), Shinoda (Flavonoides), Kedde (Glicósidos Cardiotónicos). Se utilizó el sistema de cruces, como criterio de medida para la identificación de los metabolitos secundarios. Las pruebas fueron realizadas en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales Antiparasitarios (LIPNA) del CIRNA.

3.3.5 Carga microbiana de las superficies en estudio.

Durante el estudio se muestrearon 5 superficies de mesas de venta de pollos beneficiados en la casona de Belén de la ciudad de Iquitos, al inicio y durante

la aplicación de los tratamientos, para determinar el nivel de carga microbiana total (control negativo) mediante el método del hisopado (MINSA, 2007) (Anexo 6) y recuento de mesófilos aerobios viables (Maturin & Peeler, n.d.). El muestreo se realizó después que los vendedores realizaron su proceso de limpieza rutinaria, para conocer el promedio de la carga microbiana por cm² en condiciones reales descrita en el siguiente párrafo y la factibilidad de aplicar la solución del extracto de *Chamaesyce thymifolia* como solución desinfectante natural.

El Mercado de Belén tiene actualmente vigente el Plan de Vigilancia, Prevención y Control del Covid 19 Mercado de Abastos del Distrito de Belén, el cual establece que la limpieza y desinfección de los puestos de ventas y mobiliarios es diaria y una limpieza y desinfección profunda de todo el mercado una vez a la semana, usando una concentración de hipoclorito de sodio de 206 mL/5 litros. Observándose que la limpieza y desinfección diaria es realizada por los vendedores sin ningún protocolo o vigilancia de parte de alguna autoridad sanitaria, realizando solo limpieza de las mesas con detergente y en algunos casos detergente e hipoclorito de sodio sin dilución. La limpieza profunda se realiza los viernes en la tarde, siendo el único momento que están presentes los profesionales del área de Sub gerencia de Promoción Empresarial y Comercialización

Si bien el objetivo del estudio no fue determinar el riesgo microbiano de las superficies de los puestos de ventas, se comparan los resultados obtenidos sin tratamiento (control negativo) con la Normatividad sobre superficies vivas e inertes. La Resolución Ministerial N°461-2007/MINSA – “Guía Técnica para el Análisis Microbiológico de Superficies en contacto con Alimentos y Bebidas” no incluye dentro de sus ensayos el Recuento de Mesófilos Aerobios Viables, pero otras normas internacionales si lo hacen; por eso, se toma como Referencia la Norma Mexicana NOM-093-SSA1-1994 – Bienes y Servicios. Prácticas de Higiene y Sanidad en la preparación de Alimentos que se ofrecen en Establecimientos Fijos (Secretaría de Salud, 1994), en el cual se establecen los límites microbiológicos, ubicados en el Apéndice Informativo B, De las Especificaciones Sanitarias de las Superficies Vivas e Inertes. 2.2. Superficies Inertes, como se muestra a continuación:

Tabla 5 Límites Microbiológicos de superficies inertes

Especificaciones microbiológicas en superficies inertes	
Ensayos	Límites
Cuenta Total de Mesófilos Aerobios	< 400 UFC/cm ² de superficie
Coliformes Totales	< 200 UFC/cm ² de superficie

Fuente: (Secretaría de Salud, 1994)

Tabla 6 Recuento Microbiano de superficies de puestos de ventas de pollo beneficiado - Mercado Belén (control negativo).

Recuento de Mesófilos Aerobios Viabiles		
Mesas	UFC/cm ²	Cumplimiento de los Límites (Tabla 5)
1	5,4 x 10 ³	No cumple
2	6,5 x 10 ⁵	No cumple
3	9,0 x 10 ³	No cumple
4	1,1 x 10 ⁵	No cumple
5	1,1 x 10 ³	No cumple

3.3.6 Activación de las cepas bacterianas

Las bacterias utilizadas fueron cepas referenciadas: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25925), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25613), *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) y *Salmonella Tiphymurium* (ATCC 14028). La última cepa mencionada fue obtenida en forma liofilizada en viales de la empresa Microbiologics y los demás fueron cultivos congelados donadas por el Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales "Maxime Kuczynski" (CIETROP) del Instituto Nacional de Salud de la ciudad de Iquitos.

La cepa liofilizadas se reactivaron siguiendo el procedimiento de Microbiologics (2018). Se dejó que la bolsa Kwik-Stik que contiene los microorganismos llegue a temperatura ambiente. Se rasgó el empaque y abrió la ampolla justo por debajo del menisco del líquido para liberar el líquido hidratante, ayudado por suaves golpes en forma vertical hacer que el líquido pase a la parte inferior de la ampolla que contiene el pellet. Pellizcamos el pellet en el líquido hasta que se homogenice completamente. Empapar el bastoncillo con el líquido homogenizado e inocular en una tercera parte de

una placa petri que contiene un cultivo primario (TSA), luego ayudado con un ansa bacteriológica realizar las estrías longitudinales para facilitar el crecimiento de las colonias. Invertir las placas e incubar en aerobiosis a 35°C durante 18-24 horas. Todo el procedimiento debe completarse en máximo 30 minutos posterior al proceso de hidratación (Microbiologics, 2018).

Para el caso de cepas congeladas, se realizaron subcultivos a medios sólidos o caldos, como el agar o caldo TSA, y dejamos incubar durante 18 a 24 horas por 35-37°C. A partir de aquí se volvió a sembrar con las mismas condiciones, para trabajar la actividad antimicrobiana (Cavaliere, 2005; Sacsquispe y Velásquez, 2002).

3.3.7 Preparación de los agentes antimicrobianos.

a) **Agentes químicos:** el hipoclorito de sodio al 4%, se usó como control positivo en una concentración de 0,02% y 0,1% (INACAL, 2020), preparada según indicaciones del fabricante.

b) **Extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* (pie de paloma):**

Las pruebas de Disco Difusión, emplearon las concentraciones de 1000, 900, 800, 700, 600 y 500 mg/mL.

Las Pruebas de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) utilizó las concentraciones de 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 y 128 mg/mL. Para ambas pruebas el diluyente del extracto etanólico fue una solución etanol 96°: agua en una proporción 1:1.

Las concentraciones utilizadas para preparar la solución desinfectante natural fueron 16, 32, 64 mg/mL, utilizando como diluyente del extracto una solución de Polisorbato 80: Agua destilada estéril, en una proporción de 1:4.

3.3.8 Evaluación de la Actividad Antibacteriana

Para ensayar las concentraciones del extracto de *Chamaesyce thymifolia* (L.) frente a cepas bacterianas ATCC seleccionadas para determinar su actividad antimicrobiana, se utilizó la metodología de

disco difusión y macrodilución, a partir de estos resultados se determinó las concentraciones a utilizarse en los ensayos como desinfectante natural del extracto en estudio.

3.3.8.1. Disco Difusión (Kirby- Bauer)

La metodología se desarrolló de acuerdo a la Norma para Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos en Disco (M-02) de (CLSI, 2018), del Manual de Procedimientos para la prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el método de Disco Difusión del INS (Sacsquispe y Velásquez, 2002), como se describe a continuación:

Preparación de la solución stock

Se preparó la solución madre del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* con 2 gramos de extracto en 2mL de solución etanol 96°: agua destilada estéril (1:1). A partir de esta, se prepararon diluciones seriadas como se ve en la Tabla 7, que se guardaron en refrigeración a 4°C hasta el momento de su uso.

Preparación del inóculo

De placas con agar TSA sembradas con cada bacteria de estudio, se extrajo nuevamente con el asa bacteriológica un aproximado de tres a cinco colonias bien aisladas, del mismo tipo morfológico, del cultivo en agar Mueller Hinton, para transferirlos a los tubos que contienen 3mL de Cloruro de Sodio 0,9 % (NaCl), utilizando el vórtex para mejor homogenizado, hasta obtener la turbidez de la escala 0,5 de Mc. Farland por comparación visual con dicho patrón. Se usó una luz apropiada para leer los tubos contra un fondo blanco con líneas negras como contraste. Este proceso se repitió tanto para los ensayos de disco difusión y macrodilución respectivamente.

Inoculación de las placas

Se usaron las soluciones microbianas preparados en la etapa de preparación del inóculo y se sembró 100 uL en placas secas de agar Mueller Hinton, se dispersó el inóculo con la espátula de Drigalsky en varias direcciones para lograr una distribución uniforme del inóculo. Se dejó secar por un tiempo de 3 a 5 min. El proceso de inoculación se

realizó en el transcurso de 15 minutos de ajustado el inóculo en el Mac Farland.

Aplicación de los discos e incubación.

Para esta etapa, los discos se fabricaron con papel Whatman N° 1, con un diámetro de 6mm, se esterilizaron en estufa a 180°C x 2 horas. Se dejaron enfriar para después impregnar con 15 microlitros del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* en una cabina de bioseguridad, de acuerdo a como especifica la Tabla 7.

Tabla 7 Diluciones seriadas y concentraciones del extracto etanólico en discos

Códigos	Concentraciones					
	A	B	C	D	E	F
Soluciones madres (mg/mL)	1000	900	800	700	600	500
Concentración en discos (mg/mL) por 15 µL	15	13,5	12	10,5	9	7,5

Se colocaron los discos sobre la superficie del agar Mueller Hinton con la ayuda de una pinza estéril a una distancia mínima de 25 mm y con la punta de una aguja presionamos suavemente cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del agar. Los discos no se removieron una vez colocados en el agar, debido a que los antimicrobianos difunden rápidamente en la superficie.

Para el control positivo se utilizó discos comerciales de Gentamicina de 10ug y Ciprofloxacino de 5ug. Como control negativo discos impregnados con 15 uL de solución etanol 96°:agua destilada estéril (1:1), secados a 35°C por 18 horas.

Se incubaron las placas en posición invertida a 35°C dentro de los 15 minutos posteriores a la aplicación de los discos, durante 16-18 horas.

Lectura de las placas e interpretación de los resultados:

Después de 16 a 18 horas de incubación se examinó cada placa, observando la extensión del inóculo y la formación de halos uniformemente circulares. Se midieron los diámetros de las zonas de

inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco), con un calibrador vernier con un fondo de lectura iluminada con una luz reflejada localizada a unos cuantos centímetros sobre fondo negro.

El margen de la zona se consideró como el área que no muestra ningún crecimiento obvio y visible que pueda detectarse a simple vista.

Se Interpretó los tamaños de las zonas de inhibición refiriéndose a las tablas 2, 4 y 6 de Sacsquispe y Velásquez (2002), estableciéndose los organismos como susceptibles, intermedios o resistentes (S, I y R) frente al extracto en estudio.

Procedimiento de categorización:

Siguiendo con Sacsquispe y Velásquez (2002), para los principales antibióticos, los valores críticos de las concentraciones bajas (c) y altas (C) y de sus diámetros correspondientes (d, D), permiten la categorización según los siguientes criterios (Tabla 08).

Tabla 8 *Categorización de los puntos de corte*

Categorías	Concentración mínima	Diámetro del halo de
S	CIM £ c	DHI ,D
R	CIM > C	DHI < d
I	C < CIM £ C	DHI < D

Fuente: Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión de la INS, (Sacsquispe & Velásquez, 2002).

Todo el proceso de Kirby Bauer en forma resumida se puede observar en el Anexo 3.

3.3.8.2. Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Se desarrolló de acuerdo a Métodos para Dilución de Antimicrobianos de Susceptibilidad a los Antimicrobianos para bacterias aeróbicas (M-07) de CLSI (2022) y del Manual de Procedimientos para la prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el método de Disco Difusión del INS (Sacsquispe y Velásquez, 2002), como se describe a continuación:

El inóculo se prepara de acuerdo al punto 3.3.6. activación de las cepas bacterianas, y del ítem preparación de inóculo del método disco difusión ubicado en el ítem 3.3.8.1. de este trabajo.

La suspensión preparada con turbidez comparable al tubo de la escala de Mac. Farland de 0.5, contiene aproximadamente $1 - 2 \times 10^8$ ufc/mL para *Escherichia coli* ATCC 25922. Para el ensayo, la suspensión bacteriana se preparó agregando 0,1 mL del tubo de NaCL 0.9 %, (que contiene las bacterias de estudio) en 9.9 ml de Caldo Mueller Hinton (M-H) obteniéndose un total de 10 ml con una concentración bacteriana de $1 - 2 \times 10^6$ ufc/mL.

Preparación y control de extractos:

- Se pesó 1,28 gramos del extracto etanólico en 0,5 mL de una solución etanol:agua en proporción de 1:1 en un vial tipo Eppendorf estériles para obtener una solución madre de 2560 mg/mL (Solución madre o Stock).
- De la solución madre o stock se extrajo 0.1 ml y se añadió al Tubo 1 que contenía 0.9 ml de caldo Mueller Hinton.
- Posteriormente del Tubo 1 se extrajo 0.5 mL que se añadió al Tubo 2 que contenía 0.5 mL de caldo M-H y así se realizó sucesivamente hasta llegar al Tubo 9. Del Tubo N° 9 se extrajo 0.5 mL que fue desechado.
- Después de este proceso se añadió a todos los tubos 0.5 ml de la suspensión bacteriana preparada anteriormente ($1 - 2 \times 10^6$ ufc/mL) para los ensayos. El volumen final de cada tubo eppendorf fue de 1 mL.
- Para la preparación del control de turbidez se repitieron los tres primeros pasos, añadiendo finalmente 0.5 mL de caldo M-H estéril.
- Las concentraciones para el ensayo fueron comprendidas entre los rangos de 128 mg/ml a 1 mg/ml, como se ve en la Tabla 9, siendo el Tubo 9 control de crecimiento (0 mg/mL).

Tabla 9 Concentraciones del extracto etanólico usadas en Macrodilución (Solución inicial de 2560 mg/mL).

Códigos	Concentraciones								
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	Tubo 8	Tubo 9
Caldo Mueller Hinton (mL)	0,9	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Concentración inicial del extracto (mg/mL)	256	128	64	32	16	8	4	2	0
Concentración final del extracto (mg/mL)	128	64	32	16	8	4	2	1	0

Preparación del control positivo:

- El control positivo empleado en la prueba fue el antibiótico gentamicina (160 mg/2ml), del cual se utilizó 0.64 ml y se enrasó hasta 5 ml en un tubo estéril para obtener una solución madre o stock de 10240 ug/ml.
- De la solución madre se extrajo 0.1 ml y se añadió al Tubo 1 que contenía 0.9 mL de caldo Mueller Hinton.
- Del Tubo 1 se extrajo 0.5 ml que se añadió al Tubo 2 que contenía 0.5 mL de caldo M-H y así se realizó sucesivamente hasta llegar al Tubo 9.
- Del Tubo 9 se extrajo 0.5 ml que fue desechado.
- Después de este proceso se añadió a todos los tubos 0.5 ml de la suspensión bacteriana preparada anteriormente ($1 - 2 \cdot 10^6$ ufc/mL).
- El volumen final de cada tubo fue de 1 ml.
- Las concentraciones estuvieron comprendidas entre los rangos de 512 ug/ml a 2 ug/ml, siendo el Tubo 9 el control de crecimiento (0 µg/mL).

Interpretación de datos:

La CMI corresponde a la mínima concentración de antibiótico y del extracto donde no se observa desarrollo (turbidez). La CMI se expresa en µg/mL para el control positivo y en mg/mL para los extractos. Para su clasificación se utilizará los puntos de corte de la Tabla 10, también vemos en el Anexo 4 y 5 el resumen de la serie de diluciones utilizadas para la evaluación del extracto etanólico y el control positivo.

Tabla 10 Clasificación de la actividad antimicrobiana según CMI

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA	CMI (mg/mL)
Inactivo	> 16
Poco activo	6 -15
Moderadamente activo	1 - 5
Buena actividad	< 1

Fuente: Protocolo de estudio de la actividad antimicrobiana (IMET-ESSALUD, 2007)

3.3.8.3. Determinación de Concentración Mínima Bactericida (CMB)

Una vez leída la CIM se homogenizó el contenido de los tubos que no presentaron crecimiento.

Se inoculó 100uL en placas con agar Tripticasa Soya y con un asa digralsky se extendió toda la superficie del agar, incubando a 37°C durante 18 horas. Después de la incubación se contó las colonias, considerando la CMB como la menor concentración del extracto que produjo un número de colonias menor al 0.1% del inóculo original (Abadie et al., 2014; Navarrete et al., 2020).

3.3.9 Determinación de la acción bactericida *in vivo* del desinfectante natural.

Las soluciones se prepararon el mismo día de la prueba y se aplicaron por el método de aspersion usando un frasco pulverizador a una distancia de 20 cm. Se consideró como desinfectante natural al extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* (Pie de paloma) diluido en una solución de Polisorbato 80:agua destilada estéril en una proporción de 1:4).

Las superficies en estudio fueron elegidas al azar, para después colocar las plantillas estériles de 100 cm² para cada uno de los 9 tratamientos (16, 32 y 64 mg/mL por 5, 15 y 30 minutos), dos controles positivos (solución de hipoclorito de sodio al 0,02% y 0,1%) y un control negativo (sin aplicación del extracto etanólico). Los 9 tratamientos y los dos controles se impregnaron con las soluciones desinfectantes y se

procedió a recoger las muestras según el método del hisopado (MINSA, 2007). Los hisopos recogidos se depositaron en tubos con 9 ml de caldo neutralizante que posteriormente fue llevado en una caja térmica a una temperatura de 4°C hasta el Laboratorio.

Las muestras en el Laboratorio se dejaron un tiempo hasta poner a temperatura ambiente, luego se agitaron durante 1 minuto, realizando posteriormente diluciones necesarias para efectuar los recuentos de los microorganismos sobrevivientes de Mesófilos Aerobios Viables, inoculando 1 ml de cada dilución en placas petri a las que se adicionó agar Plate Count. Luego se incubaron a 35°C por 24-48 horas (Maturin & Peeler, n.d.). Transcurrido el tiempo de incubación se efectuó el recuento correspondiente expresados en UFC/cm² y unidades logarítmicas, comprobando de esa forma la acción del desinfectante, mediante análisis inferencial y la reducción logarítmica. Ver Anexo 6.

3.4 Procesamiento y análisis de datos

El análisis comparativo de la Unidades Formadoras de Colonia (UFC) entre las concentraciones del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* (desinfectante) y el tiempo de aplicación fue realizado usando el análisis de la Varianza (ANOVA), con previo análisis de normalidad de Shapiro Wilk, para el caso dónde no hay normalidad se utilizó la prueba de Kuskal Wallis. Cuando hubo diferencia significativa a un nivel $\alpha = 0.05$ se aplicó la prueba post hoc de Tukey.

3.5 Aspectos éticos

El Laboratorio de Microbiología de Alimentos donde se realizaron los ensayos experimentales, constituye una área de trabajo especial, por lo que presenta riesgos de transmisión de contaminación con microorganismos causantes de enfermedades infecciosas, por ello se cumplió estrictamente las medidas de bioseguridad, con la finalidad de salvaguardar la integridad del personal humano, respetando, guiándonos y cumpliendo con las medidas y estipulaciones que enmarcan la protección de los derechos humanos.

CAPITULO IV: RESULTADOS

4.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO VEGETAL.

4.1.1 Determinación del rendimiento de *Chamaesyce thymifolia*

Tabla 11 Rendimiento del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia*

Parte de la planta	Cantidad de muestra	Cantidad de muestra seca	Cantidad de extracto seco	Porcentaje de rendimiento.
Entera	600g	400g	12.5g	3.125%

La Tabla 11 muestra el rendimiento de 3.125% de extracto etanólico obtenido a partir de 600 gramos de la planta entera fresca.

4.1.2 Identificación de Metabolitos Secundarios: Tamizaje fitoquímico.

Tabla 12 Tamizaje Fitoquímico de *Chamaesyce thymifolia* (pie de paloma)

METABOLITOS	ENSAYOS	EXTRACTO ETANÓLICO
ALCALOIDES	Drangendorff	++
TRITERPENOS Y ESTEROIDES	Liebermann – Burchard	+++
QUINONAS	Borntrager	0
LACTONAS Y CUMARINAS	Baljet	++
AZUCARES REDUCTORES	Fehling	0
SAPONINAS	Espuma	0
FENOLES Y TANINOS	Cloruro Férrico	+++
AMINOÁCIDOS Y AMINAS	Ninhidrina	0
FLAVONOIDES	Shinoda	+
GLICÓSIDOS CARDIOTÓNICOS	Kedde	--

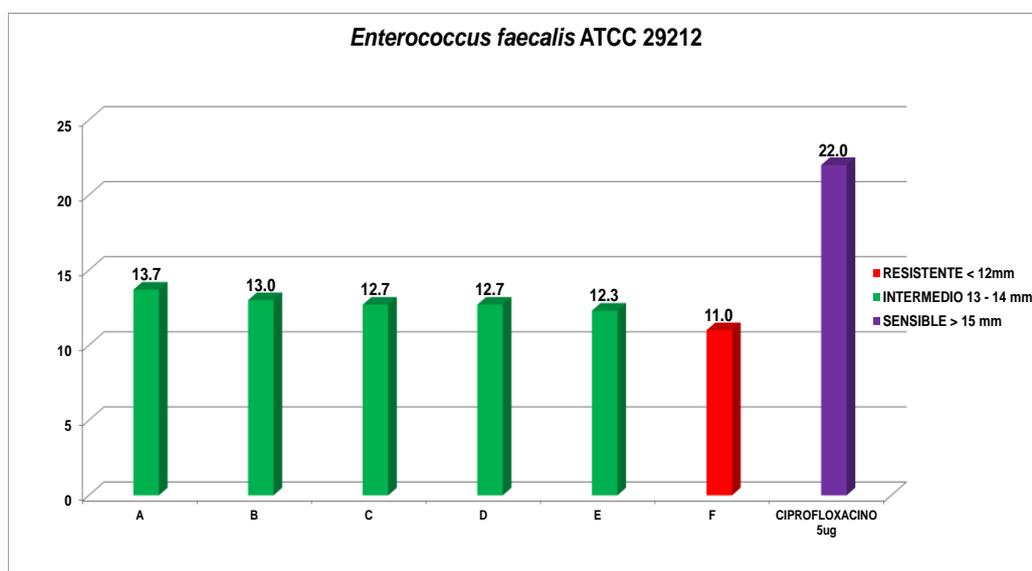
(+++) Abundante; (++) Moderado; (+) Leve; (0) Ausente; (--) No se realizó

4.1.3 Actividad antibacteriana de *Chamaesyce thymifolia* (pie de paloma)

4.1.3.1 Método Disco Difusión (Kirby Bauer)

En la Tabla 13 observamos los resultados de la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* a concentraciones de 15 mg/ml, 13,5 mg/ml, 12 mg/ml, 10,5 mg/ml, 9 mg/ml, y 7,5 mg/ml frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 25925, *Staphylococcus aureus* ATCC 25613 y *Salmonella tiphymurium* ATCC 14028.

Figura 3 Grado de sensibilidad de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212



Enterococcus faecalis ATCC 29212, en la Figura 3, muestra los halos de inhibición 13,7 mm, 13,0 mm, 12,7 mm, 12,7 mm, y 12,3 mm, a las concentraciones en estudio “A, B, C, D, y E”, siguiendo el esquema de los diámetros de la zona de inhibición del Instituto Nacional de Salud, decimos que *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 tiene una sensibilidad intermedia; la concentración “F” con un halo de 11,0 mm reporta una sensibilidad resistente al extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia*.

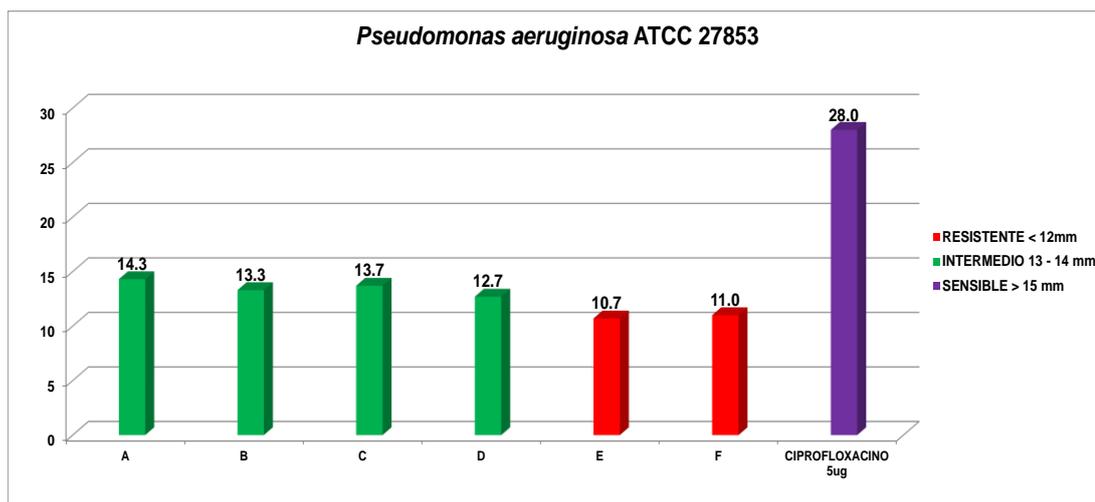
Tabla 13 Actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* frente a 7 cepas por disco difusión.

BACTERIA	CONCENTRACIÓN "A"		CONCENTRACIÓN "B"		CONCENTRACIÓN "C"		CONCENTRACIÓN "D"		CONCENTRACIÓN "E"		CONCENTRACIÓN "F"	
	15 mg/mL		13,5 mg/mL		12 mg/mL		10,5 mg/mL		9 mg/mL		7,5 mg/mL	
	mm	Resultado										
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	13,7 ± 0,6	Intermedio	13,0 ± 0,0	Intermedio	12,7 ± 0,6	Intermedio	12,7 ± 0,6	Intermedio	12,3 ± 0,6	Intermedio	11,0 ± 1,0	Resistente
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	14,3 ± 1,0	intermedio	13,3 ± 1,0	Intermedio	13,7 ± 0,6	Intermedio	12,7 ± 0,6	Intermedio	10,7 ± 0,6	Resistente	11,0 ± 1,0	Resistente
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	13,0 ± 1,0	intermedio	11,0 ± 1,0	Resistente	10,0 ± 1,0	Resistente						
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	14,0 ± 1,0	intermedio	12,7 ± 0,6	Intermedio	12,0 ± 1,0	Intermedio	12,7 ± 0,6	Intermedio	11,7 ± 0,6	Resistente	10,7 ± 0,6	Resistente
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25925	15,0 ± 1,0	Sensible	15,3 ± 0,6	Sensible	13,3 ± 0,6	Intermedio	12,5 ± 0,7	Intermedio	12,3 ± 0,6	Intermedio	13,0 ± 0,0	Intermedio
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25613	14,3 ± 0,6	Intermedio	13,0 ± 1,0	Intermedio	12,7 ± 0,6	Intermedio	11,7 ± 0,6	Resistente	11,7 ± 0,6	Resistente	11,7 ± 0,6	Resistente
<i>Salmonella tiphymurium</i> ATCC 14028	12,0 ± 0,6	Resistente	11,0 ± 0	Resistente	10,7 ± 0	Resistente	10,0 ± 1,0	Resistente	10,3 ± 0,6	Resistente	10,0 ± 1,0	resistente

* Esquema de los Diámetros de la Zona de Inhibición: Resistente: < 12 mm, Intermedio: 13 a 14 mm, Sensible: > 15 mm

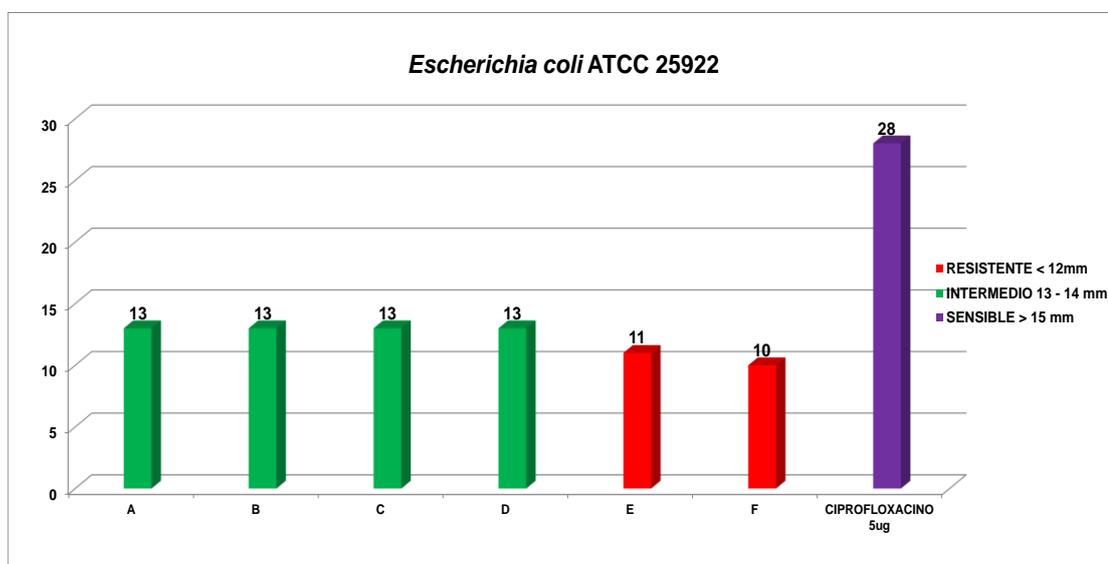
Fuente: Protocolo de Estudio de la Actividad Antibacteriana (IMET-ESSALUD, 2007)

Figura 4 Grado de sensibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



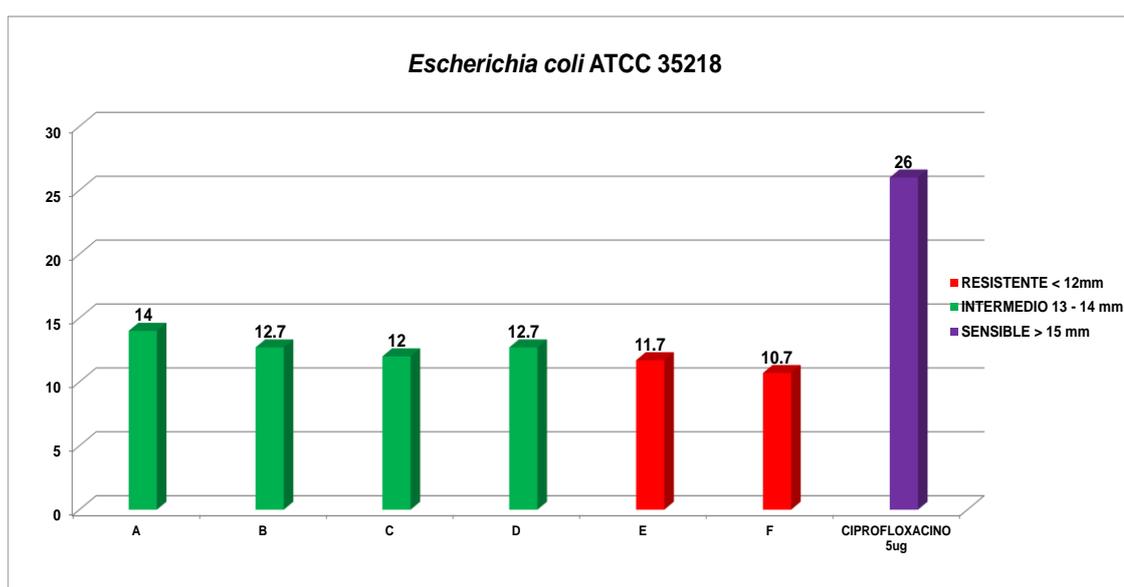
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, en Figura 4, muestra halos de inhibición de 14,3 mm, 13,3 mm, 13,7 mm, y 12,7 mm a las concentraciones en estudio “A, B, C, y D”, siguiendo el esquema de los diámetros de la zona de inhibición del Instituto Nacional de Salud, decimos que tiene una sensibilidad intermedia; la concentración “E, y F” con un halo de 10,7 mm y 11,0 mm reportan una sensibilidad resistente al extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* respectivamente.

Figura 5 Grado de sensibilidad de *Escherichia coli* ATCC 25922



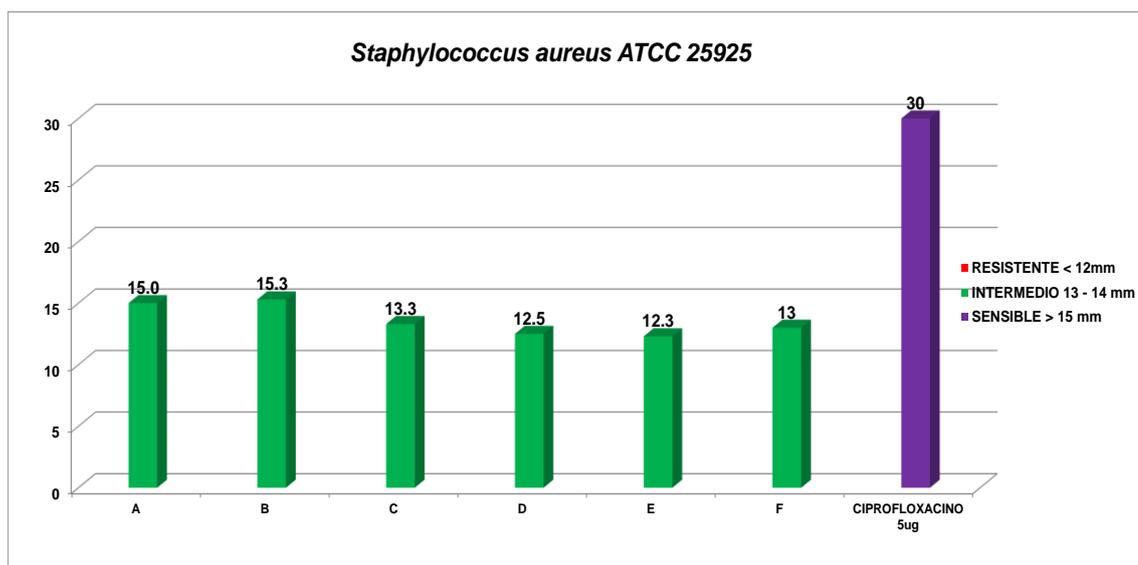
Escherichia coli ATCC 25922, en la Figura 5, muestra halos de inhibición de 13,0 mm, 13,0 mm, 13,0 mm, y 13,0 mm a las concentraciones en estudio “A, B, C, y D”, siguiendo el esquema de los diámetros de la zona de inhibición del Instituto Nacional de Salud, decimos que tiene una sensibilidad intermedia; la concentración E, y F con un halo de 11,0 mm y 10,0 mm reportan una sensibilidad resistente al extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* respectivamente.

Figura 6 Grado de sensibilidad de *Escherichia coli* ATCC 35218



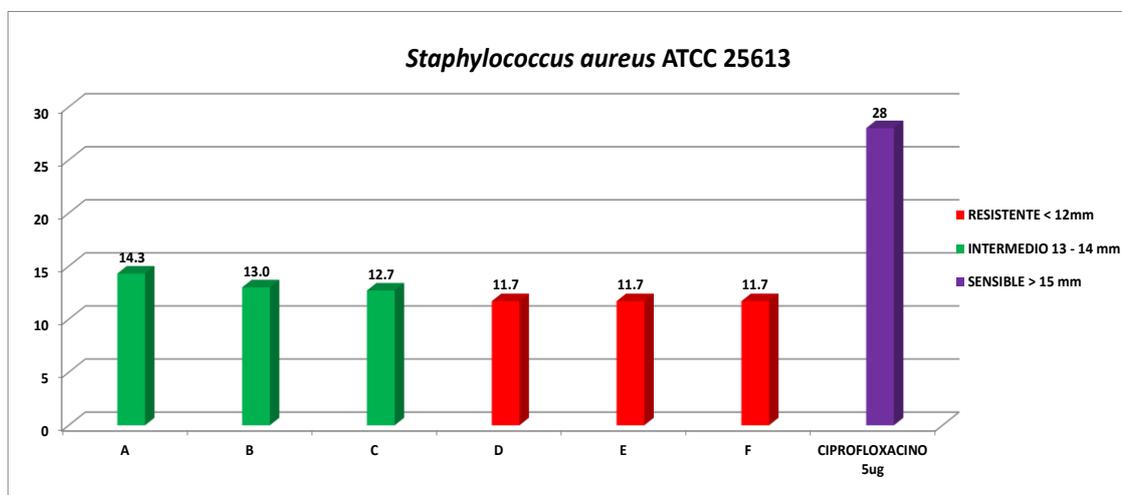
Escherichia coli ATCC 35218, en la Figura 6, muestra halos de inhibición de 14,0 mm, 12,7 mm, 12,0 mm, y 12,7 mm a las concentraciones en estudio “A, B, C, y D”, siguiendo el esquema de los diámetros de la zona de inhibición del Instituto Nacional de Salud, decimos que tiene una sensibilidad intermedia; la concentración E, y F con un halo de 11,7 mm y 10,7 mm reportan una sensibilidad resistente al extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* respectivamente.

Figura 7 Grado de sensibilidad de *Staphylococcus aureus* ATCC 25925



Staphylococcus aureus ATCC 25925, en la Figura 7, muestra halos de 15,0 mm, y 15,3 mm a las concentraciones “A, y B”, siguiendo el esquema de los diámetros de la zona de inhibición del Instituto Nacional de Salud, decimos que *Staphylococcus aureus* ATCC 25925 tiene una clasificación sensible; la concentración “C, D, E, y F” con un halo de 13,3 mm, 12,5 mm, 12,3 mm, y 13,0 mm reportan una sensibilidad intermedia al extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* respectivamente.

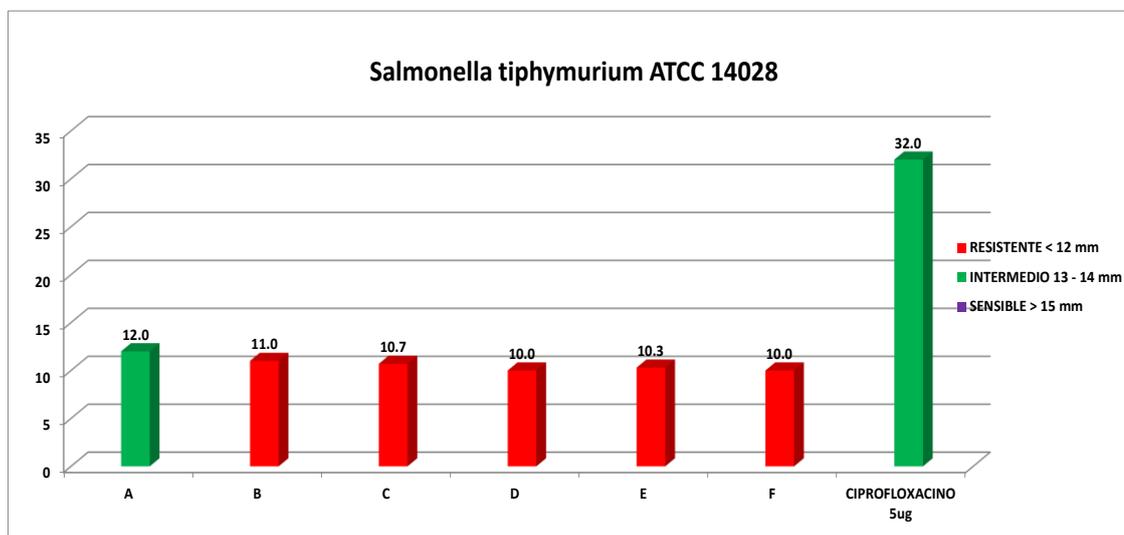
Figura 8 Grado de sensibilidad de *Staphylococcus aureus* ATCC 25613



Staphylococcus aureus ATCC 25613, en la Figura 8, de acuerdo a los halos de inhibición 14,3 mm, 13,0 mm y 12,7 mm a las concentraciones “A, B, y C”,

siguiendo el esquema de los diámetros de la zona de inhibición del Instituto Nacional de Salud, decimos que tiene una clasificación intermedia; la concentración “D, E, y F” con un halo de 11,7 mm, 11,7 mm, y 11,7 mm reportan una sensibilidad resistente al extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* respectivamente.

Figura 9 Grado de sensibilidad de *Salmonella tiphymurium* ATCC 14028



Salmonella tiphymurium ATCC 14028, en la Figura 9, muestra halos de 12,0 mm, 11,0 mm, 10,7 mm, 10,0 mm, 10,3 mm, y 10,0 mm a las concentraciones “A, B, C, D, E, y F”, siguiendo el esquema de los diámetros de la zona de inhibición del Instituto Nacional de Salud, decimos que *Salmonella tiphymurium* ATCC 14028 tiene una clasificación resistente al extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* respectivamente.

En la Tabla 13, observamos los resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana del control positivo, para la cual se utilizaron discos del antibiótico ciprofloxacino a concentraciones de 5ug/ml, en donde se reporta según el esquema de los diámetros de la zona de inhibición del Instituto Nacional de Salud, que el antibiótico es sensible a todas las bacterias en estudio.

Tabla 14 Evaluación de la actividad antibacteriana del control positivo (Ciprofloxacino 5 ug).

BACTERIA	CIPROFLOXACINO	
	ug/ml	
	mm	Resultado
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	22,0± 0,6	Sensible
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	28,0 ± 0,6	Sensible
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	28,0 ± 0,6	Sensible
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	26,0 ± 0,6	Sensible
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25925	30,0 ± 0,6	Sensible
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25613	28,0 ± 0,6	Sensible
<i>Salmonella tiphymurium</i> ATCC 14028	32,0 ± 0,6	Sensible

Fuente: Protocolo de Estudio de la Actividad Antibacteriana (IMET-ESSALUD, 2007)

* Esquema de los Diámetros de la Zona de Inhibición: Resistente: < 12mm; Intermedio: 13 a 14 mm; Sensible: > 15 mm

4.1.3.2 Método de Macrodilución (Concentración Mínima Inhibitoria)

Tabla 15 Actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* según CMI.

BACTERIA EN ESTUDIO	Nº DILUCIÓN	CMI	RESULTADO (*)
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	C4	4 mg/ml	MODERADO ACTIVO
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	C3	8 mg/ml	MODERADO ACTIVO
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	C2	16 mg/ml	INACTIVO
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	C2	16 mg/ml	INACTIVO
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	C5	2 mg/ml	MODERADO ACTIVO
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25613	C5	2 mg/ml	MODERADO ACTIVO
<i>Salmonella tiphymurium</i> ATCC 14028	C2	16 mg/ml	INACTIVO

Fuente: Protocolo de Estudio de la Actividad Antibacteriana (IMET-ESSALUD, 2007).

* Actividad antimicrobiana / Valor de CMI: Inactivo: > 16 mg/ml; Poco Activo: 8 - 15 mg/ml; Moderadamente activo: 1- 8 mg/ml; Buena Actividad: < 1 mg/ml.

La Tabla 15, muestra los resultados de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Chamaesyce thymifolia*, que frente a *Enterococcus*

faecalis ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, y *Staphylococcus aureus* ATCC 25613 y ATCC 27853 tuvo una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) Moderadamente activo; para *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218 y *Salmonella tiphymurium* ATCC 14028 tuvo una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) Inactivo.

4.1.3.3 Concentración Mínima Bactericida (CMB)

Tabla 16 Actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* según CMB.

BACTERIA EN ESTUDIO	CMB
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	32mg/ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	64mg/ml
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	64mg/ml
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	128mg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	32mg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25613	128mg/ml
<i>Salmonella tiphymurium</i> ATCC 14028	-

La Concentración Mínima Bactericida (CMB) -concentración menor del extracto que mata a las bacterias- del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* según rango de lectura frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 fue de 32 mg/ml, concentración a la que se considera Activa; para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Escherichia coli* ATCC 25922 fue de 64mg/ml, en la cual también es activa; para *Escherichia coli* ATCC 35218 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25613 fue de 128 mg/ml. Mientras que, en *Salmonella tiphymurium* ATCC 14028 no se encontró CMB, por lo que se considera como Inactiva.

4.1.3 Acción bactericida *in vivo* del extracto de *Chamaesyce thymifolia* usado como desinfectante natural.

4.1.3.1 Análisis de Varianza del recuento de Mesófilos Aerobios Viables en concentración de extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* en 5 minutos.

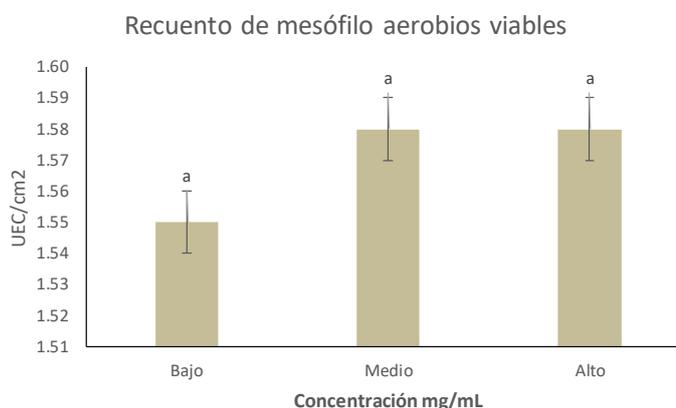
Tabla 17 Anova de recuento de mesófilos aerobios viables (UFC/cm²) por concentración de extracto etanólico (mg/mL) y tiempo de 5 minutos.

Fuentes de variabilidad	GL	SC	CM	Fc	p-valor
Concentración mg/mL	2	0.00	0.00	0.03	0.97096
Error aleatorio	6	0.22	0.04		
Total	8	0.00			

CV= 12.08%

El Anova indica significancia estadística no significativa ($p > 0.05$) para concentración de extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* (mg/mL) como desinfectante natural sobre el recuento de mesófilos aerobios viables (UFC/cm²) en un tiempo de 5 minutos, el coeficiente de variabilidad indica confiabilidad experimental.

Figura 10 Recuento de mesófilos aerobios viables (UFC/cm²) por concentración de extracto etanólico y tiempo de 5 minutos.



La Figura 10 muestra la jerarquía de las concentraciones en relación al recuento de mesófilos aerobios viables en un tiempo de 5 minutos. Hay evidencia suficiente para afirmar que no hay efecto de las concentraciones en el recuento, a decir es indiferente utilizar cualquier dosis durante 5 minutos.

Tabla 18 Orden de mérito del recuento de mesófilos aerobios viables por concentración de extracto etanólico y tiempo de 5 minutos.

Concentración mg/mL	Medias	Sig.
Medio	1.58	a
Alto	1.58	a
Bajo	1.55	a

La Tabla 18 muestra el orden de mérito, donde sólo hay discrepancias numéricas de los promedios máximos del recuento de mesófilos aerobios en que las concentraciones medio y alto tienen el mismo efecto, resultando la baja concentración con mejor acción desinfectante para mesófilos aerobios viables.

4.1.3.2 Análisis de Varianza del recuento de Mesófilos Aerobios Viables en concentración de extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* en 15 minutos.

Tabla 19 Anova de recuento de mesófilos aerobios viables (UFC/cm²) por concentración de extracto etanólico y tiempo de 15 minutos.

Fuentes de variabilidad	GL	SC	CM	Fc	p-valor
Concentración mg/mL	2	0.06	0.03	0.79	0.49685
Error aleatorio	6	0.24	0.04		
Total	8	0.31			

CV= 15.28%

El Anova indica significancia estadística no significativa ($p > 0.05$) para concentración de extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* (mg/mL) como desinfectante natural sobre el recuento de mesófilos aerobios viables (UFC/cm²) en un tiempo de 15 minutos, el coeficiente de variabilidad indica confiabilidad experimental.

La Figura 11 muestra la jerarquía de las concentraciones en relación al recuento de mesófilos aerobios viables en un tiempo de 15 minutos. Hay evidencia suficiente para afirmar que no hay efecto de las concentraciones en el recuento, es indiferente utilizar cualquier dosis durante 15 minutos.

Figura 11 Recuento de mesófilos aerobios viables por concentración de extracto etanólico y tiempo de 15 minutos.

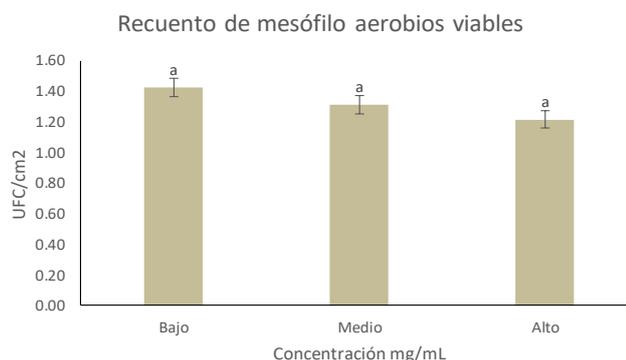


Tabla 20 Orden de mérito del recuento de mesófilos aerobios viables por concentración de extracto etanólico y tiempo de 15 minutos.

Concentración mg/mL	Medias	Sig.
Medio	1.42	a
Bajo	1.32	a
Alto	1.22	a

La Tabla 20 muestra el orden de mérito, donde sólo hay discrepancias numéricas de los promedios máximos del recuento de mesófilos aerobios en que las concentraciones medio y bajo tienen efectos similares resultando la alta concentración con mejor acción desinfectante para mesófilos aerobios viables.

4.1.3.3 Análisis de Varianza del recuento de Mesófilos Aerobios Viables por concentración de extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* por tiempo de 30 minutos.

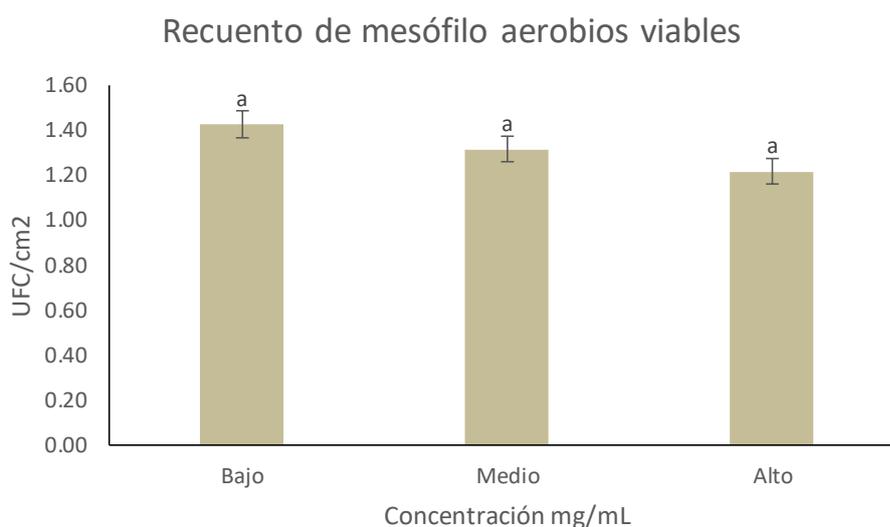
En la Tabla 21, el Anova indica significancia estadística no significativa ($p > 0.05$) para concentración de extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* (mg/mL) como desinfectante natural sobre el recuento de mesófilos aerobios viables (UFC/cm²) en un tiempo de 30 minutos, el coeficiente de variabilidad indica confiabilidad experimental.

Tabla 21 Anova de recuento de mesófilos aerobios viables (UFC/cm²) por concentración de extracto y tiempo 30 minutos.

Fuentes de variabilidad	GL	SC	CM	Fc	p-valor
Concentración mg/mL	2	0.21	0.11	1.94	0.22399
Error aleatorio	6	0.33	0.05		
Total	8	0.54			

CV= 16.54%

Figura 12 Recuento de mesófilos aerobios viables (UFC/cm²) por concentración de extracto etanólico y tiempo de 30 minutos.



La Figura 12, muestra la jerarquía de las concentraciones en relación al recuento de mesófilos aerobios viables en un tiempo de 30 minutos. Hay evidencia suficiente para afirmar que no hay efecto de las concentraciones en el recuento, a decir es indiferente utilizar cualquier dosis durante 30 minutos.

Tabla 22 Orden de mérito de recuento de mesófilos aerobios viables por concentración de extracto etanólico y tiempo de 30 minutos.

Concentración mg/mL	Medias	Sig.
Alto	1.52	a
Medio	1.51	a
Bajo	1.19	a

La Tabla 22, muestra el orden de mérito, donde sólo hay discrepancias numéricas de los promedios máximos del recuento de mesófilos aerobios en que las concentraciones medio y alto tienen el mismo efecto resultando la baja concentración con mejor acción desinfectante para mesófilos aerobios viables.

4.1.3.4 Análisis de Varianza del recuento de Mesófilos Aerobios Viables por tiempo de desinfección y concentración de 16 mg/mL del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia*.

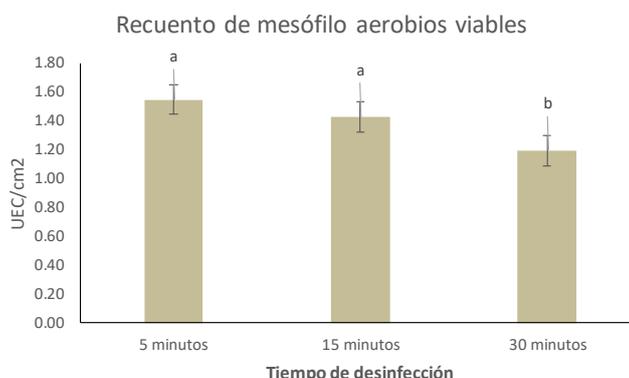
Tabla 23 Anova de recuento de mesófilos aerobios viables (UFC/cm²) por tiempo de desinfección y concentración de 16 mg/mL.

Fuentes de variabilidad	GL	SC	CM	Fc	p-valor
Tiempo	2	0.19	0.10	17.00	0.00337
Error aleatorio	6	0.03	0.01		
Total	8	0.23			

CV= 5.42%

El Anova indica alta significancia estadística ($p < 0.01$) para tiempo de desinfección sobre el recuento de mesófilos aerobios viables (UFC/cm²) en una concentración de 16 mg/mL del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia*, el coeficiente de variabilidad indica confiabilidad experimental.

Figura 13 Prueba de Tukey del recuento de mesófilos aerobios viables por tiempos de desinfección a una concentración de 16mg/mL.



La Figura 13 muestra alta significancia estadística de los tiempos de desinfección en relación al recuento de mesófilos aerobios viables en una

concentración de 16 mg/mL de extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* como desinfectante natural. Hay evidencia para afirmar que, si hay efecto de los tiempos de desinfección en el recuento, es más efectivo el tiempo de 30 minutos frente a 5 y 15 minutos.

Tabla 24 Orden de mérito según la Prueba de Tukey de los promedios máximos de recuento de mesófilos aerobios viables en tiempos de desinfección a concentración de 16 mg/mL.

Concentración mg/mL	Medias	Sig.
5 minutos	1.55	a
15 minutos	1.42	a
30 minutos	1.19	b

La Tabla 24, muestra el orden de mérito, donde los tiempos de 5 y 15 minutos no muestran significancia estadística, es indiferente el tiempo de desinfección, evidenciándose que el promedio máximo del recuento de mesófilos aerobios en tiempo de 30 minutos de desinfección es mejor (1.19), siendo este tiempo de acuerdo a los resultados a utilizarse para la desinfección.

4.1.3.5 Análisis de Varianza del recuento de Mesófilos Aerobios Viables por tiempo de desinfección y concentración de 32 mg/mL del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia*.

Tabla 25 Anova de recuento de mesófilos aerobios viables por tiempo de desinfección a 32 mg/mL de extracto etanólico.

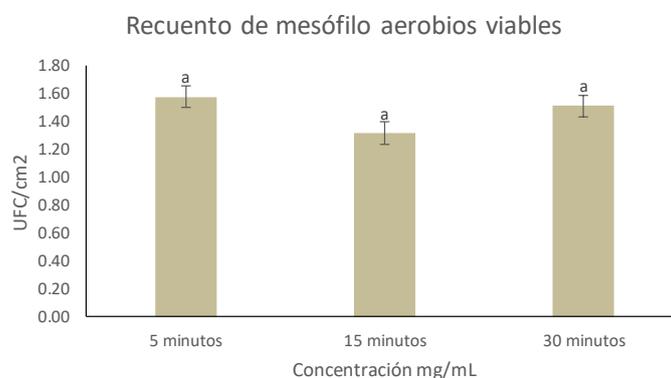
Fuentes de variabilidad	GL	SC	CM	Fc	p-valor
Tiempo	2	0.11	0.06	0.75	0.51008
Error aleatorio	6	0.44	0.07		
Total	8	0.55			

CV= 18.50%

El Anova indica significancia estadística no significativa ($p > 0.05$) para tiempo de desinfección sobre el recuento de mesófilos aerobios viables (UFC/cm²) en una concentración de 32 mg/mL de extracto etanólico de *Chamaesyce*

thymifolia., el coeficiente de variabilidad indica confiabilidad experimental, tomándolo este valor con cierta precaución.

Figura 14 Promedios máximos de recuento mesófilos aerobios viables por tiempos desinfección a una concentración de 32 mg/mL.



La Figura 14, muestra la no significancia estadística de los tiempos de desinfección en relación al recuento de mesófilos aerobios viables en una concentración de 32 mg/mL de extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* como desinfectante. Hay evidencia suficiente para afirmar que no hay ningún efecto de los tiempos de desinfección en el recuento, a decir son indiferentes los tiempos de desinfección en el recuento de los mesófilos en estudio.

Tabla 26 Orden de mérito de los promedios máximos de recuentos de mesófilos aerobios viables por tiempos de desinfección a concentración de 32 mg/mL de extracto.

Concentración mg/mL	Medias	Sig.
5 minutos	1.58	a
30 minutos	1.51	a
15 minutos	1.32	a

La Tabla 26, muestra el orden de mérito, donde los tiempos 5, 15 y 30 minutos no muestran significancia estadística, es indiferente el tiempo de desinfección, sin embargo, el promedio máximo del recuento de mesófilos aerobios en el tiempo de 15 minutos es superior numéricamente (1.32) en desinfección para mesófilos aerobios viables.

4.1.3.6 Análisis de Varianza del recuento de Mesófilos Aerobios Viables por tiempo de desinfección y concentración de 64 mg/mL del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia*.

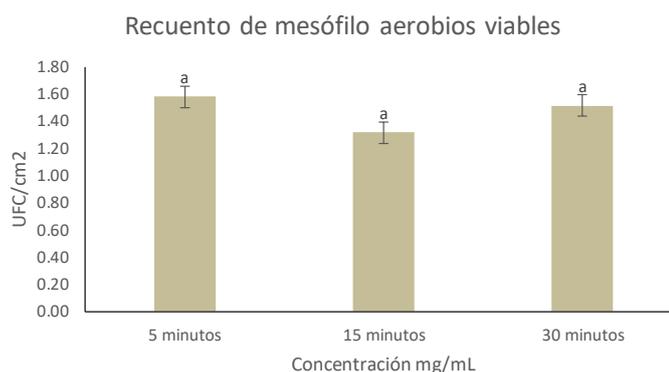
Tabla 27 Anova de recuento de mesófilos aerobios viables por tiempo de desinfección a 64 mg/mL de extracto.

Fuentes de variabilidad	GL	SC	CM	Fc	p-valor
Tiempo	2	0.23	0.11	2.20	0.19198
Error aleatorio	6	0.31	0.05		
Total	8	0.53			

CV= 15.75%

El Anova indica significancia estadística no significativa ($p > 0.05$) para tiempo de desinfección sobre el recuento de mesófilos aerobios viables (UFC/cm²) en una concentración de 64 mg/ml de extracto, el coeficiente de variabilidad indica confiabilidad experimental, tomándolo este valor con cierta precaución.

Figura 15 Promedios máximos de recuento de mesófilos aerobios viables por tiempos de desinfección a una concentración de 64 mg/mL de extracto.



La Figura 15 muestra la no significancia estadística de los tiempos de desinfección en relación al recuento de mesófilos aerobios viables en una concentración de 64 mg/mL de extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* usado como desinfectante. Hay evidencia suficiente para afirmar que no hay ningún efecto de los tiempos de desinfección en el recuento, a decir son indiferentes los tiempos de desinfección en el recuento de los mesófilos en estudio.

Tabla 28 Orden de mérito de los promedios máximos de recuento de mesófilos aerobios viables por tiempos de desinfección a concentración de 64mg/mL de extracto.

Concentración mg/mL	Medias	Sig.
5 minutos	1.58	a
30 minutos	1.52	a
15 minutos	1.22	a

La Tabla 28 muestra el orden de mérito, donde los tiempos 5, 15 y 30 minutos no muestran significancia estadística, es indiferente el tiempo de desinfección, sin embargo, el promedio máximo del recuento de mesófilos aerobios en el tiempo de 15 minutos es superior numéricamente (1.22) en desinfección para mesófilos aerobios viables.

4.1.4 Acción bactericida *in vivo* del extracto de *Chamaesyce thymifolia* usado como desinfectante natural mediante la reducción logarítmica del crecimiento de mesófilos aerobios viables.

Tabla 29 Recuento de mesófilos aerobios viables expresado en unidades logarítmicas después de la aplicación de extracto como desinfectante natural.

	CONCENTRACIÓN mg/mL	CN	16	32	64	CP1	CP2
TIEMPO (min)	5	4,49	1,55	1,58	1,39	0,30	0
	15	4,49	1,42	1,32	1,22	0,30	0
	30	4,49	1,19	1,51	1,52	0,48	0

CN = Control Negativo (Recuento microbiano sin tratamiento)

CP1 = Control positivo (Hipoclorito de sodio al 0,02%)

CP2 = Control positivo (Hipoclorito de sodio al 0,1%)

La tabla 29 muestra la disminución de los recuentos de mesófilos aerobios viables después de la aplicación del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* como desinfectante natural, en comparación con el control negativo.

La Tabla 30 muestra las reducciones logarítmicas para determinar la eficiencia del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* como

desinfectante natural, que en condiciones “*in vivo*” tiene que existir una disminución mínima de 3 ciclos logarítmicos a más en comparación con el recuento inicial. Podemos observar en la tabla que las concentraciones 16, 32 y 64 y el tiempo de 15 minutos cumple con esta condición. Por lo tanto, el extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* muestra eficacia como desinfectante natural.

Tabla 30 Reducción logarítmica del recuento de mesófilos aerobios viables después de la aplicación de extracto como desinfectante natural.

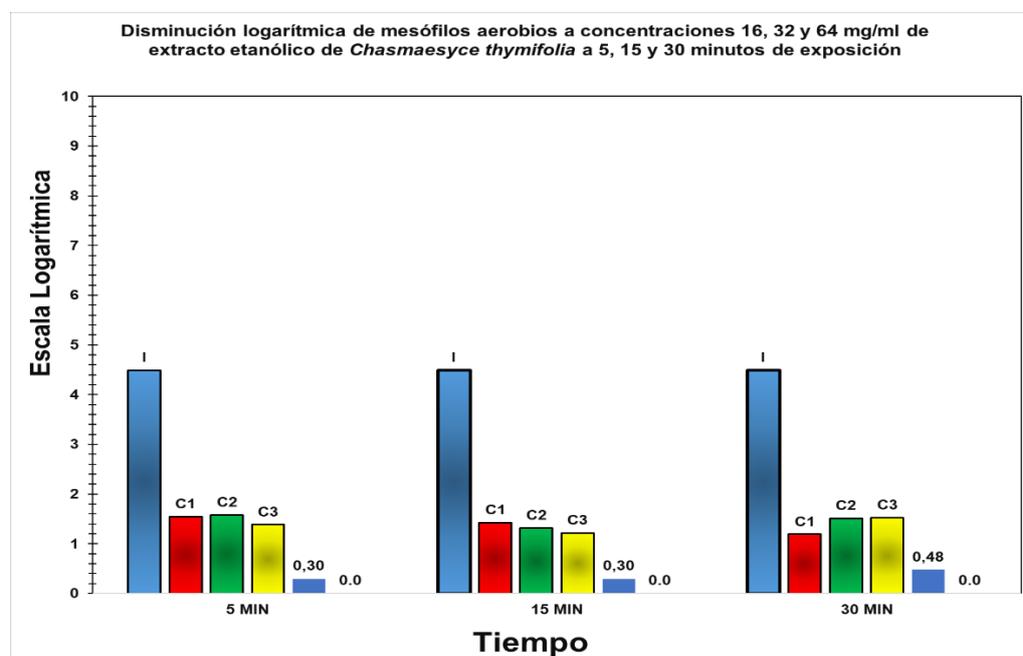
	CONCENTRACIÓN mg/mL	CN	16	32	64	CP1	CP2
TIEMPO (min)	5	4,49	2,95	2,91	3,10	4,19	4,49
	15	4,49	3,07	3,17	3,27	4,19	4,49
	30	4,49	3,30	2,98	2,97	4,01	4,49

CN = Control Negativo (Recuento microbiano sin tratamiento)

CP1 = Control positivo (Hipoclorito de sodio al 0,02%)

CP2 = Control positivo (Hipoclorito de sodio al 0,1%)

Figura 16 Reducción Logarítmica del recuento de mesófilos aerobios viables después de la aplicación de extracto etanólico como desinfectante natural



CAPITULO V: DISCUSIÓN

Las casi 2000 especies del género *Euphorbia* que pertenecen a la familia *Euphorbiaceae* son cosmopolitas y de amplia diversidad, lo que ha atraído su uso en la medicina popular (Ernst et al., 2015), por ejemplo, la aplicación tópica de látex como tratamiento casero para el cáncer de piel y la queratosis actínica, para trastornos del sistema digestivo y respiratorio, enfermedades de la piel, infecciones, inflamaciones, lesiones y otras actividades biológicas. Por su amplia diversidad de especies y de usos se justifica su investigación para la búsqueda de productos nuevos, y entre ellos destaca el género *Chamaesyce* por su alto valor medicinal pero poco estudiado químicamente (Shi et al., 2008; Vasas et al., 2012). Göhre et al. (2016) describe el uso de látex de *Euphorbia thymifolia* (*Chamaesyce thymifolia*) para enfermedades de la vista; Fakim (1990); Suroowan, Pynee y Mahomoodally (2019) describen el uso de la planta entera con antidiarreico, antihelmíntico, hipertensión, enfermedades venéreas y disentería. Se describe también su propiedad antiviral contra Herpes Simple Tipo 1 y la Diarrea Viral Bovina (Amaral et al., 1999) y contra la Hepatitis (Roumy et al., 2020). Estas propiedades de la especie se atribuyen a los diterpenos, cerebrósidos, flavonoides, gliceroles, fenoles, esteroides y triterpenos (Shi et al., 2008); Kane, Mohite y Shete (2009) en el cribado fitoquímico de los extractos reveló la presencia de alcaloides, saponinas, flavonoides, triterpenos, taninos y esteroides. En comparación al último autor, el tamizaje fitoquímico cualitativo del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* realizado en este estudio muestra abundantes triterpenos, esteroides, fenoles y taninos; y en forma moderada alcaloides, lactonas y cumarinas. Considerando esto, los terpenoides es un grupo grande y su composición es muy diferente de una especie a otra, su efecto sobre los microorganismos se ha estudiado desde los años ochenta y son muy prometedores *in vivo* inhibiendo diversas especies bacterianas (Zwenger & Basu, 2008), poseen propiedades desinfectantes (Hernández-Alvarado et al., 2018). Por otro lado, los fenoles y taninos también presentan propiedades antimicrobianas contra una diversidad de bacterias, el lugar y el número de grupos hidroxilos (OH) en el anillo está relacionado con esta propiedad, por lo

que, a mayor hidroxilación mayor toxicidad frente a los microorganismos (Walsh et al., 2019); esta capacidad, también se debe a la facilidad de penetrar las membranas bacterianas y alterar las propiedades funcionales de las células mediante la interferencias en los sistemas enzimáticos (Domingo & López-Brea, 2003) y al deterioro de la pared celular (Ordaz et al., 2010) . El hecho de que los estudios revisados de la especie muestren un amplio uso farmacéutico y en medicina natural, este trabajo dirige su atención como desinfectante natural por sus propiedades antibacterianas presentados especialmente por lo terpenoides del tipo fenólico.

Comparando los resultados de la actividad antibacteriana con otros autores que trabajaron con el extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia*, observamos diferencias, Ríos y Flores (2016) muestran que *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* son sensibles en las concentraciones de 6 y 12 mg por disco difusión, igual que lo reportado por Zagaceta (2017) a concentraciones que van de 15, 20 y 25 mg, a diferencia de nuestro estudio que solo una cepa de *S. aureus* fue sensible en las dos concentraciones más altas (15 y 13.5 mg). Los mismos autores muestran el CMI para *Ps. aeruginosa* moderada activa de 4 y 8 mg/mL; *S. aureus* de 4 mg/mL y *E. coli* de 2 y 8 mg/mL, mientras que las dos cepas de *S. aureus* tienen el más bajo CMI (2 mg/mL) para nuestro estudio, *Ps. aeruginosa* es similar a Zagaceta (2017) con 8 mg/mL y *E. coli* es inactivo para nuestra investigación y moderado activo para los autores. Siguiendo la comparación de las CMB, Ríos y Flores (2016) y Zagaceta (2017) reportan valores para *S. aureus* (16 mg/mL), *E. coli* (16 y 32 mg/mL) y *Ps. aeruginosa* (32 mg/mL) mientras nuestro estudio requiere valores más altos (32, 64 y 128 mg/mL) para las bacterias descritas. Respecto a *Salmonella typhimurium* comparando los resultados de disco difusión y CMI con Zagaceta (2017) ambos estudios reportan resistencia e inactivo respectivamente. En cambio, Muthumani, Anand y Manikandan (2013) también demuestran la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Euphorbia thymifolia* dónde el CMI y el CMB para *Salmonella typhi* fue 100 mg/mL. Se infiere que las diferencias mostradas se debe a la variabilidad intrínseca que presenta cada cepa bacteriana, el almacenamiento, así como a los métodos de extracción y el solvente utilizado

(Kuklinski, 2000; Yu et al., 2004), también a que todas las plantas producen metabolitos secundarios en calidad y cantidad que difiere incluso dentro de la misma especie y del lugar de cultivo, relacionados a las vicisitudes a la que se encuentran expuestas (Gui Ferreira & Aquila, 2000), lo cuál sería una explicación de la diferencia, ya que todas las plantas estudiadas han sido recolectadas en diferentes locales.

Más que realizar una exhaustiva comparación de la actividad antimicrobiana, lo que se requería en esta etapa era conocer si el extracto en estudio mostraba actividad antimicrobiana, y la CMI fue el resultado que orientó las concentraciones a utilizarse en la siguiente etapa *in vivo* para un grupo microbiano denominado Mesófilos Aerobios Viables que pueden incluir las cepas microbianas estudiadas y otras especies.

La actividad antimicrobiana *in vivo* visto en la Tabla 23 y Fig 13, muestran alta significancia estadística ($p < 0.01$) para tiempo de desinfección sobre el recuento de mesófilos aerobios viables (UFC/cm²) en una concentración de 16 mg/mL del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia*, utilizado como desinfectante natural para un tiempo de 30 minutos, que estadísticamente sugiere que es el mejor tratamiento a utilizarse y que es el tiempo que influye más que las concentraciones utilizadas en la desinfección de las superficies lisas de las mesas que expenden pollos beneficiados en la casona del Mercado Belén.

Además de la explicación estadística, se realizó un análisis de las reducciones logarítmicas, como se puede observar en la Tabla 30 y Fig 16, que compara las reducciones logarítmicas del recuento de Mésofilos Aerobios Viables (con tratamientos) con un recuento inicial sin aplicación de ningún tratamiento (control negativo) y el control positivo (hipoclorito de sodio), encontrando que las reducciones de los tratamientos se encuentran dentro del rango del 99,9% para todas las concentraciones en un tiempo de 15 minutos, que de acuerdo a (González, 2016), debe ser mínimo a 3 reducciones logarítmicas para comprobar la eficacia de sanitizantes en el menos tiempo posible. Como trabajo inicial de la comprobación del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* como desinfectante natural, se considera que debe realizarse más

pruebas con las fracciones de baja y alta polaridad del extracto y aumentar las concentraciones a trabajar, sin embargo, las CMI del extracto con las diversas bacterias estudiadas están entre 2 y 8 mg/mL y las CMB entre 32 y 128 mg/mL, razón por la que se decidió trabajar con las concentraciones 16, 32 y 64 mg/mL. Es necesario comprobar concentraciones más altas, valorando la toxicidad, y buscar la concentración y el tiempo adecuado para lograr una reducción logarítmica igual o mayor al control positivo.

CAPITULO VI: CONCLUSIONES

El tamizaje fitoquímico cualitativo del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* muestra triterpenos, esteroides, fenoles, taninos, alcaloides, lactonas y cumarinas.

La actividad antimicrobiana del extracto mediante disco difusión muestra en su mayoría, resultados intermedios para *Enterococcus faecalis* ATCC 19212, *Escherichia coli* ATCC 25922 y 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 25613; sensible para *Staphylococcus aureus* ATCC 25925 y resistente a *Salmonella tiphymurium* ATCC 14028.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) para *Enterococcus faecalis* ATCC 19212, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y 25613 es moderadamente activo; e inactivo para *Escherichia coli* ATCC 25922, 35218 y *Salmonella tiphymurium* ATCC 14028.

La concentración mínima bactericida (CMB) es 32 mg/mL para *Enterococcus faecalis* ATCC 19212 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, 64 mg/mL para *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomona Aeruginosa* ATCC 27853 y 128 mg/mL para *Escherichia coli* ATCC 35218 mg/mL y *Staphylococcus aureus* ATCC 25613 respectivamente.

La actividad antimicrobiana *in vivo* del extracto etanólico como desinfectante natural, muestra alta significancia estadística ($p < 0.01$) para tiempo de desinfección de 30 minutos a una concentración de 16 mg/mL sobre el recuento de mesófilos aerobios viables (UFC/cm²) en las superficies aplicadas.

El recuento de mesófilos aerobios viables de las superficies aplicadas con el extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* muestran el 99,9% de eficacia para todas las concentraciones a un tiempo de 15 minutos.

CAPITULO VI: RECOMENDACIONES

Realizar el perfil de compuesto químicos cuantitativos del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia*.

Realizar el fraccionamiento del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* para obtener los componentes activos y realizar los ensayos de la actividad antimicrobiana para determinar con exactitud el principio activo que está involucrado en el proceso de desinfección, para mejorar la eficacia desde 4 a más reducciones logarítmicas (mayor o igual a 99,99%).

Formular un desinfectante natural con el extracto etanólico que contenga solo un diluyente idóneo y aplicar la metodología de Dilución Neutralización para probar la eficacia *in vitro* frente a cepas microbianas estandarizadas y posteriormente trabajar *in vivo* con cepas aisladas de las superficies vivas e inertes a nivel de Laboratorio para controlar la población en superficies similar a los utilizados. Para complementar con ensayos de toxicidad.

Realizar búsqueda de otras plantas de la región que pueden utilizarse como posibles desinfectantes.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abadie, R., Medina, R., Ruiz, L., & Tresierra-Ayala, A. (2014). *Actividad antibacteriana de extractos vegetales frente a cepas Antibacterial activity of plant extracts against nosocomial strains* ,. 31–38.
https://revistaeciperu.com/wp-content/uploads/2016/08/5eci2014i18ricardoabadie_aktividadantibacteriana.pdf
- Ali, I., Naz, R., Khan, W. N., Gul, R., & Choudhary, M. I. (2009). Biological screening of different root extracts of *Euphorbia wallichii*. *Pakistan Journal of Botany*, 41(4), 1737–1741. <https://www.mdpi.com/1420-3049/13/2/405>
- Ali, M. S., Ahmed, S., & Saleem, M. (2008). Spirowallichione: A rearranged multiflorane from *Euphorbia wallichii* Hook F. (Euphorbiaceae). *Molecules*, 13(2), 405–411. <https://doi.org/10.3390/molecules13020405>
- Amaral, A. C. F., Kuster, R. M., Gonçalves, J. L. S., & Wigg, M. D. (1999). Antiviral investigation on the flavonoids of *Chamaesyce thymifolia*. *Fitoterapia*, 70(3), 293–295. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(99\)00008-8](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(99)00008-8)
- Arenas, M., Saravia, G. De, & Paz, D. (2007). Plantas Con Actividad Biocida De Aplicación En El Control Del Biodeterioro Que Afecta Al Patrimonio Cultural. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 6(6), 323–324.
- Ávalos García, A., & Pérez-Urria Carril, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119–145.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191–203.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
- Benítez-Benítez, R., Sarria-Villa, R. A., Gallo-Corredor, J. A., Pérez Pacheco, N. O., Álvarez Sandoval, J. H., & Giraldo Aristizabal, C. I. (2020). Obtención y rendimiento del extracto etanólico de dos plantas medicinales. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 15(1), 31–40.
<https://doi.org/10.18359/rfcb.3597>
- Berk, Z. (2018). Cleaning, disinfection, and sanitation. In Z. Berk (Ed.), *Food Process Engineering and Technology* (Third edit, pp. 643–656).

- <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812018-7.00028-2>
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. In *Nutrition Reviews* (Vol. 56, Issue 11, pp. 317–333). <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>
- Campana, R., Casettari, L., Fagioli, L., Cespi, M., Bonacucina, G., & Baffone, W. (2017). Activity of essential oil-based microemulsions against *Staphylococcus aureus* biofilms developed on stainless steel surface in different culture media and growth conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.021>
- Castro, D., Diaz, J., Serna, R., Martínez, M., Urrea, P., Muñoz, K., & Osorio, E. (2013). *Cultivo y producción de plantas aromáticas y medicinales* (D. Castro (ed.); Segunda). Fondo Editorial Universidad Católica de Oriente.
- Cavaliere, S. (2005). *Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana* (M. Coyle (ed.)). <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2005/susceptibilidad-antimicrobiana-manual-pruebas-2005.pdf>
- Chorianopoulos, N. G., Giaouris, E. D., Skandamis, P. N., Haroutounian, S. A., & Nychas, G. J. E. (2008). Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: Bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid-base sanitizers. *Journal of Applied Microbiology*, 104(6), 1586–1596. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03694.x>
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2022). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. (32nd ed.). <http://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI M100 ED32:2022&scope=user>
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). (2012). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard — Ninth Edition* (Vol. 32, Issue 2). www.clsi.org
- CLSI. (2018). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard—Eleventh Edition*. *Clinical and Laboratory Standards Institute*. 38(1), 2162–2914.
- Codex Alimentarius. (2020). *Principios Generales de Higiene de los alimentos - CXC 1-1969*. FAO, OMS. <http://www.fao.org/fao-who->

codexalimentarius/codex-texts/codes-of-practice/es/

- De Souza, M. C., & Da Silva, O. L. (2021). New record of *Euphorbia thymifolia* L. (Euphorbiaceae) from the state of Acre, Brazil. *Check List the Journal of Biodiversity Data*, 17(1), 137–144. <https://doi.org/10.15560/17.1.137>
- Departamento de Botánica, & Instituto de Biología (IBUNAM). (2011). *Euphorbia thymifolia* Linn. SpringerReference. https://doi.org/10.1007/springerreference_68541
- Domingo, D., & López-Brea, M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. In *Revista Española de Quimioterapia* (Vol. 16, Issue 4, pp. 385–393). https://seq.es/wp-content/uploads/2008/08/seq.es_seq_0214-3429_16_4_385.pdf
- Ernst, M., Grace, O. M., Saslis-Lagoudakis, C. H., Nilsson, N., Simonsen, H. T., & Rønsted, N. (2015). Global medicinal uses of *Euphorbia* L. (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 176, 90–101. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2015.10.025>
- Estrada, S. (2010). Determinación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*) y Tomillo (*Thymus vulgaris*) [Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. In *Tesis de Grado*. <http://dspace.esepoch.edu.ec/handle/123456789/699>
- Fakim, A. G. (1990). Medicinal plants of Mauritius. *Pharmaceutical Biology*, 28(4), 297–308. <https://doi.org/10.3109/13880209009082837>
- Falcó, I., Verdeguer, M., Aznar, R., Sánchez, G., & Randazzo, W. (2019). Sanitizing food contact surfaces by the use of essential oils. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 51(November 2017), 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.02.013>
- Farha, A. K., Yang, Q. Q., Kim, G., Zhang, D., Mavumengwana, V., Habimana, O., Li, H. Bin, Corke, H., & Gan, R. Y. (2020). Inhibition of multidrug-resistant foodborne *Staphylococcus aureus* biofilms by a natural terpenoid (+)-nootkatone and related molecular mechanism. *Food Control*, 112(February), 107154. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107154>
- Garipelli, N., Runja, C., Potnuri, N., & Pigili, R. (2012). Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of Ethanolic Extract of *Euphorbia thymifolia* Linn Whole Plant. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(3), 516–519. <https://www.researchgate.net/profile/Nagaraju->

Potnuri/publication/328382894_ANTI-INFLAMMATORY_AND_ANTI-OXIDANT_ACTIVITIES_OF_ETHANOLIC_EXTRACT_OF_EUPHORBIA_THYMIFOLIA_LINN_WHOLE_PLANT/links/5bc9ba5f92851cae21b2449d/ANTI-INFLAMMATORY-AND-ANTI-OXIDANT-ACTIV

- Göhre, A., Toto-Nienguesse, Á. B., Futuro, M., Neinhuis, C., & Lautenschläger, T. (2016). Plants from disturbed savannah vegetation and their usage by Bakongo tribes in Uíge, Northern Angola. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 12(1), 1–28. <https://doi.org/10.1186/S13002-016-0116-9/TABLES/3>
- Gonzales, A. (2004). *Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas*. Universidad Nacional de Colombia.
- González, P. (2016). Guía General para la realización y presentación de ensayos de eficacia de productos desinfectantes y sanitizantes de uso sanitario y doméstico. In *Departamento Salud Ambiental Unidad de Plaguicidas y Desinfectantes* (Vol. 1, pp. 3–18). Ministerio de Salud. https://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2018/05/Guía Eficacia Productos desinfectantes-versión 2016_0.pdf
- Gui Ferreira, A., & Aquila, E. M. E. A. (2000). Alelopatia: Uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 12(SPEC. ISS.), 175–204. <https://www.uv.mx/personal/tcarmona/files/2010/08/Gui-y-Alvez-19991.pdf>
- Gupta, B., Srivastava, R. S., & Goyal, R. (2007). Therapeutic uses of Euphorbia thymifolia: A review. *Pharmacognosy Reviews*, 1(2), 299–304.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572–584. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5)
- Hernández-Alvarado, J., Zaragoza-Bastida, A., López-Rodríguez, G., Peláez-Acero, A., Olmedo-Juárez, A., Rivero-Perez, N., Hernández-Alvarado, J., Zaragoza-Bastida, A., López-Rodríguez, G., Peláez-Acero, A., Olmedo-Juárez, A., & Rivero-Perez, N. (2018). Actividad antibacteriana y sobre nematodos gastrointestinales de metabolitos secundarios vegetales: enfoque en Medicina Veterinaria. *Abanico Veterinario*, 8(1), 14–27. <https://doi.org/10.21929/abavet2018.81.1>

- Hernández-Sampieri, R., & Mendoza, C. P. (2018). Metodología de la Investigación. Las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta. In *universidad tecnologica laja Bajio*. McGraw Hill Education.
<http://repositorio.uasb.edu.bo:8080/handle/54000/1292>
- Holah, J. (2018). Cleaning and Disinfection Objectives. In *Reference Module in Food Science*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.21203-1>
- Holah, J., West, S., & McHardy, M. (2016). Hygiene Requirements in Food Service. In H. Lelieveld, J. Holah, & D. Gabrić (Eds.), *Handbook of Hygiene Control in the Food Industry: Second Edition* (Second Edi, pp. 205–219). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100155-4.00015-7>
- IMET-ESSALUD. (2007). *Protocolo de Estudio de la Actividad Antimicrobiana* (p. 15).
- INACAL. (2020). *Guía para la limpieza y desinfección de manos y superficies*. https://www.inacal.gob.pe/repositorioaps/data/1/1/2/not/inacal-aprueba-guia-limpieza-desinfeccion-manos/files/Paginas_Guia_ed.pdf
- Irma, M. U. (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 dilucion "in use" en laboratorios Bagó de Bolivia S.A.* Universidad Mayor de San Andrés.
- Kane, S. R., Mohite, S. K., & Shete, J. S. (2009). Antihelmintic activity of aqueous and methanolic extracts of *Euphorbia thymifolia* Linn. *International Journal of PharmTech Research*, 1(3), 666–669.
- Karampoula, F., Giaouris, E., Deschamps, J., Doulgeraki, A. I., Nychas, G. J. E., & Dubois-Brissonnet, F. (2016). Hydrosol of *Thymbra capitata* is a highly efficient biocide against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(17), 5309–5319.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01351-16>
- Kuklinski, C. (2000). *Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Ediciones Omega.
<https://tuclubdefarmacia.blogspot.com/2016/02/libro-de-farmacognosia-claudia-kuklinski.html>
- Kusumaningrum, H. D., Van Asselt, E. D., Beumer, R. R., & Zwietering, M. H. (2004). A quantitative analysis of cross-contamination of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. via domestic kitchen surfaces. *Journal of Food*

- Protection*, 67(9), 1892–1903. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.9.1892>
- Lee, S. H., Tanaka, T., Nonaka, G. ichiro, & Nishioka, I. (1990). Hydrolysable tannins from *Euphorbia thymifolia*. *Phytochemistry*, 29(11), 3621–3625. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)85288-Q](https://doi.org/10.1016/0031-9422(90)85288-Q)
- Lin, C. C., Cheng, H. Y., Yang, C. M., & Lin, T. C. (2002). Antioxidant and antiviral activities of *Euphorbia thymifolia* L. *Journal of Biomedical Science*, 9(6 Pt 2), 656–664. <https://doi.org/10.1159/000067281>
- Lock, O. (2016). *Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales* (Tercera Ed). PUCP.
- López-Aguirre, S., Pinos-Rodríguez, J. M., Álvarez-Fuentes, G., García-López, J. C., & Méndez-Cortés, H. (2020). Uso potencial de extractos de Creosote bush (*Larrea tridentata*) como desinfectante sobre *Salmonella typhimurium* en instalaciones avícolas. *Información Técnica Económica Agraria*, 116, 294–305. <https://doi.org/10.12706/itea.2020.004>
- Mali, P. Y., & Panchal, S. S. (2013). A review on phyto-pharmacological potentials of *Euphorbia thymifolia* L. *Ancient Science of Life*, 32(3), 165. <https://doi.org/10.4103/0257-7941.123001>
- Maturin, L., & Peeler, J. (n.d.). *BAM Capítulo 3: Recuento de placas aeróbicas | FDA*. Food & Drug Administration (FDA) - Bacteriological Analytical Manual (BAM). Retrieved April 27, 2021, from <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-3-aerobic-plate-count>
- Meireles, A., Giaouris, E., & Simões, M. (2016). Alternative disinfection methods to chlorine for use in the fresh-cut industry. *Food Research International*, 82, 71–85. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.021>
- Microbiologics. (2018). *PI.194.SPAN.EU REV C* (pp. 1–6). https://www.microbiologics.com/core/media/media.nl?id=529&c=915960&h=1cc0630194d83cefcdb&_xt=.pdf
- Reglamento Sanitario de Funcionamiento de Mercados de Abasto, Pub. L. No. Resolución Ministerial N°282-2003-SA/DM, 49 (2003). <https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2016/03/RM-282-2003-MINSA-Funcionamiento-mercados-de-abasto.pdf>
- MINSA. (2007). Guía Técnica para el Análisis Microbiológico de Superficies en contacto con Alimentos y Bebidas. In *Diario Oficial El Peruano*. <https://www.gob.pe/institucion/minsa/normas-legales/249695-461-2007-minsa>

- Motarjemi, Y. (2016). The Starting Point: What Is Food Hygiene? In H. Lelieved, J. Holah, & D. Gabric (Eds.), *Handbook of Hygiene Control in the Food Industry: Second Edition* (Second edi, pp. 1–11). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100155-4.00001-7>
- Muthumani, G. D., Anand, A. V., & Manikandan, R. (2013). Antioxidant, antihelminthic and antimicrobial activity of *Euphorbia thymifolia* Linn whole plant. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2(1), 66–75. [http://www.ijcmas.com/Archives/vol-2/PDF/G.Duraimuthumani, et al.pdf%5Cnhttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=cagh&AN=20133422797%5Cnhttp://oxfordsfx.hosted.exlibrisgroup.com/oxford?sid=OVID:caghdb&id=pmid:&id=doi:&issn=2319](http://www.ijcmas.com/Archives/vol-2/PDF/G.Duraimuthumani,etal.pdf%5Cnhttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=cagh&AN=20133422797%5Cnhttp://oxfordsfx.hosted.exlibrisgroup.com/oxford?sid=OVID:caghdb&id=pmid:&id=doi:&issn=2319)
- Navarrete, N., Pita-Ospina, E., Sánchez, R., Giraldo, S., & Bernal, M. (2020). Actividad in vitro de los extractos etanólicos de *Lantana camara* L., *Petiveria alliacea* L. y *Lippia dulcis* T. frente a bacterias patógenas. *Nova*, 18(33), 53–71. <https://doi.org/10.22490/24629448.3700>
- OMS. (2016). *OMS | Enfermedades de transmisión alimentaria*. Enfermedades de Transmisión Alimentaria. https://www.who.int/topics/foodborne_diseases/es/OPS/OMS.
- OPS/OMS. (2015). *OPS/OMS Paraguay - Los alimentos insalubres causan más de 200 enfermedades*. https://www.paho.org/per/index.php?option=com_content&view=article&id=2924:los-alimentos-insalubres-causan-mas-200-enfermedades&Itemid=900
- Ordaz, G., Armas, H. D., Yáñez, D., Hernández, J., & Camacho, A. (2010). Metabolitos secundarios, letalidad y actividad antimicrobiana. *Biología Tropical*, 58(June), 677–688.
<https://www.scielo.sa.cr/pdf/rbt/v58n2/a12v58n2.pdf>
- Perez, E., Barrera, C., & Castelló, L. (2017). Métodos para la desinfección en la industria alimentaria. *Universidad Politécnica de Valencia*, 1, 1–5.
<https://riunet.upv.es/handle/10251/84175>
- Ríos, M., & Flores, J. (2016). *Actividad antibacteriana de Chasmaesyce thymifolia frente a Staphylococcus aureus, Pseudomona aeruginosa y Escherichia coli por el método de Macrodilución y Difusión en Agar*. (Vol. 954, Issue 011) [Universidad Nacional de la Amazonía Peruana].
https://repositorio.unapiquitos.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12737/3854/Marcos_Tesis_Titulo_2016.pdf?sequence=1&isAllowed=y

- Roumy, V., Ruiz, L., Ruiz Macedo, J. C., Gutierrez-Choquevilca, A. L., Samaillie, J., Encinas, L. A., Mesia, W. R., Ricopa Cotrina, H. E., Rivière, C., Sahrpaz, S., Bordage, S., Garçon, G., Dubuisson, J., Anthérieu, S., Seron, K., & Hennebelle, T. (2020). Viral hepatitis in the Peruvian Amazon: Ethnomedical context and phytomedical resource. *Journal of Ethnopharmacology*, 255(March), 112735. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112735>
- Royal Botanic Gardens Kew. (n.d.). *Euphorbia thymifolia* L. Plants of the World Online | Kew Science. Retrieved April 16, 2022, from <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:102034-2>
- Sacsquispe, R., & Velásquez, J. (2002). *Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión*. (A. Palacios (ed.)). <https://repositorio.ins.gob.pe/handle/INS/827>
- Secretaría de Salud. (1994). *NORMA Oficial Mexicana NOM-093-SSA1-1994. Bienes y servicios. Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos*. Diario Oficial de Federación (DOF). http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4882432&fecha=04/10/1995#:~:text=El control sanitario en la,el establecimiento de las disposiciones
- Shi, Q.-W., Su, X.-H., & Kiyota, H. (2008). Chemical and Pharmacological Research of the Plants in Genus *Euphorbia*. *Chemical Reviews*, 108(10), 4295–4327. <https://doi.org/10.1021/cr078350s>
- Suroowan, S., Pynee, K. B., & Mahomoodally, M. F. (2019). A comprehensive review of ethnopharmacologically important medicinal plant species from Mauritius. *South African Journal of Botany*, 122, 189–213. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.03.024>
- Swamy, M. K., Akhtar, M. S., & Sinniah, U. R. (2016). Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: An updated review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/3012462>
- Troya, J. (2007). Evaluación de la efectividad de los desinfectantes Divosan Forte Y Mh en la desinfección de equipos y áreas de trabajo en una empresa procesadora de helados [Pontificia Universidad Javeriana]. In *Pontificia Universidad Javeriana*. <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis280.pdf>

- Valencia, P. (2017). *Evaluación de la eficacia de los procesos de limpieza y desinfección en la gestión de saneamiento de los laboratorios del Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico de la UDES Campus Cúcuta* [Universidad de Santander]. <https://repositorio.udes.edu.co/handle/001/4163>
- Vasas, A., Rédei, D., Csupor, D., Molnár, J., & Hohmann, J. (2012). Diterpenes from European Euphorbia species serving as prototypes for natural-product-based drug discovery. *European Journal of Organic Chemistry*, 27, 5115–5130. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201200733>
- Vázquez-Sánchez, D., Galvão, J. A., Mazine, M. R., Gloria, E. M., & Oetterer, M. (2018). Control of Staphylococcus aureus biofilms by the application of single and combined treatments based in plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 286(August), 128–138. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.007>
- Vetas, D., Dimitropoulou, E., Mitropoulou, G., Kourkoutas, Y., & Giaouris, E. (2017). Disinfection efficiencies of sage and spearmint essential oils against planktonic and biofilm Staphylococcus aureus cells in comparison with sodium hypochlorite. *International Journal of Food Microbiology*, 257(January), 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.003>
- Vidács, A., Kerekes, E., Rajkó, R., Petkovits, T., Alharbi, N. S., Khaled, J. M., Vágvölgyi, C., & Krisch, J. (2018). Optimization of essential oil-based natural disinfectants against Listeria monocytogenes and Escherichia coli biofilms formed on polypropylene surfaces. *Journal of Molecular Liquids*, 255, 257–262. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.01.179>
- Walsh, D. J., Livinghouse, T., Goeres, D. M., Mettler, M., & Stewart, P. S. (2019). Antimicrobial Activity of Naturally Occurring Phenols and Derivatives Against Biofilm and Planktonic Bacteria. *Frontiers in Chemistry*, 7(October), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00653>
- World Checklist of Selected Plant Families (WCSP). (2016). *Euphorbia thymifolia* L. Royal Botanic Gardens - Kew Science. https://wcsp.science.kew.org/synonymy.do?name_id=82529
- Yu, J., Lei, J., Yu, H., Cai, X., & Zou, G. (2004). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Scutellaria barbata. *Phytochemistry*, 65(7), 881–884. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.02.005>

Zagaceta, J. (2017). *Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de hojas de Chamaesyce thymifolia frente a cepas bacterianas por los métodos de difusión en agar y macrodilución. Iquitos, 2017.* [Universidad Nacional de la Amazonía Peruana].

https://repositorio.unapiquitos.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12737/5434/Javier_Tesis_Titulo_2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Zwenger, S., & Basu, C. (2008). Plan terpenoids: applications and future potentials. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 3(1), 1–007.

<https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cmc/2013/00000020/00000007/art00008>

ANEXOS

ANEXO 1: Constancia de Identificación Taxonómica de la muestra vegetal.



UNAP

Centro de Investigación de
Recursos Naturales
Herbarium Amazonense — AMAZ

INSTITUCIÓN CIENTÍFICA NACIONAL DEPOSITARIA DE MATERIAL BIOLÓGICO
CÓDIGO DE AUTORIZACIÓN AUT-ICND-2017-005

CONSTANCIA n.º 037-2021-AMAZ-UNAP

El Coordinador del Herbarium Amazonense (AMAZ) del CIRNA, de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana

HACE CONSTAR:

Que, la muestra botánica presentada por **JOSELYN LOURDES SÁNCHEZ MATOS** y **LEDY MIRELLA CARO CASANOVA**, bachilleres de la Escuela Profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias de la Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana pertenece a la tesis de pre grado titulado "EVALUACIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Chamaesyce thymifolia* COMO SOLUCIÓN DESINFECTANTE NATURAL EN SUPERFICIES INERTES EN CONTACTO CON ALIMENTOS" ha sido **DETERMINADA** en este Herbarium Amazonense (AMAZ), del Centro de Investigación de Recursos Naturales (CIRNA), de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP), como a continuación se indica:

Nº	FAMILIA	ESPECIE	AUTOR
1	EUPHORBIACEAE	<i>Chamaesyce thymifolia</i>	(L.) Millsp.

Determinador: Ing. Juan Celidonio Ruiz Macedo

A los diecinueve días del mes de octubre de dos mil veintiuno, se expide la presente constancia a la interesada para los fines que se estime conveniente.

Atentamente,


Richard J. Huaranca Acostupa
Coordinador Herbarium



ANEXO 2: Proceso de Obtención del Extracto Etanólico de *Chamaesyce thymifolia*.



Planta seca de *Chamaesyce thymifolia*



Molienda de *Chamaesyce thymifolia*



Chamaesyce thymifolia macerado en etanol



Filtración del macerado de *Chamaesyce thymifolia*



Preparando el macerado etanólico de *Chamaesyce thymifolia* para concentrar.



Concentración del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* utilizando el rotavapor



Extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia*

ANEXO 3: Etapas de trabajo de la Actividad Antibacteriana por el método de Disco Difusión (Kirby Bauer).

1. Preparación del Inóculo



Preparación del inóculo con las cepas activadas, tomando colonias aisladas y diluidas en cloruro de sodio al 0.9%.

2. Comparación del inóculo con el estándar de McFarland



Comparación de la turbidez del inóculo bacteriano con la escala 0.5 de McFarland, indicando que la suspensión bacteriana tiene 1×10^8 CFU/mL de microorganismos.

3. Dilución de extractos y preparación de los discos



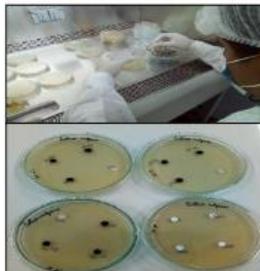
Se pesaron los extractos de acuerdo a las concentraciones deseadas, para luego ser diluidas con una mezcla de etanol/agua (1:1). Con una micropipeta, se colocaron 15 μ L de las soluciones de extracto preparadas en discos de papel Whatman (previamente esterilizados).

4. Inoculación de agar con la suspensión bacteriana



Con una micropipeta se inoculó la placa de agar Mueller Hinton con 100 μ L de la suspensión bacteriana, y con una espátula de Drigalsky se esparció por toda la superficie del agar, y se dejó reposar por 5 minutos.

5. Aplicación de los discos



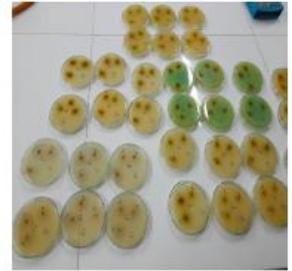
Con ayuda de puntas y/o pinzas estériles, se procedió a aplicar los discos con las diferentes concentraciones del extracto.

6. Incubación



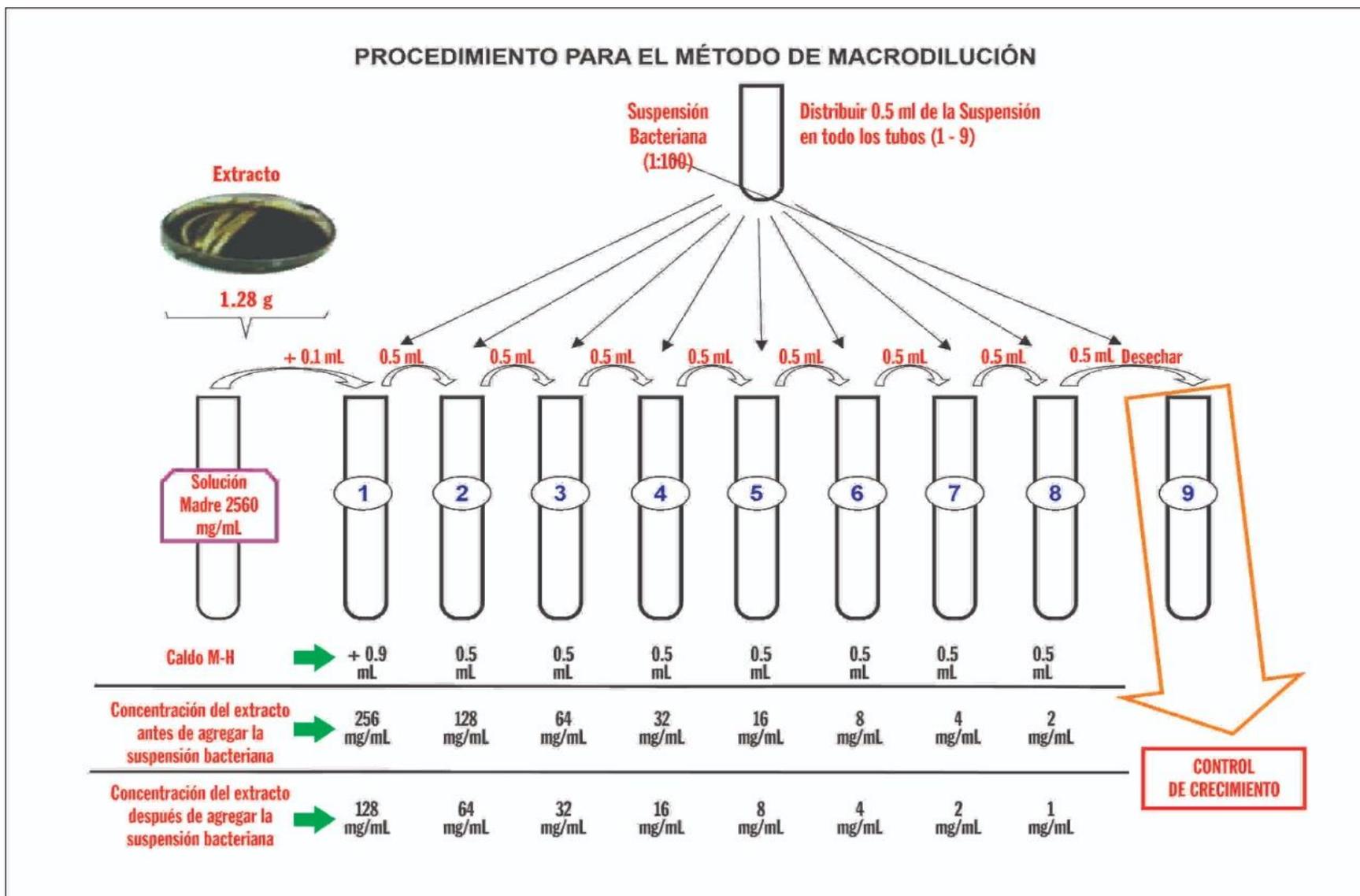
Las placas con discos fueron invertidas y llevadas a la incubadora, a 37°C por 24 horas.

7. Lectura de placas

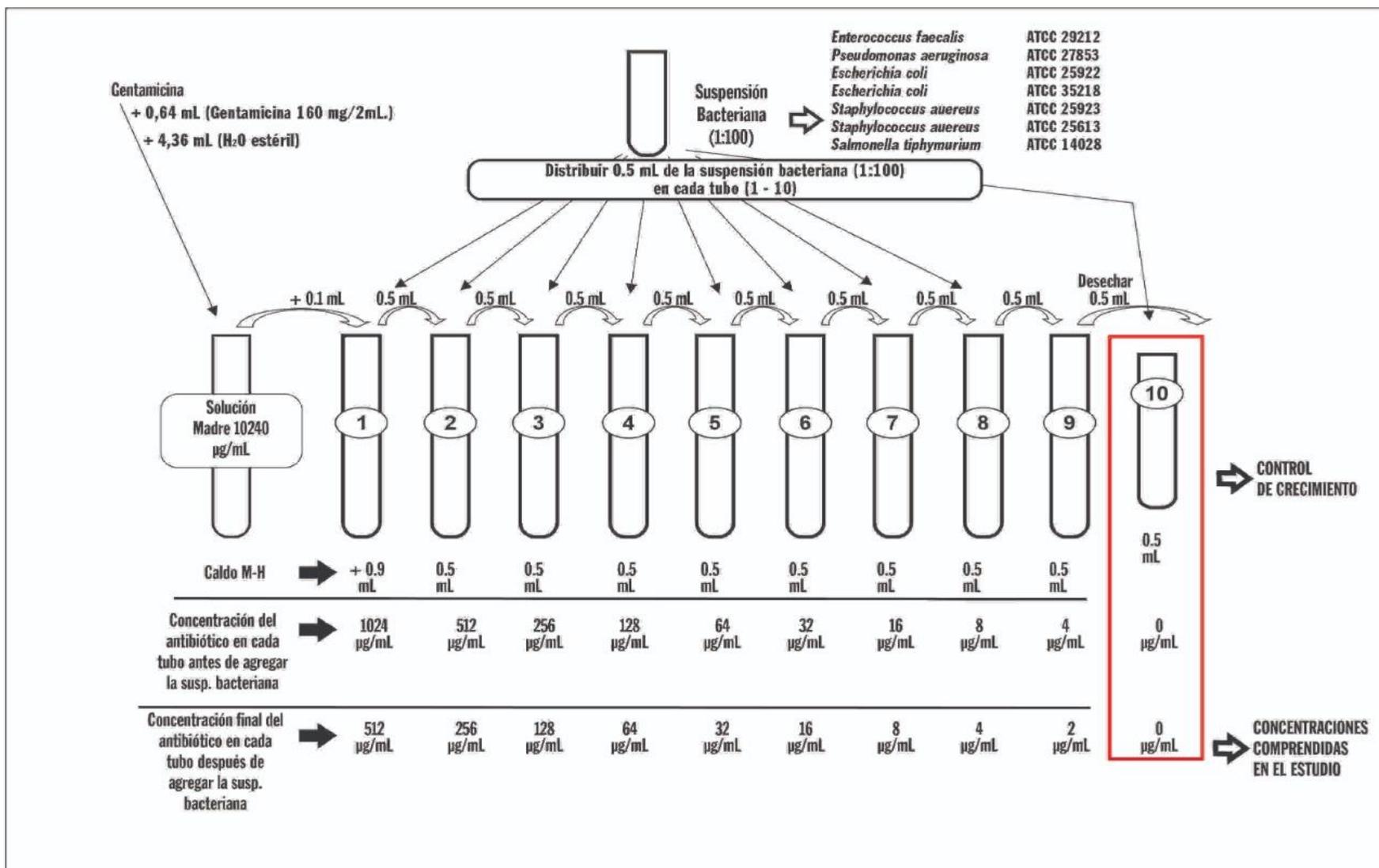


Con la ayuda de un vernier, se hizo la lectura de los halos de inhibición.

ANEXO 4: Esquema de Macrodilución del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia*.



ANEXO 5: Esquema del Control Positivo de Macrodilución.



ANEXO 6: Protocolo del Método del Hisopado según la Resolución Ministerial N°461-2007/MINSA – “Guía Técnica para el Análisis Microbiológico de Superficies en contacto con Alimentos y Bebidas”.

El Peruano Lima, jueves 7 de junio de 2007	 NORMAS LEGALES	346583
<p>como Jefe del Instituto de Desarrollo de Recursos Humanos, por las razones expuestas en la parte considerativa de la presente Resolución, dándosele las gracias por los servicios prestados.</p>	<p>SE RESUELVE:</p>	
<p>ALAN GARCÍA PÉREZ Presidente Constitucional de la República</p>	<p>Artículo 1°.- Aprobar la “Guía Técnica para el Análisis Microbiológico de Superficies en contacto con Alimentos y Bebidas”, que consta catorce (14) folios y que forma parte integrante de la presente resolución.</p>	
<p>Aprueban “Guía Técnica para el Análisis Microbiológico de Superficies en contacto con Alimentos y Bebidas”</p>	<p>Artículo 2°.- La Oficina General de Comunicaciones publicará la mencionada Guía Técnica en el Portal del Internet del Ministerio de Salud.</p>	
<p>RESOLUCIÓN MINISTERIAL N° 461-2007/MINSA</p>	<p>Regístrese, comuníquese y publíquese.</p>	
<p>Lima, 5 de junio del 2007</p>	<p>CARLOS VALLEJOS SOLOGUREN Ministro de Salud</p>	
<p>Visto: el Expediente N° 06-066910-001, que contiene el Memorandum N° 8358-2006-DG/DIGESA, presentado por la Dirección General de Salud Ambiental;</p>	<p>69199-1</p>	
<p>CONSIDERANDO:</p>	<p>Aprueban Documento Técnico: Plan Nacional de Prevención y Control de la Transmisión Madre Niño del VIH y Sífilis</p>	
<p>Que, el Artículo 92° de la Ley N° 26842, Ley General de Salud dispone que la Autoridad de Salud de nivel nacional es la encargada del control sanitario de los alimentos y bebidas;</p>	<p>RESOLUCIÓN MINISTERIAL N° 463-2007/MINSA</p>	
<p>Que, el Artículo 2° del Reglamento sobre Vigilancia y Control Sanitario de Alimentos y Bebidas, aprobado por Decreto Supremo N° 007-98-SA dispone que todo alimento y bebida o materia prima debe responder a sus caracteres organolépticos, composición química y condiciones microbiológicas;</p>	<p>Lima, 5 de junio del 2007</p>	
<p>Que, mediante Resolución Ministerial N° 410-2006/MINSA del 2 de mayo de 2006, dispuso que la Oficina General de Comunicaciones publique en el portal de internet del Ministerio de Salud, hasta por un período de treinta (30) días naturales, el proyecto de la Guía Técnica sobre Criterios y Procedimientos para el Examen Microbiológico de Superficies en relación con Alimentos y Bebidas, para recepcionar las sugerencias o recomendaciones que pudieran contribuir a su perfeccionamiento;</p>	<p>Visto: el Expediente N° 07-043201-DGSP/MINSA;</p>	
<p>Que, habiendo culminado dicho plazo, el grupo técnico conformado por representantes de las Direcciones de Salud, Centro Nacional de Alimentación y Nutrición del Instituto Nacional de Salud, Certificaciones del Perú y Laboratorios acreditados, han evaluado y consolidado las sugerencias o recomendaciones presentadas por los recurrentes;</p>	<p>CONSIDERANDO:</p>	
<p>Que, el citado proyecto de Guía Técnica, propone regular un aspecto técnico normativo, estandarizando y uniformizando los procedimientos que se deben aplicar en la selección, toma de muestras y ensayos microbiológicos, estableciendo los límites microbiológicos destinados a evaluar las condiciones higiénicas sanitarias de las superficies vivas e inertes que entran en contacto con los alimentos y bebidas;</p>	<p>Con la opinión favorable de la Dirección General de Salud Ambiental;</p>	
<p>Con la opinión favorable de la Dirección General de Salud Ambiental;</p>	<p>Con el visado del Viceministro de Salud, la Directora General de Salud Ambiental y el Director General de la Oficina General de Asesoría Jurídica; y,</p>	
<p>Con el visado del Viceministro de Salud, la Directora General de Salud Ambiental y el Director General de la Oficina General de Asesoría Jurídica; y, De conformidad con lo previsto en el Artículo 8° literal b) de la Ley N° 27657, Ley del Ministerio de Salud;</p>	<p></p>	

7.2. Selección del método de muestreo

La selección del método de muestreo debe estar en función de las características de la superficie a muestrear.

MÉTODO DE MUESTREO	SUPERFICIES A MUESTREAR
Método del Hisopo	Se utiliza para superficies inertes regulares e irregulares, tales como tabla de picar, bandejas, mesas de trabajo, utensilios, cuchillas de equipos, cortadora de embutidos, cortadora de pan de molde, fajas transportadoras, tolvas, mezcladoras, pisos, paredes y otros.
Método de la Esponja	El método de la esponja se utiliza preferentemente para muestrear superficies de mayor área.
Método del Enjuague	Se utiliza para superficies vivas (manos) y para objetos pequeños o para el muestreo de superficies interiores de envases, botellas, bolsas de plástico, etc.

7.3. Procedimiento para la toma de muestra

7.3.1. Método del hisopo

a) Descripción:

Consiste en frotar con un hisopo estéril previamente humedecido en una solución diluyente, el área determinada en el muestreo.

b) Materiales:

- Hisopos de algodón u otro material equivalente, de largo aproximado de 12 cm.
- Tubo de ensayo con tapa hermética conteniendo 10 mL de solución diluyente estéril. Se agregará una solución diluyente con neutralizante como alternativa. (Ver Anexo 1).
- Plantilla estéril, con un área abierta en el centro de 100 cm² (10cm x 10cm) o alternativamente, plantilla estéril, con un área abierta en el centro de 25 cm² (5 cm x 5 cm).
- Guantes descartables de primer uso.
- Protector de cabello.

- Mascarillas descartables.
- Plumón marcador indeleble (para vidrio).
- Caja térmica.
- Refrigerantes.

c) Procedimiento:

1. Colocar la plantilla (10cm x 10cm) sobre la superficie a muestrear.
2. Humedecer el hisopo en la solución diluyente y presionar ligeramente en la pared del tubo con un movimiento de rotación para quitar el exceso de solución.
3. Con el hisopo inclinado en un ángulo de 30°, frotar 4 veces la superficie delimitada por la plantilla, cada una en dirección opuesta a la anterior. Asegurar el hisopado en toda la superficie.
4. En el caso de utilizar la plantilla de 5cm x 5cm, repetir esta operación 3 veces más, en lugares diferentes de la misma superficie, para obtener 100 cm².
5. Colocar el hisopo en el tubo con la solución diluyente, quebrando la parte del hisopo que estuvo en contacto con los dedos del muestreador, la cual debe ser eliminada.
6. Para superficies irregulares, en el caso de utensilios, se repetirá la operación con 3 utensilios más (total 4 como máximo), con el mismo hisopo, considerando el área que está en contacto con el alimento o con la boca.
7. Si no se toman las 4 muestras, se debe anotar en la Ficha de Toma de Muestra.

d) Conservación y Transporte de la muestra

Las muestras se colocarán en un contenedor isotérmico con gel refrigerante, el cual se distribuirá uniformemente en la base y en los laterales, para asegurar que la temperatura del contenedor no sea mayor de 10°C, a fin de asegurar la vida útil de la muestra hasta su llegada al laboratorio. El tiempo de transporte entre la toma de muestra y la recepción en el laboratorio estará en función estricta de dicha temperatura, no debiendo exceder las 24 horas y excepcionalmente las 36 horas.

Se deberá registrar la temperatura del contenedor al colocar las muestras y a la llegada al laboratorio con la finalidad de asegurar que las mismas hayan sido transportadas a la temperatura indicada. Las temperaturas superiores a 10°C invalidan la muestra para su análisis.

8.2. Procedimiento para el control microbiológico con aplicación del método del hisopo

Procedimiento de análisis microbiológicos

Sea por métodos rápidos o convencionales, los ensayos microbiológicos se realizarán utilizando métodos normalizados por organismos internacionales como la Organización Internacional para la Estandarización (ISO: International Organization for Standardization), Métodos Oficiales de Análisis de la Asociación Internacional de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC: Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists International), Administración de Alimentos y Drogas/Manual Analítico Bacteriológico (FDA/BAM: Food and Drug Administration/Bacteriological

Analytical Manual), Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos (ICMSF: International Commission on Microbiological Specifications for Foods), Asociación Americana para la Salud Pública / Compendio de Métodos para el Análisis Microbiológico de Alimentos (APHA/CMMEF: American Public Health Association / Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods), entre otros; utilizando la técnica de recuento en placa.

Cálculo y expresión de resultados

a) Cálculo

Para superficies regulares: el número de colonias obtenidas (ufc) se multiplicará por el factor de dilución y por el volumen de solución diluyente utilizada en el muestreo (10 mL) y se dividirá entre el área de la superficie hisopada o muestreada (100 cm²).

Para superficies irregulares: el número de colonias obtenido (ufc) se multiplicará por el factor de dilución y por el volumen de la solución diluyente usada.

b) Expresión de resultados

Los resultados se expresarán:

- Para superficies regulares en: ufc / cm²;
- Para superficies irregulares en: ufc/ superficie muestreada (ej. cuchilla de licuadora, cuchara, etc.). Se deberá expresar la cantidad de superficies muestreadas. (ej. ufc/ 4 cucharas).

c) Interpretación de resultados de acuerdo a los límites microbiológicos

SUPERFICIES INERTES				
MÉTODO HISOPO	Superficie Regular		Superficie Irregular	
ENSAYO	Límite de Detección del Método	Límite Permisible (*)	Límite de Detección del Método	Límite Permisible (*)
Coliformes totales	< 0,1 ufc / cm ²	< 1 ufc / cm ²	< 10 ufc / superficie muestreada	< 10 ufc / superficie muestreada
Patógeno	Ausencia / superficie muestreada en cm ² (**)	Ausencia / superficie muestreada en cm ² (**)	Ausencia / superficie muestreada	Ausencia / superficie muestreada

(*) En las operaciones analíticas, estos valores son indicadores de ausencia.

(**) Indicar el área muestreada, la cual debe ser mayor o igual a 100 cm².

ANEXO 7: Proceso del trabajo de evaluación del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia in vivo* en las superficies de mesas expendedoras de pollo faenado de la Casona del Mercado Belén.

1. Preparación y esterilización de materiales



- Tubos con Agua Peptonada
- Frascos con Agua Peptonada
- Tubos con Caldo Neutralizante
- Frascos con Caldo Lactosado
- Frascos con Baird Parker
- Matraces con PLate Count
- Placas estériles
- Espátulas Drigalski estériles
- Pipetas de 10 mL estériles

2. Materiales para recojo de muestra



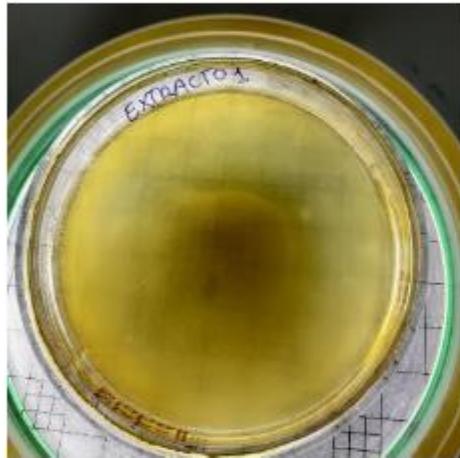
- Mandil, mascarilla, cofia y Guantes estériles.
- Hisopos y plantillas (10x10cm) estériles.
- Marcador indeleble.
- Mechero, fósforo.
- Alcohol, papel
- Bolsa de basura
- Contenedor térmico para traslado las muestra con caldo neutralizante.

3. Aplicación del extracto etanólico de *Chamaesyce thymifolia* e hisopado de las superficies tratadas.



- Colocar la plantilla sobre la superficie que se va a muestrear.
- Sacar el hisopo asépticamente.
- Con el hisopo inclinado, frotar la superficie delimitada por la plantilla en 3 sentidos diferentes (horizontal, vertical y oblicuo).
- Regresar el hisopo al tubo conteniendo caldo neutralizante y romper la parte que estuvo en contacto con los dedos.

4. Cultivo y recuento en agar Plate Count de Mesófilos Aerobios Viabiles del hisopado.



Extracto 1. Concentración 16 mg/mL



Extracto 2. Concentración 32 mg/mL



Extracto 3. Concentración 64 mg/mL

