

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE QUÍMICA



TESIS

COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Tanacetum parthenium* L. DETERMINADO POR CG-MS y SU EFECTO ANTIBACTERIANO FRENTE a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922

PRESENTADA POR:

YUDI SILVIA VILLA HUAMAN

**PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL
DE QUÍMICO**

ASESOR:

Mgt. CIRO TOMAYLLA CRUZ

CUSCO - PERÚ

2026



Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco

INFORME DE SIMILITUD

(Aprobado por Resolución Nro.CU-321-2025-UNSAAC)

El que suscribe, el Asesor Mg. CIRO TOMAYLLA CRUZ
..... quien aplica el software de detección de similitud al
trabajo de investigación/tesis titulada: COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL
DE Tanacetum parthenium L. DETERMINADO POR CG-MS Y SU EFECTO
ANTIBACTERIANO FRENTE a Staphylococcus aureus ATCC 29213 y
Escherichia coli ATCC 25922

Presentado por: YUDY SILVIA VILLA HUAMAN DNI N° 76757797
presentado por: DNI N°:
Para optar el título Profesional/Grado Académico de QUÍMICO

Informo que el trabajo de investigación ha sido sometido a revisión por 2 veces, mediante el
Software de Similitud, conforme al Art. 6° del **Reglamento para Uso del Sistema Detección de**
Similitud en la UNSAAC y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de 9 %.

Evaluación y acciones del reporte de coincidencia para trabajos de investigación conducentes a grado académico o título profesional, tesis

Porcentaje	Evaluación y Acciones	Marque con una (X)
Del 1 al 10%	No sobrepasa el porcentaje aceptado de similitud.	☒
Del 11 al 30 %	Devolver al usuario para las subsanaciones.	☐
Mayor a 31%	El responsable de la revisión del documento emite un informe al inmediato jerárquico, conforme al reglamento, quien a su vez eleva el informe al Vicerrectorado de Investigación para que tome las acciones correspondientes; Sin perjuicio de las sanciones administrativas que correspondan de acuerdo a Ley.	☐

Por tanto, en mi condición de Asesor, firmo el presente informe en señal de conformidad y adjunto las primeras páginas del reporte del Sistema de Detección de Similitud.

Cusco, 30 de enero de 2026


.....
Firma

Post firma CIRO TOMAYLLA CRUZ

Nro. de DNI 40809688

ORCID del Asesor 0000-0001-6921-1250

Se adjunta:

- Reporte generado por el Sistema Antiplagio.
- Enlace del Reporte Generado por el Sistema de Detección de Similitud: **oid:** 27259-550588539

Yudi Silvia Villa Huaman

COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE Tanacetum parthenium L. DETERMINADO POR CG-MS Y SU EF...

 Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::27259:550588539

Fecha de entrega

29 ene 2026, 11:51 a.m. GMT-5

Fecha de descarga

29 ene 2026, 12:28 p.m. GMT-5

Nombre del archivo

YUDI SILVIA VILLA HUAMAN...+docx.docx

Tamaño del archivo

25.6 MB

137 páginas

19.414 palabras

111.213 caracteres

9% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe

- Bibliografía
- Texto citado
- Texto mencionado
- Coincidencias menores (menos de 10 palabras)

Exclusiones

- N.º de coincidencias excluidas

Fuentes principales

- 8%  Fuentes de Internet
- 2%  Publicaciones
- 7%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alerta de integridad para revisión

-  **Texto oculto**
1 caracteres sospechosos en N.º de página
El texto es alterado para mezclarse con el fondo blanco del documento.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

DEDICATORIA

A Dios, por darme la vida, fortaleza y sabiduría en cada paso de este camino.

A mi madre Julia por ser mi pilar más firme y por enseñarme a no rendirme, incluso en los momentos más difíciles.

A mis hermanos Isaac, Alexander y Lis Sandra, por estar siempre presentes, brindándome su apoyo incondicional, sus palabras de ánimo y su confianza en mí.

A mi abuelita Tomasa, por su cariño, sabiduría y oraciones que me han acompañado desde el inicio.

A Elvis Rene, por estar siempre a mi lado, brindándome su compañía y su apoyo incondicional durante este proceso.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por darme la vida, fortaleza y sabiduría para seguir adelante en cada etapa del desarrollo de esta investigación.

A mi asesor de tesis Mgt. Ciro Tomaylla Cruz, por brindarme su tiempo, apoyo, paciencia y su valioso conocimiento científico durante el desarrollo de esta investigación.

A las dictaminantes, Dra. Yolanda Callo Choquevilca y Dra. Aura Natalia Cantero Loaiza, por sus exigencias y correcciones que hicieron posible darle la forma final y el contenido adecuado a esta investigación.

A mis compañeras, quienes me acompañaron durante el desarrollo de este trabajo, por su apoyo constante y por compartir momentos valiosos e inolvidables.

INDICE

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTO.....	II
INDICE.....	III
INDICE DE FIGURAS.....	VI
INDICE DE TABLAS.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
RESUMEN.....	X
ABSTRACT.....	XI
INTRODUCCIÓN.....	XII
CAPITULO I.....	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1
1.1 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA.....	1
1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	2
1.3 PROBLEMAS ESPECIFICOS.....	2
1.4 JUSTIFICACIÓN.....	2
1.5 OBJETIVOS.....	3
1.6 OBJETIVO GENERAL.....	3
1.7 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	3
CAPITULO II.....	4
MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 ANTECEDENTES.....	4
2.2 BASES TEÓRICAS.....	11
2.2.1 La familia Asteraceae y género Tanacetum.....	11
2.2.2 Clasificación taxonomía de Tanacetum parthenium L.....	11
2.2.3 Descripción botánica de la especie Tanacetum parthenium L.....	12
2.2.4 Distribucion geografica de Tanacetum parthenium L.....	13
2.3 ACEITES ESENCIALES.....	13
2.3.1 Monoterpenos.....	14
2.3.2 Sesquiterpenos.....	15
2.3.3 Fenilpropanos.....	16
2.4 METODOS DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL.....	17
2.4.1 Destilación por arrastre de vapor.....	17
2.4.2 Extracción con disolventes.....	19
2.4.3 Extracción con fluidos supercríticos.....	19
2.4.4 Extracción por microondas.....	20
2.4.5 Extracción por el método de enflorado.....	20
2.5 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES.....	20
2.5.1 Densidad.....	20
2.5.2 Índice de refracción.....	21

2.5.3	<i>Rotación óptica</i>	21
2.5.4	<i>Solubilidad</i>	21
2.5.5	<i>Índice de acidez</i>	21
2.5.6	<i>Índice de saponificación</i>	22
2.6	CROMATOGRAFIA DE GASES-ESPECTROMETRIA DE MASAS	22
2.6.1	<i>Cromatografía de gases</i>	22
2.6.2	<i>Espectrometría de masas</i>	23
2.7	BACTERIAS.....	25
2.7.1	<i>Estructuras citoplásmicas</i>	26
2.7.2	<i>Pared celular</i>	26
2.7.3	<i>Efecto antibacteriano</i>	27
2.7.4	<i>Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular</i>	28
2.7.5	<i>Descripción del antibiótico</i>	28
2.7.6	<i>Staphylococcus aureus</i>	31
2.7.7	<i>Escherichia coli</i>	32
2.7.8	<i>Método Kirby-Bauer</i>	33
	HIPÓTESIS	34
	HIPÓTESIS GENERAL	34
	HIPÓTESIS ESPECIFICOS	34
	VARIABLES DE INVESTIGACIÓN	34
	VARIABLE INDEPENDIENTE.....	34
	VARIABLE DEPENDIENTE.....	34
	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	35
	CAPITULO III	36
	METODOLOGÍA	36
3.1	TIPO DE INVESTIGACIÓN	36
3.2	UBICACIÓN GEOGRÁFICA DE LA TOMA DE MUESTRA.....	36
3.2.1	<i>Muestreo</i>	37
3.2.2	<i>Recolección de muestras</i>	37
3.3	LUGAR DE PROCESAMIENTO	38
3.3.1	<i>Identificación taxonómica</i>	38
3.3.2	<i>Autorización de recolección - SERFOR</i>	38
3.4	MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS	38
3.5	DISEÑO EXPERIMENTAL	43
3.5.1	<i>Procedimiento metodológico</i>	43
3.6	PREPARACIÓN DE MUESTRA.....	44
3.7	OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL.....	44
3.8	DETERMINACIÓN DE CARACTERISTICAS FISICOQUÍMICAS DEL ACEITE ESENCIAL	44
3.8.1	<i>Prueba de solubilidad</i>	44
3.8.2	<i>Densidad relativa</i>	45
3.8.3	<i>Índice de refracción</i>	45
3.8.4	<i>Índice de acidez</i>	46
3.8.5	<i>Índice de saponificación</i>	46
3.8.6	<i>Rotación óptica</i>	47
3.9	DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA	48

3.9.1	<i>Cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-MS)</i>	48
3.10	DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO MEDIANTE LA TECNICA DE KIRBY-BAUER.....	49
3.10.1	<i>Elaboración de los medios de cultivo</i>	49
3.10.2	<i>Activación de cepas ATCC</i>	50
3.10.3	<i>Determinación de sensibilidad antibacteriano</i>	50
3.11	ANALISIS ESTADISTICO.....	52
CAPITULO IV.....		53
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		53
4.1	DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL.....	53
4.2	PRUEBAS DE SOLUBILIDAD DEL ACEITE ESENCIAL	54
4.3	DE CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICAS DEL ACEITE ESENCIAL.....	56
4.4	DE COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>TANACETUM PARTHENIUM</i> L.	59
4.5	DE DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO POR EL MÉTODO DEL KIRBY BAUER 68	
CONCLUSIÓN		78
RECOMENDACIONES		79
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....		80
ANEXO 1.....		88
ANEXO 2.....		89
ANEXO 3.....		104
ANEXO 4.....		106
ANEXO 5.....		112
ANEXO 6.....		113
ANEXO 7.....		114
ANEXO 8.....		115
ANEXO 9.....		117
ANEXO 10.....		119
ANEXO 11.....		121

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 <i>Tanacetum parthenium</i> L. de la comunidad Ccorao.....	13
Figura 2 Monoterpenos de aceites esenciales	15
Figura 3 Sesquiterpenos de aceites esenciales	16
Figura 4 Fenilpropanos de aceites esenciales	17
Figura 5 Esquema de un espectrómetro de masas	24
Figura 6 Estructura general de una célula bacteriana	25
Figura 7 Estructura de vancomicina	29
Figura 8 Estructura del ciprofloxacino	31
Figura 9 Ubicación geográfica del distrito de San Sebastián-Ccorao	37
Figura 10 Diagrama de flujo del estudio experimental.....	43
Figura 11 Perfil cromatográfico del aceite esencial de <i>Tanacetum parthenium</i> L.....	59
Figura 12 Componentes mayoritarios del aceite esencial de <i>Tanacetum parthenium</i> L.....	61
Figura 13 Espectro de masas del componente mayoritario del carveol.....	62
Figura 14 Espectro de masas del Borneol.....	65
Figura 15 Diagrama de caja del aceite esencial de <i>Tanacetum parthenium</i> L. frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	70
Figura 16 Diagrama de caja del aceite esencial de <i>Tanacetum parthenium</i> L., frente a <i>Escherichia coli</i>	74
Figura 17 Muestreo de la especie de <i>Tanacetum parthenium</i> L.	89
Figura 18 Preparación de la muestra.....	89
Figura 19 Extracción del aceite esencial por hidrodestilación	90
Figura 20 Obtención del aceite esencial con trampa de Clevenger	90
Figura 21 Pruebas de solubilidad del aceite esencial.....	91
Figura 22 Determinación de la densidad relativa del aceite esencial	91
Figura 23 Determinación del Índice de refracción	92
Figura 24 Determinación del Índice de acidez	92
Figura 25 Reflujo del aceite esencial del índice de saponificación	93
Figura 26 Titulación del índice de saponificación.....	93
Figura 27 Determinación de la rotación óptica.....	94
Figura 28 Preparación del aceite esencial para la corrida en cromatografía de gases	94

Figura 29 Cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas.....	95
Figura 30 Esterilización de materiales.....	95
Figura 31 Elaboración de los medios de cultivo.....	96
Figura 32 Cepa certificada de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	97
Figura 33 Activación de las cepas.....	97
Figura 34 Crecimiento de la cepa activada.....	98
Figura 35 Preparación del inóculo.....	98
Figura 36 Cepas ATCC diluidas en caldo BHI.....	99
Figura 37 Diluciones del aceite esencial de <i>Tanacetum parthenium</i> L., se prepararon en proporciones de 6.25%,25%,50%,75% y 100%.....	99
Figura 38 Sembrado en las placas con agar Mueller Hinton para la determinación de sensibilidad antibacteriano del aceite esencial.....	100
Figura 39 Se realizó tres pozos excavados de 5.5mm de diámetro a una distancia de 22mm...	100
Figura 40 Siembra e inoculación con una micro pipeta en cada pozo excavado a diferentes concentraciones.....	101
Figura 41 Incubación de las placas a 37°C por un periodo de 24 horas y la medición de los halos de inhibición con un Vernier.....	101
Figura 42 Resultados de la evaluación de la sensibilidad antibacteriana del aceite esencial frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213.....	102
Figura 43 Resultados de la evaluación de la sensibilidad antibacteriana del aceite esencial frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	103
Figura 44 Resultados de la evaluación de la sensibilidad de controles.....	104

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Referencias bibliográficas del aceite esencial de la especie <i>Tanacetum</i>	10
Tabla 2 Diferencias entre bacterias Gram positivas y Gram negativas.....	27
Tabla 3 Operacionalización de variables de la investigación.....	35
Tabla 4 porcentaje de extracción del aceite esencial.....	53
Tabla 5 Resultados de la solubilidad del aceite esencial.....	54
Tabla 6 Características físicas y fisicoquímicas del aceite esencial.....	56
Tabla 7 Composición química del aceite esencial de <i>Tanacetum partheium</i> L.....	60
Tabla 8 Resultados descriptivos de los diámetros de los halos de inhibición del efecto antibacteriano del aceite esencial de <i>Tanacetum parthenium</i> L., frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 en 24-72 horas.....	68
Tabla 9 Determinación del grado de sensibilidad de <i>Staphylococcus aureus</i> a diferentes concentraciones del aceite esencial de <i>Tanacetum parthenium</i> L.....	71
Tabla 10 Análisis de Varianza (ANOVA) del efecto antibacteriano del aceite esencial de <i>Tanacetum parthenium</i> L., frente a la cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> a diferentes concentraciones	72
Tabla 11 Resultados de los diámetros de los halos de inhibición del efecto antibacteriano del aceite esencial de <i>Tanacetum parthenium</i> L., frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, en 24-72 horas..	73
Tabla 12 Determinación del grado de sensibilidad de <i>Escherichia coli</i> a diferentes concentraciones del aceite esencial de <i>Tanacetum parthenium</i> L.	75
Tabla 13 Análisis de Varianza (ANOVA) del efecto antibacteriano del aceite esencial de <i>Tanacetum parthenium</i> L., frente a la cepa de <i>Escherichia coli</i> a diferentes concentraciones.....	76
Tabla 14 Preparación de concentraciones	104
Tabla 15 Resultados de los diámetros de los halos de inhibición del efecto antibacteriano del aceite esencial de <i>Tanacetum parthenium</i> L., frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213.....	105
Tabla 16 Resultados de los diámetros de los halos de inhibición del efecto antibacteriano del aceite esencial de <i>Tanacetum parthenium</i> L., frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25992	105

LISTA DE ABREVIATURAS

AE: Aceite esencial

APG: Angiosperm Phylogeny Group

ATCC: American Type Culture Collection

BHI: Brain Heart Infusion (caldo o agar)

CG-MS: Cromatografía de Gases - Espectrometría de Masas.

E. coli: *Escherichia coli*

m.s.n.m.: Metros sobre el nivel del mar

m/z: relación masa/carga

MC: *Agar MacConkey*

MH: Agar Mueller Hinton.

MSA: *Agar Manitol Salado*.

NCCLS: (National Committee for Clinical Laboratory Standards)

NTP: Norma Técnica Peruana

Q.P.: Reactivo grado químicamente puro

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

T. parthenium L.: *Tanacetum parthenium L.*

RESUMEN

Tanacetum parthenium L. de la familia *Asteraceae*, es una planta aromática que se usa en la medicina tradicional, principalmente por sus propiedades antiinflamatorias. En el presente trabajo de investigación se determinó la composición química del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L. y su efecto antibacteriano frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922. *Tanacetum parthenium* L. fue recolectada a 3580 m.s.n.m en la comunidad de Ccorao distrito de San Sebastián-Cusco.

La obtención del aceite esencial, se realizó de la parte aérea de *Tanacetum parthenium* L. por el método de hidrodestilación con trampa de Clevenger. Se caracterizó sus propiedades fisicoquímicas, su composición se determinó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS). También, se determinó el efecto antibacteriano mediante el método del kirby-Bauer. El rendimiento de extracción del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L. fue 0.531 ± 0.025 %, las características fisicoquímicas del aceite esencial, fue: densidad (g/mL) 0.9618 ± 0.0002 , índice de refracción 1.4681 ± 0.0007 , índice de acidez (mg KOH/g) 1.5016 ± 0.02 , índice de saponificación (mg KOH/g) 35.015 ± 1.28 y rotación óptica $+0.060^\circ \pm 0.02$. Los componentes químicos mayoritarios fueron Carveol (57.47 %), Borneol (19.52 %) y 2-β-Pineno (9.38 %). El aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L. presento mayor efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* (31.16 mm a 100 %) y menor efecto frente a *Escherichia coli* (14.05 mm a 12.5 %).

Palabras clave: Aceite esencial, *Tanacetum parthenium* L, Efecto antibacteriano, Composición química.

ABSTRACT

Tanacetum parthenium L., from the Asteraceae family, is an aromatic plant used in traditional medicine, primarily for its anti-inflammatory properties. This research determined the chemical composition of the essential oil of *Tanacetum parthenium* L. and its antibacterial effect against strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Escherichia coli* ATCC 25922. *Tanacetum parthenium* L. was collected at 3580 meters above sea level in the community of Ccorao, San Sebastián district, Cusco.

The essential oil was obtained from the aerial parts of *Tanacetum parthenium* L. using hydrodistillation with a Clevenger trap. Its physicochemical properties were characterized, and its composition was determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The antibacterial effect was also determined using the Kirby-Bauer method. The extraction yield of the essential oil of *Tanacetum parthenium* L. was 0.531 ± 0.025 %. The physicochemical characteristics of the essential oil were: density (g/mL) 0.9618 ± 0.0002 , refractive index 1.4681 ± 0.0007 , acid value (mg KOH/g) 1.5016 ± 0.02 , saponification value (mg KOH/g) 35.015 ± 1.28 and optical rotation $+0.060^\circ \pm 0.02$. The major chemical components were Carveol (57.47%), Borneol (19.52%) and 2- β -Pinene (9.38%). The essential oil of *Tanacetum parthenium* L. showed a greater antibacterial effect against *Staphylococcus aureus* (31.16 mm at 100%) and a lesser effect against *Escherichia coli* (14.05 mm at 12.5%).

Keywords: Essential oil, *Tanacetum parthenium* L., antibacterial Effect, chemical composition.

INTRODUCCIÓN

Desde tiempos antiguos, el ser humano ha interactuado directamente con la naturaleza y ha empleado las plantas como su principal recurso para prevenir y tratar enfermedades infecciosas. La medicina tradicional se usa a menudo en entornos culturales donde las personas de bajos ingresos enfrentan dificultades para obtener atención médica y medicamentos, los aceites esenciales se utilizan de diversas formas, especialmente en medicina con fines terapéuticos (Fernández et al., 2019).

Tanacetum parthenium L. es utilizada con frecuencia en la medicina tradicional para tratar diversas afecciones y condiciones de origen inflamatorio, tales como fiebre, migraña, trastornos menstruales, dolor abdominal, reumatismo, dolor de muelas y reacciones a picaduras de insectos.

Staphylococcus aureus es uno de los microorganismos bacterianos Gram positivos más frecuentes en enfermedades humanas y es responsable de infecciones cutáneas, neumonía, inflamación de las articulaciones, inflamación ósea y otras infecciones sistémicas. (Gomez & Godoy, 2018).

Escherichia coli es una bacteria Gram negativa ubicua que puede provocar afecciones en el sistema digestivo, que van desde diarrea leve hasta colitis hemorrágica, especialmente en niños y adultos mayores (Aliaga, 2013).

Con el fin de encontrar un tratamiento natural para tratar *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922, se plantea realizar este estudio para conocer el componente mayoritario y su efecto antibacteriano del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L. “santa maria” de la Comunidad de Ccorao, distrito de San Sebastián, provincia de Cusco - Cusco.

CAPITULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

En la actualidad, se investiga acerca de los aceites esenciales debido a su capacidad antibacteriano, antiinflamatorio, antifúngico e insecticida como una opción para reemplazar o reducir el uso de sustancias químicas que tienen la posibilidad de ser tóxicas y causar consecuencias negativas en la salud. *Tanacetum parthenium* L. en Cusco es una planta introducida de origen europeo que se usa en la medicina tradicional andina como emplasto o en infusiones. Sin embargo, pese a su uso tradicional, esta especie no ha sido analizada científicamente de manera exhaustiva.

En el Perú, los estudios relacionados con la composición química del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L. determinado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS) son escasos. Asimismo, existe información limitada sobre su efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922. Además, la composición y la función biológica de los aceites esenciales pueden variar según factores ambientales como la altitud y el clima.

Tanacetum parthenium L. de la comunidad de Ccorao, distrito de San Sebastián - Cusco, a una altitud de 3580 m.s.n.m. no cuenta con estudios que determinen su composición química ni su efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922, lo cual revela una falta de información. Por esta razón, se sugiere realizar esta investigación.

1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Cuál será la composición química del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L. determinado por CG-MS y su efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922?

1.3 PROBLEMAS ESPECIFICOS

- ¿Cuáles serán las características fisicoquímicas y su rendimiento del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L.?
- ¿Cuál es la composición química determinado por CG-MS del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L.?
- ¿El aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L. presentará efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922 mediante el método de kirby-Bauer modificado?

1.4 JUSTIFICACIÓN

El presente estudio contribuirá a la validación científica del uso tradicional de *Tanacetum parthenium* L., utilizada en el manejo de diversas afecciones, principalmente asociadas a procesos inflamatorios y con posible utilidad en el control de infecciones de origen bacteriano (Pareek et al., 2011).

Tanacetum parthenium L. podría generar interés en la salud en la región Cusco que permitirá a los profesionales utilizar nuevas alternativas de tratamiento antibacteriano y utilizar la medicina tradicional sobre todo para las personas con limitado recursos económicos y que tienen dificultad para acceder a fármacos. Esto concientizará a la comunidad acerca de la importancia de cultivar esta especie para mejorar la calidad y el rendimiento de los aceites esenciales.

Económicamente permitirá que el aceite esencial obtenido de *Tanacetum parthenium* L. se comercialice con fines medicinales y en la parte académica servirá como antecedente para investigaciones posteriores. Esto podría representar una oportunidad para la comunidad de Ccorao que desee aprovechar las propiedades curativas de la planta.

La evaluación del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L. frente a bacterias constituye un aporte para el desarrollo de alternativas terapéuticas naturales, menos tóxicas que los fármacos convencionales y potencialmente pueden ser eficaces ante la resistencia bacteriana.

1.5 OBJETIVOS

1.6 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la composición química del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L. determinado por CG-MS y su efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

1.7 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar las características fisicoquímicas del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L. obtenido por arrastre de vapor utilizando el método de hidrodestilación con trampa de Clevenger.
- Determinar la composición química del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L. mediante la cromatografía de gases y espectrometría de masas.
- Determinar el efecto antibacteriano frente *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922. Mediante el método de kirby Bauer modificado.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES

Flores, (2024), determino la actividad antimicrobiana del aceite esencial obtenido de las hojas de *T. vulgare* L. contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Muestras recolectadas en Platería (Puno, Perú), la extracción del aceite esencial se realizó mediante hidrodestilación y se caracterizó mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas. Se utilizó el método de Kirby-Bauer a diversas concentraciones (12.5-400 µl/mL) para examinar su actividad antimicrobiana se realizaron análisis estadísticos utilizando ANOVA. El rendimiento del aceite esencial fue de 0,88%, rico en monoterpenos como tujona (83 %), β-felandreno (7 %) y β-tujona (1 %). Se observó actividad antimicrobiana significativa ($p < 0,05$), destacando mayor eficacia contra *Staphylococcus aureus*, seguida de *Candida albicans* y *Escherichia coli*. Se llego a la conclusión de que el aceite esencial de *T. vulgare* presenta un complejo de 17 compuestos volátiles con potencial antimicrobiano frente a patógenos de interés en salud pública.

Lazarević *et al.*, (2021), determinaron la composición y evaluaron el potencial de aplicación de los aceites esenciales de *Tanacetum parthenium* L. y *T. vulgare* L. (Asteraceae) como controles ecológicos alternativas para *Leptinotarsa decemlineata*. Evaluaron el efecto antialimentario en larvas y adultos de *Leptinotarsa decemlineata* y estimaron el daño en hojas de papa tratadas con 3 concentraciones de aceite esencial (0.125, 0.25 y 0.5 %) disueltas en etanol. Los resultados mostraron que *Tanacetum parthenium* L. tiene componente mayoritario como alcanfor (44.75 %) y trans-Acetato de crisantenilo (28.97 %) y *T. vulgare* β-tujona (49.75 %) y trans-Acetato de crisantenilo (22.27 %). *Tanacetum parthenium* L. fue más efectivo contra larvas y *T. vulgare* fue más efectivo contra adultos. Sin embargo, la concentración de aceite esencial tuvo

efectos significativos en el comportamiento durante ambas etapas de desarrollo. A concentraciones más altas de aceite esencial, tanto las larvas del tercer estadio como los adultos tardan menos en arrancar los discos de hojas no tratados. Además, el aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L., provocó una migración más rápida fuera de los discos foliares tratados que *T. vulgare*, especialmente en las concentraciones más altas. La modificación exitosa del comportamiento de *Leptinotarsa decemlineata* por dos aceites de *Tanacetum* sugiere que pueden usarse para proteger las papas.

Shahhoseini *et al.*, (2019), evaluaron el potencial fitoquímico de *Tanacetum parthenium* L. Schultz Bip, la partenolida se identificó mediante UPLC-MRM-MS, obtenidas el aceite por hidrodestilación con trampa de Clevenger y se utilizó cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) para identificar los componentes. A pesar de algunas diferencias menores, los resultados no revelaron diferencias apreciables entre los parámetros fitoquímicos. Los fenoles, flavonoides y antocianinas totales fueron de 21.42, 1.9 y 0.076 mg/g de peso seco. La capacidad antioxidante del extracto para inhibir los radicales libres fue del 74.82 %. Los contenidos mínimo, máximo y medio de partenolida fueron 1.73, 1.86 y 1.89 mg/g, respectivamente. El promedio extraído de aceite esencial fue de 0.84 %. Se aislaron 81 compuestos de aceites esenciales. Se identificaron 77 compuestos (96.64 % a 98.15 %) que contenían completamente todos los componentes. Los principales componentes de aceite de *Tanacetum parthenium* L., fueron alcanfor (27.75 % a 29.11 %), acetato de nerilo (8.94 % a 11.05 %) y p-cimeno (5.93 % a 7.01 %). La mayoría fueron monoterpenos oxigenados (62.81 a 68.38 %) y fenilpropanoides (0.16 a 0.28 %). Se reportaron por primera vez espiroéteres como compuestos valiosos. Además, se observó que las condiciones climáticas influenciaron la estabilidad de la síntesis de compuestos fitoquímicos.

Coban *et al.*, (2019), investigaron la composición del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L., recolectado en Gumushane, Turquía. La hidrodestilación permitió obtener un rendimiento de aceite esencial de *Tanacetum Parthenium* L., del 0.62 % a través de la cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) se detectaron 44 compuestos. El principal componente fue el alcanfor (39.47 %), seguido de guaiol (5.21%), óxido de cariofileno (3.91 %), acetato de bornilo (3.09 %), (E)-verbenol (2.68 %), canfeno (2.29 %) y α -cadinol (2.12 %). Destaca la alta concentración de alcanfor, asociada a propiedades medicinales. El guaiol se detectó por primera vez en esta especie.

Bączek *et al.*, (2017), estudiaron la comparación del efecto antibacteriano y antioxidante de *Tanacetum balsamita* L. (costmary) y *Tanacetum vulgare* L. (tanaceto) en relación con sus perfiles químicos. Los compuestos dominantes de los aceites esenciales, determinados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), fueron: β -tujona en costmary (84.43 %) y acetato de trans-crisantenilo en tanaceto (18.39 %). La composición química de flavonoides y ácidos fenólicos se estableció usando HPLC-DAD. El ácido cichórico parece ser el compuesto fenólico dominante en ambas especies (3333.9 y 4311.3 mg $\times$ 100g⁻¹). El aceite esencial y el extracto de costmary se caracterizaron por una actividad antibacteriana más fuerte (expresada como valores MIC y MBC) que el tanaceto. A su vez, el extracto de tanaceto se distinguió por un mayor potencial antioxidante (determinado por FRAP y DPPH) en comparación con las bayas marinas.

Izadi *et al.*, (2013), investigaron el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L. contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como frente a hongos. El aceite esencial fue extraído de los brotes usando hidrodestilación con trampa de Clevenger y se analizaron sus componentes a través cromatografía de gases-espectrometría de masas. Las

propiedades antimicrobianas se utilizaron los métodos de dilución en pocillos y difusión en agar. Se identificaron 35 compuestos, los principales fueron alcanfor (45 %), acetato de crisantenilo (21.5 %) y canfeno (9.6 %). El aceite esencial tuvo un efecto antifúngico más fuerte que el antibacteriano, mientras que las bacterias Gram positivas mostraron mayor sensibilidad que las Gram negativas. Según estos resultados, el aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L. podría ser una opción natural y segura para combatir microorganismos patógenos.

Mohsenzadeh *et al.*, (2011), obtuvieron el aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L. Schultz Bit. por hidrodestilación y utilizando cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS), recolectado de Hamedan (oeste de Irán). El efecto antibacteriano de estos aceites se estudió a cuatro bacterias Gram positivas y cuatro Gram negativas. La citotoxicidad del aceite se probó en células THP-1 utilizando el ensayo de azul de tripan. El rendimiento del aceite esencial fue 1.02 %, identificaron 29 componentes de aceites esenciales en etapa de floración fue la más obtenida el alcanfor (18.94 %), los otros componentes son acetato de bornilo (18.35 %), canfeno (13.74 %) y borneol (10.93 %). Las concentraciones inhibitorias mínimas de los aceites esenciales evaluaron entre 4 µL contra *Staphylococcus subtilis* y 38 µL contra *Enterobacter aerogenes*. Las pruebas de toxicidad mostraron que el aceite no era abiertamente tóxico para las células THP-1 en concentraciones entre 5 y 15 % v/v. concluyeron que el aceite estudiado tiene una buena actividad antibacteriana y ninguna toxicidad evidente.

Pareek *et al.*, (2011), investigaron aspectos de los usos botánicos y farmacológicos de la matricaria *Tanacetum parthenium* L., para comprender y sintetizar su perfil potencial como medicamento multipropósito y respaldar sus usos terapéuticos como fiebre, la jaqueca, la artritis reumatoide, el dolor abdominal, el dolor dental, las picaduras de bichos, la infertilidad y las dificultades en la menstruación y el parto.

Izadi *et al.*, (2010), estudiaron aceites esenciales de *Tanacetum parthenium L.* obtenidas por hidrodestilación de dos regiones Hamedan y Teherán. Obtuvieron el aceite esencial en Hamedan de las partes aéreas, tallo/hoja, inflorescencia, semillas inmaduras y maduras **3.80 %**, 6.01 %, 3.61 %, 0.49 % y 0.31 % p/p de rendimiento y entre **4.96 %**, 6.94 %, 3.39 %, 0.96 % y 0.87 % p/p en Teherán. El estudio del aceite obtenido a través de GC-MS reveló que el componente principal del aceite en su totalidad era el alcanfor (10.3 a **53.3 %**), seguido del acetato de crisantenilo (4.3 % a **22.5 %**) y el canfeno (4.1 -10.4 %) en Teherán y Hamedan. Probaron el efecto del aceite por difusión en disco en bacterias Gram positivas (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Micrococcus luteus*), bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella oxytoca* y *Pseudomonas aeruginosa*) y levadura (*Candida albicans*). Los resultados mostraron que las bacterias presentan notables diferencias de sensibilidad, siendo las bacterias Gram positivas más susceptibles a los efectos antimicrobianos del aceite de *Tanacetum parthenium L.* Además, en comparación con la muestra de Teherán, el aceite extraído de Hamedan demostró una actividad antimicrobiana más potente.

Polatoglu *et al.*, (2010), caracterizaron los aceites esenciales de *Tanacetum parthenium L.* recolectados en dos regiones de Turquía. Determinaron su composición química mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas. La muestra de Davutpasa-Estambul presentó como principales componentes alcanfor (49 %), acetato de trans-crisantenilo (22.1 %) y canfeno (9.4 %), mientras que la muestra de Savsat-Ardahan contenía alcanfor (60.8 %) y canfeno (6.8 %). La actividad antibacteriana, evaluada mediante microdilución en caldo frente a cinco bacterias Gram positivas y cinco Gram negativas, mostró que ambos aceites fueron activos, siendo más efectiva la muestra de Estambul, especialmente frente a *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (CMI = 125 mg/mL, el doble que el control de cloranfenicol 62.5 mg/mL).

En cuanto a actividad antioxidante medida por DPPH, la muestra de Davutpasa mostró 59.3% y la de Savsat 28.2 %, ambas inferiores al α -tocoferol (94.6 %). Finalmente, ambos aceites demostraron toxicidad frente a *Vibrio fischeri* en un ensayo de bioluminiscencia por cromatografía en capa fina.

Bagci & Kocak, (2010), determinaron la composición química de los aceites esenciales de las partes aéreas secas de dos especies endémicas de *Tanacetum nitens* y *Tanacetum argenteum* recolectadas en Baskil y Harput (Elazig, Turquía). Los rendimientos de los aceites esenciales fueron de 0.4 % para *Tanacetum nitens* y 0.7% para *Tanacetum argenteum*. mediante GC-MS se identificaron como principales compuestos de *Tanacetum nitens* que fueron 1,8-cineol (27.57 %) y α -pineno (4.62 %), mientras que en *Tanacetum argenteum* α -pineno (27.86 %) y 1,8-cineol (6.82 %). Se concluyó que *Tanacetum nitens* corresponde a un quimiotipo 1,8-cineol y *Tanacetum argenteum* al tipo α -pineno, lo que sugiere su potencial como materia prima para aplicaciones medicinales y farmacéuticas.

Tabla 1*Referencias bibliográficas del aceite esencial de la especie Tanacetum*

Fuente bibliográfico	Especie	Componente mayoritario	Rendimiento del AE
Flores (2024)	Hojas de <i>T. vulgare</i> L.	Tujona 83 % β -felandreno 7 %	0.88 %
Lazarevic <i>et al.</i> , (2021)	Partes aéreas de: <i>T. parthenium</i> L. <i>T. vulgare</i> L	-Alcanfor 44.75% Trans-acetato de crisantenilo 28.97%. - β -tujona 49.75% trans-acetato de crisantenilo 22.27%	
Coban <i>et al.</i> , (2019)	<i>T. parthenium</i> L	Alcanfor 39.47 % Guaiol 5.21 %	0.62 %
Baczek <i>et al.</i> , (2017)	<i>T. balsamita</i> <i>T. vulgare</i>	- β -tujona 84.43 % -acetato trans-crisantenilo 18.39%	
Izadi <i>et al.</i> , (2013)	<i>T. parthenium</i> L de partes aereas	Alcanfor 45% Acetato de crisantenilo 21.5 %	4.5 %
Mohsenzadeh <i>et al.</i> , (2011)	T parthenium	Alcanfor 18.9 % Acetato de bornilo 18.35 % Canfeno 13.74 Borneol 10.93%	1.02 %
Izadi <i>et al.</i> , (2010)	Partes aéreas de <i>T. parthenium</i> en Hamedan	-Alcanfor 53.39% Acetato crisantenilo 22.54%	3.80 %
	Teheran	-Alcanfor 52.98 % Acetato de crisantenilo 21.12 %	4.96 %
Polatoglu <i>et al.</i> , (2010)	<i>T. parthenium</i> L. En turquia Davutpasa-Estambul	-Alcanfor 49 % Acetato de trasn-crisantenilo 22.1 %	
	Savsaaat-Ardahan	-Alcanfor 60.8 % Canfeno 6.8 %	
Bagci & kocak (2010)	partes aéreas de <i>T. nitens</i>	-1,8-cineol 27 % α -pineno 4.62 %	0.4 %
	<i>T. argenteum</i>	- α -pineno 27.86 % santolinatrieno 8.82 % 1.8-cineol 6.82%	0.7 %

2.2 BASES TEÓRICAS

2.2.1 *La familia Asteraceae y género Tanacetum*

La segunda familia más diversa en la flora del Perú es la Asteraceae. Hay 1590 especies en esta familia repartidas en 250 géneros, principalmente en arbustos, hierbas y subarbustos (Beltrán et al., 2006). La mayoría de las plantas vasculares pertenecen a la familia Asteraceae. A nivel mundial, se cree que hay entre 23000 y 32000 especies y 1535 géneros (Apaza & Gonzáles, 2015).

2.2.2 *Clasificación taxonomía de Tanacetum parthenium L.*

Siguiendo el sistema de clasificación APG IV (2016), se llevó a cabo la identificación taxonómica del material biológico en el Herbario Vargas Cuz, perteneciente a la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Sub clase: Magnoliidae Novak ex Takht.

Orden: Asterales Link

Superorden: Asteranae Takht.

Familia: Asteraceae Bercht. & J. Presl

Género: *Tanacetum* L.

Especie: *Tanacetum parthenium* L. Sch. Bip.

Nombre común: Santa maría, altamisa, Partenio del crisantemo, Matricaria, botón de soltero, hoja de pluma, margarita de verano, manzanilla silvestre (Pareek et al., 2011).

2.2.3 Descripción botánica de la especie *Tanacetum parthenium* L.

Tanacetum parthenium L., originario de Europa, se adapta a climas templados, semicálidos y semisecos, y crece en robles, huertos familiares, bordes de caminos, tierras de cultivo, pastizales y bosques nubosos de montaña (Arturo, 2010).

Tanacetum parthenium L. es una planta perenne, muy fragante cuando se presiona, de porte arbustivo bajo a mediano, que alcanza aproximadamente entre 50 y 80 cm de altura y tiene musgo en los brotes más jóvenes. Presenta tallos ramificados y erectos, con hojas verdes compuestas y de contorno lobulado largo hasta 8 cm típicas de la familia Asteraceae. Las flores se disponen en capítulos terminales; la corola externa es blanca y radiante con pétalos alargados de 2,5-8 mm de largo, mientras que el disco central es amarillo, redondo y denso (Ortiz, 2010). *Tanacetum parthenium* L., conocida desde la antigüedad por sus propiedades medicinales, se utiliza también como planta ornamental. Tradicionalmente, ha servido como remedio para diversas dolencias, como el reumatismo, la fiebre y la migraña (Barsby et al., 1993) y (Mendoza González, 2018).

Figura 1*Tanacetum parthenium* L. de la comunidad Ccorao*Nota.* elaboración propia

2.2.4 Distribucion geografica de *Tanacetum parthenium* L.

Tanacetum parthenium L, una planta aromática perenne con un potente aroma amargo. Originaria de los Balcanes y ahora está ampliamente distribuida en Australia, Europa, Estados Unidos, China, Japón, África del Norte, América del Sur y América Central (Pareek et al., 2011), En Perú, se encuentra entre las provincias de Apurímac, Cusco y Puno, en altitudes de 3000 a 4000 m.s.n.m. y crece de octubre a abril (Roersch, 1994).

2.3 ACEITES ESENCIALES

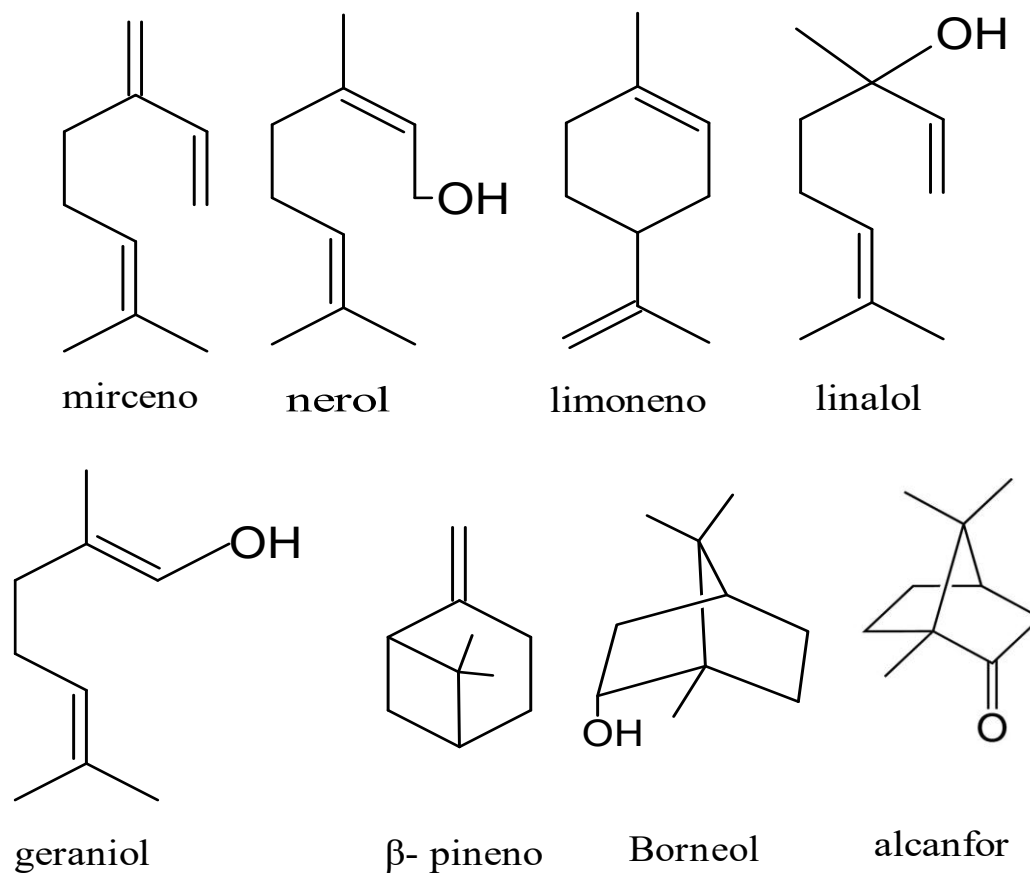
Los aceites esenciales son compuestos aromáticos volátiles de origen natural producidos por ciertas plantas que contienen un aroma agradable. La química de los aceites es extremadamente compleja, pertenecen principalmente a los grupos químicos derivados de terpenoides y fenilpropano. Estos compuestos pueden modificarse con grupos funcionales para formar alcoholes,

aldehídos, éteres, esterres, cetonas, fenoles y óxidos. Con diferencia, los componentes mayoritarios corresponden a los terpenos, así como a los monoterpenos y sesquiterpenos. Se estima que hay más de 1000 estructuras monoterpénicas y 3000 sesquiterpénicas en los aceites esenciales (Molina, 2019).

Son productos del metabolismo de las plantas, los aceites esenciales normalmente contienen hidrocarburos monoterpenos y sesquiterpenos, así como derivados oxigenados. Pueden existir también compuestos de azufre y nitrógeno (Alea, 2015).

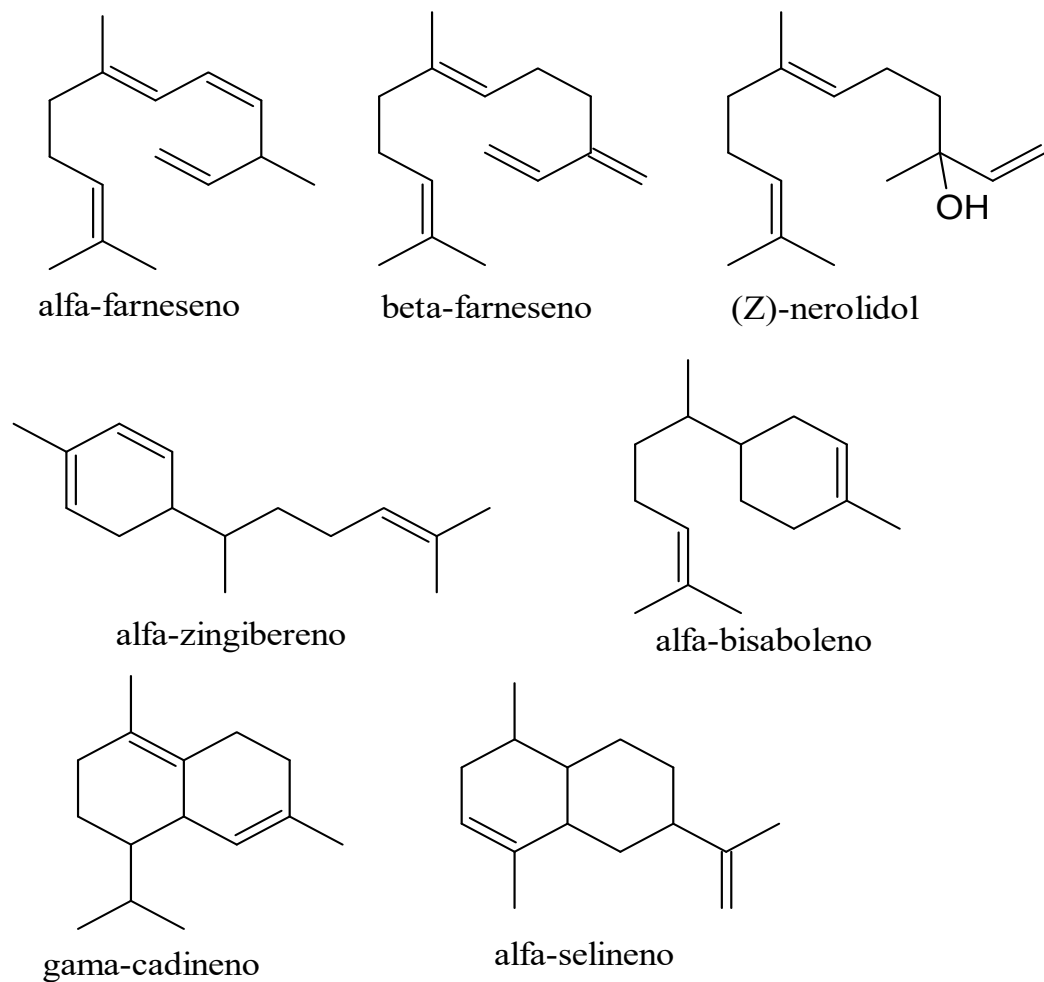
2.3.1 Monoterpenos

El compuesto monoterpenos se compone de dos unidades de isopreno. Se pueden clasificar como acíclicos o lineales, monocíclicos, bicíclicos o tricíclicos según el número de anillos en su estructura. Otros compuestos que se pueden formar incluyen alcoholes, cetonas, aldehídos y ésteres mediante adición (oxidación), reducción de dobles enlaces y adición de oxígeno (Alea, 2015).

Figura 2*Monoterpenos de aceites esenciales**Nota.* (Alea, 2015).

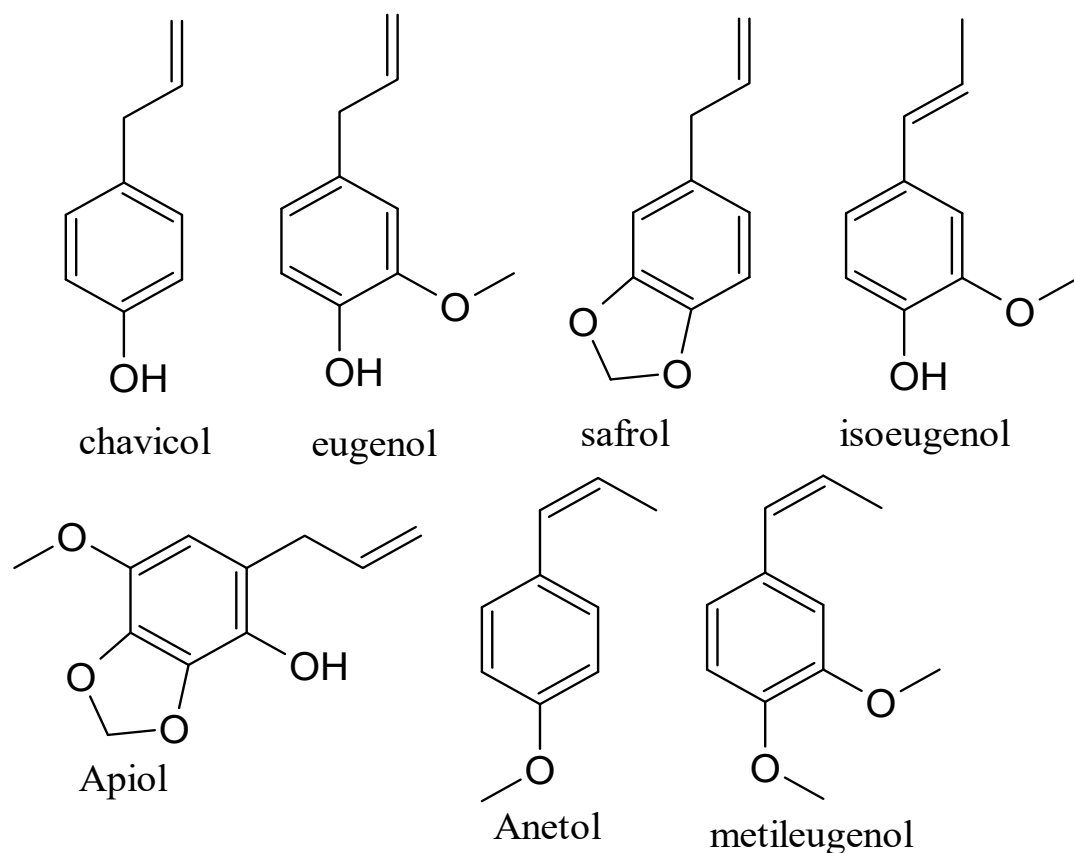
2.3.2 Sesquiterpenos

Los sesquiterpenos son compuestos formados por tres unidades de isopreno, estructural y estereoquímicamente más diversos que los monoterpenos porque contienen 15 átomos de carbono. También son menos volátiles que los monoterpenos y tienen menos importancia para las propiedades organolépticas (Bramley, 1997). Acíclicos, monocíclicos, bicíclicos o tricíclicos son clasificaciones en función de su composición estructural. Al igual que los monoterpenos, se pueden producir diferentes alcoholes, cetonas, aldehídos y ésteres por adición (oxidación), doble enlace (reducción) y adición de oxígeno (Alea, 2015).

Figura 3*Sesquiterpenos de aceites esenciales**Nota.* (Alea, 2015)

2.3.3 Fenilpropanos

Los componentes comunes de los aceites esenciales incluyen fenilpropanoides. El anillo de benceno está unido a una cadena de tres carbonos en el esqueleto del fenilpropanoide, que es una estructura de tipo C_6C_3 . El anillo de benceno se puede reemplazar hasta cuatro átomos de oxígeno y se puede agregar un anillo de metilendioxi a los átomos de oxígeno, como safrol. Además de los fenilpropanoides, los bencenos también son comunes en muchos aceites esenciales (Alea, 2015).

Figura 4*Fenilpropanos de aceites esenciales**Nota.* (Alea, 2015)

2.4 METODOS DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL

Los aceites esenciales se pueden extraerse de muestras vegetales utilizando diversos métodos, como la destilación con vapor, la utilización de disolventes volátiles, la extracción con fluidos en condiciones supercríticas y la extracción por microondas. En este trabajo de investigación, se utilizó específicamente el método de arrastre de vapor hidrodestilación utilizando el equipo de trampa de Clevenger (Álvarez *et al.*, 2012).

2.4.1 Destilación por arrastre de vapor

Este método es simple y económico, pero tiene la desventaja de que requiere mucho tiempo y produce bajos rendimientos que otros métodos.

Este método presenta tres variaciones:

La hidrodestilación: consiste que el material vegetal hierve dentro del agua y el vapor arrastra los aceites esenciales.

La destilación mixta: en este tipo de destilación, la muestra y el agua están contenidas en un mismo recipiente, aunque una rejilla las separa; esta rejilla sostiene la muestra por encima del nivel del agua. Cuando se calienta a ebullición, el vapor de agua atraviesa la muestra y transporta los aceites esenciales (Solis et al.,2018).

La destilación mediante inyección de vapor de agua: este método evapora los componentes volátiles juntos con otros que no son volátiles de la mezcla. La muestra de la planta se coloca dentro de un balón de destilación sin ningún contacto con el agua para extraer los aceites esenciales. Dado que el producto volátil (destilado) se dividirá en dos fases durante la condensación, lo que permite una fácil separación del producto y el agua, para usar este tipo de destilación es que tanto los componentes volátiles como las impurezas sean insolubles en agua (Oviedo & Orochena, 2011).

2.4.1.1 Hidrodestilación con Trampa de Clevenger

Hidrodestilación con trampa de Clevenger se usa en muchos laboratorios y es más adecuado para determinar cuántos aceites esenciales están presentes en las plantas aromáticas. El equipo consta de un balón en el que se desmenuza la materia prima y se le añade una determinada cantidad de agua. El balón se calienta continuamente para evaporar el aceite esencial que contiene agua. Con un condensador conectado a balón, la conexión D permite que el aceite se acumule y se separe de la mezcla (Oviedo & Orochena, 2011).

- Las ventajas son: Flexibilidad, fácil manejo y permite cuantificar el rendimiento.

- Las desventajas son: Debido a que tiene como objetivo extraer hasta la última gota de aceite en la planta, el proceso de extracción lleva mucho tiempo y limitada a pequeñas cantidades de muestra no apta para extracción a gran escala.

2.4.2 Extracción con disolventes

Este método involucra el uso de diferentes tipos de disolventes orgánicos como alcoholes y cloroformo. El aceite esencial obtenidos con este tipo de disolvente suelen ser de color oscuro debido a la absorción de algunos de los pigmentos. Además, el aceite esencial resultante lleva un tiempo relativamente largo y contiene trazas de los solventes utilizados, lo que limita su aplicación en la industria cosmética y farmacéutica (Sánchez, 2006).

2.4.3 Extracción con fluidos supercríticos

La extracción con fluido supercrítico es un método de separación que se realiza a temperaturas y presiones superiores a la presión crítica del disolvente. Especialmente utilizando CO₂ como solvente, puede brindar ventajas en la extracción de aceites vegetales que puede perfeccionar la calidad del extracto, reducir el tiempo de extracción y lograr mayores rendimientos. La desventaja es que las ceras de la cutícula y los compuestos con peso molecular alto se extraen junto con los aceites esenciales y los costos operativos son elevados (Fernández, 2001).

2.4.4 Extracción por microondas

El método de extracción por microondas se presenta como una herramienta más eficiente para extraer aceites esenciales. Este método ofrece varias ventajas notables, como una reducción en el tiempo de proceso y una mejora en la eficacia del calentamiento requerido. Se pueden calentar toda la muestra casi al mismo tiempo y a una velocidad muy rápida, reduce el consumo de energía y un mayor rendimiento. Aunque este método se puede realizar a gran escala utilizando un reactor de microondas, pero se deben tomar precauciones de seguridad adicionales (Villamizar-Véliz & Aular, 2022).

2.4.5 Extracción por el método de enflorado

En contacto con una grasa hay material vegetal (típicamente flores). En la grasa que sirve de medio de extracción se solubiliza la esencia. El aceite esencial y la grasa se combinan primero para formar un concreto, que luego se separa utilizando técnicas físico-químicas adicionales. Por lo general, se agrega alcohol caliente a la mezcla antes de que se enfríe para distinguir entre la grasa y el extracto de aroma. Este método se utiliza para obtener esencias florales (jazmín, rosa, azahar, etc.), pero es costoso debido al bajo rendimiento y la complejidad para separar el aceite extraído (Álvarez et al., 2012).

2.5 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES

2.5.1 Densidad

La densidad de un aceite esencial es la proporción entre su volumen y su masa. Por otro lado, la densidad relativa es importante para determinar la pureza y la calidad del aceite esencial, ya que puede variar según su composición química y grado de pureza (Guenther, 1947). En cambio, tienen una densidad inferior a la del agua, excepto algunas esencias como la de clavo de olor y canela poseen mayor densidad (Bandoni, 2003).

2.5.2 Índice de refracción

Se define el índice de refracción de los aceites esenciales como la relación entre el seno del ángulo de incidencia y el seno del ángulo de refracción cuando la luz entra en el aceite esencial desde el aire. Este parámetro puede utilizarse para detectar posibles adulteraciones y envejecimiento en los aceites esenciales (Solis et al., 2018).

2.5.3 Rotación óptica

La mayor parte de los aceites esenciales pueden cambiar, al estar expuestos a un rayo de luz polarizada, la dirección del plano de polarización cambia hacia la izquierda (levógiro) o bien hacia la derecha (dextrógiro). El nivel de actividad óptica de un aceite se expresa en grados de rotación. Por lo tanto, determinar el poder rotatorio puede ser muy útil para identificar falsificaciones o adulteraciones. (Guenther, 1947).

2.5.4 Solubilidad

Los aceites esenciales se disuelven completamente en etanol absoluto y muchos son solubles en alcohol etílico diluido. Esta propiedad de solubilidad es útil para identificar si un aceite ha sido adulterado. Además, puede ofrecer una idea preliminar sobre su composición y orientar en qué usos o aplicaciones podría emplearse (Solis et al., 2018).

2.5.5 Índice de acidez

Se denomina índice de acidez al total de miligramos de hidróxido de potasio que se requieren para neutralizar los ácidos libres presentes en 1 g de aceite esencial (Guenther, 1947).

2.5.6 Índice de saponificación

La finalidad del índice de saponificación es determinar cuántos ésteres y ácidos libres contiene un aceite esencial. Por lo general se manifiesta en miligramos de hidróxido de potasio necesario para saponificar un 1 g de aceite esencial. La suma de los dos índices da como resultado el índice de saponificación (Bandoni, 2003).

2.6 CROMATOGRAFIA DE GASES-ESPECTROMETRIA DE MASAS

2.6.1 Cromatografía de gases

La cromatografía de gases es una técnica de separación sin embargo, los tiempos de retención de los picos cromatográficos correspondientes se convierten en los valores de datos específicos que se pueden usar para identificar cada componente, una vez que cada componente individual en una muestra ha sido identificado, detectado e incluso cuantificado (Gutiérrez & Droguet, 2002).

En la CG, se introduce la muestra en una fase móvil que está formada por un gas inerte, tal como el helio o el nitrógeno. Los componentes de la muestra atraviesan a la fase estacionaria que está en una columna situada dentro de un horno con programación térmica. Cada soluto posee una afinidad diferente con la fase estacionaria, lo que facilita su separación: los compuestos que tienen una afinidad más fuerte o son más retenidos se mueven de manera más lenta, en cambio los de menor afinidad lo hacen más rápido. Dentro de este procedimiento, es la presión del vapor de las sustancias. A medida que la presión de vapor se incrementa, disminuye el tiempo de retención. Como resultado, los componentes se dividen en bandas que pueden ser examinadas cualitativa y cuantitativamente a través de detectores específicos (Gutiérrez & Droguet, 2002).

2.6.2 *Espectrometría de masas*

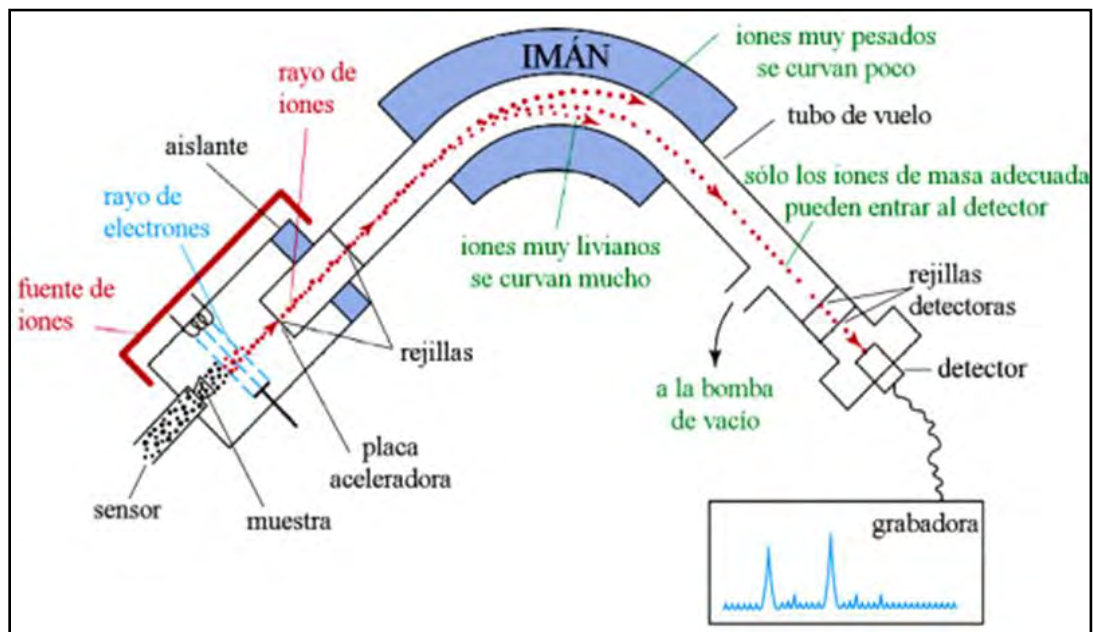
Es una de las técnicas de análisis cualitativo para identificar estructuras orgánicas. Su aplicación no se limita únicamente a la investigación científica, sino que también se utiliza en procedimientos rutinarios dentro de la industria, como el control de calidad. Además, esta técnica puede identificar claramente casi todas las sustancias puras.

En el espectrómetro de masas, se ioniza la muestra, generalmente a través del sistema de impacto electrónico. Este método bombardea las moléculas con electrones de una energía determinada, lo que ocasiona la liberación de un electrón y su ionización.

Espectrómetro de masas está compuesto por varios componentes básicos:

- ✓ Un sistema para introducir la muestra.
- ✓ Una fuente de ionización, en el que se producen los iones a partir de las sustancias químicas a examinar.
- ✓ Un analizador encargado de separar los iones según su relación masa/carga (m/z),
- ✓ Detector que genera y amplifica una señal eléctrica correspondiente a cada ion detectado (Romero González et al., 2007).

Además de los iones moleculares, en el proceso también se originan iones fragmentados debido a la ruptura de aquellos iones que presentan exceso de energía. La identidad y la proporción de estos fragmentos dependen de las moléculas que se evalúan y por las condiciones de ionización. Los iones, una vez ionizados son acelerados mediante campos eléctricos o magnéticos hacia el colector, donde su velocidad está determinada por su masa. Cuando se analiza una sustancia pura, la detección secuencial de estos iones genera un espectro de masas único, lo que permite identificar el compuesto con alta precisión (Gutiérrez & Droguet, 2002).

Figura 5*Esquema de un espectrómetro de masas*

Nota. Técnicas analíticas empleadas en metabolómica de alimentos (p.196), por (Saavedra-Charca et al., 2015), Agroindustrial science.

Ambos métodos, GC y MS crea una técnica combinada que permite separar e identificar mezclas complejas. El uso requiere sistemas especiales de conexión, ya que ambas técnicas operan en fase gaseosa y requieren una cantidad mínima de muestra para el análisis, lo que las hace altamente compatibles. Sin embargo, el principal desafío en su acoplamiento es que el efluente que sale de la columna cromatográfica lo hace a presión atmosférica, mientras que el espectrómetro de masas funciona en alto vacío. Actualmente, este acoplamiento directo se ha simplificado gracias al uso de la cromatografía de gases capilar, que es el método más comúnmente empleado (Gutiérrez & Droguet, 2002).

Cuando la mezcla de compuestos ingresa al cromatógrafo de gases, estos se separan dentro de la columna cromatográfica, provocando la elución sucesiva de los diferentes componentes. Luego, los componentes pasan directamente al espectrometría de masas, donde cada uno origina

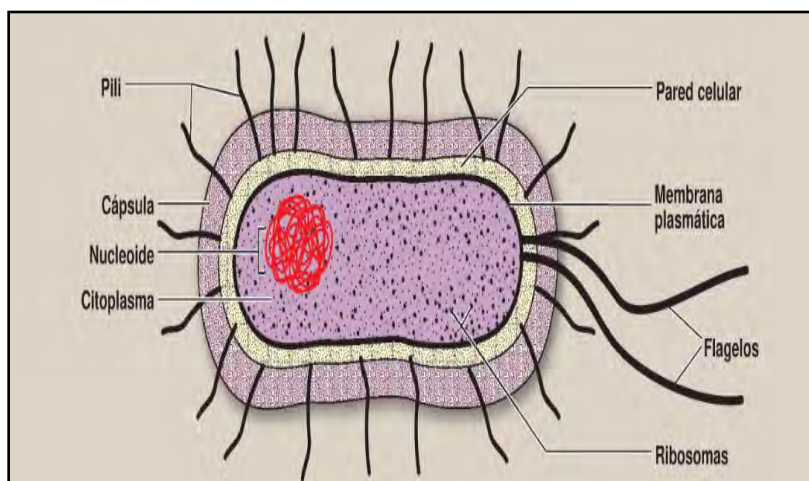
un pico en el cromatograma y se identifica a través de su espectro de masas. El espectrómetro funciona como detector, captando la corriente iónica total producida en la fuente de ionización, lo que da lugar al cromatograma. Esta corriente iónica produce picos gaussianos, cuyas áreas guardan relación proporcional con la concentración de cada sustancia analizada (Gutiérrez & Droguet, 2002).

2.7 BACTERIAS

Son microorganismos unicelulares procariotas que pueden reproducirse a expensas del medio ambiente y tienen una notable capacidad para adaptarse a las condiciones ambientales variables. Comprender la naturaleza de esta capacidad requiere comprender sus fundamentos genéticos (Bado *et al.*, 2008).

Figura 6

Estructura general de una célula bacteriana



Nota. la figura representa a la estructura de una célula bacteriana (p. 60), por Harvey, R. A. Champe, P. C. & Fisher, B. D. (2008). Microbiología: (2 ed.). Wolters Kluwer Health.

2.7.1 Estructuras citoplásmicas

Las bacterias Gram positivas y Gram negativas tienen estructuras internas similares, sus estructuras externas no son las mismas. En el citoplasma de las células bacterianas se encuentran proteínas, ribosomas, ADN cromosómico, ARNm y metabolitos. A diferencia de los cromosomas eucarióticos, los cromosomas bacterianos consisten en una sola molécula circular de doble cadena que no se encuentra en el núcleo sino en una región específica llamada nucleoide. Además, el cromosoma carece de histonas, que mantienen el ADN en su forma adecuada y no forman nucleosomas (Rosenthal & Pfäuer, 2007).

2.7.2 Pared celular

La estructura bacteriana posee una pared que es esencial, ubicada en la parte externa de la membrana plasmática. A excepción de las micoplasmas, la mayoría de las bacterias poseen pared celular que les dan forma y las protegen de la lisis osmótica. En numerosos microorganismos patógenos, esta pared contiene componentes que incrementan su capacidad de producir enfermedad. Algunos antibióticos actúan sobre esta pared, protegiendo a las células de sustancias tóxicas (Pírez & Mota, 2006).

Las bacterias Gram positivas se diferencian de las Gram negativas en la estructura, componentes y funciones de sus paredes celulares. La pared celular está formada por componentes bacterianos y su estructura repetida genera en los humanos una respuesta inmune innata que brinda protección. La mayoría de los procariotas tienen una capa rígida de peptidoglicanos (proteínas de la pared citoplasmática) que rodea la membrana citoplasmática, mientras que las micoplasmas y las arqueas contienen pseudoglicanos unidos a peptidoglicanos y contienen pseudoglicanos en lugar de una pared celular. Las bacterias Gram negativas también están rodeadas por una membrana externa (Rosenthal & Pfäuer, 2007).

Tabla 2*Diferencias entre bacterias Gram positivas y Gram negativas*

Características	Bacterias Gram (+)	Bacterias Gram (-)
Estructura de la pared celular	Pared gruesa de peptidoglucano.	Pared delgada de peptidoglucano
Membrana externa	No presenta	formada por lípidos y lipopolisacáridos
Coloración de Gram	se observan moradas.	se tiñen de rosado o rojo.
Resistencia a antibióticos	Generalmente más sensibles a antibióticos como penicilinas	Generalmente más resistentes por la membrana externa.
Ejemplo de bacteria	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella</i>

2.7.3 Efecto antibacteriano

Agentes antibacterianos son medicamentos naturales o sintéticos que pueden eliminar o detener el crecimiento de bacterias. Los antibióticos actúan contra los microorganismos inhibiendo la síntesis de sus paredes celulares y activando enzimas que cambian la pared celular, haciendo que la membrana sean más permeables, inhibiendo la síntesis de proteínas y modifican el metabolismo de sus ácidos nucleicos (Alberto, 2011).

Actúan sobre microorganismos en crecimiento activo. El efecto antibacteriano de las plantas constituye una fuente importante para la búsqueda de nuevos medicamentos, que pueden ser elaborados más adelante. Además, ayuda a entender mejor las variedades de especies vegetales, lo que ha permitido que muchos productos naturales sean considerados fitomedicamentos (Martin, 2016).

2.7.4 Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular

Los antibióticos actúan con mayor frecuencia interfiriendo con la producción de paredes celulares bacterianas. Debido a que todos comparten la estructura del anillo β -lactámico, casi todos los antibióticos con este modo de acción se clasifican como β -lactámicos, incluidas las penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, carbapenémicos, monobactámicos e inhibidores de (β -lactámicos). La vancomicina es otro ejemplo de antibiótico que previene la síntesis de las paredes celulares bacterianas (Rosenthal & Pfaüer, 2007).

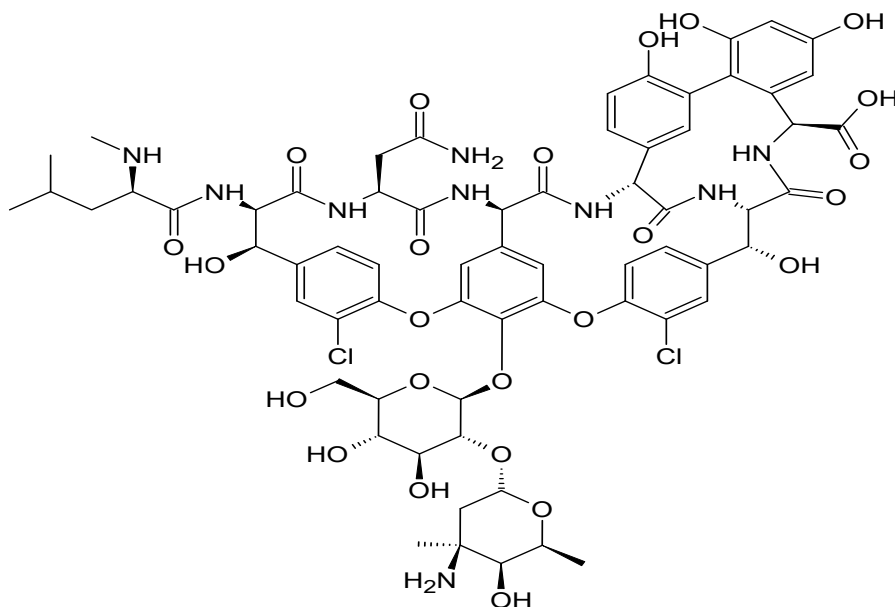
2.7.5 Descripción del antibiótico

2.7.5.1 Vancomicina

Los glucopéptidos son una estructura molecular compleja del antibiótico, que actúa principalmente sobre la pared bacteriana, que inhibe la formación de peptidoglucano. Se han utilizado durante aproximadamente 50 años, especialmente para tratar infecciones por bacterias Gram positivas, sobre todo en el ámbito hospitalario. El medicamento más importante en este grupo utilizado en la práctica clínica es la vancomicina y la ticoplanina (Revilla, 2009).

Estructura química

La vancomicina es un glicopeptido de estructuras tricíclicas, un antibiótico con peso molecular de 1448 g/mol de fórmula química $C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24}$. Su estructura incluye dos fragmentos de β -hidroxiclorotirosina, tres anillos aromáticos derivados de fenilglicina con sustituyentes, una amida formada a partir del ácido aspártico (N-metil-leucina), así como un disacárido compuesto por glucosa y vancosamina. Los grupos ionizables de la vancomicina le permiten unirse a iones metálicos y reconocer secuencias peptídicas en la pared celular bacteriana (Revilla, 2009).

Figura 7*Estructura de vancomicina****Mecanismo de acción***

Como glicopéptido, la vancomicina actúa como un equivalente estructural de la enzima glicopéptido sintetasa. Parece que se acopla al puente H, concretamente al péptido D-alanina de los residuos terminales de los peptidoglicanos, impidiendo la creación de transglicosilación y transpéptidos necesarios para la construcción final del peptidoglicano.

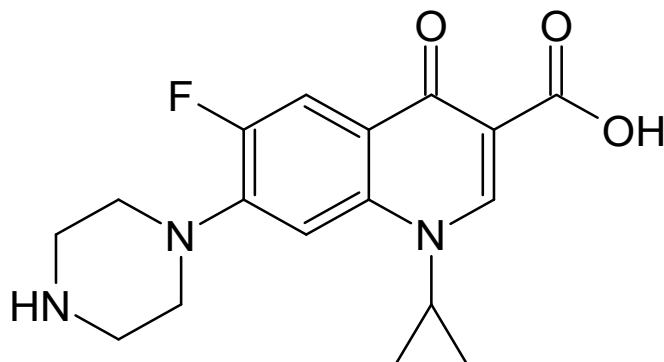
Este mecanismo impide la formación adecuada de la pared celular, afectando principalmente a bacterias Gram positivas, ya que en las Gram negativas el peptidoglicano está protegido por una membrana externa que impide el acceso del antibiótico. Adicionalmente, la vancomicina posee la habilidad de producir homodímeros que potencian su efecto de bloqueo al interferir estéricamente con la generación del peptidoglicano. Además, tiene efectos adversos tales como el cambio en la capacidad de la membrana celular y la restricción de la producción de RNA (Revilla, 2009).

2.7.5.2 Ciprofloxacina

La ciprofloxacina es una de las fluoroquinolonas, es un antibiótico utilizado para combatir infecciones provocadas por bacterias, tales como la neumonía y las infecciones urinarias. Aparte de esto, la ciprofloxacina se presenta como una opción de tratamiento para pacientes con infecciones mixtas o cuando existe el riesgo de infecciones por bacterias gramnegativas (Thai et al., 2023).

Estructura química

La ciprofloxacina, cuyo nombre químico es ácido-1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-(1-piperazinil) quinolin-3-carboxílico, tiene la fórmula molecular $C_{17}H_{18}FN_3O_3$ y un peso molecular de 331.5 g/mol. Su estructura es bicíclico heteroaromático, con un núcleo central de 1,4-dihidroquinolina. Los grupos carboxilo y ceto en las posiciones 3 y 4 facilitan la formación de puentes de hidrógeno y enlaces covalentes con las topoisomerasas bacterianas. El flúor en la posición 6 aumenta su unión a las topoisomerasas así como la penetración en la célula bacteriana. Por último, el grupo piperazinilo en la posición 7, un anillo heterocíclico, contribuye a su notable actividad biológica (Tolentino, 2016).

Figura 8*Estructura del ciprofloxacino****Mecanismo de acción***

La ciprofloxacina consiste en bloquear enzimas bacterianas, específicamente la ADN topoisomerasa y la ADN girasa, lo que interfiere con la replicación del ADN bacteriano. Entre las fluoroquinolonas, la ciprofloxacina es la más potente contra bacilos gramnegativos, principalmente enterobacterias como *E.coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* y *Neisseria spp.* Además, presenta actividad contra ciertos microorganismos grampositivos (Thai et al., 2023).

2.7.6 Staphylococcus aureus

Es una bacteria Gram positiva y forma racimos irregulares similares a uvas. Es inmóvil, libre de esporas y catalasa positivo. Crece rápida y abundantemente (J. Foster, 2002) Resistencia a ciertos antibióticos como la meticilina y puede causar diversas infecciones que afectan los tejidos blandos y la piel, los sitios intravasculares y los órganos internos (Chisaguano, 2018).

En general, el huésped debe brindar oportunidades para que *Staphylococcus aureus* se infecte, introducción de cuerpos extraños como heridas en la piel, infecciones quirúrgicas o catéteres venosos centrales, obstrucción de los folículos pilosos (foliculitis), o un sistema inmunitario debilitado. La enfermedad por *Staphylococcus aureus* puede ser una infección invasiva inducida por toxinas (Harvey et al., 2008).

2.7.6.1 Clasificación taxonómica

La especie *Staphylococcus aureus* se clasifica de la siguiente forma:

Según (Rosenbach, 1884).

Reino: Bacteria.

Filo: *Firmicutes*.

Clase: Bacilli.

Orden: *Bacillales*.

Familia: *Staphylococcaceae*.

Género: *Staphylococcus*.

Especie: *Staphylococcus aureus*.

2.7.7 *Escherichia coli*

Escherichia coli es un bacilo aeróbico Gram negativa perteneciente a la familia *Escherichia* Enterobacteriaceae (Vidal, 2006).

Escherichia coli se encuentra frecuentemente en el sistema gastrointestinal tanto de seres humanos como de animales. Se puede hallarse en el medio ambiente, en los alimentos y en agua contaminada. La infección extraintestinal resulta del contacto humano, causando cistitis, neumonía y pielonefritis. Esta infección representa al menos el 20 por ciento del total de infecciones urinarias (Castillejo & Trujillo, 2021).

2.7.7.1 Clasificación taxonómica

Según: (Migula, 1895)

Reino: *Bacteria*

Filo: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: *Enterobacteriales*

Familia: *Enterobacteriaceae*

Género: *Escherichia*

Especie: *Escherichia coli*.

2.7.8 Método Kirby-Bauer

El antibiograma se basa en la técnica de difusión en disco, de acuerdo con el estudio de Bauer Kirby. Es una de las metodologías que recomienda el NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Para determinar la sensibilidad de las bacterias hacia los antibióticos (Romero & Baldeón, 2019).

El antibiótico difunde radialmente en el agar al entrar en contacto con su superficie húmeda, formando un gradiente de concentración. Tras 18-24 horas de incubación, se observa un halo de inhibición alrededor de los discos, cuyo tamaño depende del agente antibacteriano, el microorganismo evaluado, la concentración y capacidad de difusión del compuesto, así como de las características del medio de cultivo y la velocidad de crecimiento bacteriano (Esteve & Soler, 2021).

Por tanto, cada antibacteriano tiene un diámetro de inhibición que esta estandarizado en mm, la lectura de los halos de inhibición se deben interpretar resistente (R), intermedia (I) o sensible (S), conforme a las categorías del NCCLS (Picazo, 2000).

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS GENERAL

La composición química del aceite esencial del *Tanacetum parthenium* L. determinado por CG-MS, tienen terpenos y presentan efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

HIPÓTESIS ESPECIFICOS

- Las características fisicoquímicas del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L. están dentro de parámetros óptimos.
- El aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L., presenta monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos.
- El aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L., presenta efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

VARIABLES DE INVESTIGACIÓN

VARIABLE INDEPENDIENTE

Aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L.

VARIABLE DEPENDIENTE

Efecto antibacteriano a diferentes concentraciones 100%, 75%, 50%, 25%, 12.5% y 6.25% del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L.

OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Tabla 3

Operacionalización de variables de la investigación

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Indicadores	método de medición	Unidad de análisis
Variable independiente Aceite esencial de <i>T. parthenium</i> L. caracterización fisicoquímica	Los aceites esenciales son sustancias aromáticas volátiles naturales. Conjunto de propiedades físicas y químicas que describen el aceite (calidad, pureza y estado).	Determinación experimental de propiedades fisicoquímicos siguiendo normas (NTP / ISO) y procedimientos estandarizados.	- Rendimiento de extracción (%). -Solubilidad. -Densidad relativa. - Índice de refracción (nD). - Índice de acidez (mg KOH/g). - Índice de saponificación (mg KOH/g). - Rotación óptica (°).	- Extracción por Hidrodestilación con trampa de Clevenger. - Solubilidad en disolventes - Picnómetro. - Refractómetro de Abbe. - Volumétrico - volumétrico titulación ácido-base (saponificación) - Polarímetro (rotación óptica).	-% Rendimiento -g/mL de densidad relativa. -nD (sin unidad). -mg KOH/g -mg KOH/g - grados (°)
Variable independiente Composición química del aceite esencial	Conjunto y proporción relativa de compuestos volátiles (monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanos) presentes en el aceite.	Análisis cualitativo y cuantitativo mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS).	- % área relativa de cada compuesto principal. - Identificación de los compuestos mayoritarios	GC-MS	-% área relativa -lista de compuestos.
Variable dependiente Efecto antibacteriano frente a <i>S. aureus</i> ATCC 29213 y <i>E. coli</i> ATCC 25922.	Capacidad del aceite para inhibir o reducir el crecimiento de <i>S. aureus</i> y de <i>E. coli</i> . en condiciones experimentales.	Ensayo de difusión en disco (halo), ensayo con controles positivo y negativo.	- Diámetro del halo de inhibición (mm). A diferentes concentraciones 100%, 75%, 50%, 25%, 12.5%.	- Kirby Bauer	(mm)

CAPITULO III

METODOLOGÍA

3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

El estudio de investigación es de naturaleza descriptivo y experimental de tipo causal.

Descriptivo porque se determina la caracterización fisicoquímica y composición química del aceite esencial a través de cromatografía de gases y espectrometría de masas.

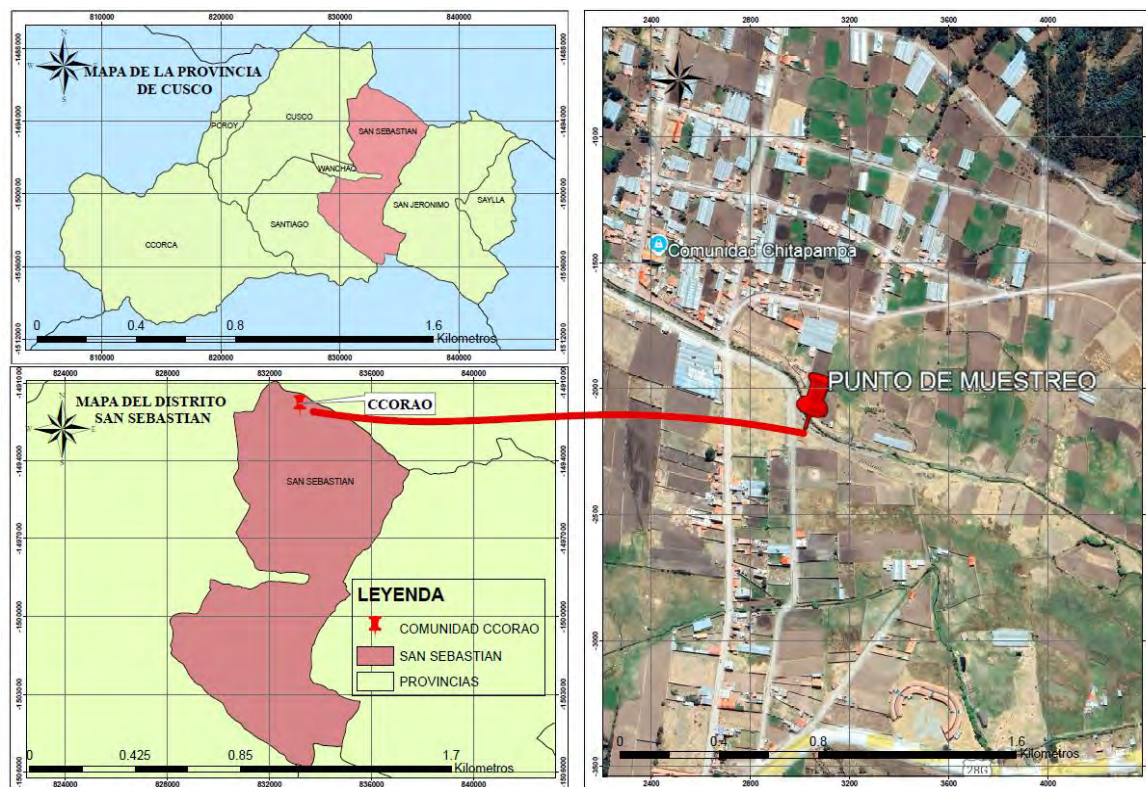
Experimental porque se determinó el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L. a diferentes concentraciones frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

3.2 UBICACIÓN GEOGRÁFICA DE LA TOMA DE MUESTRA

La ubicación es de la zona pedregosa de Quesermayo perteneciente a la Comunidad Ccorao en el distrito de San Sebastián, región Cusco, a una altitud de 3580 m.s.n.m. con las coordenadas geográficas del lugar de recolección -13.46685° de Latitud y Longitud -77.91958° UTM Zona:19L, Este: 183876 y Norte: 8509359.

Figura 9

Ubicación geográfica del distrito de San Sebastián-Ccorao



3.2.1 Muestreo

El muestreo ha sido no probabilística o dirigida por que se recolecto aleatorio simple intencionada. Se recolecto las partes aéreas de *Tanacetum parthenium* L. durante el estado de floración en mes de mayo y se seleccionó plantas sanas.

3.2.2 Recolección de muestras

Se ha obtenido una muestra representativa en buenas condiciones, constituida por la parte aérea de la planta, se recolecto aproximadamente 5Kg, se conservó en papel Kraft y transportado al laboratorio de Fitoquímica de la escuela profesional de Química, posteriormente, se llevó la muestra vegetal al Herbario Vargas, para la identificación taxonómica certificada por los expertos.

Al recolectar muestras de *Tanacetum parthenium* L., se tenía en cuenta las siguientes consideraciones como:

- A horas de la tarde.
- Clima: despejado.
- Tipo de muestra: flores, hojas y tallos sanos (simple intencional).
- Estado vegetativo: floración.

3.3 LUGAR DE PROCESAMIENTO

La investigación se realizó en el laboratorio de fitoquímica y analítica de la Escuela Profesional de Química. Se realizaron los siguientes procedimientos: obtención del aceite esencial, caracterización de las propiedades fisicoquímicas y determinación de la composición química por cromatografía gases y espectrometría de masas, con métodos y técnicas de laboratorio.

Las pruebas de efecto antibacteriano se desarrollaron en el laboratorio Biología celular de la Escuela Profesional de Biología.

3.3.1 Identificación taxonómica

Se recolectó el material aéreo de *T. parthenium* L. durante su floración, se secó dentro del papel y se llevó al Herbario Vargas para su identificación taxonómica.

3.3.2 Autorización de recolección - SERFOR

Se pidió el permiso para recolectar *Tanacetum parthenium* L., con el objetivo de hacer una investigación científica sobre la flora silvestre con colecta, para llevar a cabo la investigación científica titulada: “Composición química del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L. determinado por CG-MS y su efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922”. El muestreo se realizó de manera controlada y sin afectar la conservación de la especie dentro de la comunidad de Ccorao.

3.4 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

MUESTRA VEGETAL

Especie vegetal *Tanacetum parthenium* L. “santa maria” las partes aéreas.

MUESTRA BIOLÓGICO

- Cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.
- Cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922.

ANTIBIÓTICOS DE CONTROL

- Vancomicina y Ciprofloxacina.

MATERIALES DEL CAMPO

- Cámara fotográfica marca HUAWEI P30. Modelo ELE-L04.
- Cuaderno del campo.
- Papel Kraft.
- Tijera para cortar.
- Bolsa.
- Guantes.

MATERIALES DE LABORATORIOS

- Asa de siembra y aguja de kohle.
- Baguetas de vidrio.
- Embudo de vidrio.
- Erlenmeyer de 100mL.
- Frascos de color ámbar 20mL.
- Frascos de vidrio de 250-500mL.
- Goteros.
- Gradilla.
- Hisopo estéril.

- Matraz de fondo redondo de 500mL.
- Micropipetas marca Sciene Med de 100-1000 μ L
- Micropipetas Marca Sciene Med de 10-100 μ L.
- Papel Kraft 10x15mm.
- Picnómetro de 5mL.
- Pinza.
- Pipetas graduadas de 1-10mL.
- Pipetas Pasteur 5mL.
- Placa Petri 100x15mm.
- Probetas de 100mL.
- Puntas para micropipetas 50 μ l.
- Soporte universal.
- Termómetro de 100°C.
- Tubos de ensayo de 20mL.
- Tubos de ensayo de vidrio con tapa rosca (Pyrex 13 x 100 mm)
- Tubos eppendorf de 1.5mL.
- Vasos precipitados de 50-100mL.

REACTIVOS:

- Acetona (C_3H_6O) Q.P.
- Ácido clorhídrico (HCl) 0.1N Q.P.
- Agua destilada.
- Cloroformo ($CHCl_3$) Q.P.
- Etanol 96%, 70%, 50%.

- Etanol absoluto (C_2H_5OH) INDUQUIMICA S.R. Ltda.
- Éter etílico (C_4H_5O) Q.P.
- Fenolftaleína.
- Hexano (C_6H_{14}) Q. P.
- Hidróxido de sodio 0.1N Q.P.
- Hidroxido de potasio 0.1N Q.P.
- Metanol ($CH_3 - OH$) Q.P.
- n-heptano (C_7H_{16}) Q.P.
- Sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4).

MEDIOS DE CULTIVO

- Agar Mac Conkey marca HIMEDIA®.
- Agar Manitol Salada ReadyMED®.
- Agar Mueller Hinton HIMEDIA®.
- Caldo BHI MERX.

EQUIPOS DE LABORATORIO

- Autoclave, marca Numak, modelo LDZM-80KCS.
- Balanza analítica Marca Kern, Modelo ABS 320-4M.
- Balanza de precisión Marca RADWAG, Modelo PS 510/C/1.
- Centrifuga marca Hermle, modelo Z 206 A.
- Cromatografía de gases y espectrometro de masas marca Thermo Scientific, modelo trace 1310 con la librería Mainlib y wiley 7.
- Equipo de hidrodestilación con trampa de Clevenger Movilab.
- Estufa marca Thermo Scientific, modelo OGS 100.

- Incubadora modelo Tomos ODHG-9123A.
- Mechero Bunsen.
- Polarímetro marca Rudolph research analytical, modelo Autoplo 1.
- Refractómetro marca ABBE, modelo 2WAJ.
- Refrigeradora marca Samsung.
- Vernier digital 0-200 mm marca KAMASA.

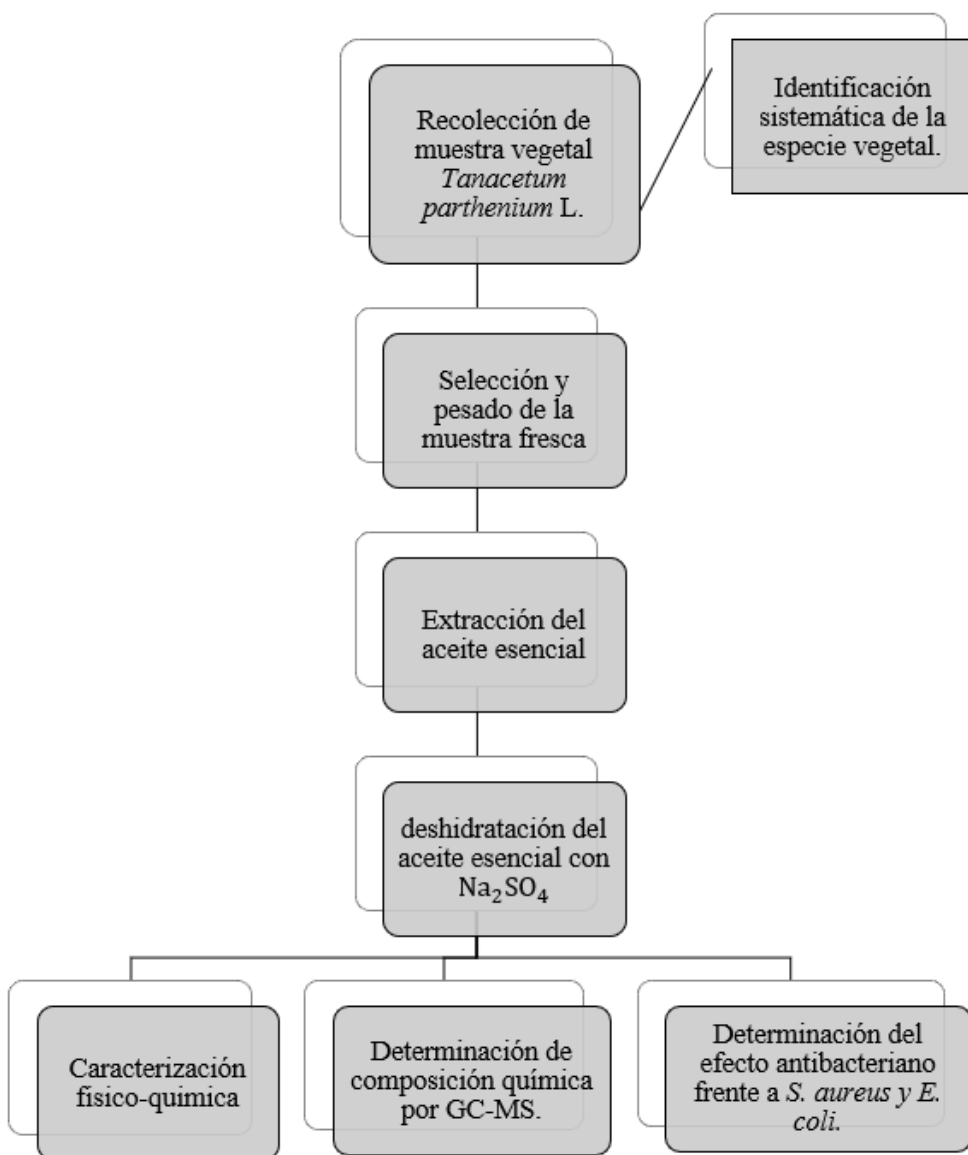
3.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

3.5.1 Procedimiento metodológico

El procedimiento metodológico desarrollado en la investigación se organizó en el siguiente diagrama.

Figura 10

Diagrama de flujo del estudio experimental



3.6 PREPARACIÓN DE MUESTRA

La muestra fue seleccionada en buen estado y posteriormente se trozó para su trasvase al equipo de hidrodestilación, usando una trampa de Clevenger, con el fin de obtener el aceite esencial.

3.7 OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL

MÉTODO: Extracción por hidrodestilación con trampa de Clevenger

PROCEDIMIENTO: Se pesó un promedio 429.219 g de *T. parthenium* L., y se colocó en un balón de vidrio usando 1000 mL de agua. El vapor extrae el aceite esencial de la planta, se recolecta el aceite en una trampa Clevenger, encontrándose el aceite en la parte superior y se traspasó el aceite con una pipeta Pasteur a un frasco ámbar, el volumen de aceite es el valor obtenido para calcular el rendimiento en porcentaje, se repitió el procedimiento hasta obtener 11.4 mL una cantidad de aceite esencial necesario para la investigación. Se añadió sulfato de sodio anhidro para eliminar el exceso de agua en los aceites esenciales.

$$\% \text{ Extracción} = \frac{\text{volumen de aceite obtenido (mL)}}{\text{peso de la muestra (g)}} \times 100\%$$

3.8 DETERMINACIÓN DE CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DEL ACEITE ESENCIAL

3.8.1 Prueba de solubilidad

La solubilidad se refiere a la formación de una mezcla homogénea de partículas entre aceites esenciales y con diferentes disolventes.

PROCEDIMIENTO: Se disolvió en 0.2 gotas (0.1 mL) de aceite esencial en 10 gotas de disolvente (agua, etanol 50 %, etanol 70%, etanol 96 %, etanol absoluto, metanol, acetona, cloroformo y hexano), siendo la muestra ligeramente soluble, insoluble.

TECNICA: NTP 319.084 (Espinoza & Cuya, 2017).

3.8.2 *Densidad relativa*

La relación entre masa y volumen se conoce como densidad relativa (Ceballos, 2012).

Formula: $\rho = \frac{P_2 - P}{P_1 - P}$

Donde:

ρ = densidad relativa.

P = peso del picnómetro vacío.

P_1 = peso del picnómetro lleno con agua destilada a 20°C.

P_2 = peso del picnómetro lleno con aceite esencial a 20°C.

PROCEDIMIENTO: Se peso el picnómetro limpio, seco y vacío en la balanza analítica y se registró el peso, luego se pesó el picnómetro con agua destilada (hasta llenarlo), de igual manera, se repitió la técnica, pero usando aceite esencial, se anotó los resultados obtenidos.

TECNICA: NTP N° 279 (INDECOPI, 2011).

3.8.3 *Índice de refracción*

El índice de refracción de cada interfaz es una característica especial que cambia según la temperatura y la longitud de onda de la luz que se estudia. Encuentra la velocidad a la que la luz viaja a través de un medio uniforme e indica la presencia de compuestos oxigenados aromáticos (Ceballos, 2012).

PROCEDIMIENTO: Antes de agregar la muestra, se calibro el refractómetro con agua destilada. Un corriente de agua circula a través del refractómetro apuntando a una temperatura del refractómetro de 20°C. se colocó una gota de aceite esencial en un prisma limpio y seco, se esperó que la temperatura se estabilice y se determinó la lectura en el refractómetro.

TECNICA: NTP 280-2011 (revisado en 2016) (Espinoza Rojas & Cuya Arias, 2017).

3.8.4 *Índice de acidez*

Se define como índice de acidez de un aceite a la cantidad de miligramos de hidróxido de potasio que se requiere para neutralizar los ácidos libres presentes en un gramo del aceite (Guenther, 1947).

Formula:

$$IA = \frac{56.1 * Vg * 0.1N}{P}$$

Donde:

Vg= mL gastado de KOH.

56.1= Meq de KOH en mg.

P = Peso de muestra en gramos.

PROCEDIMIENTO: Se colocó 0.3685 g de aceite esencial en un matraz Erlenmeyer de 100 mL, después se añadió 10 mL de alcohol neutralizado y 3 gotas de fenolftaleína. Luego, se tituló con solución hidróxido de potasio 0.1N hasta observar un cambio de color a rosado y se anotó el volumen gastado.

TECNICA: NTP 319.085 (INDECOPI, 2016), (Espinoza Rojas & Cuya Arias, 2017).

3.8.5 *Índice de saponificación*

Es la cantidad de miligramos de hidróxido de potasio que se necesita para saponificar un gramo de aceite.

FORMULA

$$IS = \frac{56.1 * N * (V_0 - V_1)}{m}$$

Donde:

N = concentración de HCl 0.1N.

56.1 = Meq de KOH en mg.

V_o = Volumen gastado en mL de HCl en blanco.

V_1 = volumen gastado en mL de HCl en la muestra.

m = masa en gramos de la muestra.

PROCEDIMIENTO: Se pesó 0.3123 g de aceite esencial en un matraz de fondo redondo de 500mL y se agrego 10 mL de KOH 0.1N se reflujo durante 1 hora, luego se dejó enfriar y se añadió 3gotas de indicador de fenolftaleína, se tituló con HCl 0.1N, hasta que el color rosado de la fenolftaleína desaparezca. Se procedió a realizar el mismo procedimiento para prueba en blanco usando aceite esencial sin hidrolizar.

TÉCNICA: NTP 319.088:1974. (Espinoza Rojas & Cuya Arias, 2017).

3.8.6 Rotación óptica

Esta técnica se trata de medir la rotación óptica de un rayo de luz polarizada que pasa por un material ópticamente activo. La cantidad de moléculas quirales y la estructura molecular desempeñan un papel en la determinación de la rotación óptica y el nivel de actividad óptica de un aceite se expresa en grados de rotación (Martínez, 2017).

PROCEDIMIENTO: Se agregó 0.1 mL de aceite esencial a un vaso precipitado, se disolvió en 10 mL de etanol absoluto y luego se llenó por completo en el tubo de contención. Luego se colocó la muestra en el polarímetro y se midió la rotación óptica.

TÉCNICA: NTP 319.076 (Espinoza & Cuya, 2017).

3.9 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA

3.9.1 *Cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-MS)*

Es una técnica que determina la composición química del aceite esencial.

PROCEDIMIENTO: Se preparó el aceite esencial de *Tanacetum parthenium* 100 μ L diluido con 500 μ L de n-heptano en un vial de 1 mL para el análisis. Fue analizado por GC-MS, el GC con modelo Trace 1310 Thermo Scientific, así como la columna cromatográfica TG-5SILMS de 30 m x 0.25 mm de diámetro interno y un espectrómetro de masas de Modelo ISQ QD Thermo Scientific. Los análisis se realizaron en las siguientes circunstancias: la secuencia de temperatura del horno comenzó a 70°C y tras de 2 minutos aumentó a 250 °C, con un aumento de 5°C/min, manteniéndose así. El helio fue el gas portador utilizado, con un flujo de 1 mL/min, con la temperatura del inyector y del detector establecida en 250 °C.

La prueba se llevó a cabo por un periodo de 50 min. Al finalizar la prueba, se obtuvieron cromatogramas y se determinó el porcentaje de cada componente basándose en el área del pico en comparación con el área total de todos los picos, el espectro de masas fue utilizado para identificar los componentes presentes en cada uno de los cromatogramas.

Los parámetros utilizados en el espectrómetro de masas fueron: la temperatura de la fuente fue de 250°C y la del cuadrupolo, de 150°C; además, se usó un rango de masas que abarcaba desde 40 hasta 400 m/z y una energía de ionización de 70 eV. Los compuestos de los aceites esenciales se reconocieron por el tiempo de retención mediante la GC-MS, que corresponde a cada uno de estos componentes. Asimismo, se recurrió a datos de librería Mainlib y Wiley 7 para identificar los compuestos obtenidos.

3.10 DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO MEDIANTE LA TÉCNICA DE KIRBY-BAUER.

La técnica de Kirby-Bauer es una de las técnicas que recomienda el NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Para determinar la sensibilidad de las bacterias hacia los antibióticos (Romero & Baldeón, 2019).

Se utilizó el método de Kirby-Bauer, para determinar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L. contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

3.10.1 Elaboración de los medios de cultivo

Se prepararon los medios de cultivo según las indicaciones del fabricante y de acuerdo a las investigaciones:

Preparación de agar Mueller Hinton: para la determinación de la sensibilidad antibacteriana, se pesaron 11.4 g de agar Mueller Hinton, los cuales se disolvieron en 300mL de agua destilada. El medio de cultivo fue esterilizado en autoclave durante 15 minutos a 121°C, posteriormente se dejó enfriar hasta 45-50°C. Luego, se distribuyeron 20 mL del agar preparado en cada placa Petri, obteniéndose un espesor aproximado de 4 mm. Finalmente, las placas se dejaron solidificar y se conservaron en refrigeración hasta su uso.

Preparación de agar Manitol Salado: Para el aislamiento de *Staphylococcus aureus*, se pesaron 22.2 g de agar Manitol Salado, los cuales se disolvieron en 200 mL de agua destilada. El medio de cultivo fue esterilizado en autoclave durante 15 min a 121°C y posteriormente se dejó enfriar hasta 45-50°C. Luego, se distribuyeron 20 mL del agar preparado en cada placa Petri. Finalmente, las placas se dejaron solidificar y se conservaron en refrigeración hasta su uso.

Preparación de agar Mac Conkey: para el aislamiento de *Escherichia coli*, se pesaron 10.31 g de agar MacConkey, los cuales se disolvieron en 200 mL de agua destilada. El medio de cultivo fue esterilizado en autoclave durante 15 min a 121°C y posteriormente se dejó enfriar entre 45-50 °C. Luego, se repartió 20 mL del agar preparado en una placa Petri. Finalmente, la placa se dejó solidificar y se conservaron en refrigeración hasta su uso.

Caldo BHI (Caldo Brain Heart Infusión): se pesó 0.925 g de BHI y se disolvió en 25mL de agua destilada. Fue esterilizado el caldo en autoclave a 121°C durante 15min. Este caldo se utilizó para mantener vivas las cepas de microorganismos en tubos de ensayo.

3.10.2 Activación de cepas ATCC

La activación de los microorganismos se realizó siguiendo las sugerencias del fabricante: El hisopo que contiene la cepa ATCC fue saturado en el material hidratado y posteriormente se trasladó a medios de cultivo selectivos para cada microorganismo: para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 en agar Manitol Salado para *Escherichia coli* ATCC 25922 en agar Mac Conkey. Se incubó a 35-37°C por 24-48 horas (Montero *et al.*, 2018).

3.10.3 Determinación de sensibilidad antibacteriano

Se determinó mediante el método Kirby-Bauer modificado en pozos (Montero *et al.*, 2018).

Sensibilidad antibacteriana, según método de pozo excavado

1. El aceite esencial fue preparado en concentraciones de 100%, 75%, 50%, 25%, 12.5% y 6.25% utilizando etanol absoluto como diluyente.
2. Luego se activó las cepas ATCC en agar selectivo para cada microorganismo.
3. Se inoculó cepas de ATCC en 5 ml del caldo BHI contenidos en tubos de ensayo con tapa y se incubaron a 37°C por 5 horas.
4. En placas con agar Mueller Hinton previamente preparadas se realizaron tres perforaciones de 5.5 mm de diámetro a una distancia de 22 mm.

5. Cada cepa ATCC fue sembrada de manera homogénea sobre la superficie del agar mediante diseminación con hisopo estéril.
6. Se aplicó a la perforación 50 µL de cada concentración del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L. realizándose el ensayo por triplicado en placas con agar Mueller Hinton.
7. Las placas fueron incubadas a 37°C durante un periodo de 24-72 horas.
8. Al mismo tiempo, se utilizaron patrones de sensibilidad a los antibióticos para cada cepa: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 Vancomicina.
Escherichia coli ATCC 25922 Ciprofloxacina.
9. Se llevaron a cabo las lecturas de los halos de inhibición desde las 24 horas y se confirmaron entre 48-72 horas de incubación.
10. Para medir los diámetros de los halos de inhibición, se utilizó un vernier.

Duraffourd (1983) presenta las siguientes pautas para clasificar de manera cualitativa, el grado de sensibilidad que presentan las bacterias ante diferentes compuestos. La escala de Duraffourd es para determinar la sensibilidad de la bacteria (Robalino et al., 2021), de acuerdo al diámetro del halo.

- Sensibilidad nula: igual o menor a 8 mm
- Sensibilidad limite o baja: comprendido entre 8 a 14 mm.
- Mayor sensibilidad: entre 14 y 20 mm.
- Altamente sensible: igual o superior a 20 mm.

3.11 ANALISIS ESTADISTICO.

Para el análisis estadístico se analizaron estadística y cualitativamente mediante análisis de varianza (ANOVA) utilizando el software SPSS versión 30, mientras que para el análisis cualitativo se realizó con la escala Duraffourd. Por lo tanto, para el estudio estadístico, se formuló las siguientes hipótesis.

Hipótesis Nula (H_0): Puede el aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L., no ejercer efecto antibacteriano sobre la cepa de *Escherichia coli*.

Hipótesis de alterna (H_1): Puede el aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L. ejerce efecto antibacteriano sobre la cepa de *Staphylococcus aureus*.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL

Los resultados de los porcentajes de extracción del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L. se muestra en la tabla 4.

Tabla 4

porcentaje de extracción del aceite esencial

<i>Tanacetum parthenium</i> L.		
Peso de la muestra (gr.)	Vol. (mL) de aceite esencial	% de extracción
404.236	2.1	0.52
424.773	2.4	0.57
428.781	2.3	0.54
448.365	2.4	0.54
439.939	2.2	0.50
$\bar{X}= 429.219 \text{ g}$	$\bar{X}= 2.28 \text{ mL}$	$\bar{X}= 0.531\% \pm 0.02$

Según se muestra en la tabla 4, el promedio de extracción peso/volumen para la especie *Tanacetum parthenium* L., es de $0.531\% \pm 0.02$ determinado mediante el procedimiento de hidrodestilación con trampa de Clevenger.

Comparando con los resultados obtenidos en el estudio de Izadi et al., (2010) el porcentaje de extracción fue de las partes aéreas de 3.80 % en Hamedan y entre 4.96 % en Teheran, lo cual muestra que la especie *Tanacetum parthenium* L. tiene mayor cantidad de aceite esencial en comparación a la presente investigación. Por otro lado, Shahhoseini et al., (2019) evaluaron el potencial fitoquímico y obtuvo el promedio de extracción del aceite esencial de 0.84 %,

Mohsenzadeh et al., (2011) obtuvieron un porcentaje de extracción del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L. 1.02 % (p/v) en la etapa de floración, mediante la hidrodestilación con trampa de Clevenger. Lo cual muestra que los valores de etapa de floración superan este promedio de investigación, puede deberse a la variedad de especie o condiciones ecológicas o tipo de suelo.

4.2 PRUEBAS DE SOLUBILIDAD DEL ACEITE ESENCIAL

Los resultados de la solubilidad del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L. se presenta en la tabla 5, están ordenados en función de la polaridad de los disolventes.

Tabla 5

Resultados de la solubilidad del aceite esencial

Disolvente	Solubilidad
Agua	-
Etanol 50%	-
Etanol 70%	++
Etanol 96%	+++
Etanol absoluto	+++
Metanol	+++
Acetona	+++
Cloroformo	+++
Hexano	+++

Nota. Muy soluble = +++ Soluble = ++ Poco soluble = + Insoluble = -

Los resultados de la tabla 5, indican que el aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L., es insolubles en disolvente polares en agua y Etanol 50 %, soluble en etanol 70 %, muy solubles en etanol de 96 %, etanol absoluto y Metanol. En disolventes apolares, la acetona, el hexano y el cloroformo son altamente solubles. Estos resultados nos ayudan a entender que la mayoría de las moléculas que componen estos aceites esenciales son predominantemente apolares y de polaridad media.

Según Zuñiga, (2022) obtuvieron que el aceite esencial de *Tanacetum vulgare*, es muy soluble en disolventes de polaridad mediana y apolares, pero insoluble en disolventes altamente polares. Esto indica que sus componentes son principalmente de naturaleza apolar y medianamente polar. Sin embargo, la diferencia en la solubilidad del aceite de *Tanacetum parthenium* L., es en etanol al 70 % que es soluble y en *Tanacetum vulgare* es poco soluble podría deberse a una mayor presencia de compuestos oxigenados. Esta variación puede estar relacionada con factores propios de la especie, condiciones ambientales y método de extracción. Ambos aceites esenciales presentan una composición principalmente apolar y polar. Los resultados obtenidos respaldan (Valdez, 2021) cuando mayor sea la solubilidad, más compuesto oxigenado tendrá.

4.3 DE CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICAS DEL ACEITE ESENCIAL

La tabla 6 presenta las propiedades físicoquímicas determinados para el aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L.

Tabla 6

Características físicas y físicoquímicas del aceite esencial

CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES	
Apariencia	Líquido Aceitoso
Color	Amarillo pálido
Olor	fresco y amargo
Densidad Relativa a 20 °C (g/mL)	0.9618 ± 0.0002
Índice de refracción 20°C	1.4681 ± 0.0007
Rotación óptica	$+0.060^\circ \pm 0.02$
Índice de acidez (mg KOH/g aceite)	1.5016 ± 0.02
Índice de saponificación (mg KOH/g aceite)	35.015 ± 1.28

Según la tabla 6, el aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L., mostró una densidad relativa de 0.9618 g/mL, un índice de refracción de 1.4681 y rotación óptica de + 0.060; además, su índice de acidez fue de 1.5016 mg KOH/g y su índice de saponificación fue de 35.015 mg KOH/g.

Los resultados de la investigación actual muestran que la densidad relativa de 0.9618 g/mL a 20 °C y el índice de refracción 1.4681 del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L. están en el rango típico de los aceites esenciales, evidenciando que el producto es menos denso que el agua.

Asimismo, el valor del índice de refracción sugiere la probable presencia de monoterpenos, principalmente oxigenados. Ambos parámetros constituyen indicadores de calidad y autenticidad del aceite esencial. Estos resultados muestran coherencia con los reportes de Zúñiga (2022) que informó la densidad de 0.9293 g/mL e índice de refracción de 1.4648 del aceite esencial *Tanacetum vulgare*, mientras que Solís et al. (2018) registraron 0.9315g/mL de densidad y 1.4548 índice de refracción, respectivamente. La similitud entre los valores obtenidos por ambos autores y reportado en esta investigación sugiere que las especies del género *Tanacetum* presentan características fisicoquímicas comparables, asociadas a una composición terpenoide similar y a la estabilidad de sus aceites esenciales bajo condiciones adecuadas de extracción y conservación.

Según Martínez (2017), la rotación óptica es influenciada por la estructura molecular y la cantidad de moléculas quirales en una sustancia que presenta actividad óptica. En el aceite de *Tanacetum parthenium* L. se encuentran compuestos quirales como el carveol y el borneol. El carveol presenta un solo centro quiral, mientras que el borneol posee varios centros quirales debido a su estructura bicíclica, lo que contribuye potencialmente a la actividad óptica del aceite esencial. La rotación óptica obtenida fue de $+0.060^\circ$, lo que muestra una leve actividad óptica de carácter dextrógiro. Este valor evidencia la presencia de compuestos quirales; sin embargo, el bajo valor obtenido sugiere una escasa predominancia enantiomérica y una posible compensación parcial entre enantiómeros, consistente con la naturaleza compleja del aceite esencial.

En comparación, Solís et al. (2018) y Zúñiga (2022) reportaron valores levógiros de -0.161° y -0.135° para *T. vulgare*. Estas diferencias reflejan variaciones en la composición enantiomérica y en los compuestos ópticamente activos entre las distintas especies del género *Tanacetum*.

El aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L., mostró un índice de acidez de 1.5016 mg KOH/g, lo que indica que hay una mínima existencia de ácidos libres y por lo tanto una buena

estabilidad química del aceite. En comparación, Zuñiga (2022) reportó un valor menor (0.870 mg KOH/g), lo cual también corresponde a un aceite esencial fresco de buena estabilidad. En conjunto, el valor obtenido en esta investigación se encuentra dentro de un rango aceptable, reflejando un aceite esencial con buena calidad y bajo nivel de oxidación.

El aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L., presentó un índice de saponificación de 35.015 mg KOH/g, considerado relativamente bajo, lo que indica una baja presencia de ésteres, Sin embargo, este valor es superior al reportado por Solís et al. (2018) para *T. vulgare* (20.30 mg KOH/g), lo que sugiere que *Tanacetum parthenium* L., contiene una mayor cantidad de compuestos con un peso molecular bajo o ligeramente oxigenados que reaccionan con el hidróxido de potasio. Las diferencias entre ambas especies pueden deberse a variaciones en su composición química y las condiciones del medio ambiente, que influyen en la cantidad de esterres presentes. En general, el resultado indica que el aceite de *Tanacetum parthenium* L., es más reactivo y contiene más compuestos oxigenados que la especie de *Tanacetum vulgare*.

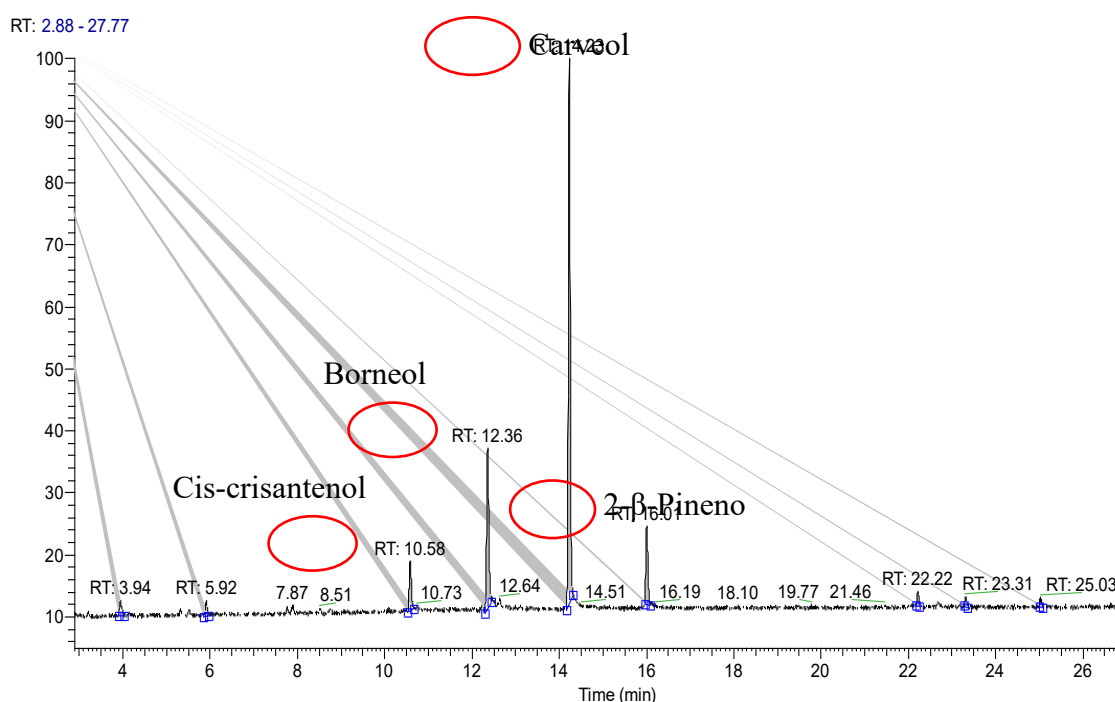
4.4 DE COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Tanacetum parthenium*

L.

La interpretación del perfil cromatográfico se fundamenta en el número de picos, cada uno correspondiente a un componente con un tiempo de retención específico, como se observa en la Figura 11.

Figura 11

Perfil cromatográfico del aceite esencial de Tanacetum parthenium L.



En este caso, el cromatograma muestra nueve picos a diferentes tiempos de retención (RT), donde el compuesto más abundante se detalla en la tabla 7. Los espectros de masas adquiridos se compararon con los de la base de datos de las librerías Mainlib y Wiley 7 para identificar los componentes del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L.

Tabla 7*Composición química del aceite esencial de Tanacetum partheium L.*

N° pico	Nombre del compuesto	RT	Area	% de abundancia
1	NI	3.94	8407596	2.29
2	Ácido pterina-6-carboxílico	5.92	6935643	1.89
3	Cis-Crisantenol	10.58	22184046	6.04
4	Borneol	12.36	71666393	19.52
5	Carveol	14.23	2.11E+08	57.47
6	2-β-Pineno	16.01	34437685	9.38
7	NI	22.22	5336158	1.45
8	NI	23.31	3616511	0.99
9	NI	25.03	3545694	0.97

Nota. N.I.: compuesto no identificado, RT: Tiempo de retención, %: Porcentaje de abundancia.

En la tabla 7, el AE de *Tanacetum parthenium* L. muestra que los componentes mayoritarios fueron: Carveol (57.47 %), Borneol (19.52 %), 2-β-pineno (9.38 %) y cis-Crisantenol (6.04 %); por lo tanto, los monoterpenos son el componente químico mayoritario de aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L.

Según Coban et al., (2019), los principales compuestos del aceite fueron alcanfor (39.47 %) y guaiol (5.21 %). En esta investigación, el guaiol se detectó por primera vez en *Tanacetum parthenium* L., ya que en estudios anteriores no había sido reportado. Estas diferencias en la composición química podrían deberse a variaciones en las condiciones ecológicas y geográficas, que influyen directamente en la formación y proporción de los compuestos del aceite esencial.

Según la bibliografía, se observaron diferencias notables en la composición química del aceite esencial. Lazarević et al., (2021) reportaron como componentes principales el alcanfor

(44.75%) y el trans-acetato de crisantenilo (28.97%), mientras que Mohsenzadeh et al., (2011) e Izadi et al., (2013) también encontraron al alcanfor y al acetato de crisantenilo como componentes predominantes, junto con menores cantidades de canfeno, borneol e isovalerato de bornilo. En cambio, el *Tanacetum parthenium* L. analizado en esta investigación mostró una composición diferente, destacando el carveol y el borneol como compuestos mayoritarios. Estas diferencias pueden explicarse por factores ecológicos en las que crece esta especie, las condiciones climáticas, el tipo de suelo o la zona geográfica de recolección.

Figura12

Componentes mayoritarios del aceite esencial de Tanacetum parthenium L.

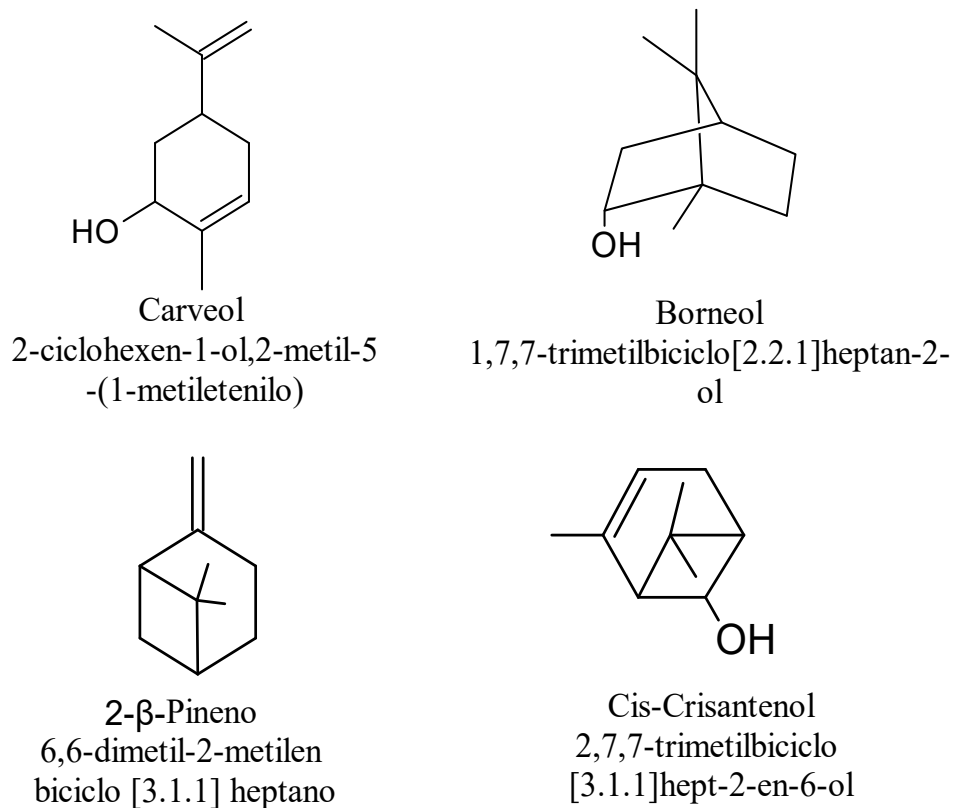
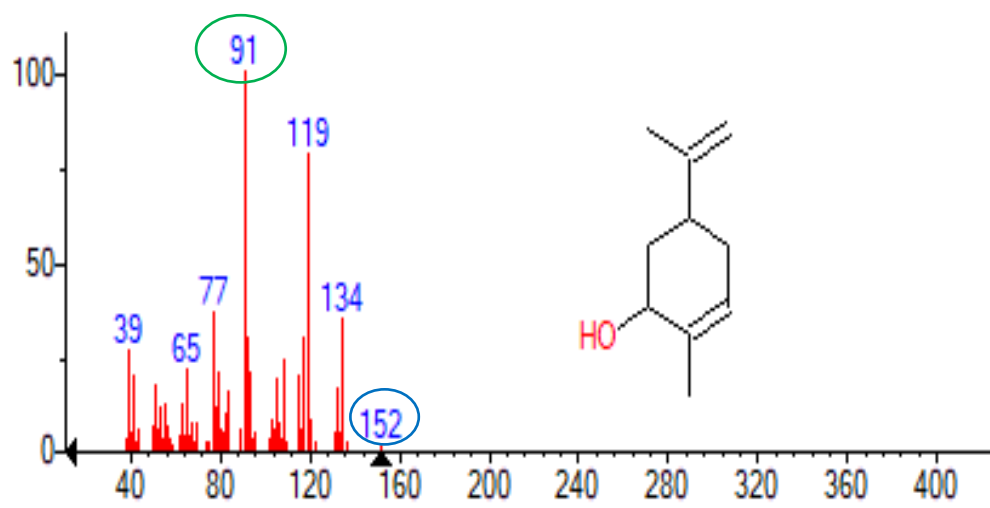


Figura 13

Espectro de masas del componente mayoritario del carveol

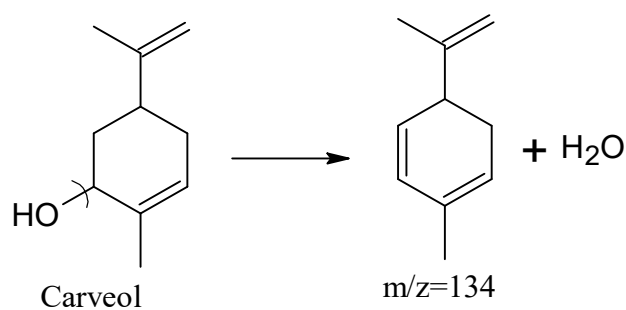


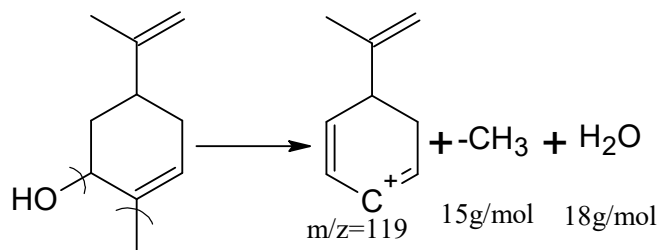
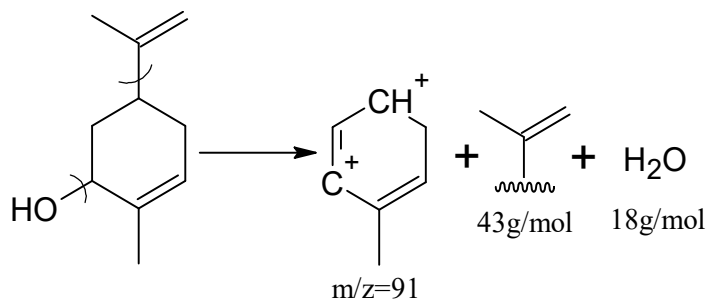
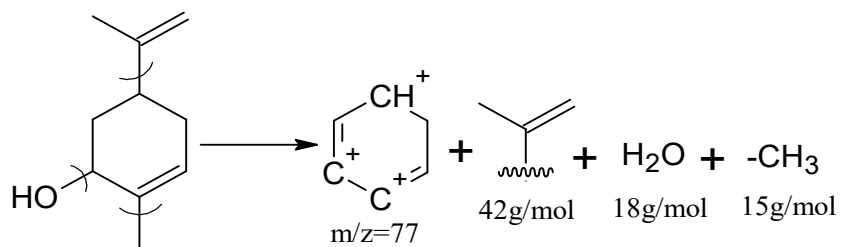
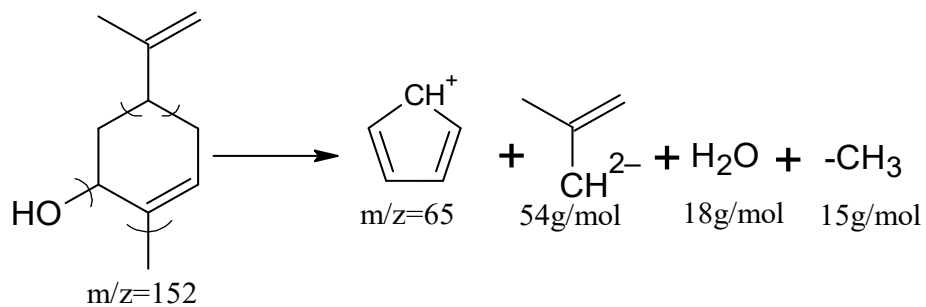
Espectro de masa correspondiente al Carveol (2-ciclohexen-1-ol, 2-metil-5-(1-metiletlenilo) se aprecia en la figura 13 el pico de $m/z=152$, que corresponde al peso molecular del compuesto. El pico de m/z 91 siendo el ion más estable y el fragmento más abundante correspondiente al fragmento Tropilio o bencilo ($M-C_7H_7^+$) perdió el fragmento isopropinilo (43 g/mol) y agua (18 g/mol).

Como se observa en la interpretación de los siguientes picos de cada fragmento ionizado del carveol.

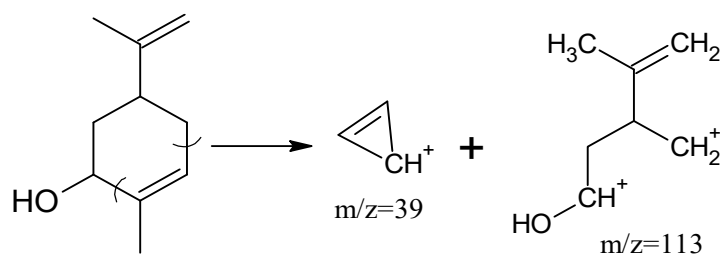
PICO CON M/Z=134

$m/z=152-134$



PICO CON M/Z=119**PICO CON M/Z=91****PICO CON M/Z=77****PICO CON M/Z 65**

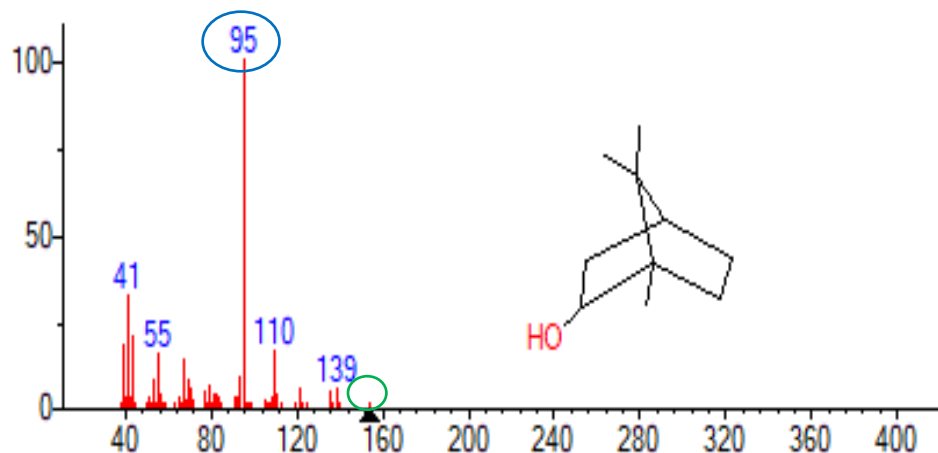
PICO CON M/Z 39



Se aprecia en el pico de $m/z=152$, que es el peso molecular del carveol, al igual que los distintos picos con sus respectivas masas.

- El pico m/z 134 el fragmento y el ion estable que corresponde ($M-C_{10}H_{14}$) este fragmento perdió la molécula de agua (18g/mol)
- El pico m/z 119 el fragmente que corresponde ($M-C_9H_{11}$) el fragmento perdió grupo metilo (15g/mol) y agua (18g/mol).
- El pico m/z 77 siendo el fragmento ion fenilo ($M-C_6H_5^+$) el fragmento perdió el grupo isopropinilo, hidroxilo y metilo.
- El pico m/z 65 siendo el fragmento ciclopentadienilo ($M-C_5H_5^+$) el fragmento perdió el grupo isobutileno, hidroxilo y metilo.
- El pico m/z 39 siendo el fragmento que corresponde al ($M-C_3H_3^+$) el fragmento perdió $C_7H_{12}O$ (3,4-dimetilpent-4-en-1-ol).

El espectro de masas del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L. mostró un ion molecular principal en $m/z = 152$, correspondiente al carveol, confirmando su identidad como componente mayoritario. Los fragmentos observados en m/z 134, 119, 91, 77, 65 y 39 evidencian pérdidas características de grupos metilo, hidroxilo, isopropinilo y típicas de monoterpenos oxigenados. Estos patrones de fragmentación confirman la estructura del carveol y su alta proporción en el aceite esencial, lo que sugiere que es uno de los principales responsables de sus propiedades químicas y biológicas.

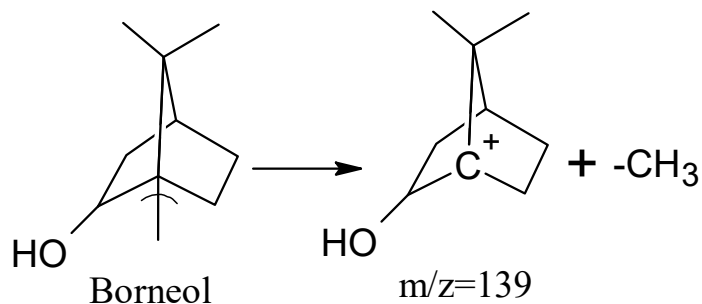
Figura 14*Espectro de masas del Borneol*

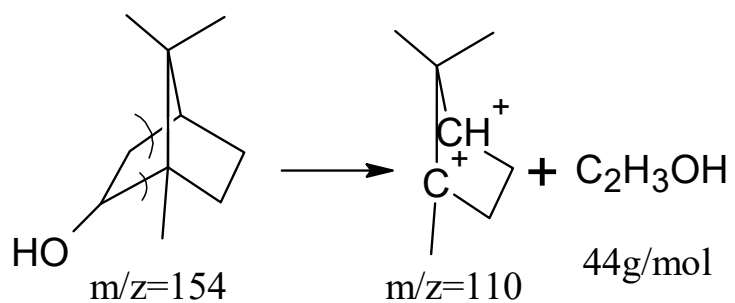
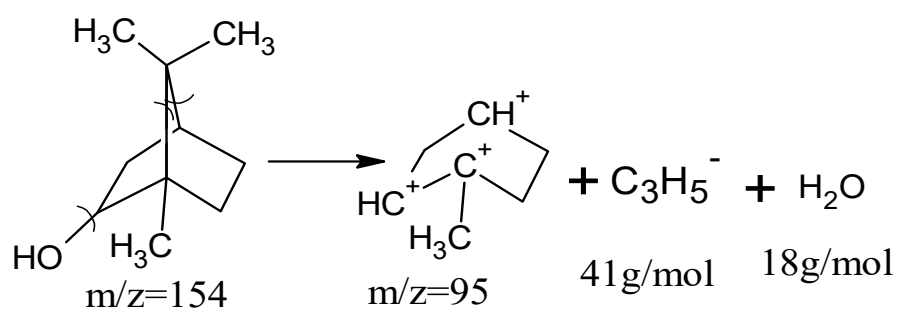
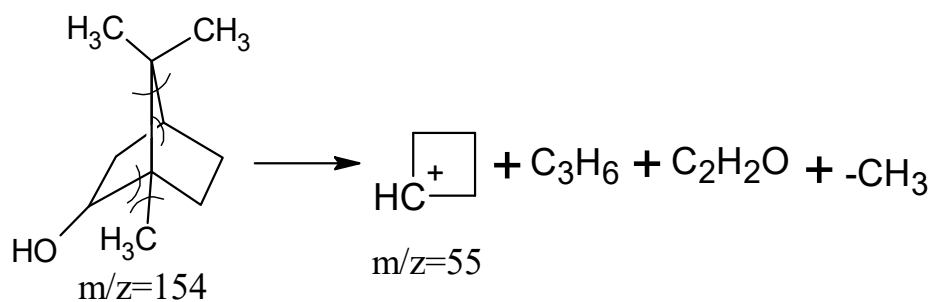
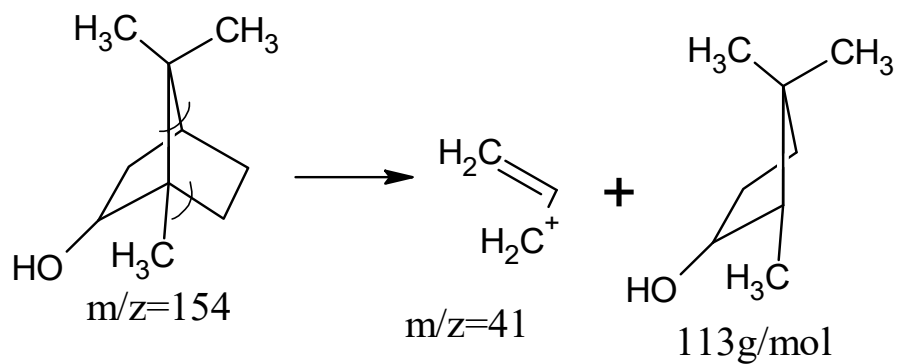
Espectro de masa correspondiente al Borneol (1,7,7- trimetilbiciclo [2.2.1]heptan-2-ol), se aprecia en la figura 14, se observa el ion molecular con un valor de $m/z = 154$, que es el peso molecular del compuesto. El pico m/z 95 siendo el ion más estable y el fragmento más abundante que corresponde al fragmento catión 1- metilciclohexano ($M-C_7H_{11}^+$) además perdió ($M-59$) correspondiente al isopropilo (C_3H_5) y H_2O .

Como se observa en la interpretación de los siguientes picos de cada fragmento ionizado del borneol.

PICO CON M/Z 139

$$m/z=154-139=15$$



PICO CON M/Z 110**PICO CON M/Z 95****PICO CON M/Z 55****PICO CON M/Z 41**

Se observa el pico con un valor de $m/z=154$, que corresponde al peso molecular del borneol. Asimismo, se registra distintos picos con sus masas.

- El pico m/z 139 el fragmento y el ion estable que corresponde ($M-C_9H_{15}O$) este fragmento perdió el radical ($M-15$) correspondiente al metilo ($-CH_3$).
- El pico con un valor m/z 110 corresponde al fragmento ($M-C_8H_{14}$), al ionizarse perdió ($M-44$) correspondiente a un radical derivado del etanol C_2H_4O .
- El pico de m/z 55 siendo el fragmento ion ciclo butilo ($M-C_4H_7^+$) el fragmento perdió ($M-99$) correspondiente al grupo isopropinilo, acilio y metilo.
- El pico de m/z 41 siendo el fragmento que corresponde a catión alilo ($M-C_3H_5^+$) perdió ($M-113$) el grupo 2,3,3-trimetilciclopentan-1-ol.

Los componentes mayoritarios del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L., son carveol y borneol ambos monoterpenos hidroxilados cuya presencia se confirmó mediante espectrometría de masas. Los iones moleculares y fragmentos característicos observados respaldan su correcta identificación y evidencian una alta pureza y estabilidad química del aceite. La predominancia de estos compuestos sugiere que el aceite esencial posee una composición rica en compuestos bioactivos, responsables de sus propiedades aromáticas y biológicas.

4.5 DE DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO POR EL MÉTODO DEL KIRBY BAUER

Tabla 8

*Resultados descriptivos de los diámetros de los halos de inhibición del efecto antibacteriano del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L., frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 en 24-72 horas*

Concentración (%) del aceite esencial <i>Tanacetum parthenium</i> L.	N	Promedio halos de inhibición (mm)	Error estándar	95% de intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo	Nota: Datos
				Límite inferior	Límite superior			
6.25	3	12.85 ± 2.29	1.32	7.18	18.54	10.92	15.38	
12.5	3	13.77 ± 1.24	0.71	10.70	16.85	12.65	15.1	
25	3	15.23 ± 2.66	1.54	8.61	21.85	12.97	18.17	
50	3	16.48 ± 2.35	1.36	10.64	22.32	14.75	19.16	
75	3	17.21 ± 2.25	1.30	11.63	22.80	14.73	19.11	
100	3	31.16 ± 9.40	5.42	7.82	54.50	23.57	41.67	
Vancomicina 30 µg	2	19.66 ± 0.25	0.18	17.43	21.88	19.48	19.83	
Total	20	17.97 ± 6.94	1.55	14.73	21.22	10.92	41.67	

estadísticos del Estudio.

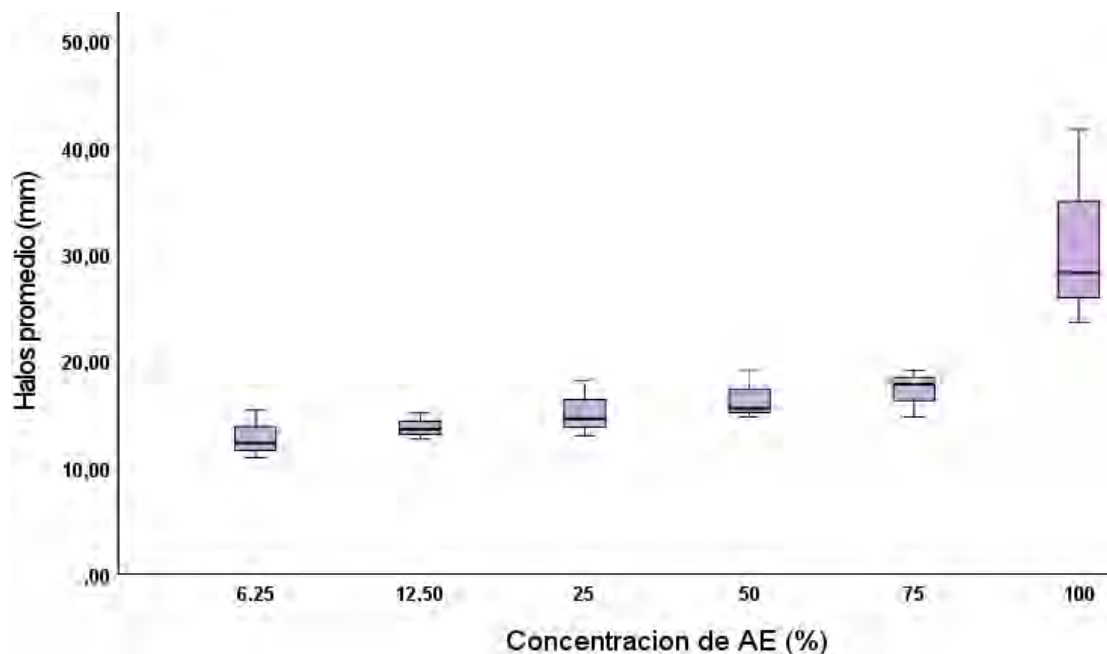
En la tabla 8, Se observa que, al incrementar la concentración del aceite esencial, los diámetros de los halos de inhibición se extienden progresivamente, desde 12.85 mm a una concentración del 6.25 % hasta 31.16 mm a concentración del 100 % frente a *Staphylococcus aureus*. Esto indica que, a mayores concentraciones del aceite esencial, se presenta un mayor efecto antibacteriano. En comparación, el antibiótico patrón vancomicina presentó halos de 19.66 mm, mostrando una eficacia superior frente a la mayoría de las concentraciones del aceite, aunque menor respecto al aceite esencial al 100%.

Existen ciertos autores que afirman que los aceites con alto contenido de compuestos monoterpénicos poseen propiedades antibacterianas Pumaylle et al., (2012) y González et al.,

(2022). En este sentido, Mohsenzadeh et al., (2011), obtuvieron que el aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L., en la etapa de floración mostró un halo de inhibición de 24 mm frente a *Staphylococcus aureus*, atribuyendo su eficacia a la alta proporción de alcanfor y acetato de bornilo, ambos monoterpenos oxigenados reconocidos por su efecto antibacteriano. De manera similar, Amiri (2007) informó que el aceite esencial de *T. polycephalum* mostró fuerte efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* con un halo de inhibición de 45 mm, relacionado con su alto contenido de borneol, un monoterpeno oxigenado. Asimismo, Dorman y Deans (2000) describieron al borneol como responsable de efecto antimicrobiano. Estos resultados respaldan que la presencia de monoterpenos oxigenados en el aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L., contribuye significativamente a su efecto inhibidor sobre *Staphylococcus aureus*.

Figura 15

Diagrama de caja del aceite esencial de Tanacetum parthenium L. frente a Staphylococcus aureus



El diagrama de cajas Figura 15, muestra que el promedio de diámetro de halo de inhibición aumentó proporcionalmente con la concentración del aceite esencial de *Tanacetum parthenium*. A bajas concentraciones 6.25-25 % los halos fueron moderados, con valores mínimos entre 10.92 y 12.97 mm y máximos entre 15.10 y 18.17 mm en concentraciones intermedias 50-75 %, los halos se mantuvieron entre 14.73 y 19.16 mm, mientras que a 100 % se observó máximo efecto antibacteriano, mayor dispersión y alta variabilidad con un rango de 23.57 a 41.67 mm. Los resultados confirman que la actividad inhibidora aumenta con la concentración del aceite esencial, alcanzando su efecto más marcado en la muestra pura.

Tabla 9

Determinación del grado de sensibilidad de Staphylococcus aureus a diferentes concentraciones del aceite esencial de Tanacetum parthenium L.

Concentración (%)	Grado de sensibilidad		
	Sensibilidad límite, entre 8 a 14 mm (+)	Sensibilidad media, entre 14 a 20 mm (++)	Sensibilidad alta, más de 20 mm (+++)
6.5	12.8566		
12.5	13.7733		
25		15.2333	
50		16.4833	
75		17.2133	
100			31.1633
Vancomicina 30 µg		19.65	

La tabla 9, presenta el grado de sensibilidad según los promedios de los halos de inhibición, obtenidos del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L., este análisis se basa en los criterios de Duraffourd (1983) que define la sensibilidad en función de los diámetros de inhibición.

Con el incremento de la concentración del aceite esencial, mejora el grado de sensibilidad de *Staphylococcus aureus*. A concentración de 6.5 % y 12.5 % muestran sensibilidad límite (diámetro de inhibición entre 8-14 mm), indicando una actividad antibacteriana débil. De 25 % a 75 % presentan sensibilidad media (14-20 mm), mostrando un efecto moderado. A concentración de 100 % alcanza sensibilidad alta (>20 mm), con un promedio de 31.16 mm, lo que indica fuerte actividad antibacteriana. El control vancomicina (30 µg) también se encuentra dentro del intervalo de sensibilidad media (19.65 mm), siendo superada en inhibición por el aceite al 100%. Podemos concluir que el aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L., tiene un fuerte efecto antibacteriano contra *Staphylococcus aureus*.

En comparación con lo reportado por Huanca (2021), el aceite esencial de *Senecio saxicola* al 75 % presentó sensibilidad media 14-20 mm frente a *S. aureus*, mientras que el aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L., mostró un mayor efecto antibacteriano, alcanzando 31.16 mm alta sensibilidad al 100 %. Esta diferencia se debe a su mayor contenido de compuestos monoterpenos oxigenados, que potencian su efecto inhibitorio sobre la bacteria.

Tabla 10

Análisis de Varianza (ANOVA) del efecto antibacteriano del aceite esencial de Tanacetum parthenium L., frente a la cepa de Staphylococcus aureus a diferentes concentraciones

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	689.961	6	114.994	6.63	0.002
Dentro de grupos	225.49	13	17.345		
Total	915.451	19			

Nota: Resultados brindados por el programa estadístico SPSS-30

Los resultados del ANOVA indican que existen diferencias significativas en el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L., a diferentes concentraciones sobre la cepa de *Staphylococcus aureus*.

Hipótesis nula (H_0): No existen diferencias significativas en el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L., frente a *Staphylococcus aureus* entre las distintas concentraciones.

Hipótesis alterna (H_1): Existen diferencias significativas en el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L., frente a *Staphylococcus aureus* entre las distintas concentraciones.

El análisis estadístico demuestra que acepta la hipótesis alterna, donde el incremento en la concentración del aceite esencial genera un aumento significativo en los halos de inhibición, evidenciando una relación dosis dependiente del efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus*

aureus. Estos resultados respaldan los hallazgos observados experimentalmente, donde las concentraciones más altas del aceite esencial especialmente al 100 % mostraron una mayor sensibilidad bacteriana.

Tabla 11

Resultados de los diámetros de los halos de inhibición del efecto antibacteriano del aceite esencial de Tanacetum parthenium L., frente a Escherichia coli ATCC 25922, en 24-72 horas

Concentración (%) del aceite esencial <i>Tanacetum parthenium</i> L.	N	Promedio halos de inhibición (mm)	Error estándar	95% de intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
6.25	3	13.67 ± 1.99	1.15	8.74	18.60	11.78	15.74
12.5	3	14.05 ± 1.43	0.83	10.49	17.61	12.81	15.62
25	3	13.48 ± 0.40	0.23	12.49	14.47	13.02	13.75
50	3	9.43 ± 0.73	0.42	7.62	11.24	8.99	10.27
75	3	9.42 ± 0.49	0.28	8.21	10.65	8.86	9.74
100	3	8.91 ± 0.14	0.08	8.57	9.26	8.76	9.03
Ciprofloxacina 5 µg	2	40.49 ± 2.29	1.62	19.91	61.07	38.87	42.11
Total	20	14.40 ± 9.24	2.07	10.07	18.72	8.76	42.11

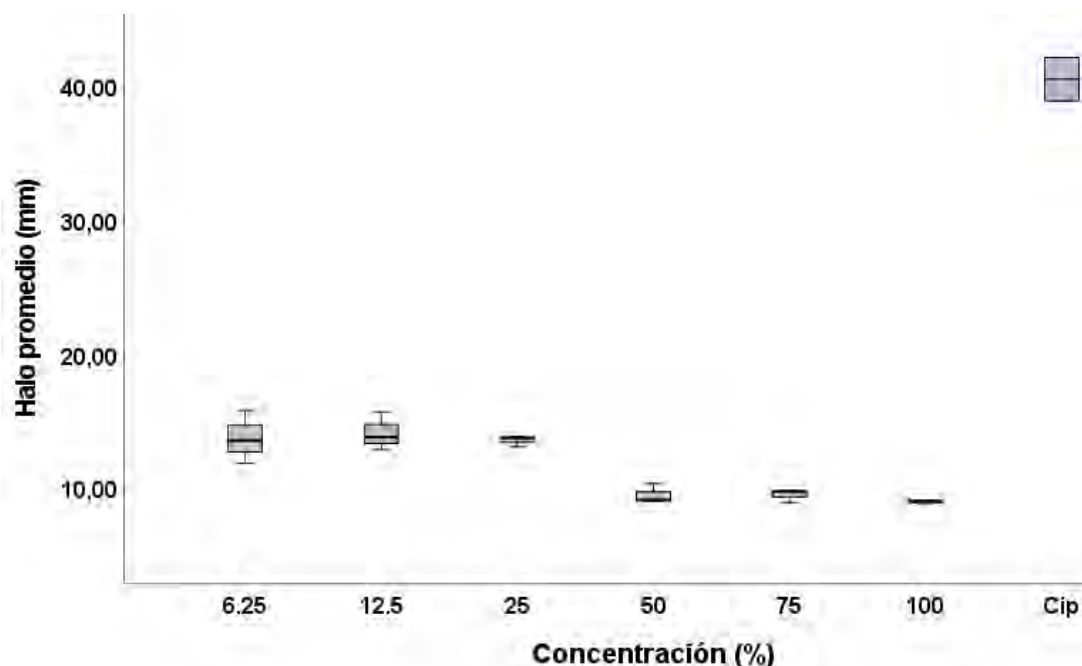
En la tabla 11, se muestra los promedios de diámetros de los halos inhibidores del efecto antibacteriano del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L., a distintas concentraciones. Los resultados indican que a medida que incrementa la concentración de aceite esencial, el diámetro de los halos de inhibición frente a *Escherichia coli* disminuyen a concentraciones 6.25%, 12.5% y 25% del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L., muestran halos de inhibición con promedios de 13.67 mm, 14.05 mm y 13.48 mm, respectivamente. A partir del 50 % los valores descendieron hasta 8.91 mm lo que indica una reducción en efecto antibacteriano.

Estos resultados concuerdan con los reportados por Palatuglo (2010), quien observó que el aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L., mostró menor efecto antibacteriano frente a *Escherichia*

coli Gram negativo. De igual manera, Izadi et al, (2010) indicaron que hay diferencias significativas en la sensibilidad bacteriana, siendo las bacterias Gram positivas más susceptibles al efecto del aceite esencial que las Gram negativas. Asimismo, Izadi et al., (2013) confirmaron que las bacterias Gram negativas presentan menor sensibilidad al aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L., lo que se atribuye a la compleja estructura de su membrana externa, que actúa como barrera a la penetración de compuestos lipofílicos.

Figura 16

Diagrama de caja del aceite esencial de Tanacetum parthenium L., frente a Escherichia coli



En el diagrama de cajas en figura 16, muestra que los valores máximos del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L., alcanzan aproximadamente 15.74mm correspondientes a la concentración del 6.25 %, mientras que los valores mínimos se registran alrededor de 8.76 mm en la concentración del 100 %, evidenciando una disminución del efecto antibacteriano a medida que aumenta la concentración del aceite. Este comportamiento se asocia con la limitada difusión de los compuestos hidrofóbicos en el medio de cultivo. Por otro lado, el control con ciprofloxacina 40.49

mm presentó una inhibición significativamente mayor, lo que confirma la alta eficacia del antibiótico frente a *Escherichia coli* y baja sensibilidad del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L., En resumen, los resultados demuestran que el aceite esencial presento efecto antibacteriano baja frente a *Escherichia coli* ATCC 25922.

Tabla 12

Determinación del grado de sensibilidad de Escherichia coli a diferentes concentraciones del aceite esencial de Tanacetum parthenium L.

Concentración (%)	Grado de sensibilidad		
	Sensibilidad límite, entre 8 a 14 mm (+)	Sensibilidad media, entre 14 a 20 mm (++)	Sensibilidad alta, más de 20 mm (+++)
6.5	13.67		
12.5		14.0533	
25	13.48		
50	9.43		
75	9.4267		
100	8.9133		
Ciprofloxacina 5 µg			40.49

La tabla 12, los resultados obtenidos muestran que *Escherichia coli* presentó baja sensibilidad al aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L., en la mayoría de las concentraciones evaluadas. De acuerdo con la escala de sensibilidad de Duraffourd (1983), los halos de inhibición registrados entre 8.91 mm y 13.67 mm corresponden a una sensibilidad límite, observándose en las concentraciones de 6.25 %, 25 %, 50 %, 75 % y 100 %. Solo la concentración de 12.5 % alcanzó una sensibilidad media, con un halo de inhibición promedio de 14.05 mm, mientras que ninguna de las concentraciones del aceite mostró sensibilidad alta. En contraste, la ciprofloxacina (5 µg) presentó un halo de inhibición de 40.49 mm, clasificado como sensibilidad alta,

evidenciando una eficacia notablemente mayor contra *Escherichia coli*. Estos resultados confirman que el aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L., tiene menor efecto antibacteriano limitado frente a bacterias Gram negativas, atribuida a la barrera estructural de su membrana externa y a la naturaleza hidrofóbica de los compuestos del aceite que restringen su difusión en el medio.

Según Izadi (2010) y Izadi et al. (2013) señalaron que las bacterias Gram negativas presentan menor sensibilidad al aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L., porque contienen una membrana externa con un alto contenido de lipopolisacáridos, la cual funciona como un escudo ante los elementos lipofílicos del aceite.

Tabla 13

Análisis de Varianza (ANOVA) del efecto antibacteriano del aceite esencial de Tanacetum parthenium L., frente a la cepa de Escherichia coli a diferentes concentraciones

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1604.489	6	267.415	181.584	0,001
Dentro de grupos	19.145	13	1.473		
Total	1623.634	19			

Nota: Resultados brindados por el programa estadístico SPSS-30

Dado que el valor de P es 0.001 es inferior a 0.05, se concluye que hay variaciones significativas entre los halos de inhibición correspondientes a distintas concentraciones de aceite esencial en la cepa de *Escherichia coli*.

Hipótesis nula (H_0): No existen diferencias significativas en el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L., frente a *Escherichia coli* entre las diferentes concentraciones.

Hipótesis alterna (H_1): Existen diferencias significativas en el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L., frente a *Escherichia coli* entre las distintas concentraciones.

El análisis estadístico demuestra que se acepta la hipótesis alterna, que señala una disminución en los diámetros de halos de inhibición al aumentar la concentración del aceite, lo que indica una reducción del efecto antibacteriano a concentraciones más altas. Este comportamiento podría deberse a la baja difusión de los compuestos hidrofóbicos del aceite en el medio de cultivo y a la barrera estructural de la membrana externa.

Según Flores (2024), demostró un importante efecto antimicrobiano significativo del aceite esencial de *T. vulgare* L. contra a *Escherichia coli*, con concentraciones de 400 y 200 $\mu\text{l/mL}$, que mostraron halos de inhibición más amplios. Por lo tanto, se desestimó la hipótesis nula y se aprobó la hipótesis alterna, corroborando el efecto antimicrobiano importante del aceite esencial en contra de *Escherichia coli*. El comportamiento de este depende de su composición química y del origen de la planta.

CONCLUSIÓN

1. El rendimiento de extracción del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L., de la parte aérea fue de 0.531 ± 0.02 %, utilizando el método de hidrodestilación con trampa de Clevenger. En el aceite esencial se caracterizó sus propiedades fisicoquímicas y solubilidad, obteniéndose una densidad de 0.9618 ± 0.0002 g/mL, índice de refracción de 1.468 ± 0.0007 , rotación óptica de $+ 0.060^\circ \pm 0.02$, índice de acidez mg KOH/g 1.5016 ± 0.02 e índice de saponificación mg KOH/g 35.015 ± 1.28 . Además, presentó buena solubilidad en etanol al 96 %, etanol absoluto, metanol, acetona, hexano y cloroformo. Cumpliendo los parámetros comunes a los aceites esenciales.
2. Se determinó la composición química por cromatografía de gases - espectrometría de masas (CG-MS) encontrándose Carveol (57.47 %), Borneol (19.52 %), 2-β-Pineno (9.38 %), cis-Crisantenol (6.04 %) y Ácido pterina-6-carboxílico (1.89 %), como componentes mayoritarios correspondientes a monoterpenos hidroxilados.
3. El efecto antibacteriano del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L. se evaluó mediante el método de Kirby-Bauer, demostrándose un efecto antibacteriano significativo principalmente contra la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus*, alcanzando un halo de inhibición máximo de 31.16 mm al 100 % de concentración. En contraste, frente a la bacteria Gram negativa *Escherichia coli*, se observó una baja sensibilidad, con un halo máximo de 14.05 mm al 12.5 % de concentración. Este efecto antibacteriano se debe a los monoterpenos oxigenados carveol y borneol, cuyos grupos hidroxilo alteran las membranas bacterianas e inhiben su crecimiento.

RECOMENDACIONES

- Continuar con el estudio del efecto antibacteriano de *Tanacetum parthenium* L., utilizando en otras cepas bacterianas, con el fin de determinar su verdadero potencial antibacteriano.
- Asimismo, se recomienda promover el cultivo de plantas medicinales para asegurar una fuente sostenible de materia prima.
- Se sugiere ampliar la investigación del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* L., evaluando otras actividades biológicas como la antifúngica, antioxidante, antiinflamatoria y cicatrizante. Asimismo, se recomienda explorar su potencial como bioinsecticida, repelente natural y fungicida agrícola, considerando su posible aplicación en salud y agricultura.
- Se recomienda realizar estudios comparativos de la extracción de aceites esenciales de *Tanacetum parthenium* L., en diferentes zonas ecológicas y tipos de suelo, ya que factores como la altitud, el clima y las propiedades del suelo pueden influir en el rendimiento, la composición química y la actividad biológica del aceite. Esta comparación permitirá identificar las condiciones óptimas para su obtención y uso.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alberto, J. (2011). Agentes antibacterianos. *Monografias.com*.
<https://www.monografias.com/trabajos85/agentes-antibacterianos/agentes-antibacterianos>
- Alea, J. A. P. (2015). *Aceites esenciales: Química, bioquímica, producción y usos*. Editorial Universitaria. <https://elibro.net/es/ereader/unsaac/71620>
- Aliaga Mamani, P. A. (2013). *Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de hojas de Aloysia triphylla P. "Cedrón" frente a Escherichia coli ATTC 25922 y Staphylococcus aureus 25923*. <https://repositorio.unjbg.edu.pe/handle/20.500.12510/3230>
- Álvarez, M. R., Meléndez, L. A., & Cosío, S. M. R. (2012). *proyecto sagarpa-conacyt 126183*.
- Apaza Taca, L., & Gonzáles Uscamayta, M. (2015). *Extracción y purificación del partenólido de la especie Tanacetum parthenium de la ciudad del Cusco por métodos cromatográficos utilizando el acetato de etilo. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco*.
<https://repositorio.unsaac.edu.pe/handle/20.500.12918/92>
- Arturo. (2010, abril). *Estudio químico tanacetum parthenium Repositorio Institucional de la Universidad Nacional Autónoma de México*. <http://repositorio.unam.mx>
- Bączek, K. B., Kosakowska, O., Przybył, J. L., Pióro-Jabrucka, E., Costa, R., Mondello, L., Gniewosz, M., Synowiec, A., & Węglarz, Z. (2017). *Antibacterial and antioxidant activity of essential oils and extracts from costmary (Tanacetum balsamita L.) and tansy (Tanacetum vulgare L.)*. *Industrial Crops and Products*, 102, 154-163.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.03.009>
- Bado, J. L., Torres, M. E., Sandin, D., Flores, K., Pensado, G. V., Grotiuz, G., Garcia, V., Mota, M. I., Robino, L., Barrios, P., Chabalgoity, A., Pereira, M., Vola, M., Campione, J., Ingold,

- E., Calvelo, E., Vignoli, R., Chiparelli, H., Chiaperelli, H., ... ARBIZA, J. R. (2008). *Temas de bacteriología y virología médica* (3a ed.). facultad de medicina. instituto de higiene.
- Bagci, E., & Kocak, A. (2010). *Essential oil composition of two endemic Tanacetum (T. nitens (Boiss.&Noe) Grierson and T. argenteum (Lam.) Willd. Subsp. Argenteum) (Asteraceae) taxa, growing wild in Turkey*. Industrial Crops and Products, 31(3), 542-545.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.02.006>
- Bandoni, A. L. (2003). *Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores*.
- Barsby, R. W., Salan, U., Knight, D. W., & Hoult, J. R. (1993). *Feverfew and vascular smooth muscle: Extracts from fresh and dried plants show opposing pharmacological profiles, dependent upon sesquiterpene lactone content*. Planta Medica, 59(1), 20-25.
<https://doi.org/10.1055/s-2006-959596>
- Beltrán, H., Granda, A., León, B., Sagástegui, A., Sánchez, I., & Zapata, M. (2006). *Asteraceae endémicas del Perú*. Revista Peruana de Biología, 13(2), 64-164.
- Ceballos, m. a. r. (2012). *análisis de parámetros microbiológicos y fisicoquímicos de un aceite esencial de romero obtenido por medio de la destilación por arrastre de vapor*.
- Chisaguano, p. j. c. (2018). chimborazo. abril-julio 2018.
- Coban, F., Ozer, H., & Mete, E. (2019). *Essential Oil Composition of Tanacetum parthenium from Eastern Black Sea Region, Turkey*. Agriculturae Conspectus Scientificus, 84(1), 91-94.
- Espinoza Rojas, C. K., & Cuya Arias, C. M. (2017). *"Obtención y caracterización del aceite esencial de romero (Rosmarinus Officinalis) procedente del distrito de Mala-Lima"*. Repositorio institucional - UNAC.
<http://repositorio.unac.edu.pe/handle/20.500.12952/3596>

- Esteve, E. P., & Soler, A. R. (2021). *Determinación de la sensibilidad de los microorganismos frente a antimicrobianos de origen natural y la concentración mínima inhibitoria por métodos fenotípicos*. <https://riunet.upv.es/handle/10251/167611>
- Fernández, I. G. (2001). *Obtención de aceite de orujo mediante extracción con fluidos supercríticos*. Univ de Castilla La Mancha.
- Fernández, M. C., Fárez, D. L. A., Roblez, N. C. C., Hernández, I. M., Galván, D. S. M., & Rubio, O. C. (2019). *Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb contra el *Staphylococcus aureus**. Revista Cubana de Farmacia, 51(4), Article 4. <https://revfarmacia.sld.cu/index.php/far/article/view/183>
- Flores Balda, F. M. (2024). *Aislamiento, caracterización fitoquímica de compuestos volátiles y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Tanacetum vulgare* L frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* multidrogoresistentes*. <https://repositorio.unap.edu.pe/handle/20.500.14082/21420>
- Gomez Callupe, C. E., & Godoy Quispe, E. (2018). *Efecto antibacteriano del aceite esencial de *lepechinia meyenii* (pacha salvia) en cultivos microbiológicos de *staphylococcus aureus**. Repositorio Institucional - UIGV. <http://repositorio.uigv.edu.pe/handle/20.500.11818/2856>
- González-Moreno, B. J., Piña-Barrera, A. M., Pérez-López, L. A., Galindo-Rodríguez, S. A., & Alvarez-Román, R. (2022). *Aceites esenciales de origen natural: Características químicas, técnicas de extracción y potencial aplicación biológica*. Biología y Sociedad, 5(10), 20-30. <https://doi.org/10.29105/bys5.10-71>
- Guenther, E. (1947). *The Essential Oils—Vol 1: History—Origin In Plants—Production—Analysis*.

- Gutiérrez, M. C., & Droguet, M. (2002). *la cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor*.
- Harvey, R. A., Champe, P. C., & Fisher, B. D. (2008). *Microbiología (2a. Ed.)*. Wolters Kluwer Health. <https://elibro.net/es/ereader/unsaac/125446?page=60>
- Izadi, Z., Aghaalkhani, M., Esna-Ashari, M., & Davoodi, P. (2013). *Determining Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Feverfew (Tanacetum parthenium L.) Essential Oil on Some Microbial Strains*.
- Izadi, Z., Esna-Ashari, M., Piri, K., & Davoodi, P. (2010). *Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Feverfew (Tanacetum parthenium) Essential Oil. Int. J. Agric. Biol*, 12, 1560-8530.
- J. Foster, T. (2002). 39—*Staphylococcus aureus*. En M. Sussman (Ed.), *Molecular Medical Microbiology* (pp. 839-888). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012677530-3/50258-0>
- Lazarević, J., Kostić, I., Milanović, S., Šešlija Jovanović, D., Krnjajić, S., Čalić, D., Stanković, S., & Kostić, M. (2021). *Repellent activity of Tanacetum parthenium (L.) and Tanacetum vulgare (L.) essential oils against Leptinotarsa decemlineata (Say)*. Bulletin of Entomological Research, 111(2), 190-199. <https://doi.org/10.1017/S0007485320000504>
- Martin, S. (2016). *Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador*.
- Martínez, G. (2017). *Departamento de Tecnología de Alimentos*.
- Mendoza González, V. (2018). *Caracterización del crecimiento y la producción de metabolitos secundarios con potencial actividad contra el cáncer en cultivos in vitro de Tanacetum parthenium*. <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/71056>

- Migula. (1895). *Escherichia coli* (Migula, 1895) Castellani & Chalmers, 1919.
<https://www.gbif.org/es/species/6110934>
- Mohsenzadeh, F., Chehregani, A., & Amiri, H. (2011). *Chemical composition, antibacterial activity and cytotoxicity of essential oils of Tanacetum parthenium in different developmental stages*. *Pharmaceutical Biology*, 49(9), 920-926.
<https://doi.org/10.3109/13880209.2011.556650>
- Molina Abril, J. A. (2019). *Botánica aplicada*. Dextra Editorial.
<https://elibro.net/es/ereader/unsaac/131465>
- Montero-Recalde, M., Vayas, L., Avilés-Esquivel, D., Pazmiño, P., & Erazo-Gutierrez, V. (2018). *Evaluación de dos métodos para medir la sensibilidad de inhibición de crecimiento de la cepa certificada de Staphylococcus aureus subsp. Aureus*. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29(4), 1543-1547. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i4.15185>
- Ortiz. (2010). *Repositorio de Tesis DGBSDI: Estudio químico de Tanacetum parthenium (L.) Schultz—Bip*. <https://ru.dgb.unam.mx/handle/20.500.14330/TES01000659888>
- Oviedo Zamora, C. D., & Orochena Jiménez, S. A. (2011). *Métodos de extracción de aceites esenciales, comparación y empleo en productos de perfumería [Thesis]*.
<http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/handle/123456789/5873>
- Pareek, A., Suthar, M., Rathore, G. S., & Bansal, V. (2011). *Feverfew (Tanacetum parthenium L.): A systematic review*. *Pharmacognosy Reviews*, 5(9), 103-110.
<https://doi.org/10.4103/0973-7847.79105>
- Picazo, J. J. (2000). *Procedimientos en Microbiología Clínica*.
- Pírez, M., & Mota, M. (2006). *Introducción e importancia del tema*.

- Polatoglu, K., Demirci, F., Demirci, B., Gören, N., & Baser, K. H. C. (2010). *Antibacterial Activity and the Variation of <I>Tanacetum parthenium</I> (L.) Schultz Bip. Essential Oils from Turkey*. Journal of Oleo Science, 59(4), 177-184. <https://doi.org/10.5650/jos.59.177>
- Pumaylle, K. O., Quiroz, L. R. P., Luján, D. L. B., & Paz, R. J. S. (2012). *Extracción, caracterización y evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de Senecio graveolens Wedd (Wiskataya)*. Scientia Agropecuaria, 3(4), 291-302. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2012.04.03>
- Revilla, N. (2009). *Análisis Farmacocinético-Farmacodinámico de Vancomicina en pacientes de Uci [Universidad de Salamanca]*. <https://doi.org/10.14201/gredos.76312>
- Robalino, D. M. R., Ortiz, S. A. R., Lara, S. V. V., & Chinizaca, P. N. P. (2021). *Evaluación de la susceptibilidad de Enterococcus faecalis ATCC-29212 frente a medicamentos combinados con hidróxido de calcio*. Revista Eugenio Espejo, 15(1), 12-21.
- Roersch, C. (1994). *Plantas medicinales en el sur andino del Perú*.
- Romero González, R., Fernández Moreno, J. L., Plaza Bolaños, P., Garrido Frenich, A., & Martínez Vidal, J. L. (2007). *Empleo de la espectrometría de masas como herramienta para la determinación de tóxicos en alimentos: Hacia la seguridad alimentaria*. Revista Española de Salud Pública, 81(5), 461-474.
- Romero Veramendi, A. R., & Baldeón Mendoza, I. V. (2019). *Actividad antibacteriana del extracto etanólico de las flores de Tropaeolum majus L. (mastuerzo), frente a Staphylococcus epidermidis, por la técnica de Kirby-Bauer*. Universidad Inca Garcilaso de la Vega. <http://repositorio.uigv.edu.pe/handle/20.500.11818/5389>
- Rosenbach. (1884). *Staphylococcus aureus* Rosenbach, 1884. <https://www.gbif.org/es/species/3227657>

- Rosenthal, K. S., & Pfäuer, M. (2007). *Chief, Microbiology Service Department of Laboratory Medicine National Institutes of Health Bethesda, Maryland.*
- Saavedra-Charca, W., Vásquez Villalobos, V., & Rojas, C. (2015). *Analytical techniques used in food metabolomics.* *Agroindustrial science*, 5, 191-210.
<https://doi.org/10.17268/agroind.science.2015.02.11>
- Sánchez, M. F. O. (2006). *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes.* *aiyana ediciones.*
- Shahhoseini, R., Azizi, M., Asili, J., Moshtaghi, N., & Samiei, L. (2019). *Comprehensive Assessment of Phytochemical Potential of Tanacetum parthenium (L.): Phenolic Compounds, Antioxidant Activity, Essential Oil and Parthenolide.* *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 22(3), 614-629. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2019.1632228>
- Solis Quispe, L., Pino Alea, J. A., Solis Quispe, J. A., Tomaylla Cruz, C., & Aragon Alencastre, L. J. (2018). *plantas y aceites esenciales como insecticidas* (1a-marzo2018 ed.).
- Solis-Quispe, L., Solis-Quispe, J. A., Aragon-Alencastre, L. J., Fernández, M. D., Hernández, I., Rodeiro, I., & Pino, J. A. (2017). *Composición química y actividad antioxidante de aceites esenciales de Tanacetum vulgare y Mentha x piperita L. var. Vulgaris cultivados en Cusco, Perú.* *Revista CENIC. Ciencias Químicas*, 48(1), 41-47.
- Thai, T., Salisbury, B. H., & Zito, P. M. (2023). *Ciprofloxacin.* En StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535454/>
- Tolentino, S. J. (2016). *Estudio comparativo de calidad biofarmacéutica de tabletas de ciprofloxacino 500mg de patente y genéricas, como evidencia para descartar desarrollo de resistencia micribiana* [masterThesis, Tesis (M.C.)-Centro de Investigación y de

Estudios Avanzados del I.P.N. Departamento de Farmacología.].

<https://repositorio.cinvestav.mx/handle/cinvestav/1189>

Valdez, Y. A. L. (2021). *extracción experimental de aceite esencial de cáscara de mandarina (citrus reticulata) cultivada en el departamento de tarija mediante hidrodestilación asistida por microondas.*: Modalidad de Graduacion: (Investigación Aplicada).
Repositorio *UAJMS.*

<https://dicyt.uajms.edu.bo/investigacion/index.php/quimica/article/view/150>

Veramendi, A. R. R., & Baldeón Mendoza, I. V. (2021). *Actividad antibacteriana del extracto etanólico de las flores de Tropaeolum majus L. (mastuerzo), frente a Staphylococcus epidermidis, por la técnica de Kirby-Bauer.* Universidad Inca Garcilaso de la Vega.
<http://repositorio.uigv.edu.pe/handle/20.500.11818/5389>

Vidal Graniel, J. E. (2006). *Escherichia coli enteropatógena (EPEC): Una causa frecuente de diarrea infantil.* Red Salud en Tabasco. <https://elibro.net/es/ereader/unsaac/18709>

Villamizar-Véliz, M., & Aular, Y. (2022). *Métodos de extracción del aceite esencial de lippia alba.* Revista Ingeniería UC, 29(1), Article 1. <https://doi.org/10.54139/revinguc.v29i1.90>

Zuñiga Olaguibel, M. (2022). *Composición química de los aceites esenciales de Minthostachys spicata (Benth) Epling, Clinopodium bolivianum (Benth) Kuntze, Tanacetum vulgare Linnaeus y Mentha x piperita var. Citrata (Ehrh.) Briq y su efecto insecticida para Pagiocerus frontalis.* <https://repositorio.unsaac.edu.pe/handle/20.500.12918/6866>

ANEXO 1

Certificado de determinación taxonómica de la especie de *Tanacetum parthenium* L.



Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres
Año de la recuperación y consolidación de la economía peruana



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD
DEL CUSCO**

HERBARIO VARGAS CUZ

CERTIFICADO DE DETERMINACION TAXONÓMICA

N° 002-2025-HVC-FCB-UNSAAC

El que suscribe, director del Herbario Vargas CUZ, de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, **M. Sc. Wilian Nazario Cárdenas Enríquez**, emite el presente Certificado de determinación taxonómica y depósito de material Biológico, a la **Bach. En Química Yudi Silvia Villa Huamán**, identificada con DNI N° 76757797; código universitario N° 131070, de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, correspondiente al plan de tesis intitulada "CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL COMPONENTE MAYORITARIO Y SU EFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Tanacetum parthenium* (L.) SOBRE *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922" con **RESOLUCION N° D-71-2024-FCQFM-UNSAAC** con N° Expediente 707463; ha presentado a la Dirección del Herbario Vargas CUZ una muestra botánica para su determinación taxonómica (expediente N° 707463). La que al ser diagnosticada por el Blgo. Víctor Chama Moscoso, el cual, utilizando claves dicotómicas, consulta con bibliografía especializada y comparación con muestras del herbario, concuerdan con la especie *Tanacetum parthenium* L. (**ASTERACEAE**), de acuerdo con la clasificación del Grupo del Sistema Filogenético de las Angiospermas (Angiosperm Phylogeny Group-APG IV, 2016). Asimismo, la colecta de dichas muestras fue autorizada por la **RA N° D000033-2024-MIDAGRI-SERFOR-ATFFS-CUSCO** y Código de Autorización N° 08-CUS-AUT-IFL-2024-001. El material biológico depositado al Herbario Vargas CUZ, se adjunta a continuación:

N°	FAMILIA	ESPECIE	Cantidad
1	ASTERACEAE	<i>Tanacetum parthenium</i> L.	1
		Total	1

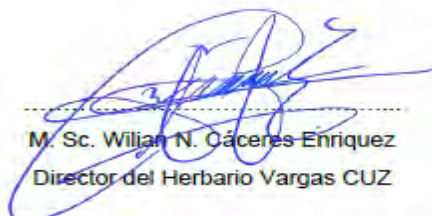
Se expide el presente certificado, a petición formal de la interesada para los fines que viera por conveniente.

Cusco, 18 de agosto del 2025



Firmado digitalmente por:
CHAMA MOSCOSO Víctor FIR
+2139257 hard
Método: Soy el autor del
documento
Fecha: 19/08/2025 22:17:25-0600

Blgo. Víctor Chama Moscoso
Curador del Herbario Vargas CUZ


M. Sc. Wilian N. Cáceres Enríquez
Director del Herbario Vargas CUZ

ANEXO 2

Figura 17

Muestreo de la especie de Tanacetum parthenium L.

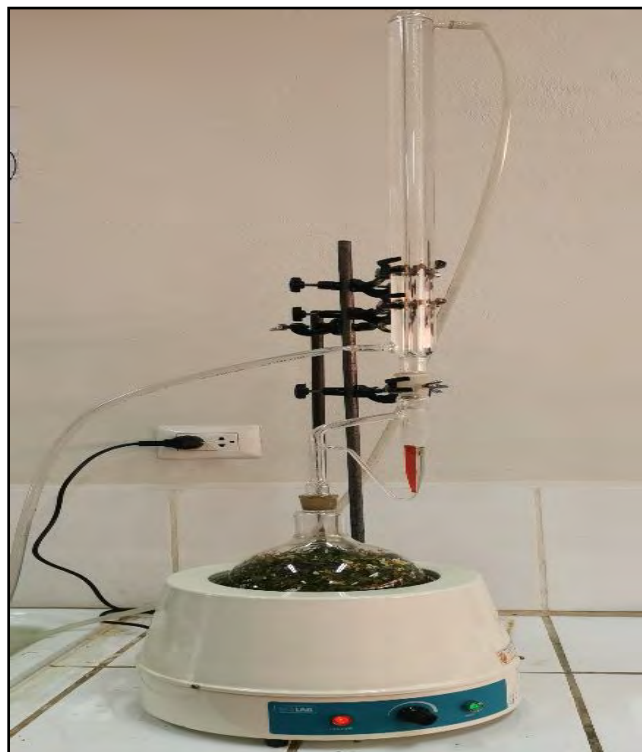
**Figura 18**

Preparación de la muestra



Figura 19

Extracción del aceite esencial por hidrodestilación

**Figura 20**

Obtención del aceite esencial con trampa de Clevenger

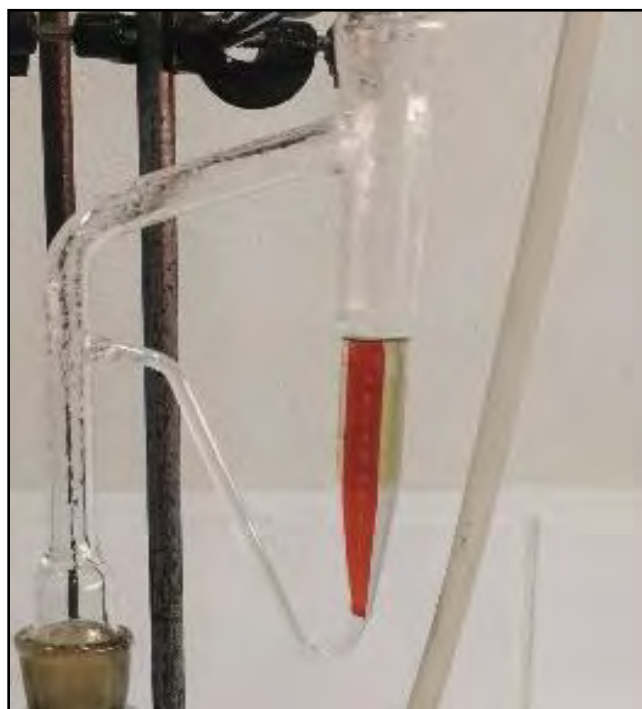


Figura 21

Pruebas de solubilidad del aceite esencial

**Figura 22**

Determinación de la densidad relativa del aceite esencial



Figura 23

Determinación del Índice de refracción

**Figura 24**

Determinación del Índice de acidez

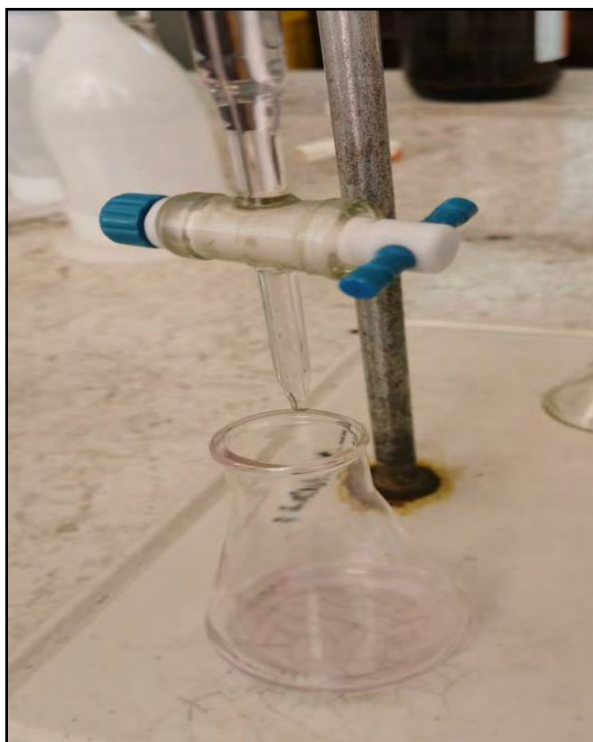


Figura 25

Reflujo del aceite esencial del índice de saponificación

**Figura 26**

Titulación del índice de saponificación



Figura 27

Determinación de la rotación óptica

**Figura 28**

Preparación del aceite esencial para la corrida en cromatografía de gases



Figura 29

Cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas

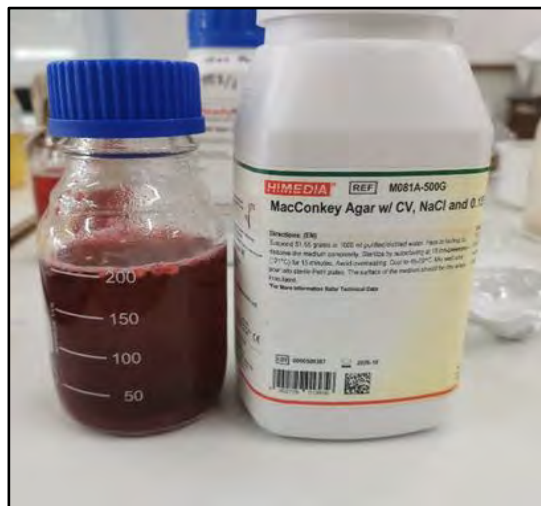
**Figura 30**

Esterilización de materiales



Figura 31*Elaboración de los medios de cultivo*

Se preparo de agar manitol salado para
aislar *Staphylococcus aureus*



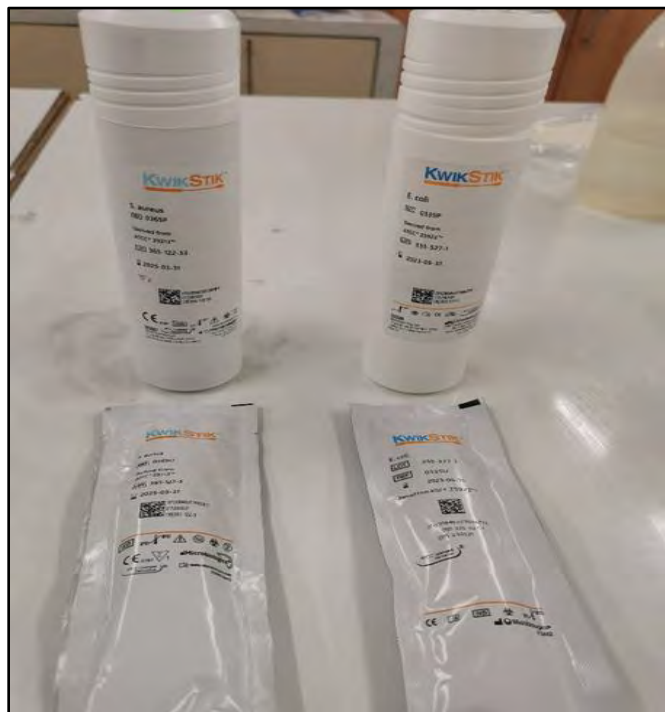
Se preparo de agar Mac Conkey para
aislar *Escherichia coli*



Se preparo para determinar Agar Mueller Hinton la sensibilidad antibacteriana

Figura 32

Cepa certificada de Staphylococcus aureus ATCC 29213 y Escherichia coli ATCC 25922

**Figura 33**

Activación de las cepas



Figura 34*Crecimiento de la cepa activada*

*Crecimiento de la cepa activada de
Staphylococcus aureus ATCC 29213*



*Crecimiento de la cepa activada de
Escherichia coli ATCC 25922*

Figura 35*Preparación del inoculo*

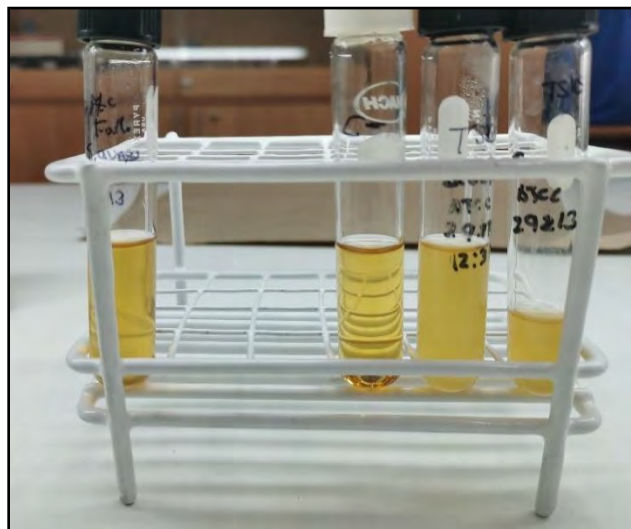
Preparación del inoculo S. aureus



Preparación del inoculo E. coli

Figura 36

Cepas ATCC diluidas en caldo BHI

**Figura 37**

Diluciones del aceite esencial de Tanacetum parthenium L., se prepararon en proporciones de 6.25%, 25%, 50%, 75% y 100%



Figura 38

Sembrado en las placas con agar Mueller Hinton para la determinación de sensibilidad antibacteriano del aceite esencial



Siembra en las placas con Agar Mueller Hinton



Sembrado con Agar Mueller Hinton

Figura 39

Se realizo tres pozos excavados de 5.5mm de diámetro a una distancia de 22mm

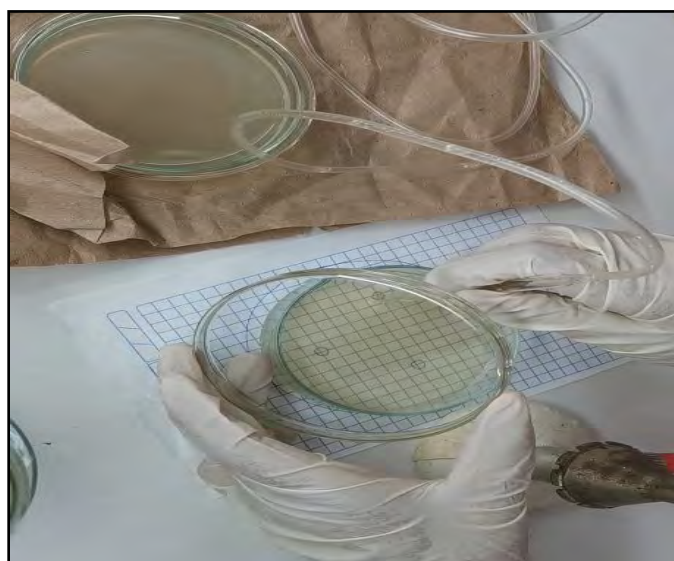


Figura 40

Siembra e inoculación con una micro pipeta en cada pozo excavado a diferentes concentraciones



Siembra de las cepas



Inoculación del aceite esencial

Figura 41

Incubación de las placas a 37°C por un periodo de 24 horas y la medición de los halos de inhibición con un Vernier



Incubación de las placas



Medición de los halos

Figura 42

Resultados de la evaluación de la sensibilidad antibacteriana del aceite esencial frente a Staphylococcus aureus ATCC 29213

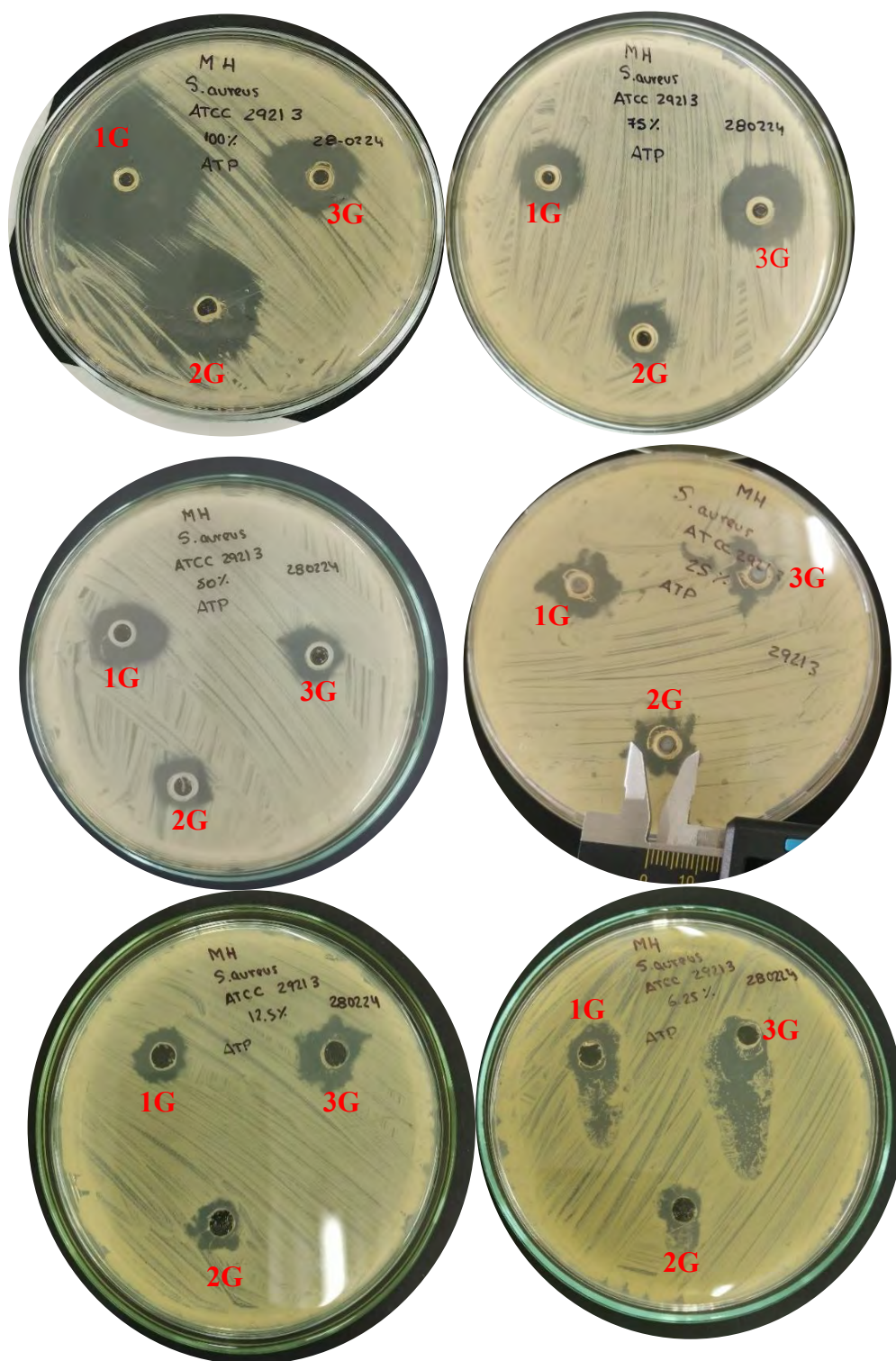


Figura 43

Resultados de la evaluación de la sensibilidad antibacteriana del aceite esencial frente a Escherichia coli ATCC 25922

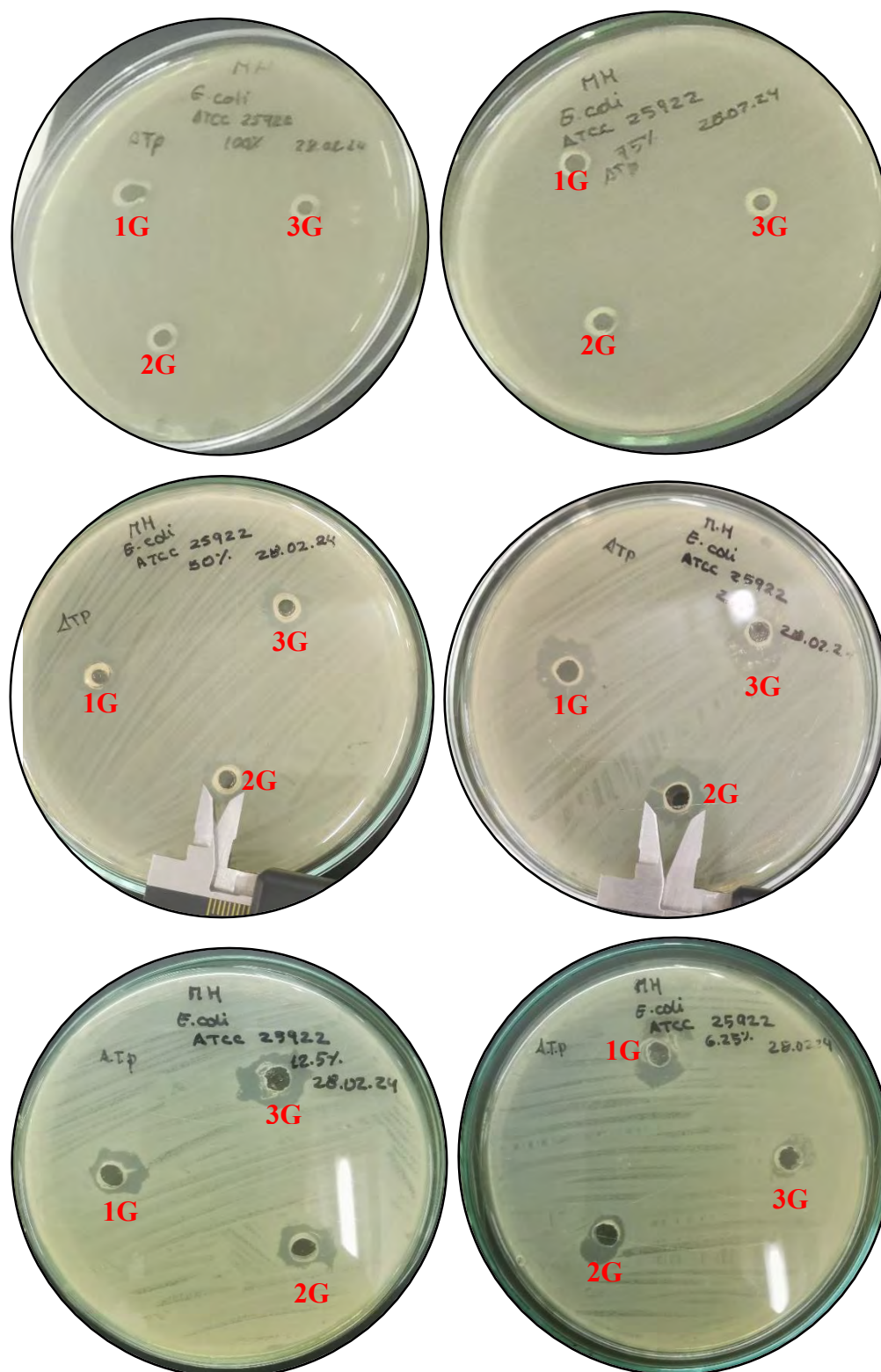


Figura 44*Resultados de la evaluación de la sensibilidad de controles***ANEXO 3****Tabla 14***Preparación de concentraciones*

Sustancias	Concentración de aceite esencial (%)						C +	C -
	100 %	75 %	50 %	25 %	12.50%	6.25%		
Aceite (μL)	200	150	100	50	25	12.5		
Et-OH absoluto (μL)		50	100	150	175	187.5		
V. final	200μL	200μL	200μL	200μL	200μL	200μL	200μL	200μL

Las concentraciones de aceites esenciales se prepararon utilizando etanol absoluto como disolvente, según lo indicado en la tabla correspondiente. Todas las soluciones se elaboraron en tubos Eppendorf de 1.5 mL.

Tabla 15

Resultados de los diámetros de los halos de inhibición del efecto antibacteriano del aceite esencial de Tanacetum parthenium L., frente a Staphylococcus aureus ATCC 29213

Concentraciones (%)	Diámetro de Halos de inhibición (mm) en cepas de <i>S. aureus</i> ATCC 29213			
<i>T. parthenium.</i>	1G	2G	3G	Promedio
6.25	12.27	10.92	15.38	12.8566
12.50	12.65	13.57	15.1	13.7733
25	18.17	14.56	12.97	15.2333
50	19.16	15.54	14.75	16.4833
75	17.8	14.73	19.11	17.2133
100	41.67	28.25	23.57	31.1633
Vancomicina 30µg	19.48	19.83		19.655

Donde:

1G: Grupo 1 de halos de inhibición.

2G: Grupo 2 de halos de inhibición.

3G: Grupo 3 de halos de inhibición.

Tabla 16

Resultados de los diámetros de los halos de inhibición del efecto antibacteriano del aceite esencial de Tanacetum parthenium L., frente a Escherichia coli ATCC 25992

Concentraciones (%)	Diámetro de Halos de inhibición (mm) en cepas de <i>E. coli</i> ATCC 25922			
<i>T. parthenium.</i>	1G	2G	3G	Promedio
6.25	15.74	13.49	11.78	13.67
12.5	13.73	12.81	15.62	14.05
25	13.67	13.02	13.75	13.48
50	9.03	8.99	10.27	9.43
75	8.86	9.74	9.68	9.43
100	8.95	9.03	8.76	8.91
Ciprofloxacina 5µg	38.87	42.11		40.49

Donde:

1G: Grupo 1 de halos de inhibición.

2G: Grupo 2 de halos de inhibición.

3G: Grupo 3 de halos de inhibición.

ANEXO 4



RESOLUCIÓN ADMINISTRATIVA

Cusco, 07 de Febrero del 2024

RA N° D000033-2024-MIDAGRI-SERFOR-ATFFS - CUSCO

VISTO:

El Informe Técnico N° D000024-2024-MIDAGRI-SERFOR-ATFFS-CUSCO del 26 de enero de 2024 y la solicitud S/N del 12 de setiembre de 2023 con número de expediente 2023-0042363, presentada por la señora Yudi Silvia Villa Huamán, identificada con DNI N° 76757797, quien solicita autorización con fines de investigación científica en flora silvestre, fuera de Áreas Naturales Protegidas, como parte de la investigación titulada "Composición química y efecto antibacteriano del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* (L.) "Santa María" frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922", a desarrollarse en la Comunidad Ccorao Quesermayo, distrito de San Sebastián, provincia y departamento de Cusco; y todo lo actuado en el expediente administrativo, y;

CONSIDERANDO:

Que, el artículo 66° de la Constitución Política del Perú, establece que los recursos naturales, renovables y no renovables, son patrimonio de la Nación. El Estado es soberano en su aprovechamiento; asimismo, en su artículo 68° establece que es obligación del Estado promover la conservación de la diversidad biológica;

Que, la Ley N° 26821, Ley Orgánica para el Aprovechamiento Sostenible de los Recursos Naturales, establece en su artículo 9°, referido a la investigación científica, que el Estado promueve la investigación científica y tecnológica sobre la diversidad, calidad, composición, potencialidad y gestión de los recursos naturales. Asimismo, promueve la información y el conocimiento sobre los recursos naturales. Para estos efectos, podrán otorgarse permisos para investigación en materia de recursos naturales;

Que, el artículo 13° de la Ley N° 29763, crea el Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre-SERFOR, como organismo público técnico especializado, con personería jurídica de derecho público interno, como pliego presupuestal adscrito al Ministerio de Agricultura y Riego. Asimismo, se señala que el SERFOR es la autoridad nacional forestal y de fauna silvestre, ente rector del Sistema Nacional de Gestión Forestal y de Fauna Silvestre (SINAFOR), y se constituye en su autoridad técnico normativa a nivel nacional, encargada de dictar las normas y establecer los procedimientos relacionados a su ámbito;

Que, el Reglamento de Organización y Funciones del Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre-SERFOR, aprobado mediante Decreto Supremo N° 007-2013-MINAGRI, y modificado mediante el D.S. N° 016-2014-MINAGRI, establece en su primera Disposición Complementaria Transitoria que, las Administraciones Técnicas Forestales y de Fauna Silvestre (en adelante, ATFFS) se incorporan al SERFOR, como órganos desconcentrados de actuación local del SERFOR, con pliego presupuestal adscrito al Ministerio de Agricultura y Riego, hoy Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego;

Que, el artículo 137° de la precitada Ley N° 29763, Ley Forestal y de Fauna Silvestre, declara de interés nacional realizar la investigación, el desarrollo tecnológico, la mejora del conocimiento y el monitoreo del estado de conservación del patrimonio forestal y de fauna silvestre de la Nación;

Firmado digitalmente por ASALDE
ALVAREZ Cruz Jessica FAU/
2056230027 soft
Motivo: Dny V° B°
Fecha: 06.02.2024 15:50:54 -05:00

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento electrónico archivado en el Servicio Forestal y de Fauna Silvestre, aplicando lo dispuesto por el Art. 25 de D.S. 070-2013-PCM y la Tercera Disposición Complementaria Final del D.S. 026-2016-PCM. Su autenticidad e integridad pueden ser contrastadas a través de la siguiente dirección web: Url: <https://sgd.serfor.gob.pe/validadorDocumental/> Clave: IZQBR44



RESOLUCIÓN ADMINISTRATIVA

Que, el Decreto Supremo N° 018-2015-MINAGRI, que aprueba el Reglamento para la Gestión Forestal, regula el procedimiento de otorgamiento de autorizaciones con fines de investigación científica de flora silvestre, estableciendo para tal efecto los requisitos y consideraciones para su otorgamiento, de acuerdo con los lineamientos aprobados por el SERFOR, así como las obligaciones materia de cumplimiento por parte de la titular de la autorización;

Que, el artículo 154° del Reglamento para la Gestión Forestal, establece que la investigación científica del Patrimonio se aprueba mediante autorizaciones, salvaguardando los derechos del país respecto de su patrimonio genético nativo y que son las ARFFS las que otorgan las autorizaciones con fines de investigación científica que impliquen la utilización de métodos directos e indirectos para especies no categorizadas como amenazadas y no listadas en los Apéndices CITES y que en ningún caso otorgue el acceso a los recursos genéticos o sus productos derivados. Asimismo, menciona que los derechos otorgados a través de las autorizaciones de investigación científica, no otorgan derechos sobre los recursos genéticos contenidos en ellos;

Que, mediante Resolución de Dirección Ejecutiva N° 060-2016-SERFOR/DE, del 01 de abril del 2016, se aprueban los "Lineamientos para el otorgamiento de la autorización con fines de investigación científica de flora y/o fauna silvestre";

Que, mediante solicitud S/N, presentada el 12 de setiembre de 2023, la señora Yudi Silvia Villa Huamán, identificada con DNI N° 76757797, en su calidad de investigadora principal, solicitó autorización con fines de investigación científica de flora silvestre, para la investigación titulada: "Composición química y efecto antibacteriano del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* (L.) "Santa María" frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922", a desarrollarse en la Comunidad Ccorao Quesermayo, distrito de San Sebastián, provincia y departamento de Cusco, por el periodo de seis (6) meses;

Que, en el actual Texto Único de Procedimientos Administrativos - TUPA del SERFOR, aprobado por Decreto Supremo N° 001-2016-MINAGRI y modificado por Resolución Ministerial N° 613-2016-MINAGRI, Resolución Ministerial N° 026-2019-MINAGRI, Resolución de Dirección Ejecutiva N° D000103-2020-MINAGRI-SERFOR-DE y Resolución de Dirección Ejecutiva N° D000099-2021-MINAGRI-SERFOR-DE; no se contempla el procedimiento de autorización para realizar investigación científica fuera de ANP;

Que, en observancia del principio de impulso de oficio, previsto en el numeral 1.3 del artículo IV del Título Preliminar del Texto Único Ordenado de la Ley N° 27444, Ley del Procedimiento Administrativo General, aprobado con Decreto Supremo N° 004-2019-JUS; se colige que, las autoridades deben dirigir e impulsar de oficio el procedimiento y ordenar la realización o práctica de los actos que resulten convenientes para el esclarecimiento y resolución de las cuestiones necesarias;

Que, por tanto, la solicitud presentada ha sido evaluada verificando el cumplimiento de los requisitos exigidos en el numeral 9° del ANEXO N° 1 del Reglamento para la Gestión

¹ El numeral 9 del ANEXO N° 1 del Reglamento para la Gestión Forestal, establece los requisitos para la autorización con fines de investigación de flora, con o sin contrato de acceso a recursos genéticos, conforme la siguiente documentación:

- Solicitud con carácter de declaración jurada dirigida a la autoridad competente, según formato, que contenga hoja de vida del investigador principal, relación de investigadores y el Plan de Investigación.
- Carta de presentación de los investigadores participantes expedida por la institución científica de procedencia.

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento electrónico archivado en el Servicio Forestal y de Fauna Silvestre, aplicando lo dispuesto por el Art. 25 de D.S. 070-2013-PCM y la Tercera Disposición Complementaria Final del D.S. 026-2016-PCM. Su autenticidad e integridad pueden ser contrastadas a través de la siguiente dirección web: Url: <https://sgd.serfor.gob.pe/validadorDocumental/> Clave: IZQBR44



RESOLUCIÓN ADMINISTRATIVA

Forestal, establece los requisitos para la solicitud de autorizaciones con fines de investigación de flora en concordancia con el numeral 6.6 de los lineamientos aprobados por Resolución de Dirección Ejecutiva N° 060-2016-SERFOR/DE, se establecen los siguientes requisitos para la autorización con fines de investigación científica fuera de ANP: i) Solicitud con carácter de declaración jurada que contenga información sobre el investigador, según formato; ii) Hoja de vida del investigador principal y plan de investigación, según formato; iii) Carta de presentación de los investigadores participantes, emitida por la institución académica u organización científica nacional o extranjera de procedencia; iv) Documento que acredite el consentimiento informado previo, expedido por la respectiva organización comunal representativa, de corresponder; y v) Documento que acredite el acuerdo entre las instituciones que respaldan a los investigadores nacionales y extranjeros, en caso la solicitud sea presentada por un investigador extranjero;

Que, el Informe Técnico del visto, concluye que la administrada reúne las condiciones mínimas para el otorgamiento de la autorización solicitada y que cumple con los requisitos establecidos en el numeral 9 del anexo N° 1 del Reglamento para la Gestión Forestal y los lineamientos aprobados por Resolución de Dirección Ejecutiva N° 060-2016-SERFOR/DE, y con los criterios técnicos para llevar a cabo el proyecto denominado "Composición química y efecto antibacteriano del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* (L.) "Santa María" frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922" por el periodo de seis (6) meses, según el cronograma de trabajo del plan de investigación presentado, el cual se llevará a cabo en la Comunidad Ccorao Quesermayo, distrito de San Sebastián, provincia y departamento de Cusco, fuera de áreas naturales protegidas y de territorios de comunidades campesinas y nativas;

Que, la investigación tiene como objetivo general el de determinar la composición química y efecto antibacteriano del aceite esencial *Tanacetum parthenium* (L.) "Santa María" frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922 y como objetivos específicos: i) Obtener aceite esencial de santa maria mediante el método de hidrodestilación con trampa de clewenger; ii) Realizar las características fisicoquímicas del aceite esencial de Santa María y iii) Determinar el efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*;

Que, respecto a la justificación del proyecto, la investigadora manifiesta que este contribuirá en la validación científica al uso tradicional de Santa María, como antiinflamatorio, antifúngica, insecticida, antiparasitaria anticancerígeno y antibacteriano y que pueda ser usado para tratar problemas de salud causado por bacterias;

Que, en cuanto a los metodología, esta consiste en la identificación botánica de la especie en estudio, revisión bibliográfica, construcción de marco teórico, muestreo y preparación de la muestra para el trabajo experimental, obtención de aceite esencial, determinación de las características fisicoquímicas del aceite esencial, determinación de la composición química del aceite esencial por cromatografía de gases y espectrometría de masas, evaluación de efecto antibacteriano del aceite esencial y análisis e interpretación de resultados. Se utilizará la técnica de hidrodestilación de Clewenger, técnica kirby Bauer (método de difusión en agar);

Que, conforme a los objetivos, métodos y técnicas detallados en el plan de investigación presentado, así como los plazos establecidos en el cronograma del proyecto, analizados en el Informe Técnico N° D000024-2024-MIDAGRI-SERFOR-ATFFS-CUSCO

- c. Documento que acredite el consentimiento informado previo, expedido por la respectiva organización comunal representativa, de corresponder.
- d. Documento que acredite el acuerdo entre las instituciones que respaldan a los investigadores nacionales y extranjeros, en caso la solicitud sea presentada por un investigador extranjero.

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento electrónico archivado en el Servicio Forestal y de Fauna Silvestre, aplicando lo dispuesto por el Art. 25 de D.S. 070-2013-PCM y la Tercera Disposición Complementaria Final del D.S. 026-2016-PCM. Su autenticidad e integridad pueden ser contrastadas a través de la siguiente dirección web: Url: <https://sgd.serfor.gob.pe/validadorDocumental/> Clave: IZQBR44



RESOLUCIÓN ADMINISTRATIVA

del 26 de enero de 2024, es pertinente otorgar la autorización con fines de investigación científica de flora silvestre a la señora Yudi Silvia Villa Huamán identificada con DNI N° 73640887, como investigadora principal, para la ejecución del proyecto titulado "Composición química y efecto antibacteriano del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* (L.) "Santa María" frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922";

Que, de conformidad a lo dispuesto en la Ley N° 29763, Ley Forestal y de Fauna Silvestre; el Reglamento para la Gestión Forestal, aprobado por Decreto Supremo N° 018-2015-MINAGRI; el Texto Único Ordenado de la Ley N° 27444, Ley del Procedimiento Administrativo General aprobado con Decreto Supremo N° 004-2019-JUS; el Decreto Supremo N° 007-2013- MINAGRI, que aprueba el Reglamento de Organización y Funciones del Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre - SERFOR, modificado mediante Decreto Supremo N° 016-2014- MINAGRI, en el cual incorpora a las Administraciones Técnicas Forestales y de Fauna Silvestre como Órganos desconcentrados de actuación local del SERFOR y la Resolución de Dirección Ejecutiva N° D00022-2023-MIDAGRI-SERFOR-DE;

SE RESUELVE:

Artículo 1°.- Otorgar la autorización con fines de investigación científica de flora silvestre con colecta, a la señora Yudi Silvia Villa Huamán identificada con DNI N° 76757797, para la realización de la investigación científica titulada: "Composición química y efecto antibacteriano del aceite esencial de *Tanacetum parthenium* (L.) "Santa María" frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922" en la que participará como investigadora principal, en virtud de las consideraciones antes expuestas, correspondiéndole el Código de Autorización N° **08-CUS-AUT-IFL-2024-001**.

Artículo 2°.- El desarrollo de la investigación científica autorizada se circunscribe a la Comunidad Ccorao Quesermayo, distrito de San Sebastián, provincia y departamento de Cusco, fuera de áreas naturales protegidas y de territorios de comunidades campesinas y nativas, de acuerdo con las coordenadas referenciales detalladas en el Plan de Investigación presentado.

Artículo 3°.- La investigación científica autorizada incluye la colecta de especies de flora silvestre a realizarse en la localidad señalada en el artículo anterior, fuera de Áreas Naturales Protegidas y por el período señalado en el Plan de Investigación presentado.

Artículo 4°.- En mérito a la autorización que precede, la titular se encuentra sujeta al cumplimiento del cronograma de trabajo del plan de investigación aprobado, por el período comprendido de seis (6) meses, contados a partir del día siguiente de la notificación de la presente Resolución.

Artículo 5°.- Autorizar la participación de la investigadora:

N°	Nombres y Apellidos	Tipo de documento	N° documento de identidad	Participación en la investigación
1	Yudi Silvia Villa Huamán	DNI	76757797	Investigador principal

Artículo 6°.- La titular, investigadora principal de la autorización tiene las siguientes obligaciones:

- a) No extraer especímenes, ni muestras biológicas de flora silvestre no autorizada, no

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento electrónico archivado en el Servicio Forestal y de Fauna Silvestre, aplicándose lo dispuesto por el Art. 45 de D.S. 070-2014-PCM y la Tercera Disposición Complementaria Final del D.S. 026-2018-PCM. Su autenticidad e integridad pueden ser contrastadas a través de la siguiente dirección web: <https://sgd.serfor.gob.pe/validadorDocumental/> Clave: IZQBR44



RESOLUCIÓN ADMINISTRATIVA

ceder los mismos a terceras personas, ni utilizarlos para fines distintos a lo autorizado.

- b) No contactar ni ingresar a los territorios comunales sin contar con la autorización de las autoridades comunales correspondientes.
- c) Retirar todo el material empleado para la ejecución del presente estudio una vez terminado el trabajo de campo y levantamiento de información biológica.
- d) En caso corresponda, depositar el material colectado en una institución científica nacional depositaria de material biológico, así como entregar a la ATFFS Cusco la constancia de dicho depósito. En casos debidamente justificados, y siempre que el material colectado no constituya holotipos ni ejemplares únicos, el depósito se podrá realizar en una institución distinta a la mencionada para ellos se requiere la autorización del SERFOR.
- e) Solo en el caso que por razones científicas acotadas se requiere enviar al extranjero parte del material colectado, el interesado deberá gestionar el correspondiente permiso de exportación ante la Dirección General Sostenible del Patrimonio Forestal y de Fauna Silvestre del SERFOR, así como pasar el control respectivo. Los ejemplares únicos de los grupos taxonómicos colectados y holotipos solo podrán ser exportados en calidad de préstamo.
- f) Entregar a la ATFFS Cusco una (01) copia del informe final en idioma español (incluyendo versión digital) como resultado de la autorización otorgada, copias del material fotográfico y/o slídes que pueda ser utilizadas para difusión. Asimismo, entregar una (01) copia de las publicaciones producto de la investigación realizada en formato impreso y digital.
- g) El informe final deberá contener una lista taxonómica de las especies objeto de la presente autorización de colecta, en formato MS Excel. Esta lista deberá contar con sus respectivas coordenadas en formato UTM (Datum WGS84), incluyendo la zona (17,18 o 19). Asimismo, incluir los datos de colecta de cada espécimen. El informe final que debe ser usado se encuentra en el Anexo 1 de la presente resolución.
- h) El plazo de cumplimiento de lo señalado en el literal d) y g) no deberá ser mayor a los seis (06) meses al vencimiento de la presente autorización.
- i) Solicitar anticipadamente a la ATFFS Cusco y dentro del plazo de vigencia de la resolución, cualquier cambio en las características de la investigación aprobada, que demanden la modificación de la presente resolución.
- j) Indicar el número de la resolución en las publicaciones generadas a partir de la autorización concedida.

Artículo 7°.- Exhortar a la titular de la presente autorización, cumplir en estricto con las disposiciones legales en materia forestal y de fauna silvestre, caso contrario se procederá a instaurar procedimiento administrativo sancionador.

Artículo 8°.- La titular deberá implementar todas las medidas de seguridad y eliminación de impactos que se puedan producir por las actividades propias de la fase de campo, como toma de datos, tratamiento y transporte de muestras, transporte de equipos, personal, entre otros.

Artículo 9°.- Los derechos otorgados a través de la presente autorización, no eximen a su titular de contar con la autorización respectiva para el ingreso a territorios de comunidades nativas o comunidades campesinas, ANP, predios privados ni áreas comprendidas en títulos habilitantes, por lo que es responsabilidad de la titular obtener las citadas autorizaciones.

Artículo 10°.- La Administración Técnica Forestal y de Fauna Silvestre Cusco del SERFOR, no se responsabiliza por accidentes o daños sufridos por la solicitante y su equipo

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento electrónico archivado en el Servicio Forestal y de Fauna Silvestre, aplicando lo dispuesto por el art. 25 de D.S. 076-2013-PCM y la Tercera Disposición Complementaria Final del D.S. 018-2016-PCM. Su autenticidad e integridad pueden verificarse a través de la siguiente dirección web: Url: <https://sgd.serfor.gob.pe/validadorDocumental/> Clave: IZQBR44



RESOLUCIÓN ADMINISTRATIVA

durante la ejecución del proyecto; asimismo, se reserva el derecho de demandar al proyecto de investigación, los cambios a que hubiese lugar en los casos en que se dicten nuevas disposiciones legales o se formulen ajustes sobre la presente autorización.

Artículo 11°.- Informar que el incumplimiento de los compromisos adquiridos podrá ser causal para denegar futuras autorizaciones a nivel institucional.

Artículo 12°.- Notificar la presente resolución y el Informe Técnico N° D000024-2024-MIDAGRI-SERFOR-ATFFS-CUSCO del 26 de enero de 2024, a la señora Yudi Silvia Villa Huamán, para su conocimiento y fines. Contra la presente resolución, es posible la interposición de los recursos impugnativos previstos en el TUO de la Ley N° 27444, Ley del Procedimiento Administrativo General, aprobado por Decreto Supremo N° 004-2019-JUS, en el plazo de quince (15) días hábiles más el término de la distancia (en caso corresponda), contados a partir del día siguiente de notificada la presente.

Artículo 13°.- Remitir la presente resolución y el Informe Técnico N° D000024-2024-MIDAGRI-SERFOR-ATFFS-CUSCO a la Dirección General de Información y Ordenamiento Forestal y de Fauna Silvestre, para su correspondiente registro; así como, a la Dirección General de Gestión Sostenible del Patrimonio Forestal y de Fauna Silvestre.

Artículo 14°.- Disponer la publicación de la presente Resolución en el Portal Web del Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre: www.gob.pe/serfor

Regístrese y comuníquese,

Documento firmado digitalmente

RONALD SENIN CHANCASANAMPA MEDINA
ADMINISTRADOR TECNICO FFS
ATFFS – CUSCO

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento electrónico archivado en el Servicio Forestal y de Fauna Silvestre; aplicando lo dispuesto por el Art. 25 de D.L. 1720-2013-PCM y la Tercera Disposición Complementaria Final del D.L. 1726-2013-PCM, su autenticidad e integridad pueden ser contrastadas a través de la siguiente dirección web: URL: <https://sgd.serfor.gob.pe/validadorDocumental/> Clave: IZQB44

ANEXO 5

Instrucciones para la activación de las cepas ATCC KWIK-STIK™ Plus

INSTRUCCIONES ILUSTRADAS

- 1**

Permita que la bolsa de KWIK-STIK™ alcance la temperatura ambiente sin abrirla. Abra la bolsa a la altura de la muesca y quite la unidad KWIK-STIK™.
- 2**

Desprenda la parte despegable de la etiqueta y sujétela a la placa de cultivo primario o al registro de control de calidad. No desmonte el dispositivo durante la hidratación.
- 3**

Sobre el borde de la mesa o el banco de trabajo, triture la ampolla en la parte superior del KWIK-STIK™ (justo debajo del menisco del líquido) para liberar el líquido hidratante. Rompa la ampolla solo una vez. Si la rompe varias veces puede hacer que fragmentos de vidrio perforen la carcasa de plástico, y crear así un riesgo de lesiones.
- 4**

Sostenga verticalmente y golpee sobre una superficie dura para facilitar el flujo del líquido a través del eje hacia la parte inferior de la unidad donde está contenida la microesfera. No agite el KWIK-STIK™ y no cubra el pequeño orificio de ventilación de la parte superior del KWIK-STIK™.
- 5**

Pellizque la parte inferior de la unidad y triture la microesfera en el líquido hasta que este se haya disuelto.
- 6**

A continuación, sature de forma abundante el hisopo con el material hidratado y transfiera al medio de agar apropiado o utilice de acuerdo con el POE del laboratorio. Una vez hidratado, utilícelo de inmediato.
- 7**

Inocule la(s) placa(s) de cultivo primario haciendo rodar suavemente el hisopo sobre un tercio de la placa.
- 8**

Mediante un bucle estéril, estríe para facilitar el aislamiento de colonias.
- 9**

Deséchelo el KWIK-STIK™ mediante la eliminación adecuada de riesgos biológicos.
- 10**

Inmediatamente incube la(s) placa(s) invertida(s) de cultivo primario inoculado a temperatura y condiciones apropiadas para el microorganismo.

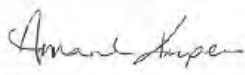
El método de cultivo se puede encontrar en la página del producto en microbiolgcx.com

ANEXO 6

Certificado de cepa *Escherichia coli* ATCC 25922

Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

SPECIFICATIONS:	RELEASE INFORMATION:
Product Name: <i>Escherichia coli</i>	Quality Control Technologist: Christine Condon
Catalog Number: 0335	Release Date: 2021/07/12
Lot Number: 335-527**	
Reference Number: ATCC® 25922™**	
Passage from Reference: 3	
Expiration Date: 2023/05/31	

Performance	
Macroscopic Features: 2 colony types, both are gray & beta hemolytic: one is circular to irregular, convex, slightly erose edge & smooth; other is larger, irregular, low convex, erose edge & rough Microscopic Features: Gram negative straight rod	Medium: SBAP Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF (1)	
See attached ID System results document.	
Other Features/ Challenges: Results	
(1) Oxidase (Kovacs): negative Beta-glucuronidase (E. coli Broth w/MUG): positive (1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 15 - 22 mm (1) Gentamicin (10 mcg - Disk Susceptibility): 19 - 26 mm (1) SXT (1.25/23.75 mcg - Disk Susceptibility): 23 - 29 mm	 Amanda Kuperus Director of Quality Control AUTHORIZED SIGNATURE
**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number. Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information. Individual products are traceable to a recognized culture collection. (1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025.  TESTING CERT #2655.01   REFERENCE MATERIAL PRODUCER CERT #2655.02 (*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.	

ANEXO 7

Certificado de cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 29213



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

SPECIFICATIONS:	RELEASE INFORMATION:
Product Name: <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	Quality Control Technologist: Christine Condon
Catalog Number: 0365	Release Date: 2023/04/18
Lot Number: 365-122**	
Reference Number: ATCC® 29213™*	
Passage from Reference: 3	
Expiration Date: 2025/03/31	

Performance	
Macroscopic Features: Medium to large, convex, white-yellow, creamy opaque, beta hemolytic	Medium: SBAP
Microscopic Features: Gram positive cocci occurring singly, in pairs and in irregular clusters	Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF (1)	
See attached ID System results document.	
Other Features/ Challenges: Results	
(1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): positive (1) Coagulase (rabbit plasma-tube): positive (1) Beta Lactamase (Cefinase Disk): positive (1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): ≤ 28 mm (1) Penicillin (10 units - Disk Susceptibility): ≤ 28 mm Urea Agar Slant: positive	 Amanda Kuperus Director of Quality Control AUTHORIZED SIGNATURE
**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number. <u>Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</u> Individual products are traceable to a recognized culture collection. (1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025.  TESTING CERT #2655.01   REFERENCE MATERIAL PRODUCER CERT #2655.02 (*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.	

ANEXO 8

Elaboración de caldo BHI para preservar bacterias

© Liofilchem® - Brain Heart Infusion Broth - Rev.1 / 15.05.2020

Instrucciones de Uso
ESPAÑOL



Brain Heart Infusion Broth

Medio líquido para el cultivo de diferentes organismos exigentes y para la detección de estafilococos, de acuerdo a la ISO 6888.

DESCRIPCIÓN

Brain Heart Infusion Broth es un medio líquido utilizado para el cultivo de microorganismos exigentes y no exigentes, incluyendo bacterias aeróbicas y anaeróbicas, desde muestras clínicas, ambientales y alimentos. Este medio se aconseja para el cultivo de estafilococos coagulasa-positivos staphylococci para el test de la coagulasa en plasma de acuerdo a la ISO 6888.

Brain Heart Infusion Broth está recomendado por la APHA para el análisis de aguas potables y aguas de descarga y por la CLSI para la preparación de los inóculos para los estudios de susceptibilidad antimicrobiana

FÓRMULA

	(g/l)
Digerido Enzimático de Tejidos Animales	10.0
Infusión Deshidratada de Cerebro de Ternera	12.5
Infusión Deshidratada de Corazón de Ternera	5.0
Glucosa	2.0
Cloruro Sódico	5.0
Disodio Hidrógeno Fosfato , Anhidro	2.5
pH Final 7.4 ± 0.2 a 25°C	

PRINCIPIO DEL MÉTODO

El digerido enzimático y la infusión de corazón y cerebro suministran los aminoácidos, nitrógeno, carbono, vitaminas y minerales necesarios para el crecimiento de los microorganismos. La Glucosa es la fuente de carbohidratos. El cloruro sódico mantiene el equilibrio osmótico del medio. El Disodio hidrógeno fosfato es el tampón.

PREPARACIÓN

Medio deshidratado Suspender 37 g del polvo deshidratado en 1 litro de agua destilada o desionizada. Mezclar bien. Calentar hasta la ebullición removiendo frecuentemente hasta la completa disolución. Distribuir en los recipientes finales. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

PROCEDIMIENTO DEL TEST

Si se obtiene el cultivo directamente desde un tampón, introducir éste en el caldo después de ser inoculado en una placa Petri. Para muestras líquidas, transferir un asa de la muestra al caldo usando un asa estéril o pipeteando asépticamente la muestra a un medio en placa y al caldo. Examinar el crecimiento después de 24-72 horas de incubación.

Nota: Se recomienda que para la incubación anaeróbica el medio líquido debería reducirse antes de ser inoculado, sometiendo los tubos (con tapones parcialmente desenroscados) a condiciones anaeróbicas durante 18-24 horas. Alternativamente, el medio se puede reducir llevándolo hasta 100°C en un baño. Desenroscar los tapones parcialmente antes de calentar y cerrar cuando se enfríen a la temperatura ambiente.

Para realizar las pruebas de la coagulasa en plasma, según la ISO 6888, inocular los tubos de Brain Heart Infusion Broth con una colonia seleccionada desde placas de Baird Parker Agar (ref. 10020). Incubar a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 horas. Añadir 0.1 ml de cada cultivo a 0.3 ml de plasma de conejo. Examinar después de 4-6 horas de incubación a 37°C para comprobar la coagulación del plasma.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La turbidez indica crecimiento microbico.

El test de la coagulasa se considera positivo si el volumen coagulado es superior a la mitad del volumen inicial del líquido.

ASPECTO

Medio deshidratado: suelto, homogéneo, beige claro.

Medio preparado: claro, ámbar

ALMACENAMIENTO

El polvo deshidratado es muy higroscópico, almacenar a 10-30°C, en un entorno seco, en su frasco original correctamente cerrado. Almacenar las botellas y los tubos a 10-25°C fuera del contacto de la luz. No utilizar el producto fuera de la fecha de caducidad descrita en la etiqueta o si el producto presenta alguna muestra de deterioro o contaminación.

SHELF LIFE

Medio deshidratado: 4 años.

Medio en botellas: 3 años.

Medio en tubos: 2 años.

CONTROL DE CALIDAD

Las placas se inoculan con las cepas indicadas en la siguiente tabla.

Inóculo para productividad: 50-100 CFU.

Inóculo para selectividad: 10^4 - 10^6 CFU.

Condiciones de incubación: $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 horas. 40-48 h en condiciones anaeróbicas para *B. fragilis*.

Tabla QC.

Microorganismo		Crecimiento
<i>Staphylococcus aureus</i>	WDCM 00034	Bueno
<i>Escherichia coli</i>	ATCC® 25922	Bueno
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC® 6305	Bueno
<i>Bacteroides fragilis</i>	ATCC® 25285	Bueno

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Este producto no contiene sustancias peligrosas en concentraciones que excedan los límites fijados por la legislación actual y no está clasificado como peligroso. Se recomienda de todas formas la lectura de la hoja de seguridad para el uso apropiado. El producto está pensado para un uso exclusivo de diagnóstico *in vitro* y debe ser utilizado sólo por operadores debidamente adiestrados.

DESECHO DE RESÍDUOS

El desecho de los residuos debe realizarse según la regulación nacional y local vigente.

BIBLIOGRAFÍA

Vea las referencias al final de este documento.

TABLA DE SÍMBOLOS

Vea la tabla de símbolos al final de este documento.

ANEXO 9

Preparación de agar de Mueller Hinton



Agar Mueller Hinton

Cat. 1058

Para pruebas de sensibilidad con antibióticos y sulfamidas, y para el aislamiento primario de Neisseria y otros patógenos de muestras clínicas

Información práctica

Aplicaciones	Categorías
Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana	Uso general

Industria: Clínica / Test de susceptibilidad antimicrobianos



Principios y usos

Agar Mueller Hinton, junto con el Caldo Mueller Hinton (Cat. 1214), se usa para testar la susceptibilidad antimicrobiana de organismos aeróbicos de crecimiento rápido a partir de muestras clínicas y se ha convertido en el medio estándar para el método de Bauer Kirby de acuerdo a las normas de Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) y European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

El principal objetivo de las pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos in vitro es el proporcionar una guía para el manejo terapéutico de las enfermedades infecciosas a través de la sensibilidad o resistencia de bacterias patógenas aerobias y anaerobias facultativas a diferentes compuestos antimicrobianos.

Debido a que es imposible predecir la susceptibilidad de una bacteria responsable de una determinada infección a los antimicrobianos, las pruebas de susceptibilidad a antibióticos efectuadas en el laboratorio microbiológico se convierten en un instrumento esencial para el manejo terapéutico de los pacientes.

En el medio, la infusión de carne y la peptona de caseína ácida (H) proporcionan nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento. El almidón absorbe cualquier metabolito tóxico producido por el crecimiento microbiano y el agar bacteriológico es el agente solidificante.

Fórmula en g/L

Peptona de caseína ácida (H)	17,5	Agar bacteriológico	17
Infusión de carne	2	Almidón	1,5

Fórmula típica g / L * Ajustada y/o suplementada según sea necesario para cumplir con los criterios de rendimiento.

Preparación

Suspender 38 gramos del medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y disolver con calor y agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta disolver por completo. Distribuir en recipientes apropiados y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar a 45 o 50 °C y agregar sangre defibrinada si se desea. La mezcla de sangre se debe chocolatear calentando a 80 °C durante 10 minutos si se desea el desarrollo de Neisseria. NO SOBRECALENTAR. Para volver a fundir el medio frío, calentar lo más brevemente posible.

Instrucciones de uso

»Para el diagnóstico clínico mediante pruebas de sensibilidad a antibióticos, el tipo de muestra son bacterias aisladas de cualquier tipo de muestra clínica (orina, sangre, recto, esputo, etc.):

- Dispensar el medio en placas Petri estériles para obtener una profundidad de 4±0,5 mm (aproximadamente 25 mL en una placa circular de 90 mm, 31 mL en una placa circular de 100 mm, 71 mL en una placa circular de 150 mm y 40 mL en una placa cuadrada de 100 mm).

- Ajustar la densidad de la suspensión del organismo a 0,5 Mac Farland. Un inóculo más denso producirá zonas de inhibición más reducidas y un inóculo menor dará lugar al efecto opuesto.

- La suspensión no debe usarse después de 15 minutos y siempre se usará antes de 60 minutos de preparación.

- Sumerge un hisopo de algodón estéril en la suspensión.
- Para evitar la sobreinoculación de bacterias gram negativas, elimine el exceso de líquido presionando y girando el hisopo contra el interior del tubo.
- Para bacterias gram positivas, no presionar ni girar el hisopo contra el interior del tubo.
- Aplique los discos antes de que pasen 15 minutos desde la inoculación.
- Incubar a una temperatura de 37 ± 1 °C durante 24 horas.
- Los resultados son tomados desde el borde donde se observa inhibición completa con la placa a unos 30 cm del ojo.
- Leer las placas de MH desde la parte posterior sobre un fondo oscuro iluminado con luz reflejada.
- En caso de colonias distintas dentro de las zonas, verificar la pureza y repetir la prueba si es necesario.
- Para *Proteus* spp., Ignorar el swarming y leer inhibición del crecimiento.
- En caso de zonas dobles, leer la zona interna.

Para el cultivo de *Neisseria*:

- Incubar las placas a una temperatura de 37 ± 1 °C en una atmósfera de CO₂ durante 18-24 horas.

Control de calidad

Solubilidad	Apariencia	Color del medio deshidratado	Color del medio preparado	Final pH (25°C)
Ligeramente opalescente	Polvo fino	Crema	Sin sangre: ámbar opalescente. Con sangre: rojo	7,4±0,2

Test microbiológico

Prueba de sensibilidad de difusión de disco. Incubation conditions: (37 ± 1 °C / 24 h).

Diámetro del halo en mm.

Microrganismos	Gentamicin 10 µg	Ampicilina 10 µg	Tetraciclina 30 µg	Polimixina B 300 µg	SXT: Trimetoprim (1,25µg)+Sulfametoxazol (23,75 µg)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 CLSI	19-26	15-22	18-25	13-19	23-29
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 EUCAST	19-26	15-22		13-19	23-29
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 CLSI	19-27	27-35	24-30		24-32
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 EUCAST					
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 CLSI	17-23			14-18	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 EUCAST	17-23				
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 CLSI					
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 EUCAST					26-34
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 CLSI					
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 EUCAST	19-25		23-31		26-32

Almacenamiento

Temp. Min.: 2 °C

Temp. Max.: 25 °C

Bibliografía

EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing - Version 6.0 (January 2017)

Reading guide. EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing. Version 5.0 January 2017

Mueller and Hinton A. Protein-Free Medium for Primary Isolation of the *Gonococcus* and *Meningococcus*. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 48:330. 1941.

Harris and Coleman Diagnostic.

Procedures and Reagents. 4th Edition APH, Inc. New York, 1963.

ANEXO 10

Preparación de Agar MacConkey



Agar MacConkey EP/USP/ISO

Cat. 1052

Para el aislamiento e identificación de Enterobacteriaceae a partir de las heces, aguas residuales de orina y alimentos.

Información práctica

Aplicaciones	Categorías
Aislamiento selectivo	Enterobacterias
Aislamiento selectivo	Escherichia coli
Detección	Shigella

Industria: Aguas de consumo / Farmacéutica/Veterinaria / Cosmética / Clínica / Alimentación / Test de susceptibilidad antimicrobianos / Control de Calidad

Regulaciones: USP / Farmacopea Europea / ISO 21150 / ISO 21567



Principios y usos

Agar MacConkey se utiliza para el aislamiento selectivo y la identificación de Enterobacteriaceae de las heces, la orina, aguas residuales y alimentos. También es un medio selectivo y diferencial para el aislamiento de bacterias Gram-negativas entéricas.

La muestra puede sembrarse directamente en el medio o inocularse primero en un caldo de enriquecimiento tal como Caldo Tetrathionato (Cat. 1114), Caldo Selenito Cistina (Cat. 1220), Caldo de Enriquecimiento GN (Cat. 1248) o Caldo MacConkey (Cat. 1210).

La Farmacopea Europea, USP recomienda este medio en el párrafo 2.6.13: "Microbiological examination of non-sterile products: Test for specified microorganisms" para la prueba de E.coli en productos.

ISO 21567 recomienda este medio para la detección de Shigella spp. Se usa para obtener colonias aisladas. Después de incubar las placas de Agar MacConkey, es necesario un paso de confirmación.

ISO 21150 recomienda este medio para la detección de E.coli en muestras cosméticas.

El digerido pancreático de gelatina y peptonas (came y caseína) proporcionan nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esencial para el crecimiento. La lactosa es el carbohidrato fermentable que proporciona carbono y energía. El cloruro sódico suministra los electrolitos esenciales para el transporte y el equilibrio osmótico. Las sales biliares y el cristal violeta son los agentes selectivos e inhiben organismos Gram positivos. El rojo neutro es el indicador de pH. cuando se fermenta la lactosa, el pH del medio disminuye, cambiando el color de rojo neutro a rosa. El agar bacteriológico es el agente solidificante.

Las colonias aisladas de Escherichia coli son de color rojo ladrillo y están rodeadas por una zona de bilis precipitada. Este precipitado biliar se debe a una caída de pH alrededor de la colonia debido a la fermentación de la lactosa.

Fórmula en g/L

Agar bacteriológico	13,5	Sales biliares	1,5
Cristal violeta	0,001	Digerido pancreático de gelatina	17
Rojo neutro	0,03	Mezcla de peptona	3
Cloruro sódico	5	Lactosa monohidrato	10

Preparación

Suspender 50 gramos del medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y disolver con calor y agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta la disolver completamente. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar a 47 °C, mezclar bien y dispensar en placas. Permitir que las placas se solidifiquen y colocarlas boca abajo para evitar la humedad excesiva en la superficie del medio.

» Para diagnóstico clínico, el tipo de muestras es orina y heces.

- Inocular en superficie. Estrías paralelas con el asa o hisopo
- Incubar en condiciones aeróbicas a 35 ± 2 °C durante 18-24 horas.
- Lectura e interpretación de los resultados.

» Para otros usos no amparados por el marcado CE:

Prueba de microorganismos específicos (Enterobacteriaceae) según la Farmacopea Europea:

- Inocular e incubar a 30-35 °C durante 18-24 h en Caldo TSB (Cat. 1224).
- Subcultivar en Caldo MacConkey e incubar a 42-44 °C durante 24-48 h (Cat. 1210).
- Sembrar en una placa de MacConkey Agar.
- Incubar a 30-35 °C durante 18-72 horas.
- El crecimiento de colonias con precipitado biliar indica la posible presencia de *E. coli*.
- Esto se confirma mediante una prueba de identificación.
- Los productos cumplen con la prueba si no hay colonias presentes o si la prueba de identificación es negativa.

Detección de *Shigella* spp según ISO 21567:

- Sembrar la muestra en Caldo *Shigella* (Cat. 2078) con 0,5 µg/mL de novobiocina. Incubar en anaerobiosis a $41,5\pm 1$ °C durante 16-20 horas.
- A partir del caldo *Shigella*, sembrar Agar MacConkey (Cat. 1052), Agar XLD (Cat. 1174) y Agar Entérico Hektoen (Cat. 1030). Incubar a una temperatura de 37 ± 1 °C durante 20-24 horas.
- Realizar las pruebas bioquímicas con las colonias características y sospechosas.

Detección de *E. coli* según ISO 21150:

- Suspender 1 g o 1 ml del producto en 9 ml de caldo de enriquecimiento Eugon LT 100 (Cat. 2110). De acuerdo con las indicaciones de la ISO, puede usarse de manera diferente dependiendo de si se analizan productos miscibles o inmiscibles o si las muestras son productos filtrables. Incubar a $32,5\pm 2,5$ °C durante al menos 20 horas (máximo 72 h).
- A partir del caldo de enriquecimiento, se inocula Agar MacConkey para obtener colonias aisladas. Incubar a $32,5\pm 2,5$ °C durante al menos 24 horas (máximo 48 h).
- La confirmación se hace con colonias sospechosas.

Se recomienda sembrar las muestras en otros medios selectivos como Agar Eosina Azul Metileno (Cat. 1039), Agar SS (Cat. 1064), Agar XLD (Cat. 1080), Agar Entérico Hektoen (Cat. 1030), Agar Sulfito de Bismuto (Cat. 1011), especialmente para *Salmonella typhi* y / o Agar Verde Brillante (Cat. 1078), especialmente para *Salmonella*.

CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS:

Escherichia coli: rojo o rosa; No mucoide; Redonda; Precipitado opaco de sales biliares.

Klebsiella: grande, roja, mucoide.

Enterobacter aerogenes: rosada a roja.

Serratia: Roja a rosa, no mucoide.

Arizona y *Citrobacter*: incolora, transparente; Roja si se fermenta la lactosa.

Proteus: incolora y transparente. Agar amarillo alrededor de la colonia.

Salmonella: incolora, transparente o ámbar. Agar amarillo alrededor de la colonia.

*Shigella sonnei**: incolora a rosa pálido, translúcida, lactosa negativo

Shigella, otras especies: Incolora, translúcida, lactosa negativo.

* *Shigella sonnei* puede fermentar la lactosa después de más de 40 horas de incubación, lo que da una reacción débil similar a *Escherichia coli* después del mismo tiempo.

Control de calidad

Solubilidad	Apariencia	Color del medio deshidratado	Color del medio preparado	Final pH (25°C)
Sin restos	Polvo fino	Beige-rosa	Violeta-rojo	7,1±0,2

Test microbiológico

De acuerdo a Farmacopea europea; *Escherichia coli* ATCC 8739:

Condiciones de incubación: (30-35 °C / 18-72 h)

Condiciones de inoculación: (<=100 CFU)

De acuerdo a ISO 21567; *Shigella dysenteriae*:

Condiciones de incubación: (37 ± 1 °C / 20-24 h)

De acuerdo a ISO 21150; *Escherichia coli* ATCC 8739:

Condiciones de incubación: (30-35 °C / 24-48 h)

Resto de cepas; *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ATCC 25922:

Condiciones incubación: (35 ± 2 °C / 24 h).

Microrganismos	Especificación	Reacción característica
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	Buen crecimiento	Colonias de color rojo-rosa

ANEXO 11

Preparación de agar Manisol Salado



Agar Sal y Manitol (MSA) (Medio Chapman) EP/USP/ISO

Cat. 1062

Para el aislamiento y la enumeración de estafilococos.

Información práctica

Aplicaciones	Categorías
Recuento selectivo	Staphylococcus
Aislamiento selectivo	Staphylococcus

Industria: Farmacéutica/Veterinaria / Clínica / Test de susceptibilidad antimicrobianos / Control de Calidad

Regulaciones: USP / Farmacopea Europea / ISO 22718



Principios y usos

Agar Sal y Manitol (MSA) (Medio Chapman) es un medio selectivo preparado según las recomendaciones de Chapman para el aislamiento de presuntos estafilococos patógenos. La mayoría de las otras bacterias están inhibidas por la alta concentración de cloruro sódico.

El digerido pancreático de caseína, el digerido peptídico de tejido animal y el extracto de carne proporcionan nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento. El manitol es la fuente de energía de carbohidratos y el rojo de fenol es el indicador de pH. El cloruro de sodio suministra electrolitos esenciales para el transporte y el equilibrio osmótico. El agar bacteriológico es el agente solidificante.

La degradación del manitol por bacterias produce productos ácidos que cambian el color del medio de rosa a amarillo. Debido a su alto contenido de cloruro de sodio, se puede usar un inóculo abundante del material en estudio.

La Farmacopea Europea, USP recomienda este medio en el párrafo 2.6.13: "Microbiological examination of non-sterile products: Test for specified microorganisms" para de *Staphylococcus aureus* en productos.

La adición de emulsión de yema de huevo al 5% (Cat. 5152) permite detectar la actividad de la lipasa de los estafilococos, así como la fermentación del manitol. La alta concentración de sal en el medio elimina la emulsión de yema de huevo, y la producción de lipasa se detecta como una zona opaca amarilla alrededor de las colonias de estafilococos que producen esta enzima. Este fenómeno, junto con una prueba de coagulasa positiva, confirma al organismo como un *Staphylococcus* patógeno.

Fórmula en g/L

Agar bacteriológico	15	D-manitol	10
Extracto de carne	1	Digerido pancreático de caseína	5
Digerido péptico de tejido animal	5	Rojo fenol	0,025
Cloruro sódico	75		

Preparación

Suspender 111 gramos del medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y disolver con calor y agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta disolver por completo. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar a 45-50 °C, mezclar bien y dispensar en placas.

Instrucciones de uso

» Para diagnóstico clínico, el tipo de muestra es bacterias aisladas a partir de cualquier muestra clínica.

- Inocular la superficie mediante estrias en paralelo con el asa o el hisopo.
- Incubar a una temperatura de 35±2 °C durante 18-24 horas, y después de 48 horas.
- Lectura e interpretación de los resultados.

» Para otros usos no amparados por el marcado CE:

Prueba de microorganismos específicos (*Staphylococcus aureus*) de acuerdo con la Farmacopea Europea:

- Inocular una cantidad adecuada de Caldo Soja Trypticaseína (Cat. 1224) e incubar a 30-35 °C durante 18-24 horas.
- Subcultivar en un placa de MSA e incubar a 30-35 °C durante 18-72 horas.
- La posible presencia de *S. aureus* está indicada por el crecimiento de colonias amarillas / blancas rodeadas por un zona amarilla. Los estafilococos patógenos que fermentan manitol son grandes y están rodeados por una zona amarilla, las colonias de estafilococos no patógenos aparecen como pequeñas colonias rodeadas por una zona roja o púrpura.
- Confirmar mediante una prueba de identificación.
- El producto cumple con la prueba si las colonias de los tipos descritos no están presentes o si las pruebas de identificación confirmatorias son negativas.

Control de calidad

Solubilidad	Apariencia	Color del medio deshidratado	Color del medio preparado	Final pH (25°C)
Sin restos	Polvo fino	Beige-rosa	Rojo	7,4±0,2

Test microbiológico

De acuerdo a Farmacopea; *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538:

Condiciones incubación: (30-35 °C / 18-72 h).

Condiciones inoculación: Productividad (<=100 CFU) / Inhibición (>=100 CFU).

Resto de cepas:

Condiciones de incubación: (35±2°C / 18-24 y 48 h).

Microorganismos	Especificación	Reacción característica
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Crecimiento aceptable	Colonias rojas
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990	Buen crecimiento	Colonias rojas
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Inhibición	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Buen crecimiento	Colonias amarillas
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Buen crecimiento	Colonias amarillas
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Inhibición	

Almacenamiento

Temp. Min.:2 °C

Temp. Max.:25 °C

Bibliografía

McColloch Am. J. Vet. Research, 8:173. 1947. Velilla, Faber, and Pelczar Am. J. Vet. Research, 8:275. 1947.

Chapman, G.H. 1945 J. Bact. 50:201-203.

European Pharmacopoeia.