

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



TESIS

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL
ACEITE ESENCIAL DE *Clinopodium bolivianum* (Benth.) Kuntze EN
Staphylococcus aureus ATCC 25923**

PRESENTADO POR:

Br. BRYAN NOA HUASCAR

**PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL
DE BIÓLOGO**

ASESORA:

Dra. HELDY YIYI ESPINOZA CARRASCO

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 HELDY YUYI ESPINOZA CARRASCO
..... quien aplica el software de detección de similitud al
trabajo de investigación/tesis titulada: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA
DEL ACEITE ESENCIAL DE *Clinopodium bolivianum* (Benth.) Kuntze EN *Staphylococcus*
aureus ATCC 25923

Presentado por: BRYAN NOA HUASCAR DNI N° 73886728;
presentado por: DNI N°:
Para optar el título Profesional/Grado Académico de BIÓLOGO

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 10%.

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 Julio de 2026

Firma

Post firma Hedy Y.Y. Espinoza Carrasco

Nro. de DNI 23826797

ORCID del Asesor 0000-0002-4016-8815

Se adjunta:

- Reporte generado por el Sistema Antiplagio.
- Enlace del Reporte Generado por el Sistema de Detección de Similitud: **oid:** 27259:611361077

Bryan Noa Huascar

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Clinopodium bolivianum* (Benth.) Kuntze...

 Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::27259:611361077

Fecha de entrega

30 jul 2026, 10:47 a.m. GMT-5

Fecha de descarga

30 jul 2026, 10:52 a.m. GMT-5

Nombre del archivo

TESIS.pdf

Tamaño del archivo

5.0 MB

114 páginas

17.924 palabras

110.215 caracteres

10% 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 12 palabras)

Fuentes principales

- 9%  Fuentes de Internet
- 1%  Publicaciones
- 7%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alerta de integridad para revisión

-  **Texto oculto**
2 caracteres sospechosos en N.º de páginas
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

Dedico este trabajo a toda mi familia en especial a mis padres Raul Noa Quispe y Teresa Huascar Flores, quienes con su amor, esfuerzo y sacrificio me dieron la oportunidad de formarme y alcanzar mis sueños, a mi hermano Jhosep Noa Huascar por apoyarme siempre en las buenas y en las malas. A mi compañera de vida Anny Vaneza Jala Condori, por su amor, comprensión y apoyo incondicional en cada etapa de este proceso.

Finalmente, a todas aquellas personas que, de una u otra manera, estuvieron presentes durante este camino, apoyándome en los momentos difíciles y compartiendo conmigo cada logro alcanzado.

Bryan Noa Huascar

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer de corazón a Dios, por darme fuerza y salud para poder concluir esta etapa tan valiosa en mi vida. A la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, porque en sus aulas no solo adquirí valiosos conocimientos, sino también conocí a personas maravillosas que dejaron una huella en mi vida.

A mi asesora, la Dra. Heldy Y. Espinoza Carrasco, por su paciencia, orientación y los aportes que me brindó a lo largo de la elaboración de esta tesis. Su apoyo constante y sus conocimientos fueron clave para poder culminar este trabajo.

A mi co asesora, la Quím. Jerónima Surco Fuentes, le agradezco de corazón por sus consejos y por la colaboración que me brindó con tanta paciencia para poder llevar a cabo este trabajo.

Al docente Hans Carreño, por su paciencia y los consejos brindados para culminar el trabajo de investigación. Al Dr. Leoncio Solis Quispe por las facilidades del laboratorio para culminar este trabajo de investigación.

Finalmente, a todas las personas que, de alguna forma, hicieron posible el desarrollo de esta investigación con su apoyo y colaboración.

ÍNDICE

RESUMEN.....	I
INTRODUCCIÓN	II
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	IV
JUSTIFICACIÓN.....	VII
OBJETIVOS.....	VIII
HIPÓTESIS	IX
VARIABLES	X
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL.....	1
1.1 ANTECEDENTES.....	1
1.1.1 ANTECEDENTES INTERNACIONALES	1
1.1.2 ANTECEDENTES NACIONALES	4
1.1.3 ANTECEDENTES LOCALES.....	8
1.2 Descripción de <i>Clinopodium bolivianum</i>	9
1.2.1 Ubicación taxonómica	9
1.2.2 Hábitat y distribución	9
1.2.3 Descripción botánica	9
1.2.4 Floración y reproducción.....	11
1.2.5 Usos y medicina tradicional.....	11
1.2.6 Composición química de <i>Clinopodium bolivianum</i>	11
1.3 ACEITE ESENCIAL.....	11
1.3.1 Distribución natural	12
1.3.2 Función de los aceites esenciales en la planta	13
1.3.3 Componentes fitoquímicos (Metabolitos secundarios).....	13
1.3.4 Terpenos	13

1.3.5	Monoterpenos	14
1.3.6	Sesquiterpenos	15
1.3.7	Fenilpropanos	16
1.4	EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES.....	17
1.4.1	Destilación por arrastre con vapor seco	17
1.4.2	Extracción con disolventes	17
1.4.3	Extracción con fluidos supercríticos	17
1.4.4	Destilación por arrastre de vapor	18
1.4.5	Hidrodestilación	18
1.5	CONSERVACIÓN DE ACEITES ESENCIALES.....	19
1.6	AGENTE EMULSIFICANTE TWEEN 80	19
1.7	CROMATOGRAFÍA DE GASES – ESPECTROMETRÍA DE MASAS	20
1.7.1	Espectrometría de masas	20
1.7.2	Acoplamiento cromatografía de gases - espectrometría de masas	21
1.8	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 subsp. aureus Rosenbach	21
1.8.1	Descripción.....	21
1.8.2	Ubicación taxonómica.....	22
1.8.3	Características de cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	23
1.8.4	Estructura de la bacteria <i>Staphylococcus</i>	23
1.8.5	Hábitat	23
1.8.6	Supervivencia ambiental	24
1.8.7	Infección estafilocócica.....	24
1.8.8	Terapéutica	27
1.8.9	Resistencia antibiótica.....	28
1.9	PRUEBA DE SENSIBILIDAD BACTERIANA (ANTIBIOGRAMA).....	28

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
2.1 UBICACIÓN DEL ÁREA DE PROCEDENCIA DE LA MUESTRA	
BOTÁNICA	30
2.2 Procedencia de la cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	31
2.3 ÁREA DE PROCESAMIENTO	31
2.4 MATERIALES:	31
2.4.1 Materiales Biológico	31
2.4.2 Material de campo	31
2.4.3 Equipos de laboratorio	32
2.4.4 Medios de cultivo	32
2.4.5 Antibiótico de control.....	33
2.4.6 Material de vidrio de laboratorio.....	33
2.4.7 Reactivos	33
2.4.8 Otros materiales.....	33
2.5 METODOLOGÍA	34
2.5.1 Tipo de Investigación	34
2.5.2 Línea de investigación.....	34
2.6 METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN	35
2.6.1 Colecta de muestras de <i>Clinopodium bolivianum</i>	35
2.6.2 Determinación taxonómica	35
2.6.3 Selección y seccionamiento de hojas	35
2.6.4 Obtención del aceite esencial de <i>Clinopodium bolivianum</i>	35
2.6.5 Determinación del porcentaje de rendimiento del aceite esencial de <i>Clinopodium bolivianum</i>	37
2.6.6 Determinación de los componentes químicos del aceite esencial.....	37

2.6.7	Evaluación antibacteriana (método de difusión en discos)	38
2.6.8	Activación de la cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	38
2.6.9	Tinción de Gram para la caracterización bacteriana	39
2.6.10	Preparación de concentraciones del Aceite esencial	39
2.6.11	Preparación de discos	40
2.6.12	Preparación del agar Muller Hilton (MH).....	40
2.6.13	Preparación del inóculo	41
2.6.14	Inoculación de las placas.....	41
2.6.15	Aplicación de los discos	42
2.6.16	Incubación	42
2.6.17	Medición del diámetro de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano	42
2.6.18	Evaluación de la efectividad bacteriana frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	42
2.6.19	Diseño experimental.....	43
2.7	PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS.....	44
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		45
3.1	Resultado del porcentaje de rendimiento del aceite esencial de <i>Clinopodium bolivianum</i> (Benth.) Kuntze	45
3.2	Resultados de la composición química del aceite esencial de <i>Clinopodium bolivianum</i>	47
3.3	Resultados de la actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Clinopodium bolivianum</i> (Benth.) (Kuntze)	51
CONCLUSIONES		56
SUGERENCIAS		57

BIBLIOGRAFÍA.....	58
ANEXOS.....	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Operacionalización de variables.....	11
Tabla 2. Concentración del aceite esencial <i>Clinopodium bolivianum</i> utilizada en el antibiograma.....	40
Tabla 3. Porcentaje de extracción del aceite esencial de <i>Clinopodium bolivianum</i>	45
Tabla 4. Composición química del aceite esencial de <i>Clinopodium bolivianum</i>	48
Tabla 5. Halos de inhibición de la actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>C.</i> <i>bolivianum</i> (Kuntze), frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	51
Tabla 6. Determinación del grado de sensibilidad de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 a diferentes concentraciones del aceite esencial de <i>Clinopodium bolivianum</i> (Benth) Kuntze..	53
Tabla 7. Análisis de varianza (ANOVA) de la actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>C.</i> <i>bolivianum</i> frente a la cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	54
Tabla 8. Prueba de Post hoc de Scheffé de la actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>C.</i> <i>bolivianum</i> frente a la cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estructura vegetal de <i>Clinopodium bolivianum</i>	10
Figura 2 Estructuras moleculares de algunos monoterpenos	14
Figura 3 Estructuras moleculares de algunos sesquiterpenos hidrocarburos	15
Figura 4 Estructuras químicas de fenilpropanoides que se encuentran en los aceites esenciales	16
Figura 5 Micrografía electrónica de <i>Staphylococcus aureus</i>	22
Figura 6 Punto de muestreo de <i>Clinopodium bolivianum</i>	30
Figura 7 Hidrodestilación con trampa de clewenger.....	36
Figura 8 Diseño experimental para evaluar la actividad antibacteriana “in vitro”	43
Figura 9 Cromatograma de <i>Clinopodium bolivianum</i> obtenido de Cusco - centro arqueológico Amaru Marka Wasi.....	47
Figura 10 Estructuras moleculares del aceite esencial <i>Clinopodium bolivianum</i>	49

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Certificado de identificación taxonómica de <i>Clinopodium bolivianum</i>	70
Anexo 2. Permiso de investigación SERFOR.....	71
Anexo 3. Ficha técnica del agar Manitol salado	77
Anexo 4. Ficha técnica del caldo BHI (brain heart infusion) para la conservación de bacterias	78
Anexo 5. Ficha técnica de agar de Mueller Hinton para la replicación de bacterias	79
Anexo 6. Certificado de disco de sensibilidad de Fosfomicina trometanol 200 ug	80
Anexo 7. Certificado de la cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	81
Anexo 8. Certificado de cromatografía de gases del aceite esencial de <i>Clinopodium bolivianum</i>	82
Anexo 9. Recolección de las muestras en estudio.....	85
Anexo 10. Preparación del material para la extracción del aceite esencial de <i>Clinopodium bolivianum</i>	86
Anexo 11. Extracción del aceite esencial	87
Anexo 12. Preparación del material para la actividad antibacteriana del aceite esencial	88
Anexo 13. Aislamiento de <i>Staphylococcus aureus</i> de manitol salado	89
Anexo 14. Preparación de las diferentes concentraciones	90
Anexo 15. Medición de los halos de inhibición	91

ABREVIATURAS

ATCC: Colección Americana de Cultivos Tipo.

CLSI: Clinical & Laboratory Standards Institute.

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina.

MSSA: *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina.

GC-MS: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

BHI: Caldo Cerebro Corazón (Brain Heart Infusion).

MH: Agar Mueller Hinton.

AMS: Agar Manitol Salado.

ANOVA: Análisis de Varianza

RESUMEN

Las infecciones ocasionadas por *Staphylococcus aureus* constituyen un problema significativo de salud pública, debido al incremento progresivo de su resistencia a los agentes antimicrobianos. El presente estudio se realizó con la finalidad de determinar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Clinopodium bolivianum* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Se trabajó con hojas de la planta de *Clinopodium bolivianum* colectadas en el Distrito de Cusco, en la zona aledaña al centro arqueológico del templo de la Luna (Amaru Marka Wasi, Chukimarca). La extracción del aceite esencial se realizó mediante hidrodestilación con trampa de Clevenger, alcanzando un rendimiento de 0,73%. El aceite esencial fue caracterizado mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y se identificaron 21 componentes que representan el 96,47% del total de aceites volátiles donde los compuestos mayoritarios fueron: Pulegona con un porcentaje de (21,65%) seguido del L-Mentona con (21,44%), Timol (15,32%), Isopulegona (10,96%), Mentona (10,24%), Linalol (4,27%) y 2-Metilenobornano con (2,17%). La actividad inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 se evaluó mediante la técnica de Kirby-bauer, utilizando siete diferentes concentraciones del aceite esencial (1%, 5%, 15%, 25%, 50%, 75% y 100%). Los resultados se compararon con el antibiótico de referencia Fosfomicina de 200 µg y con un control negativo de Tween 80 al 1%. El aceite esencial al 75 % generó halos de 8,89 mm y la concentración al 100% generó halos de 12,74 mm. Se concluye que el aceite esencial de *Clinopodium bolivianum* en concentraciones de 75% y 100% presenta actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, en comparación con las demás concentraciones evaluadas.

Palabras clave: *Clinopodium bolivianum*, *Staphylococcus aureus*, Aceite esencial, Inhibición, Actividad antibacteriana.

INTRODUCCIÓN

Clinopodium bolivianum comúnmente denominado “Inca muña” es una Lamiaceae de la subfamilia Nepetoideae, conocida por sus amplias propiedades medicinales. Esta especie es propia de las regiones altoandinas de Perú y Bolivia que crece a altitudes que van desde los 2,700 hasta los 3,800 m.s.n.m y, en algunos casos pueden encontrarse a 4000 m.s.n.m. (Salcedo y Alonso, 2021). Es un arbusto aromático importante que crece en áreas cerca de los arroyos que bajan de las montañas, así como lugares elevados de las quebradas (Mamani, 2013). Esta planta es utilizada en la medicina tradicional en infusiones para tratar afecciones respiratorias, indigestión y diarreas (Chirinos et al., 2013).

Desde el punto de vista fitoquímico, las hojas de *Clinopodium bolivianum* presentan compuestos fenólicos que se asemejan a derivados de ácidos hidroxicinámicos como el ácido cafeico y el p-cumárico, además de flavanonas como la eriodictiol y, flavonas del tipo apigenina que tiene propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Yapuchura, 2010). Estos metabolitos secundarios contribuyen a sustentar científicamente su uso tradicional.

Entre los productos derivados de esta especie destacan los aceites esenciales, los cuales se caracterizan por su alta volatilidad y compleja composición química. Su actividad antibacteriana se atribuye a diversas características, entre ellas: la presencia de compuestos fenólicos y terpenoides (como timol, carvacrol y p-cimeno) y su naturaleza lipofílica que le permite interactuar con las membranas celulares bacterianas. Estas características explican sus efectos tanto bacteriostáticos como bactericidas, los cuales varían según la concentración y la composición específica del aceite esencial (Pardo et al., 2017).

Esos efectos pueden ser ensayados contra *Staphylococcus aureus* que representa uno de los principales patógenos de importancia clínica, que muestran una alta resistencia a los antibióticos, debido a su gran impacto global en términos de carga de morbilidad, transmisibilidad y desafíos en el tratamiento (OMS, 2024). Por ende, esta bacteria puede

causar una gran variedad de infecciones que afectan a la piel, los tejidos blandos y articulaciones óseas, así como aquellas que se desarrollan en pacientes que tienen prótesis o catéteres (Castañeda et al., 2018). El uso indiscriminado de antibióticos ha favorecido la aparición de cepas resistentes a penicilinas, macrólidos y cefalosporinas, lo que ha impulsado la investigación de nuevas alternativas terapéuticas de origen natural entre ellos los extractos de vegetales.

Con todos estos aspectos en consideración, este trabajo de investigación evaluó el efecto antibacteriano del aceite esencial *Clinopodium bolivianum* (Benth.) Kuntze en *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Según el informe 2022 del Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos y de su Uso (GLASS), aproximadamente el 35% de los aislamientos de *Staphylococcus aureus* reportados en 76 países corresponden a cepas resistentes a la meticilina (GlobeNewswire, 2025). Dicha resistencia no se distribuye de manera uniforme en el mundo. Según una revisión sistemática de alcance global, las Américas concentran la mayor carga, con aproximadamente con 22%; Europa se sitúa en un nivel intermedio, con cerca del 17% de los casos, mientras que el Pacífico occidental registra la proporción más baja, en torno al 11% (Hasanpour et al., 2023).

En diferentes países de América hay una carencia notable de informes y análisis acerca de la frecuencia y aparición de infecciones originadas por *Staphylococcus aureus*. En Perú la Universidad Peruana Cayetano Heredia llevó a cabo una investigación que examinó la mortalidad asociada con la bacteriemia en hospitales de Lima, proporcionando información crucial sobre la frecuencia y el impacto de esta condición en el entorno hospitalario cuyo estudio identificó 150 casos, de los cuales el 54.7% mostró resistencia a la meticilina (MRSA) y el 45.3% resultó sensible a ella (MSSA), lo que resalta el alto riesgo asociado con las infecciones por MRSA (Cachay et al., 2018).

En el Hospital Docente Belén de Lambayeque se realizó una evaluación de 70 trabajadores del área asistencial, con el objetivo de analizar diversos aspectos de su desempeño y salud laboral, durante el estudio se aislaron bacterias intrahospitalarias, siendo *Staphylococcus aureus* la más prevalente, con un 92.86% de los casos, además esta bacteria demostró una alta resistencia a varios antibióticos, incluyendo un 84,6% a penicilina, un 38,5% a eritromicina, un 15,4% a clindamicina y un 7,7% a rifampicina (Aguilar et al., 2015).

En 2019 el hospital Antonio Lorena de Cusco fue parte de un estudio donde se reveló que el

47,6% de los pacientes hospitalizados recibía tratamiento con antibióticos, siendo *Staphylococcus aureus* identificado como el patógeno más frecuente en los cultivos sanguíneos del estudio (43,6%), presentando una preocupante tasa de resistencia a la meticilina (MRSA) del 48,8%; además las infecciones de piel y partes blandas que estaban relacionadas a *Staphylococcus aureus* representaron el 19% de los diagnósticos tratados, lo que resalta la urgencia de mejorar el acceso a diagnósticos precisos y fortalecer los programas de optimización para combatir la resistencia bacteriana en la región (Rondon et al., 2023). *Staphylococcus aureus subsp. aureus* Rosenbach es conocida por su potencial para inducir una extensa variedad de infecciones en el ser humano, como infecciones cutáneas leves hasta afecciones graves como neumonía, endocarditis y sepsis. También incluye cepas que pueden ser resistentes a múltiples antibióticos.

Este problema es significativo debido a la creciente preocupación global por el incremento de la resistencia de las bacterias a los antibióticos convencionales, lo que ha generado un interés en el desarrollo de alternativas naturales y efectivas. Además, la comunidad científica y la población en general están cada vez más interesados en el potencial de las plantas medicinales para combatir enfermedades infecciosas. En virtud de lo expuesto, se formula las siguientes interrogantes:

Problema general

¿Cuál será la actividad antibacteriana del aceite esencial *Clinopodium bolivianum* (Benth.) Kuntze, sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923?

Problemas específicos

1. ¿Cuál es el porcentaje de rendimiento del aceite esencial de *Clinopodium bolivianum* (Benth.) Kuntze obtenido mediante hidrodestilación con trampa de Clevenger?
2. ¿Cuál es la composición química del aceite esencial de *Clinopodium bolivianum* (Benth.) Kuntze determinada mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas?
3. ¿Cuál es la actividad antibacteriana a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Clinopodium bolivianum* (Benth.) Kuntze sobre la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 evaluado mediante pruebas de sensibilidad bacteriana?

JUSTIFICACIÓN

En vista del incremento de la resistencia antimicrobiana a los antibióticos convencionales, es necesario explorar y desarrollar nuevas alternativas terapéuticas, preferentemente de origen natural. Se ha demostrado que los aceites esenciales extraídos de plantas aromáticas poseen propiedades antimicrobianas muy prometedoras, lo que lo convierte en un recurso potencial para el desarrollo de tratamientos alternativos contra infecciones bacterianas. Las comunidades rurales de la región andina han utilizado históricamente *Clinopodium bolivianum* con fines medicinales para tratar diversas enfermedades (Rocabado Imaña et al., 2025). Investigaciones científicas que validen el conocimiento tradicional y su identificación de los componentes químicos responsables de su actividad terapéutica podría contribuir a la conservación y promoción de la medicina tradicional en el Perú (Reyes et al., 2025).

Staphylococcus aureus es una bacteria que representa un serio problema en la medicina actual, su peligrosidad radica en que puede causar desde infecciones relativamente menores en la piel hasta cuadros graves como neumonía, endocarditis o sepsis que pueden costar la vida. A esto se suma la capacidad para adaptarse a distintos tejidos, escapar de las defensas del organismo y resistir a múltiples antibióticos, características que lo convierten en uno de los microorganismos más difíciles de combatir en la práctica clínica (Touaitia et al., 2025).

Por consiguiente, la siguiente investigación busca contribuir conocimiento científico sobre el efecto del aceite esencial de *Clinopodium bolivianum* procedente del distrito de Cusco específicamente de las zonas aledañas al centro arqueológico del templo de la luna (Amaru Marka Wasi), que servirá para saber su efecto antibacteriano contra *Staphylococcus aureus* y así poder desarrollar tratamientos efectivos para estas infecciones bacterianas, especialmente en entornos con recursos limitados como las comunidades rurales del Cusco. Esto permitirá valorar la eficiencia del recurso vegetal y revalorizar el aprovechamiento sostenible de la flora medicinal del Cusco.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Clinopodium bolivianum* en *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Objetivos específicos

1. Determinar el porcentaje de rendimiento del aceite esencial de *Clinopodium bolivianum* (Benth.) Kuntze mediante hidrodestilación con trampa de cleverger.
2. Determinar la composición química del aceite esencial de *Clinopodium bolivianum* (Benth.) Kuntze por cromatografía de gases y espectrometría de masas.
3. Determinar la actividad antibacteriana a diferentes concentraciones del aceite esencial *Clinopodium bolivianum* (Benth.) Kuntze sobre la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mediante pruebas de sensibilidad bacteriana.

HIPÓTESIS

El aceite esencial de *Clinopodium bolivianum* (Benth.) Kuntze presenta efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, el cual varía en función de la concentración aplicada.

VARIABLES

VARIABLE INDEPENDIENTE

- Concentraciones del aceite esencial de *Clinopodium bolivianum*.

VARIABLE DEPENDIENTE

- Porcentaje de rendimiento.
- Composición química.
- Actividad antibacteriana.

Tabla 1 Operacionalización de variable

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	DEFINICIÓN	DIMENSIONES	INDICADORES
Concentración del aceite esencial de <i>Clinopodium bolivianum</i>	Independiente	Magnitud que expresa cantidad del aceite esencial de <i>Clinopodium bolivianum</i> presente en una solución, expresada como proporción o porcentaje respecto al volumen total.	50µL/mL (5%) 250µL/mL (25%) 500 µL/mL (50%) 750µL/mL (75%) 1000µL/mL (100%)	Concentración µL/mL
Actividad antibacteriana del aceite esencial en <i>Staphylococcus aureus</i>	Dependiente	Capacidad para inhibir desarrollo, crecimiento y reproducción de la bacteria.	Halos de inhibición en (mm) < 8 8 – 14 15 – 20 >20	Escala de Duraffourd: Resistente (R) Sensible (S) Muy sensible (MS) Altamente sensible (AS)
Porcentaje de rendimiento	Dependiente	Relación porcentual entre la cantidad de aceite esencial	$\% R = \frac{\text{Volumen de aceite obtenido (mL)}}{\text{peso de la muestra (g)}} \times 100$	Porcentaje (%)
Composición química	Dependiente	Conjunto de compuestos químicos volátiles presentes en el aceite esencial, identificados mediante técnicas analíticas como cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC -MS).	Número total de compuestos identificados. Abundancia	n (Cantidad) Porcentaje de abundancia (%)

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

1.1 ANTECEDENTES

1.1.1 ANTECEDENTES INTERNACIONALES

Apaza Ticona et al., (2024), realizaron un estudio en Madrid, España sobre la actividad antiinflamatoria, antibacteriana e inhibición bacteriana de los diterpenos aislados de *Clinopodium bolivianum* que fueron colectados en el departamento de La Paz (Bolivia), mediante procesos de extracción y fraccionamiento aislaron cuatro compuestos diterpenoides: 15-Hydroxy-12-oxo-abietic acid, 12 α -hydroxyabietic acid, Jolkinolide E y 15-Hydroxydehydroabietic acid, mostraron actividad antiinflamatoria por inhibición de la activación del NF-kB, así como propiedades antibacteriana especialmente con bacterias Gram positivas y acción antibiofilm frente a bacterias Gram negativas. Tanto el diterpeno Jolkinolide E y 15-Hydroxydehydroabietic acid demostraron los efectos antiinflamatorios más significativos en líneas celulares HBEC3-KT y MRC-5, con valores de CI₅₀ inferiores a 24 μ M, además ambos compuestos fueron particularmente efectivos contra *Staphylococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*; llegando a la conclusión que este estudio respalda el uso tradicional de *Clinopodium bolivianum* en tratamiento de infecciones respiratorias y resalta el potencial de los compuestos aislados como candidatos prometedores en el desarrollo de nuevos fármacos ante la creciente resistencia bacteriana.

Salcedo & Alonso (2021), realizaron una recopilación exhaustiva en Argentina sobre la composición fitoquímica, estudios preclínicos y clínicos de la especie *Clinopodium bolivianum* antes denominada *Satureja boliviana* (Benth.), cuyo objetivo fue identificar y agrupar sus actividades más destacadas en categorías específicas para lo cual abarcan fuentes disponibles en internet, revistas y libros encontrando un total de 45 referencias bibliográficas que sirvieron

para elaborar una revisión organizada en sinonimias, descripción botánica , composición química , toxicología, estatus legal y formas de uso de *Saruteja boliviana* (Benth).

Noriega et al., (2018), realizaron una investigación en la provincia de Pichincha, Ecuador del aceite esencial de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) frente a patógenos respiratorios, el aceite esencial lo obtuvieron por destilación al vapor de las hojas y flores, que posteriormente mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas obtuvieron como componentes principales: acetato de carvacrol (42,1%), carvacrol (20,6%), pulegona (6,3%) y timol (5,5%). La capacidad antioxidante lo realizaron en ensayos DPPH (CI₅₀: 1,8 µl/ml), ABTS (CI₅₀: 0,3 µl/ml) y β-caroteno (CI₅₀: 0,031 µl/ml), comparando con *Thymus vulgaris* y el antioxidante sintético BHA; llegando a la conclusión que *Clinopodium nubigenum* tiene una significativa actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (2,5 % v/v), *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus. pneumoniae* y *Streptococcus. mutans* (0,6 % v/v), lo que sugiere su potencial como alternativa natural frente a bacterias resistentes a antibióticos.

Morocho et al., (2018), realizaron un estudio en Saraguro provincia de Loja (Ecuador), sobre la fitoquímica de metabolitos volátiles y fijos de *Clinopodium taxifolium* (Kunth), el aceite esencial lo obtuvieron por hidrodestilación en dos periodos diferentes y posteriormente se analizaron por GC-MS y GC acoplado a detector de ionización de Llama (GC-FID), encontrando 54 compuestos y los de mayor porcentaje fueron carvacrol metil éter (18,9-23,2%), carvacrol (13,8-16,3%) y acetato de carvacril (11,4-4,8%); las actividades antibacterianas se determinaron como concentración mínima de inhibición contra *Staphylococcus aureus* , *Enterococcus faecalis* , *Escherichia coli* , *Klebsiella pneumoniae* , *Proteus vulgaris* , *Pseudomonas aeruginosa* y *Micrococcus luteus*; llegando a la conclusión de que el metabolito

aislado de ácido ursólico mostró la mejor concentración inhibitoria media IC50, indicando un posible efecto sinérgico de los diferentes compuestos presentes en esta fracción.

Torrenegra et al., (2016), realizaron un estudio en Colombia, sobre el aceite esencial de *Minthostachys mollis*, colectado en la región de Norte de Santander, lo primero que se evaluó fue el contenido químico que lo determinaron utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas dando como resultado a dos Monoterpenos de alta actividad antibacteriana tales como el timol y el carvacrol, y respecto a la actividad antibacteriana se hicieron uso del método de microdilución en caldo con ayuda de un lector de microplacas para medir el desarrollo bacteriano, arrojando resultados que si son sensibles al aceite esencial en Gram positivas como el género *Staphylococcus*.

Fonseca (2016), realizó un estudio en Ecuador con el aceite esencial de sunfo (*Clinopodium nubigenum*), que fueron colectados en el páramo de la parroquia de Pintag en Ecuador, que posteriormente realizó múltiples pruebas para la actividad antibacteriana en cuatro patógenos de afecciones respiratorias, la actividad antibacteriana lo realizaron en pruebas in vitro de antibiogramas a diferentes concentraciones, generando como resultados que si hay halo de inhibición para *Staphylococcus aureus* a concentraciones de 2,5% y 5% pero desde una perspectiva estadística, su efectividad es inferior en comparación con el control positivo.

1.1.2 ANTECEDENTES NACIONALES

Reyes et al., (2025), realizaron un estudio en Acobamba, provincia de Huancavelica sobre la actividad antibacteriana del aceite esencial y del extracto acuoso de *Clinopodium bolivianum* frente a *Staphylococcus aureus* 25923; tanto el aceite como el extracto se realizaron en hojas frescas, el porcentaje de rendimiento obtenido fue superior en extracto acuoso en comparación con el aceite esencial, la identificación de compuestos bioactivos se realizaron mediante cromatografía de gases-espectrometría de gases dando como resultado los compuestos como Ciclohexanona, 5-metil-2-(-metil etil)-(2R-cis)(Isomentona) al 28,74%, Linalol al 17,50% y pulegona al 12,05%. La actividad antibacteriana se evaluó mediante halos de inhibición (IZD), concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima bactericida (MBC). Llegando a la conclusión que el aceite esencial de hojas secas mostró mayor efectividad contra *Staphylococcus aureus* (IZD 23.30 ± 1.15 mm, MIC 2.74 g/L, MBC 5.49 g/L), superando al de hojas frescas y los extractos acuosos.

Obispo et al., (2025), realizaron un estudio en la provincia de Yunguyo de Puno sobre los componentes volátiles del aceite esencial de *Clinopodium bolivianum* y su capacidad antioxidante en tratamientos capilares, la recolección de material vegetal fue en el distrito de Ollaraya, Puno a una altitud de 3827 m.s.n.m. El aceite esencial se obtuvo mediante destilación de arrastre por vapor con trampa de Clevenger durante tres horas. Para la identificación química se empleó Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS). Los resultados del análisis fitoquímico revelaron que los componentes mayoritarios del aceite esencial fueron la pulegona con 66,85%, 1,8-cineol (6,47%), isocitral (4,57%) y carvacrol (4,30%). En cuanto a la actividad biológica, el aceite esencial mostro una capacidad significativa de captación de radicales libres.

Laura et al., (2024), realizaron un estudio en Juliaca, departamento de Puno cuyo objetivo era evaluar el efecto antimicrobiano de dos fuentes de aceites esenciales frente a *Staphylococcus*

aureus y Coliformes fecales, utilizaron el aceite esencial de muña y de eucalipto para evaluar su porcentaje de rendimiento y su caracterización fisicoquímica respectiva, las diluciones de ambos aceites que utilizaron fueron a 25%, 50% y 75% obteniéndose resultados de la actividad antibacteriana del aceite esencial de muña frente a Coliformes fecales a 75% un halo promedio de 13,27mm y para *Staphylococcus aureus* un halo de 13,15mm, para el aceite esencial de eucalipto también al 75% obtuvieron mejores halos con un promedio de 14,58 mm para Coliformes fecales y para *Staphylococcus aureus* un halo de 14,37 mm, evidenciándose que en ambos aceites esenciales poseen una actividad antibacteriana moderada.

Carbajal & Condori (2023), realizaron una investigación en Lima, sobre estudios en los últimos 20 años sobre *Clinopodium bolivianum*, recopilados en una revisión sistemática basada en fuentes como Google Académico, Proquest, Pubmed y Scielo donde se analizaron 29 investigaciones, en su mayoría de Perú y Bolivia, que destacaron y ratificaron de manera científica sus propiedades medicinales, incluyendo efectos antibacterianos, antiespasmódicos, antioxidantes, antiinflamatorios, gastroprotectores, antifúngicos y antivirales.

Osorio (2022), en su trabajo de investigación realizado en Nuevo Chimbote, en el departamento de Áncash cuyo objetivo fue determinar la eficacia antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Muña) contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, el aceite esencial se logró obtener mediante el método de arrastre a vapor de agua y para ver el efecto bacteriano se utilizó el método Kirby-bauer, dando como resultados que a las concentraciones de 75% y 100% generaron una sensibilidad intermedia con halos de 14,40 mm y 15,11 mm respectivamente, con estos datos podemos afirmar que el aceite esencial de muña tiene un potencial para ser considerado en futuras aplicaciones terapéuticas.

Barón & Velásquez (2021), realizaron un estudio en Santa Cruz departamento de Cajamarca donde obtuvieron aceite esencial de muña mediante destilación por arrastre de vapor para

enfrentarlo a cepas de *Staphylococcus aureus* en diferentes concentraciones mediante la técnica de difusión en pozos excavados y llegando a la conclusión que las concentraciones de 75% y 100% llegaron a generar halos de inhibición de 11,57 mm y 14,20 mm respectivamente que indica que si son eficaces contra la bacteria *Staphylococcus aureus*, en contraposición de la concentración al 50% que no presentaron actividad antibacteriana.

Hospino & Mallma (2019), realizaron una investigación en la provincia de Acobamba, departamento de Huancavelica para investigar la composición química que presentaba el aceite esencial de *Clinopodium bolivianum* “Inca muña”, tanto en estado fresco como en seco obteniendo 60 componentes en fresco y 107 en estado seco, lo que nos indica según estos estudios que en el proceso de secado hay una mayor detectabilidad de ciertos componentes que no se encuentran o están en niveles muy bajos en su estado fresco, en cuanto a la actividad antibacteriana se obtuvieron resultados positivos en bacterias de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* que en ambos casos resultaron ser sensibles obteniéndose halos mayores de 21 mm.

Tapia et al., (2019), en su trabajo de investigación realizado en provincia de Pallasca, departamento de Ancash cuyo objetivo fue evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* in vitro contra dos microorganismos de importancia clínica, las muestras vegetales fueron colectados en la región de Ancash que posteriormente extrajeron el aceite esencial mediante un sistema de destilación a vapor de agua para posteriormente realizar tanto su análisis fitoquímico como su porcentaje de rendimiento, la actividad antimicrobiana se realizó en cuatro concentraciones diferentes, y concluyen que para *Staphylococcus aureus* presenta actividad antimicrobiana significativa alcanzando halos de inhibición mayores de 30 mm al 25% y halos de 35mm para las concentraciones de 75% y 100%, pero para *Pseudomona aeruginosa* los halos de inhibición no presentaron ninguna actividad antibacteriana.

Cotera & Yauri (2018), realizaron un estudio en el distrito de San Juan de Pillo en Huancayo, para analizar cómo la presión y la temperatura durante la extracción con fluidos supercríticos afecta el rendimiento, la capacidad antioxidante y el contenido de compuestos volátiles del aceite esencial de inka muña para esto se utilizaron un tamaño predominante de 0,595 mm (52%) con partículas más pequeñas en menor proporción; la extracción se realizó durante 30 minutos dando mejores resultados a una presión de 200 bar y una temperatura de 50 °C y los principales componentes identificados de este estudio fueron Beta-thujene, p- cimeno, d- limoneno, además se observó que la capacidad antioxidante estaba directamente relacionada con el contenido de compuestos volátiles.

Mollo (2017), realizaron una investigación en el distrito de Pocsi, Arequipa sobre los extractos de *Clinopodium bolivianum* obtenidos por dos métodos frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Para la evaluación de la actividad antibacteriana emplearon el método de difusión en disco (Kirby-Bauer), mientras que la concentración mínima inhibitorio y bactericida se determinaron mediante el método de dilución en caldo, llegando a la conclusión que el aceite obtenido por hidrodestilación generó un halo de inhibición de 10 mm, una CIM DE 6,25% y una CBM de 25%, mientras que el extracto por infusión no mostró halo de inhibición y presentó una CIM de 12,5% y la misma CBM, lo que demuestra que el método de extracción influye en la efectividad antibacteriana del extracto.

1.1.3 ANTECEDENTES LOCALES

Huanqui (2019), realizó un trabajo de investigación en la ciudad de Cusco, con aceite esencial de “Cjuñuca” *Clinopodium bolivianum* para determinar la actividad antibacteriana contra la cepa ATCC 6919 *Cutibacterium acnes*, para este estudio realizaron la colecta en la comunidad de Chiara, distrito de Combapata provincia de Canchis del Cusco y posteriormente se sometió a Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-SM) para ver su composición química resultando con mayor porcentaje pulegona con 38,69% e isopulegona con 11,94% que son compuestos de alta capacidad bactericida, la actividad antibacteriana dio un resultado con un halo máximo de 15,76 mm a 150 µg/mL de concentración, concluyendo que el aceite esencial de “Cjuñuca” tiene una actividad antibacteriana moderada frente a la cepa *Cutibacterium acnes*.

1.2 Descripción de *Clinopodium bolivianum*

1.2.1 Ubicación taxonómica

Reino: Plantae

Filum: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Género: *Clinopodium*

Especie: *Clinopodium bolivianum*

Nombres comunes: Inca muña, ñut`u muña, cjuñuca, Cjuñu muña (Yapuchura, 2010).

1.2.2 Hábitat y distribución

La especie se encuentra en las regiones altoandinas sureñas de Perú, Bolivia y Argentina. Es tolerante a la altura y se encuentra desde los 1500 a 4200 msnm, en laderas húmedas, hasta semi secas y semi sombreadas; en otras palabras, no está presente en zonas muy húmedas ni tampoco muy secas (Cachuta y Ramón, 2010).

1.2.3 Descripción botánica

Es un arbusto erguido que alcanza hasta 1 metro de altura, presenta ramas cuadrangulares con carinas en cada ángulo, las hojas son pequeñas, simples, opuestas, decusadas, elípticas a ovadas con margen entero de peciolo corto, presenta inflorescencias axilares, cimosas; con flores blancas pequeñas con cáliz tubular, 4 estambres, ovario súpero y de fruto en drupa oblonga (Rodríguez, 1988). *Clinopodium bolivianum* (Benth.) Kuntze, antes denominada *Satureja boliviana* (Wood, 2011), es una especie que se encuentra ampliamente distribuida

en la región andina del Perú, donde abunda especialmente en la sierra, siendo conocida en el departamento de Cusco con los nombres de “muña muña” y “cjuñuca” (Zirena, 1945).

Figura 1 Estructura vegetal de Clinopodium bolivianum



Descripción de la estructura vegetativa: Tallo cuadrangulares, hojas cortamente pecioladas con margen entero, inflorescencia de flores axilares solitarias, corola blanca pubescente en el exterior y con estambres didínamos. (Royal Botanic Gardens kew, 2025)

1.2.4 Floración y reproducción

Clinopodium bolivianum ha sido recolectado en estado de floración entre enero y marzo en el departamento de Huancavelica, Perú, periodo que coincide con la temporada de lluvias en los andes peruanos (Reyes et al., 2025). Otros reportes de *Clinopodium bolivianum* indican que florece principalmente durante la estación seca de invierno, entre mayo y noviembre; Mientras que registros de herbarios muestran especímenes con flores desde abril hasta agosto, lo que sugiere que la época de floración puede variar según la altitud y las condiciones ambientales locales (Royal Botanic Gardens kew, 2025).

1.2.5 Usos y medicina tradicional

Es habitual su empleo en infusiones a fin de mitigar espasmos intestinales y aliviar problemas estomacales, la preparación con sus hojas y partes florales se usa para prevenir el mal de altura y en dosis muy elevadas como abortivo, algunos pobladores realizan un licor a partir de esta planta macerando en alcohol con la creencia medicinal de fortalecedor estomacal y tónico estimulante (Yapuchura, 2010).

1.2.6 Composición química de *Clinopodium bolivianum*

Los principales componentes del aceite esencial de *Clinopodium bolivianum* son: isomentona, que representa el 24,08 %, la mentona con 16,13 %, el timol con 15,82 %, seguido del p-cimeno (10,17 %), γ -terpineno (6,65 %), pulegona (6,55 %) y eucaliptol (2,87 %) (Solis, 2021).

1.3 ACEITE ESENCIAL

Son compuestos del metabolismo vegetal, formado principalmente por terpenos, que pueden encontrarse solos o acompañados de otros compuestos, la mayoría son volátiles y en conjunto

son responsables del aroma característico de la planta (Bandoni, 2000).

Son sustancias complejas y volátiles que dan a ciertas plantas su característico aroma agradable, se obtienen principalmente mediante destilación por arrastre de vapor o la liberación del pericarpio de ciertos frutos, a veces denominados esencias, este término es más general e incluye no sólo los aceites esenciales sino también otras sustancias obtenidas de diversas formas de extracción (Kuklinski, 2000).

Son solubles en sustancias como alcohol, éter y aceites fijos, pero no en agua a temperatura ambiente, estos aceites suelen ser líquidos e incoloros y tienen un aroma distintivo. Generalmente, su densidad es menor al agua (Sanchez y García, 2022).

1.3.1 Distribución natural

Los aceites esenciales pueden encontrarse en prácticamente todas las partes de las plantas aromáticas, se almacenan en las flores (como lavanda y rosa), en las hojas (como eucalipto, menta y laurel), en raíces (como vetiver), rizomas (como jengibre y cálamo), semillas (como las de carvi y cilantro), frutos (como anís y las cáscaras de cítricos), así como en la madera y corteza de algunas especies (canela, sándalo y palo de rosa) (Dhifi et al., 2016).

Los aceites esenciales en las plantas se sintetizan y acumulan en distintas estructuras, ya sea en el exterior, en tricomas y papilas glandulares presentes en familias como Asteraceae, Geraniaceae o Lamiaceae, o en el interior, en células especializadas como las secretoras, así como en canales intercelulares o bolsas secretoras típicas de familias como Anacardiaceae, Rutaceae y Myrtaceae (Butnariu y Sarac, 2018).

1.3.2 Función de los aceites esenciales en la planta

Los aceites esenciales son mezclas de compuestos volátiles que cumplen diversas funciones importantes en las plantas como a enfrentar el estrés ambiental, protegerse de herbívoros y microbios, comunicarse con otras plantas, influir en el crecimiento de especies cercanas y atraer polinizadores como animales que dispersan sus semillas (Sharifi-Rad et al., 2017).

1.3.3 Componentes fitoquímicos (Metabolitos secundarios)

Los metabolitos secundarios son compuestos orgánicos complejos producidos por las plantas que se producen y almacenan, generalmente en vacuolas, para interactuar con otros seres vivos o defenderse de amenazas como herbívoros, microorganismos o condiciones adversas del entorno, además estos compuestos pueden acumularse en diferentes tejidos y comportamientos celulares especialmente en vacuolas donde se almacenan de forma segura antes de cumplir una función biológica (Khan et al., 2025). Dentro de este grupo de compuestos se incluye en:

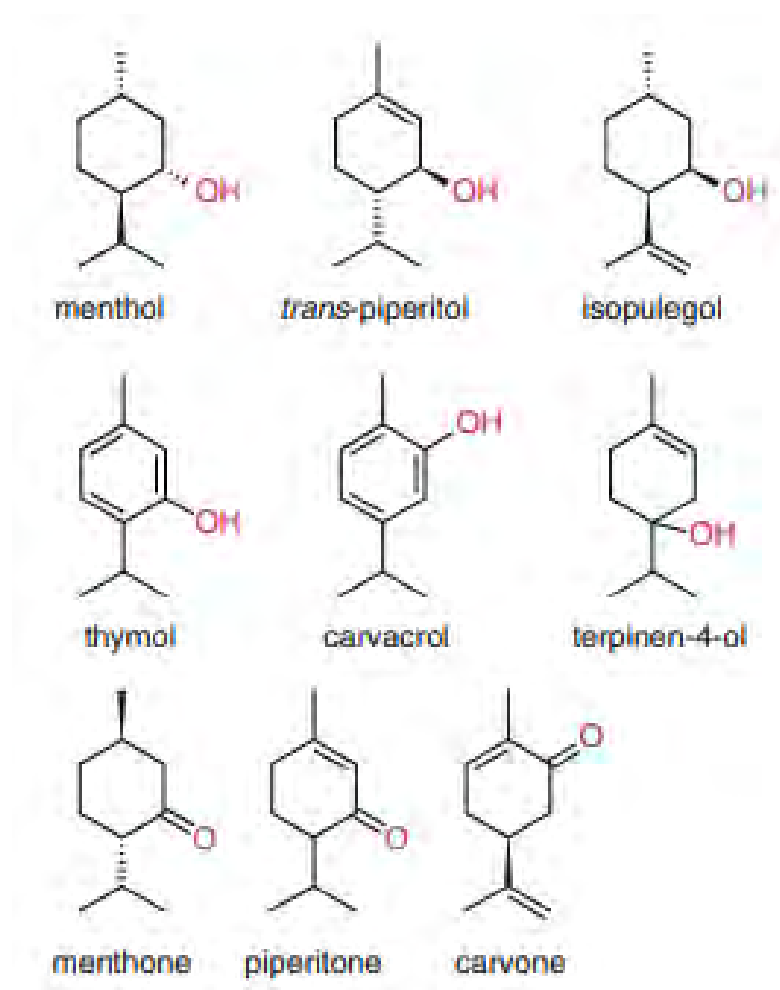
1.3.4 Terpenos

Los terpenos son compuestos hidrocarbonados formados por unidades de isopreno (C_5H_8), en las plantas se sintetizan de precursores isopentenil difosfato (IPP) y dimetilalil difosfato (DMAPP), producidos por las vías del ácido mevalónico en el citosol y del metileritritol fosfato en los plastidios; cuya diversidad estructural de estos compuestos se genera mediante las terpene sintasas, enzimas que catalizan reacciones de ciclación y originan estructuras lineales, monocíclicas y bíciclicas (Bergman et al., 2024).

1.3.5 Monoterpenos

Los monoterpenos son los compuestos más simples dentro de los terpenos, exceptuando los hemiterpenos, que son poco comunes, están formados por dos unidades de isopreno (C_5), lo que lo confiere una estructura de diez átomos de carbono (Bergman et al., 2024). Los monoterpenos constituyen el grupo predominante de muchos aceites esenciales, los compuestos más representativos se encuentran el α -pineno, β -pineno, limoneno, linalool, geraniol, mentol, mentona, carvona, timol y 1,8-cineol, metabolitos responsables de numerosas propiedades biológicas y del aroma característico de diversas especies vegetales (Lange, 2015).

Figura 2 Estructuras moleculares de algunos monoterpenos

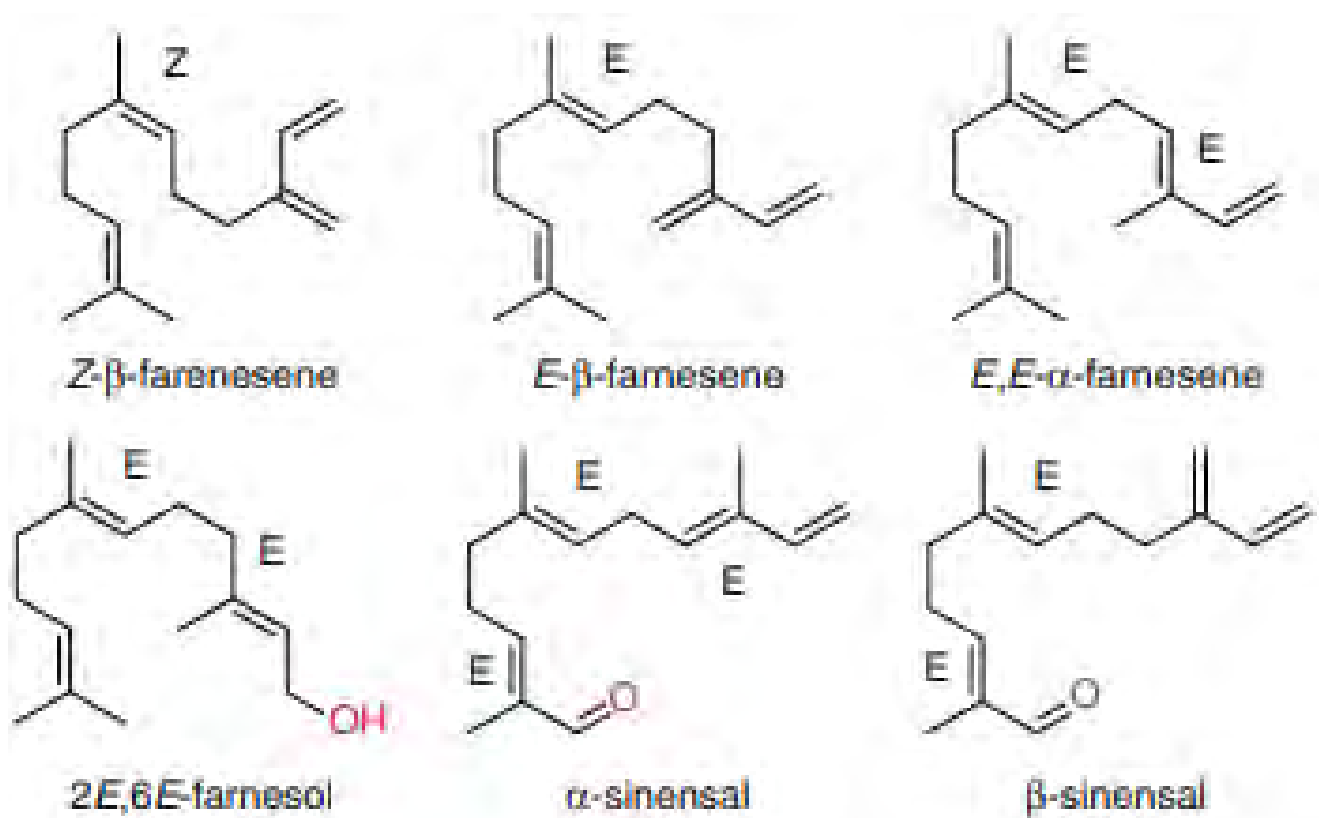


Fuente: (Chizzola, 2013)

1.3.6 Sesquiterpenos

Los sesquiterpenos están constituidos por tres unidades de isopreno, equivalentes a quince átomos de carbono, todos derivan biosintéticamente del farnesil difosfato (FPP), precursor que experimenta diferentes reacciones de ciclación y dar una gran variedad de esqueletos carbonado (Riyadi et al., 2023). En función de su estructura los sesquiterpenos pueden presentarse en formas acíclicas (lineales) o cíclicas incluyendo estructuras monocíclicas y tricíclicas, lo que contribuye a su diversidad química y biológica (Riyadi et al., 2023).

Figura 3 Estructuras moleculares de algunos sesquiterpenos hidrocarburos

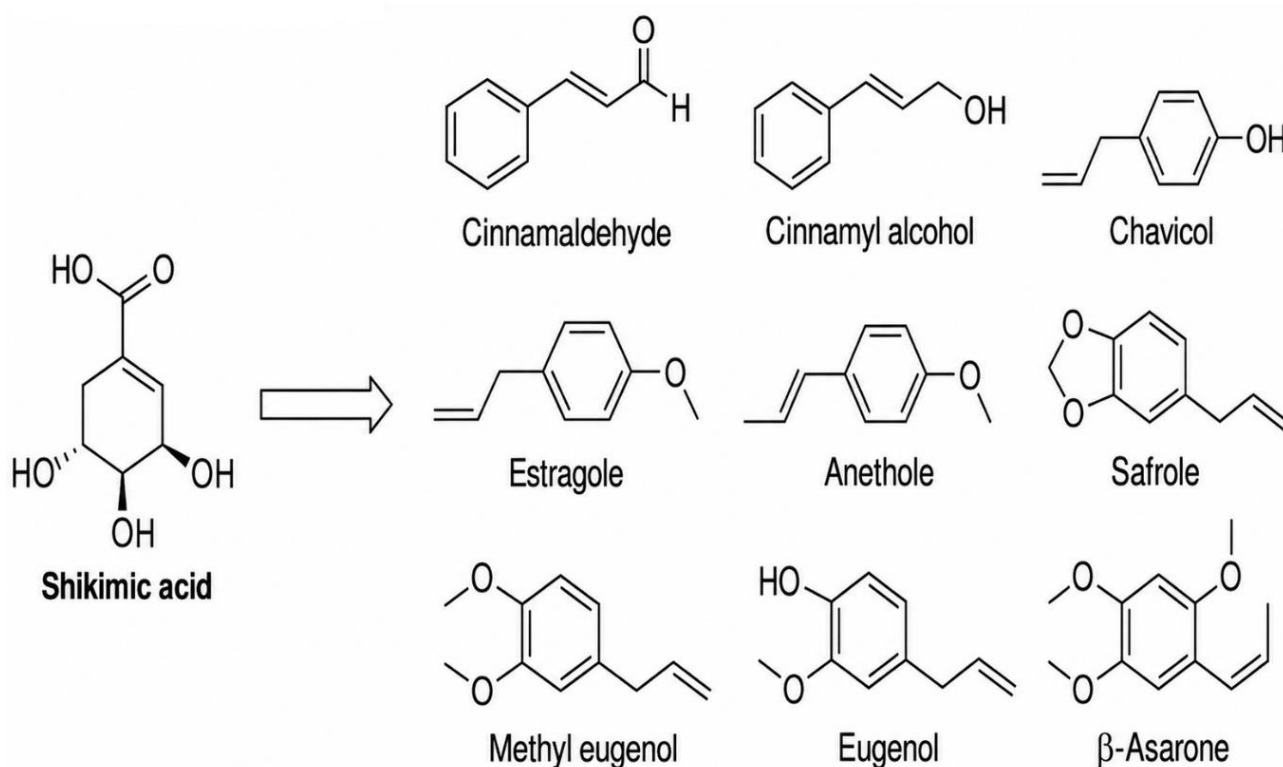


Fuente: (Chizzola, 2013)

1.3.7 Fenilpropanos

Los fenilpropanoides son compuestos orgánicos que las plantas producen a partir del aminoácido L-fenilalanina mediante la vía del shikimato, y aunque son menos abundantes que los terpenos, presentan una gran diversidad estructural gracias a la modificación de un núcleo común formado por un anillo de fenilo unido a una cadena de tres carbonos (C3) (de Sousa et al., 2023).

Figura 4 Estructuras químicas de fenilpropanoides que se encuentran en los aceites esenciales



Fuente: (de Sousa et al., 2023)

1.4 EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales pueden obtenerse de las plantas utilizando diferentes técnicas, como el arrastre de vapor, la destilación con vapor de agua, la extracción con solventes volátiles o el uso de fluidos supercríticos, entre otras opciones.

1.4.1 Destilación por arrastre con vapor seco

La destilación por vapor seco es un proceso utilizado para extraer aceites esenciales mediante vapor generado en una caldera externa. El material vegetal se coloca sobre una rejilla perforada por donde pasa el vapor, el cual arrastra los compuestos volátiles sin superar los 100 °C, evitando su degradación. Gracias al vapor controlado y su eficiencia, este método es uno de los más utilizados a nivel industrial para la obtención de aceites esenciales (Cárdenas, 2014).

1.4.2 Extracción con disolventes

La extracción con disolventes se utiliza en materiales vegetales delicados que no soportan el calor de la destilación por vapor. Consiste en mezclar el material con un disolvente como hexano, etanol, metanol, éter de petróleo o acetona, y calentarlo suavemente para disolver los compuestos aromáticos. Luego, la mezcla se filtra y el disolvente se evapora, obteniéndose un concentrado llamado resinoide o concreto. Este concentrado se trata con alcohol puro para separar el aceite esencial, el cual se obtiene tras destilar a baja temperatura y evaporar el alcohol, dando lugar al aceite absoluto. Aunque eficaz y adecuado para compuestos sensibles, este proceso es lento y eleva el costo del producto final (Tongnuanchan y Benjakul, 2014).

1.4.3 Extracción con fluidos supercríticos

El estado supercrítico que se alcanza al someter un fluido a altas presiones y bajas temperaturas. En estas condiciones, el fluido combina propiedades de líquido y gas: tiene la densidad de un líquido y la viscosidad de un gas, lo que le otorga gran capacidad de difusión y un excelente

poder disolvente. Por ello, la extracción de aceites esenciales en este estado resulta altamente selectiva y no agresiva, siendo el dióxido de carbono (CO₂) el fluido más utilizado (Domínguez y Parzanese, 2013).

1.4.4 Destilación por arrastre de vapor

En la técnica de destilación por arrastre con vapor de agua, se utiliza una muestra vegetal, generalmente fresca y troceada en pequeñas partes que se coloca dentro de una cámara inerte; allí, se expone a una corriente de vapor de agua sobrecalentado que arrastra las esencias volátiles y que posteriormente, estas esencias se condensan, se recolectan y se separa del agua; es muy aplicado en la industria gracias a su eficiencia, la alta pureza del aceite obtenido y su baja dependencia de tecnología compleja (Martínez, 2003).

La destilación por arrastre de vapor es un método económico y común para extraer aceites esenciales, aunque tiene la desventaja de usar altas temperaturas que pueden dañar compuestos sensibles al calor y dejar residuos de solventes en el producto (de Souza et al., 2020).

1.4.5 Hidrodestilación

La hidrodestilación es uno de los métodos más comunes para extraer aceites esenciales, su proceso es similar al de la destilación por arrastre con vapor, pero con una diferencia clave: el material vegetal está en contacto directo con agua hirviendo esto facilita una extracción más eficiente de los aceites contenidos en los tejidos de las plantas (Cerpa, 2007).

No obstante, si el material vegetal permanece mucho tiempo en contacto con agua caliente, algunos compuestos pueden degradarse o sufrir hidrólisis (Machado et al., 2022).

1.5 CONSERVACIÓN DE ACEITES ESENCIALES

Tras la extracción, los aceites esenciales deben conservarse en condiciones controladas, ya que su composición en compuestos volátiles como monoterpenos y sesquiterpenos los hace sensibles a la luz, el oxígeno, el calor y los cambios de temperatura, factores que directamente afectan su estabilidad y vida útil (Ganosi et al., 2023). Los aceites esenciales deben conservarse en frascos de vidrio ámbar u oscuro, en un ambiente que los mantenga protegidos de la exposición directa a la luz solar (Flores, 2010), con el aumento de temperatura los aceites esenciales tienden a volverse menos estables ya que el oxígeno disuelto en ellos es más soluble a bajas temperaturas, lo que influye en su conservación, por ello se recomienda mantenerlo en un ambiente fresco o refrigerado entre 4 y 10 °C (Mohtashami et al., 2018).

1.6 AGENTE EMULSIFICANTE TWEEN 80

Los tensioactivos más empleados en la preparación de sistemas coloidales con aceites esenciales son los polisorbatos Tween 80 y Tween 20, debido a que permiten obtener formulaciones estables sin requerir la adición de un co-tensioactivo; esto representa una ventaja tanto en la parte de formulación como en el aspecto toxicológico, ya que simplifica el sistema y evita el uso de compuestos con posibles efectos adversos (Pavoni et al., 2020). El monooleato de polioxietileno sorbitol, conocido comúnmente como polisorbato 80, es un tensioactivo comúnmente utilizado en la elaboración de productos biofarmacéuticos, como emulsionante no iónico, generalmente se emplea en concentraciones que van del 0.01 % al 0.1% (v/v) (Braun et al., 2015), es uno de los emulsionantes sintéticos más utilizados y cuenta con equilibrio hidrofílico-lipofílico de 15, lo que le permite mezclarse fácilmente en la interfase entre el aceite y el agua, generando una buena estabilidad y capacidad de emulsión (Marhamati et al., 2021). Sin embargo, los emulsionantes sintéticos pueden representar cierto riesgo para la salud, por lo

que actualmente muchos investigadores orientan sus estudios hacia el uso de emulsionantes naturales que sean seguros y no tóxicos (Lüdtke et al., 2022).

1.7 CROMATOGRAFÍA DE GASES – ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Es una técnica analítica la cual es utilizada para separar y analizar compuestos volátiles y semivolátiles de una mezcla (Gutiérrez y Droguet, 2002). Una vez separados, identificados e incluso cuantificados todos sus componentes, el único dato con el que se cuenta para la identificación de cada uno es el tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos que con ayuda de la espectrometría de masas puede identificar de forma precisa cualquier sustancia pura, pero no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin separar previamente sus componentes, por lo que la asociación de la cromatografía de gases y espectrometría de masa da lugar a una técnica combinada la cual permite la separación e identificación de complejas mezclas (Gutiérrez y Droguet, 2002).

1.7.1 Espectrometría de masas

Es una técnica micro analítica la cual se utiliza para la identificación de compuestos desconocidos, cuantificación de compuestos conocidos y para aclarar la estructura y propiedades químicas de las moléculas, se requiere mínimas cantidades de muestra de la cual obtiene información como el peso, se basa en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa, obtenidos estos iones se separan de acuerdo con su masa y su carga y finalmente son detectados por un adecuado dispositivo (Gutiérrez y Droguet, 2002).

1.7.2 Acoplamiento cromatografía de gases - espectrometría de masas

La cromatografía de gases - espectrometría de masas (GC-MS) es considerada una técnica analítica híbrida ya que mezcla por una lado la capacidad de separación de un cromatógrafo de gases con las capacidades de detección de un espectrómetro de masa lo cual proporciona una mayor eficiencia en el análisis de muestras, el GC se encarga de separar los componentes volátiles de la muestra y el MS actúa fragmentando estos componentes e identificándolos en función a su masa (SOLINSA, 2017).

En el proceso la muestra se introduce por un inyector y la temperatura debe ser adecuada para que sus componentes se vaporicen. El gas portador generalmente helio, nitrógeno, hidrógeno o argón, todos inertes, estables y libres de oxígeno y agua transporta la mezcla a través de la columna. Los compuestos se separan según su afinidad con la fase estacionaria o su tendencia a permanecer en la fase móvil. Sin esta interacción, todos se moverían a la misma velocidad y no habría separación. Luego, cada componente aislado pasa a un detector, normalmente un espectrómetro de masas (Solís et al., 2018).

En el espectrómetro de masas las moléculas ionizadas se fragmentan sin descomponerse en átomos, y sus iones se registran según la relación masa/carga (m/z). El analizador cuantifica estos iones, generando un espectro de masas. Comparando estos espectros con una base de datos, es posible identificar la naturaleza de cada sustancia y, además, obtener información cuantitativa mediante el área o la altura de los picos cromatográficos (Solís et al., 2018).

1.8 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 subsp. aureus Rosenbach

1.8.1 Descripción

Es un coco Gram positivo que se dispone en racimos, con un diámetro aproximado de 0,5 – 1,5 μm , anaerobio facultativo, catalasa y coagulasa positivo, e inmóvil; algunas cepas presentan capsula asociada a mayor virulencia (Murray P. et al., 2023).

1.8.2 Ubicación taxonómica

Reino: Monera

Filum: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Staphylococcaceae

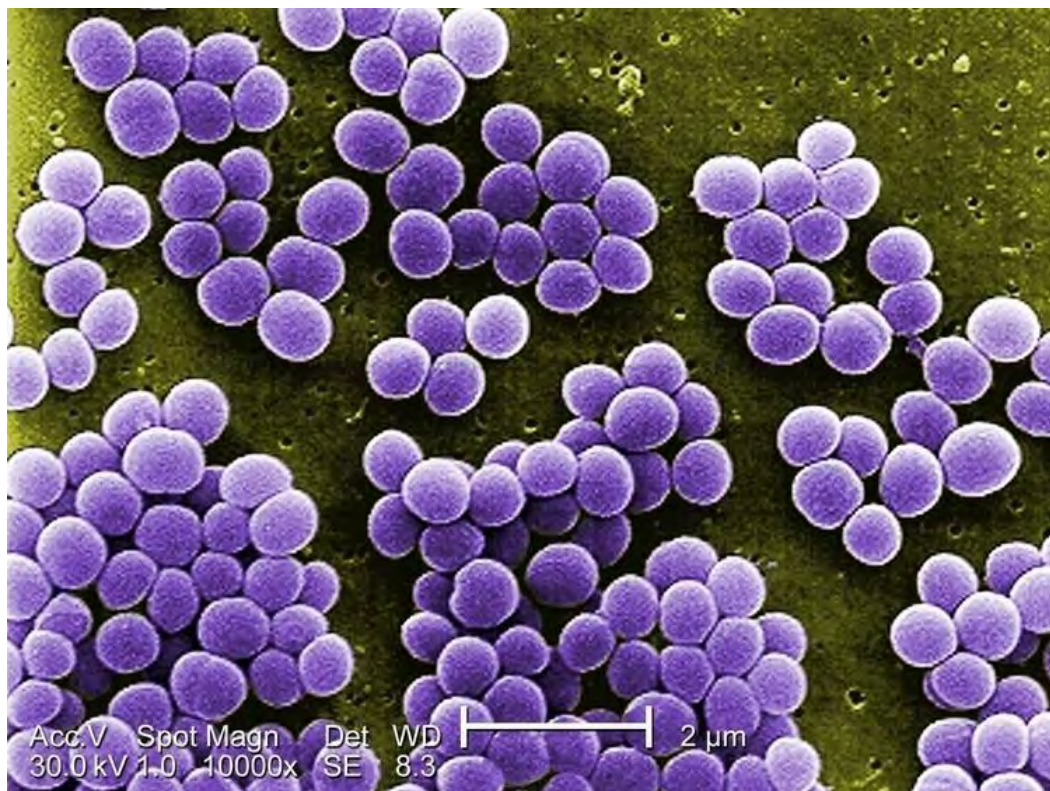
Género: Staphylococcus

Especie: Staphylococcus aureus

ATCC:25923

Según la clasificación del (NCBI, 2022)

Figura 5 Micrografía electrónica de Staphylococcus aureus



Fuente: (Centers for Disease Control and Prevention, s,f)

1.8.3 Características de cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

La cepa Seattle 1945 de *Staphylococcus aureus* corresponde a un aislado clínico cuya secuencia genómica completa ya ha sido determinada. Su principal utilidad en el laboratorio es servir como referencia estándar para garantizar la calidad de diversas pruebas y procedimientos, como el análisis CAMP, la valoración del agar Mueller-Hinton, el estudio de productos lácteos y concentrado de humo de leña, la verificación de medios de cultivo, los ensayos de difusión en disco bajo los estándares CLSI, y la validación de sistemas Abbott y Autobac (American Type Collection, 2013).

1.8.4 Estructura de la bacteria *Staphylococcus*

En *Staphylococcus aureus* se han identificado once tipos de cápsulas diferentes (serotipos), los serotipos 5 y 8 son los principales responsables de infecciones en humanos esta cápsula desempeña un papel protector al evitar que los leucocitos polimorfonucleares (PMN) fagociten las bacterias. Además, la mayoría de los estafilococos producen una biopelícula compuesta por azúcares simples, proteínas y pequeños péptidos, que facilitan su adhesión a tejidos y materiales como catéteres, válvulas y prótesis. Esta biopelícula es especialmente crucial para la supervivencia de especies de estafilococos menos virulentos, como los coagulasa negativos, en entornos hospitalarios (Murray P. et al., 2023).

1.8.5 Hábitat

El *Staphylococcus aureus* convive habitualmente con el ser humano como parte de su microbiota normal, instalándose principalmente en la piel y las mucosas. Aunque puede hallarse en distintas zonas del cuerpo como la garganta, las axilas, la ingle o el intestino, su hábitat preferido es la parte anterior de la cavidad nasal. Esta convivencia no siempre es permanente, ya que en algunos casos la colonización es pasajera y en otros se mantiene a lo largo del tiempo. En cualquiera de los dos escenarios, representa un punto de partida relevante, ya que las

personas colonizadas tienen mayor riesgo de desarrollar infecciones oportunistas o de transmitir el microorganismo a otros (Murray P. et al., 2023).

1.8.6 Supervivencia ambiental

Una de las razones por las que el *Staphylococcus aureus* resulta tan difícil de controlar es su extraordinaria capacidad para sobrevivir fuera de un organismo vivo. Esta bacteria puede persistir hasta 318 días en superficies secas y varía según el material, en superficies no porosas como vidrio o plástico dura hasta 60 días, mientras que en superficies porosas como papel o algodón su permanencia es mayor alcanzando hasta 168 días (Porter et al., 2024). A ello se suma su tolerancia a condiciones adversas: resiste la sequedad mejor que la mayoría de las bacterias, soporta altas concentraciones de sal, e incluso puede aguantar temperaturas de hasta 60 °C por períodos cortos, todo lo cual le otorga una ventaja considerable sobre otros patógenos y explica su amplia presencia tanto en entornos hospitalarios como en la vida cotidiana (Murray et al., 2020).

1.8.7 Infección estafilocócica

1.8.7.1 Intoxicación alimentaria por estafilococos

La intoxicación alimentaria por estafilococos es una de las enfermedades más comunes transmitidas por los alimentos en todo el mundo. Ocurre cuando una persona consume comida contaminada con ciertas cepas de estafilococos capaces de producir toxinas, conocidas como enterotoxinas estafilocócicas (Pal et al., 2020).

El *Staphylococcus aureus* tiene la capacidad de resistir en ambientes secos e incluso crear biopelículas, lo que le permite mantenerse por largo tiempo en lugares donde se manipulan o procesan alimentos. Aun así, la mayoría de los brotes se producen cuando los alimentos se contaminan después de haber sido procesados o cuando no se mantienen bajo una adecuada temperatura (Hennekinne et al., 2012).

1.8.7.2 Síndrome de piel escaldada estafilocócica

El síndrome de piel escaldada estafilocócica es una enfermedad causada por toxinas epidermolíticas que produce *Staphylococcus aureus*. Estas toxinas dañan las uniones entre las células de la epidermis, lo que provoca que la piel se desprenda de manera superficial. Como consecuencia, aparecen lesiones cutáneas con enrojecimiento, celulitis eritematosa y ampollas que pueden extenderse a grandes áreas del cuerpo. Se trata de una infección mediada por toxinas que afecta principalmente a niños, aunque también puede presentarse en algunos adultos (Faúndes et al., 2019).

El síndrome de piel escaldada estafilocócica en adultos es poco común, por lo general aparece en personas con algún factor de predisposición, aunque no siempre existe una enfermedad de base. En los niños, la mortalidad ronda en 4%, mientras que en los adultos la tasa puede superar el 60% (Patel y Finlay, 2012).

Staphylococcus aureus es un microorganismo Gram positivo que comúnmente se encuentra en piel humana como un microorganismo común, pero cuando atraviesa la barrera cutánea, puede provocar diversos tipos de infecciones, tanto superficiales como sistémicas, ya sea en entornos médicos como comunitarios, además de su papel como un organismo que actúa fuera de las células, se ha reconocido a esta bacteria también como un patógeno que actúa dentro de las células, lo que puede contribuir a su persistencia, su resistencia a los antibióticos y su capacidad para evadir el sistema inmunológico (Tapia et al., 2019).

1.8.7.3 Síndrome de shock tóxico estafilocócico

El síndrome de shock tóxico (SST) es una infección poco común pero muy peligrosa, ya que está mediada por toxinas que pueden desencadenar un shock repentino y severo, provocar fallo multiorgánico y, en muchos casos, la muerte. Casi siempre está asociado a cepas de

Staphylococcus aureus o *Streptococcus pyogenes* (estreptococo del grupo A) capaces de producir estas toxinas (Atchade et al., 2024).

1.8.7.4 Bacteriemia por *Staphylococcus aureus*

La bacteriemia causada por *Staphylococcus aureus* (BAS) es una de las infecciones más graves y representa una de las principales causas de mortalidad bacteriana a nivel mundial. La enfermedad puede presentarse con distintos niveles de severidad, lo que dificulta su evaluación: mientras algunos pacientes responden bien al tratamiento y se recuperan pronto, otros pueden desarrollar complicaciones serias como diseminación hematógena o endocarditis (Minter et al., 2023).

Las complicaciones de la bacteriemia por *Staphylococcus aureus* son frecuentes, con una incidencia que varía entre el 11% y el 53%. Dependiendo del lugar afectado y de lo difícil que resulta llegar a un diagnóstico rápido, algunas de estas complicaciones pueden requerir ingreso a la unidad de cuidados intensivos y, en ciertos casos, tener un desenlace desfavorable (Bashabsheh et al., 2023).

1.8.7.5 Endocarditis estafilocócica

La endocarditis infecciosa por *Staphylococcus aureus* (EAI) es una enfermedad severa que conlleva alta morbilidad y mortalidad, y se ha observado que su frecuencia va en aumento. Como sus manifestaciones clínicas no son específicas, siempre debe considerarse la posibilidad de EAI en cualquier paciente con bacteriemia por *S. aureus*, incluso cuando no exista una fuente evidente de infección (Murray P. et al., 2023).

1.8.7.6 Osteomielitis estafilocócica

La osteomielitis (OM) es una infección que provoca inflamación en el hueso y la médula ósea, pudiendo ocasionar un daño óseo progresivo. En la mayoría de los casos, sobre todo en la forma crónica, el principal causante es *Staphylococcus aureus*, considerado el patógeno más común y agresivo, gracias a su capacidad de resistir tanto a la respuesta del sistema inmunitario como a los tratamientos con antibióticos (Song et al., 2025).

1.8.7.7 Neumonía estafilocócica

La neumonía causada por *Staphylococcus aureus* necesita ser detectada de manera temprana, ya que puede derivar en complicaciones serias como neumonía necrosante, bacteriemia o incluso sepsis, con o sin shock. Esta infección también puede aparecer después de un cuadro viral (Farmer et al., 2026).

1.8.8 Terapéutica

El tratamiento de las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* depende del perfil de susceptibilidad antimicrobiana, la localización de la infección y la gravedad del cuadro clínico. En las cepas sensibles a meticilina (MSSA), los antibióticos β -lactámicos resistentes a penicilinasas, como oxacilina, nafcilina o cefazolina, constituyen la terapia de elección debido a su elevada actividad bactericida frente a este microorganismo (Murray et al., 2020).

En el caso de las cepas resistentes a meticilina (MRSA), el tratamiento requiere el uso de antimicrobianos alternativos como vancomicina, daptomicina o linezolid, especialmente en infecciones invasivas como bacteriemia, endocarditis, neumonía u osteomielitis. La duración del tratamiento varía según la complejidad del cuadro clínico, pudiendo extenderse desde infecciones cutáneas no complicadas hasta infecciones profundas que requieren terapias prolongadas (Tong et al., 2015).

1.8.9 Resistencia antibiótica

La resistencia a los antimicrobianos se manifiesta cuando bacterias, virus, hongos y parásitos evolucionan con el tiempo y dejan de ser afectados por los medicamentos y esto complica el tratamiento de las infecciones, incrementa el riesgo de propagación de enfermedades y conduce a la aparición de formas más graves de enfermedades y a un aumento de la mortalidad, debido a esta resistencia, los antibióticos y otros medicamentos antimicrobianos pierden su eficacia lo que hace que las infecciones sean cada vez más difíciles o incluso imposibles de tratar (OMS, 2021).

Las bacterias que inicialmente presentan sensibilidad a los antibióticos pueden desarrollar biopelículas más robustas o adoptar un estado de persistencia tras la exposición a dichos compuestos. Asimismo, los procesos de transformación, transducción, conjugación y vesiculación de membrana externa constituyen mecanismos fundamentales de variación genética en las poblaciones bacterianas, favoreciendo no solo su adaptación y supervivencia frente a la presión antibiótica, sino también la transferencia horizontal de genes de resistencia hacia otras bacterias (Lee et al., 2022).

En los últimos veinte años, la forma en que se presentan las infecciones por *Staphylococcus aureus* ha cambiado notablemente: por un lado, se ha incrementado el número de casos ligados a la atención médica, sobre todo en infecciones como la endocarditis y aquellas relacionadas con prótesis; y, por otro, se ha extendido en la comunidad una ola de infecciones en la piel y tejidos blandos, causada por cepas que combinan factores de virulencia con resistencia a los antibióticos β -lactámicos (Tong et al., 2015).

1.9 PRUEBA DE SENSIBILIDAD BACTERIANA (ANTIBIOGRAMA)

Se utilizan para evaluar la susceptibilidad de un microorganismo a los medicamentos antimicrobianos, estas pruebas implican exponer una muestra estandarizada del

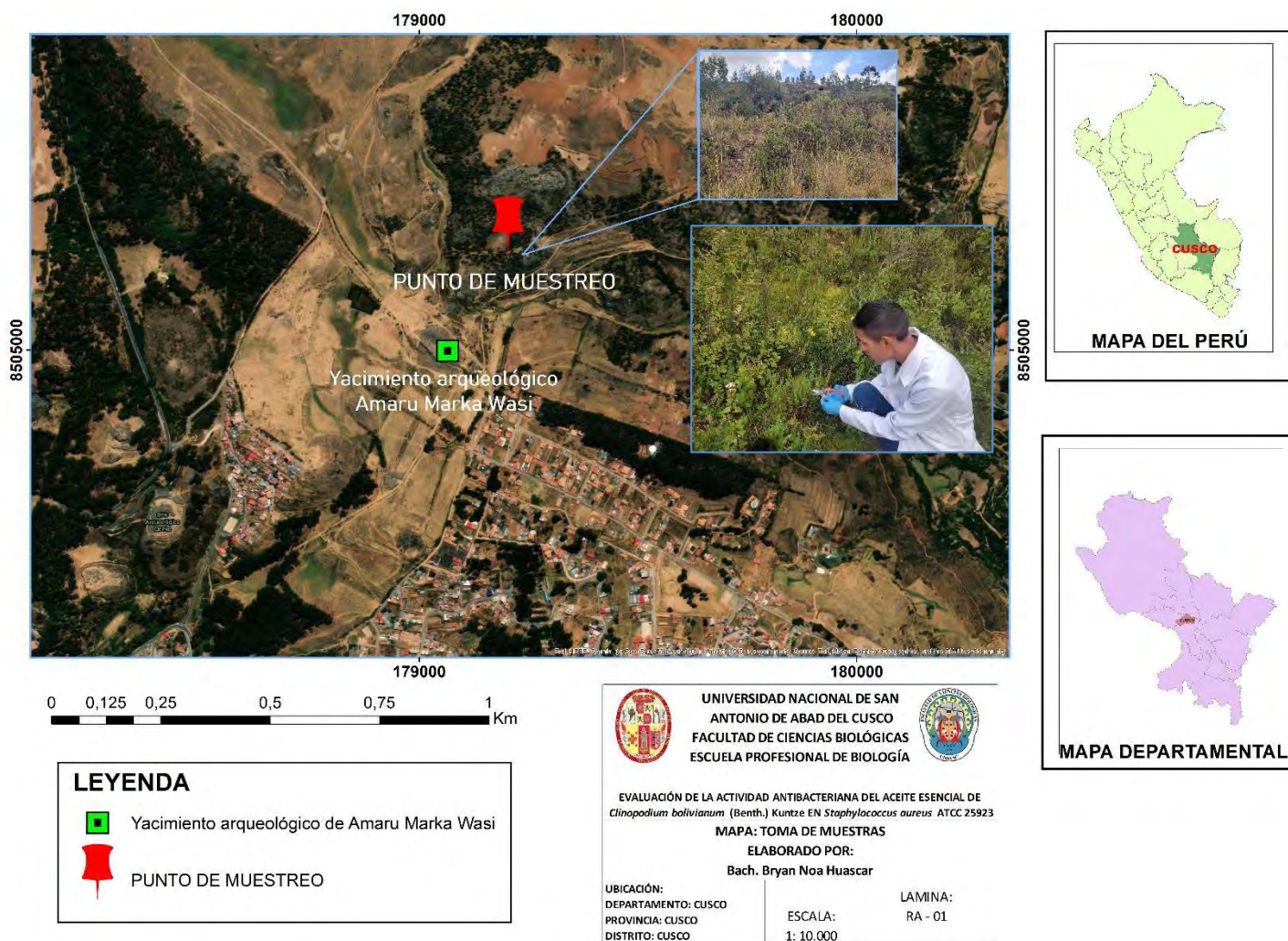
microorganismo a diversos fármacos para observar su efectividad; se pueden realizar en bacterias, hongos o virus y a menudo los resultados de sensibilidad a un medicamento específico pueden ayudar a prever la respuesta del microorganismo a otros fármacos similares, lo que permite reducir el número de medicamentos que necesitan ser probados directamente (Vasquez et al., 2025).

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 UBICACIÓN DEL ÁREA DE PROCEDENCIA DE LA MUESTRA BOTÁNICA

La colecta de las muestras de *Clinopodium bolivianum* “Inca muña”, se realizó en zonas aledañas del centro arqueológico del templo de la Luna (Amaru Marka Wasi), ubicado en el distrito y provincia de Cusco, Perú, a una altitud de 3,630 m.s.n.m., en las coordenadas (13°30'16.2"S 71°57'48.3"W).

Figura 6 Punto de muestreo de *Clinopodium bolivianum*



Fuente: Google Eerth Pro, 2025.

2.2 Procedencia de la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

La cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 fue obtenida del cepario del Laboratorio de Biotecnología 2° piso de la Escuela Profesional de Biología, en la Facultad de Ciencias Biológicas - UNSAAC. Av. La cultura 733 distrito y Provincia del Cusco.

2.3 ÁREA DE PROCESAMIENTO

La extracción del aceite esencial de *Clinopodium bolivianum* se llevó a cabo en el pabellón B, laboratorio de Fitoquímica B-308 de la Facultad de Química, mientras que las actividades experimentales con las bacterias se desarrollaron en el pabellón de Control de Calidad de la Facultad de Ciencias Biológicas (Laboratorio de Microbiología de Aguas y Alimentos N° 204), ambas Facultades pertenecen a la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco y están situadas en la ciudad universitaria de Perayoc Av. La cultura 733 distrito y Provincia del Cusco.

2.4 MATERIALES:

2.4.1 Materiales Biológico

- Cepa *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach - ATCC 25923.
- Especie vegetal *Clinopodium bolivianum* “Inca muña” (hojas), 750 g.
- Aceite esencial de *Clinopodium bolivianum* en 7 concentraciones (10 mL)

2.4.2 Material de campo

- Camara fotográfica
- Cinta adhesiva
- Bolígrafos
- Papel Kraft
- Marcador indeleble

- Libreta de notas
- Guantes
- Tijeras de poda
- Prensa botánica

2.4.3 Equipos de laboratorio

- Autoclave (Phoenix modelo AV-75 PLUS 121X 15)
- Balanza analítica (H.W.Kessel S.A modelo EK-200)
- Incubadora (H.W.Kessel S.A MODELO EK-610)
- Equipo de hidroddestilación con trampa de clevenger.
- Equipo de cromatografía de gases (Modelo Agilent Technologies 6890N Network GC Sistema) acoplado a un espectrómetro de masas (Modelo Agilent Technologies 5973B Inter XL EI/CI MSD)
- Estufa marca Memmert.
- Horno con aire circulante.
- Centrifugadora (HERMLE)
- Baño maria 0-100 °C (Hubner)
- Refrigeradora
- Microscopio óptico campo claro
- Micropipetas y puntas de 5-50µL (WORNER-LAB)
- Micropipetas y puntas de 10-100µl (WORNER-LAB)
- Micropipetas automáticas de 1,2 µL (WORNER-LAB)
- Vernier digital marca TOTAL

2.4.4 Medios de cultivo

- Agar Mueller Hinton (Liofilchem)

- Manitol salado (HiMedia)
- Caldo BHI (Liofilchem)

2.4.5 Antibiótico de control

- Fosfomicina de 200 µg

2.4.6 Material de vidrio de laboratorio

- Matraz Erlenmeyer de 250 mL y 500 mL.
- Placas petri 100 x 15mm
- Probeta de 100 ml
- Vasos de precipitados de 100, 250 y 400ml
- Pipetas volumétricas de 1 y 5 mL
- Bagueta

2.4.7 Reactivos

- Hipoclorito de sodio (NaClO)
- Agua destilada
- Solución Tween 80
- Sulfato de sodio anhidro (Q.P. Sigma)

2.4.8 Otros materiales

- Papel Aluminio.
- Hisopos estériles.

- Bolsas de plásticas
- Pinzas.
- Papel filtro.
- Pabilo.
- Algodón.
- Cocina eléctrica
- Discos de papel filtro Whatman N° 3
- Mechero bunsen.
- Agujas y asas de siembra.
- Dispositivo móvil.
- Tijeras.

2.5 METODOLOGÍA

2.5.1 Tipo de Investigación

La presente investigación es de tipo experimental, con un enfoque mixto, dado que integra datos cuantitativos y cualitativos. El enfoque cuantitativo porque se empleó diferentes concentraciones del aceite esencial de *Clinopodium bolivianum* y cualitativo en la identificación de compuestos químicos mediante Cromatografía de Gases – Espectrometría de masas.

2.5.2 Línea de investigación

La investigación se enmarca en el área de conocimiento de Ciencias de Vida y la línea de investigación en microbiología según lo establecido en la resolución N.º D- 2205-2022-FC-UNSAAC.

2.6 METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN

2.6.1 Colecta de muestras de *Clinopodium bolivianum*

Las muestras fueron recolectadas manualmente por la mañana, durante la temporada de lluvias del mes abril del 2025, en etapa de floración de la especie, teniendo en cuenta que sean homogéneas, limpias y en buen estado, con una colecta total de 10 kg correspondiente a la parte aérea de la planta. Una vez recolectado se envolvió en papel kraft y se llevó al laboratorio para su posterior procesamiento y extracción del aceite esencial (Barón y Velásquez, 2021).

2.6.2 Determinación taxonómica

Para realizar la determinación taxonómica de las muestras, se seleccionaron los mejores ejemplares en papel Kraft y se prensaron para su secado. Al finalizar el secado, las muestras secas fueron enviadas al especialista del Herbario Vargas CUZ para su identificación.

2.6.3 Selección y seccionamiento de hojas

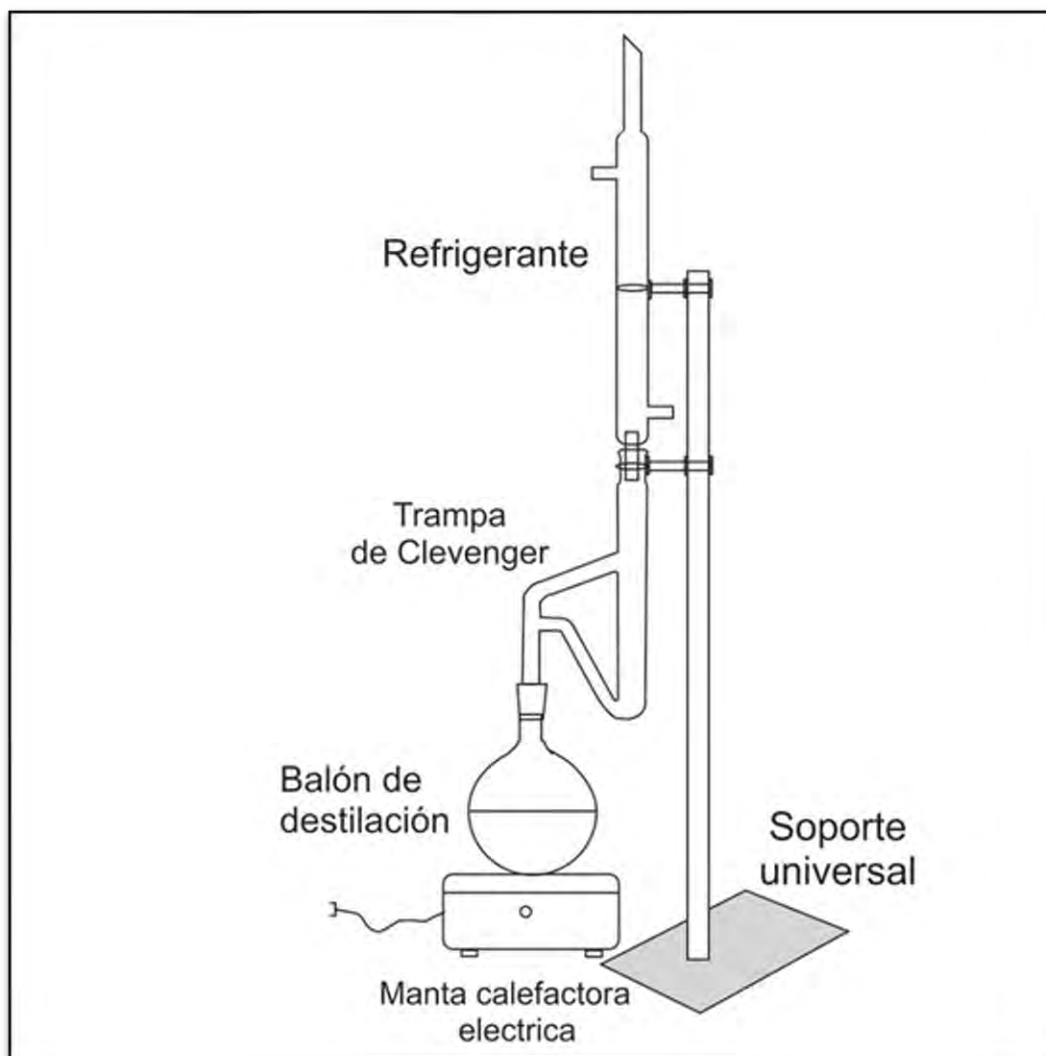
Se seleccionaron 750 gramos de *Clinopodium bolivianum* eligiendo las hojas en buen estado, enteros y sin signos de deterioro (Barón y Velásquez, 2021). Las hojas se seccionaron en partes más pequeñas de manera manual, tratando que tengan un tamaño de un 0,5 cm. Estas partes fraccionadas se trasvasaron a un balón de destilación de 2000 ml de capacidad, al que se añadieron 250g de material vegetal y 980 ml de agua destilada, asegurando la adecuada inmersión de la muestra durante el proceso (Barón y Velásquez, 2021).

2.6.4 Obtención del aceite esencial de *Clinopodium bolivianum*

Para la extracción del aceite esencial se utilizó el método de hidrodestilación con trampa de cleverger modificado (Peña y Gutiérrez, 2017). El equipo incluye un balón donde se coloca la materia prima triturada junto con una cantidad específica de agua pura; al calentarse de manera constante, el agua y el aceite esencial se evaporan simultáneamente y un condensador conectado al balón, mediante una conexión en forma de “D”, permite recolectar y separar el aceite esencial

de la mezcla condensada, el agua floral condensada retorna al balón a través del desbordamiento de la conexión (Cerpa, 2007). Las muestras de *Clinopodium bolivianum* fueron sometidas a hidrodestilación durante 3 a horas. El aceite esencial obtenido fue recogido en un frasco que posteriormente se procedió a deshidratar el aceite con sulfato de sodio anhidro (1 g por cada 10 mL de muestra) y finalmente el aceite fue almacenado en un frasco de color ámbar a 4°C en condiciones de refrigeración y oscuridad, hasta su posterior análisis y caracterización (Huanca, 2021).

Figura 7 Hidrodestilación con trampa de clevenger



Fuente: (Cerpa, 2007)

2.6.5 Determinación del porcentaje de rendimiento del aceite esencial de

Clinopodium bolivianum

El porcentaje de rendimiento se obtuvo del peso total de la muestra fresca de 250 g y el peso del aceite obtenido de 2 mL (Huanca, 2021).

Mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Peso del aceite esencial obtenido}}{\text{Peso de la muestra (g)}} \times 100$$

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{1,84\text{mL}}{250,1\text{g}} \times 100$$

$$\% \text{ Rendimiento} = 0,73\%$$

2.6.6 Determinación de los componentes químicos del aceite esencial

La determinación de los componentes químicos del aceite esencial de *Clinopodium bolivianum* se realizó en el laboratorio de cromatografía y espectrometría- Pabellon de Control de Calidad N° 110 de la Universidad Nacional De San Antonio Abad Del Cusco. El aceite fue determinado en un cromatógrafo de gases (Agilent 6890N) acoplado a un espectrómetro de masas (Agilent Technologies 5973B). Se inyectó 1 µl la muestra con las siguientes condiciones: temperatura del horno, comenzando 60°C, gradiente 5 °C/min, finalizando con una temperatura de 240 °C (5 min); el gas de helio tuvo un flujo de 1uL y una relación de Split 1:20. Luego de la corrida se tuvo los resultados del cromatograma, el contenido porcentual de cada uno de los componentes, se calculó comenzando del área bajo el pico y se compara con el total del pico áreas de todos los componentes; por otro lado la identificación de los componentes de cada cromatograma se realizó mediante la obtención del espectro de masa (Zúniga, 2022).

En el espectrómetro de masas, se establecieron los siguientes parámetros: la temperatura de la fuente fue de 230°C, del cuadrupolo fue de 150°C; la energía de ionización se fijó en 70 eV, y se seleccionó un rango de masas de 40 a 400 m/z (Zúniga, 2022).

2.6.7 Evaluación antibacteriana (método de difusión en discos)

Consiste en colocar discos de papel filtro impregnados con concentraciones conocidas de diferentes antibióticos sobre la superficie de una placa de Agar Muller-Hinton, previamente inoculada con el microorganismo de *Staphylococcus aureus*, luego estas placas se incuban durante 18 a 24 horas a una temperatura de 35-37°C, durante este tiempo, el antibiótico se dispersa radialmente desde el disco hacia el agar, disminuyendo su concentración a medida que se aleja del disco, lo que genera un gradiente de concentración y tras un periodo de incubación, los discos pueden estar rodeados por una zona donde el crecimiento bacteriano ha sido inhibido o no (Huanca, 2021). El diámetro de halo de inhibición se interpretó con las categorías de sensibilidad nula $\leq 8\text{mm}$, sensible 8-14mm, muy sensible 15-20mm y altamente sensible $>20\text{mm}$ (Durauffourd et al., 1986).

2.6.8 Activación de la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

La cepa fue obtenida del cepario de la Facultad de Ciencias Biológicas (Laboratorio de biotecnología) perteneciente Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco y reactivada mediante siembra en agar nutritivo, incubándose a una temperatura de 35–37 °C durante 18–24 horas. Posteriormente, se realizó su subcultivo en agar manitol salado, manteniéndose en las mismas condiciones de incubación, con la finalidad de favorecer su propagación y confirmar su crecimiento característico (Collection, American Type, 2013)

2.6.9 Tinción de Gram para la caracterización bacteriana

Se colocó una colonia de la muestra bacteriana sobre un portaobjetos, se extendió en una película fina y se dejó secar al aire. Seguidamente se pasó el portaobjetos suavemente por llama del mechero repetidas veces para fijar las bacterias (Tortora et al., 2024). Posteriormente se cubrió el frotis con cristal violeta y se dejó actuar por 1 minuto, luego se enjuago suavemente con agua destilada para eliminar exceso de colorante, se aplicó Lugol durante 1 minuto y se enjuago nuevamente para eliminar el exceso de mordiente, seguidamente se agregó el agente decolorante alcohol acetona durante 30 segundos hasta que el solvente que escurre este casi claro, luego se enjuagó con agua para detener la decoloración (Tortora et al., 2024).

Finalmente se cubrió con safranina durante 1 minuto para teñir las células que se decoloraron, se enjuago con agua y se dejó escurrir y secar con papel absorbente antes de la observación (Tortora et al., 2024). La observación se realizó en un microscopio óptico usando aceite de inmersión con el objetivo de 100X.

2.6.10 Preparación de concentraciones del Aceite esencial

Las diferentes concentraciones de aceite esenciales se prepararon en base a la siguiente tabla 2, usando como disolvente Tween 80. El volumen inicial disponible de aceite esencial fue de 10 mL, a partir del cual se realizaron las diluciones correspondientes; todas las concentraciones se prepararon en tubos de centrífuga de 1,5 mL estériles (Huanca, 2021).

Tabla 2 Concentración del aceite esencial Clinopodium bolivianum utilizada en el antibiograma

N.º	Concentración de aceite esencial (%)	Aceite esencial (µL)	Disolvente (Solución Tween 80 al 1%) (µL)
1	1%	10	990
2	5%	50	950
3	15%	150	850
4	25%	250	750
5	50%	500	500
6	75%	750	250
7	100%	1000	-

Fuente: (Huanqui, 2019)

2.6.11 Preparación de discos

Los discos se fabricaron perforando papel filtro Whatman N° 4, obteniendo discos de 6mm de diámetro, los cuales se esterilizaron en autoclave a 121°C, las aplicaciones de las diferentes concentraciones de aceites esenciales en los discos se realizaron bajo condiciones de esterilidad, cada disco se aplicará una cantidad de 10 µL de aceite esencial (5 µL por cada cara) con ayuda de micropipetas, este proceso se llevó a cabo el día de la prueba microbiológica dos horas antes, debido a que los discos deben encontrarse secos y conteniendo el aceite esencial (Huanca, 2021).

2.6.12 Preparación del agar Muller Hilton (MH)

Para la parte experimental se llenó cada placa Petri con 30 mL del agar Muller Hinton preparado (placa de 10 cm de diámetro), se obtuvo un grosor de 4 mm de agar en la placa en base a lo cual se realizaron los cálculos (Huanca, 2021).

Luego, se preparó el medio deshidratado según las instrucciones del fabricante, se pesó la cantidad requerida y se disolvió la muestra con agua destilada, el medio se esterilizó en autoclave por 15 minutos a 121°C, y se dejó enfriar hasta alcanzar una temperatura de 45 - 50 °C, posteriormente se distribuyó el medio en placas petri previamente esterilizadas, que se dejaron enfriar y se almacenaron en condiciones estériles hasta su uso, finalmente estas placas luego de ser utilizadas fueron desechadas (Huanca, 2021).

2.6.13 Preparación del inóculo

Se usó un tubo de ensayo con 3 mL de agua destilada esterilizada, luego se agregó 1 colonia de *Staphylococcus aureus*, la turbidez se ajustó al equivalente del estándar de 0.5 en la escala de McFarland el cual corresponde a una media de 1.5×10^8 Bacterias/mL (CLSI, 2024). Se preparó 525 mL para cubrir 40 placas, manteniendo la proporción de 34,0 g de agar por cada 1000 mL de agua destilada.

2.6.14 Inoculación de las placas

Los siguientes 15 minutos después del ajuste de la turbidez del inóculo se sumergió el hisopo estéril en la suspensión ajustada, luego se sembró sobre la superficie seca de la placa de Mueller Hinton, se hizo estrias con el hisopo en tres direcciones para una distribución uniforme del inóculo, Antes de colocar los discos se dejó la placa a temperatura ambiente durante 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido (Sacsquispe y Velásquez, 2002).

2.6.15 Aplicación de los discos

Se colocaron los discos individuales sobre la superficie del agar con la ayuda de una pinza estéril presionando suavemente sobre cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del agar, en cada placa se colocó un disco con la concentración correspondiente del aceite esencial, un disco de control negativo (tween 80) y un disco de control positivo (fosfomicina 200 µL) manteniendo una distancia mínima de 25 mm. Cada disco con concentración determinada se realizará por triplicado.

Para el control de susceptibilidad se utilizará discos de Fosfomicina, las cepas de *Staphylococcus*, posteriormente al proceso de incubación se compararon los halos de inhibición (Huanca, 2021).

2.6.16 Incubación

La incubación se realizó 15 minutos después de aplicar los discos con aceite esencial, luego las placas fueron incubadas en posición invertida a 37°C por 24 horas (Huanca, 2021).

2.6.17 Medición del diámetro de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano

Después de las 24 horas de incubación, se midieron el diámetro de los halos de inhibición en milímetros alrededor de los discos sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, para lo cual se utilizaron un vernier milimetrado (Baca y Yábar, 2016).

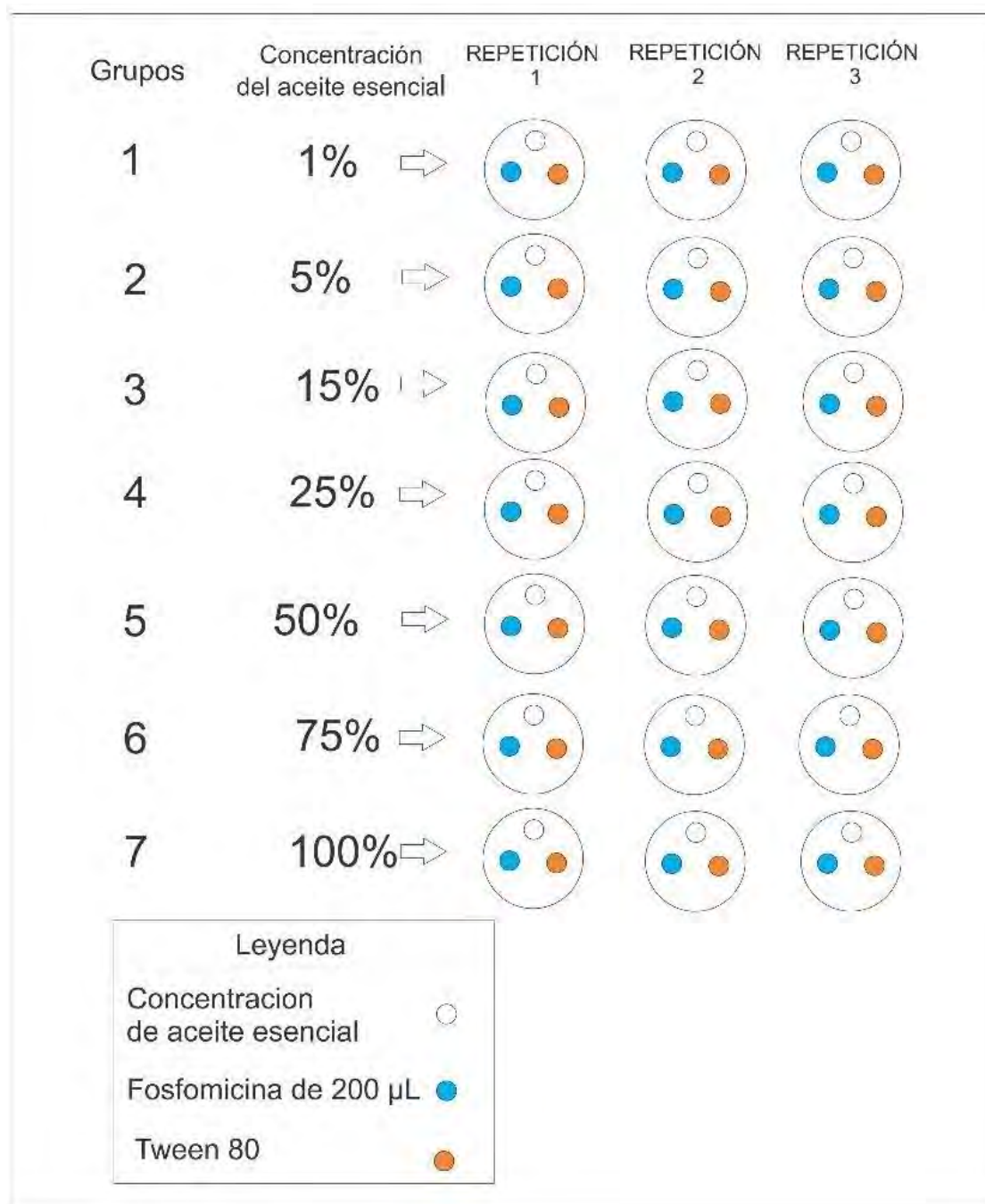
2.6.18 Evaluación de la efectividad bacteriana frente a *Staphylococcus aureus*

Para interpretar los halos, se utilizaron las siguientes pautas establecidas: sensibilidad nula (≤ 8 mm), sensible (8-14mm), muy sensible (15-20mm) y altamente sensible (> 20 mm) (Duraffourd et al., 1986).

2.6.19 Diseño experimental

El diseño experimental es unifactorial, estuvo conformado por 7 grupos y se realizaron 3 repeticiones por grupo, obteniendo un total de 21 unidades experimentales.

Figura 8 Diseño experimental para evaluar la actividad antibacteriana “in vitro”



Fuente: (Huanca, 2021) modificado

2.7 PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS

Se elaboró una ficha de datos para registrar manual y visualmente los resultados de la prueba de difusión en agar Muller- Hilton usando discos. La lectura implicó medir los halos de inhibición alrededor del disco, que indican el efecto del tratamiento sobre el crecimiento del microorganismo (Baca y Yábar, 2016).

Los datos que se obtuvieron se analizaron en función de las variables establecidas, los objetivos y la hipótesis del estudio, para el análisis estadístico se utilizó el software SPSS Statistics versión 30.0, empleando un análisis de varianza (ANOVA) para determinar las diferencias significativas de las distintas concentraciones de los aceites y la prueba de comparación de Scheffé con un nivel de confianza de $\alpha=0,05$ para determinar qué grupos son significativamente diferentes entre sí.

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Resultado del porcentaje de rendimiento del aceite esencial de *Clinopodium*

bolivianum (Benth.) Kuntze

El aceite esencial de *Clinopodium bolivianum* se obtuvo de hojas tiernas por el método de hidrodestilación - con trampa de Clevenger a una temperatura de 90 °C en el laboratorio de fitoquímica de la facultad de Química - UNSAAC.

Tabla 3 Porcentaje de extracción del aceite esencial de *Clinopodium bolivianum*

Número de Repeticiones	1	2	3	Promedio
Peso de Muestra (g)	250 g	250,2 g	250,10 g	250,1 g
Volumen (mL)	1,52 mL	2 mL	2 mL	1,84 mL
Tiempo (Horas)	3	3	3	3
Rendimiento (%) p/v	0,60%	0,79%	0,80%	0,73%

En la presente tabla muestra los resultados, del rendimiento promedio de 0,73% para el aceite esencial de *Clinopodium bolivianum*, equivalente a 1,84 mL extraídos por el método de hidrodestilación con trampa de clevenger a partir de 250.1 g de muestra de *Clinopodium bolivianum*.

Zúniga (2022) en su trabajo de investigación extrajo aceites esenciales de muestras frescas, mediante hidrodestilación con trampa de Clevenger de *Clinopodium bolivianum*, del cual obtuvo un rendimiento de 0,81%, mayor al del presente estudio. Esta diferencia porcentual es

moderada pero la influencia de factores externos en la biosíntesis de la planta es crucial en la extracción de aceites esenciales.

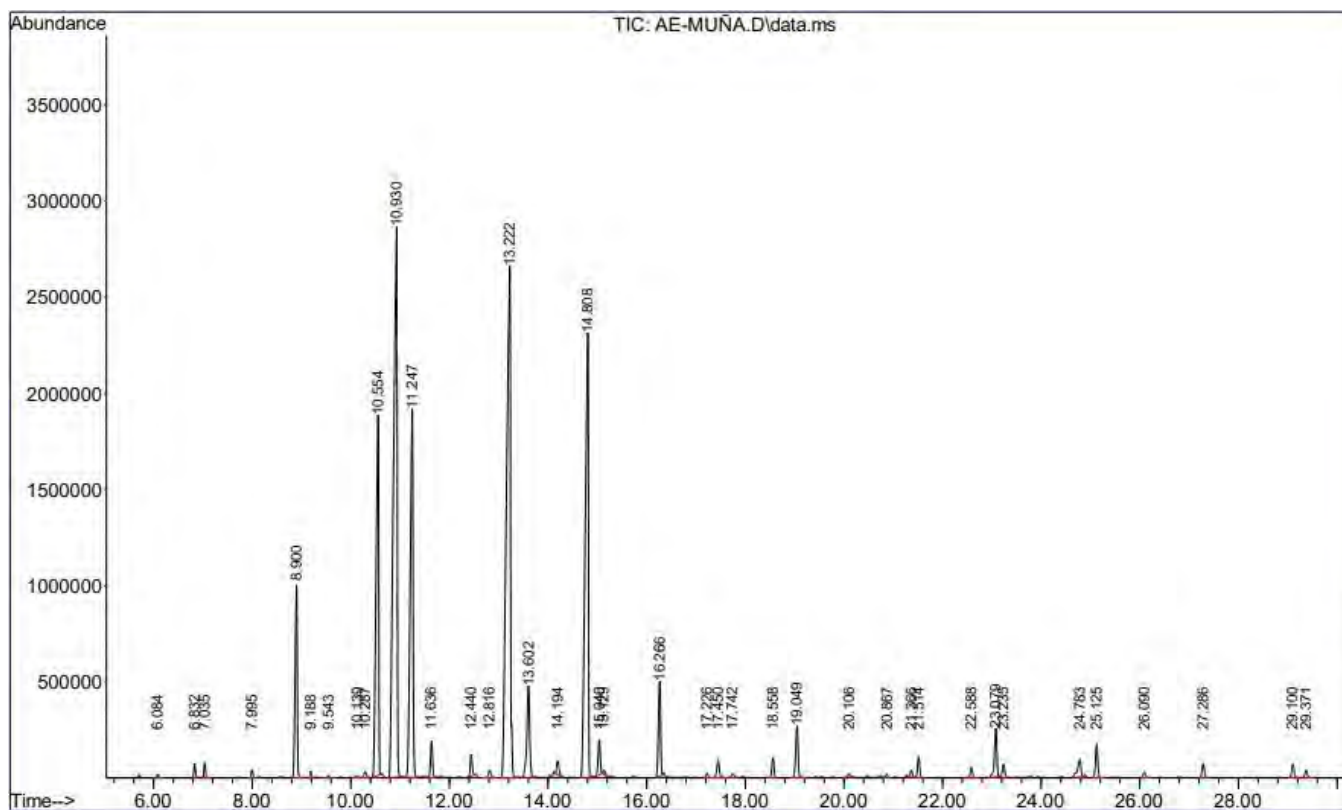
Reyes et al. (2025) extrajeron aceite esencial de *Clinopodium bolivianum* tanto en muestras frescas como secas y mediante la técnica de hidrodestilación convencional obtuvieron porcentajes de rendimiento de 0,19 % y 0,45% respectivamente, a pesar que la muestra seca tuvo mayor porcentaje sigue siendo inferior al del presente estudio y esta diferencia puede atribuirse, entre otros factores, al método y a las condiciones de extracción empleadas, lo que evidencia su influencia sobre el rendimiento del aceite esencial.

Por su parte Huanqui (2019) en su estudio obtuvo un porcentaje de rendimiento de 2,03% (p/v) siendo este un valor considerado alto, esto indica que para obtener un alto rendimiento de aceite esencial se necesita mucha cantidad de materia vegetal, además que la colecta de la muestra lo realizaron en etapa de florecimiento a diferencia de la muestra de este estudio que se colectó en el mes de abril etapa final de floración, el cual hizo diferencia en la obtención del aceite.

Finalmente, Heredia & Montenegro (2015), en su trabajo de investigación obtuvieron un porcentaje de rendimiento de 1,18 % (p/v) de aceite esencial de muestras secas de *Satureja boliviana* ahora denominada *Clinopodium bolivianum* de la zona de Urubamba – Cusco, el cual es superior al trabajo presente. Esta variación puede atribuirse principalmente al estado de la materia prima ya que dicho estudio utilizó material vegetal seco, lo cual tiende a concentrar las esencias y facilitar su extracción en comparación con las muestras frescas. Así evidenciando que el rendimiento de un aceite esencial depende de muchos factores como la época de colecta, la zona geográfica, el método empleado para su extracción.

3.2 Resultados de la composición química del aceite esencial de *Clinopodium bolivianum*

Figura 9 Cromatograma de *Clinopodium bolivianum* obtenido de Cusco - centro arqueológico Amaru Marka Wasi



En la Figura N.º 9 Se observa el cromatograma obtenido mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) del aceite esencial de *Clinopodium bolivianum*. En el eje X se muestra el tiempo de retención, mientras que el eje Y se registra la intensidad del detector, expresada como abundancia o intensidad relativa. La cuantificación de los compuestos se realizó mediante el equipo analítico, integrando el área correspondiente a cada pico del cromatograma. Los tiempos de retención (RT) y el porcentaje de abundancia relativa de cada componente se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4 Composición química del aceite esencial de *Clinopodium bolivianum*

Pico	Componente	TR min	%
1	o-Cymene	6,83	0,22
2	Eucalyptol	7,04	0,24
3	gamma.-Terpinene	8,00	0,15
4	Linalol	8,90	4,27
5	1-Octen-3-yl-acetate	9,19	0,11
6	Menthone	10,55	10,24
7	l-Menthone	10,93	21,44
8	Isopulegone	11,25	10,96
9	.alpha.-Terpineol	11,64	0,77
10	Pulegone	13,22	21,65
11	Piperitone	13,60	2,73
12	Thymol	14,81	15,32
13	3-Methyl-4-isopropylphenol	15,04	0,80
14	2-Methylenebornane	16,27	2,17
15	2-Propenoic acid, 3-phenyl-, methyl ester	17,45	0,49
16	Caryophyllene	18,56	0,45
17	Naphthalene, decahydro-2,6-dimethyl-	19,05	1,30
18	(+)-delta-Cadinene	21,51	0,47
19	Espatulenol	23,08	1,24
20	.gamma.-Muurolene	24,78	0,66
21	Bicyclo[4.4.0]dec-1-ene, 2-isopropyl-5-methyl-9-methylene-	25,13	0,79

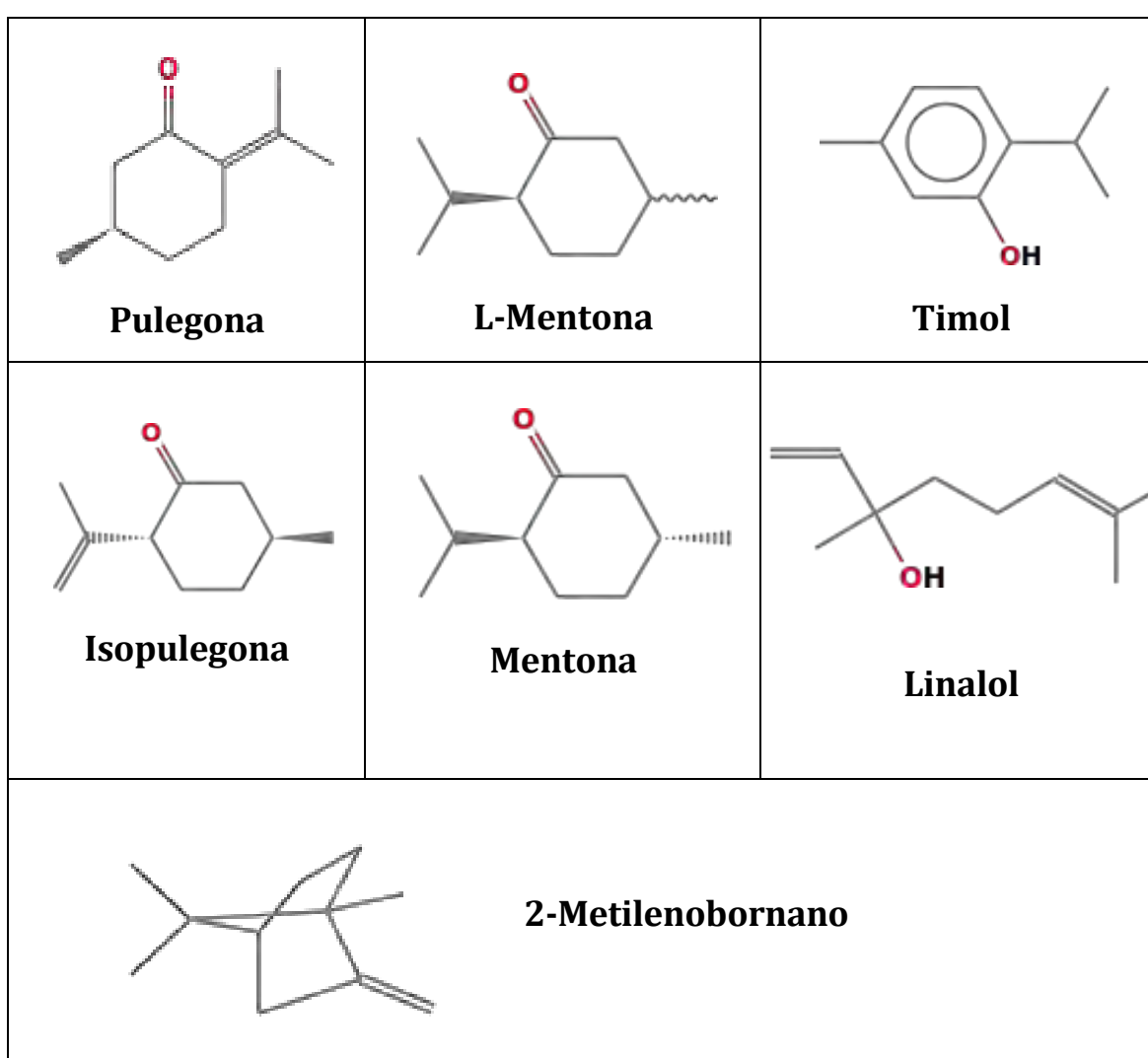
Donde: TR min= Tiempo de retención en minutos

%: Porcentaje de abundancia

La tabla 04, muestra la composición química del aceite esencial de *C. bolivianum* determinada mediante GC-MC, aunque se identificó de 40 compuestos, solo se tomó en cuenta 21, debido a que algunos presentaron porcentaje de presencia baja.

A partir de los datos presentados en la tabla 4, se observa que el aceite esencial de *Clinopodium bolivianum* (Benth.) Kuntze está compuesto principalmente por monoterpenos hidrocarbonados. Se identificaron los siguientes compuestos químicos como los constituyentes mayoritarios: Pulegona con un porcentaje de (21,65%) seguido del L- Mentona con (21,44%), Timol (15,32%), Isopulegona (10,96%), Mentona (10,24%), Linalol (4,27%) y 2-Metilenobornano (2,17%).

Figura 10 Estructuras moleculares del aceite esencial *Clinopodium bolivianum*



Fuente: (pubchem, s.f.)

En comparación al trabajo de Reyes et al.(2025) en el cual extrajeron compuestos bioactivos de *Clinopodium bolivianum*, lograron identificar 60 compuestos volátiles de muestra fresca teniendo como componentes predominantes a Isomentona con 28.74%, Linalol con 17.50 % y

Pulegona al 12.05%; en el presente estudio se obtuvo una composición química diferente, caracterizada principalmente por pulegona (21.65%) y L-mentona (21.44%). Estas diferencias en la abundancia relativa de los compuestos mayoritarios podrían atribuirse a variaciones en el estado fenológico de la planta o diferencias genéticas entre las poblaciones evaluadas.

Por otra parte, Zúñiga (2022), al evaluar la composición química de *Clinopodium bolivianum* obtuvo 6 componentes mayoritarios: Isomentona (24,08%), mentona (16,3), timol (15,82%), p-cimeno (10,7%), terpineno (7,21%) y pulegona (6,55%). Al comparar los resultados con el presente estudio, se observó la presencia común de mentona, timol y pulegona, aunque con diferentes proporciones relativas. En cambio, el porcentaje de timol fue similar, lo que podría indicar una relativa estabilidad en la biosíntesis de este compuesto dentro de la especie, a pesar de las variaciones observadas en otros metabolitos.

Por su parte Solis (2021), obtuvo 7 componentes mayoritarios: isomentona (24,08%), mentona (16,13%), timol (15,82%), p-cimeno (10,17%), y-terpineno (6,65%), pulegona (6,55%) y eucaliptol (2,87%). Al comparar los resultados con el presente estudio se observa diferencias en componentes como p-cimeno, y-terpineno y eucaliptol, esta variable podría estar relacionada con factores ambientales, geográficos o fisiológicos que influyen en la biosíntesis de metabolitos secundarios.

Además, Obispo et al. (2025) en su estudio obtuvieron como componentes mayoritarios a Pulegona con un 66,85%, iso-mentona con 1,58% y carvacrol con 4,30%. Concluyendo que el alto porcentaje de Pulegona se debe a que la muestra utilizada corresponde a un quimiotipo con una ruta biosintética orientada a la producción de cetona monoterpenica.

3.3 Resultados de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Clinopodium*

bolivianum (Benth.) (Kuntze)

Los diámetros de los halos de inhibición producidos por el aceite esencial de *C. bolivianum* en distintas concentraciones frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 se presentan en la tabla.

Tabla 5 Halos de inhibición de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *C. bolivianum* (Kuntze), frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Nº	Concentración (%)	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio
1	1%	6,65	6,68	6,66	6,66
2	5%	6,84	7,60	6,82	7,09
3	15%	7,36	8,22	7,05	7,54
4	25%	8,16	7,12	12,02	9,16
5	50%	8,18	7,95	7,93	8,02
6	75%	8,96	8,95	8,77	8,89
7	100%	13,01	13,05	12,15	12,74
8	Fosfomicina de 200 µg	53,17	51,18	58,44	54,26

Donde:

R1: Primer grupo de halos.

R2: Segundo grupo de halos.

R3: Tercer grupo de halos

*El promedio considera el diámetro de los discos de aceite esencial.

En la Tabla 5 se presentan los diámetros de los halos de inhibición generados por el aceite esencial de *C. bolivianum* (Benth.) Kuntze frente a *S. aureus* ATCC 25923 a 7 diferentes

concentraciones. Evidenciando que, conforme aumenta la concentración del aceite esencial, también se incrementa el tamaño de los halos de inhibición, con valores que van desde 6.65 mm a una concentración del 1 %, hasta un máximo de 13.05 mm a la concentración del 100 %, sin embargo en la concentración del 50 % se observó una ligera disminución en el diámetro de los halos, lo que sugiere una posible variación en la respuesta bacteriana o en la acción del compuesto activo; sin embargo, este valor volvió a incrementarse en la concentración siguiente de 75%, lo que refuerza la relación de concentración - respuesta del aceite esencial.

Reyes et al. (2025) en su trabajo de investigación reportó que el aceite esencial de muestra seca de *C. bolivianum* frente a *S. aureus* ATCC 25923 generaron halos hasta 23.30 mm de halos y en muestras frescas hasta 18.03 mm de halos. Al comparar los resultados con este trabajo, se observa que ambos estudios demostraron actividad antibacteriana frente a *S. aureus*. Sin embargo, los diámetros de inhibición reportado por Reyes et al. (2025) son superiores, esta diferencia esta relacionada con variaciones en la composición química del aceite esencial ya que identificaron como compuestos predominantes a Isomentona (28,74%), Linalol (17,50%) y pulegona (12,05%). No obstante, la actividad antibacteriana de los aceites esenciales depende de la interacción entre múltiples compuestos bioactivos por lo que las diferencias observadas probablemente responden al perfil químico global del aceite esencial y no únicamente a la concentración de un compuesto específico.

Por su parte, Hospino & Mallma (2019) reportaron resultados similares del aceite esencial en estado fresco y seco de *C. bolivianum* lograron generar halos de inhibición de 22,26 mm y 23,30 mm respectivamente frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Al comparar dichos resultados con la presente investigación, se observa que los diámetros de inhibición fueron mayores a los registrados en este estudio, cuyo valor máximo alcanzo 13,05 mm. esta diferencia podría estar relacionada con variaciones en la composición química del aceite esencial.

Finalmente, Mollo (2017) reportó que el aceite esencial de *C. bolivianum* produjo halos de inhibición de 10 mm sobre cepas de *S. aureus* ATCC 25923, estos resultados indican una menor actividad antibacteriana. Esta diferencia podría atribuirse a variaciones en la composición química de la fracción volátil de la planta, la cual concentra los compuestos bioactivos responsables de la actividad antibacteriana.

Tabla 6 Determinación del grado de sensibilidad de Staphylococcus aureus ATCC 25923 a diferentes concentraciones del aceite esencial de Clinopodium bolivianum (Benth) Kuntze.

Nº	concentración (%)	Grado de sensibilidad		
		Sensibilidad límite, entre 8 a 14 mm (+)	Sensibilidad media, entre 14 a 20 mm (++)	Sensibilidad alta, más de 20 mm (+++)
1	1%	-	-	-
2	5%	-	-	-
3	15%	-	-	-
4	25%	10.54	-	-
5	50%	-	-	-
6	75%	8.89	-	-
7	100%	12.74	-	-

Fuente: Procesamiento de datos estadísticos 2025

En la tabla 6 se presentan los promedios de halos de inhibición que reflejan el grado de sensibilidad frente al aceite esencial de *C. bolivianum* (Benth) Kuntze., evaluados en

concentraciones del 1% al 100% exceptuando la concentración de 50%. Los resultados obtenidos se ubican dentro del rango límite (8-12 mm), lo que evidencia que el aceite esencial ejerce únicamente una actividad antibacteriana mínima, atribuible principalmente a su composición química y al modo en que sus compuestos interactúan en conjunto frente a *S. aureus* ATCC 25923.

Tabla 7 Análisis de varianza (ANOVA) de la actividad antibacteriana del aceite esencial de C. bolivianum frente a la cepa de Staphylococcus aureus ATCC 25923

	Suma de Cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig
Inter- grupos	5553,674	7	793,382	293,936	< 0,001
Intra- grupos	43,187	16	2,699		
Total	5596,861	23			

Fuentes: Procesamiento de datos estadísticos 2025

Donde:

gl= Grados de libertad

F= Distribucion de Fisher

Sig.= Significancia

Se obtuvo un valor de significancia de $< 0,001$, el cual se encuentra por debajo del umbral de 0,05 ($\alpha < 0.05$). Esto indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre las distintas concentraciones evaluadas.

En la tabla 8, se aprecian los resultados posteriores al ANOVA, la prueba de comparación de Scheffé utilizando un nivel de confianza de $\alpha = 0,05$.

Tabla 8 Prueba de Post hoc de Scheffé de la actividad antibacteriana del aceite esencial de C. bolivianum frente a la cepa de S. aureus ATCC 25923.

concentración (%)	N	Subconjunto para $\alpha = 0.05$		
		1	2	3
1%	3	6,6633		
5%	3	7,0867	7,0867	
15%	3	7,5433	7,5433	
50%	3	8,0200	8,0200	
75%	3	8,8933	8,8933	
25%	3	9,1000	9,1000	
100%	3		12,7367	
Fosfomicina de 200 ug	3			54,2633
Sig.		0.841	0,059	1,000

Fuente: Procesamiento de datos estadísticos 2025

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

- a. Usa el tamaño muestral de la media armónica=3.000.

Se identificaron tres subconjuntos diferenciados incluyendo el control positivo de Fosfomicina de 200 ug según el tipo de tratamiento, mostrando en cada caso la media correspondiente. En el segundo subconjunto se registró el valor máximo de halo de inhibición, con 12,73 mm, obtenido a la concentración del 100 % del aceite esencial.

CONCLUSIONES

1. El porcentaje de rendimiento del aceite esencial de *Clinopodium bolivianum* fue de 0,73% a partir de 205,1 g materia vegetal.
2. El análisis por Cromatografía de gases – espectrometría de masas (CG-MS) identifico 40 compuestos químicos, siendo 7 los compuestos mayoritarios: Pulegona con un porcentaje de (21,65%) seguido del L-Mentona con (21,44%), Timol (15,32%), Isopulegona (10,96%), Mentona (10,24%), Linalol (4,27%) y 2-Metilenobornano con (2,17%).
3. La actividad antibacteriana del aceite esencial de *Clinopodium bolivianum* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, no presento actividad antibacteriana a las concentraciones de 1%, 5%, 15% y 25%, pero si presenta actividad antibacteriana a las concentraciones de 50%,75% y 100%, que presentaron halos de inhibición de 8,02 mm, 8,89 mm y 12.74 mm respectivamente pero no supero el control positivo de Fosfomicina de 200 µL que generó hasta 44 mm de halo.

SUGERENCIAS

1. Realizar estudios de componentes puros de aceites esenciales como Pulegona, timol, L-mentona, Isopulegona y Mentona frente a bacterias resistentes a antibióticos.
2. Realizar nanoemulsiones con diferentes aceites esenciales y comparar su eficacia antimicrobiana con emulsiones convencionales.
3. Ampliar más estudios hacia otras cepas bacterianas de importancia clínica tanto Gram positivas como negativas.
4. Realizar estandarizaciones de las concentraciones y métodos de extracción del aceite esencial, ya que la variabilidad en el proceso puede influir en la actividad antibacteriana.
5. Incorporar ensayos in vivo y estudios toxicológicos preliminares, que permitan determinar la seguridad del aceite esencial para su posible aplicación.
6. Realizar más investigaciones para la revalorización etnobotánica de *Clinopodium bolivianum* mediante difusión de los resultados en comunidades locales, incentivando la conservación de esta especie y su potencial uso como recurso natural con valor agregado.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, F. R., Niño, V. J., & Moreno, M. (2015). *Portadores Nasofaríngeos de Staphylococcus aureus y Streptococcus pneumoniae en personal de Salud del Hospital Provincial Docente Belén de Lambayeque*.
<https://rem.hrlamb.gob.pe/index.php/REM/article/view/17>
- American Type Collection. (2013). *Staphylococcus aureus subsp. aureo Rosenbach 25923*.
<https://www.atcc.org/products/25923>
- Atchade, E., de Tymowski, C., Grall, N., Tanaka, S., & Montravers, P. (2024). *Toxic Shock Syndrome: A Literature Review*. 10.3390/antibiotics13010096
- Baca, L. K., & Yábar, A. (2016). *Efectos antibacteriano in vitro de los aceites esenciales de: Foeniculum Vulgar, Cimbopogon citrus, Origanum vulgare, Citrus aurantifolia swingle y Citrus sinesis, frente a Cepas estandarizadas de Streptococcus mutans, Cusco 2016*. <https://hdl.handle.net/20.500.12557/559>
- Bandoni, A. L. (2000). *Los Recursos Naturales Vegetales Aromáticos en Latinoamérica*. Universidad de la Plata. <https://doi.org/http://www.herbotecnia.com.ar/Recursos-Vegetales-Arnaldo-Bandoni.pdf>
- Barón, Y., & Velásquez, E. (2021). *EFICACIA ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE MUÑA (Minthostachys mollis) SOBRE CEPAS DE Staphylococcus aureus*.
<https://repositorio.uroosevelt.edu.pe/server/api/core/bitstreams/d651afea-e3b9-4945-bdea-bc0eac64b8f1/content>
- Bashabsheh, R. H., Al-Fawares, O., Natsheh, I., Bdeir, R., Al-Khreshieh, R. O., & Bashabsheh, H. H. (2023). *Staphylococcus aureus epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations and application of nano-therapeutics as a promising approach*

to combat methicillin resistant Staphylococcus aureus.

10.1080/20477724.2023.2285187

Bergman, M. E., Kortbeek, R. W., Gutensohn, M., & Dudareva, N. (2024). *Plant terpenoid biosynthetic network and its multiple layers of regulation.*

<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2024.101287>

Braun, A. C., Ilko, D., Merget, B., Henning, G., Germershaus, O., Holzgrabe, U., & Lorenz, M. (2015). *Predicting critical micelle concentration and micelle molecular weight of polysorbate 80 using compendial methods.* <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.12.015>

Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia fitoquímica plantas medicinales* (2da ed ed.). ACRIBIA.

Butnariu, M., & Sarac, I. (2018). *Essential Oils from Plants. Journal of Biotechnology and Biomedical Science.* <https://doi.org/10.14302/issn.2576-6694.jbbs-18-2489>

Cachay, F. R., De La Flor Llona, A., & Schwalb Calderón, A. (2018). *Mortalidad en pacientes con bacteriemia por Staphylococcus aureus en hospitales de Lima, Perú.* <https://hdl.handle.net/20.500.12866/3565>

Cachuta, & Ramón. (2010). *aracterización y uso de "Q'OA" (Satureja boliviana (Benth.)) en tres localidades del norte de la Paz-Bolivia.* <http://tesis.unap.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14082/605/EPG205-00207-01.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Cárdenas, E. M. (2014). *Determinación de parámetros de operación para la destilación por arrastre con vapor de agua del aceite esencial de molle (Schinus molle Linneo) en el equipo modular de extracción de aceites esenciales de la FIQM - UNSCH.* <http://repositorio.unsch.edu.pe/handle/UNSCH/1032>

- Castañeda, P. F., Hernández, D., Muñoz, M., & Soto, L. E. (2018). *Frecuencia de infecciones por S. aureus en pacientes hospitalizados en un hospital privado de tercer nivel de la Ciudad de México*. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revmed/md-2018/md184i.pdf>
- Centers for Disease Control and Prevention. (s,f). Public Health Image Library (PHIL): <https://www.microbiologyinpictures.com/bacteriaainphotos/staphylococcus-aureus-electron-microscopy.html>
- Cerpa, M. G. (2007). *Hidrodestilacion de aceites esenciales; modelado y caracterizacion*. https://www.researchgate.net/profile/Manuel-Cerpa-2/publication/235356074_Hidrodestilacion_de_aceites_esenciales_Modelado_y_Caracterizacion/links/54f8f71d0cf28d6deca2dbdc/Hidrodestilacion-de-aceites-esenciales-Modelado-y-Caracterizacion.pdf
- Chirinos, R., Pedreschi, R., Rogez, Larondelle, L. Y., & Campos, D. (2013). *Phenolic compound contents and antioxidant activity in plants with nutritional and/or medicinal properties from the Peruvian Andean region*. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.02.025>
- Chizzola, R. (2013). *Regular Monoterpenes and Sesquiterpenes (Essential Oils)*. SPRINGER: https://link.springer.com/rwe/10.1007/978-3-642-22144-6_130
- CLSI. (2024). *performance standards for antimicrobial Susceptibility Testing* (34th ed. ed.). Collection, American Type. (2013). <https://www.atcc.org/products/25923>
- de Sousa, D., Damasceno, R. O., Amorati, R., Elshabrawy, H. A., de Castro, R. D., Bezerra, D. P., . . . Lima, T. C. (2023). *Essential Oils: Chemistry and Pharmacological Activities*. <https://doi.org/10.3390/biom13071144>

- de Souza, E. T., Martins, L., Nolibos, R., Machado, A., Garcia, C., Cassel, E., & Figueiró, R. (2020). *Comparison of Different Extraction Techniques of Zingiber officinale Essential Oil*.
<https://www.scielo.br/j/babt/a/FDzjVn5LrThx59hKjv9LK7d/?format=pdf&lang=en>
- Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., & Mnif, W. (2016). *Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review*.
<https://doi.org/10.3390/medicines3040025>
- Domínguez, L., & Parzanese, M. (2013). *Tecnologías para la Industria Alimentaria Fluidos supercríticos*.
https://alimentosargentinos.magyp.gob.ar/contenido/sectores/tecnologia/Ficha_01_Fluidos.pdf
- Duraffourd, C., Hervicourt, L. D., & Lapraz, J. C. (1986). *uadernos de Fitoterapia Clínica*.
- Farmer, A., Tobin, E. H., & Hicks, M. A. (2026). *Staphylococcal Pneumonia*.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559152/?utm_source=chatgpt.com
- Faúndes, N. M., Estrada, S. I., García, A. I., Leiva, J. A., & Ducasse, K. P. (2019). *Síndrome de piel escaldada. Avances en Diagnóstico y Tratamiento*.
<https://doi.org/10.22370/bolmicol.2019.34.2.2004>
- Flores, M. C. (2010). *Investigación de los aceites esenciales, sus características y finalidad de uso : análisis del estado de su regulación en Chile y el mundo*.
<https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/105352>
- Ganosi, E., Barda, C., Grafakou, M. E., Rallis, M. C., & Skaltsa, H. (2023). *An In-Depth Stability Study of the Essential Oils from Mentha × piperita, Mentha spicata,*

Origanum vulgare, and *Thymus vulgaris*: The Impact of Thermal and Storage Conditions. <https://doi.org/10.3390/separations10090488>

GlobeNewswire. (2025). *The Methicillin-resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) Epidemiology Forecast Report 2025-2034 offers a detailed analysis of MRSA's prevalence and associated demographic factors.*
<https://www.globenewswire.com/news-release/2025/07/14/3114594/28124/en/Methicillin-resistant-Staphylococcus-Aureus-MRSA-Epidemiology-Forecast-Report-2025-2034-Community-Associated-MRSA-on-the-Rise-Challenging-Historical-Norms.html>

Gutiérrez, M. C., & Droguet, M. (2002). *La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor*. UPCommons:
<https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099/2733/5CROMGASES.pdf>

Hasanpour, A. H., Sepidarkish, M., Mollalo, A., Ardekani, A., Almukhtar, M., Mechaal, A., . . . Rostami, A. (2023). *The global prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus colonization in residents of elderly care centers: a systematic review and meta-analysis. Antimicrobial resistance and infection control.*
<https://doi.org/10.1186/s13756-023-01210-6>

Hennekinne, J. A., De Buyser, M. L., & Dragacci, S. (2012). *Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation.*
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x>

Huanca, L. R. (2021). *Composición química del aceite esencial de Senecio saxicola Wedd y su efecto inhibitorio ante Staphylococcus epidermidis y Staphylococcus aureus, procedente del distrito de Ocongate, provincia de Quispicanchis, Cusco.*
<http://hdl.handle.net/20.500.12918/7251>

- Huanqui, A. S. (2019). *inacion de la actividad antioxidante y antibacteriana del aceite esencial de Clinopodium bolivianum (Benth.) Kuntze "cjuñuca" frente a la cepa de Cutibacterium acnes 6919*. <http://hdl.handle.net/20.500.12918/4628>
- Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). *Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components*. *Front. Microbio.*
<https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2012.00012/full>
- Khan, A., Kanwal, F., Ullah, S., Fahad, M., Tariq, L., Altaf, M., . . . Zhang, G. (2025). *Metabolitos secundarios de las plantas: reguladores centrales frente al estrés abiótico y biótico*. <https://doi.org/10.3390/metabo15040276>
- Kuklinski, C. (2000). *Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Omega.
- Lange, B. M. (2015). *Biosynthesis and Biotechnology of High-Value p-Menthane Monoterpenes, Including Menthol, Carvone, and Limonene*.
https://doi.org/10.1007/10_2014_289
- Lee, A. R., Park, S. B., Kim, S. W., Jung, J. W., Chun, J. H., Kim, J., . . . Jung, T. (2022). *Membrane vesicles from antibiotic-resistant Staphylococcus aureus transfer antibiotic-resistance to antibiotic-susceptible Escherichia coli*.
<https://doi.org/10.1111/jam.15449>
- Lüdtke, F. L., Stahl, M. A., Grimaldi, R., Forte, M. B., Gigante, M. L., & Bordan, A. P. (2022). *Optimization of high pressure homogenization conditions to produce nanostructured lipid carriers using natural and synthetic emulsifiers*.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996922008043>

- Machado, C. A., Oliveira, f., de Andrade, M., Hodel, K. V., Lepikson, H., & Machado, B. A. (2022). *Steam Distillation for Essential Oil Extraction: An Evaluation of Technological Advances Based on an Analysis of Patent Documents*.
<https://doi.org/10.3390/su14127119>
- Marhamati, M., Ranjbar, G., & Rezaie, M. (2021). *Effects of emulsifiers on the physicochemical stability of Oil-in-water Nanoemulsions: A critical review*.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167732221019425?via%3Dihub>
- Martínez, A. (2003). *Aceites esenciales*. https://www.informatica.com/OBSERVAMED/Descripciones/AceitesEsencialesUdeA_esencias2001b.pdf
- Minter, D. J., Appa, A., Chambers, H., & Doernberg, S. B. (2023). *Contemporary Management of Staphylococcus aureus Bacteremia-Controversies in Clinical Practice*.
10.1093/cid/ciad500
- Mohtashami, S., Rowshan, V., Tabrizi, L., Babalar, M., & Ghani, A. (2018). *Summer savory (Satureja hortensis L.) essential oil constituent oscillation at different storage conditions*. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.09.055>
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfäuer, M. A. (2020). *Microbiología médica*. España: Elsevier.
- Murray, P., Rosenthal, K., Pfaller, & M. (2023). *Medical microbiology*.
<https://shop.elsevier.com/books/medical-microbiology/murray/978-0-323-67322-8>

- NCBI. (2022). *Taxonomy browser (Staphylococcus aureus)*.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?lin=s&p=has_linkout&id=1280
- OMS. (2021). *Resistencia a los antimicrobianos*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- OMS. (2024). *Lista de patógenos bacterianos prioritarios de la OMS, 2024*.
<https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>
- Pal, M., Berhanu, G., Megersa, L., & Kandi, V. (2020). *Epidemiology, Pathogenicity, Animal Infections, Antibiotic Resistance, Public Health Significance, and Economic Impact of Staphylococcus Aureus: A Comprehensive Review*.
https://www.researchgate.net/publication/339041889_Epidemiology_Pathogenicity_Animal_Infections_Antibiotic_Resistance_Public_Health_Significance_and_Economic_Impact_of_Staphylococcus_Aureus_A_Comprehensive_Review
- Pardo, C. G., Monsalve, G. S., Erira, A., Espinoza, Y., & Jaramillo, G. I. (2017). *Efecto antimicrobiano del aceite esencial de Citrus reticulata sobre Fusobacterium nucleatum asociada a enfermedad periodonta*.
<http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v19n2/0123-3475-biote-19-02-00007.pdf>
- Patel, G. K., & Finlay, A. Y. (2012). *Staphylococcal Scalded Skin Syndrome*.
<https://link.springer.com/article/10.2165/00128071-200304030-00003>
- Pavoni, L., Perinelli, D. R., Bonacucina, G., Cespi, M., & Palmieri, G. f. (2020). *An Overview of Micro- and Nanoemulsions as Vehicles for Essential Oils: Formulation, Preparation and Stability*. <https://doi.org/10.3390/nano10010135>

- Peña, D., & Gutiérrez, M. (2017). *Efecto antimicrobiano del aceite esencial de Minthostachys mollis sobre microorganismos frecuentes en vías respiratorias bajas*.
<https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/PGM/es/article/view/1874/1802>
- Pérez, M. O. (2008). *evaluación de la producción de metabolitos anticancerígenos a partir de células en suspensión de Caléndula officinalis*.
<https://bffrepositorio.unal.edu.co/server/api/core/bitstreams/0eea1561-59f4-4662-8f90-abb79d101481/content>
- Porter, L., Sultan, O., Mitchell, B. G., Jenney, A., Kiernan, M., Brewster, D. J., & Russo, P. L. (2024). *How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A scoping review*. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2024.01.023>
- pubchem. (s.f.). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Reyes, V. J., Mallma, F. d., Atapoma, M., Hospino, L., & Yabar, E. (2025). *Bioactive compounds and in vitro antibacterial activity of Clinopodium bolivianum (Benth) Kuntze*. <https://doi.org/10.37360/blacpma.25.24.3.27>
- Riyadi, S. A., Naini, A. A., & Unang, S. (2023). *Sesquiterpenoids from Meliaceae Family and Their Biological Activities*. <https://doi.org/10.3390/molecules28124874>
- Rocabado Imaña, E., Carita Cahua, R., Patty Mullisaca, F., Ríos Guzmán, M., Carita Patty, D., & Paniagua Zambrana, N. (2025). *Traditional knowledge and use of medicinal plants in the Ayllu Niño Corin (Prov. Bautista Saavedra, La Paz, Bolivia)*.
<http://dx.doi.org/10.32859/era.32.46.1-33>
- Rodríguez, C. R. (1988). *Plantas para leña en el sur-occidente de Puno*. Proyecto Arbol andino.

- Rondon, Claudia, Garcia, C., Krapp, F., Machaca, I., Olivera, M., . . . Kuenzli, E. (2023). *Antibiotic point prevalence survey and antimicrobial resistance in hospitalized patients across Peruvian reference hospitals*.
<https://doi.org/10.1016/j.jiph.2023.10.030>
- Royal Botanic Gardens kew. (2025). *Clinopodium bolivianum subsp. bolivianum*.
<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:61175-2/general-information>
- Sacsaquispe, R. E., & Velásquez, J. (2002). *Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión*.
https://bvs.ins.gob.pe/insprint/SALUD_PUBLICA/NOR_TEC/30.pdf
- Salcedo, M. d., & Alonso, J. R. (2021). *Satureja boliviana (Lamiaceae). Una puesta al día de “muña blanca”*. <https://www.dominguezia.org/volumen/37200.pdf>
- Sanchez, F. L., & García, F. (2022). *Fitoquímica*. Universidad Nacional Autónoma de México. <https://doi.org/https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/2022/Publicaciones/libros/cbiologia/Fitoquimica.pdf>
- Sharifi-Rad, J., Sureda, A., Tenore, G. C., Daglia, M., Sharifi-Rad, M., Valussi, M., . . . Iriti, M. (2017). *Biological Activities of Essential Oils: From Plant Chemoecology to Traditional Healing Systems*. <https://doi.org/10.3390/molecules22010070>
- SOLINSA. (2017). *Cromatografo de gases*. <https://www.solinsa.mx/conoce-algunas-aplicaciones-de-la-cromatografia-de-gases-acoplado-a-un-espectrometro-de-masas>
- Solis, E. M. (2021). *Composición química, citotoxicidad en Artemia salina Leach y toxicidad aguda en ratones albinos de los aceites esenciales de Clinopodium bolivianum*

(Benth) Kuntze y *Tagetes multiflora* Kunth.

<https://repositorio.unsaac.edu.pe/handle/20.500.12918/6044>

Solís, L., Pino, J. A., Tomaylla, C., & Aragón Alencastre, L. (2018). *Plantas y Aceites esenciales como insecticidas. Una alternativa de manejo ecológico*. UNSAAC.

Song, M., Sun, J., Lv, K., Li, J., Shi, J., & Xu, Y. (2025). *A comprehensive review of pathology and treatment of staphylococcus aureus osteomyelitis*.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40299136/>

Suárez, E. B. (2012). *Evaluación de la Actividad Antibacteriana de los Aceites Esenciales de: Zacate de limón (Cymbopogon Citratus DC. Stapf), Eucalipto (Eucalyptus ssp.) y Clavo de olor (Syzygium aromaticum L), Sólo y en Combinación, Contra Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853*.

<https://repositorio.unan.edu.ni/id/eprint/78/1/90907.pdf>

Tapia, E., Rivera, B., Castro, A., Corderhuamán, M., Quispe, C., & Valdivieso, D. (2019). *Actividad antimicrobiana del aceite esencial de Clinopodium pulchellum (Kunth) Govaerts «panizara», frente a Pseudomonas aeruginosa y Staphylococcus aureus*.

<https://doi.org/10.24265/cultura.2019.v33.22>

Tong, S. Y., Davis, J. S., Holland, T. L., & Fowler, V. (2015). *Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management*. <https://doi.org/10.1128/cmr.00134-14>

Tongnuanchan, P., & Benjakul, S. (2014). *Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation*. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12492>

Tortora, G. J., Case, C. L., Bair, W. B., Weber, D., & Funke, B. R. (2024). *Microbiology: An Introduction* (14th ed ed.). Pearson.

- Touaitia, R., Mairi, A., Ibrahim, N. A., Basher, N. S., Takfarinas, I., & Touati, A. (2025). *Staphylococcus aureus: A Review of the Pathogenesis and Virulence Mechanisms*.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics14050470>
- Vasquez, M. T., Bush, L. M., Tesini, & L, B. (2025). *Pruebas de sensibilidad o antibiogramas*. <https://www.msdmanuals.com/es/professional/enfermedades->
- Wood, J. R. (2011). *Clinopodium L. (Lamiaceae) in Bolivia*.
<https://doi.org/https://link.springer.com/article/10.1007/s12225-011-9282-z?>
- Yapuchura, R. (2010). *Estudio de los componentes antioxidantes de las hojas de muña (Minthostachys mollis (Kunth) Griseb.) E inca muña (Clinopodium bolivianum (Benth.) Kuntze)*. <https://hdl.handle.net/20.500.12996/1700>
- Zirena, L. (1945). *Satureja boliviana (Lamiaceae). Una puesta al día de "muña blanca"*.
- Zúniga, 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*. <http://hdl.handle.net/20.500.12918/6866>

ANEXOS

Anexo 1 Certificado de identificación taxonómica de *Clinopodium bolivianum*



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

- **APARTADO POSTAL**
N° 921 - Cusco - Perú
- **FAX:** 238156 - 238173 - 222512
- **RECTORADO**
Calle Tigre N° 127
Teléfonos: 222271 - 224891 - 224181 - 254398
- **CIUDAD UNIVERSITARIA**
Av. De la Cultura N° 733 - Teléfonos: 228661 - 222512 - 232370 - 232375 - 232226
- **CENTRAL TELEFÓNICA:** 232398 - 252210
243835 - 243836 - 243837 - 243838
- **LOCAL CENTRAL**
Plaza de Armas s/n
Teléfonos: 227571 - 225721 - 224015
- **MUSEO INKA**
Cuesta del Almirante N° 103 - Teléfono: 237380
- **CENTRO AGRONÓMICO K'AYRA**
San Jerónimo s/n Cusco - Teléfonos: 277145 - 277246
- **COLEGIO "FORTUNATO L. HERRERA"**
Av. De la Cultura N° 721
"Estadio Universitario" - Teléfono: 227192

HERBARIO VARGAS CUZ

CERTIFICADO DE DETERMINACIÓN TAXONÓMICA N° 09-2025-HVC-FCB-UNSAAC

La Directora del Herbario Vargas (CUZ), Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC), deja constancia que: **NOA HUASCAR BRYAN**, con código de matrícula N°174211, Bachiller de Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC), ha presentado a la Dirección del Herbario Vargas (CUZ), una muestra botánica para su determinación taxonómica (expediente N° 854338), para realizar el proyecto de tesis "**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Clinopodium bolivianum* (Benth.) Kuntze EN *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**", la que al ser diagnosticada por el Blgo. Víctor Chama Moscoso, utilizando claves dicotómicas, consulta con bibliografía especializada, y comparación con muestras del herbario, concuerdan con las siguientes especies; de acuerdo a la clasificación del Grupo del Sistema Filogenético de las Angiospermas (Angiosperm Phylogeny Group-APG IV, 2016).

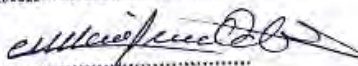
N°	FAMILIA	ESPECIE	NOMBRE LOCAL
1	Lamiaceae	<i>Clinopodium bolivianum</i> (Benth.) Kuntze	"Inca muña"

Se le expide la presente certificación a petición formal del interesado, para los fines que viera por conveniente.

Cusco, 04 de julio de 2025



Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA


 Blga. María Luisa Ochoa Cámara
 DIRECTORA DEL HERBARIO VARGAS CUZ

Anexo 2 Permiso de investigación SERFOR



Formato digitalizado por:
MALDONADO HINA Edwin FAU
2025/01/20/27 aut
Cargo: Administrador - Técnico PPA
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 15.01.2025 11:27:27 -05:00

RESOLUCIÓN ADMINISTRATIVA

Magdalena Del Mar, 15 de Enero del 2025

RA N° D000007-2025-MIDAGRI-SERFOR-ATFFS - CUSCO

VISTO:

El Informe Técnico N° D000009-2025-MIDAGRI-SERFOR-ATFFS-CUSCO de fecha 10 de enero de 2025 y el escrito ingresado con número de expediente N° 2024-0052158 de fecha 28 de octubre de 2024, presentada por el señor **BRYAN NOA HUASCAR**, identificado con DNI N° 73886728, sobre la solicitud de autorización con fines de investigación científica de flora silvestre fuera de Áreas Naturales Protegidas, como parte de la investigación titulada "*Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de Clinopodium Bolivianum (Benth) Kuntze en Staphylococcus Aureus ATCC 25923*" a colectarse en la Zona de Chukimarca en el distrito, provincia y departamento de Cusco; y todo lo actuado en el expediente administrativo; y;

CONSIDERANDO:

Que, el artículo 65° 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



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, 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 escrito ingresado con número de expediente N° 2024-0052158 de fecha 28 de octubre de 2024, **BRYAN NOA HUASCAR**, identificado con DNI N° 73886728, en su calidad de investigador principal, solicitó autorización con fines de investigación científica en flora silvestre fuera de Áreas Naturales Protegidas para la investigación titulada: "*Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de Clinopodium Bolivianum (Benth) Kuntze en Staphylococcus Aureus ATCC 25923*", a colectarse en la Zona de Chukimarca en el distrito, provincia y departamento de Cusco; por un periodo de doce (12) meses.

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:

- This report was prepared by the author under contract to the U.S. Environmental Protection Agency. It has been reviewed by EPA personnel and approved for publication as part of the official business of the agency. It does not necessarily represent the views of the individual contributors or the official position of the U.S. Environmental Protection Agency.

Forestal y en el TUPA del SERFOR, ello en concordancia con el numeral 6.6 de los Lineamientos aprobados por Resolución de Dirección Ejecutiva N° 060-2016-SERFOR/DE, que establece: 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 el Administrado reúne las condiciones mínimas para el otorgamiento de la autorización solicitada y que cumple con los requisitos establecidos en el TUPA del SERFOR, 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 "*Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de Clinopodium Bolivianum (Benth) Kuntze en Staphylococcus Aureus ATCC 25923*", por el periodo de doce (12) meses, según el cronograma de Trabajo del Plan de Investigación presentado, cuya colecta de la "*Inca Muña*" de 10 Kg se realizará en el Complejo Arqueológico de Chukimarka, ubicada en el distrito, provincia Canchis y departamento de Cusco;

Que, la investigación tiene como Objetivo General el de "*Evaluar la actividad antibacteriana del aceite esencial de Clinopodium Bolivianum en Staphylococcus Aureus ATCC 25923*"; y con los siguientes objetivos específicos de "*Obtener el aceite esencia y el porcentaje de rendimiento de Clinopodium bolivianum por arrastre de vapor mediante hidrodestilación con trampa de clewenger*"; "*Determinar la composición química del aceite esencial de Clinopodium bolivianum por cromatografía de gases y espectrometría de masas*"; y "*Determinar el efecto antibacteriano del aceite esencial Clinopodium bolivianum (Benth) Kuntze sobre la cepa Staphylococcus aureus ATCC 25923 mediante pruebas de sensibilidad bacteriana (Antibiograma)*."

Que, respecto a la justificación del proyecto, el Administrado esquematiza su importancia en desarrollar nuevas alternativas terapéuticas, preferentemente de origen natural, ante el incremento de la resistencia antimicrobiana a los antibióticos convencionales; contribuir a la conservación y promoción de la medicina tradicional en el Perú; y desarrollar tratamientos efectivos para infecciones bacterianas por Staphylococcus aureus, especialmente en entornos con recursos limitados como las comunidades rurales del Cusco.

Que, en cuanto a los métodos y técnicas a utilizar, esta consiste en: **(i) Colecta de muestras**, donde señala que, las muestras de *Clinopodium bolivianum*, serán colectadas por la mañana, durante temporada de lluvias, en la zona comprendida del complejo arqueológico de Chukimarka (Cusco – Cusco), cuya determinación taxonómica serán realizadas en el Herbario Vargas CUZ, con la correspondiente selección, secado y

- 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.

El presente documento es una copia de un documento original que se encuentra en el archivo de documentos de la Oficina de Asesoría Jurídica del SERFOR, en la ciudad de Lima, Perú. El documento original es el que debe ser utilizado para fines legales. El presente documento es una copia de un documento original que se encuentra en el archivo de documentos de la Oficina de Asesoría Jurídica del SERFOR, en la ciudad de Lima, Perú. El documento original es el que debe ser utilizado para fines legales.

CHUKIMARKA

fraccionamiento. (ii) **Obtención del Aceite Esencial de *Clinopodium bolivianum***, donde se señala que para la extracción del aceite esencia se utilizará el método de destilación por arrastre de vapor modificado (Peña S & Gutierrez R, 2017). Las muestras de *Clinopodium bolivianum* serán expuestas a vapor de agua aproximadamente 3 horas. (iii) **Análisis Químico del Aceite Esencial**, donde se señala que, los componentes químicos del aceite esencia de *Clinopodium bolivianum*, serán determinados usando un cromatógrafo de gases (Agilent 6890N) acoplado a un espectrómetro de masas (Agilent Technologies 5973B). (iv) **Evaluación de actividad antibacteriana**; donde se señala que, se utilizará el método de difusión en discos, que consiste en colocar discos de papel filtro impregnados con concentraciones conocidas de diferentes antibióticos sobre la superficie de una placa de Agar Muller-Hinton, previamente inoculada con el microorganismo luego estas placas se incuban durante 18 a 24 horas a una temperatura de 35-37°C, durante este tiempo el antibiótico se dispersa radialmente desde el disco hacia el agar, disminuyendo su concentración a medida que se aleja del disco, lo que genera un gradiente de concentración y tras un periodo de incubación, los discos pueden estar rodeados por una zona donde el crecimiento bacteriano ha sido inhibido o no (Huanca Camacho, 2021). Este diámetro puede ser convertido a las categorías de sensible (S), intermedio (I) o resistente (R) (Cortes Moñiz, 2022);

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° D000009-2025-MIDAGRI-SERFOR-ATFFS-CUSCO de fecha 10 de enero de 2025, es pertinente otorgar la autorización con fines de investigación científica de flora silvestre al señor **BRYAN NOA HUASCAR**, identificado con DNI N° 73886728, como investigador principal, para la ejecución del proyecto titulado "*Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de Clinopodium Bolivianum (Benth) Kuntze en Staphylococcus Aureus ATCC 25923*";

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° D00160-2024-MIDAGRI-SERFOR-DE;

SE RESUELVE:

Artículo 1º.- Otorgar la autorización con fines de investigación científica de flora silvestre con colecta, al señor **BRYAN NOA HUASCAR**, identificado con DNI N° 73886728, para la realización de la investigación científica titulada: "*Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de Clinopodium Bolivianum (Benth) Kuntze en Staphylococcus Aureus ATCC 25923*" en la que participará como investigador principal, en virtud de las consideraciones antes expuestas, correspondiéndole el Código de Autorización N° 08-CUS-AUT-IFL-2025-001.

El presente documento es válido en el sistema de validación de documentos de la Dirección Ejecutiva del Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre (SERFOR) a través del portal de validación de documentos en línea: <https://sgd.serfor.gob.pe/validarDocumento/>.
Código de validación: QM1UZW01

Artículo 2°. - El desarrollo de la investigación científica autorizada se circunscribe a los alrededores de la Zona de Chukimarca en el distrito, 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 las localidades señaladas en el artículo anterior, fuera de Áreas Naturales Protegidas y por el periodo 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 periodo comprendido de doce (12) 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° DNI	PARTICIPACIÓN EN LA INVESTIGACIÓN
1	BRYAN NOA HUASCAR	DNI	73886728	Investigador principal

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

- No extraer especímenes, ni muestras biológicas de flora silvestre no autorizada, no ceder los mismos a terceras personas, ni utilizarlos para fines distintos a lo autorizado.
- No contactar ni ingresar a los territorios comunales sin contar con la autorización de las autoridades comunales correspondientes.
- Retirar todo el material empleado para la ejecución del presente estudio una vez terminado el trabajo de campo y levantamiento de información biológica.
- 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.
- 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.
- 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 slides que pueda ser utilizadas para difusión. Asimismo, entregar una (01) copia de las publicaciones producto de la investigación realizada en formato impreso y digital.
- 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

El presente documento es una copia impresa de la versión digitalizada de la Resolución de la ATFFS Cusco, emitida el 20 de mayo de 2024, en el marco del proceso de autorización de investigación científica en la zona de Chukimarca, distrito de Chukimarca, provincia de Cusco, departamento de Cusco. La versión digitalizada de este documento se encuentra disponible en el portal de la ATFFS Cusco, en la siguiente dirección: <https://app.serfor.gob.pe/validador/validacion/>. Código QR: 0MAUZWBQ

- (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 la 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 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.

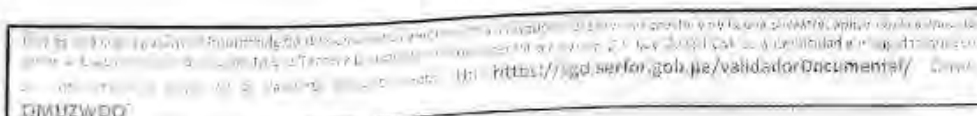
Artículo 12°.- Notificar la presente Resolución y el Informe Técnico N° D000009-2025-MIDAGRI-SERFOR-ATFFS-CUSCO de fecha 10 de enero de 2025, al señor **BRYAN NOA HUASCAR**, para su conocimiento y fines.

Artículo 13°. - Remitir la presente resolución y el Informe Técnico N° D000009-2025-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
EDWIN MALDONADO NINA
 ADMINISTRADOR TECNICO
 ATFFS - CUSCO





Technical Data

Mannitol Salt Agar

M1118

Intended Use:

Recommended for the isolation of pathogenic *Staphylococci* from clinical and non-clinical samples.

Composition**

Ingredients	g/L
Proteose peptone	10.000
HM peptone B #	1.000
Sodium chloride	75.000
D-Mannitol	10.000
Phenol red	0.025
Agar	15.000
Final pH (at 25°C)	7.4±0.2

**Formula adjusted, standardized to suit performance parameters

- Equivalent to Beef extract

Directions

Suspend 111.02 grams in 1000 ml purified / distilled water. Heat to boiling to dissolve the medium completely. Sterilize by autoclaving at 15 lbs pressure (121°C) for 15 minutes. Cool to 45-50°C. If desired, add 5% w/v Egg Yolk Emulsion (FD045). Mix well and pour into sterile Petri plates.

Note : This product contains 7.5% Sodium chloride as one of its ingredients. On repeated exposure to air and absorption moisture sodium chloride has tendency to form lumps, therefore we strongly recommend storage in tightly closed containers in dry place away from bright light.

Principle And Interpretation

Staphylococci are widespread in nature, although they are mainly found on the skin, skin glands and mucous membranes of mammals and birds. The coagulase-positive species i.e. *Staphylococcus aureus* is well documented as a human opportunistic pathogen. The ability to clot plasma continues to be the most widely used and accepted criterion for the identification of pathogenic staphylococci associated with acute infections (1). *Staphylococci* have the unique ability of growing on a high salt containing media (2). Isolation of coagulase-positive staphylococci on Phenol Red Mannitol Agar supplemented with 7.5% NaCl was studied by Chapman (3). The resulting Mannitol Salt Agar Base is recommended for the isolation of coagulase-positive *Staphylococci* from cosmetics, milk, food and other specimens (1, 4,5,6,7). The additional property of lipase activity of *Staphylococcus aureus* can be detected by the addition of the Egg Yolk Emulsion (FD045). The lipase activity can be visualized as yellow opaque zones around the colonies (8). HM peptone B and proteose peptone supply essential growth factors and trace nutrients to the growing bacteria. Sodium chloride serves as an inhibitory agent against bacteria other than staphylococci. Mannitol is the fermentable carbohydrate, fermentation of which leads to acid production, detected by phenol red indicator.

S.aureus ferment mannitol and produce yellow coloured colonies surrounded by yellow zones. Coagulase-negative strains of *S.aureus* are usually mannitol non-fermenters and therefore produce pink to red colonies surrounded by red-purple zones. Presumptive coagulase-positive yellow colonies of *S. aureus* should be confirmed by performing the coagulase test [tube or slide] (1). Lipase activity of *S.aureus* can be detected by supplementing the medium with egg yolk emulsion.

A possible *S.aureus* must be confirmed by the coagulase test. Also the organism should be subcultured to a less inhibitory medium not containing excess salt to avoid the possible interference of salt with coagulase testing or other diagnostic tests (e.g. Nutrient Broth) (M002) (9). Few strains of *S.aureus* may exhibit delayed mannitol fermentation. Negative results should therefore be re-incubated for an additional 24 hours before being discarded (9).

Type of specimen

Clinical samples: pus, urine, etc.; Food and dairy samples.

Specimen Collection and Handling

For food and dairy samples, follow appropriate techniques for sample collection and processing as per guidelines (6,10,11). For clinical samples follow appropriate techniques for handling specimens as per established guidelines (12,13). After use, contaminated materials must be sterilized by autoclaving before discarding.

Anexo 4 Ficha técnica del caldo BHI (brain heart infusion) para la conservación de bacterias



Liofilchem® - Brain Heart Infusion Broth - Rev. A / 15.05.2020

Instructions For Use
ENGLISH

Brain Heart Infusion Broth

Liquid medium for the cultivation of various fastidious organisms and detection of staphylococci, according to ISO 6888.

DESCRIPTION

Brain Heart Infusion Broth is a liquid medium used for the cultivation of fastidious and nonfastidious microorganisms, including aerobic and anaerobic bacteria, from clinical specimens, food and environmental samples.

This medium is especially suited for the cultivation of coagulase-positive staphylococci for the plasma coagulase test according to ISO 6888.

Brain Heart Infusion Broth is recommended by the APHA for examination of water and wastewater and by the CLSI for preparing inocula used in antimicrobial susceptibility tests.

TYPICAL FORMULA	(g/l)
Enzymatic Digest of Animal Tissues	10.0
Dehydrated Calf Brain Infusion	12.5
Dehydrated Beef Heart Infusion	5.0
Glucose	2.0
Sodium Chloride	5.0
Disodium Hydrogen Phosphate, Anhydrous	2.5
Final pH 7.4 ± 0.2 at 25°C	

METHOD PRINCIPLE

Enzymatic digest of animal tissues and brain-heart infusion provide amino acids, nitrogen, carbon, vitamins and minerals for organisms growth. Glucose is the carbohydrate source. Sodium chloride maintains the osmotic balance of the medium. Disodium phosphate is the buffering agent.

PREPARATION

Dehydrated medium Suspend 37 g of the powder in 1 liter of distilled or deionized water. Mix well. Heat to boil shaking frequently until completely dissolved. Distribute into final containers. Sterilize in autoclave at 121°C for 15 minutes.

TEST PROCEDURE

If material is being cultured directly from a swab, insert the swab into the broth after inoculation of plated media. For liquid specimens, transfer a loopful of the specimen into the broth medium using a sterile loop or aseptically pipette the specimen onto plated medium and into the broth. Examine for growth after 24-72 hours of incubation.

NB. It is recommended that liquid media for anaerobic incubation should be reduced prior to inoculation by placing tubes (with loosened caps) under anaerobic conditions for 18-24 hours. Alternatively, the media may be reduced by bringing the media up to 100°C in a boiling waterbath. Loosen screw caps slightly before heating, and tighten during cooling to room temperature.

To perform plasma coagulase tests, according to ISO 6888, inoculate tubes of Brain Heart Infusion Broth with selected colony from Baird Parker Agar plates (ref. 10020). Incubate at 37 ± 1°C for 24 ± 2 hours. Add 0.1 ml of each culture to 0.3 ml of the rabbit plasma. Examine after 4-6 hours incubation at 37°C for clotting of the plasma.

INTERPRETING RESULTS

Turbidity indicates microbial growth.

The coagulase test is considered positive if the clot volume is more than half of the original liquid volume.

APPEARANCE

Dehydrated medium: free-flowing, homogeneous, light beige.

Prepared medium: clear, amber.

STORAGE

The powder is very hygroscopic, store the powder at 10-30°C, in a dry environment, in its original container tightly closed. Store bottles and tubes at 10-25°C away from light. Do not use the product beyond its expiry date on the label or if product shows any evidence of contamination or any sign of deterioration.

Anexo 5 Ficha técnica de agar de Mueller Hinton para la replicación de bacterias

© Liofilchem® - Mueller Hinton II Agar - Rev.01/20.07.2024



Mueller Hinton II Agar

Medium for antimicrobial susceptibility testing by the disc diffusion technique, according to CLSI and EUCAST.

Instructions For Use
ENGLISH

INTENDED PURPOSE

Medium recommended for antimicrobial susceptibility testing of common, rapidly growing aerobic microorganisms by the disc diffusion technique (Kirby-Bauer method), as standardized by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

DESCRIPTION

With increasing antimicrobial resistance, AST of aerobic bacteria becomes more relevant. Mueller Hinton II Agar permits excellent growth of most aerobic bacteria. This medium is formulated to have low levels of thymine and thymidine and is adjusted to the calcium and magnesium ions concentrations. It conforms to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) recommendations.

TYPICAL FORMULA*

	(g/l)
Beef Extract	2.0
Acid Hydrolysate of Casein	17.5
Starch	1.5
Agar	17.0
Final pH 7.3 ± 0.2 at 25°C	

*Adjusted and/or supplemented as required with appropriate salts to provide the following concentrations of ions and meet performance specifications according to ISO/TS 16782: 20-25 mg/l of calcium, 10-12.5 mg/l of magnesium, manganese and zinc below 8 mg/l and 3 mg/l, respectively.

METHOD PRINCIPLE

Acid hydrolysate of casein and beef extract provide amino acids, nitrogen, minerals, vitamins, carbon and other nutrients which support the growth of microorganisms. Starch acts as a protective colloid against toxic molecules which can be present in the medium. Hydrolysis of starch during autoclaving supplies a little amount of glucose, which is a source of energy. Agar is the solidifying agent.

The Kirby-Bauer method is based on the diffusion, through the agar, of the antimicrobial substance which soaks the paper disc. Each disc has a single concentration of the antimicrobial agent that inhibits the microorganism growth showing a halo around the disc. The diameter of the inhibiting halo is correlated with the Minimal Inhibitory Concentration (MIC).

PREPARATION

Dehydrated medium

Suspend 38.0 g of the powder in 1 liter of distilled or deionized water. Mix well. Heat until completely dissolved. Sterilize in autoclave at 121°C for 15 minutes. Cool to 45-50°C. Aseptically dispense in Petri dishes.

Medium in bottles

Melt the content of the tube/bottle in a water bath at 100°C (loosing the cap partially removed) until completely dissolved. Then screw the cap and check the homogeneity of the dissolved medium, if it is the case turning the bottle upside down. Cool at 45-50°C, mix well avoiding foam formation and aseptically distribute into Petri dishes.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Standard microbiological supplies and equipment such as: Autoclave, test tubes, inoculating loops, swabs, incubator, quality control organisms.

SPECIMENS

Mueller Hinton II Agar is used for AST of pure cultures that have been isolated from clinical specimens. Specimens should be obtained before antimicrobial therapy (where possible) and promptly delivered to the laboratory for examination. Clinical samples are not inoculated directly onto MH II Agar.

Anexo 6 Certificado de disco de sensibilidad de Fosfomicina trometanol 200 ug

ThermoFisher
SCIENTIFIC



Page 1 of 1

CERTIFICATE OF ANALYSIS

PRODUCT CT0758B
FOT200 FOSFOMYCIN TROMETAMOL

LOT NUMBER 6304876

EXPIRY DATE 2027.09.01

DATE OF MANUFACTURE 2025.09.01

Delivery/Customer information

Date Printed

2025.09.10

Delivery No.

Customer

Customer Order Number

Microbiological Performance

Assay (mcg/disc) 213.86

Tested in accordance with current CLSI methodology

	Zone Size (mm)	Limits (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC®25923	27	25 - 33

Tested in accordance with current EUCAST methodology

PLEASE NOTE EUCAST have the following guidelines for reading the zone:

Ignore isolated colonies within the inhibition zone and read the outer zone edge

<i>Escherichia coli</i> ATCC®25922	32	26 - 34
------------------------------------	----	---------

The above have been tested in our Product Performance Laboratory using conventional procedures and control ATCC and NCTC cultures, where appropriate, and have met the specified test parameters. Additional challenging strains may also be employed.

The accuracy of the information provided in this certificate of analysis / conformity is considered reliable. However, it is important to note that (i) the information is only applicable, and (ii) the product is only approved, for the product's intended use as specified on the label, specification, and website. No warranty is hereby implied. This certificate may only be reproduced in its entirety and cannot be replicated partially or in any altered form.

Lot Accepted. 2025.09.10

This certificate is produced electronically and valid without a signature.

ATCC is a registered trade mark of the American Type Culture Collection.

NCTC and National Collection of Type Cultures are registered trade marks of the Health Protection Agency.

Anexo 7 Certificado de la cepa Staphylococcus aureus ATCC 25923



Certificate of Analysis

Thermo Fisher Scientific

Microbiology
12076 South Fr Trail Drive
12210 South Fr Trail Drive
Lenexa, KS 66215
800-255-6730
800-447-5761 fax
www.thermofisher.com

Product Name: S. aureus ATCC 25923 PK/5

Lot Number: 662143

Product Number: R4607010

Expiration Date: 2024-10-31
(YYYY-MM-DD)

This product has been manufactured, processed and packaged in accordance with Quality Systems Regulation, 21 CFR Part 820. Representative samples were tested per Remel Inc., a part of Thermo Fisher Scientific Quality Control specifications and were found to meet performance criteria for this product.

Purity:

Standardized aliquots of the rehydrated product are inoculated onto nonselective media and examined for pure growth following the appropriate incubation. Selective and Differential media are also tested where applicable.

Viability And Quantification:

Each organism is recovered from the preserved state within the required time frame and at an acceptable level. Passage number is stated as the current preserved state.

Macroscopic And Microscopic Morphology:

Colony morphology is consistent with documented referenced description.
Traditional staining is performed.

Characterization:

Organism exhibits characteristic biochemical, enzymatic, genotypical and/or biochemical reactions. Automated and/or conventional testing was performed and results were within established limits. Antimicrobial testing performed where applicable. Results within expected ranges.

CFU/bog: >10(4)

Passage: 3

Gram Reaction: Gram Positive Cocci

Identification Profile: MicroSEQ® or Vitek® 2

Appearance: Preserved Gel Matrix suspended in inoculating loop

pH: N/A

Anexo 8 Certificado de cromatografía de gases del aceite esencial de *Clinopodium bolivianum*



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
FACULTAD DE CIENCIAS
 LABORATORIO DE CROMATOGRAFIA Y ESPECTROMETRIA – Pabellón de Control de Calidad
 AV. De la Cultura 733 CUSCO-PERÚ Contacto 973868855

RESULTADOS

Cusco, 16 de Octubre del 2025

Solicitante : Bryan Noa Huascar
 Tipo de Análisis : Compuestos orgánicos en Aceite Esencial
 Método : Cromatografía de Gases GC-MSD.
 Muestra : 1 frascos de vidrio denominado Aceite Esencial de Muña
 Fecha de Ingreso : 07/10/25

Pico	Tiempo min	Compuestos orgánicos volátiles (VOC) Librería Nist 11	CAS	Qual	Contenido Relativo %
1	6.83	o-Cymene	000527-84-4	97	0.22
2	7.04	Eucalyptol	000470-82-6	99	0.24
3	8.00	.gamma.-Terpinene	000099-85-4	92	0.15
4	8.90	Linalol	000078-70-6	96	4.27
5	9.19	1-Octen-3-yl-acetate	002442-10-6	74	0.11
6	10.55	Menthone	000089-80-5	98	10.24
7	10.93	l-Menthone	014073-97-3	98	21.44
8	11.25	isopulegone	029606-79-9	83	10.96
9	11.64	.alpha.-Terpineol	000098-55-5	87	0.77
10	13.22	Pulegone	015932-80-6	98	21.65
11	13.60	Piperitone	000089-81-6	96	2.73
12	14.81	Thymol	000089-83-8	95	15.32
13	15.04	3-Methyl-4-isopropylphenol	003228-02-2	95	0.80
14	16.27	2-Methylenebornane	027538-47-2	76	2.17
15	17.45	Methyl cinnamate	000103-26-4	96	0.49
16	18.56	Caryophyllene	000087-44-5	99	0.45
17	19.05	Naphthalene, decahydro-2,6-dimethyl-	001618-22-0	53	1.30
18	21.51	(+)-delta-Cadinene	000483-76-1	95	0.47
19	23.08	Espatuleno	006750-60-3	90	1.24
20	24.78	.gamma.-Murolene	030021-74-0	97	0.66
21	25.13	Bicyclo[4.4.0]dec-1-ene, 2-isopropyl-5-methyl-9-methylene-	150320-52-8	95	0.79

TR min = Tiempo de retención en minutos

Qual = Porcentaje de coincidencia con la base de datos Nist 11

CAS = Numero para identificar la molécula

Nota: Se reporta solo la coincidencia mas del 70% con Base de datos espectrales de National Institute of Standards and Technology versión 11 (NIST v11)

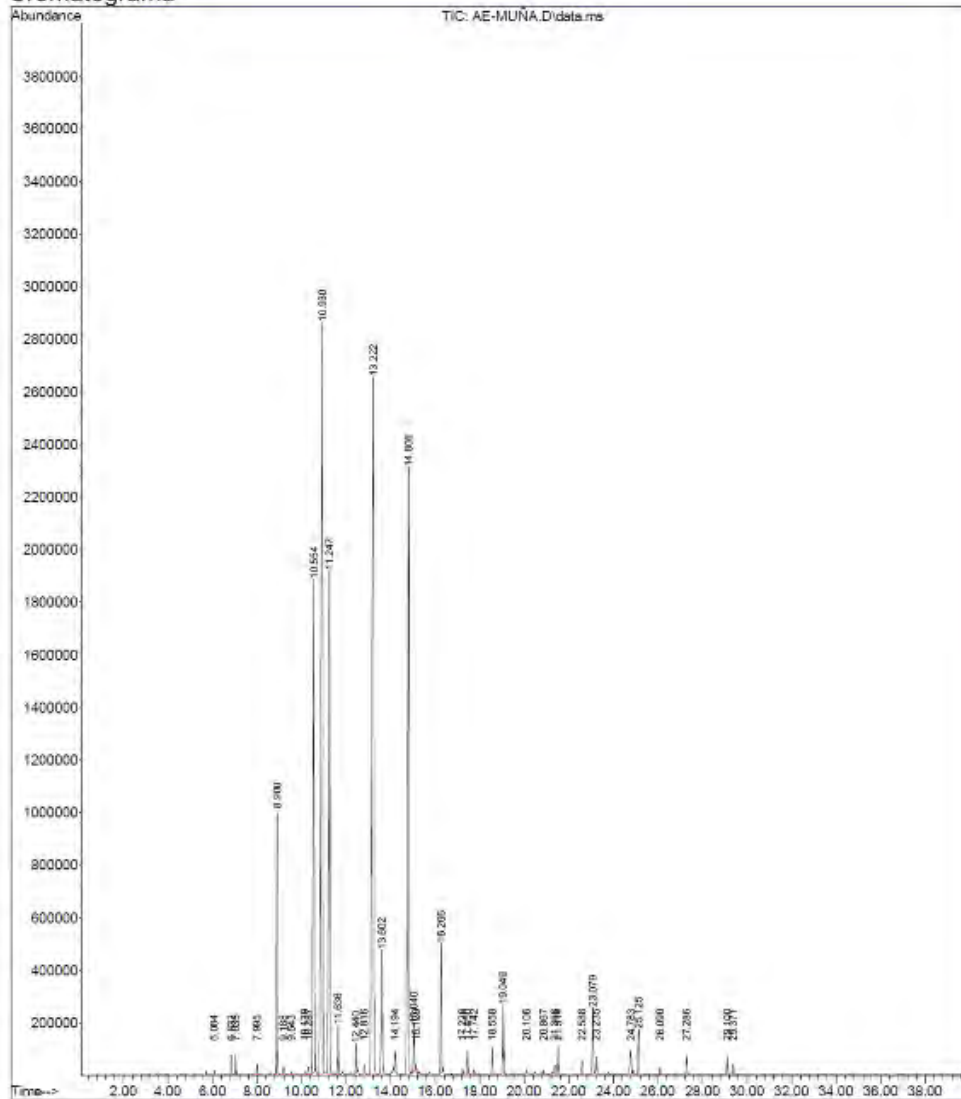


Químico, Jorge Chequenaira Pari
 Analista del Laboratorio de Cromatografía y
 Espectrometría – UNSAAC.
 CQP - 914



RESULTADOS

Cromatograma



Químico. Jorge Choquenaira Pari
Analista del Laboratorio de Cromatografía y
Espectrometría – UNSAAC.
CQP - 914



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
FACULTAD DE CIENCIAS
LABORATORIO DE CROMATOGRAFIA Y ESPECTROMETRIA – Pabellón de Control de Calidad
AV. De la Cultura 733 CUSCO-PERÚ Contacto 973868855

RESULTADOS
Condiciones de Análisis

Cromatógrafo:	Agilent 6890N
Software de Control:	Chemstation B.030
Detector de Masas:	Agilent 5975B
Energía de Ionización:	70eV
Modo de Ionización:	Impacto Electrónico (IE)
Modo de escaneo de masas:	40 a 400 uma
Retraso del disolvente:	0.0 minutos
inyector Automático:	Agilent 7683B

Columna: Agilent HP-5MS 5% Fenil Metil Siloxano 30m x 0.25id x 0.5um film

Temperatura del Horno inicial 60 °C, incremento de 4.5 °C/minuto hasta 230 °C, 2 min 230 °C

Puerto de Inyección	
Modo	: Split (con división)
Relación de Split	: 100:1
Temp. Inicial	: 200 °C
Tipo de Gas	: Helio
Flujo	: 1 mL/min
Tiempo de Análisis	: 39.78 min
Volumen de Inyección	: 0.1 uL
Muestra inyecta	: Puro

Referencia

- Pino Alea, J. A. I Curso Internacional Análisis de Aceites Esenciales Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco 2014.
- Lynam, K. 2014. Potential Allergens in Aromatherapy Oils by GC/MS Using an Agilent J&W DB-XLB Capillary Column Agilent Technologies, Inc. 2850 Centerville Road Wilmington, DE 19808 USA 5990-5293EN




Químico. Jorge Choquenaira Pari
Analista del Laboratorio de Cromatografía y
Espectrometría – UNSAAC.
CQP - 914

Anexo 9. Recolección de las muestras en estudio



Fotografía 1: Lugar de colecta de *Clinopodium bolivianum* (Benth.) Kuntze, ubicado en sector del templo de la Luna, distrito, provincia y departamento del Cusco.



Fotografía 2: Planta de *Clinopodium bolivianum* en el lugar de colecta.



Fotografía 3: Colecta de la parte aérea (tallos, hojas y flores) de *Clinopodium bolivianum*.



Fotografía 4: Muestras vegetales puestas en bolsas de primer uso.

Anexo 10. Preparación del material para la extracción del aceite esencial de Clinopodium bolivianum



Fotografía 5: Separación de hojas sanas para la extracción de aceite esencial.



Fotografía 6: Pesado de la muestra en balanza analítica listo para la extracción.

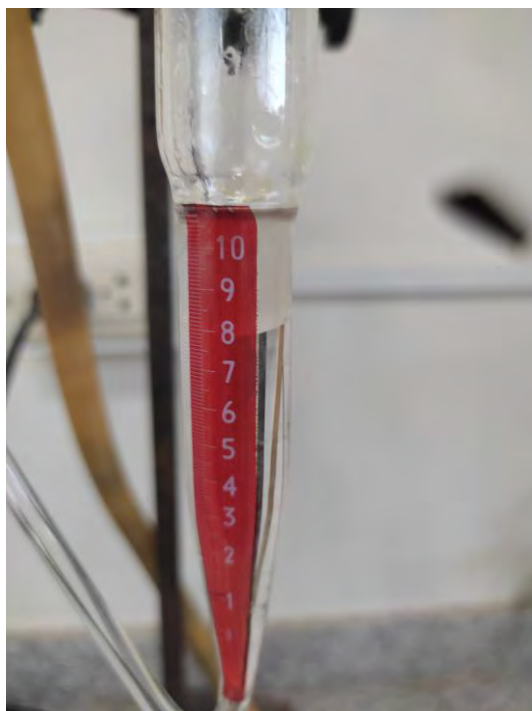


Fotografía 7: Vertido de agua destilada en el balón con muestra de *Clinopodium bolivianum*.

Anexo 11. Extracción del aceite esencial



Fotografía 8: Equipo completo de hidrodestilación con trampa de cleverger.



Fotografía 9: Aceite esencial en la trampa de cleverger.



Fotografía 10: Aceite esencial de *Clinopodium bolivianum* en frascos ámbar.



Fotografía 11: Aplicación de ácido sulfato (secante a la muestra de aceite).

Anexo 12 Preparación del material para la actividad antibacteriana del aceite esencial

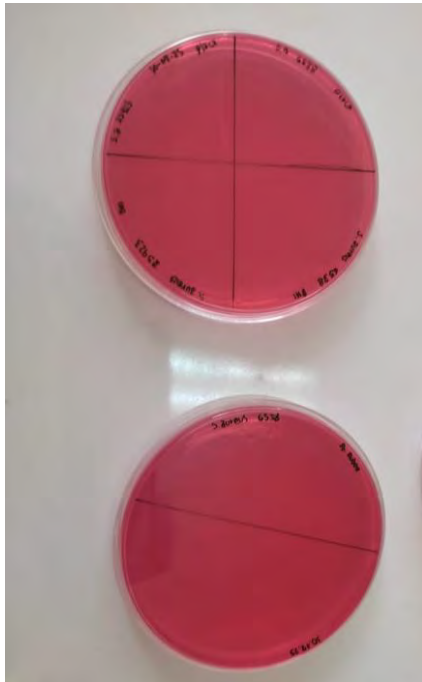


Fotografía 12: Preparación de Agar Müller Hinton para las pruebas microbiológicas.



Fotografía 13: Esterilización de materiales en autoclave.

Anexo 13 Aislamiento de Staphylococcus aureus de manitol salado



Fotografía 14: Placa con manitol salado.



Fotografía 15: Siembra de bacteria en placa Petri con agar manitol.

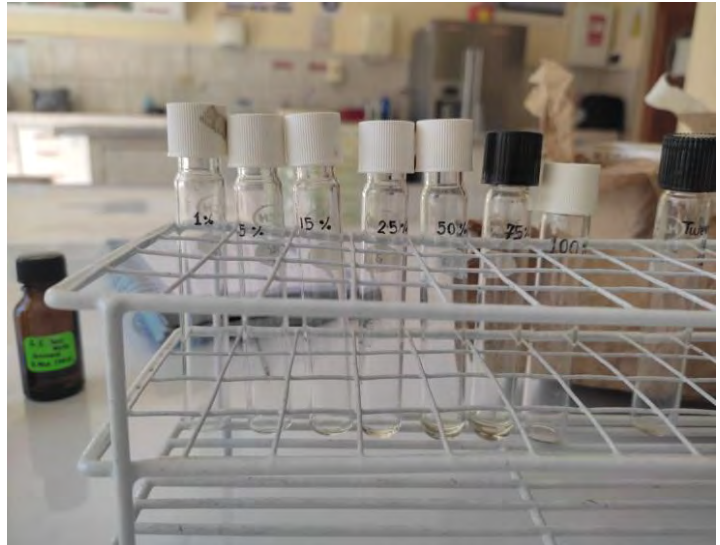


Fotografía 16: Placa con *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en agar manitol salado. Se observa un crecimiento abundante de colonias acompañado del cambio de color del medio de rojo a amarillo.

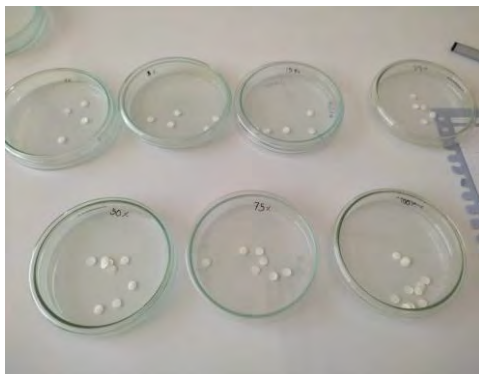
Anexo 14 Preparación de las diferentes concentraciones



Fotografía 17: Purificación del Tween 80.



Fotografía 18: Preparación de las diferentes concentraciones para el antibiograma.



Fotografía 19: Preparación de los discos de papel Whatman.



Fotografía 20: discos de sensibilidad.

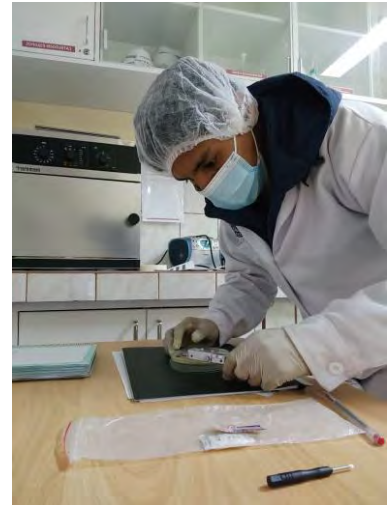


Fotografía 21: Placas Petri con Agar Müller Hinton.

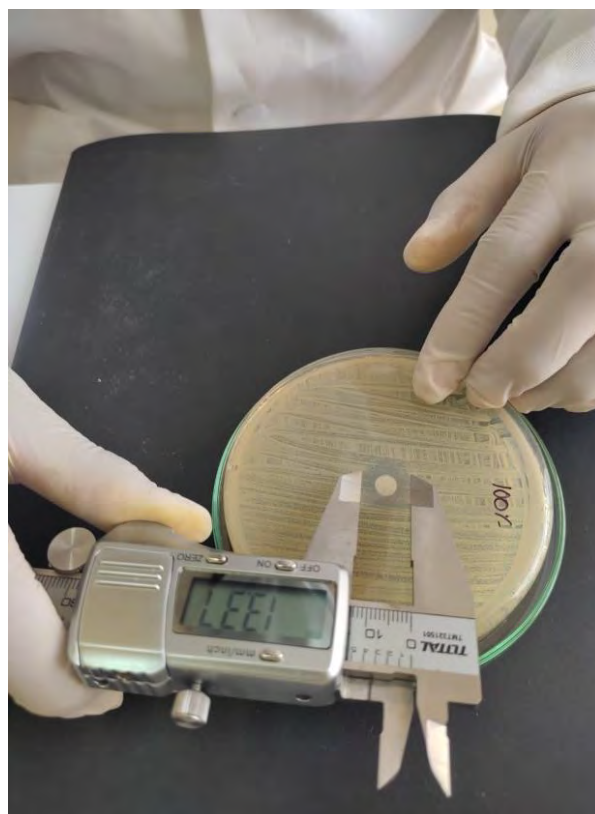
Anexo 15 Medición de los halos de inhibición



Fotografía 22: Placas Petri con halos del aceite esencial.



Fotografía 23: Medición de los halos de inhibición.



Fotografía 24: Medición con vernier digital