



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DE
COMPUESTOS VOLÁTILES Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA
DEL ACEITE ESENCIAL DE *Tanacetum vulgare* L FRENTE A
Escherichia coli, *Staphylococcus aureus* Y *Candida albicans*
MULTIDROGORESISTENTES**

TESIS

PRESENTADA POR:

Bach. FANNY MAGALI FLORES BALDA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA: MICROBIOLOGÍA Y
LABORATORIO CLÍNICO**

PUNO – PERÚ

2024



DEDICATORIA

A Dios por bendecirme, acompañarme y guiarme en el transcurso de cada una de las etapas, por ser un gran apoyo y fortaleza en los momentos de flaqueza.

A mi estimado padre Alcides, mi amor más grande, el ser más maravilloso que Dios me puso en la tierra, quien me brindo su apoyo plenamente en todas las etapas de mi formación académica, por enseñarme a luchar por cada uno de mis propósitos, por ser mi guía, soporte y quien me ha querido de manera incondicional. Gracias papá.

A mis hermanos por su respaldo y cariño. A todos mis abuelos que se encuentran en la gloria de Dios, ángeles que me cuidan.

Fanny Magali Flores Balda



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por ser pilar fundamental en cada etapa de mi vida.

A la primera casa de Estudio Superior “Universidad Nacional del Altiplano – Puno” en especial a la Facultad de Ciencias Biológicas y a todos los docentes que contribuyeron en mi plena formación académica y profesional.

A mi apreciado padre Alcides mi eterna gratitud, a mis hermanos por brindarme ánimos y apoyo.

A mi estimado asesor MSc. Juan Pablo Huarachi Valencia, por su paciencia, apoyo constante, por las sugerencias y consejos en todo el proceso de elaboración del presente proyecto.

A los distinguidos miembros del jurado, Dra. Roxana del Carmen Medina Rojas, Dra. Maria Trinidad Romero Torres y Mg. Diana Elizabeth Cavero Zegarra. Por sus recomendaciones en el proceso de revisión de este proyecto de investigación.

A mis amistades y compañeros que fueron parte de esta etapa, especialmente a Sonaly, Gladys, y Yeny, por ser un apoyo constante y absoluto, siendo compañía en momentos de flaqueza y alegrías.

Al Departamento de Patología Clínica del Hospital “Carlos Monge Medrano” de la ciudad de Juliaca, en particular al Blgo. Jhonny Rafael Coaquira Toro Jefe del área de Microbiología, por sus preciados consejos y recomendaciones durante la ejecución del proyecto.

Al personal del área de Microbiología del Hospital Regional “Honorio Delgado Espinoza” III-1 Arequipa por su valioso apoyo en el presente proyecto de tesis.

Al Químico, Jorge Choquenaira Pari, personal del Laboratorio de Cromatografía y espectrometría por su apoyo en el análisis del perfil cromatografico.

Al Blgo Mg. Leoncio Mariño Herrera, director del Herbarium Arequipense (HUSA) por su apoyo en la determinación taxonómica de la especie vegetal y sus valiosos consejos.

Al Q.F. Wilber Carlos Benito Ichocan, encargado del Laboratorio de Industrias Medicas y Farmaceuticas S.R.L. por su apoyo en el transcurso de la ejecucion de este proyecto.

Al. Lic. Alex Mario Salas Apaza, Lic. Getbert Juan Coaquira Quispe, Lic. Ronal Zapana y a todo el personal del área de laboratorio clinico del Centro de Salud I-4 Acora, mi gratitud por su apreciadas recomendaciones y apoyo.

Fanny Magali Flores Balda



ÍNDICE GENERAL

	Pág
DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTOS	
ÍNDICE GENERAL	
ÍNDICE DE FIGURAS	
ÍNDICE DE TABLAS	
ÍNDICE DE ACRÓNIMOS	
RESUMEN	12
ABSTRACT.....	13
CAPÍTULO I	
INTRODUCCIÓN	
1.1. OBJETIVO GENERAL	16
1.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	17
CAPÍTULO II	
REVISIÓN DE LITERATURA	
2.1. ANTECEDENTES	18
2.2. MARCO TEORICO	24
2.2.1. Palma real (<i>Tanacetum vulgare</i> L).....	24
2.2.2. Aceites esenciales	26
2.2.3. Resistencia antibiótica	38
2.2.4. Microorganismos	44
CAPÍTULO III	
MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1. ÁREA DE ESTUDIO.....	70



3.2. DISEÑO Y TIPO DE ESTUDIO	70
3.3. POBLACIÓN Y MUESTRA	71
3.4. METODOLOGÍA	71
3.4.1. Rendimiento de aceite esencial extraído de hojas de <i>Tanacetum vulgare</i> L por hidrodestilación.....	71
3.4.2. Caracterización de la composición fitoquímica de compuestos volátiles del aceite esencial de hojas de <i>Tanacetum vulgare</i> L.	79
3.4.3. Establecimiento de la susceptibilidad antibacteriana, concentración mínima inhibitoria y concentración mínima microbica del aceite esencial de hojas de <i>Tanacetum vulgare</i> L frente a <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Candida albicans</i> multidrogoresistentes.....	82

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RENDIMIENTO DE ACEITE ESENCIAL EXTRAÍDO DE HOJAS DE <i>Tanacetum vulgare</i> L POR HIDRODESTILACIÓN	90
4.2. COMPOSICIÓN FITOQUÍMICA DE COMPUESTOS VOLÁTILES DEL ACEITE ESENCIAL DE HOJAS DE <i>Tanacetum vulgare</i> L	92
4.3. SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA, CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA MICROBICIDA DEL ACEITE ESENCIAL DE HOJAS DE <i>Tanacetum vulgare</i> L FRENTE A <i>Escherichia coli</i>, <i>Staphylococcus aureus</i> Y <i>Candida albicans</i> MULTIDROGORESISTENTE	101
V. CONCLUSIONES	119
VI. RECOMENDACIONES	120



VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	121
ANEXOS.....	142

ÁREA: Ciencias Biomedicas

SUB LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: Diagnostico y epidemiologia

FECHA DE SUSTENTACIÓN: 25 de enero del 2024.



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Palma real (<i>Tanacetum vulgare</i> L)	25
Figura 2	Clasificación de los monoterpenos	30
Figura 3	Clasificación de los sesquiterpenos	32
Figura 4	Descripción de la técnica de hidrodestilación.....	35
Figura 5	Distintos mecanismos de multidrogoresistencia en <i>Escherichia coli</i>	52
Figura 6	Mecanismos moleculares de resistencia a antibióticos en <i>Staphylococcus aureus</i>	61
Figura 7	Mecanismos de resistencia prevalentes a los antifúngicos azoles, equinocandinas y poliénicos	67
Figura 9	Perfil cromatográfico de los componentes presentes en el aceite esencial de la hoja de <i>Tanacetum vulgare</i> L obtenido por cromatografía de gases acoplado a espectrofotometría de masas	100
Figura 10	Análisis de regresión y correlación lineal entre el crecimiento microbiano (UFC x 100/ml) de <i>Escherichia coli</i> y la concentración de aceite esencial de hojas de <i>Tanacetum vulgare</i> L.....	102
Figura 11	Análisis de regresión y correlación lineal entre el crecimiento microbiano (UFC x 100/ml) de <i>Staphylococcus aureus</i> y la concentración de aceite esencial de hojas de <i>Tanacetum vulgare</i> L	105
Figura 12	Análisis de regresión y correlación lineal entre el crecimiento microbiano (UFC x 100/ml) de <i>Candida albicans</i> y la concentración de aceite esencial de hojas de <i>Tanacetum vulgare</i> L.....	108
Figura 13	Análisis de variabilidad de Fisher y prueba de comparaciones múltiples de t Student de la susceptibilidad en <i>Escherichia coli</i> por efecto del aceite esencial de hojas de <i>Tanacetum vulgare</i> L.....	111



Figura 14	Análisis de variabilidad de Fisher y prueba de comparaciones múltiples de t Student de la susceptibilidad en <i>Staphylococcus aureus</i> por efecto del aceite esencial de hojas de <i>Tanacetum vulgare</i> L	114
Figura 15	Análisis de variabilidad de Kruskal Wallis y prueba de comparaciones múltiples de Dunn de la susceptibilidad en <i>Candida albicans</i> por efecto del aceite esencial de hojas de <i>Tanacetum vulgare</i> L.....	116



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Clasificación taxonómica de la palma real	24
Tabla 2	Aplicaciones y usos de los aceites esenciales	34
Tabla 3	Clasificación taxonómica de <i>Escherichia coli</i>	48
Tabla 4	Clasificación taxonómica de <i>Staphylococcus aureus</i>	55
Tabla 5	Clasificación taxonómica de <i>Candida albicans</i>	62
Tabla 6	Características de la recolección y secado de la palma real	75
Tabla 7	Compuestos volátiles del aceite esencial de hojas de <i>Tanacetum vulgare</i> L identificados por CG-EM.....	92
Tabla 8	Clasificación de compuestos fitoquímicos encontrados en AE de hojas de <i>Tanacetum vulgare</i> L	97



ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

°C:	Grados centígrados
AE:	Aceite esencial
ATCC :	American Type Culture Collection
<i>C. albicans</i> :	<i>Candida albicans</i>
CG-EM:	Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas
CLSI:	Comité de Laboratorios y Estándares Clínicos
CMI:	Concentración Mínima Inhibitoria
CMB:	Concentración Mínima Bactericida
CMF:	Concentración Mínima Fungicida
DCR:	Diseño Completamente Randomizado
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
<i>et al.</i> :	Y colaboradores
Kg:	Kilogramo
MDR:	Multidrogoresistente
μl/ml:	Microlitro/mililitro
MH:	Müeller Hinton
mm:	Milímetro
msnm:	Metros sobre el nivel del mar
OMS:	Organización Mundial de Salud
<i>S. aureus</i> :	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>T. vulgare</i> :	<i>Tanacetum vulgare</i>
UFC:	Unidad formadora de colonia



RESUMEN

La palma real (*Tanacetum vulgare* L, Fam. Asteraceae) constituye un recurso vegetal silvestre presente en la región con diversas propiedades etnomedicinales, como las antimicrobianas frente a infecciones. El objetivo general fue determinar el efecto antimicrobiano del aceite esencial (AE) de hojas de *Tanacetum vulgare* L frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* multidrogoresistentes, constituye un estudio de nivel explicativo, de tipo cuantitativo, prospectivo, transversal, con diseño experimental puro, en la cual se empleó especímenes de palma real recolectados de la comunidad de Ccota, distrito de Plateria (Puno) localizada a una LS 15°56'15'', LO 69°49'15''W, y a 3811 m.s.n.m., siendo la determinación taxonómica realizada en el “*Herbarium Arequipense*” de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, luego se realizó la extracción del aceite esencial por hidrodestilación, mientras que la caracterización fitoquímica del aceite esencial se desarrolló mediante Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas (CG-EM), mientras que la evaluación del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *T. vulgare* L frente a *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans* multidrogoresistentes tipificadas por el sistema Vitek 2.0, se evaluó a través de la concentración mínima inhibitoria (CMI), concentración mínima bactericida (CMB), concentración mínima fungicida (CMF) y susceptibilidad antimicrobiana (Kirby-Bauer) a 400, 200, 100, 50, 25 y 12,5 µl/ml de aceite esencial, siendo los datos procesados a través de estadísticos descriptivos, análisis de varianza y pruebas de comparación múltiple con un $\alpha = 0,05$ mediante el Programa R v 4.3.1. Como resultado se encontró que el rendimiento de aceite esencial extraído fue de 0,88%, constituido en su mayoría de compuestos volátiles de bajo peso molecular (64,7%), principalmente monoterpenos (tujona, 83%, β felandreno, 7% y β tujona, 1%), y actividad antimicrobiana a 400^a y 200^{ab} µl/ml ($p < 0,05$) con un CMI, CMB y CMF significativo ($p < 0,05$) en orden de relevancia frente a *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Escherichia coli*. Se concluye que el aceite esencial de 17 compuestos volátiles de bajo peso molecular forma un complejo activo con actividad antimicrobiana significativa potencial frente a diferentes microorganismos de relevancia en salud pública.

Palabras Clave: Aceite esencial, Antimicrobiano, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Tanacetum vulgare*.



ABSTRACT

The royal palm (*Tanacetum vulgare* L, Fam. Asteraceae) constitutes a wild plant resource present in the region with various ethnomedicinal properties, such as antimicrobial properties against infections. The general objective was to determine the antimicrobial effect of the essential oil (EO) of *Tanacetum vulgare* L leaves against multidrug-resistant *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. It constitutes an explanatory, quantitative, prospective, cross-sectional study with an experimental design. pure, in which specimens of royal palm collected from the community of Ccota, Plateria district (Puno) located at LS 15°56'15", LO 69°49'15"W, and at 3811 m.a.s.l., were used. The taxonomic determination was carried out in the "Herbarium Arequipense" of the National University of San Agustín of Arequipa, then the extraction of the essential oil was carried out by hydrodistillation, while the phytochemical characterization of the essential oil was developed by Gas Chromatography – Mass Spectrometry (GC-MS), while the evaluation of the antimicrobial effect of the essential oil of *T. vulgare* L against multidrug-resistant *E. coli*, *S. aureus* and *C. albicans* typified by the Vitek 2.0 system, was evaluated through the minimum concentration inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MCB), minimum fungicidal concentration (MCF) and antimicrobial susceptibility (Kirby-Bauer) at 400, 200, 100, 50, 25 and 12,5 µl/ml of essential oil, the data being processed through descriptive statistics, analysis of variance and multiple comparison tests with $\alpha = 0,05$ using the R Program v 4.3.1. As a result, it was found that the yield of extracted essential oil was 0,88%, consisting mostly of low molecular weight volatile compounds (64,7%), mainly monoterpenes (thujone, 83%, β phellandrene, 7% and β thujone, 1%), and antimicrobial activity at 400^a and 200^{ab} µl/ml ($p < 0,05$) with a significant MIC, MBC and MFC ($p < 0,05$) in order of relevance against *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Escherichia coli*. It is concluded that the essential oil of 17 low molecular weight volatile compounds forms an active complex with significant potential antimicrobial activity against different microorganisms of relevance to public health.

Keywords: Essential oil, Antimicrobial, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Tanacetum vulgare*.



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La conservación de la salud es un aspecto que cada vez cobra mayor importancia para gran parte de la población mundial. Sin embargo, la salud de las personas viene siendo amenazada por el surgimiento de microorganismos multidrogoresistentes causantes de infecciones, entre ellos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Es así que el tratamiento con plantas medicinales constituye una alternativa frente a los efectos adversos de los antimicrobianos de origen sintético, donde el principio activo de las plantas guarda un mejor equilibrio fisiológico con nuestro cuerpo (Torres, 2014).

Staphylococcus aureus es un coco Gram positivo causante de infecciones de la piel y ojos, intoxicación alimentaria, neumonía, meningitis, endocarditis y osteomielitis (Agurto & Cuya, 2021). Por otro lado, *Escherichia coli* enteropatógena es un bacilo Gram negativo, que en últimas décadas manifiesta cepas resistentes a diversos fármacos, por su mayor grado de patogenicidad, transmisibilidad y colonización (Paitan, 2018). Así, *Escherichia coli* diarreogénica causa 40% de decesos anualmente y *Escherichia coli* enterotoxigénica causaría alrededor de 40000 defunciones anualmente en la población infantil de países en desarrollo (Medina et al., 2015), ambos causan la gastroenteritis aguda, siendo el segundo motivo de decesos e internamientos a nivel mundial (Manar et al., 2021), siendo transmitidas por alimentos de origen láctico y alimentos no pasteurizados, carne y hortalizas semi cocidas o crudas, y por la manipulación y el almacenamiento que no cumple con las medidas sanitarias de higiene necesarias (FAO, 2011). Asimismo, *Candida albicans* es un hongo patógeno comensal oportunista causante de infecciones mucosas y sistémicas, teniendo consecuencias mortales, donde el uso



desmesurado de antifúngicos ha llevado a la aparición de cepas resistentes a fármacos (D'Enfert et al., 2021).

Frente al surgimiento de cepas multidrogoresistentes que acarrear un serio problema en salud pública, es necesario la búsqueda de novedosas soluciones, donde una de las opciones es acudir a los aceites esenciales vegetales que poseen monoterpenos y sesquiterpenos en diferentes órganos (hojas, raíces y tallo) de gran importancia farmacéutica. El Perú tiene gran biodiversidad de plantas medicinales de procedencia nativa, la que puede ser usada como medio profiláctico para conservar la salud (Lehtinen et al., 2019; Mamani, 2017).

Siendo que, en la Región Puno, crece la palma real *Tanacetum vulgare* L la cual es considerada una especie cosmopolita perteneciente a la familia de las Asteraceas, es una planta herbácea perenne, con tallos de aspecto leñoso, hojas con múltiples folíolos y bordes dentadas (pinnadas), generalmente de coloración verde oscuro, y con característico olor aromático. Asimismo, es empleada en infusiones o por consumo directo, es que esta especie altoandina puede tener una composición química diferente según zona geográfica (Acimović & Puvača, 2020; Chuctaya & Roque, 2018; Solis et al., 2017).

El presente estudio de investigación aborda la extracción del aceite esencial de la palma real *Tanacetum vulgare* L por medio del método de hidrodestilación, identificación de su composición fitoquímica mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG- EM) y el cálculo del rendimiento del aceite esencial, así como evidenciar técnicamente la actividad antimicrobiana que presenta frente a tres bacterias multidrogoresistentes, así demostrar la capacidad de sensibilidad del aceite esencial a través de la técnica de difusión en agar Kirby-Bauer.



En ese sentido, la presente investigación reporta la caracterización fitoquímica principalmente de 17 metabolitos secundarios en el aceite esencial de las hojas de *Tanacetum vulgare* L, así como el cálculo del rendimiento; En cuanto a la susceptibilidad antimicrobiana, concentración mínima inhibitoria y concentración mínima microbicida del aceite esencial de las hojas de *Tanacetum vulgare* L frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* multidrogoresistente hallando mayor susceptibilidad en *Candida albicans* seguido de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, y una buena CMI, CMB y CMF en orden de relevancia frente a *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Escherichia coli* multidrogoresistentes.

La presente investigación contribuye al mejor conocimiento científico y promover futuros trabajos de investigación, sobre la palma real *Tanacetum vulgare* L como planta medicinal con propiedades antimicrobianas y terapéuticas, las cuales podrían ser alternativas de prevención e incluso como tratamiento de las patologías más habituales causadas por *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Escherichia coli* multidrogoresistentes, previo análisis del grado de toxicidad. Así como, la importancia de la utilización de la técnica combinada CG-EM que permite la separación e identificación de mezclas, como el aceite esencial. Por lo cual, se propuso los siguientes objetivos de investigación:

1.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de hojas de *Tanacetum vulgare* L frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* multidrogoresistente.



1.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Establecer el rendimiento de aceite esencial extraído de hojas de *Tanacetum vulgare* L por hidrodestilación.
- Caracterizar la composición fitoquímica de compuestos volátiles del aceite esencial de hojas de *Tanacetum vulgare* L.
- Establecer la susceptibilidad antimicrobiana, concentración mínima inhibitoria y concentración mínima microbicida del aceite esencial de hojas de *Tanacetum vulgare* L frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* multidrogoresistente.



CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ANTECEDENTES

Mikulášová & Vaverková, (2021) (Eslovaquia) obtuvieron aceites esenciales (AE) de *Tanacetum vulgare* L. y *Salvia officinalis* L. con 16 compuestos que constituyen el 82,1 % del aceite total analizado por CG-EM con efecto antimicrobiano frente a *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* y *Bacillus subtilis* (< 0,6 %) además de actividad antifúngica (*Candida albicans*) (halo de 13-15mm).

Otro estudio, en Marruecos, indica que el AE caracterizado por CG-EM de *Rosmarinus officinalis* (β -pineno) (CMI 0,67-10,8 mg/ml, CMB 2,70-21,6 mg/ml), *Zingiber officinale* (zingibereno) (CMI 0,15-9,85 mg/ml, CMB 0,61-19,71 mg/ml), *Melaleuca alternifolia* (α careno) (CMI 0,55-17,6 mg/ml, CMB 2,21-17,6 mg/ml), *Cymbopogon winterianus* (linalol) (CMI 4,03-8,07 mg/ml), *Salvia sclarea* (linalol) (CMI 1,38-44,23 mg/ml) y *Syzygium aromaticum* (3-alilguayacol) (CMI 0,21 mg/ml, CMB 0,21 mg/ml) ejercieron actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* MRSA NCTC 12493, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* CRK ATCC 700603, *Escherichia coli* ESBL y *Enterococcus faecalis* ERV (Nait Irahah et al., 2021).

De otro lado, Korpinen et al., (2021) (Finlandia) en su estudio de *Angelica archangelica* L., *Rhododendron tomentosum*, syn. *Ledum palustre* y *Tanacetum vulgare* encontraron que los AEs y extractos supercríticos de CO₂, caracterizados mediante CG-EM, para el caso del AE de *Tanacetum vulgare* demostraron que tiene propiedades antimicrobianas contra *Staphylococcus aureus* (halo de inhibición de 7-14 mm), *Candida*



albicans (halo de inhibición <7 mm) y *Penicillium venetum* ATCC (halo de inhibición de 15 - 21 mm).

Entre las asteráceas de Venezuela, Fajardo et al. (2021) hallaron que el AE (germacreno-D, 45,80 %) de hojas de *Ageratina neriifolia* (CMI 75 µg/ml) presenta actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Asimismo, en Etiopía, Gishen et al. (2020) hallaron actividad antibacteriana de 50 µl de AE puro de *Cymbopogon citratus* (CMI 62,5 a 125 µl/ml), *Lavandula angustifolia* (CMI 62,5 a 250 µl/ml) y *Mentha piperita* (CM 62,5 a 125 µl/ml) frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

En Colombia, Cáceres et al. (2020) encontraron que los AE de *Lippia alba* (CMI₅₀ y CMB >3 mg/ml), *Cymbopogon nardus* (CMI₅₀ ~3 mg/ml y CMB >3 mg/ml), *Cymbopogon martini* (CMI₅₀ ~3 mg/ml y CMB >3 mg/ml), *Cymbopogon flexuosus* (CMI₅₀ y CMB >3 mg/ml), *flexuosus origanoides* (CMI₅₀ ~0,37-~0,75 mg/ml y CMB a 0,75-1,5 mg/ml), *Rosmarinus officinalis* (CMI₅₀ y CMB > 3 mg/ml), *Salvia officinalis* (CMI₅₀ y CMB >3 mg/ml), *Swinglea glutinosa* (CMI₅₀ y CMB >3 mg/ml), *Tagetes lucida* (CMI₅₀ ~3 mg/l y CMB >3 mg/ml), *Thymus vulgaris* (CMI₅₀ ~0,75 mg/ml y CMB 0,75 a 1,5 mg/ml), *Satureja viminea* (CMI₅₀ y CMB > 3 mg/ml), *Cananga odorata* (CMI₅₀ y CMB > 3 mg/ml), *Citrus sinensis* (CMI₅₀ y CMB > 3 mg/ml) y *Elettaria cardamomum* (CMI₅₀ y CMB > 3 mg/ml) caracterizados por CG-EM, tuvieron actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus epidermidis*.

Además, existen otros estudios que señalan efecto antimicrobiano de los AE, así en Arabia Saudí, Lagha et al. (2019) encontraron propiedades antibacterianas en el AE de



Thymus zygis (linalool, 39,7%) (CMI 0,19-0,78 mg/ml, CMB 1,56-6,25 mg/ml), *Origanum majorana* (terpinen-4-ol, 25,9%) (CMI 0,19-0,78 mg/ml, CMB 1,56-12,5 mg/ml) y *Rosmarinus officinalis* (1,8 cineol, 47,7%) (CMI 1,56-3,125 mg/ml, CMB 12,5 mg/ml), más no en *Juniperus communis* y *Zingiber officinale*, sin embargo, hallaron una alta acción inhibidora de biopelículas bacterianas que fluctuó entre 14,94% y 94,75%, siendo el AE de *Rosmarinus officinalis* el de mayor actividad seguido de *Thymus zygis* y *Origanum majorana*.

De otro lado, Aparicio et al. (2019) determinaron que el AE de *Libanothamnus neriifolius* presenta β -felandreno (29,04%) con actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* (CMI 50 μ l/ml), *Candida albicans* (CMI 700 μ l/ml) y *C. krusei* (500 μ l/ml), mientras que Ivănescu et al. (2018) (Rumania) determinaron que *Tanacetum vulgare*, *Tanacetum macrophyllum* y *Tanacetum corymbosum* tienen actividad antioxidante relacionado al contenido fenólico. También encontraron fitoesteroles comunes y muchos flavonoides, algunos reportados por primera vez como la casticina en *Tanacetum vulgare*, y la eupatilina, casticina, acacetina, quercitrina e isoquercitrina en *Tanacetum macrophyllum*, mientras que la eupatorina, apigenina y quercitrina en *Tanacetum corymbosum*; además de un efecto antimicrobiano frente a *Staphylococcus aureus* (13 a 18 mm), *Candida albicans* (9 a 12 mm), 28, *Candida parapsilosis* (9 a 12 mm) además de una fuerte actividad citotóxica frente a líneas celulares cancerosas (HeLa) y sanas (Vero).

Asimismo, Bączek et al. (2017) hallaron que el AE de *Tanacetum vulgare* (Polonia) está compuesto de hidrocarburos monoterpénicos (6,87%), monoterpenos oxigenados (84,37%), hidrocarburos sesquiterpénicos (0,42%), sesquiterpenos oxigenados (5,08%) y otros compuestos (0,51%) siendo el trans-crisantenol acetato el



principal compuesto encontrado, mostrando efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* (CMI 4 μ L/ml, CMB 8 μ L/ml) y *Escherichia coli* ATCC 25922 (CMI 8 μ l/ml, CMB >32 μ L/ml), siendo corroborado por Móricz et al. (2015) (Hungría) de que ese principio activo inhibe el crecimiento bacteriano.

Devrnja et al. (2017) (Serbia) también analizaron la composición química del AE, además del EM de diferentes partes de *Tanacetum vulgare* L. caracterizándose por un alto contenido de monoterpenos oxigenados como el acetato de trans-crisantenilo con una fuerte actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* (CMI/CMB 0.03^d/0,053^d), *Staphylococcus aureus* (CMI/CMB 0,21^d/0,85^d), *Listeria monocytogenes* (CMI/CMB 2,12^d/16,93^d) y *Pseudomonas aeruginosa* (CMI/CMB 8,47^e/16,93^f) además de efecto antimicótico frente a *Aspergillus fumigatus* (CMI/CMB 0.13^a/0,51^d), *Aspergillus versicolor* (CMI/CMB 0,11^{bc}/ 0,21^c), *Aspergillus ochraceus* (CMI/CMB 0,05^a/0,21^a), *Aspergillus niger* (CMI/CMB 0,25^d/0,51^c), *Trichoderma viride* (CMI/CMB 0,42^d/8,47^d) y *Penicillium verrucosum* (CMI/CMB 0,11^b/ 0,22^{bc}).

De otro lado, Coté et al. (2017) (Canadá) evaluaron las propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antibacterianas y citotóxicas de *Tanacetum vulgare*, para lo cual haciendo uso de la técnica GC-FID encontraron alcanfor, borneol y 1,8-cineol, presentando el α -humuleno actividad antiinflamatoria, mientras que la actividad antioxidante la proporcionó el α -pineno y el óxido de cariofileno, siendo el alcanfor y óxido de cariofileno responsables de la actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

De otro lado, en España, Clemente et al. (2016) encontraron un CMI de 12,5 a 400 μ g/ml y una CMB de 12,5 a >1600 μ g/ml para el AE de *Sinapis alba* (alil isotiocianato 90-95%) y *Cinnamomum zeylanicum* (extraído de corteza fortificado con



cinnamaldehído) frente a *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pectobacterium carotovorum*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* y *Staphylococcus aureus*.

Asimismo, en Rumania, Mureșan et al. (2015) encontraron que el extracto hidroalcohólico de flores de *Tanacetum vulgare* inhibe principalmente bacterias Gram positivas, seguido de Gram negativas y *Candida albicans*. También se menciona que si bien la composición química del AE es casi igual entre hojas e inflorescencias, sin embargo, el 1,8 cineol tiene mayor concentración en hojas, existiendo además algunas diferencias en la composición química según área geográfica (Aćimović & Puvača, 2020).

Además, Mureșan, (2015) (Rumania) demostró actividad antimicrobiana de los extractos y AE de *Tanacetum vulgare* L. silvestre sobre *Staphylococcus aureus* (12–16 mm) y *Bacillus subtilis* (11–12 mm) presentando actividad moderada y baja actividad sobre *Escherichia coli* (7-8mm) y *Pseudomonas aeruginosa* (7 – 6 mm).

Ya en Turquía, Özek et al. (2007) muestran que el AE hidrodestilado de partes aéreas de *Tanacetum cadmeum* (Boiss.) mediante métodos CG y CG/EM presentan 93 compuestos, entre ellos 1,8-cineol (18,9 %), p-cimeno (15,7 %), terpinen-4-ol (14,8 %), borneol (9,8 %) y γ -terpineno (3,5 %), con actividad antimicrobiana significativa frente *Staphylococcus epidermidis* (62,5 ug/mL) y efecto antimicótico frente a *Candida albicans* (125 μ g/ml).

A nivel nacional, Cucho et al. (2021) encontraron actividad antimicrobiana para los AE de hojas de *Croton* (Jaén, Cajamarca) como son *Croton adipatus* (β -mirceno, 18,34%), *Croton thurifer* (Monoterpeno C₁₀H₁₆, 22,38%) y *Croton collinus* (β -



cariofileno,) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (CMI 72 a 286,4 µg/ml), *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (CMI 296,1 a > 1000 µg/ml), *Escherichia coli* ATCC 25922 (CMI > 1000 µg/ml), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (CMI > 1000 µg/ml) y *Candida albicans* (CMI 576,2 a > 1000 µg/ml).

Asimismo, Roumy et al. (2020) señalan que de 59 plantas amazónicas (Loreto), 12 (*Aspidosperma excelsum*, *Brosimum acutifolium*, *Copaifera paupera*, *Erythrina amazonica*, *Hura crepitans*, *Myrciaria dubia*, *Ocotea aciphylla*, *Persea americana*, *Spondias mombin*, *Swartzia polyphylla*, *Viola pavonis* y *Vismia macrophylla*) tuvieron un CMI $\leq 0,15$ mg/ml frente a alguno de los 36 microorganismos evaluados (Gram positivos, Gram negativos y hongos).

Mientras tanto, Solís et al. (2019) (Cusco) hallaron 115 compuestos en el AE de hojas de *Ageratina pentlandiana* el cual tuvo efecto sobre *Staphylococcus aureus* (CMI y CMB ~11,9 µl/ml), *Bacillus subtilis* (CMI y CMB ~22,7 µl/ml), *Escherichia coli* (CMI ~57,7 µl/ml y CMB ~64,8 µl/ml) y *Salmonella tiphymurium* (CMI ~41,6 y CMB ~50,0 µl/ml).

Y a nivel regional, Mamani (2022) encontró que el AE de *Satureja boliviana* obtenida con un rendimiento de 0,82 % y 0,60 %, para la forma fresca y seca respectivamente, mostraron actividad antibacteriana significativa frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, pero sin significancia a nivel de interacción entre tipo de AE y dosis. De otro lado, Huayllapuma (2022), encontró que la CMI del AE frente a *Escherichia coli* fue de 1,0% y para *Staphylococcus aureus* de 0.5% ($p > 0.05$). También, Huaracha (2019) encontró un CMI adecuado al 100% para *Cinnamomum zeylanicum* frente a *Candida albicans*.



2.2. MARCO TEORICO

2.2.1. Palma real (*Tanacetum vulgare* L)

2.2.1.1. Clasificación taxonómica

Según Chávez & Gutiérrez (2013) *Tanacetum vulgare* fue taxonomizada en el Museo de Historia Natural del Perú, en base a estudios iniciales de Arthur Cronquist en 1981, siendo su clasificación sistemática la siguiente:

Tabla 1

Clasificación taxonómica de la Palma real

Categoría taxonómica	Descripción
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsidae
Subclase	Asteridae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Subfamilia	Asteroideae
Genero	Tanacetum
Especie	<i>Tanacetum vulgare</i> L

Fuente: Constancia N° 01-2022-HUSA (Anexo K)

2.2.1.2. Descripción botánica

Es una planta herbácea perenne, ya que presenta tallos leñosos, su estructura es muy robusta, posee un tallo central rígido con longitud de entre 60 a 90 cm de altura. Las hojas tienen múltiples folíolos (pinnadas), de bordes dentados profundos con dimensiones de 10 x 20 cm formado por 4 a 10 lóbulos con algo de pilosidad, siendo su coloración por lo general un verde oscuro, con característico olor aromático. La estructura floral es una inflorescencia de tipo de corimbo, formado por pequeñas flores de color amarillo, principalmente en estación de verano. El fruto producido

es un aquenio de 1.2 a 1.8 mm. La raíz es un rizoma de 10 mm de diámetro, con disposición horizontal, ramificado con estolones, por lo que abarca un área considerable de varios metros cuadrados (Aćimović & Puvača, 2020).

Figura 1

Palma real (Tanacetum vulgare L)



Fuente: Banco de imágenes

2.2.1.3. Distribución geográfica

Los estudios biogeográficos indican que *Tanacetum vulgare L* se distribuye de preferencia en zonas de clima templado y frío en los continentes de Asia y Europa, además se reporta que fue introducido en los continentes de Australia, Nueva Zelanda y América, siendo su hábitat principal las zonas montañosas hasta el punto que en España se ha llegado a cultivar por sus propiedades medicinales (Dasilveira, 2008).

Actualmente es una especie cosmopolita, especialmente se verifica su presencia en el continente europeo, Norteamérica y Sudamérica. En Perú, por ejemplo, se reporta su presencia en el distrito de Tamburco (Abancay, Apurímac), colectado a 2581 msnm (Chuctaya & Roque, 2018).



2.2.1.4. Usos medicinales

Se ha utilizado de manera ancestral en infusiones fundamentalmente de hojas, raíces y flores, con fines antiparasitarios, para lo cual se ingiere una infusión de flores, para el tratamiento de vermes y helmintos, para flujo menstrual ausente, dolor menstrual y para tratar cólicos intestinales, además por su propiedad antiespasmódica es empleado frente a dolores migrañosos (infusión y tintura), reumatismo (aplicación tópica), y en lo que respecta al aceite esencial, es utilizada como repelente contra insectos debido a las sustancias volátiles presentes (Solis et al. 2017).

2.2.2. Aceites esenciales

2.2.2.1. Descripción

Son un conjunto de sustancias líquidas y volátiles, obtenida de las plantas por diferentes métodos y procedimientos, la industria de los cosméticos lo utiliza para formular perfumes y sustancias aromatizantes, la industria de los alimentos la emplea como saborizantes, y la medicina los usa para tratamientos complementarios a los tradicionales (López, 2004; Marqués, 2015).

Los aceites esenciales han sido utilizados desde hace más de 5000 años, en las culturas de Mesopotamia, posteriormente en India, Roma y Grecia, para inicialmente rendir culto a sus dioses y otras ceremonias,



luego con fines medicinales, diversificándose después a todos los continentes y países (Andrango, 2021).

El aceite esencial se puede obtener de las raíces, hojas, troncos o cortezas, frutos y flores. La cantidad que se obtiene está en función de cada especie y órgano. Las hierbas o arbustos tienen mayor rendimiento porque presentan estructuras en forma de glándulas secretoras de aceites. Los aceites esenciales son parte del mecanismo de defensa, que protege a la planta contra diversos agentes invasores o amenazas del entorno (Acero et al., 2019; Sena, 2015).

Los compuestos son sintetizados y segregados por determinadas estructuras histológicas especializadas, frecuentemente localizadas en la superficie de la planta como las células oleíferas, conductos o cavidades secretoras, o en pelos glandulosos, a los que se le atribuye variadas funciones en la defensa vegetal frente a insectos y herbívoros, adaptación al estrés hídrico y en la polinización, debido a que constituyen elementos de comunicación química por su volatilidad y marcado olor (Martínez, 2003).

2.2.2.2. Composición química

Los aceites esenciales son básicamente las que producen el aroma característico de las plantas, las mismas están compuestas por decenas y aun centenas de sustancias aromáticas volátiles, la mayor parte son terpenos, es decir por hidrocarburos (CH) (Cerutti & Neumayer, 2004). Son moléculas orgánicas pequeñas, cuya característica química principal es cambiar de un estado líquido a gaseoso a temperatura ambiental



(González, 2018) pudiendo tener de 1 a 1000 compuestos, así por ejemplo el aceite esencial de abedul tiene básicamente una sola sustancia (salicilato de metilo), mientras el aceite esencial del nardo contiene cientos de sustancias (Hevea, 2013).

2.2.2.3. Tipos

Los terpenos son compuestos aromáticos sintetizados en las plantas por centenares de enzimas terpenosintasas, para ello hacen uso de pequeñas unidades de isopreno, formadas por cinco carbonos estructurales (Marqués, 2015).

En base al número de carbonos se puede identificar tres grupos de terpenos: monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos, los dos primeros son de mayor importancia debido a su mayor frecuencia y cantidad, mientras que los diterpenos son más raros y están en bajas cantidades, que además de tener un elevado peso molecular tienden a no evaporarse al momento de la destilación de arrastre de vapor (Llorens, 2021; López, 2004).

2.2.2.3.1. Monoterpenos

Según Acero et al. (2019) los terpenos tienen mayor volatilidad, se hallan mayormente en flores y son repelente de insectos, siendo producto del metabolismo secundario vegetal. Está formado por 2 unidades de isopreno y de al menos un enlace doble, siendo una de las familias más grandes que tienen aceites esenciales, reportándose ~2000 variedades.



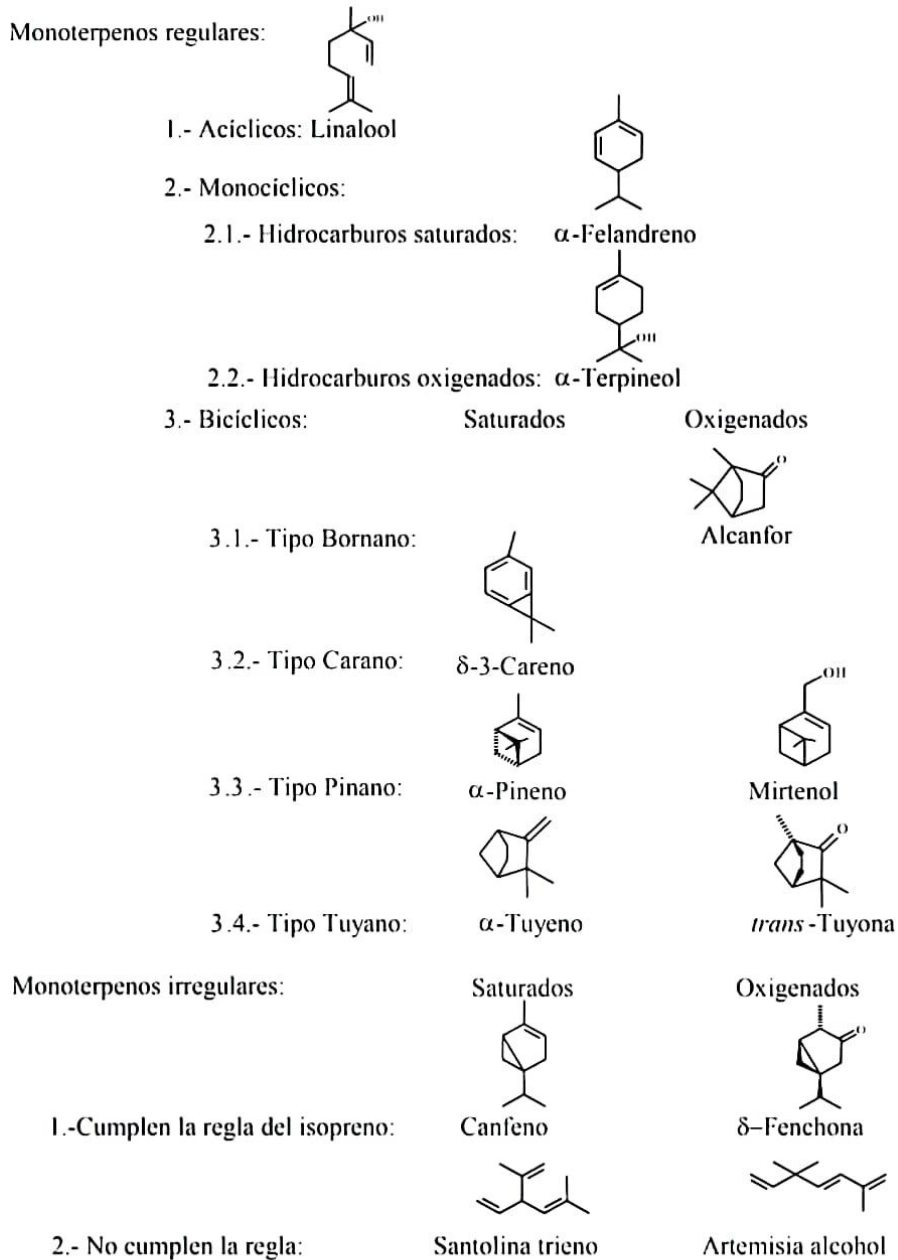
De otro lado, Solis et al. (2017) manifiestan que los monoterpenos presentes en algunas familias vegetales como Poaceae, Apiaceae, Poaceae, Asteraceae, Lamiaceae, Myristicaceae, Rubiaceae y Myrtaceae, también están en ciertos hongos y plantas no vascularizadas, pero en menor cantidad, incluso se halló en un insecto (*Necrodes surinamensis*) que produce un monoterpeno en su glándula anal para repeler a posibles predadores o competidores.

Llorens (2021) señala que presentan una estructura regular, son de tamaño pequeño, lo cual les permite reaccionar rápidamente al entrar en contacto con el aire y el calor, por lo cual, su descomposición se produce de manera más rápida que los sesquiterpenos de mayor complejidad, presentando gran variedad de hidrocarburos, alcoholes, aldehidos y otros compuestos oxigenados.

Su clasificación se enfoca en el tipo de uniones que presentan, así se denomina monoterpenos regulares cuando provienen de la fusión “cabeza-cola” de dos unidades de isopreno, mientras que se llaman irregulares cuando la fusión es de tipo “cabeza mitad”, y en base a características diferenciables se dividen según el número de ciclaje, en acíclicos, monocíclicos, bicíclicos y tricíclicos. (Martínez, 2003).

Figura 2

Clasificación de los monoterpenos



Fuente: Palá (2002).



2.2.2.3.2. Sesquiterpenos

Su estructura molecular tiene 15 carbonos que constituyen los 3 monómeros isoprenicos, la mayoría de tipo “cabeza-cola”, los que poseen mayor peso molecular, menor capacidad de volátil y no pueden pasar a través de la membrana celular como los monoterpenos, siendo menos frecuentes en los aceites esenciales en general (Acero et al.,2019; Andrango, 2021).

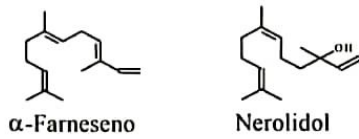
Pueden presentar una estructura regular y producto de transposiciones de grupos funcionales (alcoholes, hidrocarburos, cetonas, además de derivados, ésteres, glicósidos y alcaloides) esta origina una gran variabilidad natural. Se encuentran distribuidos ampliamente, se estima que existen más de 10000 variedades de sesquiterpenos, con mayor frecuencia en hongos, plantas no vascularizadas e incluso en ciertas bacterias como los *Streptomyces* (Cerutti & Neumayer, 2004).

Al tener una unidad más de isopreno que los monoterpenos, tienen mayor plasticidad en su estructura y función, gracias a esta particularidad y al ciclaje molecular, se clasifican en acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos y tetracíclicos (Guerra et al., 2014).

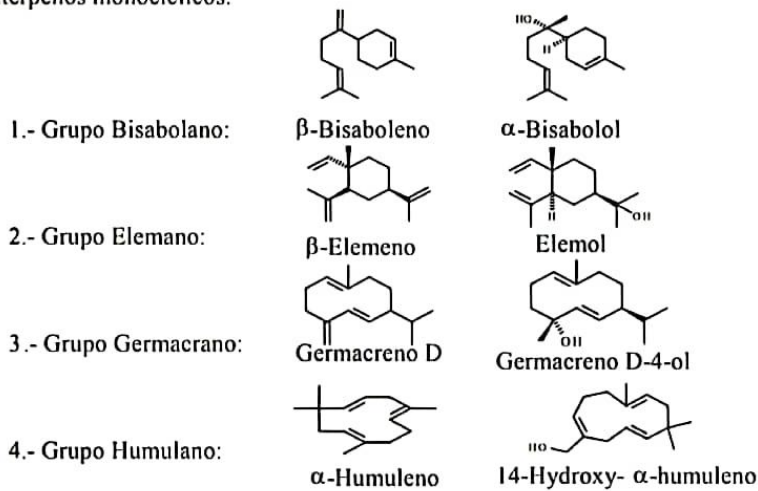
Figura 3

Clasificación de los sesquiterpenos

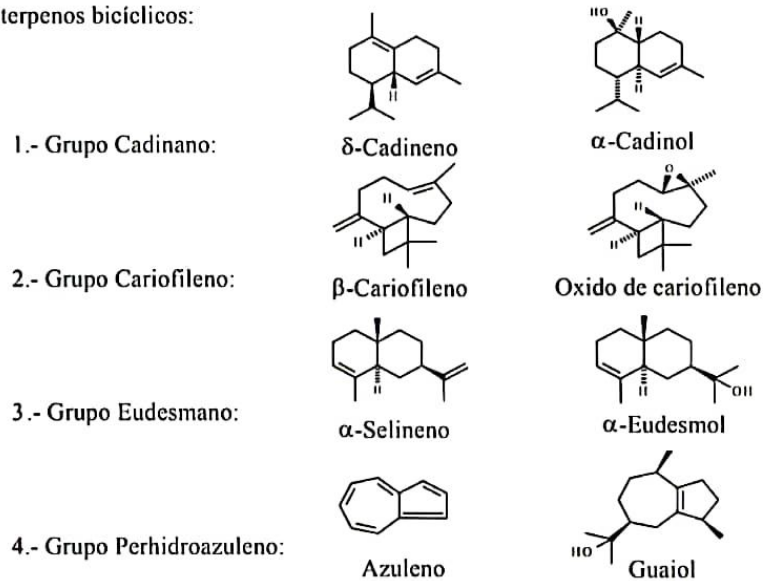
Sesquiterpenos acíclicos:



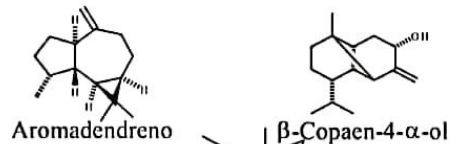
Sesquiterpenos monocíclicos:



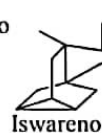
Sesquiterpenos bicíclicos:



Sesquiterpenos tricíclicos:



Sesquiterpenos tetracíclicos:



Fuente: Palá (2002)



2.2.2.4. Actividad biológica

Los terpenos pueden actuar como hormonas vegetales (ácido abscísico o fitoalexinas), al adherirse a ciertos espacios tridimensionales de las proteínas y activar algunos receptores de superficie celular; también pueden ser alelopáticos y fitotóxicos, es decir herbicidas selectivos, puesto que presentan ciertos compuestos químicos que pueden influenciar en la germinación, crecimiento y reproducción vegetal, por tanto, se pueden usar como alternativa a los herbicidas químicos (Cabrera, 2017; Jaramillo et al., 2012).

Debido a la propiedades de los aceites esenciales, tradicionalmente se las ha empleado en aromaterapia y cosmética. Sin embargo, frente a la resistencia antimicrobiana en la medicina se la ha utilizado por su acción antibacteriana, antifúngica y antiviral. Sus efectos serían producto de propiedades sinérgicas como la hidrofobicidad del aceite, que permite la adherencia a la membrana celular bacteriana, que por presión molecular la hace más permeable, provocando la salida de iones del interior y finalmente produce la lisis bacteriana debido a los alcoholes, fenoles y aldehídos (Oliveros, 2016; Rincón et al., 2012).

También se informa que tienen propiedades antioxidantes y anticancerígenas, evidenciándose su efecto frente a ciertos tumores, como es el caso del d-limoneno, obtenida de varios frutos cítricos, y del alcohol perílico que por ensayos en ratones de laboratorio, evidencian un efecto quimioterapéutico importante contra el cáncer (González, 2018).

Asimismo, serviría para tratar el dolor neuropático en nervios periféricos, el cual es difícil de tratar por métodos convencionales ya que es refractario, es así que la timoquinona tiene por ejemplo, efecto antinociceptivo. Y algunos otros aceites esenciales provenientes de Asteráceas, tendrían actividad antiviral al inhibir la replicación y reducir su propagación entre células (Acero et al., 2019).

Tabla 2

Aplicaciones y usos de los aceites esenciales

Vía externa		Vía interna	
antisépticos	Antiinflamatorios	Expectorantes	Antiinflamatorios
Rubefacientes	Insecticidas	Carminativos	Coleréticos
Desodorantes	repelentes	Estomacales	colagogos
Analgésicos	Cicatrizantes	Antiespasmódicos	Digestivos
		Sedantes	Diuréticos
		Estimulantes	Antisépticos
		cardíacos	Estimulantes circulatorios

Fuente: Castro et al. (2013)

2.2.2.5. Métodos de extracción

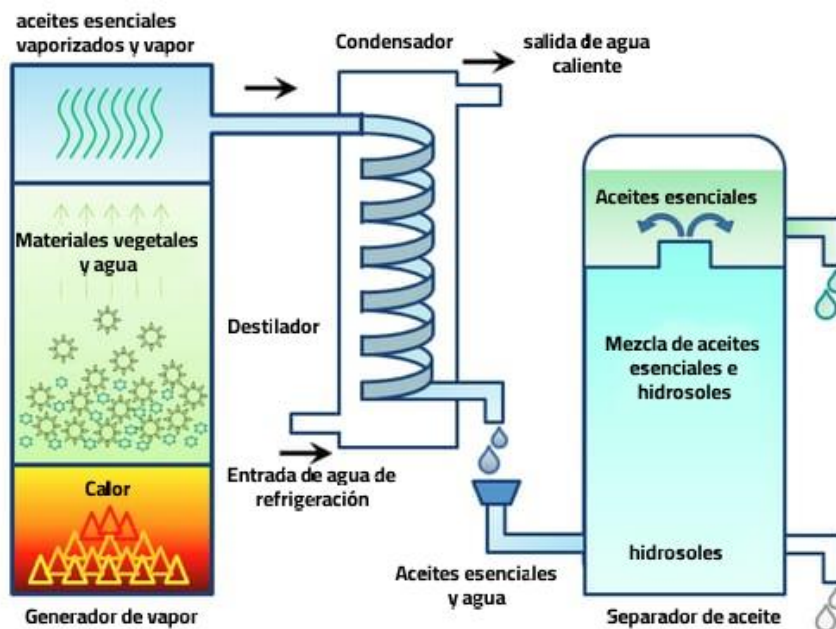
Los aceites esenciales se pueden obtener por diversos métodos y procedimientos, lo cual depende de la parte anatómica, sus componentes, estabilidad y las propias especificaciones que se quiera conseguir (Oliveros, 2016). El proceso de extracción inapropiado puede deteriorar o alterar la composición química del aceite esencial, pudiendo ocasionar decoloración, mal olor/sabor e incremento de la viscosidad (Tongnuanchan & Benjakul, 2014).

a. Hidrodestilación

Este método conlleva la inmersión íntegra del material vegetal en agua, seguido de ebullición cuyo vapor sale a través de un canal, los que al enfriarse se condensan, generando un destilado líquido conformado por dos estados inmiscibles, una fase acuosa y otra orgánica (AE) siendo separado por decantación, debido a las diferencias de densidad, usando un vaso florentino (Casado, 2018; Montoya, 2010). Esta técnica conserva los compuestos debido al agua circundante que ejerce una barrera evitando que sobrecaliente, siendo uno de los beneficios de este método que puede destilarse a menos de 100° (Tongnuanchan & Benjakul, 2014).

Figura 4

Descripción de la técnica de hidrodestilación



Fuente: Tongnuanchan & Benjakul (2014)



b. Destilación por arrastre de vapor de agua

Martínez (2003) y López (2004) para este método indican que la materia vegetal debe ser fresca y dividida en porciones pequeñas, confinada a una cámara inerte o colocada encima de una rejilla perforada y sujeta a una corriente de vapor de agua sobrecalentada, siendo los metabolitos arrastrados para luego ser condensados, recolectados y separados del fragmento acuoso.

Es el método más utilizado para obtener aceites esenciales, por su bajo costo y relativa facilidad operativa, no obstante, puede modificarse por el calentamiento y contacto directo con el vapor de agua, además que requiere un tiempo extenso para obtener una mínima cantidad de aceite (Casado, 2018), siendo ideal para obtención de esencias fluidas en perfumería. Por lo mismo, es usado industrialmente por su alto rendimiento y la pureza del aceite obtenido, no siendo indispensable el uso de tecnología sofisticada (Martínez, 2003).

c. Extracción con solventes volátiles

En este método se pone la muestra vegetal seca y molida con solventes, los más utilizados son alcohol y cloroformo, al reaccionar ambos se produce la solubilización del aceite esencial, también se extrae otras sustancias como ceras y grasas, entonces se obtiene una esencia con presencia de impurezas. Este método es más utilizado en laboratorios, las cantidades de insumos se refleja altos costos y menor beneficio (Hevea, 2013).



d. Prensado

En este método, el material vegetal se somete a un proceso mecánico de exprimido para liberar el aceite, siendo luego recolectado y filtrado. Por lo general, se aplica en frutos cítricos o partes de éstas (Solís et al., 2019).

e. Método de enflorado

En este método las flores se exponen a una grasa, la esencia se solubiliza en ésta que cumple un rol extractor; en la primera etapa se obtiene una mezcla de aceite esencial, luego la grasa se retira por procesos físicos y químicos, y en general se utiliza alcohol caliente para lograr la separación de la grasa y el extracto aromático (Martínez, 2003; Rodríguez et al., 2012). Es de utilidad para algunos vegetales con cierta fragilidad en su esencia (Montoya, 2010).

f. Extracción con fluidos supercríticos

Es una técnica reciente en la cual el vegetal se debe trozar, moler o licuar, para luego empacar en una estructura de acero inoxidable, donde se aplica un fluido de CO₂ en estado crítico, haciéndolo circular por su interior, el cual produce la solubilización de los aromas que se acumulan, mientras se elimina la sustancia extractora por descompresión progresiva hasta alcanzar un balance con el medio ambiente exterior, siendo el resultado un aceite esencial con características particulares (Hevea, 2013).



2.2.3. Resistencia antibiótica

2.2.3.1. Definición

Es el mecanismo con que cuenta un microorganismo para sobrevivir, cuando es expuesto a un antibiótico, por reducir la capacidad antibiótica o inhibir al mismo, está presente en bacterias, virus, protozoos y hongos, la cual en los últimos años se ha incrementado debido al uso desmedido de antibióticos (Pérez & Robles, 2013), siendo determinada a través de ensayos *in vitro*, valorando la capacidad del antibiótico mediante la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) que puede indicar si es sensible, resistente o intermedio a un antibiótico según los puntos de corte establecidos para cada microorganismo en particular (Castellano & Armindo, 2010).

2.2.3.2. Origen

A. Resistencia natural

Es una característica permanente de las especies bacterianas, determinada genéticamente, no está asociado con la dosis de antimicrobiano administrado. Un ejemplo es *Proteus mirabilis* frente a las tetraciclinas, que por un proceso natural expulsa a antibióticos e incluye a un lipopolisacárido que resta la afinidad a los antibióticos; otros ejemplos incluyen la producción de betalactamasas frente a penicilinas, o la ausencia de un sitio diana para antimicrobianos como en los bacilos Gram negativos frente a las clindamicinas (Reygaert, 2018).

Este mecanismo de resistencia se remonta al período previo de uso de antibióticos, así se ha identificado bacterias con características de



resistencia en profundas cavernas de los glaciares en el ártico de hace 2000 años. Y el desarrollo de resistencia natural se debería a que todas las bacterias de una especie muestran resistencia a ciertos grupos de antibióticos, por tanto, logran obtener una ventaja frente a otras cepas pudiendo sobrevivir a los antibióticos utilizados (Reygaert, 2018).

B. Resistencia adquirida

Según Bisso (2018) se produce por medio de mutaciones, o por la transmisión de material genético a nivel extracromosómico proveniente de otras bacterias. En la primera forma la resistencia se transmite de generación en generación en forma vertical, mientras en la segunda forma la transmisión es horizontal a través de plásmidos u otros componentes genéticos como integrones y transposones, en cuyo caso no solo se transmite la resistencia entre generaciones, sino también entre otras especies de bacterias, la cual puede ser adquirida por bacterias que nunca tuvieron contacto a antibióticos.

2.2.3.3. Mecanismos de resistencia

A. Limitación de absorción de drogas

La estructura y funciones del lipopolisacárido en bacterias Gram negativas son una barrera para ciertos tipos de moléculas, que les confiere resistencia innata a los antimicrobianos. Las micobacterias tienen una membrana externa con alto contenido de lípidos, donde los fármacos hidrofóbicos como la rifampicina y las fluoroquinolonas tienen un acceso más fácil hacia a la célula que los fármacos hidrofílicos (Taroco et al., 2006).



Las bacterias carentes de pared celular, como *Mycoplasma* y especies relacionadas son intrínsecamente resistentes a todos los fármacos que actúan en la pared celular, incluidos los betalactámicos y los gluco péptidos. En las bacterias Gram positivas la restricción al acceso de medicamentos no es tan frecuente, los enterococos tienen moléculas polares que dificultan la penetración en la pared celular lo que confiere una resistencia intrínseca a los aminoglucósidos. De otro lado, *Staphylococcus aureus* ha desarrollado recientemente resistencia a la vancomicina, un mecanismo aún no explicado que le permite producir una pared celular engrosada con resistencia intermedia a la vancomicina (Taroco et al., 2006).

Otro fenómeno es la formación de una biopelícula por una comunidad bacteriana, la cual puede contener un organismo predominante o una amplia variedad de éstos, como en la biopelícula de la microbiota intestinal. En patógenos, la biopelícula protege del ataque del sistema inmunitario del huésped y frente a los antimicrobianos. La consistencia espesa y pegajosa de la matriz de la biopelícula que contiene polisacáridos, proteínas y ADN de las bacterias residentes dificulta que los agentes antimicrobianos lleguen a las bacterias (Pérez & Robles, 2013).

B. Modificación de diana farmacológica

Como señala Agudo (2010), se da por alteración del lugar en donde actúa el antibiótico, es una modificación adaptativa de ciertos puntos específicos de la célula bacteriana, como la membrana celular, pared celular, ribosomas entre otras estructuras. La mutación a nivel de los genes GyrA y GyrB generarían resistencia frente a las quinolonas en



Pseudomonas aeruginosa, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus epidermidis*, mientras que las modificaciones en las subunidades 30S y 50S del ribosoma confieren resistencia a tetraciclinas y lincosamidas.

Otro mecanismo de resistencia es la metilación del RNA del ribosoma, específicamente de la subunidad 50S como ocurre en *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* frente a macrólidos, tetraciclinas y cloranfenicol, mientras que la resistencia bacteriana a la gentamicina, amikacina y tobramicina, se atribuye a una mutación en la subunidad 30S del ribosoma (Agudo, 2010).

En el caso de la resistencia a fluoroquinolonas ésta se produce a través de modificaciones en la ADN girasa (bacterias Gram negativas) o topoisomerasa IV (bacterias Gram positivas), cuyas mutaciones provocan disminución o eliminan la capacidad del fármaco para unirse a estos componentes (Taroco et al., 2006).

C. Inactivación de drogas

Es un mecanismo de destrucción o modificación de la estructura química del antibiótico, realizado por enzimas. Las más conocidas son las betalactamasas, que hidrolizan el núcleo betalactámico, así la enzima eritromicina esterasa hidroliza el anillo de lactona, además se tiene a la cloranfenicol acetiltransferasa y las enzimas modificadoras de aminoglucósidos (Barrero, 2009).



La transferencia de un grupo químico como acetilo, fosforilo y adenilo al fármaco lo inactiva. Hay un gran número de transferasas, la acetilación es el mecanismo más utilizado y es usado contra los aminoglucósidos, el cloranfenicol, las estreptograminas y las fluoroquinolonas. La fosforilación y la adenilación se da principalmente contra los aminoglucósidos (Pérez & Robles, 2013).

D. Bombas de expulsión

En la membrana celular se encuentra una variedad de bombas de expulsión, las cuales sirven para expulsar e internalizar antibióticos, los que constituyen mecanismos de resistencia en bacterias Gram positivas y Gram negativas, constituyendo bombas de eflujo activo mediado por proteínas transmembranales, mientras que en bacterias Gram negativas se tiene también la participación de la membrana externa y citoplasmática frente a quinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol y beta lactámicos (Pérez & Robles, 2013).

E. Transportadores ABC, MATE, SMR, RND

El transportador ABC son sistemas de captación y eflujo, que para transportar utilizan energía derivada de la hidrólisis del ATP. Estas bombas transportan aminoácidos, fármacos, iones, polisacáridos, proteínas y azúcares y están formados por seis segmentos transmembrana (TMS) de hélices α , que funcionan en pares como homodímeros o heterodímeros. Estas bombas tienen sustratos bastante específicos, y se encuentran muy poco en bacterias de ambiente clínico, por ejemplo en *Vibrio cholerae*



(VcaM) es capaz de transportar fluoroquinolonas y tetraciclinas (Pérez & Robles, 2013).

El transportador MATE (Multidrug and Toxic Compound Extrusion) comprende cinco familias de las cuales 4 son sistemas de transporte que emplea un gradiente electroquímico de cationes para transportar las drogas a través de la membrana entre ellas fluoroquinolonas, aminoglucósidos y colorantes catiónicos, estando compuestas por doce TMS (segmentos transmembrana). Otros sustratos para estas bombas pueden tener estructuras químicas no relacionadas. La mayoría están en organismos Gram negativos, siendo uno de los primeros en ser caracterizados la bomba NorM del ADN cromosómico en *Vibrio parahaemolyticus*, el que también fue encontrado en *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis* (Paitan, 2018).

La familia de eflujo como son las pequeñas proteínas de resistencia a múltiples fármacos (SMR) se encuentra energizada por la fuerza motriz protón (H^+) estando compuesta por cuatro TMS que funcionan como homotetrámeros asimétricos, y efluyen principalmente cationes lipofílicos con un rango de sustrato muy estrecho. Los genes de estas bombas están en el ADN cromosómico, plásmidos y elementos transponibles. Pocos fármacos son expulsados por éstas, sin embargo le confieren resistencia a los β -lactámicos y a algunos aminoglucósidos, por ejemplo la bomba SMR en *Staphylococcus epidermidis* transporta ampicilina, eritromicina y tetraciclina y la bomba EmeR en *Escherichia coli* transporta vancomicina, eritromicina y tetraciclina (Torres et al., 2022).



Como indica Reygaert (2018), los miembros de la familia de eflujo RND (Resistance-Nodulation-Division) expulsan por un mecanismo antiport sustrato/H⁺, estos transportadores son complejos generalmente formados por doce TMS y contienen dos grandes asas periplásmicas entre TMS 1 y 2 y el TMS 7 y 8, donde para funcionar se conectan a una proteína de membrana externa (OMP), la que comparte un alto grado de homología entre los miembros de la RND. Los genes de las bombas RND están organizados como un operón, y se encuentran principalmente en bacterias Gram negativas.

Los transportadores RND pueden ser específicas de una clase de fármacos (bomba Tet: tetraciclina; bomba Mef: macrólidos) o ser capaces de transportar una amplia gama de fármacos, como es la bomba MexAB-OprM en *Pseudomonas aeruginosa* que expulsan β-lactámicos, cloranfenicol, tetraciclina, trimetoprima, sulfametoxazol y algunas fluoroquinolonas. De otro lado, la bomba AcrAB-TolC en *Escherichia coli* le confiere resistencia a penicilinas, cloranfenicol, macrólidos, fluoroquinolonas y tetraciclina. (Reygaert, 2018).

2.2.4. Microorganismos

2.2.4.1. Definición

Son organismos microscópicos, que no se los puede observar a simple vista por ser de un tamaño muy pequeño, además se encuentran en todas partes. Se conoce que fueron las primeras formas de vida que existieron en el planeta, lo cual se remonta hasta hace unos 4000 millones de años, es decir se puede indicar que son los que hicieron posible la



variedad de formas de vida que hoy conocemos, puesto que por su existencia se formó la actual atmósfera (Brooks et al., 2013).

En la actualidad la denominación de microorganismos, según los microbiólogos, se refiere a tres grandes grupos según su grado de organización, como son a) Bacterias, denominadas al principio “bacterias verdaderas” o eubacterias; b) Arqueas (Archaea o arqueobacterias), entre las que se incluyeron inicialmente bacterias que habitan en ambientes extremos; y c) Eucariontes (Eucarya), formados por hongos, levaduras, algas y protozoarios. Así también se tiene como denominación general a los priones, viroides y virus como microorganismos (Tortora et al., 2007).

Según los reportes se estima que se tiene alrededor de 70 000 especies de hongos, 45000 de bacterias, 30800 de protozoarios y 1×10^{32} de virus, además se estima que se tiene unos 10 millones de especies de bacterias que todavía no han sido identificadas, es decir queda aún muchos microorganismos por identificar sobre todo en ambientes poco accesibles como los fondos marinos, glaciares perennes, entre otros (Ryan & Ray, 2011).

2.2.4.2. Tipos

A. Patógenos

Son aquellos microorganismos que tienen la capacidad de provocar enfermedades en el cuerpo humano, para conseguir ingresar e invadir nuestro organismo, los patógenos utilizan una gran variedad de “puertas de ingreso”, las principales estructuras por la que puede ingresar un



patógeno microscópico son la mucosa, piel, placenta, ruta parenteral, etc (Gómez & Acevedo, 2001).

Los microorganismos patógenos son agentes infecciosos que al ingresar al cuerpo humano le pueden provocar alguna enfermedad, por lo general se refieren a hongos, virus y bacterias, los cuales tienen la capacidad de alterar el funcionamiento normal de plantas, animales y humanos que fueron infectados por estos (Brooks et al., 2013).

Se reconoce como bacterias patógenas a aquellas bacterias Gram negativas de la familia Enterobacteriaceae (*Serratia marcescens*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Escherichia coli*), con una particular capacidad para formar colonias en varias partes del organismo humano, aun cuando se halle frente a defensas inmunológicas, a lo cual se adiciona su capacidad de alta resistencia frente a los antibióticos, en este sentido *Escherichia coli* se considera de un grave riesgo para la salud pública (Murray et al., 2017).

B. No patógenos

Los microorganismos no patógenos son aquellos que no provocan enfermedad, daño o muerte a otro organismo; por lo general el término se aplica para describir a las bacterias, considerando que la mayoría de especies de ellas no provocan enfermedades (Murray et al., 2017).

Los microorganismos se pueden hallar en cualquier lugar del planeta, relacionados con organismos multicelulares, llegando a habitar el cuerpo humano, como simples comensales o como parte integrante de las



funciones corporales, ya sean bacterias, hongos e incluso otros microorganismos, que en circunstancias no anormales y en un individuo potencialmente saludable, llegan a ser inofensivos. A estos microorganismos se les denomina microorganismos no patógenos, y/o comensales (Salas, 2014).

2.2.4.3. *Escherichia coli*

A. Morfología

Es una bacteria en forma de bacilo, presenta coloración Gram negativa, mide de 1 a 3 μm y el ancho es de 0,2 a 0,4 μm , se caracteriza por la presencia de flagelos peritricos o ser inmóviles, y tener apéndices tipo pilis, donde su pared celular está formada en su mayor parte por un polímero estructural de peptidoglicano, el cual presenta además una doble membrana fosfolipídica (Torres et al., 2022).

Son anaerobios facultativos con un metabolismo fermentativo además de oxidativo. Es considerado un organismo quimioorganotrofo, oxidasa negativo y catalasa positivo, donde 37 °C es su temperatura ideal de desarrollo, y en cultivos de agar nutritivo, se caracterizan por tener colonias tanto lisas como rugosas (Aquili, 2007; Salas, 2014).

B. Taxonomía

Su clasificación taxonómica sería de la siguiente forma:

Tabla 3.

Clasificación taxonómica de Escherichia coli

Categoría taxonómica	Descripción
Dominio	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Clase	gammaproteobacteria
Orden	Enterobacterales
Familia	Enterobacteriaceae
Genero	Escherichia
Especie	<i>Escherichia coli</i>

Fuente: NCBI (NCBI National center for Biotechnology Information, 2020b)

C. Metabolismo

Con la finalidad de asimilar el compuesto del amonio no dependiente de ATP es que utiliza la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH). Así pues GOGAT-GS (Glutamina Oxoglutarato Aminotransferasa/glutamato sintasa) y GDH, catalizan la asimilación de amonio, en condiciones ricas de nitrógeno y energía estimulando su crecimiento (Taroco et al., 2006).

A diferencia del ácido acético, el ácido cítrico se convierte en su principal fuente de energía cuando está presente. De manera similar, otros azúcares como la glucosa se metabolizan para producir piruvato y lactato, acetato y formiato, en la que este último se convierte en CO₂ e H₂ a través del sistema hidrógeno liasa. La fermentación de lactosa puede o no estar



latente en el metabolismo de esta bacteria, si la bacteria reduce el nitrato, da una reacción positiva al rojo de metilo y tiene una prueba de Voges-Proskauer negativa. Las pruebas de producción de SH₂, hidrólisis de urea y lipasa son negativas y la mayoría de las cepas de *Escherichia coli* son citrato negativas. En este género, la suma de bases G+C en el ADN es 48-52% (Aquili, 2007).

D. Patogenia

Escherichia coli en su forma patogénica se puede adherir utilizando los pili a las células del epitelio, intestino delgado, pudiendo llegar a destruir las microvellosidades formando además microcolonias, donde esta patogenicidad está incluida en genes codificados en ciertos islotes, de los cuales 40 genes son participes del mecanismo de degradación celular. Después de la colonización comenzaría la secreción de proteínas de respuesta por parte de las células del epitelio, es en este momento que la bacteria inserta la proteína receptora de intimina translocada (Tir), que recibe a la intimina de la membrana externa bacteriana la que actúa como una adhesina, posteriormente se desencadena la polimerización de actina, provocando la acumulación del citoesqueleto celular terminando con la muerte de las células epiteliales por la reducción de su integridad superficial (Brooks et al., 2013).

Según los aspectos genéticos y clínicos, las cepas de *Escherichia coli* se pueden clasificar en 3 grupos: comensales, patógenos intestinales y patógenos extraintestinales. Las cepas patógenas intestinales causan gastroenteritis, así se reconocen 6 patotipos diarreogénicos como es el



enterotoxigénico (EPEC), enterohemorrágico/productor de toxina Shiga (STEC/EHEC), enteropatogénico (EPEC), enteroinvasivo (EIEC), enteroagregativo (EAEC) y difusamente adherente (DAEC).

La filogenia es diversa en cada uno de estos patógenos, pero en general derivan de los grupos A, B1 o D, donde cada patotipo presenta una combinación única de factores virulentos. Así, *Escherichia coli* enteropatógena está más asociado a diarrea en lactantes y algunas veces se asocia a vómito y fiebre, mientras que *Escherichia coli* enteroinvasiva afecta a niños de seis meses, se caracteriza por diarrea y ocasionalmente ocurre con sangre y moco. En el caso de *Escherichia coli* enterotoxigénica ésta afecta a niños menores de 2 años, puede acompañarse de fiebre y algunas veces de vómito, siendo agente principal de la diarrea acuosa del viajero (Farfán-García et al., 2016).

De otro lado, *Escherichia coli* enteroagregativa causa diarrea persistente de color verde y con moco. *Escherichia coli* difusamente adherente produce diarrea acuosa sin sangre en niños de uno a cinco años. Y por último, *Escherichia coli* enterohemorrágica causa diarrea sanguinolenta, dolor abdominal y poca fiebre, siendo responsable del síndrome hemolítico urémico (SHU), caracterizado por daño renal, anemia hemolítica microangiopática y trombocitopenia (Farfán-García et al., 2016).

Las cepas de *Escherichia coli* patógenas extraintestinales, que incluye a los uropatógenos, pertenecen al grupo filogenético B2 (el más frecuente y patógeno) y en menor proporción al grupo D, en la que las



infecciones pueden afectar a casi todos los órganos y localizaciones anatómicas, excepto el tracto intestinal. Así, el grupo B2 tiene mayor capacidad de adaptación en el fluido urinario, siendo productores de cistitis y pielonefritis (Andreu, 2005). Además, la expresión de exotoxinas, adhesinas y flagelos serían determinantes en la proliferación del microorganismo en el tracto urinario, pero no sin evidencia de un mecanismo de virulencia dominante que no sea compartido por bacterias no patógenas (Barron Pastor et al., 2019).

E. Epidemiología

Escherichia coli es una bacteria patógena asociada a enfermedades diarreicas, prevalente generalmente en niños menores de 12 años en países de escaso desarrollo, contrario a los países en vías de desarrollo donde esta enfermedad se ha reducido significativamente en los últimos años, si bien cada cierto tiempo se producen brotes localizados con pequeñas cargas infecciosas, las cuales se transmiten en grupos con cierto grado de hacinamiento como las guarderías, se tiene ya presente su cuidado, tratamiento y prevención (Contreras et al., 2017).

Los síntomas que evidencian una infección por esta bacteria son identificados por la presencia de febrícula, vómitos, malestar general y por último una diarrea acuosa profusa y crónica, con gran cantidad de mucosidad con ausencia de sangre macroscópica, además de leucocitosis en sangre periférica (Sorlózano et al., 2017).

EPEC ocasiona una diarrea acuosa siendo el organismo principal que causa la diarrea del viajero. EPEC es el agente causante de diarrea

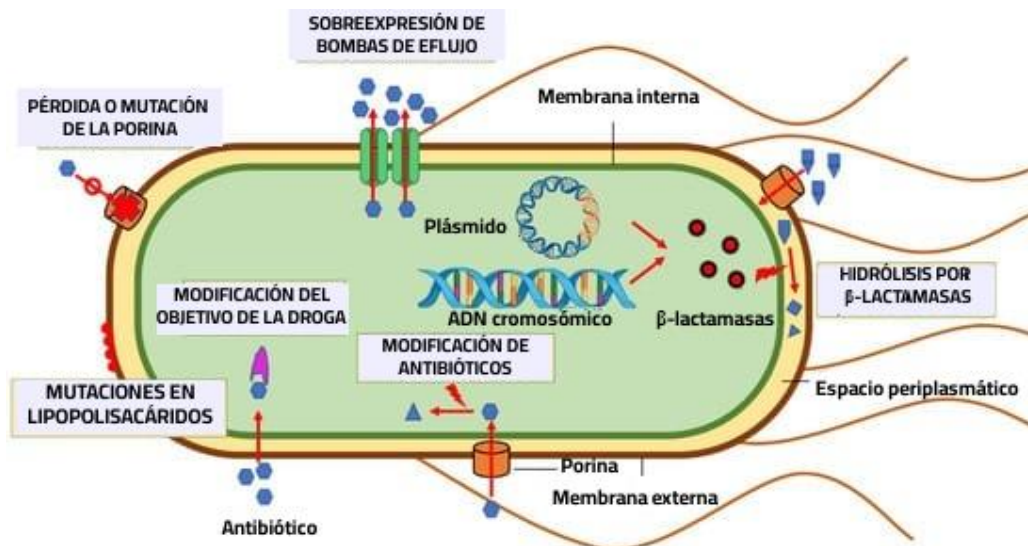
acuosa en bebés y niños pequeños además de ser causante de brotes esporádicos y epidémicos; EAEC produce diarrea acuosa aguda y crónica y EHEC/STEC produce la toxina Shiga (Aquili, 2007).

F. Multidrogoresistencia

La resistencia intrínseca (innata) de *Escherichia coli* se debe principalmente a la membrana externa y a la expresión de bombas de expulsión, donde se cree que la inducción de las bombas de expulsión es clave para la resistencia a las células del biofilm. Mientras, que la resistencia extrínseca (adquirida) se debe principalmente a la actividad humana y al uso excesivo de antibióticos (May et al., 2009; Rozwadowski & Gawel, 2022).

Figura 5

Distintos mecanismos de multidrogoresistencia en Escherichia coli



Fuente: Rozwadowski & Gawel (2022)

La forma más común de resistencia a β -lactámicos en *Escherichia coli* es la adquisición de genes de resistencia como las β -lactamasas de

espectro extendido (BLEE) (resistencia a cefalosporinas de amplio espectro), carbapenemasas (resistencia a carbapenémicos) y rRNA 16S metilasas (pan-resistencia a aminoglucósidos) (Rozwadowski & Gawel, 2022).

Las β -lactamasas se clasifican en el subgrupo 2b (hidrolizan penicilinas y cefalosporinas de primera generación), subgrupo 2br codificados por genes blaTEM y genes blaCTX-M (β -lactamasas de amplio espectro con resistencia al ácido clavulánico) y el subgrupo 2be (hidroliza uno o más oxiiimino- β -lactámicos) (Galindo, 2020). Asimismo, la resistencia por AmpC (β -lactamasas de clase C) puede estar codificada por plásmidos (CMY, DHA y ACC) o deberse a la sobreexpresión de los genes AmpC cromosómicos y también se encontró BLEE/AmpC en *Escherichia coli* de humanos y animales (Galindo, 2020; Poirel et al., 2018). De igual modo, los plásmidos, transposones y los cassetes de genes en los integrones de clase 1 y clase 2, cumplen un rol de diseminación de genes de resistencia (Poirel et al., 2018).

La resistencia a quinolonas y fluoroquinolonas generalmente se debe a mutaciones de la ADN girasa, mientras que la topoisomerasa IV actuaría como diana secundaria (Mosquito et al., 2011; Poirel et al., 2018); asimismo los genes qnrA , qnrB, qnrC , qnrD y qnrS integrados en plásmidos codifican proteínas que protegen a las dianas de las quinolonas (girasa y topoisomerasa IV) (Mosquito et al., 2011; Rozwadowski & Gawel, 2022).



Al parecer, el mecanismo de resistencia a las tetraciclinas es por sistemas de eflujo que son codificados por los genes tetA, tetB, tetC, tetD, tetE, tetG, tetJ, tetI, tetL y tetY, también participarían dos genes que codifican proteínas protectoras del ribosoma tetM y tetW (Mosquito et al., 2011; Poirel et al., 2018).

En cuanto a los mecanismos de resistencia a sulfonamidas esta mediada por los genes sul1; sul2 y sul3, relacionados con integrones que codifican formas mutantes de la dihidropteroato sintasa, mientras que para trimetoprim se han detectado numerosos genes mutantes dfr (dfrA y dfrB) los que confieren resistencia en Enterobacterales y otras bacterias Gram-negativas (Mosquito et al., 2011; Poirel et al., 2018).

Concerniente a los mecanismos de resistencia a cloranfenicol esta puede ser por inactivación enzimática a través de la acetilación de cloramfenicol acetiltransferasas. Además, puede existiría sistemas exportadores específicos para cloramfenicol y florfenicol (su derivado), relacionados con genes como cmlA y floR (Mosquito et al., 2011).

De igual modo, el sistema MacAB-TolC actúa como transportador de eflujo de fármacos único de lípidos macrocíclicos, confiriendo resistencia a los macrólidos, participando en la creación de resistencia intrínseca a eritromicina y ácido fusídico (Rozwadowski & Gawel, 2022).

Y respecto, a la resistencia a la colistina estaría mediada por el gen MCR-1 en *Escherichia coli* de humanos y animales (destinados a la producción de alimentos y carne) incluidos pollos y carne de pollo, cerdos y lechones, vacas, terneros y pavos (Poirel et al., 2018) y que para

enterobacteriales, habría diez variantes principales de MCR (MCR-1 a MCR-10) (Bao et al., 2022).

2.2.4.4. *Staphylococcus aureus*

A. Morfología

Son cocos Gram positivos, con 0,5 a 1,5 μm de diámetro, dispuestas en células únicas, también en parejas o tétradas, de cadenas pequeñas incluso forma racimos irregulares similar a racimos de uvas, son bacterias incapaces de moverse, no esporulan, carecen de cápsulas en su mayoría y una minoría desarrolla una cápsula de limo (Sánchez et al., 2022), además pueden tener un tono blanco hasta un amarillo muy intenso (Freitas et al., 2020).

B. Taxonomía

Tabla 4

Clasificación taxonómica de Staphylococcus aureus

Categoría taxonómica	Descripción
Dominio	Bacteria
Clado	Grupo terrabacteria
Phylum	Firmicutes
Clase	Bacilli
Orden	Bacillales
Familia	Staphylococcaceae
Genero	Staphylococcus
Especie	<i>Staphylococcus aureus</i>

Fuente: NCBI (NCBI National center for Biotechnology Information, 2020c)



C. Metabolismo

Esta bacteria puede obtener su energía a través de la respiración, como por la fermentación de diversos carbohidratos. Tiene capacidad para fermentar el manitol (Lazo et al., 2013).

Su principal fuente de carbono es la glucosa, utiliza tres vías catabólicas como son la de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), Entner Doudoroff y Warburg Dickens, donde cada una presenta transferencia de hidrogeniones sumada a la liberación final de ATP y NADH (Carrel et al., 2015).

Staphylococcus aureus en condiciones anaerobias, no hace procesos oxidativos y opta por procesos fermentativos, por ejemplo, de piruvato a lactato, favoreciendo al reuso de NAD⁺, donde como punto principal de producción de energía tenemos a la fosforilación que se da a nivel de sustrato. El transporte de electrones aerobio es inexistente, el ciclo de los ATC (ácidos tricarboxílicos) no es completo, dando paso solo a la primera conversión evitándose el uso de otros compuestos como aminoácidos, ácidos grasos o lactato (Castillo, 2018).

D. Patogenia

Causa infecciones cutáneas y mucosas benignas, como forunculosis o conjuntivitis, foliculitis, además de otras de mayor importancia como absceso profundo, celulitis, meningitis, osteomielitis, endocarditis o neumonía, sepsis. Se reporta que infecta el aparato



gastrointestinal, por de consumo de la bacteria o ingestión de la enterotoxina estafilocócica (Jenul & Horswill, 2018).

Forma parte de la microbiota en seres humanos principalmente en la piel, nasofaringe, pliegues inguinales y axilas. Sin embargo, este patógeno se caracteriza por generar multitud de síndromes por invasión y destrucción tisular de la piel, tejidos blandos (músculos, tendones, tejidos grasos y vasos sanguíneos), osteoarticulares, bacteriemia, endocarditis, neumonía (incluyendo neumonía hemorrágica en pacientes jóvenes), invasión a dispositivos protésicos y en enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) (Pasachova Garzon et al., 2019).

Entre los factores de virulencia encontrados tenemos a los polisacáridos capsulares (CP5 y CP8), que evaden la fagocitosis mediada por neutrófilos; la formación de biopelículas, que dificultan el tratamiento y contribuyen a la resistencia bacteriana; los componentes de la superficie microbiana que reconocen las moléculas de la matriz adhesiva, las cuales son proteínas de unión a la fibronectina, al fibrinógeno (factor *clumping*); toxinas (α y β); las islas de patogenicidad ySa α y vSa β , que son genes que codifican la leucocidina y superantígenos (enterotoxinas y exotoxinas); el profago Sa2USA que posee genes que codifican la toxina PVL (Panton-Valentine Leucocidina) dando origen a dos proteínas LukS-PV y LukF-PV encargadas de inducir muerte celular por apoptosis o necrosis; y el profago Sa3USA que tiene genes que codifican las estafiloquinasas (disolventes de la fibrina sanguínea) y las proteínas inhibitoras de



quimiotaxis (inhiben el reclutamiento de neutrófilos) (Pasachova Garzon et al., 2019).

E. Epidemiología

Esta bacteria patógena ataca a pacientes hospitalizados inmunodeficientes, donde su infección provoca enfermedades muy variadas, desde abscesos en la dermis hasta septicemias mortales además de choques tóxicos estafilocócicos (SSTS). También es causante de intoxicación alimentaria, esto se produce cuando se ingiere la enterotoxina B termoestable preformada, generada por una cepa oxigénica de *Staphylococcus aureus* que prospera en los alimentos (Jenul & Horswill, 2018).

Staphylococcus aureus también se encuentra en superficies inertes de nosocomios, desarrollando infecciones asociadas a la atención en salud (Sánchez et al., 2022).

F. Multidrogoresistencia

La resistencia a β -lactámicos mediante β -lactamasa (penicilinas), ocurre a través del gen blaZ que inactivan por ejemplo la penicilina y cefazolina (Ahmad et al., 2018; Schmidt et al., 2015). También hay *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), y existen dos tipos: uno de ellos el MRSA asociado a la comunidad (CA-MRSA) que se transmite entre la población de lugares concurridos, y otro es el MRSA adquirido en el hospital (HA-MRSA) que son altamente resistentes a la meticilina y la penicilina (Guo et al., 2020; Mukherjee et al., 2021). Uno



de ellos, el MRSA que se caracteriza por la secreción excesiva de β -lactamasa, cuyo mecanismo es hidrolizar e inactivar los antibióticos β -lactámicos; y el otro mecanismo es el pinzamiento, donde la gran cantidad de β -lactamasa permite unir rápidamente antibióticos extracelulares, impidiendo disposición de antibióticos en el espacio intracelular (Guo et al., 2020; Lade & Kim, 2021).

Al parecer, la resistencia a la meticilina esta mediada por el gen *mecA*, que es adquirido por transferencia horizontal de elementos genéticos móviles (MGEs) y un cassette estafilocócico del cromosoma *mec* (SCC *mec*) responsable de la síntesis de la proteínas de unión a penicilina (llamada PBP) involucradas en la síntesis de peptidoglicanos (Bitrus et al., 2018; Lade et al., 2022), donde cepas de *Staphylococcus aureus* sensibles a meticilina (MSSA) sintetizan PBP1, PBP2 y PBP4, mientras que las cepas de MRSA sintetizan PBP2A (PBP2a o PBP2'). Eventualmente existen mutaciones en genes que codifican la PBP2 y PBP4 causantes de resistencia a la oxacilina, siendo descritas como MODSA (proteína de unión a penicilina modificada en *Staphylococcus aureus*) o MRLM (resistente a la meticilina que carece de *mec*). También se reporta que la mutación más frecuente ocurre en la región promotora del gen *pbp4* y los genes *gdpP* (fosfodiesterasa c-di-AMP regulador) (Mlynarczyk et al., 2022).

El *Staphylococcus aureus* resistente (VARSA) y de susceptibilidad intermedia a vancomicina (VISA) tienen dos mecanismos de resistencia que está mediada por VanA y por engrosamiento de la pared celular, así



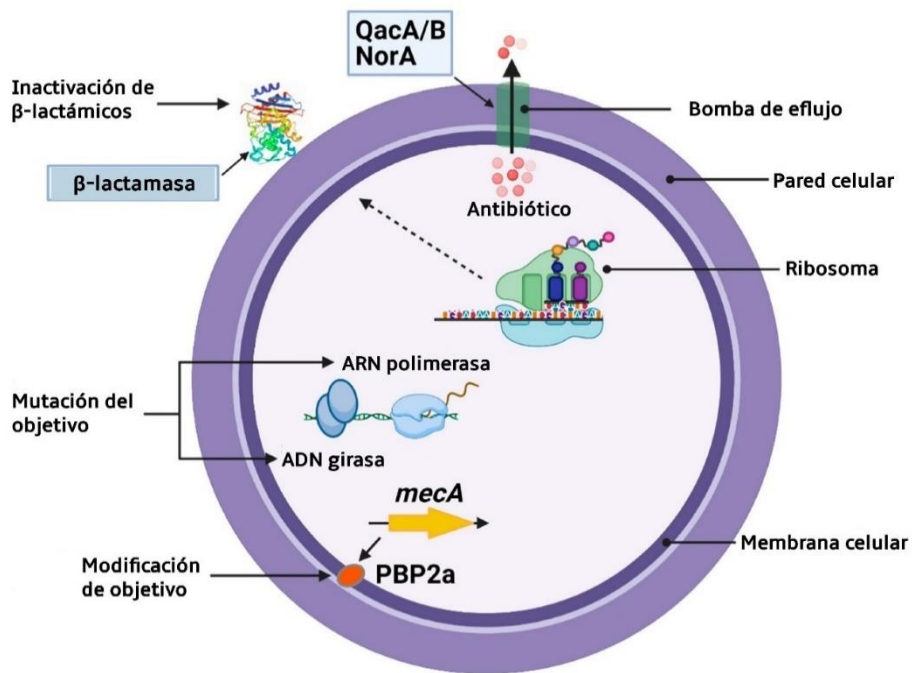
como por un poco reticulado que da como resultado la producción de un mayor volumen de tallo peptídico D-ala-D-ala fuera de la pared celular, lo que reduce la penetración de vancomicina en la célula (Bitrus et al., 2018; Schmidt et al., 2015).

De otro lado, la resistencia a las fluoroquinolonas es por mutaciones en los genes *gyrA*, *gyrB* (topoisomerasa II), *parC* y *ParE* (topoisomerasa IV) resultando en la susceptibilidad reducida o insusceptibilidad a las fluoroquinolonas (Bitrus et al., 2018; Lade et al., 2022; Mlynarczyk et al., 2022); y la sobreexpresión de las bombas de eflujo NorA. Así, los plásmidos son capaces de portar genes resistentes y también varios genes tóxicos, principalmente los plásmidos R (Mukherjee et al., 2021).

Mientras que la resistencia a los aminoglucósidos ocurre por varios mecanismos, entre ellos la síntesis de transferasas (acetiltransferasas, fosfotransferasas, nucleotidiltransferasas) que modifican la molécula de aminoglucósido; y por falta de enzimas responsables del transporte activo de aminoglucósidos a la célula bacteriana (Mlynarczyk et al., 2022).

Figura 6

Mecanismos moleculares de resistencia a antibióticos en Staphylococcus aureus



Fuente: Lade y Kim (2021).

2.2.4.5. *Candida albicans*

A. Morfología

Es una levadura que existe como un microorganismo comensal en humanos y otros mamíferos. Las manifestaciones clínicas pueden ser locales o sistémicas y pueden afectar casi cualquier superficie del cuerpo, desde piel y mucosas hasta órganos internos, tendiendo a formar estructuras ramificadas, cuando entra en contacto con suero de conejo a 37 °C por 90 min) (Mantilla et al., 2021).

Es un hongo diploide con forma de levadura, perteneciente a la familia Saccharomycetes, de células redondas u ovaladas, con 3-8 x 2-7 μ m, agrupadas en pequeños grupos, con forma de hongo filamentoso,

donde las células se alargan y diversifican para tomar la forma de micelio filamentosos o pseudomicelio (D'Enfert et al., 2021).

B. Taxonomía

Tabla 5

Clasificación taxonómica de Candida albicans

Categoría taxonómica	Descripción
Dominio	Eukarya
Clado	Opisthokonta
Reino	Fungi
Sub reino	Dikarya
Filo	Ascomycota
Sub filo	Saccharomycotina
Clase	Saccharomycetes
Orden	Saccharomycetales
Familia	Debaryomycetaceae
Genero	Candida
Especie	<i>Candida albicans</i>

Fuente: NCBI (NCBI National center for Biotechnology Information, 2020a)

C. Metabolismo

Candida albicans se alimenta por adsorción a base de carbohidratos, se desarrollan en medios neutros y ligeramente ácidos a un pH de 4,5 a 6,5 unidades (Alburquenque & Tapia, 2013). Es aeróbico y se reproduce asexualmente por gemación, donde la transición entre levadura e hifas es importante para aumentar su patogenicidad, así las hifas proliferan solo durante la invasión de tejidos y son muchos los estímulos ambientales que desencadenan o inhiben su transformación; por ejemplo, a un pH <6 este microorganismo crece como levadura, mientras que a un pH >7 crece como hifas (Mantilla et al., 2021).



Candida albicans es una levadura común que es patógena bajo ciertas condiciones. La capacidad de cambio es un factor que surge donde la patogenicidad permite que la levadura entre y se propague. Así, el sistema inmunitario innato puede reconocer diferentes formas de *Candida albicans* activando patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) o receptores que reconocen patrones moleculares conservados (PRR). Las células inmunitarias más importantes son los macrófagos y los neutrófilos, que desencadenan respuestas efectoras frente a *Candida albicans* mediante la activación de la fagocitosis y el estrés oxidativo (Cruz et al., 2017).

Las células dendríticas expresan la mayoría de los PRR involucrados en el reconocimiento de *Candida albicans* y activan (inducen) su secreción Treg de citocinas en una respuesta de tipo TH1 (INF tipo 1, IL-12, INF γ). TGF β , IL-10) y TH17 (IL-23 inducida por IL6). Las células epiteliales no solo proporcionan una barrera física contra la infección por *Candida albicans*, sino que también son esenciales para el reconocimiento primario de este organismo. Estas células activan específicamente vías de señalización a través de una respuesta bifásica, en la que las respuestas de citoquinas no se activan en presencia de conidios de esporas (comensales) y se activan en presencia de hifas (invasivas). decide convertirse. *Candida albicans* tiene la capacidad de desarrollar mecanismos para evadir respuestas inmunitarias. Esta compleja interacción hongo-huésped determina si el huésped puede destruir este microbio o finalmente invadir y expresar virulencia..(Cruz et al., 2017).



D. Patogenia

Candida albicans es una levadura comensal que coloniza la membrana mucosa gastrointestinal, respiratoria, genitourinaria, así como la piel. El hallazgo en estas zonas no implica necesariamente una infección; el paso de la colonización a la invasión de mucosas o la diseminación depende a la respuesta inmune del huésped. Produce dos grupos de infecciones: la mucocutánea, ha sido observada en personas con deficiencias fisiológicas de inmunidad celular y la invasora, observada en personas que usan dispositivos invasivos (Cruz et al., 2017).

Los factores de virulencia involucrados en la patogenia comprenden las adhesinas; la gonadotrofina coriónica y la hormona luteinizante que inducen la transición de fase levaduriforme a la filamentosa; así como la secreción de enzimas, como las proteinasas aspárticas secretadas (PAS) que degradan el tejido de las mucosas y permiten su invasión, de las que existen más de 10 tipos de PAS que dependen de las características del medio (pH) y son importantes para la activación de la respuesta inmunitaria; además de fosfolipasas y la inmunomodulación de los mecanismos de defensa del hospedero (García-Vidal & Carratalà, 2012; Cruz et al., 2017).

La candidiasis superficial (cutánea o de mucosas) aparece por el aumento en el número local de células, y daño al epitelio, permitiendo la invasión y proliferación local por las levaduras y pseudohifas, ocasionando que las lesiones cutáneas o mucocutáneas produzcan reacciones inflamatorias. Los antibacterianos de amplio espectro a menudo impulsan



aumentos grandes de la población endógena de *Candida* en el tubo digestivo, así como en las mucosas oral y vaginal (Carroll et al., 2016).

La adhesión de *Candida albicans* en la colonización se da en primer lugar dando paso a la invasión de los tejidos mucocutáneos y puede estar mediada por interacciones entre las células epiteliales del huésped y las glicoproteínas de superficie de la levadura. También aparecen tubos germinativos, micelio o pseudomicelio (según la especie) que invaden directamente las células epiteliales. La adhesión procede a través de la producción de enzimas hidrofílicas tales como proteinasas, fosfatasas y fosfolipasas. (Alburquenque & Tapia, 2013).

E. Epidemiología

Las enfermedades sistémicas por *Candida albicans* en el 42% de los casos desencadenan en consecuencias fatales, pese al uso de terapias antifúngicas, siendo la cuarta infección nosocomial más frecuente (Ford et al., 2015).

La especie predominante responsable del 85-90% de los casos notificados de candidiasis vaginal es *Candida albicans*, que forma parte de la microbiota comensal y está presente en la mucosa vaginal, donde la mayoría de las mujeres son asintomáticas, y para cuyo tratamiento se recurre a los azoles como el miconazol, itraconazol, fluconazol, clotrimazol, voriconazol, isoconazol, ketoconazol y nistatina, siendo el fluconazol el más recomendado y tolerado (Herrerías & López, 2022).



La candidiasis es una infección fúngica causada por varias levaduras comúnmente conocidas como *Candida albicans*. El tipo más común de candidiasis es una infección externa de la boca, la vagina o la piel, que causa placas blancas o rojas y comezón. Sin embargo, en algunos casos, puede tener su origen en una fuente externa de contaminación, como un hospital. (Cucho et al., 2021).

Aunque la especie predominante es *Candida albicans*, en los últimos años se han producido importantes cambios epidemiológicos en la patogenia de la candidiasis invasiva. La presencia de especies distintas de *Candida albicans* supone el 35% y 55% de los casos. En América Latina, *Candida albicans* se presenta con una frecuencia del 34,3 %, seguida de *Candida parapsilosis* (21 %), *Candida tropicalis* (17 %) entre otras (*Candida glabrata*, *Candida guilliermondii* y *Candida rugosa*) que empiezan a ser considerados como patógenos emergentes en América Latina (Bedout & Gómez, 2010).

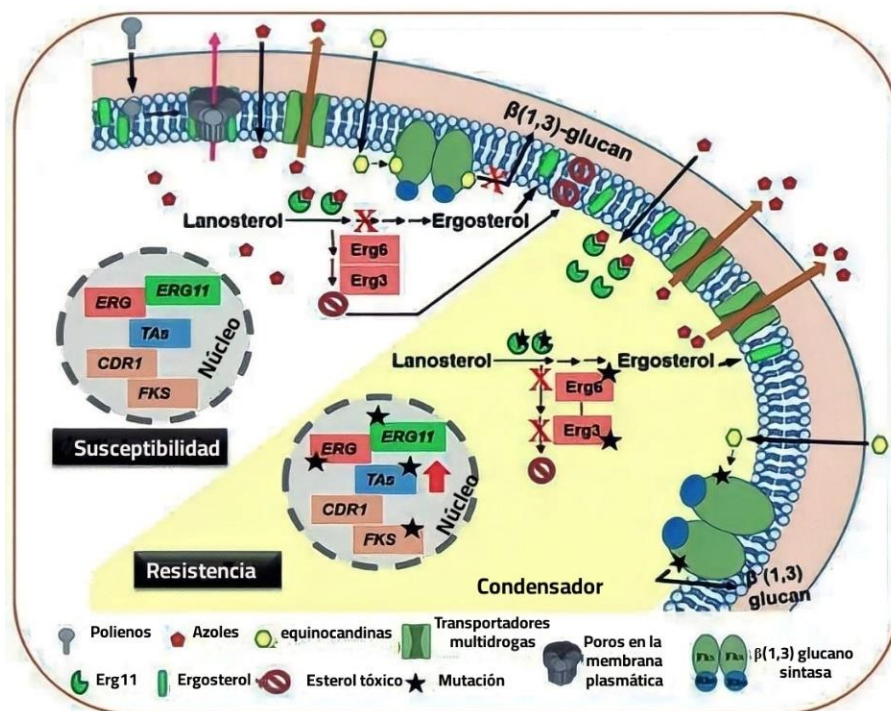
F. Multidrogoresistencia

Los antifúngicos como los azoles inhiben la síntesis de ergosterol al interferir con la enzima lanosterol 14- α -desmetilasa (codificada por el gen ERG11 en las especies de *Candida* y los genes Cyp51 en hongos filamentosos), responsable de convertir el lanosterol en ergosterol. Asimismo, los polienos también se unirían al ergosterol de la membrana causando su ruptura, promoviendo la liberación de componentes intracelulares y muerte celular. La flucitosina inhibe a la timidilato-sintetasa al interferir con la síntesis del ADN, mientras que las

equinocandinas inhiben la (1,3) β -D-glucano sintasa (codificada por los genes FKS) evitan la glucanosíntesis presente en la membrana celular de los hongos (Santos et al., 2018);(Brilhante et al., 2016; Patra et al., 2022).

Figura 7

Mecanismos de resistencia prevalentes a los antifúngicos azoles, equinocandinas y poliénicos



Fuente: Patra et al. (2022)

Existen 3 mecanismos de resistencia antifúngica como es la primaria (forma intrínseca), secundaria (forma adquirida) y clínica (referida a resultados adversos en pacientes pese a terapias antifúngicas) vinculado con la resistencia primaria o secundaria (Bhattacharya et al., 2020; Santos et al., 2018).

El incremento de resistencia a azoles es principalmente fungistática más que fungicida (Ruiz et al., 2021) lo cual ocurre por sustitución del



ergosterol por otro esteroles (Costa & Rodrigues, 2020; Santos et al., 2018), pérdida de mitocondrias que se relaciona con la regulación al alza de CgCDR1, CgPDH1 y otros genes (Bhattacharya et al., 2020), adquisición de aneuploidías debido a la plasticidad genómica y la rápida selección evolutiva durante la infección (Ford et al., 2015) y sobreexpresión de transportadores de membrana (bombas de eflujo) como ocurre en *Candida albicans* con el Cdr1p (ABC-T), Cdr2p (ABC-T) y mdr1p (MFS-T); en *Candida glabrata* el CgCdr1p (ABC-T), CgFlr1p (MFS-T), CgPdh1p (ABC-T), CgQdr2p (MFS-T) y CgSnq2p (ABC-T); en *C. krusei* CkAbc1p (ABC-T), CkAbc2p (ABC-T); y en *Candida auris* el cdr1p (ABC-T) los cuales bombean activamente los azoles, lo que reduce sustancialmente la concentración del fármaco dentro de la célula; y finalmente la sobreexpresión o mutaciones en Erg11/CYP5 que disminuye la unión enzima-fármaco (Bhattacharya et al., 2020; Patra et al., 2022).

En cuanto a la resistencia a los polienos se da por pérdida o mutaciones en los genes ERG, ERG2, ERG3, ERG6 y ERG1, que en aislamientos clínicos no ha sido bien caracterizada (Bhattacharya et al., 2020; Patra et al., 2022); asimismo, la resistencia a la anfotericina B es bastante inusual y, en gran medida, se debe a mutaciones en el gen ERG3 que disminuye la concentración de ergosterol (Costa & Rodrigues, 2020); y los biofilms, que tienen un alto contenido de proteínas y carbohidratos en la matriz extracelular que confiere una alta resistencia antifúngica (Fernandes et al., 2015).



Respecto a la resistencia a la equinocandina ésta se atribuye a mutaciones en el gen FKS1 y en menor medida a FKS2, que dan como resultado sustituciones de aminoácidos en las regiones conservadas hot spot 1 (HS1) y hot spot 2 (SA2) de la subunidad catalítica de β -(1,3)-glucano sintasa, haciendo a la enzima mutante menos sensible al fármaco (Costa & Rodrigues, 2020), también aquí estaría la resistencia por mutación de CaFKS2 (Bhattacharya et al., 2020).

Concerniente a la flucitosina la resistencia primaria, ocurre a través de una permeasa de citosina (gen FCY2), mientras que la resistencia secundaria por alteraciones en la citosina desaminasa (FCY1) o enzimas como la uracilo fosforribosiltransferasa (FUR1). Además, la resistencia a flucitosina requeriría de alguna manera una alta producción de arginina (Santos et al., 2018).



CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ÁREA DE ESTUDIO

Los especímenes de palma real (*Tanacetum vulgare* L) fueron recolectados de la comunidad de Ccota, distrito de Plateria (Puno) localizada a una LS 15°56'15'', LO 69°49'15''W, y una altitud de 3811 m.s.n.m., en tanto, la determinación taxonómica fue realizada según características morfológicas en el “*Herbarium Arequipense* (HUSA)” de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, mientras que la extracción de aceites esenciales se realizó en el Laboratorio de Industrias Medicas y Farmaceuticas S.R.L. (Cerro Colorado, Arequipa); por otro lado, el análisis del perfil cromatográfico de aceites esenciales se derivó al Laboratorio de Cromatografía y Espectrofometría de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco. Y concerniente a las pruebas experimentales de efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Tanacetum vulgare* L frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* multidrogoresistentes se ejecutó en el laboratorio de Microbiología, Departamento de Patología Clínica, del Hospital Carlos Monge Medrano (Juliaca, San Román).

3.2. DISEÑO Y TIPO DE ESTUDIO

El presente trabajo de investigación es de tipo descriptivo con diseño simple, ya que para la determinación de los principios activos contenidos en el aceite esencial estos se expresaron en porcentaje con respecto al total y es de tipo experimental con diseño completamente randomizado porque se evaluaron diferentes concentraciones de aceite esencial y se implementaron controles para determinar el mejor tratamiento.



3.3. POBLACIÓN Y MUESTRA

Población

Plantas de palma real

Aislamientos clínicos de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* con sistema Vitek 2,0

Muestra

Plantas secas de palma real: 2043,6 g

Cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* multidrogoresistentes tipificadas por Sistema Vitek 2.0

3.4. METODOLOGÍA

3.4.1. Rendimiento de aceite esencial extraído de hojas de *Tanacetum vulgare* L por hidrodestilación

3.4.1.1. Material vegetal

A. Determinación taxonómica

a. Técnica

Análisis de características morfológicas en el *Herbarium Arequipense*

b. Fundamento

La utilidad de la taxonomía vegetal está en la precisión que se le da al nombre de cada especie de manera universal, debido a que una misma planta puede ser denominada de manera diferente (nombre común), no



sólo de un país a otro, sino dentro de una misma región. Para lograr identificar una especie vegetal (Scandaliaris, 2022), los nombres de las plantas son una clave para encontrar información sobre ellas, sobre todo, para acceder a información técnica y científica sobre diversos aspectos de importancia. Por ello, para identificar adecuadamente especies vegetales, se hace uso de características que llamamos diagnósticas, distintivas, que diferencian a cada especie de las otras (Reynel, 2012). En ese sentido, los herbarios tienen una colección de plantas pertenecientes a diferentes familias botánicas que sirven de referencia para la clasificación de diferentes especies vegetales.

c. Procedimiento

Para la determinación taxonómica de la palma real se realizó la recolección de un espécimen vegetal completo que con los cuidados necesarios se evito dañar las estructuras, realizándose el prensado y secado en un ambiente oscuro, fresco y seco, así como a la caracterización del ambiente, los cuales fueron necesarios para la realización de la ficha de colección, posteriormente fue derivada al “*Herbarium Arequipense*” de la Facultad de Ciencias Biológicas – Universidad Nacional de San Agustín, a cargo del Mg. Leoncio Mariño Herrera, el cual hizo constar que el espécimen suministrado corresponde a la especie *Tanacetum vulgare* L.



B. Recolección

a. Técnica

Manual

b. Fundamento

La recolección abundante, el secado y la conservación son recursos para tener a disponibilidad las plantas que no tenemos durante todo el año, por ejemplo, cuando se utilizan sólo las flores que están abiertas en un período determinado. Para una prudente y efectiva recolección de las plantas aromáticas y medicinales, debemos considerar que parte de la planta usamos (flor, fruto, hojas, raíz) (INTA ProHuerta, 2003).

c. Procedimiento

La recolección de los especímenes de “palma real” se efectuó en la comunidad de Ccota, distrito de Plateria, Provincia de Puno (Puno), a ~3811 msnm, localizada a una LS 15°56’15”, LO 69°49’15”W, entre los meses de enero – febrero (2022), recolectándose 15 kg de planta fresca, de las que se seleccionaron hojas en buen estado vegetativo, libres de agentes contaminantes, y en condiciones ambientales adecuadas, para posteriormente ser secadas.



C. Secado

a. Técnica

Dsecación (Cuervo & Hensel, 2016)

b. Fundamento

Una vez recolectada la planta se procedió al secado, en este caso mediante la técnica natural de preservación, que evita la proliferación de microorganismos, conservando su color verde, y con ello manteniendo los componentes aromáticos, puesto que el color amarillo de la hoja es indicativo que la planta ha reducido sus propiedades. El espécimen vegetal debe conservar una cantidad mínima humedad, en sus tejidos, que en el caso de flores u hojas, estas deben secarse evitando la exposición a la luz. Al efectuar esta técnica se toma en cuenta algunos requerimientos esenciales tales como un ambiente oscuro, ventilado, temperatura adecuada y baja humedad relativa, lo cual favorecerá el secado, para lo cual es ideal hacerlo en bandejas estériles, donde los especímenes vegetales estarán extendidos en capas con un grosor de 1 cm (Fretes, 2010; Palomino, 2016).

Para la conservación de la especie vegetal seca a corto plazo, esta puede realizarse en bolsas de papel por un período prolongado y mantenerse en recipientes completamente cerrados de vidrio oscuro, esto con la finalidad de impedir que pueda atravesar la luz, humedad, aromas y gases (INTA ProHuerta, 2003).



c. Procedimiento

Se realizo sobre un mesón en un lugar ventilado y seco, en la sombra, protegido de la luz solar, ya que las hojas son uno de los órganos vegetales más sensibles, evitando que los principios activos que contiene se degraden, durante 21 días (3 semanas), a partir de 15 kg de planta fresca obteniendo al final ~3 kg (Balanza marca Solis STB 6202e) de material vegetal seco para su posterior selección.

Tabla 6

Características de la recolección y secado de la Palma real

Condiciones de muestreo	Información de muestreo
Clima	Día despejado con presencia de algunas nubes (época de lluvias)
Estado vegetativo	Desarrollo vegetativo
Cantidad en fresco	15 kg de material fresco
Cantidad en seco	2044 kg de material seco óptimo
Lugar de muestreo	C.P. Villa Ccota, distrito de Plateria (Puno)
Fecha de muestreo	enero – febrero
Altitud	3811 m.s.n.m.
Lugar de secado	Secado natural (ambiente oscuro y seco)

Fuente: Elaboración propia

3.4.1.2. Extracción del aceite esencial

a. Técnica

Hidrodestilación (Khan et al., 2023)



b. Fundamento

Esta técnica de separación mediante vapor de agua, permite que se vaporicen los compuestos volátiles del material vegetal, a través de un canal, luego, estos vapores se enfrían y se condensan, generando un destilado líquido conformado por dos estados inmiscibles, una fase acuosa y la otra orgánica, que es el aceite esencial, siendo separado del hidrolato por decantación, debido a la diferencia de densidad presente entre ambas, mediante el uso de un vaso florentino (Casado, 2018; Montoya, 2010).

c. Procedimiento

Inicialmente se colocó la malla de soporte dentro de la cámara de extracción del hidrodestilador de 20 litros (Inox 340) e inmediatamente después se agregó 3 litros de agua destilada, de ahí se colocó encima el material vegetal seco (2043,6g) correspondiente a las hojas de *Tanacetum vulgare* L, luego se procedió a cerrar herméticamente la cámara de forma mecánica mediante 6 tornillos. De ahí, se procedió a conectar el resto del equipo como es la cámara refrigerante y las mangueras de ingreso, egreso y recirculación de agua. Posteriormente se conectó el equipo a 220V por 3 h alcanzando condiciones de $\sim 100^{\circ}\text{C}$ y ~ 1 atm de presión, luego de lo cual se recolectó 1600 ml de líquido que incluía el agua y aceite que fueron separados en una pera de decantación obteniendo 20 ml de aceite esencial, el cual inmediatamente fue recolectado y colocado en un frasco de color ámbar a 4°C para finalmente determinar su densidad, color y olor.



3.4.1.3. Rendimiento de aceite esencial

a. Técnica

Relación porcentual (Fuller et al., 2018).

b. Fundamento

Es importante conocer el volumen de aceite esencial extraído como producto de la hidrodestilación ya que permite tener una idea de la cantidad que se puede extraer mediante este procedimiento y comparar con otros (Fuller et al., 2018).

El rendimiento de los aceites esenciales (AE) precisa de diversos factores como tipo de materia prima (variedad, estado y órgano vegetal), ubicación geográfica, la estación del año (condiciones climáticas) en la que se recolecta, tiempo de secado, método de extracción, condiciones del equipo de extracción (diseño y material adecuado del equipo), tiempo de extracción, características de los flujos (estado y cantidad del material vegetal empleado, el volumen y la pureza del solvente utilizado, la cantidad de agua, distribución y flujo de vapor, temperatura de condensación, presión, tiempo de destilación, así mismo también podrían variar levemente la densidad) (Casado, 2018; Lopez & Caso, 2015; Ovares, 2016).

En la literatura de los AE, la determinación del rendimiento del aceite esencial de un material vegetal, usualmente se precisa como el cociente entre masa del aceite esencial obtenido respecto a la masa de materia prima vegetal introducida inicialmente (Casado, 2018). Por otra



parte, el rendimiento de los aceite esencial se puntualiza como la relación en gramos de aceite esencial obtenido con respecto a la cantidad en gramos de material vegetal utilizado, asimismo también se puede expresar en términos de volumen del aceite esencial en ml con respecto a la cantidad en gramos de material vegetal utilizado (fresco o seco) (Ovares, 2016).

Para la determinación del rendimiento de aceite esencial (AE), inicialmente, se realiza la medición del volumen y peso del aceite esencial extraído por especie y repetición, la determinación de la densidad del aceite esencial consta en pesar el aceite, obtenido de cada repetición y especie, previo registro de sus respectivos volúmenes, luego mediante una operación matemática que resulta al dividir la masa del aceite (gr) entre el volumen (ml) se obtuvo la densidad (Lopez & Caso, 2015).

c. Procedimiento

Para su determinación se aplica la siguiente fórmula (Fuller et al., 2018):

$$\%Rendimiento = \frac{Volumen_{AE} \times Densidad_{AE}}{Masa_{material\ vegetal\ seco}} \times 100$$

Donde:

Volumen_{AE}= Volumen de aceite esencial obtenido (ml)

Densidad_{AE}=Densidad del aceite esencial (g/ml)

Masa_{material vegetal seco}= Masa del material vegetal referido a las hojas (g)



3.4.2. Caracterización de la composición fitoquímica de compuestos volátiles del aceite esencial de hojas de *Tanacetum vulgare* L

a. Técnica

Cromatografía de gases – Espectrometría de masas (CG-EM) (Adams, 2007)

b. Fundamento

Es una técnica analítica que permite la separación, identificación y cuantificación de mezclas de sustancias volátiles y semivolátiles. Permite la identificación de compuestos del aceite esencial que son componentes volátiles y de bajo peso molecular (< 250 dalton). Cuando se cuenta con una sustancia patrón, la calibración del equipo puede lograr análisis cuantitativos exactos de la muestra (Fernandez, 2019; Montoya, 2010).

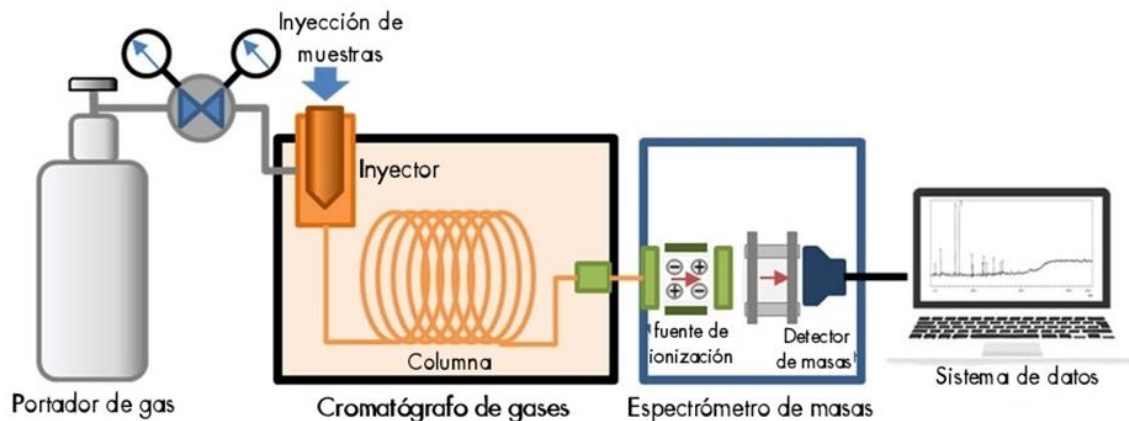
Para la fase gaseosa, se requiere muy poca cantidad de muestra (10 μ l) así se coloca directamente el aceite esencial en el equipo, sin ninguna variación previa, esto con el propósito de eliminar cualquier probabilidad de introducir modificaciones, evitando alteraciones en la composición de la muestra o en la estructura de sus componentes (Fernandez, 2019).

De este modo una mezcla de compuestos inyectado en el CG se divide en la columna cromatográfica, permitiendo registrar el espectro de cada una de las sustancias separadas consiguiendo la elución de los compuestos individuales al pasar por el EM, el cual es registrado en picos cromatográficos en las abscisas del cromatograma donde van los tiempos de retención en minutos, y en las ordenadas, el índice de intensidad relativa porcentual de las fracciones de las moléculas presentes, donde la identificación de los compuestos del aceite se sustenta en

patrones de fragmentación, que se observan en sus espectros de masas (Fernandez, 2019; Montoya, 2010; Quispe & Taco, 2018).

Figura 8

Cromatógrafo de gases/espectrómetro de masas (CG/EM)



Fuente: Kim & Choi (2020)

c. Procedimiento

El aceite esencial de palma real fue almacenado en un frasco color ámbar oscuro a 4 °C, y analizado en el Laboratorio de Cromatografía y Espectrofotometría de la Universidad de San Antonio de Abad del Cusco, para lo cual se empleó un equipo CG (Agilent 6890N Network GC – System) unido a EM (Agilent Technologies 5975B Inert XL GI/CI MSD) el cual consta de una columna Agilent HP-5MS 5% fenil metil siloxano de 30m x 0.25id x 0.5 μ m. La programación de temperatura del horno inicial fue de 60°C hasta alcanzar los 230°C (final) con un gradiente de 5°C/minuto. La inyección se efectuó en modo split (con división) con relación 1/80 a 200°C, para lo cual se empleó gas helio a un flujo 1 mL/min, con una inyección de 0,1 μ l de aceite esencial de palma real, bajo el modo de escaneo de masas de 40 a 500 u.m.a.



Inicialmente el aceite esencial fue introducido por el inyector automático (Agilent 7683B) del CG (Agilent 6890N Network GC – System) separándose en la columna cromatográfica (Agilent HP-5MS 5% fenil metil siloxano de 30m x 0.25mm x 0.5 µm film) , obteniendo así una elución sucesiva de los compuestos individuales aislados que pasan enseguida al EM (Agilent Technologies 5975B Inert XL GI/CI MSD). A medida que los compuestos individuales se eluyen de la columna CG, entran a ionización electrónica (especificación de masas) por el detector del EM (Agilent 5975B). Allí, son bombardeados con una corriente de electrones que los rompe en fragmentos, la fragmentación depende únicamente de la estructura molecular del compuesto, el EM no sólo detecta los compuestos, sino que primero genera iones, los separa y luego los detecta, registrando la corriente iónica total generada en la fuente iónica, cuya representación gráfica constituye el cromatograma, y cada uno de los picos en el cromatograma representa la señal creada cuando un compuesto se dirige desde la columna del CG al detector del EM (Agilent 5975B) y se distingue mediante su correspondiente espectro de masas, por lo cual mientras el equipo funciona, la computadora genera el cromatograma. En uno de los ejes muestra el tiempo de retención (TR), siendo considerado el tiempo desde que se realiza la inyección (tiempo cero) hasta que se produce la elución y en otro eje muestra la intensidad (abundancia). Cada compuesto en la mezcla interactúa independientemente. Aquellos con mayor interacción surgirán rápidamente de la columna. En cambio, aquellas que interactúen más lentamente aparecerán últimos de la columna.

Para la identificación de los compuestos volátiles a partir de su espectro de masas del aceite esencial se comparó con la base de datos de National Institute of Standards and Technology versión 11 (NIST v11), la base de datos compara el



espectro de masas de un componente de la muestra con otros espectros de masas de referencia en la base de datos, que expresa el contenido relativo de componentes volátiles en % aceite esencial, para lo cual cada pico del cromatograma indicaba la existencia de un compuesto, así también se obtuvieron datos porcentuales del contenido de cada componente.

3.4.3. Establecimiento de la susceptibilidad antibacteriana, concentración mínima inhibitoria y concentración mínima microbica del aceite esencial de hojas de *Tanacetum vulgare* L frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* multidrogoresistentes

3.4.3.1. Obtención de microorganismos multidrogoresistentes

a. Técnica

Equipo automatizado VITEK 2.0 211 Serie 000013D4383F que emplea el juego de parámetros de interpretación CLSI Natural 212 Resistance M100-S28-2018

b. Fundamento

Es un sistema automatizado para la identificación y pruebas de susceptibilidad de microorganismos clínicamente importantes. El sistema VITEK (bioMérieux-Vitek, Hazelwood, Missouri) fue diseñado originalmente como un sistema a bordo para la detección e identificación de patógenos del tracto urinario de astronautas en naves espaciales. Se introdujo por primera vez en laboratorios clínicos en 1979 y desde entonces se ha ido perfeccionando, el cual detecta cambios metabólicos basados en 47, 43, y 46 reacciones metabólicas para bacterias Gram



negativas (BGN), bacterias Gram positivas (BGP) y hongos respectivamente, mediante métodos basados en fluorescencia que facilitan la identificación de microorganismos. Este sistema monitorea la cinética del crecimiento bacteriano y calcula las CIM utilizando un algoritmo único siendo el tiempo promedio máximo de identificación de 10, 8 y 18 h para BGN, BGP y hongos, respectivamente y en cuanto al análisis de susceptibilidad antimicrobiana esta se realiza con el empleo de tarjetas que incluye diluciones estandarizadas de diversos antimicrobianos, empleando parámetros establecidos por el CLSI (Romeua et al., 2010; Vargas et al., 2005).

En el presente trabajo se utilizaron cepas clínicas multidrogoresistentes correspondientes a *Escherichia coli* Bionúmero 0405610550026600 resistente a ceftazidima, cefepima, aztreonam y ciprofloxacino, *S. aureus* Bionúmero 010402062763231 resistente a bencilpenicilina, eritromicina, clindamicina y tetraciclina, y *Candida albicans* Aislamiento 2052230622 resistente a voriconazol y anfotericina B.

c. **Procedimiento**

Los microorganismos empleados para el presente estudio fueron aislados en frascos de 5 ml con medio Trypticase Soya a partir del cual se preparó un inóculo de $\sim 8 \times 10^6$ UFC/ml (suspensión de McFarland 0,5) que fue utilizada con las tarjetas de identificación. De este modo el sistema VITEK 2 también procesó automáticamente las tarjetas de susceptibilidad a los antimicrobianos hasta obtener las CIM correspondientes.



3.4.3.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima microbicida para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*

a. Técnica

Macrodilución en caldo

b. Fundamento

Esta técnica consiste en la exposición de las cepas a analizar a distintas concentraciones de antimicrobianos, y evaluar el desarrollo de los microorganismos para posteriormente establecer la CMI (Taroco et al., 2006), también es ideal para la determinación de la actividad bactericida (García et al., 2000).

Por cada combinación microorganismo/agente antimicrobiano se dispone una serie de tubos con 1ml de medio estéril sin antimicrobiano, donde al primer tubo se añade 1 ml de la solución madre del tubo de antimicrobiano hasta conseguir la más alta dilución; para esto se repite la cantidad de diluciones que se requieran estudiar, descartando 1 ml del último tubo de la serie, con la finalidad de conservar el volumen final de 1 ml, también se considera una serie de control sin antimicrobiano conteniendo únicamente 1 ml de caldo (García et al., 2000).

c. Procedimiento

Para cada microorganismo, se realizó la preparación de diluciones dobles en tubos 13x100 mm (Marca Pyrex), partiendo de una solución madre conteniendo 4 ml de aceite esencial y 1 ml de reactivo de Tween 80



(Marca Omnichem SAC Lote N° 211012G010997) haciendo un total de 5 ml (800 μ l/ml), a partir del cual se obtuvieron 400 μ l/ml, 200 μ l/ml, 100 μ l/ml, 50 μ l/ml, 25 μ l/ml hasta 12,5 μ l/ml, para lo que inicialmente se colocó 500 μ l del diluyente Tween 80 en el primer tubo, y luego se añadió 500 μ l de solución madre dando un total de 1 ml en el primer tubo, que luego con una micropipeta automática (Marca Boeco Germany serie 9311100 rango 100 – 1000 μ l) se transfirió 500 μ l al segundo tubo, y así sucesivamente.

Paralelamente, se prepararon suspensiones microbianas, para lo cual se empleó 5 ml de caldo Müeller Hinton (Marca Merk 1.10293.0500) y 3-5 colonias de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* hasta alcanzar una turbidez equivalente a 0,5 en la escala de Mc Farland (Marca Emarin SDA S.A. LOT 210914). De esta suspensión, se añadió 500 μ l a cada una de la serie de tubos que contenían las diluciones dobles del aceite esencial, haciendo un volumen total de 1 ml en cada serie.

Para los controles, en el caso del control negativo solo se colocó 1 ml (1000 μ l) de Tween 80, y para el control positivo se añadió 1 ml (1000 μ l) de suspensión microbiana equivalente a 0,5 Mc Farland. De este modo, todos los tubos se incubaron a 37°C por 24 h (Ihebuzaaju, 2017; Taroco et al., 2006), luego del cual se midió su turbidez a 620 nm en un espectrofotómetro (Marca Spectronic 20D Milton Roy Company) (Ihebuzaaju, 2017) y de ahí se procedió a la siembra de 10 μ l de éstos en placas Petri (90x15 mm, Marca Henso Medical N14203-1) con agar nutritivo (marca Merck 1.05450.0500) para *Escherichia coli* y



Staphylococcus aureus, y en Agar Saboroud 4% dextrosa (marca Merck 1.05438.0500) para *Candida albicans*, siendo incubados por 24 h para bacterias y 48 h para la levadura en la incubadora (Marca H.W. Kessel S.A.C. MMM group), luego del cual se hizo el recuento de colonias respectivo (Ihebuzoaju, 2017). Todos los ensayos se realizó por triplicado.

3.4.3.3. Determinación de la susceptibilidad antibacteriana para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*

a. Técnica

Kirby-Bauer

b. Fundamento

Es una técnica de fácil estandarización para microorganismos no exigentes de desarrollo acelerado, para lo cual se emplea un aislamiento en placas que contengan un medio de cultivo apropiado para la cepa en estudio (a la que además se le deben brindar las propiedades atmosféricas adecuadas y específicas para cada cepa) (Taroco et al., 2006). De este modo, el microorganismo patógeno se cultiva en agar MH en la presencia de varios discos de papel filtro impregnados con antimicrobianos, donde la presencia o ausencia de crecimiento alrededor de los discos es un indicador de la capacidad del compuesto para inhibir ese microorganismo, lo que está correlacionado con las zona de inhibición dando resultados interpretativos (Biemer, 1973; Hudzicki, 2016).



c. Procedimiento

Para la preparación de discos de susceptibilidad (5 mm) se utilizó papel filtro Whatman N° 2, previamente esterilizado a calor seco en el horno esterilizador (KertLab ODHG-9240A) a 150 °C por 60 minutos, luego de lo cual con la ayuda de una micropipeta sobre una placa petri estéril se colocó 10 µl de diluciones del aceite esencial a las concentraciones de 400, 200, 100, 50, 25, 12,5 µl/ml, los que se dejaron por 15 minutos para una adecuada imbibición.

Para los controles, en el caso del control negativo solo se colocó 10 µl de Tween 80 (Marca Omnicem sac Lote N° 211012G010997) y para el caso del control positivo se utilizaron discos de susceptibilidad antimicrobiana como Gentamicina 10 µg (Bioanalyse Lot 220426B REF ASD04300) y Fluconazol 25 µg (Bioanalyse Lot 210825J REF ASD03930), los cuales fueron atemperados 1h antes de su empleo.

Finalmente, se prepararon suspensiones microbiológicas de los 3 microorganismos en estudio de los cuales se tomó unas 3-5 colonias hasta alcanzar una turbidez de 0.5 en la escala de Mc Farland (EMARIN SDA S.A LOT 210914) luego de lo cual se introdujo un hisopo estéril (ALKHOFAR modelo 150 mm 6") con la cual se procedió a sembrar (3 direcciones de ángulo recto) las placas de agar MH (Merck 1.05437.0500) para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, y de agar Saboroud 4% dextrosa (Merck 1.05438.0500) para *Candida albicans*, las que se dejó reposar por 5 minutos antes de colocar los discos de susceptibilidad con la ayuda de una pinza (MEDESY ITALY 1026 college), ejerciendo cierta



presión para su adherencia. A continuación, las placas se colocaron en la incubadora (marca H.W. Kessel s.a.c. MMM group) a 37°C por 24 h (*Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*) y 48 h (*Candida albicans*) (Taroco et al., 2006), después de lo cual se procedió a la medición de los halos de susceptibilidad con un vernier (Marca Uyustools CLA006) en un fondo oscuro (Taroco et al., 2006).

3.5. Análisis estadístico

El rendimiento fue determinado mediante la cantidad de aceite esencial extraído con respecto al total de materia vegetal recolectada expresado en porcentaje, mientras que la composición fitoquímica también fue expresada como porcentaje por el equipo de cromatografía de gases y espectrofotometría de masas (CG-EM).

Respecto a la evaluación de los datos del efecto antibacteriano del aceite esencial de *Tanacetum vulgare* L estos fueron analizados a través de la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI, $\mu\text{l/ml}$), la concentración mínima microbicida (CMB [Concentración Mínima Bactericida] y CMF [Concentración Mínima Fungicida], N° colonias $\times 10^2/\text{ml}$) y susceptibilidad microbiana (Halo de susceptibilidad, mm).

El CMI ($\mu\text{l/ml}$) y CMB ($\mu\text{l/ml}$) se establecieron mediante análisis de regresión y correlación lineal de Pearson para lo cual se evaluó previamente los supuestos de normalidad (Shapiro Willk), homogeneidad de varianzas (Breusch Pagan) y autocorrelación (Durbin Watson), luego de lo cual se calculó el coeficiente de correlación de Pearson empleando los 6 promedios de cada una de las concentraciones de aceite esencial de *Tanacetum vulgare* L evaluadas (12,5, 25, 50, 100, 200 y 400 $\mu\text{l/ml}$) y el recuento de colonias microbianas (Unidades Formadoras de Colonias $\times 10^2/\text{ml}$) para lo



cual se determinó la ecuación de regresión lineal a partir de la cual se calculó el CMI y el CMB con respecto a 1 y 0 UFC/ml.

En cuanto a la evaluación de la susceptibilidad bacteriana se empleó un diseño completamente randomizado (8 tratamientos con 3 repeticiones) evaluado mediante análisis de variabilidad de Kruskal Wallis y la prueba de comparaciones múltiples de Dunn, así como mediante el análisis de varianza Fisher y la prueba de comparaciones de T Student, previa verificación de los supuestos de normalidad (Shapiro Wilk) y homocedasticidad (Levene). En todas las comparaciones múltiples no se ajustó los valores de p debido a que se puede sobreajustar el error Tipo I, Además, se aplicó la prueba de tamaño de efecto como es el rango eta al cuadrado (ξ^2_{ordinal}) y omega parcial al cuadrado ($\hat{\omega}_p^2$) para medir el efecto de la concentración del aceite esencial frente a los indicadores de crecimiento microbiano, cuyo valor mientras más cercano a 1 indica mayor efecto.

Todos los datos fueron procesados con un nivel de significancia del 5%, a través del programa R versión 4.2.2 (Innocent and Trusting) empleando las librerías readxl (lectura de base de datos en excel), car y stat (análisis exploratorio, lmtest), ggstatsplot y PMCMRplus, mediante la función ggscatterstats, ggbetweenstats y lmtest.



CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RENDIMIENTO DE ACEITE ESENCIAL EXTRAÍDO DE HOJAS DE *Tanacetum vulgare* L POR HIDRODESTILACIÓN

$$\%Rendimiento = \frac{Volumen_{AE} \times Densidad_{AE}}{Masa_{material\ vegetal\ seco}} \times 100$$

Reemplazando con valores obtenidos en laboratorio es:

$$\%Rendimiento = \frac{20\ ml \times 0,8983\ g/ml}{2043,6\ g} \times 100 = 0,879$$

Como se observa el porcentaje de rendimiento de aceite esencial de *Tanacetum vulgare* L fue 0,88% el cual presentó consistencia oleosa de color amarillento claro, olor sui generis con una densidad de 0,8983 g/ml.

Sin embargo, Zúniga (2022) utilizando un método similar, solo logró un rendimiento de extracción de aceite esencial de *Tanacetum vulgare* L del 0,4% al igual que Solis et al. (2017) 0,4%; mientras que en otro estudio llevado a cabo cerca a Belgrado, Serbia, se extrajo aceites esenciales de las partes aéreas de la planta *Tanacetum vulgare* alcanzando un rendimiento del 0,32% (Devrnja et al., 2017). Asimismo, Vélez (2022) utilizando arrastre por vapor en una especie similar (*Tanacetum parthenium*), obtuvo un rendimiento muy bajo de aceite esencial (0,04%), lo que pudo deberse al tiempo y material utilizado en el proceso.

En otro trabajo de investigación, se detalló que los rendimientos de aceite esencial de cinco genotipos diferentes de *Tanacetum vulgare*, evaluados a lo largo de todo el



período vegetativo, variaron los rendimientos entre 0,14–0,45% en hojas y 0,35–0,79% en flores secas (Dragland et al., 2005). Además, se observó que el rendimiento del aceite esencial obtenido en poblaciones silvestres de *Tanacetum vulgare* recolectadas en 40 ubicaciones distintas de Noruega fluctuó en el rango 0,35–1,90% (Rohloff et al., 2004). Estos resultados destacan la complejidad y diversidad en la producción de aceites esenciales que revelan una notoria variabilidad intraespecífica, la cual se atribuye a factores como la variación genética y las condiciones ambientales.

Al parecer, las partes aéreas de *Tanacetum vulgare*, recolectadas en plena floración, generalmente contienen niveles de aceite esencial que oscilan entre el 0,1% y 0,5%; no obstante, se ha registrado en casos excepcionales porcentajes tan elevados como el 1,9% (Aćimović & Puvača, 2020). Esta variabilidad en la concentración de aceite esencial podría atribuirse a diversos factores, incluyendo condiciones climáticas, genéticas o geográficas. Además, es fundamental destacar la importancia de comprender y considerar esta variabilidad al evaluar el potencial aromático y medicinal de la planta.

Respecto a la técnica de hidrodestilación para la extracción de aceite esencial esta conserva los compuestos gracias a la presencia del agua circundante, que actúa como una barrera para evitar el sobrecalentamiento, además uno de los beneficios destacados de este método es que permite también la destilación a temperaturas inferiores a 100°C (Tongnuanchan & Benjakul, 2014).

4.2. COMPOSICIÓN FITOQUÍMICA DE COMPUESTOS VOLÁTILES DEL ACEITE ESENCIAL DE HOJAS DE *Tanacetum vulgare* L

Tabla 7

Compuestos volátiles del aceite esencial de hojas de Tanacetum vulgare L identificados por CG-EM

Pico	TR	Compuesto Librería Nist 11	CAS	Calidad	Contenido relativo (%)
1	7,3397	α -pineno	000080-56-8	96	0,3057
2	8,3969	β -felandreno	000555-10-2	94	6,8061
3	9,8262	o-cimeno	000527-84-4	97	1,1668
4	10,0757	Eucaliptol	000470-82-6	99	1,2138
5	10,8326	γ -terpineno	000099-85-4	97	0,4960
6	11,1159	Biciclo[3.1.0]hexan-2-ol, 2-metil-5-(1-metiletilo)-, (1 α ,2 β ,5 α)-	015537-55-0	96	1,0415
7	12,3507	β -Tujona	000546-80-5	96	1,6889
8	12,8539	Tujona	000546-80-5	98	83,0953
9	13,3571	Biciclo [3.1.0]hexan-3-ol, 4-metilen-1-(1-metiletilo)-, [1S-(1 α ,3 β ,5 α)]-	003310-02-9	86	0,6165
10	14,5284	Terpinen-4-ol	000562-74-3	97	0,1816
11	14,7272	α -Tuyenal	1000139-63-3	81	0,2543
12	21,789	Cariofileno	000087-44-5	99	0,1975
13	23,4382	1,6-Ciclododecadieno, 1-metil-5-Metilen-8-(1-metiletil)-[S-(E,E)]-	023986-74-5	99	0,1694
14	24,4192	Naftaleno, 1,2,3,5,6, 8a-hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletilo)-, (1S-cis)-	000483-76-1	99	0,1774
15	26,2713	Aromandendreno	000489-39-4	81	0,4276
16	27,8275	Oxaciclotetradecan-2-ona, 14-metil-	027198-63-6	91	0,1866
17	28,4322	1(2H)-naftalenona, octahidro-4a, 8a-dimetil-7-(1-metiletil)-, [4aR-(4 $\alpha\alpha$,7 β , 8 $\alpha\alpha$)]-	001803-39-0	98	0,3577

Nota: TR: Tiempo de retención, CAS: Servicio de Resúmenes Químicos.

Fuente: Reporte Análisis CG-EM, NIST v11



En la Tabla 7 se muestra información relacionada al cromatograma del aceite esencial de hojas de *Tanacetum vulgare* L obtenido por CG-EM, donde se aprecia tiempos de retención, compuestos volátiles detectados, factores de identificación y contenido relativo correspondientes a cada uno de los picos comparados con el espectro de masas almacenada en la librería de la base de datos NIST v11.

De este modo se encontró que las hojas de *Tanacetum vulgare* L tienen 17 compuestos volátiles, siendo el compuesto volátil con mayor cantidad relativa la α -tujona (83%), seguido por β -felandreno (7%) siendo ambos los terpenos más predominantes, y el resto de los compuestos (10%) que tienen una concentración por debajo del 2% son: β -Tujona (1,7%), eucaliptol (1,2%), o-cimeno (1,2%), γ -terpineno (0,5%), aromandendreno (0,4%), α -tuyenal (0,3%), α -pineno (0,3%), cariofileno (0,2%), naftalenona (0,2%), terpinen-4-ol (0,2%) y naftaleno (0,2%).

Los compuestos fitoquímicos obtenidos aquí en hojas de *Tanacetum vulgare* L, comparados con los de la literatura indican que su presencia y las concentraciones de éstos varían como es de esperar según especies vegetales y ámbito geográfico, así tenemos que Lazarevic et al. (2021) en el aceite esencial de plantas procedentes de Serbia señalan como componente principal a la β -tujona (49,8%) seguido del acetato de transcrisantenilo (22,3%). De igual modo, Bączek et al. (2017) encontraron en aceites esenciales de plantas de Polonia, una concentración alta de β -tujona (14,28%), eucaliptol (2,55%) y una más baja de α -tujona (0,83 %), además de otros monoterpenos oxigenados en mayor concentración, como el acetato de trans-crisantenilo (altamente dominante, 18,39 %), (E)-dihidrocarvona (11,02 %) y cetona de artemisia (9,15 %).

Como se indicaba, existen otros compuestos diferentes a los aquí presentes como lo menciona Devrnja et al. (2017) quienes reportan un alto contenido de acetato de trans-



crisantenilo (41,37%), trans-crisantenol (12,51%), transtujona (9,04%) y cis-tujona (5,28%), todos pertenecientes a compuestos monoterpénicos oxigenados. Asimismo, Ekundayo (1979) encontró que el monoterpeno predominante fue la iso-tujona (66-81%) y como componentes monoterpénicos menores el sabineno (3-6 %), α -terpineno (1-4%), y entre las de sesquiterpenos representando un contenido mucho menor (0,1-0,7%) estarían el cariofileno e hidrocarburos sesquiterpénicos identificados tentativamente como γ -cadineno, α -bergamoteno y β -elemeno.

Otra investigación realizada por Keskitalo et al. (1998) donde examinaron veinte muestras de aceite esencial de *Tanacetum vulgare* en Finlandia, encontraron que el componente más comúnmente hallado fue el alcanfor, ya sea solo o acompañado de diversos compuestos satélites como pinocamfona, 1,8-cineol, canfeno, acetato de crisantenilo, acetato de bornilo y acetato de isobornilo, aunque también se identificaron otros quimiotipos ricos en trans tujona, davador-D o cetona de artemisia, siendo los genotipos que presentaban alcanfor los más prevalentes en el norte de Finlandia, mientras que los genotipos con tujona eran los más predominantes en el sur de Finlandia.

En otro estudio llevado a cabo por Collin et al. (1993), se detectaron diversos quimiotipos en el aceite esencial de 25 plantas individuales de *Tanacetum vulgare* recolectadas en la región de Quebec, Canadá. La mitad de estas plantas manifestaron un quimiotipo mixto de alcanfor-1,8-cineol-borneol, con una concentración que superaba el 52%, asimismo, se evidenció que el quimiotipo de β -tujona predominaba, mostrando una presencia superior al 50% en seis de las muestras examinadas, mientras que en cuatro especímenes, se identificó un quimiotipo caracterizado por un predominio de crisantemona, superando el 50% y por último, se constató que una planta presentaba una notable concentración de dihidrocarvona, que superaba el 60%.



De otro lado, en dos aceites esenciales de *Tanacetum vulgare* procedentes de dos distritos de Estonia se identificaron 83 compuestos, donde en el distrito de Harju los componentes cuantitativos más importantes fueron trans-crisantenona con 41,4%, 1,8-cineol con 9,6%, β -pineno con 5,0% y 6-camfenona con 4,6%, y en el aceite del distrito de Tartu predominaron los compuestos de β -tuyona (47,2%) y acetato de trans-crisantenilo (30,7%) (Raal et al., 2014).

Asimismo, las plantas de *Tanacetum vulgare* recolectadas en Irán presentaron una alta cantidad de trans-tuyona (44%), alcanfor (31,04%) y acetato de trans-crisantenilo (31,1%) (Goudarzi et al., 2015), mientras que en el aceite esencial de *Tanacetum vulgare* recolectado en Polonia los principales compuestos fueron β -tuyona (61,0%), alcanfor (13,0%) y acetato de trans-crisantenilo (6,5%) (Szołtyga et al., 2014). Para el aceite esencial de *Tanacetum vulgare* recolectado en Alemania, los compuestos se dividieron en 3 quimiotipos: acetato de trans-carvilo ($8 \pm 2,6\%$), β -tuyona ($9 \pm 3,1\%$) y alcanfor ($9 \pm 2,7\%$) (Kleine & Müller, 2013). En el caso del aceite esencial de *Tanacetum vulgare* procedente de Eslovaquia, los principales compuestos identificados fueron: α -pineno, canfeno, sabineno, β -pineno, 1,8-cineol, cetona de artemisia, β -tuyona, alcanfor, borneol, acetato de crisantenilo, D-carvona (Mikulášová & Vaverková, 2021). Y en Turquía, los principales constituyentes de la composición del aceite esencial de *Tanacetum vulgare* resultaron ser el borneol, germacreno D, espatulenol, α -pineno, 1,8-cineol, β -pineno y alcanfor (Kilic, 2014).

De acuerdo con un análisis de conglomerados, el aceite esencial de *Tanacetum vulgare* proveniente de Lituania se clasifica en cuatro grupos distintos: 1,8-cineol, trans-tuyona, alcanfor y mirtenol (Mockutė & Judzentiene, 2003). Es relevante destacar que este último se produce de manera excepcional en las plantas de *Tanacetum vulgare*. En



Escandinavia y el Báltico se han descrito más de 15 quimiotipos distintos (Dragland et al., 2005), y la correlación entre las matrices de distancia genética de los mismos genotipos fue altamente significativa (Keskitalo et al., 2001).

En Noruega, se identificaron siete quimiotipos de *Tanacetum vulgare*, que incluyen α -tuyona, β -tuyona, alcanfor, acetato de crisantemilo/crisantemol, crisantenona, cetona de artemisia/alcohol de artemisia y 1,8-cineol (Rohloff et al., 2004).

Esta variabilidad de los compuestos podría ser debido al impacto ecológico sobre los aceites esenciales que se manifiesta por la interacción de las plantas con los factores ambientales. La capacidad de adaptación de las plantas al entorno se refleja en los niveles de aceites esenciales presentes (Stevović et al., 2009).

Según la compilación y el minucioso análisis de Mureşan (2015) sobre los resultados obtenidos a partir de la revisión de literatura concluye que hay una presencia significativa de β -tuyona, trans-tuyona, alcanfor y trans-crisantenilacetato como elementos específicos en los aceites esenciales extraídos de *Tanacetum vulgare* en 11 hábitats de diversos continentes como América, Europa y Asia.

Tabla 8

Clasificación de compuestos fitoquímicos encontrados en aceite esencial de hojas de *Tanacetum vulgare L*

Tipo de terpeno	Fitoquímico	Peso molecular (g/mol)	Fórmula química	Saturación	Ciclaje
Monoterpeno 64,70%	o-cimeno	134,22	C ₁₀ H ₁₄	Hidrocarburo 36.40%	Acíclico
	β-felandreno	136,23	C ₁₀ H ₁₆		Monocíclico
	γ-terpineno	136,23	C ₁₀ H ₁₆		Monocíclico
	α-pineno	136,23	C ₁₀ H ₁₆		Bicíclico
	Terpinen-4-ol	154,25	C ₁₀ H ₁₈ O	Oxygenado 63.70%	Monocíclico
	β-Tujona	152,23	C ₁₀ H ₁₆ O		Bicíclico
	Tujona	152,23	C ₁₀ H ₁₆ O		Bicíclico
	Biciclo[3.1.0]hexan-3-ol, 4-metileno-1-(1-metiletilo)-, [1S-(1α,3β,5α)]-	152,23	C ₁₀ H ₁₆ O		Bicíclico
	Eucaliptol	154,25	C ₁₀ H ₁₈ O		Bicíclico
	α-Tuyenal	150,22	C ₁₀ H ₁₄ O		Bicíclico
Biciclo[3.1.0]hexan-2-ol, 2-metil-5-(1-metiletilo)-, (1α,2β,5α)-	156,25	C ₁₀ H ₂₀ O	Bicíclico		
Sesquiterpeno 24,9%	1,6-Ciclododecadieno, 1-metil-5-Metilen-8-(1-metiletil)-[S-(E,E)]-	204,35	C ₁₅ H ₂₄	Hidrocarburo 80%	Monocíclico
	Cariofileno	204,35	C ₁₅ H ₂₄		Bicíclico
	Naftaleno, 1,2,3,5,6,8a hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletilo)-, (1S-cis)-	204,35	C ₁₅ H ₂₄		Bicíclico
	Aromandendreno	204,35	C ₁₅ H ₂₄	Tricíclico	
	1(2H)-naftalenona, octahidro-4a,8a-dimetil-7-(1-metiletil)-, [4aR-(4α,7β,8α)]-	222,37	C ₁₅ H ₂₆ O	Oxygenado 20%	Bicíclico
Macrólido y análogos 5.90%	Oxacicotetradecan-2-ona, 14-metil-	226,36	C ₁₄ H ₂₆ O ₂	Oxygenado	Monocíclico

Fuente: CG-EM NIST v11 y SpectraBase

En la Tabla 8 se muestra una clasificación de los compuestos volátiles aislados de hojas de *Tanacetum vulgare L* según su estructura química, donde predominan los monoterpenos con el 64,7% (o-cimeno, β-felandreno, γ-terpineno, α-pineno, terpinen-4-ol, β-tujona, tujona, biciclo[3.1.0]hexan-3-ol, 4-metileno-1-(1-metiletilo)-, [1S-



(1 α ,3 β ,5 α)-, eucaliptol, α -tuyenal, biciclo[3.1.0]hexan-2-ol, 2-metil-5-(1-metiletilo)-(1 α ,2 β ,5 α)-) entre los cuales sobresalen los monoterpenos oxigenados (63,7%) seguido de los monoterpenos hidrocarbonados (36,4%).

En cuanto al segundo grupo de compuestos volátiles encontrados, los sesquiterpenos (24,9%) (1,6-ciclododecadieno, 1-metil-5-metilen-8-(1-metiletilo)-[S-(E,E)]-, cariofileno, naftaleno, 1,2,3,5,6,8a hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletilo)-, (1S-cis)-, aromandendreno, 1(2H)-naftalenona, octahidro-4a,8a-dimetil-7-(1-metiletilo)-,[4aR-(4 α ,7 β ,8 α)]-) están representados por los hidrocarbonados (80%) seguido de los oxigenados (20%). Y como un tercer grupo de compuestos volátiles poco frecuente estuvo el compuesto perteneciente a los macrólidos (Oxaciclotetradecan-2-ona, 14-metil-)(5,9 %).

Según los tipos de terpenos encontrados, en comparación con el presente estudio, Lazarevic et al. (2021) también habrían reportado un alto porcentaje de monoterpenos oxigenados (87,9%), de la misma forma, Bączek et al. (2017) corroboran lo encontrado al indicar que el aceite esencial de *Tanacetum vulgare* procedente de Polonia tienen una buena proporción de compuestos químicos de tipo monoterpénico oxigenado (84,37%), hidrocarburos monoterpénicos (6,87%), hidrocarburos sesquiterpénicos (0,42%), sesquiterpenos oxigenados (5,08%) y otros compuestos alifáticos (0,51%) como el trans-crisantenol acetato como el principal compuesto encontrado.

Otros resultados algo parecidos, fueron reportados por Kleine & Müller (2013) para aceite esencial de hojas donde los monoterpenoides (acetato de trans-carvil, β -tujona y alcanfor) fueron predominantes y solo se encontró unos pocos sesquiterpenoides. De igual manera, Devrnja et al. (2017) reportan en el aceite esencial de partes aéreas vegetales secas un 93,5 % de monoterpenos oxigenados, 3,52% de monoterpenos con



hidrocarburos, 0,65% de sesquiterpenos oxigenados, 0,03% de hidrocarburos sesquiterpénicos, 1,76 % de hidrocarburos aromáticos y 0,12 % de alcoholes aromáticos.

En el aceite esencial de *Tanacetum vulgare* recolectada en Juiz de Fora, Brasil, se identificaron un total de 7 compuestos, siendo seis monoterpenos (89,58%) y un sesquiterpeno (6,81%), siendo la β -tuyona (84,15%) identificada como el constituyente mayoritario (Godinho et al., 2014). Según Acero et al. (2019) los terpenos tienen mayor volatilidad, se hallan mayormente en flores y son repelente de insectos, siendo producto del metabolismo secundario vegetal, y constituyendo una de las familias más grandes que tienen los aceites esenciales, reportándose ~2000 variedades.

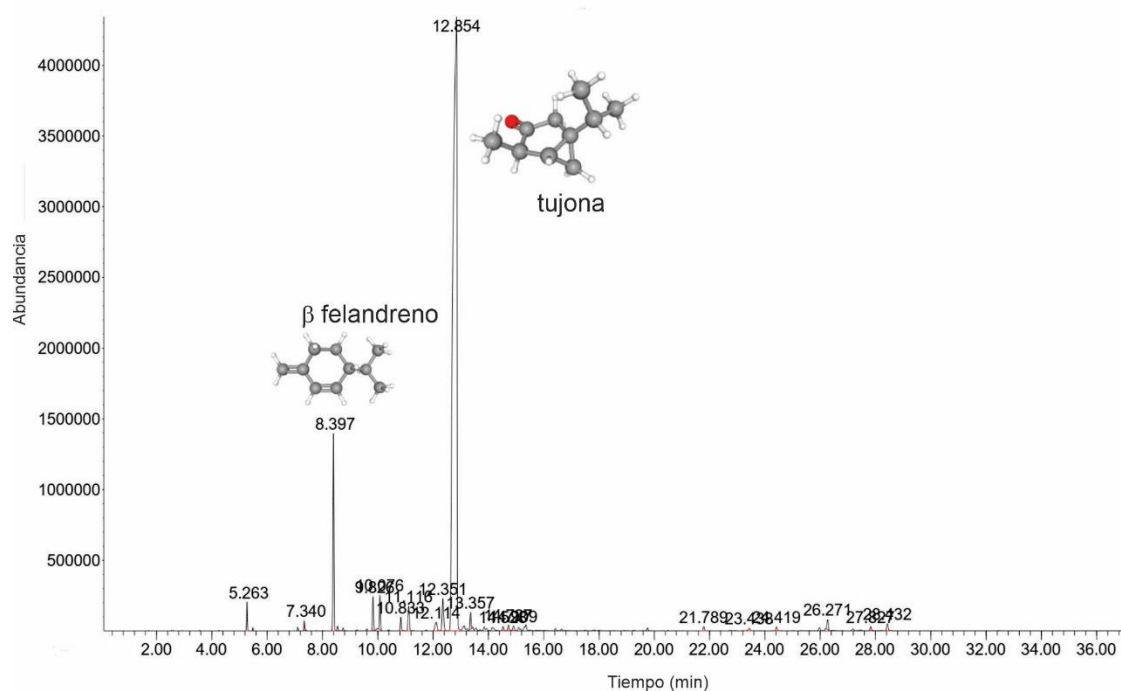
Y en cuanto a la presencia de oxaciclotetradecan-2-ona, 14-metil- un compuesto similar a un macrólido, este no se ha reportado mucho en la literatura más que por ejemplo en hojas de *Cardiospermum halicacabum*, una especie vegetal india con actividad antibacteriana y antifúngica (Jeyadevi et al., 2013).

Respecto a esto, una mayor variabilidad química puede explicarse por la forma de propagación de la halogamia, así como por el carácter heterocigótico de esta planta y probablemente también debido al procedimiento de extracción (Aziz et al., 2018; Sehaki et al., 2022).

Según Mureşan (2015) los componentes fitoquímicos identificados de manera consistente en muestras provenientes de 11 hábitats distintos alrededor del mundo, destacan la universalidad de su presencia en diferentes áreas geográficas para esta especie.

Figura 9

*Perfil cromatográfico de los componentes presentes en el aceite esencial de la hoja de *Tanacetum vulgare* L obtenido por cromatografía de gases acoplado a espectrofotometría de masas*



Fuente: CG-EM NIST v11 y SpectraBase

Como se observa en la Figura 9, el tiempo de retención de 12,8539 minutos que corresponde al pico 10 representa al compuesto con mayor abundancia en el aceite esencial que corresponde a la tujona, seguido por otro pico con tiempo de retención 8,397 minutos correspondiente al β -felandreno (Figura 10) es decir estaría relacionado directamente con su bajo peso molecular y la abundancia de estos, donde cada factor de identificación (Tabla 7) garantiza la similitud de los compuestos con la base de datos NIST v11. La importancia de este indicador también es compartida por Mothana et al (2013), en quienes al trabajar con aceite esencial de *Leucas virgata* Balf. señalan que los tiempos de retención son importantes para valorar la similitud de los compuestos encontrados con los de la librería a comparar. De igual forma, El-Nashar et al. (2021)



(Egipto) encontraron que la composición química del aceite esencial de *Syzygium cumini*, fue un factor en su determinación que también va relacionado con el peso molecular del principio activo en comparación con una serie de n-alcenos (C8-C28) inyectado en las mismas condiciones.

4.3. SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA, CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA MICROBICIDA DEL ACEITE ESENCIAL DE HOJAS DE *Tanacetum vulgare* L FRENTE A *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* Y *Candida albicans* MULTIDROGORESISTENTE

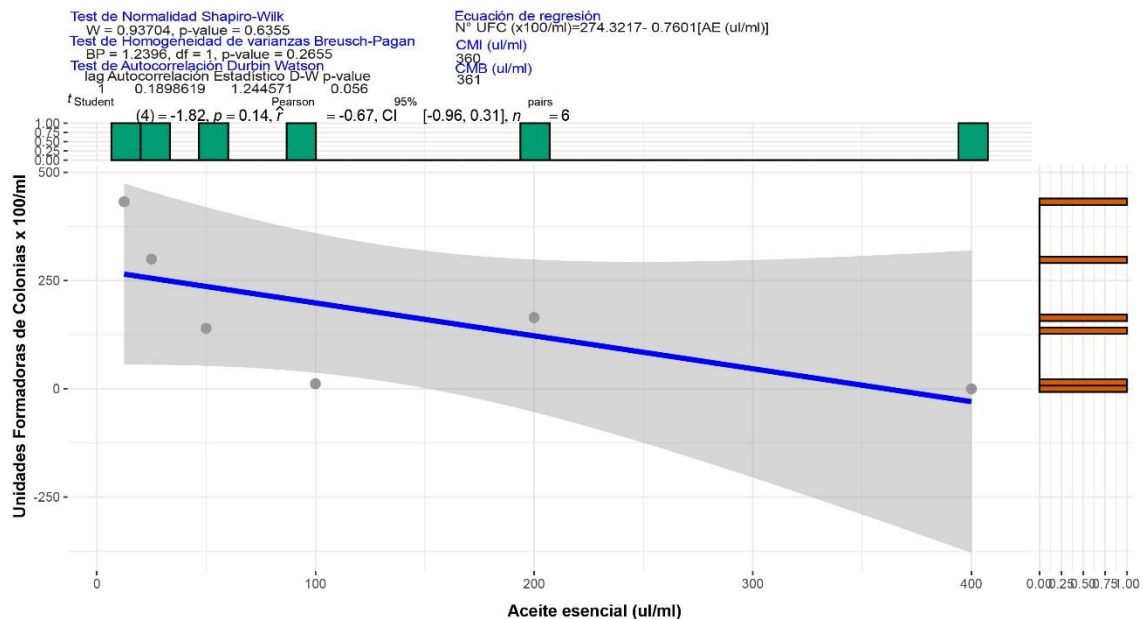
4.3.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima microbiana del aceite esencial de hojas de *Tanacetum vulgare* L mediante la técnica de macrodilución en caldo

En la Figura 10, se ve a través del análisis de correlación lineal, que existe una buena correlación negativa ($r=-0,67$), así como un coeficiente de la pendiente β_1 de la ecuación de regresión lineal que no fue estadísticamente significativa, sin embargo, se pudo determinar que el CMI y CMB frente a *Escherichia coli* para el aceite esencial de hojas de *Tanacetum vulgare* L fue de 360 y 361 $\mu\text{l/ml}$, respectivamente.

En cuanto a esto, según Bączek et al. (2017), en Polonia, indican que el aceite esencial de *Tanacetum vulgare* L demostró efecto antibacteriano contra *Escherichia coli* ATCC 25922, con un CMI de 8 $\mu\text{l/ml}$ y un CMB mayor de 32 $\mu\text{l/ml}$, demostrando una relativa mejor actividad antibacteriana.

Figura 10

Análisis de regresión y correlación lineal entre el crecimiento microbiano (UFC x 100/ml) de Escherichia coli y la concentración de aceite esencial de hojas de Tanacetum vulgare L



Donde: \hat{r}_{Pearson} = estimador de la correlación, n_{pairs} = número de elementos pares, t_{Student} = Prueba T Student, p = **Probabilidad** de rechazar la hipótesis nula cuando esta es verdadera siendo el umbral 0,05 (significativo), ul/ml = microlitros por ml, CI_{95%} = Intervalo de Confianza al 95%, CMI = Concentración Mínima Inhibitoria, CMB = Concentración Mínima Bactericida

Fuente: Matriz de tabulación de datos procesado con el programa R version 4.3.1 (2023-06-16 ucrt) -- "Beagle Scouts" Copyright (C) 2023 The R Foundation for Statistical Computing Platform: x86_64-w64-mingw32/x64 (64-bit)

Por otro lado, en España, Clemente et al. (2016) encontraron que el aceite esencial de *Sinapis alba* (alil isotiocianato 90-95%) y *Cinnamomum zeylanicum* (extraído de corteza fortificado con cinnamaldehído) mostró un CMI de 12,5 a 400 $\mu\text{g/ml}$ y un CMB de 12,5 a $>1600 \mu\text{g/ml}$ frente a *Escherichia coli* y *Escherichia coli* O157:H7. De igual modo, en Etiopía, Gishen et al. (2020) observaron actividad antibacteriana del aceite esencial puro de *Cymbopogon*



*citratu*s (CMI de 62.5 a 125 μ l/ml), *Lavandula angustifolia* (CMI de 62.5 a 250 μ l/ml), y *Mentha piperita* (CMI de 62.5 a 125 μ l/ml) frente a *Escherichia coli*. En Australia, Nirmal et al. (2018) encontraron también efecto antibacteriano del aceite esencial de *Backhousia citriodora* con un CMI del 0,625% (625 μ l/ml) frente a *Escherichia coli*, mientras que en Venezuela, Fajardo et al. (2021) descubrieron que el aceite esencial (germacreno-D, 45,80%) de las hojas de *Ageratina neriifolia* tenían un CMI de 75 μ g/ml frente a *Escherichia coli*.

En Perú, Cucho et al. (2021) identificaron actividad antimicrobiana en los aceites esenciales de hojas de Croton, en especies como *Croton adipatus* (β -mirceno, 18,34%), *Croton thurifer* (monoterpeno C₁₀H₁₆, 22.38%) y *Croton collinus* (β -cariofileno), con un CMI >1000 μ g/ml frente a *Escherichia coli* ATCC 25922. Además, Solís et al. (2019) observaron que el aceite esencial de hojas de *Ageratina pentlandiana* (Cusco, 2557 msnm) también tenían efecto sobre *Escherichia coli*, con una CMI \sim 57.7 μ l/ml y una CMB de \sim 64,8 μ l/ml. Finalmente, Devrnja et al. (2017) al analizar la composición química del aceite esencial y los extractos de metanol (ME) de diferentes partes de *Tanacetum vulgare* L, observaron una fuerte actividad antimicrobiana contra *E. coli*, con un CMI/CMB de 0,03^d/0,053^d.

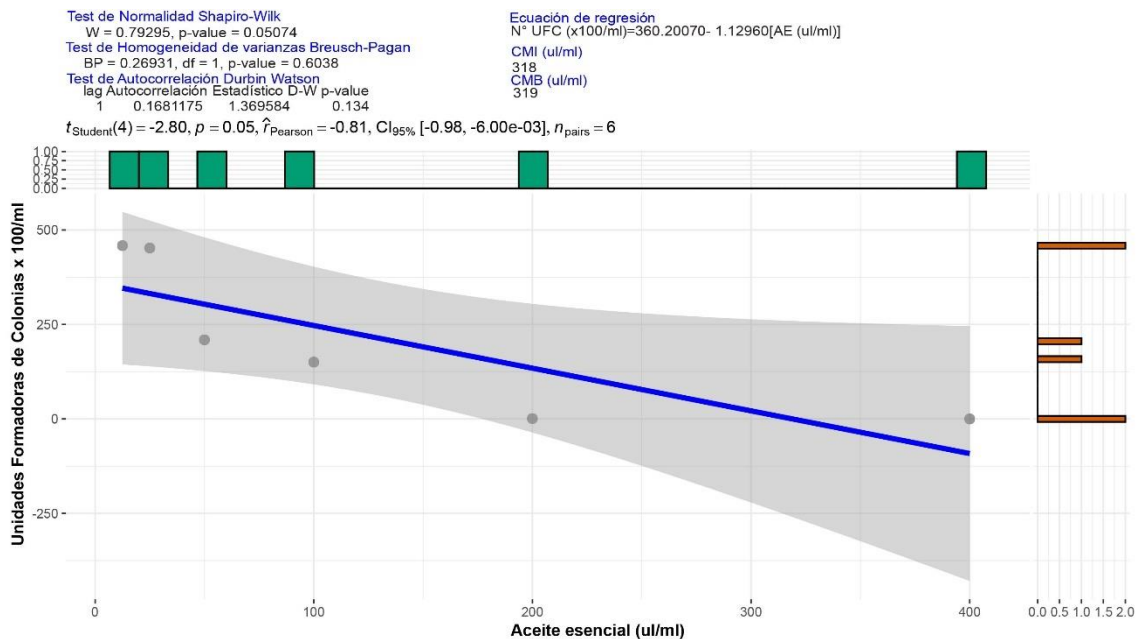
Los resultados de actividad antibacteriana realizados por Devrnja et al. (2017) evidenciaron un marcado efecto inhibitorio en el crecimiento de las bacterias Gram-negativas, particularmente en el caso de *Escherichia coli*, utilizando el aceite esencial de *Tanacetum vulgare*. Los valores de CMI y CMB resultaron ser más bajos en comparación a estreptomycin y ampicilina como agentes de referencia.



Coté et al. (2017) muestran que el aceite esencial de *Tanacetum vulgare* fue efectivo contra de *Escherichia coli* con un IC50 a 241 µg/MI. Estos estudios resaltan la diversidad de propiedades antimicrobianas en aceites esenciales de diferentes plantas y su variabilidad en la inhibición de cepas de *Escherichia coli*.

Figura 11

*Análisis de regresión y correlación lineal entre el crecimiento microbiano (UFC x 100/ml) de *Staphylococcus aureus* y la concentración de aceite esencial de hojas de *Tanacetum vulgare* L*



Donde: $\hat{r}_{Pearson}$ = estimador de la correlación, n_{pairs} = número de elementos pares, $t_{Student}$ = Prueba T Student, p = Probabilidad de rechazar la hipótesis nula cuando esta es verdadera siendo el umbral 0,05 (significativo), ul/ml = microlitros por ml, $CI_{95\%}$ = Intervalo de Confianza al 95%, CMI = Concentración Mínima Inhibitoria, CMB = Concentración Mínima Bactericida

Fuente: Matriz de tabulación de datos procesado con el programa R version 4.3.1 (2023-06-16 ucrt) -- "Beagle Scouts" Copyright (C) 2023 The R Foundation for Statistical Computing Platform: x86_64-w64-mingw32/x64 (64-bit)

La Figura 11, muestra a través del análisis de correlación lineal, que existe una buena correlación negativa ($r = -0,81$) en la que el coeficiente de la pendiente β_1 de la ecuación de regresión lineal sí fue estadísticamente significativo, encontrándose un CMI y un CMB frente a *Staphylococcus aureus* para el aceite esencial de hojas de *Tanacetum vulgare* L de 318 y 319 $\mu\text{l/ml}$, respectivamente.



Según el estudio de Bączek et al. (2017) en Polonia, el aceite esencial de *Tanacetum vulgare* mostró actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, con una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 4 $\mu\text{L}/\text{ml}$ y una Concentración Mínima Bactericida (CMB) de 8 $\mu\text{L}/\text{ml}$. Por otro lado, en Etiopía, Gishen et al. (2020) encontraron actividad antibacteriana en 50 μL de aceite esencial puro de *Cymbopogon citratus* (CMI de 62.5 a 125 $\mu\text{L}/\text{ml}$), *Lavandula angustifolia* (CMI de 62.5 a 250 $\mu\text{L}/\text{ml}$) y *Mentha piperita* (CMI de 62.5 a 125 $\mu\text{L}/\text{ml}$) frente a *Staphylococcus aureus*.

En Australia, Nirmal et al. (2018) observaron efecto antibacteriano del aceite esencial de *Backhousia citriodora* frente a *Staphylococcus aureus*, con una CMI del 0.156%. En el caso de las asteráceas en Venezuela, Fajardo et al. (2021) identificaron que el aceite esencial de hojas de *Ageratina neriifolia* (germacreno-D, 45.80%) tenía una CMI de 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ frente a *Staphylococcus aureus*. Además, Aparicio et al. (2019) determinaron que el aceite esencial de *Libanothamnus neriifolius*, que contiene β -felandreno (29.04%), mostró actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, con una CMI de 50 $\mu\text{L}/\text{ml}$.

En el Perú, Cucho et al. (2021) encontraron actividad antimicrobiana en los aceites esenciales de hojas de Croton, como *Croton adipatus* (β -mirceno, 18.34%), *Croton thurifer* (Monoterpeno $\text{C}_{10}\text{H}_{16}$, 22.38%), y *Croton collinus* (β -cariofileno), con una CMI que varió de 72 a 286.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Solís et al. (2019) demostraron que el aceite esencial de hojas de *Ageratina pentlandiana* (Cusco, 2557 msnm) tuvo un efecto sobre *Staphylococcus aureus*, con CMI y CMB mayores de 11.9 $\mu\text{L}/\text{ml}$. Por otro lado, Devrnja et al. (2017) analizaron la composición química del aceite esencial y los

extractos de metanol (ME) de diferentes partes de la planta *Tanacetum vulgare* L., y encontraron una fuerte actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, con una CMI/CMB de 210^d µg/ml y 850^d µg/ml. Finalmente, Coté et al. (2017), también encontraron actividad antibacteriana del aceite esencial de *Tanacetum vulgare* recolectado en Canadá contra *Staphylococcus aureus*, mostrando un 50% de inhibición en el crecimiento bacteriano (IC50).

Coté et al. (2017) demostraron la eficacia del aceite esencial de *Tanacetum vulgare* frente a *S. aureus*, exhibiendo un IC50 de 59 µg/mL. Además, llevaron a cabo pruebas para evaluar la actividad antibacteriana de los componentes principales de dicho aceite esencial contra *S. aureus*. Se observó que el óxido de cariofileno y el terpineno también presentaron actividad frente a *S. aureus*, con valores de IC50 de 10.4 µg/mL y 50 µg/mL, respectivamente. Es relevante destacar que la actividad antibacteriana del óxido de cariofileno y el terpineno ha sido previamente documentada en la literatura científica (Gupta, 2010;Hsouna et al, 2013).

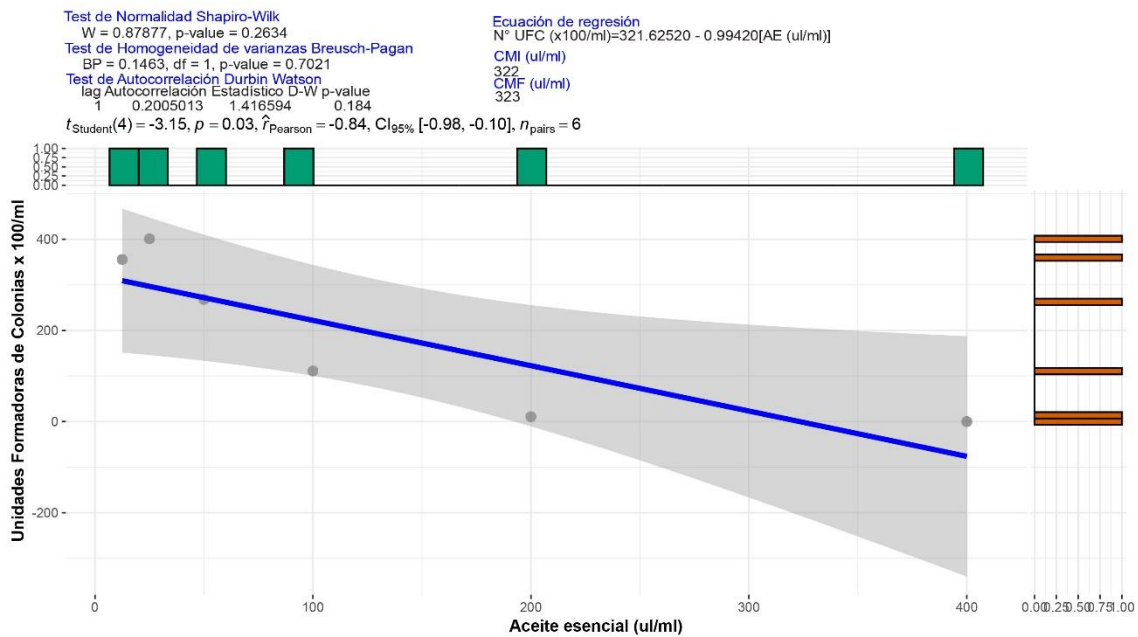
Estos estudios demuestran una amplia gama de actividad antibacteriana en aceites esenciales de diferentes plantas y su variabilidad en la inhibición del crecimiento de cepas de *Staphylococcus aureus*.

Al respecto, en Etiopía, Gishen et al. (2020) observaron actividad anticandidiásica para 50 µL de aceite esencial puro de *Cymbopogon citratus* (CMI de 62,5 a 125 µl/ml), *Lavandula angustifolia* (CMI de 62,5 a 250 µl/ml) y *Mentha piperita* (CMI de 62,5 a 125 µl/ml). Esto sugiere que estos aceites esenciales tienen potencial para inhibir el crecimiento de esta especie fúngica. De igual modo, Aparicio et al. (2019) encontraron que el aceite esencial de *Libanothamnus*

neriifolius, que contiene β -felandreno en un 29,04%, tiene un CMI de 700 μ l/ml lo cual es inferior a la actividad reportada aquí

Figura 12

Análisis de regresión y correlación lineal entre el crecimiento microbiano (UFC x 100/ml) de *Candida albicans* y la concentración de aceite esencial de hojas de *Tanacetum vulgare* LZ



Donde: $\hat{r}_{Pearson}$ = estimador de la correlación, n_{pairs} = número de elementos pares, $t_{Student}$ = Prueba T Student, p = Probabilidad de rechazar la hipótesis nula cuando esta es verdadera siendo el umbral 0,05 (significativo), ul/ml = microlitros por ml, $CI_{95\%}$ = Intervalo de Confianza al 95%, CMI = Concentración Mínima Inhibitoria, CMB = Concentración Mínima Bactericida

Fuente: Matriz de tabulación de datos procesado con el programa R version 4.3.1 (2023-06-16 ucrt) -- "Beagle Scouts" Copyright (C) 2023 The R Foundation for Statistical Computing Platform: x86_64-w64-mingw32/x64 (64-bit)

La Figura 12, muestra también a través del análisis de correlación lineal, que existe una buena correlación negativa ($r = -0,84$) en la que el coeficiente de la pendiente β_1 de la ecuación de regresión lineal sí fue estadísticamente significativo, encontrándose un CMI y un CMF frente a *Candida albicans* para el



aceite esencial de hojas de *Tanacetum vulgare* L de 322 y 323 $\mu\text{l/ml}$, respectivamente.

Por otro lado, en Perú, Cucho et al. (2021) también encontraron actividad anticandidiásica para los aceites esenciales de hojas de diferentes especies de Croton, como ocurre en *Croton adipatus* (β -mirceno, 18,34%), *Croton thurifer* (monoterpeno $\text{C}_{10}\text{H}_{16}$, 22,38%), y *Croton collinus* (β -cariofileno), con CMI's que varían de 576,2 a $>1000 \mu\text{g/ml}$ lo que indica que algunos de estos aceites esenciales pueden tener un efecto inhibitor moderado algo menor a lo reportado aquí.

No obstante, Özek et al. (2007) hallaron que el aceite esencial destilado en agua de las partes aéreas de *Tanacetum cadmeum* tuvo efecto antimicrobiano significativo y un efecto antimicótico similar al medicamento Ketonazole frente a *Candida albicans*, a una concentración efectiva de 125 $\mu\text{g/ml}$, lo que sugiere su buen uso potencial.

Para otros hongos similares (excepto *Aspergillus niger* y *Trichoderma viride*) Devrnja et al. (2017) observaron los valores de concentración inhibitoria mínima y concentración fungicida mínima (MFC) para el aceite esencial de *Tanacetum vulgare* se asemejan a bifonazol y ketoconazol. Destacan especialmente, la notable actividad en la prueba de microdilución contra *Penicillium funiculosum*, donde tanto los valores de IMC como los de FMC fueron significativamente más bajos en comparación con los antifúngicos de referencia.

En concreto, estos estudios demuestran que los aceites esenciales de diferentes plantas tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de *Candida albicans* multidrogoresistente, lo que sugiere su utilidad en aplicaciones



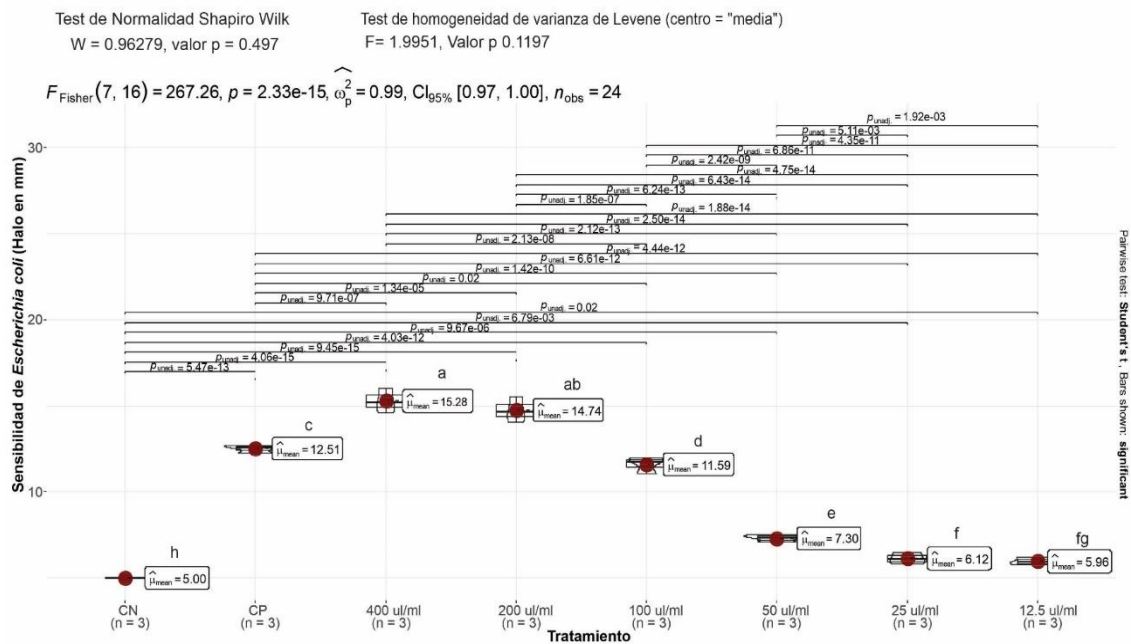
antimicóticas. Los resultados varían según la planta y la composición química de sus aceites esenciales.

4.3.2. Determinación de la susceptibilidad microbiana mediante el método de difusión Kirby Bauer

En la Figura 13, se aprecia que existen diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos de aceite esencial de hojas de *Tanacetum vulgare* L frente a *Escherichia coli* a través del análisis de varianza de Fisher ($F_{Fisher} = 267,26$; $p = 2,33 \times 10^{-15}$ $n = 24$), en la que el 99% ($\hat{\omega}_p^2 = 0,99$, $IC_{95} 0,97-1,00$) del efecto del tratamiento explica la inhibición de crecimiento microbiano. Asimismo, a través de la prueba de comparaciones múltiples de T Student se halló que existe efecto significativo a 400^a y 200 $\mu\text{l/ml}^{\text{ab}}$ de aceite esencial de *Tanacetum vulgare* L en la inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* (15,28 y 14,74 mm, respectivamente) comparado con la gentamicina (12,51 mm), es decir se rechaza la hipótesis nula, y se acepta la hipótesis alternativa, demostrando que hubo efecto antimicrobiano significativo del aceite esencial frente a *Escherichia coli*.

Figura 13

Análisis de variabilidad de Fisher y prueba de comparaciones múltiples de t Student de la susceptibilidad en Escherichia coli por efecto del aceite esencial de hojas de Tanacetum vulgare L



Donde: CN=Control Negativo (Tween 80), CP=Control Positivo (disco de Gentamicina 10 μ g), $\hat{\omega}_p^2$ = estimador de la mediana, n = número de unidades experimentales, F_{Fisher} =estadístico de Fisher, $\hat{\omega}_p^2$ = Omega parcial al cuadrado, p=Probabilidad de rechazar la hipótesis nula cuando esta es verdadera siendo el umbral 0,05 (significativo), ul/ml=microlitros por ml, CI95%=Intervalo de Confianza al 95%, a,b,...=Letras de significancia en orden de importancia del tratamiento aplicado resultado de la prueba de comparaciones múltiples

Fuente: Matriz de tabulación de datos procesado con el programa R version 4.3.1 (2023-06-16 ucrt) -- "Beagle Scouts" Copyright (C) 2023 The R Foundation for Statistical Computing Platform: x86_64-w64-mingw32/x64 (64-bit)

Concerniente a esto, en un estudio llevado a cabo en Rumania por Mureşan et al. (2015), se encontró que el extracto hidroalcohólico como el aceite esencial de las flores de *Tanacetum vulgare* tenían actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram negativas de *Tanacetum vulgare*, cuando se aplicaron sobre *Escherichia coli*, logrando diámetros de inhibición de 7-8 mm, lo que sugiere una



actividad moderada, menor a la reportada aquí. De otro lado, Patterson et al. (2017) señalan una baja actividad del aceite esencial de manuka (6 mm), una moderada actividad para clavo de olor (12 mm), té (13 mm) y complejo Thieves (13 mm), mientras que una mejor actividad para el tomillo (20,5 mm), orégano (21 mm) y canela (24 mm). De igual modo, Puvača et al. (2021) registraron un buen efecto del té con un halo de 21 mm (*Escherichia coli*) y 18 mm (*Escherichia coli* ATCC 25922).

Asimismo, la evaluación antimicrobiana frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 como el de Semeniuc et al. (2017) mencionan que el aceite esencial de perejil (9,60 mm), apio (9,85 mm), perejil/apio (9,95 mm) tienen baja actividad, mientras que el de apio/albahaca (11,95 mm), perejil/albahaca (12,19 mm) tendría una actividad moderada y una mejor actividad correspondería al de albahaca (14,85 mm), apio/tomillo (20,25 mm), perejil/tomillo (23,03 mm), albahaca/tomillo (25,76 mm) y tomillo (36,41 mm).

Kowalonek et al. (2023) llevó a cabo una investigación que vinculó la reducción en la cantidad de células bacterianas viables en una superficie con el aumento de la concentración de aceite de *Tanacetum vulgare* en materiales que contenían alginato. En este contexto, se observó que las muestras con un 1,67% y un 2% de aceite exhibieron propiedades antibacterianas contra *Escherichia coli*, un patógeno humano comúnmente asociado a infecciones nosocomiales.

Los aceites esenciales están compuestos por una amplia variedad de componentes, de acuerdo con la información recopilada en la literatura científica, la mayoría de estos compuestos son monoterpenos oxigenados, los cuales son responsables de las propiedades antimicrobianas (Bączek et al., 2017; Devrnja et

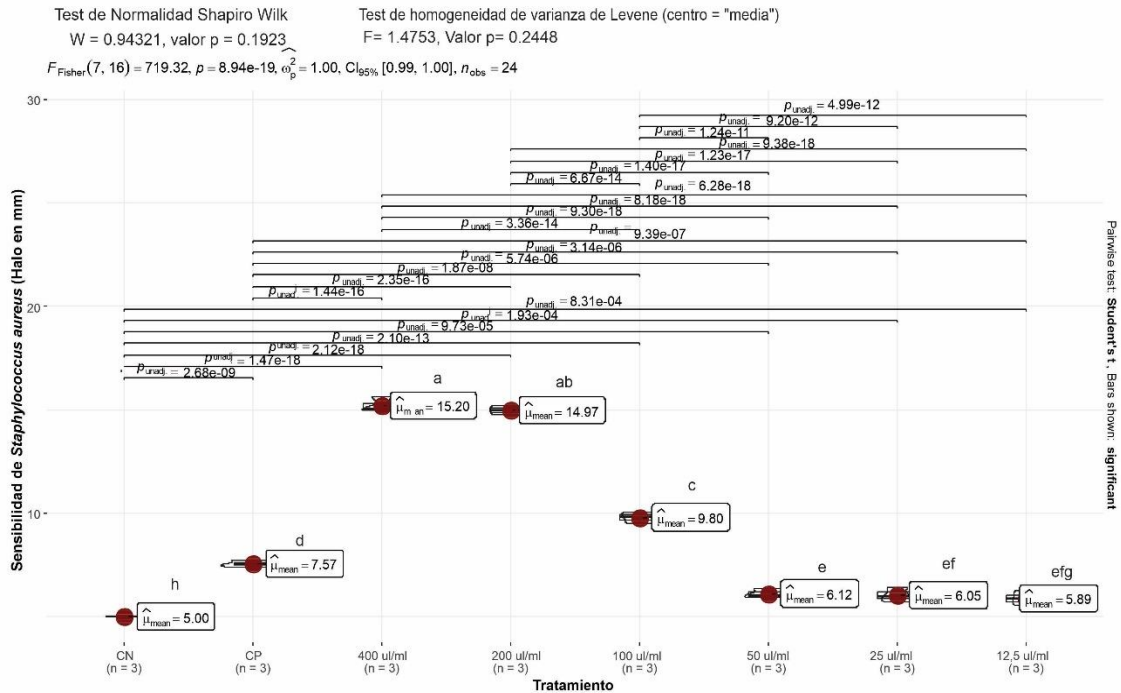


al., 2017; Keskitalo et al., 2001). En el presente estudio, la actividad antimicrobiana se atribuye principalmente a los terpenos, que constituyen el grupo dominante de estos compuestos. Mediante el uso de cromatografía de gases con espectrometría de masas y basándonos en la información disponible en la literatura, se identificó que las tuyonas podrían ser el principal componente antibacteriano presente en el aceite esencial de *Tanacetum vulgare* L.

No obstante, es importante destacar que todos los constituyentes presentes en el aceite esencial interactúan entre sí, generando la actividad global del aceite.

Figura 14

Análisis de variabilidad de Fisher y prueba de comparaciones múltiples de t Student de la susceptibilidad en Staphylococcus aureus por efecto del aceite esencial de hojas de Tanacetum vulgare L



Donde: CN=Control Negativo (Tween 80), CP=Control Positivo (disco de Gentamicina 10 μ g), $\hat{\mu}_{median}$ = estimador de la mediana, n = número de unidades experimentales, F_{Fisher} =estadístico de Fisher, $\hat{\omega}_p^2$ = Omega parcial al cuadrado, p=Probabilidad de rechazar la hipótesis nula cuando esta es verdadera siendo el umbral 0,05 (significativo), ul/ml=microlitros por ml, $CI_{95\%}$ =Intervalo de Confianza al 95%, a,b,...=Letras de significancia en orden de importancia del tratamiento aplicado resultado de la prueba de comparaciones múltiples

Fuente: Matriz de tabulación de datos procesado con el programa R version 4.3.1 (2023-06-16 ucrt) -- "Beagle Scouts" Copyright (C) 2023 The R Foundation for Statistical Computing Platform: x86_64-w64-mingw32/x64 (64-bit)

En la Figura 14, se observa que existen diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos de aceite esencial de hojas de *Tanacetum vulgare L* frente a *Staphylococcus aureus* a través del análisis de varianza de Fisher ($F_{Fisher} = 719.32$; $p = 8.94 \times 10^{-19}$ n= 24), en la que el 100% ($\hat{\omega}_p^2 = 1.00$, $IC_{95} 0.99-1.00$) del efecto del tratamiento explica la inhibición de

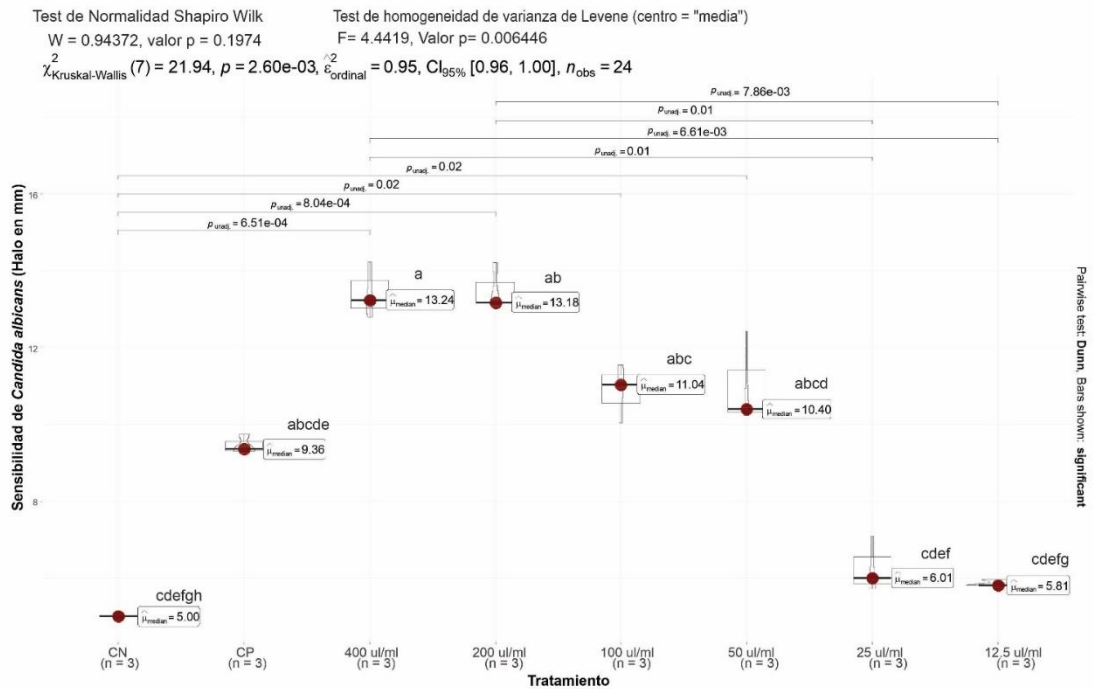


crecimiento microbiano. Asimismo, a través de la prueba de comparaciones múltiples de T Student se halló que existe efecto significativo a 400^a, 200^{ab} y 100^c µl/ml de aceite esencial de *Tanacetum vulgare* L en la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* (15,20, 14,97 y 9,80 mm, respectivamente) comparado con la gentamicina (7,57 mm) comprobándose la hipótesis alternativa de investigación.

Al respecto algunos estudios de actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, demostraron, como el de Mureşan (2015), en Rumania que los extractos y aceite esencial de *Tanacetum vulgare* ejercen un halo de inhibición de 12 a 16 mm, casi parecido a lo del presente estudio; de igual modo, Korpinen et al. (2021) hallaron que el aceite esencial de *Tanacetum vulgare*, ejerce un diámetro de inhibición entre 7 y 14 mm, asimismo es de destacar que, aunque la composición química del aceite esencial es similar entre las hojas e inflorescencias, el 1,8 cineol tiene una concentración mayor en las hojas, siendo la ubicación geográfica, según Acimović & Puvača (2020a), un factor diferencial

Figura 15

Análisis de variabilidad de Kruskal Wallis y prueba de comparaciones múltiples de Dunn de la susceptibilidad en Candida albicans por efecto del aceite esencial de hojas de Tanacetum vulgare L



Donde: CN=Control Negativo (Tween 80), CP=Control Positivo (discos de fluconazol 25 μ g), \hat{u}_{median} = estimador de la mediana, n = número de unidades experimentales, $\chi^2_{Kruskal Wallis}$ =estadístico de Kruskal Wallis, $\hat{\epsilon}^2_{ordinal}$ =rango épsilon al cuadrado, p=probabilidad de rechazar la hipótesis nula cuando esta es verdadera siendo el umbral 0,05 (significativo), μ l/ml=microlitros por ml, $CI_{95\%}$ =Intervalo de Confianza al 95%, a,b...=Letras de significancia en orden de importancia del tratamiento aplicado resultado de la prueba de comparaciones múltiples

Fuente: Matriz de tabulación de datos procesado con el programa R version 4.3.1 (2023-06-16 ucrt) -- "Beagle Scouts" Copyright (C) 2023 The R Foundation for Statistical Computing Platform: x86_64-w64-mingw32/x64 (64-bit)

En la Figura 15, se ha encontrado que existen diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos de aceite esencial de hojas *Tanacetum vulgare L* frente a *Candida albicans* a través de la prueba de Kruskal Wallis ($\chi^2_{Kruskal Wallis} = 21.94; p = 2.60 \times 10^{-3}$), en la que el 95% ($\hat{\epsilon}^2_{ordinal} = 0.96$, $IC_{95} 0.96-1.00$) del efecto del tratamiento explica la inhibición microbiana.



Asimismo, a través de la prueba de Dunn se halló que existe efecto significativo de 400^a, 200^{ab}, 100^{abc} y 50^{abcd} µl/ml de aceite esencial de *Tanacetum vulgare* L en la inhibición del crecimiento de *Candida albicans* comparado con el control positivo.

Sobre ello, en Rumania, Mureşan et al. (2015) identificaron que el extracto hidroalcohólico de las flores de *Tanacetum vulgare* presentaba actividad inhibitoria contra *Candida albicans*.

Por otro lado, Mikulášová & Vaverková (2021) han demostrado que el aceite esencial aislado de *Tanacetum vulgare* L. posee propiedades antimicrobianas, incluyendo la inhibición de crecimiento de *Candida albicans*, con halos de inhibición entre 13 y 15 mm, como lo señala también Coté et al. (2017) para el aceite esencial de *Tanacetum vulgare* recolectada en Canadá. Por el contrario, Korpinen et al. (2021) señalan sobre el aceite esencial de *T. vulgare* que el diámetro de inhibición fue menor a 7 mm frente a este microorganismo.

Para otros hongos, Hassanin (2020) indicaron una pronunciada propiedad antifúngica en los aceites de *Tanacetum vulgare* obtenidos de flores, hojas y la combinación de ambas. Constataron los obtenidos de las hojas presentaron actividad antimicrobiana a una concentración del 3%, superando la eficacia del 1%, lo cual fue corroborado en *Trichophyton interdigitale* y *Epidermophyton floccosum*.

La presencia de oxaciclotetradecan-2-ona, 14-metil- un compuesto similar a un macrólido fue encontrado en esta investigación y que podría jugar un rol importante de inhibición de microorganismos, debido a que fue encontradas en las



hojas de *Cardiospermum halicacabum*, una especie vegetal de India donde demostraron actividad antibacteriana y antifúngica (Jeyadevi et al., 2013).

Estas investigaciones revelan una variabilidad de las propiedades antimicrobianas de *Tanacetum vulgare* en relación con *Candida albicans*, lo que puede estar influenciado por diversos factores, como los agentes ambientales en la cual se encuentran las condiciones del material vegetal, órgano vegetal empleado, ubicación geográfica de la especie vegetal, las condiciones geobotánicas del medio, la estación del año (condiciones climáticas) en la que se recolecta, tiempo de secado y el estado fenológico, y por otra parte algunas de las condiciones experimentales son los métodos de extracción, condiciones del equipo de extracción, tiempo de extracción.



V. CONCLUSIONES

- El rendimiento de aceite esencial extraído de las hojas de *Tanacetum vulgare* L por hidrodestilación fue de 0,88%.
- La caracterización de la composición fitoquímica de compuestos volátiles del aceite esencial de las hojas de *Tanacetum vulgare* L, comprendió 17 compuestos fitoquímicos, correspondiente a monoterpenos (64,70%), sesquiterpenos (24,9%) y macrólidos y análogos (5,90%) resaltando dentro de los compuestos volátiles específicos la tujona (PM 152,23 Da) con un 83%, el β felandreno (PM 136,23 Da) con 7% y la β -Tujona (PM 152. 23 Da) con 2%.
- El aceite esencial de las hojas de *Tanacetum vulgare* L frente a *Escherichia coli* mostró actividad antimicrobiana dando como resultado una susceptibilidad a 400^a y 200^{ab} μ l/ml ($p < 0,05$) comparado con Gentamicina 10 μ g^c, un CMI de 360 μ l/ml y un CMB de 361 μ l/ml; para *Staphylococcus aureus* se observó también susceptibilidad a 400^a y 200^{ab} μ l/ml ($p < 0,05$) comparado con Gentamicina 10 μ g^d, así como un CMI de 318 μ l/ml y un CMB de 319 μ l/ml; y respecto a *Candida albicans* multidrogoresistente se encontró igualmente mayor susceptibilidad a 400^a y 200^{ab} μ l/ml ($p < 0,05$) comparado con fluconazol de 25 μ g^{abcde}, así como un CMI de 322 μ l/ml y un CMF de 323 μ l/ml. Por lo tanto, podría considerarse las hojas de esta especie vegetal una alternativa fitoterapéutica frente a infecciones, previos ensayos preclínicos.



VI. RECOMENDACIONES

- Realizar la evaluación del rendimiento de aceite esencial con diferentes solventes orgánicos de cada parte anatómica según etapa fenológica de *Tanacetum vulgare* L.
- Desarrollar un análisis *in silico* de docking molecular respecto a tujona, β felandreno y β Tujona que fueron los compuestos volátiles que estuvieron presentes en mayor proporción en el aceite esencial de *Tanacetum vulgare* L frente a antígenos presentes en *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* o *Candida albicans* almacenados en bases datos biológicas.
- Desarrollar una plataforma regional de principios activos de plantas nativas de la Región Puno cuyas propiedades antimicrobianas han sido validadas mediante experimentación frente a microorganismos de importancia en Salud Pública que contribuya a la Declaratoria de Protección de Principios Bioactivos del Perú.
- Finalmente a partir de la presente investigación como parte de las alternativas fitoterapéuticas, se recomienda realizar un análisis del grado de toxicidad y estudios preclínicos con la finalidad de encontrar posibles efectos tóxicos y alucinógenos.



VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acero, J., Guzmán, T., & Muñoz, C. (2019). Revisión documental de uso de los aceites esenciales obtenidos de *Lippia alba* (Verbenaceae), como alternativa antibacteriana y antifúngica. *Revista Tecnología En Marcha*, 32(1), 3–11. <https://doi.org/10.18845/tm.v32i1.4114>
- Ácimović, M., & Puvača, N. (2020). *Tanacetum vulgare* L.-A Systematic Review. In *Technology and Engineering Management J Agron Technol Eng Manag* (Vol. 2020, Issue 3). www.fimek.edu.rs/jatem
- Adams, R. (2007). *Identification of Essential Oil Components By Gas Chromatography/Mass Spectrometry* (4th ed.).
- Agudo, S. (2010). *Estudio molecular de los factores de virulencia y de la resistencia a claritromicina en la infección por Helicobacter pylori*. Universidad Complutense de Madrid.
- Agurto, J. C., & Cuya, E. (2021). *Actividad antimicrobiana del extracto etanólico liofilizado de propóleo procedente de Ayacucho y Huaral frente a Staphylococcus aureus y Pseudomonas aeruginosa*. Universidad nacional de San Marcos. https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/16527/Agurto_mj.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Ahmad, S., Raqeeb, A., Ali, F., & Anwar, M. (2018). Characterization of Novel Antibiotic Resistance Genes in *Staphylococcal aureus*. *Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access*, 6(1), 10–12. <https://doi.org/10.15406/jbmoa.2018.06.00167>
- Alburquenque, C., & Tapia, C. (2013). Interacción *Candida albicans*-Hospedero: un proceso complejo en el que la inmunidad innata juega un importante papel. *Boletín Micológico*, 28(2), 37–47. <https://doi.org/10.22370/bolmicol.2013.28.2.875>
- Andrango, R. (2021). Aceites esenciales. *División de Publicaciones UIS*, 32(2), 180. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.36647.47522/1>
- Andreu, A. (2005). Patogenia de las infecciones del tracto urinario. *Enfermedades*



- Infecciosas y Microbiología Clínica*, 23(Suplemento 4), 15–21.
<https://doi.org/10.1157/13091444>
- Aparicio, R., Rojas, L., Velasco, J., Usubillaga, A., Sosa, M., & Rojas, J. (2019). Caracterización química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de *Libanothamnus neriifolius* (Asteraceae). *Revista Peruana de Biología*, 26(1), 95–100.
- Aquili, V. D. (2007). *Caracterización de cepas de Escherichia coli con fenotipos de multirresistencia inducidos o seleccionados in vitro con antimicrobianos o con fármacos no antimicrobianos*. Universidad de las Palmas de Gran Canaria.
- Aziz, Z. A. A., Ahmad, A., Setapar, S. H. M., Karakucuk, A., Azim, M. M., Lokhat, D., Rafatullah, M., Ganash, M., Kamal, M. A., & Ashraf, G. M. (2018). Essential Oils: Extraction Techniques, Pharmaceutical And Therapeutic Potential - A Review. *Current Drug Metabolism*, 19(13), 1100–1110.
<https://doi.org/10.2174/1389200219666180723144850>
- Bączek, K. B., Kosakowska, O., Przybył, J. L., Pióro-Jabrucka, E., Costa, R., Mondello, L., Gniewosz, M., Synowiec, A., & Węglarz, Z. (2017). Antibacterial and antioxidant activity of essential oils and extracts from costmary (*Tanacetum balsamita* L.) and tansy (*Tanacetum vulgare* L.). *Industrial Crops and Products*, 102, 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.03.009>
- Bao, D., Xu, X., Wang, Y., & Zhu, F. (2022). Emergence of a Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Co-Carrying a New mcr-1.33 Variant and blaNDM-5 Genes Recovered from a Urinary Tract Infection. *Infection and Drug Resistance*, 15(April), 1499–1503. <https://doi.org/10.2147/IDR.S358566>
- Barrero, L. (2009). Microbiología clínica. *Universidad Europea de Madrid*, 1, 236–265.
- Barron Pastor, H. J., Gonzales Rodriguez, A. O., Gutiérrez Villafuerte, C. A., Mitma de Barrón, Y. L., Huerta Canales de Miranda, D. V., & Suarez Cunza, S. (2019). Clasificación filogenética de *Escherichia coli* uropatógena y respuesta inmunometabólica en adultos mayores con infección urinaria en casas de reposo. *Archivos de Medicina (Manizales)*, 19(2), 238–248.
<https://doi.org/10.30554/archmed.19.2.3334.2019>



- Bedout, C., & Gómez, B. (2010). Candida y candidiasis invasora: un reto continuo para su diagnóstico temprano. *Candida and candidiasis: the challenge continues for an early diagnosis. Revista de Infectología*, 14(2), 45–53.
- Bhattacharya, S., Sae-Tia, S., & Fries, B. (2020). Candidiasis and mechanisms of antifungal resistance. *Antibiotics*, 9(6), 1–19. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9060312>
- Biemer, J. (1973). Antimicrobial susceptibility testing by the Kirby-Bauer disc diffusion method. *Annals of Clinical Laboratory Science*, 3(2), 135–140.
- Bisso, A. (2018). Resistencia a los antimicrobianos. *Sociedad Peruana de Medicina Interna*, 31(2), 50–59.
- Bitrus, A. A., Peter, O. M., Abbas, M. A., & Goni, M. D. (2018). *Staphylococcus aureus*: A Review of Antimicrobial Resistance Mechanisms. *Veterinary Sciences: Research and Reviews*, 4(2), 527–534. <https://doi.org/10.17582/journal.vsr/2018/4.2.43.54>
- Brilhante, R. S. N., Paiva, M. A. N., Sampaio, C. M. S., Castelo-Branco, D. S. C. M., Teixeira, C. E. C., de Alencar, L. P., Bandeira, T. J. P. G., Monteiro, A. J., Cordeiro, R. A., Pereira-Neto, W. A., Sidrim, J. J. C., Moreira, J. L. B., & Rocha, M. F. G. (2016). Azole resistance in *Candida* spp. isolated from Catú Lake, Ceará, Brazil: An efflux-pump-mediated mechanism. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(1), 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.008>
- Brooks, G., Carroll, K., Butel, J., Morse, S., & Mietzner, T. (2013). Jawetz, Melnick, & Adelberg's Microbiología médica. In *McGraw-Hill Interamericana Editores* (Vol. 53, Issue 25 ava edicion). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Cabrera, Y. (2017). *Determinación de las propiedades físicas, composición química y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de Chenopodium ambrosioides (Paico) de la provincia de Loja*. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Cáceres, M., Hidalgo, W., Stashenko, E., Torres, R., & Ortiz, C. (2020). Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Anti-Biofilm and Anti-Quorum Sensing Activities against Pathogenic Bacteria. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9(4), 147.



<https://doi.org/10.3390/antibiotics9040147>

- Carrel, M., Perencevich, E. N., & David, M. Z. (2015). USA300 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, United States, 2000–2013. *Emerging Infectious Diseases*, 21(11), 1973–1980. <https://doi.org/10.3201/eid2111.150452>
- Carroll, K. C., Morse, S. A., Mietzner, T., & Miller, S. (2016). Microbiologia Medica. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue 9).
- Casado, I. (2018). *Optimización de la extracción de Aceites Esenciales por destilación en Corriente de Vapor* (Vol. 1). Universidad Politécnica de Madrid. <https://bit.ly/3ObkF1a>
- Castellano, M., & Armindo, J. (2010). Mecanismos de resistencia a antibióticos b-lactámicos en *Staphylococcus aureus*. *Kasmera*, 38(1), 18–35.
- Castillo, A. (2018). La experiencia : requisito para la visibilidad , la divulgación y el impacto de la investigación (J. Blanco (ed.); Second, Issue January).
- Castro, D., Diaz, J., Serna, R., Martínez, M., Urrea, P., Muñoz, K., & Osorio, E. (2013). *Cultivo y producción de plantas aromáticas y medicinales* (D. Castro (ed.); 2nd ed.). Fondo Editorial Universidad Católica de Oriente.
- Cerutti, M., & Neumayer, F. (2004). Introduccion a la obtencion de aceites esenciales del limon. *Invenio*, 7(12), 149–155.
- Chávez, L., & Gutiérrez, D. (2013). *Estudio fitoquímico y evaluación de la toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de las hojas frescas de Tanacetum vulgare L., "Palma real"*. In Repositorio institucional - WIENER. Universidad Wiener.
- Chuctaya, H., & Roque, W. (2018). *Investigación de las tesis realizadas sobre plantas medicinales y alimenticias en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Norbert Wiener del 2012 al 2016*. Universidad Norbert Wiener.
- Clemente, I., Aznar, M., Silva, F., & Nerín, C. (2016). Antimicrobial properties and mode of action of mustard and cinnamon essential oils and their combination against foodborne bacteria. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 36, 26–33.



- Collin, G., Deslauriers, H., Pageau, N., & Gagnon, M. (1993). Essential oil of tansy (*Tanacetum vulgare* L.) of Canadian origin. *Journal of Essential Oil Research*, 5(6), 629–638. <https://doi.org/10.1080/10412905.1993.9698296>
- Contreras, M., González, T., Ayora, T., Martínez, Z., & Pacheco, N. (2017). ¿Que son microorganismos? In *Ciencia* (Vol. 68, Issue 2, pp. 1–8).
- Costa, S., & Rodrigues, A. (2020). *Candida albicans* antifungal resistance and tolerance in bloodstream infections: The triad yeast-host-antifungal. *Microorganisms*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020154>
- Coté, H., Boucher, M. A., Pichette, A., & Legault, J. (2017). Anti-Inflammatory, Antioxidant, Antibiotic, and Cytotoxic Activities of *Tanacetum vulgare* L. Essential Oil and Its Constituents. *Medicines*, 4(2), 34. <https://doi.org/10.3390/medicines4020034>
- Cruz, S., Díaz, P., Mazón, G., Arias, D., Calderon, M., & Herrera, A. (2017). Genoma de *Candida albicans* y resistencia a las drogas. *Red de Revistas Científicas de América Latina, El Caribe, España y Portugal*, 33(3), 438–450.
- Cucho, J. L. L., Mendoza, S. W., Fuertes, C. M., Salazar, M. E., & Herrera, O. (2021). Chemical Profile of the Volatile Constituents and Antimicrobial Activity of the Essential Oils from *Croton adipatus*, *Croton thurifer*, and *Croton collinus*. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(11), 1387. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10111387>
- Cuervo, S. P., & Hensel, O. (2016). Stepwise drying of medicinal plants as alternative to reduce time and energy processing. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 138, 012014. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/138/1/012014>
- D'Enfert, C., Kaune, A., Alaban, L., Chakraborty, S., Cole, N., Delavy, M., Kosmala, D., Marsaux, B., Fróis-Martins, R., Morelli, M., Rosati, D., Valentine, M., Xie, Z., Emritloll, Y., Warn, P., Bequet, F., Bougnoux, M.-E., Bornes, S., Gresnigt, M. S., Brown, A. J. P. (2021). The impact of the Fungus-Host-Microbiota interplay upon *Candida albicans* infections: current knowledge and new perspectives. *FEMS Microbiology Reviews*, 45(3), 1–55. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa060>



- Dasilveira, R. (2008). Vademecum colombiano de plantas medicinales. In *Mycological Research* (1st ed., Vol. 106, Issue 11). Ministerio de la protección social.
- Devrnja, N., Anđelković, B., Arandjelović, S., Radulović, S., Soković, M., Krstić-Milošević, D., Ristić, M., & Čalić, D. (2017). Comparative studies on the antimicrobial and cytotoxic activities of *Tanacetum vulgare* L. essential oil and methanol extracts. *South African Journal of Botany*, *111*, 212–221. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.03.028>
- Dragland, S., Rohloff, J., Mordal, R., & Iversen, T. H. (2005). Harvest regimen optimization and essential oil production in five tansy (*Tanacetum vulgare* L.) genotypes under a northern climate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(12), 4946–4953. <https://doi.org/10.1021/jf047817m>
- Ekundayo, O. (1979). Essential Oils II. Terpene Composition of the Leaf Oil of *Tanacetum vulgare* L. *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie*, *92*(3), 215–219. [https://doi.org/10.1016/s0044-328x\(79\)80003-3](https://doi.org/10.1016/s0044-328x(79)80003-3)
- El-Nashar, H. A. S., Eldehna, W. M., Al-Rashood, S. T., Alharbi, A., Eskandrani, R. O., & Aly, S. H. (2021). GC/MS Analysis of Essential Oil and Enzyme Inhibitory Activities of *Syzygium cumini* (Pamposia) Grown in Egypt: Chemical Characterization and Molecular Docking Studies. *Molecules*, *26*(22), 6984. <https://doi.org/10.3390/molecules26226984>
- Fajardo, F. J. U., Lucena, M. E., Briceño, K. M., Carrero, V. S., Fermín, L. B. R., de Rojas, Y. E. C., Rodríguez, S. H. T., & Manzano, V. P. C. (2021). Composición y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Ageratina neriifolia* (Asteraeae) de Mérida-Venezuela. *Revista Cubana de Farmacia*, *54*(1), e548.
- FAO. (2011). Preventing *Escherichia coli* in food. Food and Agriculture Organization. https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/FAO_E.Coli_FCC_2011.06.231.pdf
- Farfán-García, A. E., Ariza-Rojas, S. C., Vargas-Cárdenas, F. A., & Vargas-Remolina, L. V. (2016). Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Revista Chilena de Infectología*, *33*(4), 438–450. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182016000400009>



- Fernandes, T., Silva, S., & Henriques, M. (2015). *Candida tropicalis* biofilm's matrix-involvement on its resistance to amphotericin B. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 83(2), 165–169. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.06.015>
- Fernandez, L. (2019). Principios activos del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayan” y evaluacion de su actividad antibacteriana. Universidad Nacional de San Agustin.
- Ford, C., Funt, J., Abbey, D., Issi, L., Guiducci, C., Martinez, D., Delorey, T., Li, B. Y., White, T., Cuomo, C., Rao, R., Berman, J., Thompson, D., & Regev, A. (2015). The evolution of drug resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. *ELife*, 2015(4), 1–27. <https://doi.org/10.7554/eLife.00662>
- Freitas, L., Damasceno, G., De Almeida, A., Cardoso, L., De Sousa, M., Prates, T., Santos, G., Silva, H., Soares, W., & Ericsson, A. (2020). Identification and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. isolated from surfaces near patients in an intensive care unit of a hospital in southeastern Brazil. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 53, 343–348. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0244-2020>
- Fretes, F. (2010). Plantas Medicinales Y Aromáticas: una alternativa de producción comercial. *Agencia Del Gobierno de Los Estados Unidos Para El Desarrollo Internacional (USAID)*, 60.
- Fuller, N. J., Pegg, R. B., Affolter, J., & Berle, D. (2018). Variation in Growth and Development, and Essential Oil Yield between Two *Ocimum* Species (*O. tenuiflorum* and *O. gratissimum*) Grown in Georgia. *HortScience Horts*, 53(9), 1275–1282. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI13156-18>
- Galindo, M. (2020). Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. In *E. Coli Infections - Importance of Early Diagnosis and Efficient Treatment*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.93115>
- Garcia-Vidal, C., & Carratalà, J. (2012). Patogenia de la infección fúngica invasora. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(3), 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.09.011>



- García, J., Cantón, R., Sánchez, E., Gomez, L., Martínez, L., Rodríguez, C., & Vila, J. (2000). Metodos basicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 11(Protocolos microbiologia), 55.
- Gishen, N. Z., Taddese, S., Zenebe, T., Dires, K., Tedla, A., Mengiste, B., Shenkute, D., Tesema, A., Shiferaw, Y., & Lulekal, E. (2020). In vitro antimicrobial activity of six Ethiopian medicinal plants against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. *European Journal of Integrative Medicine*, 36, 101121. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eujim.2020.101121>
- Godinho, L. S., Aleixo de Carvalho, L. S., Barbosa de Castro, C. C., Dias, M. M., Pinto, P. de F., Crotti, A. E. M., Pinto, P. L. S., de Moraes, J., & Da Silva Filho, A. A. (2014). Anthelmintic Activity of Crude Extract and Essential Oil of *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) against Adult Worms of *Schistosoma mansoni*. *The Scientific World Journal*, 2014, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2014/460342>
- Gómez, J., & Acevedo, D. (2001). Manual de laboratorio Microbiologia. In *Universidad del Valle* (p. 95).
- González, A. (2018). *Extracción, caracterización física y química, y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de la especie conocida como chilchi Tagetes terniflora de la provincia de Loja*. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Goudarzi, T., Saharkhiz, M. J., & Rowshan, V. (2015). Ontogenetic variation of essential oil content and constituents in tansy (*Tanacetum vulgare* L.). *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2(2), 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2015.03.003>
- Guerra, L., Soto, L., Medina, Z., Ojeda de R, G., & Peña, Y. J. (2014). Actividad antibacteriana del aceite esencial de cortezas de naranja (*Citrus sinensis*) var. Valencia frente a microorganismos gram positivos y gram negativos. *Revista de La Facultad de Agronomía*, 31(2), 215–232.
- Guo, Y., Song, G., Sun, M., Wang, J., & Wang, Y. (2020). Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Cellular and*



Infection Microbiology, 10(March), 1–11.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00107>

Gupta, N. Saxena, G. (2010). Antimicrobial activity of constituents identified in essential oils from *Mentha* and *Cinnamomum* through GC-MS. *Int. J. Pharma Bio Sci*, 1, 715–720.

Hassanin, I. S. (2020). Aspects regarding the effectiveness of volatile oils of the *Tanacetum vulgare* kind in the conservation of heritage objects. *Proceedings of the 8th International Conference on Advanced Materials and Systems*, 297–302.
<https://doi.org/10.24264/icams-2020.III.8>

Herreras, L., & López, V. (2022). Antifungal resistance profile in the treatment of vaginal candidiasis: A diagnosis of etiologic agents. *Revista Habanera de Ciencias Medicas*, 21(2), 1–7.

Hevea, L. (2013). Los aceites esenciales. *Aceites Esenciales*, 4, 2.

Hsouna, A.B. Halima, N.B. Abdelkafi, S. Hamdi, N. (2013). Essential oil from *Artemisia phaeolepis*: Chemical composition and antimicrobial activities. *J. Oleo Sci.*, 980, 973–980.

Huaracha, O. (2019). *Efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de Cinnamomum zeylanicum “canela” sobre Candida albicans*. Universidad Nacional del Altiplano.

Huayllapuma, C. A. (2022). *Actividad antimicrobiana “In Vitro” del aceite esencial de Ocimum basilicum (albahaca) frente a Escherichia coli y Staphylococcus aureus uropatógenos*. Universidad Nacional del Altiplano.

Hudzicki, J. (2016). Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. *American Society For Microbiology*, December 2009, 1–13.
<https://www.asm.org/Protocols/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Pro>

Ihebuozaju, C. (2017). Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) using a novel dilution tube method. *African Journal of Microbiology Research*, 11(23), 977–980.



<https://doi.org/10.5897/ajmr2017.8545>

- INTA ProHuerta Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. (2003). Recolección, secado y conservación de hierbas - hierbas secas. *Aquí Vivimos*, 3(Hierba aromáticas), 17–24.
- Ivănescu, B., Tuchiluş, C., Corciovă, A., Lungu, C., Mihai, C. T., Gheldiu, A. M., & Vlase, L. (2018). Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activity of *Tanacetum vulgare*, *Tanacetum Corymbosum* and *Tanacetum macrophyllum* extracts. *Farmacia*, 66(2), 282–288.
- Jaramillo, B., Duarte, E., & Delgado, W. (2012). Bioactividad del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* colombiano. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17(1), 54–64.
- Jenul, C., & Horswill, A. R. (2018). Regulation of *Staphylococcus aureus* virulence. *HHS Author Manuscripts Journal*, 176(3), 34. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0031-2018.Regulation>
- Jeyadevi, R., Sivasudha, T., Ilavarasi, A., & Thajuddin, N. (2013). Chemical Constituents and Antimicrobial Activity of Indian Green Leafy Vegetable *Cardiospermum halicacabum*. *Indian Journal of Microbiology*, 53(2), 208–213. <https://doi.org/10.1007/s12088-012-0333-4>
- Keskitalo, M., Lindén, A., & Valkonen, J. P. T. (1998). Genetic and morphological diversity of Finnish tansy (*Tanacetum vulgare* L., Asteraceae). *Theoretical and Applied Genetics*, 96(8), 1141–1150. <https://doi.org/10.1007/s001220050850>
- Keskitalo, M., Pehu, E., & Simon, J. (2001). Variation in volatile compounds from tansy (*Tanacetum vulgare* L.) related to genetic and morphological differences of genotypes. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29(3), 267–285. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(00\)00056-9](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(00)00056-9)
- Khan, S., Sahar, A., Tariq, T., Sameen, A., & Tariq, F. (2023). Chapter 1 - Essential oils in plants: Plant physiology, the chemical composition of the oil, and natural variation of the oils (chemotaxonomy and environmental effects, etc.) (G. A. Nayik & M. J. B. T.-E. O. Ansari (eds.); pp. 1–36). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91740-7.00016-5>



- Kilic, O. (2014). Essential oil composition of two *Sideritis* L. Taxa from Turkey: A chemotaxonomic approach. *Asian Journal of Chemistry*, 26(8), 2466–2470. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2014.16425>
- Kim, H. Y., & Choi, N. J. (2020). Study on volatile organic compounds from diesel engine fueled with palm oil biodiesel blends at low idle speed. *Applied Sciences (Switzerland)*, 10(14), 1–18. <https://doi.org/10.3390/app10144969>
- Kleine, S., & Müller, C. (2013). Differences in shoot and root terpenoid profiles and plant responses to fertilisation in *Tanacetum vulgare*. *Phytochemistry*, 96, 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.09.018>
- Korpinen, R. I., Välimaa, A. L., Liimatainen, J., & Kunnas, S. (2021). Essential oils and supercritical CO₂ extracts of arctic angelica (*Angelica archangelica* L.), marsh labrador tea (*Rhododendron tomentosum*) and common tansy (*Tanacetum vulgare*) Chemical compositions and antimicrobial activities. *Molecules*, 26(23). <https://doi.org/10.3390/molecules26237121>
- Kowalonek, J., Stachowiak, N., Bolczak, K., & Richert, A. (2023). Physicochemical and Antibacterial Properties of Alginate Films Containing Tansy (*Tanacetum vulgare* L.) Essential Oil. *Polymers*, 15(2), 260. <https://doi.org/10.3390/polym15020260>
- Lade, H., Joo, H. S., & Kim, J. S. (2022). Molecular Basis of Non-β-Lactam Antibiotics Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*, 11(10), 1–28. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101378>
- Lade, H., & Kim, J. S. (2021). Bacterial Targets of Antibiotics in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*, 10(4), 398. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040398>
- Lagha, R., Ben Abdallah, F., Al-Sarhan, B. O., & Al-Sodany, Y. (2019). Antibacterial and Biofilm Inhibitory Activity of Medicinal Plant Essential Oils Against *Escherichia coli* Isolated from UTI Patients. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(6), 1161. <https://doi.org/10.3390/molecules24061161>
- Lazarevic, J., Kostic, I., Milanovic, S., Šešlija Jovanović, D., Krnjajic, S., Č'alic, D., Stankovic, S., & Kostic, M. (2021). Repellent activity of *Tanacetum parthenium* (L.) and *Tanacetum vulgare* (L.) essential oils against *Leptinotarsa decemlineata*



- (Say). *Bulletin of Entomological Research*, 111(2), 190–199.
<https://doi.org/10.1017/S0007485320000504>
- Lazo, G., Mamani, E., Vargas, E., Camacho, J., & Sahonero, O. (2013). Sensibilidad y resistencia en el antibiograma del *Staphylococcus aureus* en pacientes del Hospital Clinico Viedma. *Revista Científica Ciencia Médica*, 16(2), 15–17.
- Lehtinen, S., Blanquart, F., Lipsitch, M., Fraser, C., & Collaboration, with the M. P. (2019). On the evolutionary ecology of multidrug resistance in bacteria. *PLoS Pathogens*, 15(5), e1007763–e1007763.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007763>
- Llorens, J. (2021). Los aceites esenciales y su actividad biológica. *Real Sociedad Española de Química*, 2(2), 165–170.
- López, M. (2004). Los aceites esenciales, aplicaciones farmacológicas, cosméticas y alimentarias. *Elseiver*, 23(7), 88–91.
- Lopez, R., & Caso, N. (2015). *Rendimiento y Composición Química de Aceites Esenciales de Eucalyptus archeri y Schinus molle - Valle del Mantaro*. Universidad Nacional del Centro del Peru.
[http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/UNCP/3508/Lopez De La Cruz - Caso Orihuela.pdf?sequence=1](http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/UNCP/3508/Lopez%20De%20La%20Cruz%20-%20Caso%20Orihuela.pdf?sequence=1)
- Mamani, C. (2022). *Efecto antibacteriano in vitro de aceite esencial de Satureja boliviana benth (MUÑA) seco y fresco frente a Escherichia coli ATCC 25922*. Puno 2019. Universidad Nacional del Altiplano.
- Mamani, L. (2017). *Actividad Antibacteriana de los extractos alcohólicos de Senecio spp (chachacoma) en el crecimiento de Escherichia coli, Klebsiella sp, Staphylococcus aureus y Enterococcus sp*. Universidad Nacional del Altiplano.
http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/3978/Mamani_Lima_Luz_Delia.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Manar, A.-R., Shilu, M., Asmaa, A. T., Khalid, A. A., & Hadi, Y. (2021). Clinical manifestations associated with acute viral gastroenteritis pathogens among pediatric patients in Qatar. *Journal of Medical Virology*, 93(8), 4794–4804.
<https://doi.org/10.1002/jmv.26859>



- Mantilla, Y., Tuta, E., Brito, A., & Clavijo, L. (2021). Candidiasis and *Candida albicans*. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 61(3), 391–400. <https://doi.org/10.52808/bmsa.7e5.613.003>
- Marqués, M. (2015). *Composición química de los aceites esenciales de Lavanda y Tomillo. Determinación de la actividad antifúngica*. Universidad Politècnica De València, 62.
- Martínez, A. (2003). *Aceites Esenciales*. Universidad de Antioquia, 180.
- May, T., Ito, A., & Okabe, S. (2009). Induction of Multidrug Resistance Mechanism in *Escherichia coli* Biofilms by Interplay between Tetracycline and Ampicillin Resistance Genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(11), 4628–4639. <https://doi.org/10.1128/AAC.00454-09>
- Medina, A. M., Rivera, F. P., Pons, M. J., Riveros, M., Gomes, C., Bernal, M., Meza, R., Maves, R. C., Huicho, L., Chea-Woo, E., Lanata, C. F., Gil, A. I., Ochoa, T. J., & Ruiz, J. (2015). Comparative analysis of antimicrobial resistance in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates from two paediatric cohort studies in Lima, Peru. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 109(8), 493–502. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trv054>
- Mikulášová, M., & Vaverková, Š. (2021). Antimicrobial effects of essential oils from *Tanacetum vulgare* L. and *Salvia officinalis* L., growing in Slovakia. *Nova Biotechnologica et Chimica*, 9(2). <https://doi.org/10.36547/nbc.1273>
- Mlynarczyk, B., Kowalewski, C., Krolak, A., & Marusza, W. (2022). Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15). <https://doi.org/10.3390/ijms23158088>
- Mockutė, D., & Judzentiene, A. (2003). The myrtenol chemotype of essential oil *Tanacetum vulgare* L. var: vulgare (tansy) growing wild in the Vilnius region. *Chemija*, 14(2), 103–107.
- Montoya, G. (2010). *Aceites esenciales, una alternativa de diversificación para el eje cafetero*. In Universidad Nacional de Colombia (Vol. 1).



- Móricz, Á. M., Häbe, T. T., Böszörményi, A., Ott, P. G., & Morlock, G. E. (2015). Tracking and identification of antibacterial components in the essential oil of *Tanacetum vulgare* L. by the combination of high-performance thin-layer chromatography with direct bioautography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1422, 310–317. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.10.010>
- Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J., & Ochoa, T. (2011). Molecular mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli*- associated diarrhea. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 28(4), 648–656. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22241263>
- Mothana, R., Al-Said, M., Al-Yahya, M., Al-Rehaily, A., & Khaled, J. (2013). GC and GC/MS Analysis of Essential Oil Composition of the Endemic Soqotraen *Leucas virgata* Balf.f. and Its Antimicrobial and Antioxidant Activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(11), 23129–23139. <https://doi.org/10.3390/ijms141123129>
- Mukherjee, R., Priyadarshini, A., Pati Pandey, R., & Samuel Raj, V. (2021). Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus*. In *Insights Into Drug Resistance in Staphylococcus aureus*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.96888>
- Mureşan, M. (2015). Antimicrobial Effects Of The Ethanolic Extracts And Essential Oils Of *Tanacetum Vulgare* L From Romania. *Acta Universitatis Cibiniensis. Series E: Food Technology*, 19(2), 75–80. <https://doi.org/10.1515/aucft-2015-0016>
- Mureşan, M., Benedec, D., Vlase, L., Oprean, R., Toiu, A., & Oniga, I. (2015). Screening of polyphenolic compounds, antioxidant and antimicrobial properties of *Tanacetum vulgare* from Transylvania. *STUDIA UBB CHEMIA*, LX(1), 127–138.
- Mureşan, M. L. (2015). Clinical aspects variability of chemical composition in *Tanacetum vulgare* L essential oils over the world. 20(4), 163–164.



- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2017). *Microbiología Médica* (8th ed.). Elsevier.
- Nait Irahah, I., azzahra Lahlou, F., Hmimid, F., Errami, A., Guenaou, I., Diawara, I., Kettani-Halabi, M., Fahde, S., Ouafik, L., & Bourhim, N. (2021). Identification of the chemical composition of six essential oils with mass spectroscopy and evaluation of their antibacterial and antioxidant potential. *Flavour and Fragrance Journal*, 36(4), 465–476. <https://doi.org/10.1002/ffj.3657>
- NCBI National center for Biotechnology Information. (2020a). *Candida albicans*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=5476>
- NCBI National center for Biotechnology Information. (2020b). *Escherichia coli*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=562>
- NCBI National center for Biotechnology Information. (2020c). *Staphylococcus aureus*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1280>
- Nirmal, N. P., Mereddy, R., Li, L., & Sultanbawa, Y. (2018). Formulation, characterisation and antibacterial activity of lemon myrtle and anise myrtle essential oil in water nanoemulsion. *Food Chemistry*, 254, 1–7. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.173>
- Oliveros, M. (2016). *Determinación del rendimiento y caracterización fisicoquímica del aceite esencial de apazote (Chenopodium ambrosioides L.) obtenido de plantas cosechadas en diferentes etapas de desarrollo a nivel laboratorio*. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Ovares, J. (2016). *Determinación de los rendimientos y caracterización de aceites esenciales obtenidos por hidrodestilación a partir de Lippia alba y Rosmarinus officinalis*. Universidad de Costa Rica. <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/bitstream/123456789/5569/1/40655.pdf>
- Özek, G., Özek, T., Işcan, G., Başer, K. H. C., Hamzaoglu, E., & Duran, A. (2007). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Tanacetum cadmeum* (Boiss.) heywood subsp. Orientale grierson. *Journal of Essential Oil Research*, 19(4), 392–395. <https://doi.org/10.1080/10412905.2007.9699313>



- Paitan, Y. (2018). Current Trends in Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli*. In G. Frankel & E. Z. Ron (Eds.), *Escherichia coli, a Versatile Pathogen. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol 416* (pp. 181–211). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/82_2018_110
- Palá, J. (2002). *Contribución al conocimiento de los aceites esenciales del género "Eryngium" L.* Universidad Complutense de Madrid.
- Palomino, J. (2016). *Estudio de las condiciones de secado sobre la cinética de deshidratación de las hojas de Romero (Rosmarinus officinalis L.)*. Universidad Privada de Tacna. <http://repositorio.upt.edu.pe/handle/UPT/818>
- Pasachova Garzon, J., Martinez Ramirez, S., & Munoz Molina, L. (2019). *Staphylococcus aureus*: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. *NOVA*, 17(32), 25–38.
- Patra, S., Raney, M., Pareek, A., & Kaur, R. (2022). Epigenetic Regulation of Antifungal Drug Resistance. *Journal of Fungi*, 8(8), 1–16. <https://doi.org/10.3390/jof8080875>
- Patterson, J. E., McElmeel, M., & Wiederhold, N. P. (2017). *In vitro* Susceptibility Testing of Essential Oils against Gram-positive and Gram-negative Clinical Isolates, including Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE). *Open Forum Infectious Diseases*, 4(suppl_1), S370–S370. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofx163.907>
- Pérez, H., & Robles, A. (2013). Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Revista Médica*, 4(04), 186–191.
- Poirel, L., Madec, J.-Y., Lupo, A., Schink, A.-K., Kieffer, N., Nordmann, P., & Schwarz, S. (2018). Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 6(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017>
- Puvača, N., Milenković, J., Galonja Coghill, T., Bursić, V., Petrović, A., Tanasković, S., Pelić, M., Ljubojević Pelić, D., & Miljković, T. (2021). Antimicrobial Activity of Selected Essential Oils against Selected Pathogenic Bacteria: *In Vitro* Study. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050546>



- Quispe, K., & Taco, R. (2018). *Evaluación del tiempo de extracción, factor de empaquetamiento, humedad del rizoma, en el rendimiento de la extracción del aceite esencial de jengibre (Zingiber officinale roscoe) por arrastre de vapor, caracterización fisicoquímica del aceite esencial* Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa. In Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa. <http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/6561>
- Raal, A., Orav, A., & Gretchushnikova, T. (2014). Essential Oil Content and Composition in *Tanacetum vulgare* L. Herbs Growing Wild in Estonia. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 17(4), 670–675. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.958554>
- Reygaert, W. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3), 482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>
- Reynel, C. (2012). Guía de identificación de las plantas comunes del derecho de vía del ducto de Perú LNG (Comunica 2 sac.).
- Rincón, C., Castaño, J., & Rios, E. (2012). Biological activity of essential oils from *Acmella ciliata* (Kunth) Cass. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17(2), 160–171.
- Rodriguez, M., Alcaraz, L., & Real, S. (2012). Procedimientos para la extracción de aceite en plantas aromáticas. *Centro de Investigaciones Biológicas Del Noroeste, S.C, 1*, 12–17.
- Rohloff, J., Mordal, R., & Dragland, S. (2004). Chemotypical Variation of Tansy (*Tanacetum vulgare* L.) from 40 Different Locations in Norway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(6), 1742–1748. <https://doi.org/10.1021/jf0352430>
- Romeua, B., Salazar, P., Navarro, A., Lugo, D., Hernández, U., Rojas, N., & Eslava, C. (2010). Utilidad del sistema VITEK en la identificación y determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de bacterias aisladas de ecosistemas dulceacuícolas. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 41, 1–9.



- Roumy, V., Ruiz Macedo, J. C., Bonneau, N., Samaillie, J., Azaroual, N., Encinas, L. A., Rivière, C., Hennebelle, T., Sahpaz, S., Antherieu, S., Pinçon, C., Neut, C., Siah, A., Gutierrez-Choquevilca, A.-L., & Ruiz, L. (2020). Plant therapy in the Peruvian Amazon (Loreto) in case of infectious diseases and its antimicrobial evaluation. *Journal of Ethnopharmacology*, 249, 112411. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112411>
- Rozwadowski, M., & Gawel, D. (2022). Molecular Factors and Mechanisms Driving Multidrug Resistance in Uropathogenic *Escherichia coli* An Update. *Genes*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/genes13081397>
- Ruiz, E., Arredondo, R., Corral, K., López, A., Meneses, I., Ayala, V., & Martínez, A. (2021). Molecular Mechanisms of Resistance to Antifungals in *Candida albicans*. In *Advances in Candida albicans* (Issue March). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.96346>
- Ryan, K. J., & Ray, C. G. (2011). Sherris Microbiología Médica. In *Sherris medical microbiology*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Salas, C. (2014). *Elaboración y evaluación del material didáctico variedades enterovirulentas de Escherichia coli*. In Universidad Autónoma de México.
- Sánchez, A., Orellana, P., & Andrade, C. (2022). Vigilancia epidemiológica de *Staphylococcus aureus* y resistencia antibiótica en ambientes nosocomiales. *Revista Vive*, 5(13), 233–244. <https://doi.org/10.33996/revistavive.v5i13.144>
- Santos, G., Vasconcelos, C., Lopes, A., Cartágenes, M., Filho, A., Nascimento, F., Ramos, R., Pires, E., Andrade, M., Rocha, F., & Monteiro, C. (2018). Candida infections and therapeutic strategies: Mechanisms of action for traditional and alternative agents. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUL), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01351>
- Scandaliaris, M. (2022). Botánica taxonomica agricola Complemento para clases teóricas y prácticas.
- Schmidt, T., Kock, M., & Ehlers, M. (2015). Antimicrobial Resistance in Staphylococci at the Human Animal Interface. In *Antimicrobial Resistance - An Open Challenge*. InTech. <https://doi.org/10.5772/61785>



- Sehaki, C., Jullian, N., Choque, E., Dauwe, R., Fontaine, J. X., Molinie, R., Ayati, F., Fernane, F., & Gontier, E. (2022). Profiling of Essential Oils from the Leaves of *Pistacia lentiscus* Collected in the Algerian Region of Tizi-Ouzou: Evidence of Chemical Variations Associated with Climatic Contrasts between Littoral and Mountain Samples. *Molecules*, 27(13), 4148. <https://doi.org/10.3390/molecules27134148>
- Semeniuc, C. A., Pop, C. R., & Rotar, A. M. (2017). Antibacterial activity and interactions of plant essential oil combinations against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(2), 403–408. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.06.002>
- Sena. (2015). Introducción a la industria de los aceites esenciales extraídos de plantas medicinales y aromáticas (Vol. 7, Issue 1, pp. 37–72).
- Solís, L., Pino, J., Falco, A. S., Tomaylla, C., Quispe, E. G., Solís, J. A., Aragón, L. J., & Solís, A. (2019). Chemical composition and antibacterial activities of essential oil from *Ageratina pentlandiana* (DC.) R.M. King & H. Rob. leaves grown in the Peruvian Andes. *Journal of Essential Oil Research*, 31(5), 409–413. <https://doi.org/10.1080/10412905.2019.1593891>
- Solis, L., Solis, J., Aragon, L., Fernández, M., Hernández, I., Rodeiro, I., & Pino, J. (2017). Composición química y actividad antioxidante de aceites esenciales de *Tanacetum vulgare* y *Mentha x piperita* L. var. vulgaris cultivados en Cusco, Perú. *Revista CENIC. Ciencias Químicas*, 48(1), 41–47.
- Sorlózano, A., Gómez, J. M., Luna, J. de D., Navarro, J. M., & Gutiérrez, J. (2017). Etiological and Resistance Profile of Bacteria Involved in Urinary Tract Infections in Young Children. *BioMed Research International*, 2017, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2017/4909452>
- Stevović, S., Mikovilović, V. S., & Čalić-Dragosavac, D. (2009). Environmental adaptability of tansy (*Tanacetum vulgare* L.). *African Journal of Biotechnology*, 8(22), 6290–6294. <https://doi.org/10.5897/ajb09.1267>
- Szołyga, B., Gniłka, R., Szczepanik, M., & Szumny, A. (2014). Chemical composition and insecticidal activity of *Thuja occidentalis* and *Tanacetum vulgare* essential



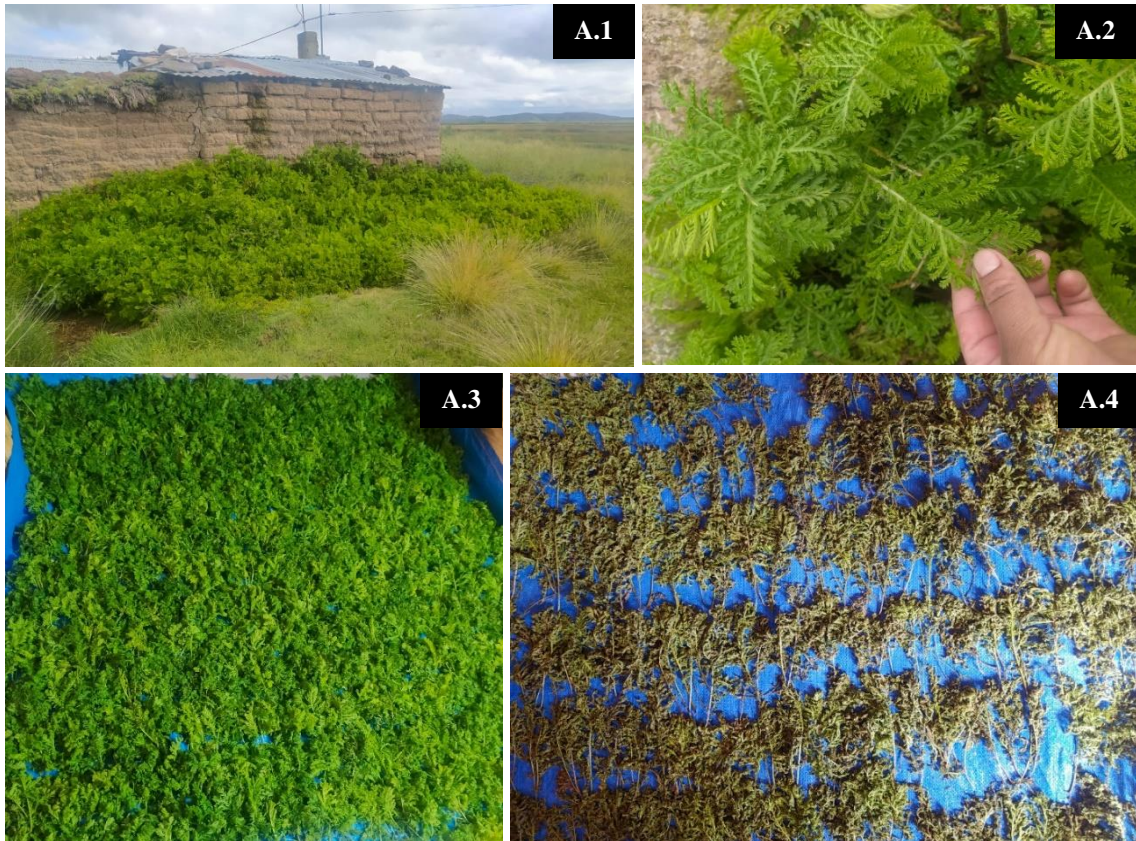
- oils against larvae of the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 151(1), 1–10. <https://doi.org/10.1111/eea.12166>
- Taroco, R., Seija, V., & Vignoli, R. (2006). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. In *Temas de Bacterología y Virología Médica* (Vol. 36, Issue Cim, pp. 663–671).
- Tongnuanchan, P., & Benjakul, S. (2014). Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *Journal of Food Science*, 79(7), 1231–1249. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12492>
- Torres, E., Gracia, L., Thorrens, E., & Villegas, R. (2022). Manual de Introducción a la Microbiología (1st ed.). Fondo editorial de la Universidad de Córdoba.
- Torres, J. (2014). Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de *Luma chequen* (molina) a. gray “arrayán” frente a patógenos aislados de hemocultivos del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/3605/Torres_cj.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). Introducción a la microbiología (9th ed., Vol. 3). Editorial Médica Panamericana.
- Vargas, L., Vila, A., Lanza, A., Bonvehi, P., Nazar, J., Mikietuk, A., Labat, R., & Smayevsky, J. (2005). Utilidad del sistema VITEK en la identificación bacteriana y estudios de sensibilidad antimicrobiana. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 39(1), 19–25.
- Vélez, G. (2022). Evaluación de la aplicación del bioinsecticida obtenido de: Santa María (*Tanacetum parthenium* L.) para el biocontrol de: gorgojo de maíz (*Sitophilus zeamais* M.) en granos almacenados. Universidad Politecnica Salesiana Ecuador. In *DSpace Salesiana*. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/23399/1/UPS-CT010065.pdf>
- 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* Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco. In *Repositorio Institucional UNSAAC* (Vol. 1). <http://repositorio.unsaac.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12918/5181/253T20201002.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

ANEXOS

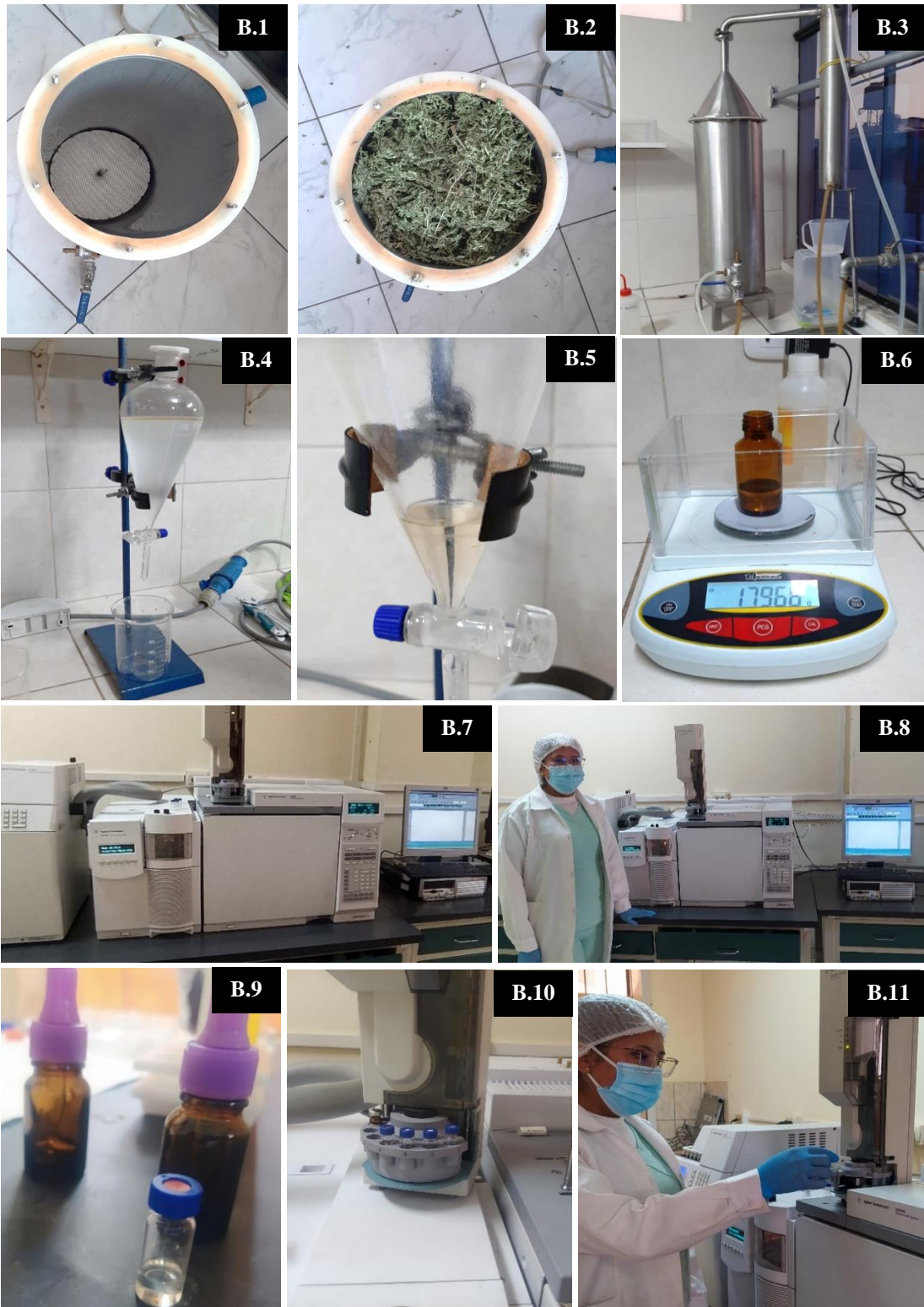
Anexo A. Zona de estudio, recolección y secado de la especie vegetal *Tanacetum vulgare* L.



A.1. Punto de recolección de la planta *Tanacetum vulgare* L ubicada en el C.P. Villa Ccota – Plateria, **A.2.** Planta *Tanacetum vulgare* L (Palma real), **A.3.** Hojas frescas recolectadas de *Tanacetum vulgare* L durante los meses enero – febrero 2022, **A.4.** Secado natural de las hojas de *Tanacetum vulgare* L en un ambiente oscuro y ventilad

Anexo B. Extracción y análisis físico del aceite esencial de hojas de *Tanacetum vulgare*

L.





B.1. Cámara de extracción del hidroddestilador de 20 litros (Inox 340), **B.2.** Colocación del material vegetal seco de hojas de *Tanacetum vulgare* L en la cámara de extracción del hidroddestilador, **B.3.** Equipo de hidroddestilación, **B.4.** Recolección de líquido (agua y aceite) en pera de decantación, **B.5.** Aceite esencial de *Tanacetum vulgare* L separado y recolectado mediante una pera de decantación, **B.6.** Determinación de la densidad del aceite esencial de hojas de *Tanacetum vulgare* L recolectado, **B.7.** Equipo de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM) de la UNSAAC, **B.8.** Análisis del aceite esencial de hojas de *Tanacetum vulgare* L en el Laboratorio de cromatografía y espectrometría – UNSAAC, **B.9.** Almacenamiento del aceite esencial extraído en frasco de color ámbar, **B.10.** Corrida de la muestra de aceite esencial en el CG-EM, **B.11.** Inicio del proceso de corrida del aceite esencial en el equipo CG-EM.

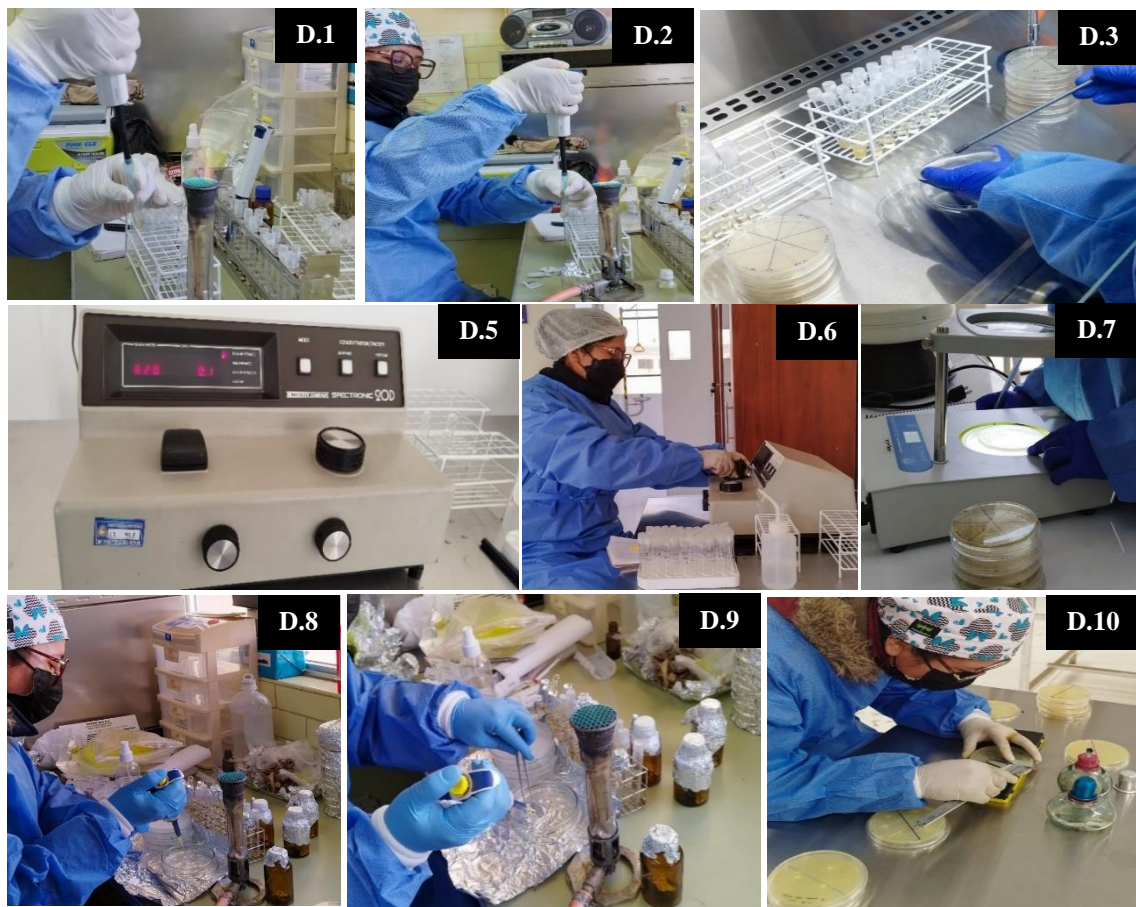
Anexo C. Preparación de medios de cultivo, macrodilución en caldo, y técnica de difusión en agar Kirby-Bauer. Cepas de microorganismos MDR obtenidas mediante el sistema Vitek 2.0.





C.1. Área de microbiología del Hospital Carlos Monge Medrano. **C.2** Caldo de cultivo Mueller-Hinton, **C.3.** Agar Mueller-Hinton, **C.4.** Agar nutritivo, **C.5.** Agar Sabouraud, **C.6.** Pesado de medios de cultivo, **C.7.** Medios de cultivo disueltos en agua destilada listos para su autoclavado, **C.8.** Plaqueado de los medios de cultivo. **C.9.** Cepas de *Escherichia coli* y *Candida albicans* obtenidos mediante el equipo automatizado VITEK 2.0 211 Serie 000013D4383F que emplea el juego de parámetros de interpretación CLSI Natural 212 Resistance M100-S28-2018, **C.10.** Cepa de *Staphylococcus aureus* obtenido mediante el equipo automatizado VITEK 2.0 211 Serie 000013D4383F que emplea el juego de parámetros de interpretación CLSI Natural 212 Resistance M100-S28-2018, **C.11.** Pantalla de lectura estándar de suspensión de microorganismos al estándar 0,5 de la Escala de Mc Farland.

Anexo D. Proceso experimental para la evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de hojas de *Tanacetum vulgare* L.



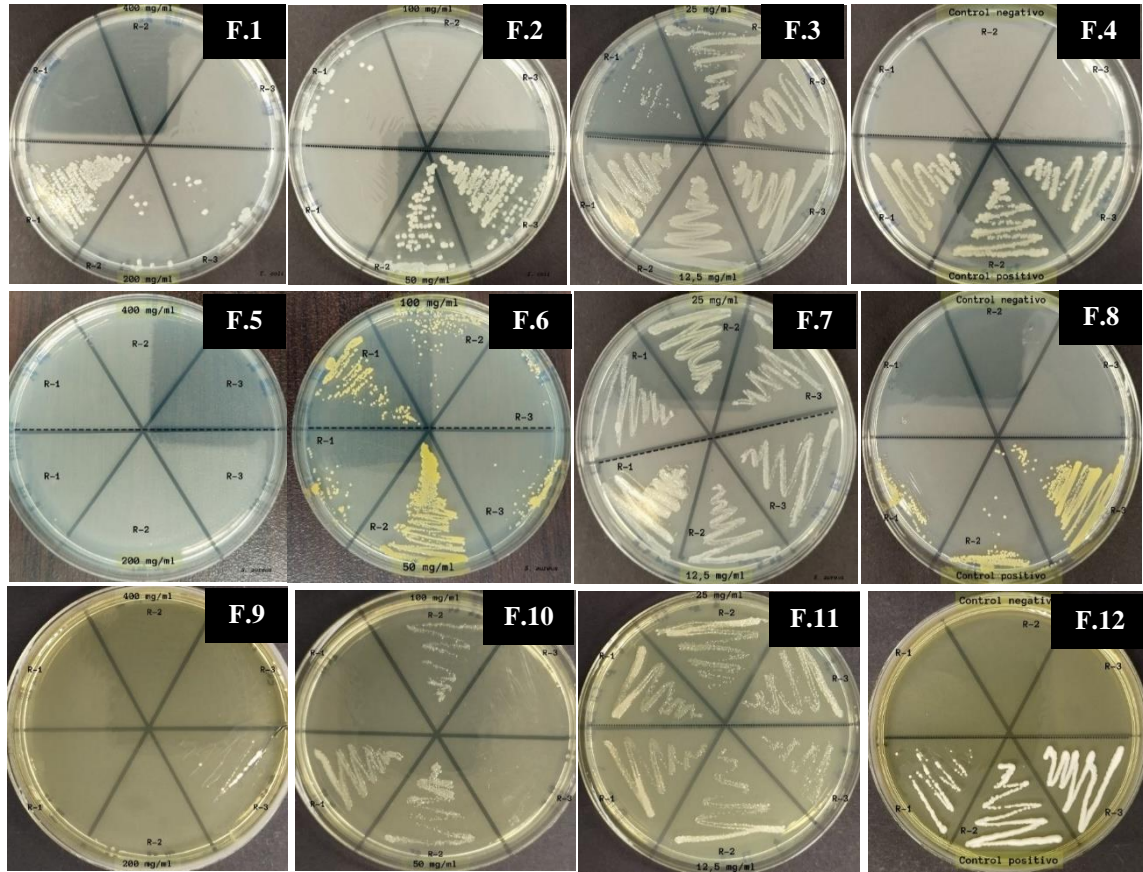
D.1. Preparación de la primera serie de diluciones dobles en tubos mediante la técnica de macrodilución en caldo para la evaluación de CMI, **D.2.** Preparación de la segunda y tercera serie de diluciones dobles en tubos mediante la técnica de macrodilución en caldo para la evaluación de CMI, **D.3.** Siembra en Agar Nutritivo y Agar Sabouraud para determinación de CMB, CMF y CMI, **D.4.** Calibración de espectrofotómetro - Marca Spetronic 20D Milton Roy Company a 620 nm, **D.5.** Medición de absorbancias a 620 nm en espectrofotómetro para determinación de crecimiento microbiano en el Laboratorio de Bioquímica FCCBB - UNA Puno, **D.6.** Conteo de colonias para CMI, CMB y CMF, **D.7.** Preparación de discos embebidos con diferentes concentraciones de aceite esencial de *Tanacetum vulgare* L, **D.8.** Distribución de discos embebidos con aceite esencial en placas con agar Müller-Hinton y Agar Sabouraud, **D.9.** Medición de los halos de inhibición de crecimiento microbiano.

Anexo E. Determinación de la concentración mínima inhibitoria frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* para el aceite esencial de hojas de *Tanacetum vulgare* L



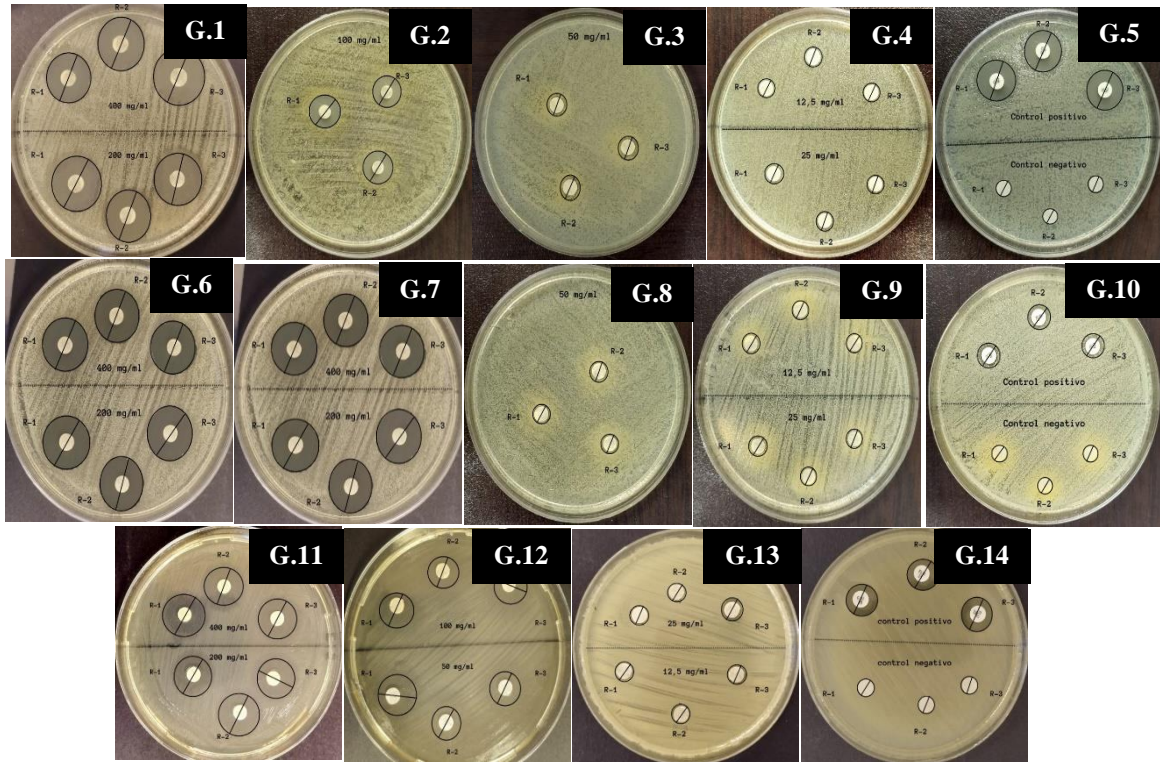
E.1. Serie de concentraciones por triplicado del aceite esencial de hojas de *Tanacetum vulgare* L frente a *Escherichia coli*, **E.2.** Serie de concentraciones por triplicado del aceite esencial de hojas de *Tanacetum vulgare* L frente a *Staphylococcus aureus*. **E.3.** Serie de concentraciones por triplicado del aceite esencial de hojas de *Tanacetum vulgare* L frente a *Candida albicans*.

Anexo F. Determinación de la concentración mínima microbicida frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* para el aceite esencial de hojas de *T. vulgare*



F.1-F.4 Serie por triplicado de recuentos microbianos a partir de las macrodiluciones en caldo frente a *Escherichia coli*, **F.5-F.8** Serie por triplicado de recuentos microbianos a partir de las macrodiluciones en caldo frente a *Staphylococcus aureus*, **F.9-F.12** Serie por triplicado de recuentos microbianos a partir de las macrodiluciones en caldo frente a *Candida albicans*

Anexo G. Determinación de susceptibilidad microbiana frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* para el aceite esencial de hojas de *Tanacetum vulgare* L



G.1-G.5. Halos de susceptibilidad microbiana por triplicado producidos por diferentes concentraciones del aceite esencial de *Tanacetum vulgare* L (palma real) y sus controles frente a *Escherichia coli*. **G.6-G.10.** Halos de susceptibilidad microbiana por triplicado producidos por diferentes concentraciones del aceite esencial de *Tanacetum vulgare* L (palma real) y sus controles frente a *Staphylococcus aureus*. **G.11-G.14.** Halos de susceptibilidad microbiana por triplicado producidos por diferentes concentraciones del aceite esencial de *Tanacetum vulgare* L (palma real) y sus controles frente a *Escherichia coli*.



Anexo H. Ficha de informe clínico de identificación de *Escherichia coli* según el sistema Vitek 2.0

Cliente de bioMérieux:	Informe clínico				
Nombre del paciente:				Nº paciente:	
Localización:				Médico:	
Nº de examen:				Nº de aislamiento:	
Cantidad de organismo:					
Organismo seleccionado:	Escherichia coli				
Origen:	SANGRE				
Recogida:					
Comentarios:					
Información de identificación	Tiempo de análisis:	3,85 horas	Estado:	Final	
Organismo seleccionado	99% Probabilidad	Escherichia coli			
Mensajes de análisis de ID	Bionúmero:	0405610550026600			
Información de sensibilidad	Tiempo de análisis:	12,65 horas	Estado:	Final	
Antibiótico	CMI	Interpretación	Antibiótico	CMI	Interpretación
BLEE	POS	+	Aztreonam	16	R
Ampicilina/Sulbactam	4	S	Ertapenem	<= 0,12	S
Piperacilina/Tazobactam	<= 4	S	Imipenem	<= 0,25	S
Ceftazidima	16	R	Meropenem	<= 0,25	S
Ceftazidima/Avibactam	<= 0,12	S	Amicacina	2	S
Ceftolozano/Tazobactam	0,5	S	Ciprofloxacino	>= 4	R
Cefepima	16	R			
Conclusiones de AES					
Nivel de confianza:	Coherente				



Anexo I. Ficha de informe clínico de identificación de *Staphylococcus aureus* según el sistema Vitek 2.0

Cliente de bioMérieux: Informe clínico
 Nombre del paciente: N° paciente:
 Localización: Médico:
 N° de examen: N° de aislamiento: 1
 Cantidad de organismo:
Organismo seleccionado: Staphylococcus aureus
Origen: ESPUTO Recogida:

Comentarios:	

Información de identificación	Tiempo de análisis: 4,40 horas	Estado: Final
Organismo seleccionado	99% Probabilidad Bionúmero: 010402062763231	Staphylococcus aureus
Mensajes de análisis de ID		

Información de sensibilidad	Tiempo de análisis: 18,08 horas	Estado: Final
------------------------------------	--	----------------------

Antibiótico	CMI	Interpretación	Antibiótico	CMI	Interpretación
Detección de cefoxitina	NEG	-	Eritromicina	≥ 8	R
Bencilpenicilina	$\geq 0,5$	R	Clindamicina	≥ 4	R
Oxacilina	$\leq 0,25$	S	Linezolid	1	S
Ceftarolina	0,25	S	Vancomicina	1	S
Ciprofloxacino	$\leq 0,5$	S	Tetraciclina	≥ 16	R
Levofloxacino	$\leq 0,12$	S	Rifampicina	$\leq 0,03$	S
Resistencia inducible a clindamicina	NEG	-	Trimetoprima/Sulfametoxazol	≤ 10	S

Conclusiones de AES	
Nivel de confianza:	Coherente



Anexo J. Ficha de informe clínico de identificación de *Candida albicans* según el sistema Vitek 2.0

Cliente de bioMérieux:	Informe clínico				
Nombre del paciente:	Nº paciente:				
Localización: Nº de examen: 323810092	Médico: Nº de aislamiento:				
Cantidad de organismo: Organismo seleccionado: <i>Candida albicans</i> Origen: ESPUTO	Recogida:				
Comentarios:					
Información de sensibilidad	Tempo de análisis: 12,60 horas	Estado: Final			
Antibiótico	CMI	Interpretación	Antibiótico	CMI	Interpretación
Fluconazol	1	S	Micafungina	$\leq 0,06$	S
Voriconazol	8	R	Anfotericina B	2	R
Caspofungina	0,25	S	Flucitosina	≤ 1	S
Conclusiones de AES					
Nivel de confianza:	Coherente tras corrección				



Anexo K. Constancia de determinación taxonómica de palma real emitido por el Herbarium Arequipense de la Universidad Nacional de San Agustín



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA
HERBARIUM AREQVIPENSE (HUSA)



CONSTANCIA N°01-2022-HUSA

El director del *Herbarium Arequipense* (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.


HACE CONSTAR:

Que la muestra biológica presentada por Fanny Magali Flores Balda, Bachiller de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional del Altiplano, para la realización de su tesis "AISLAMIENTO, CARACTERIZACION FITOQUIMICA DE COMPUESTOS VOLATILES Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Tanacetum vulgare* L frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* MULTIDROGO RESISTENTES". La muestra fue enviada al laboratorio de Botánica al estado fenológico fresco, para su determinación en el Herbarium Arequipense (HUSA) y corresponde a la siguiente especie.

Division Magnoliophyta
Clase Magnoliopsidae
Subclase Asteridae
Orden Asterales
Familia Asteraceae
Subfamilia Asteroideae
Genero *Tanacetum*
Especie *Tanacetum vulgare* L

Se le expide la presente a solicitud del interesado

Arequipa, 11 de enero del 2022


Mg. Leoncio Mariño Herrera
DIRECTOR
Herbarium Arequipense (HUSA)



Anexo I. Constancia de ejecución del proyecto de tesis en el Hospital “Carlos Monge Medrano” – Juliaca.



PERÚ Ministerio de Salud

RED DE SALUD SAN ROMÁN
HOSPITAL “CARLOS MONGE MEDRANO” - JULIACA



CONSTANCIA

EL QUE SUSCRIBE JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA CLÍNICA DEL HOSPITAL “CARLOS MONGE MEDRANO” DE LA CIUDAD DE JULIACA.

HACE CONSTAR:

Que, la Bach. **Fanny Magali Flores Balda** identificada con DNI N° 73504924, realizó su proyecto de investigación en el Departamento de Patología Clínica – Servicio de Microbiología del Hospital “Carlos Monge Medrano” de la ciudad de Juliaca, titulado “AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DE COMPUESTOS VOLÁTILES Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Tanacetum vulgare* FRENTE A *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* Y *Candida albicans* MULTIDROGORESISTENTES” en los meses de junio, julio y agosto del 2022.

Se expide la presente COSNTANCIA, a solicitud del interesado para los fines que viera conveniente.

Juliaca, 02 de Septiembre del 2022.

Atentamente.



William Apaza Mamani
BIÓLOGO
CBP N° 8505

C.c.

Arch.

“PERSONAS QUE ATENDEMOS PERSONAS”

Carretera Huancané Km. 2 - Juliaca / Teléfono: 321370, Fax: 321750 - R.S.S.R.: 324967 - Hosp.: 321901 -



Anexo J. Constancia de desarrollo de actividades operativas relacionadas al proyecto de



Universidad Nacional del Altiplano
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela Profesional de Biología



CONSTANCIA

EL QUE SUSCRIBE, MSc. JUAN PABLO HUARACHI VALENCIA, DOCENTE DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO PUNO – PERÚ.

HACE CONSTAR:

Que, la Bachiller Fanny Magali Flores Balda, identificada con DNI N° 73504924, egresada de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional del Altiplano – Puno, ha desarrollado los ensayos de la parte experimental como parte de la ejecución del proyecto de investigación titulado “AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DE COMPUESTOS VOLÁTILES Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Tanacetum vulgare* FRENTE A *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* Y *Candida albicans* MULTIDROGORESISTENTES” en el Servicio de Microbiología del Departamento de Patología Clínica del Hospital “Carlos Monte Medrano” de la ciudad de Juliaca, entre los meses de Junio – Agosto 2022 y el Laboratorio de Virología y Biología de la Salud de la Facultad de Ciencias Biológicas, UNA-Puno.

Se emite la presente constancia a solicitud del interesado para los fines que estime conveniente.

Puno, 06 de noviembre del 2023.

Atentamente.

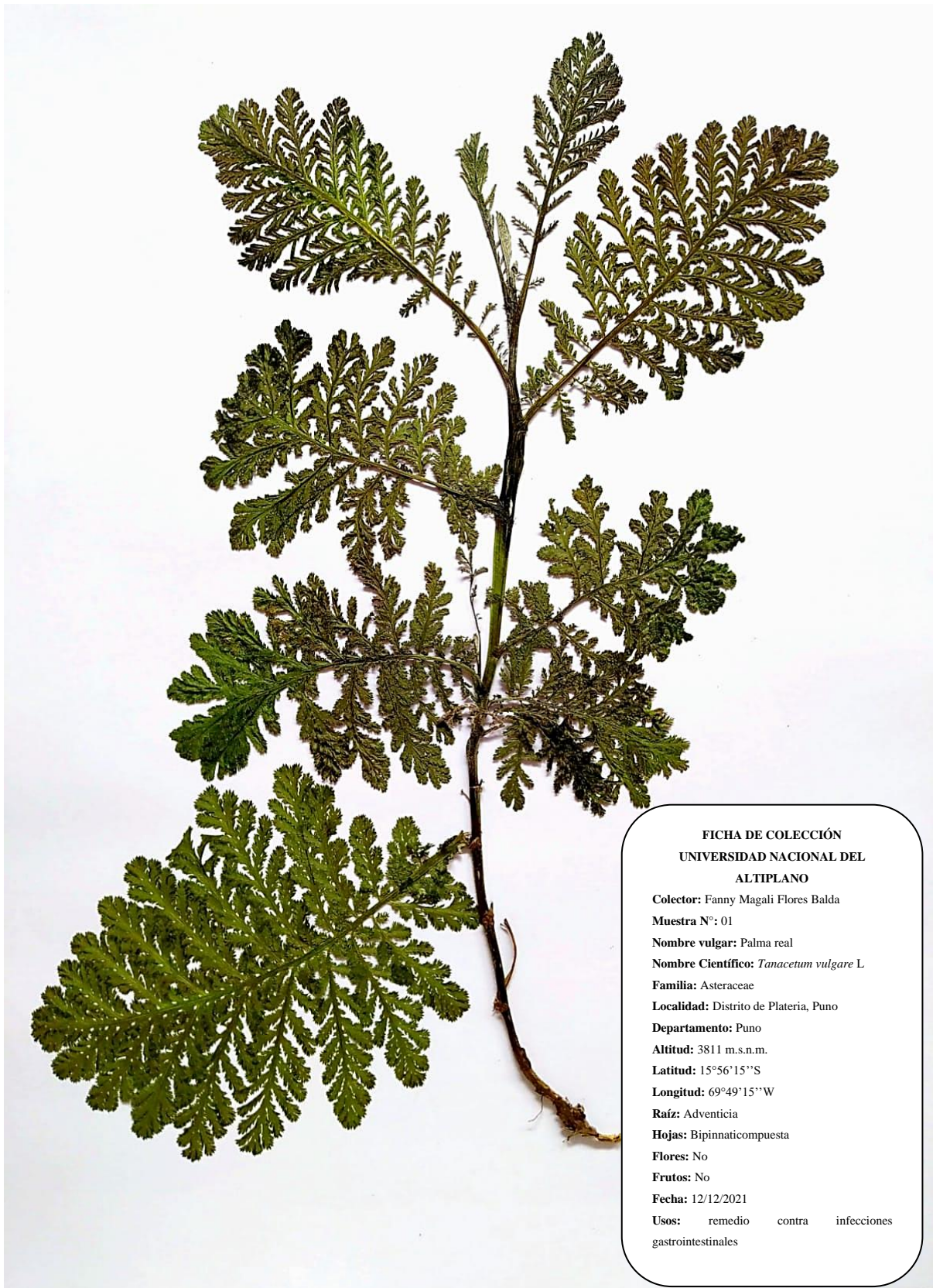
Juan Pablo
Huarachi
Valencia



.....
DIRECTOR DE TESIS

investigación.

Anexo K. Ficha de colección de un espécimen de *Tanacetum vulgare* L (Palma real)



**FICHA DE COLECCIÓN
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL
ALTIPLANO**

Colector: Fanny Magali Flores Balda

Muestra N°: 01

Nombre vulgar: Palma real

Nombre Científico: *Tanacetum vulgare* L.

Familia: Asteraceae

Localidad: Distrito de Plateria, Puno

Departamento: Puno

Altitud: 3811 m.s.n.m.

Latitud: 15°56'15"S

Longitud: 69°49'15"W

Raíz: Adventicia

Hojas: Bipinnatocompuesta

Flores: No

Frutos: No

Fecha: 12/12/2021

Usos: remedio contra infecciones
gastrointestinales

Anexo L. Matriz de tabulación de datos

Tratamiento	Concentración Mínima Microbiana					Susceptibilidad microbiana			
	Abs 620nm_Ec	RC_Ec	Abs 620nm	RC_Sa	Abs 620nm	RC_Ca	S_Ec	S_Sa	S_Ca
400 µl/ml	-	0	-	0	-	0	14,608	15,628	14,230
400 µl /ml	-	0	-	0	-	0	15,207	14,976	12,797
400 µl /ml	-	0	-	0	-	0	16,029	15,009	13,244
200 µl /ml	+	437	+	1	+	0	15,517	14,973	13,182
200 µl /ml	+	19	+	2	+	0	14,051	14,762	14,213
200 µl /ml	+	37	+	0	+	32	14,661	15,181	13,126
100 µl /ml	+	35	+	225	+	0	11,964	9,823	11,042
100 µl /ml	-	0	-	187	-	333	11,766	10,060	10,044
100 µl /ml	-	0	-	39	-	0	11,053	9,526	11,538
50 µl /ml	-	0	-	54	-	404	7,042	6,066	12,438
50 µl /ml	+	134	+	467	+	382	7,491	6,378	10,234
50 µl /ml	+	285	+	107	+	18	7,362	5,920	10,397
25 µl /ml	+	83	+	433	+	396	6,482	6,421	6,007
25 µl /ml	+	393	+	466	+	398	6,102	5,740	5,722
25 µl /ml	+	423	+	458	+	409	5,790	5,982	7,090
12.5 µl/ml	+	429	+	477	+	398	5,932	6,244	5,959
12.5 µl /ml	+	431	+	452	+	427	6,198	5,882	5,806
12.5 µl/ml	+	436	+	447	+	242	5,739	5,556	5,812
Control positivo	+	363	+	452	+	125	12,593	7,738	9,355
Control positivo	+	439	+	159	+	401	12,711	7,537	9,295
Control positivo	+	447	+	472	+	414	12,221	7,421	9,750
Control negativo	-	0	-	0	-	0	5,000	5,001	5,000
Control negativo	-	0	-	0	-	0	5,000	5,001	5,000
Control negativo	-	0	-	0	-	0	5,000	5,001	5,000

Donde: Abs_{620nm_Ec}=Presencia de turbidez a una Abs_{620 nm} para crecimiento de *E. coli*, Abs_{620nm_Sa}= Presencia de turbidez a una Abs_{620 nm} para crecimiento de *S. aureus*, Abs_{620nm_Ca}= Presencia de turbidez a una Abs_{620 nm} para crecimiento de *C. albicans*, RC_Ec= Recuento de colonias de *E. coli* (UFC x 100/ml), RC_Sa= Recuento de colonias de *S. aureus* (UFC x 100/ml), RC_Ca= Recuento de colonias de *C. albicans* (UFC x 100/ml), S_Ec= Halo de susceptibilidad en mm frente a *E. coli* ejercido por el AE de hojas de *T. vulgare* L, S_Sa= Halo de susceptibilidad en mm frente a *S. aureus* ejercido por el AE de hojas de *T. vulgare* L, S_Ca= Halo de susceptibilidad en mm frente a *C. albicans* ejercido por el AE de hojas de *T. vulgare* L, Control positivo= Gentamicina 10µg, Control negativo=Tween 80, -= Sin turbidez, += Con turbidez



AUTORIZACIÓN PARA EL DEPÓSITO DE TESIS O TRABAJO DE INVESTIGACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Por el presente documento, Yo Fanny Magali Flores Balda,
identificado con DNI 73504924 en mi condición de egresado de:

Escuela Profesional, Programa de Segunda Especialidad, Programa de Maestría o Doctorado
de Biología,

informo que he elaborado el/la Tesis o Trabajo de Investigación denominada:

“Aislamiento, caracterización fitoquímica de compuestos volátiles y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Tanacetum vulgare* L. frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* multidrogoresistentes.”

para la obtención de Grado, Título Profesional o Segunda Especialidad.

Por medio del presente documento, afirmo y garantizo ser el legítimo, único y exclusivo titular de todos los derechos de propiedad intelectual sobre los documentos arriba mencionados, las obras, los contenidos, los productos y/o las creaciones en general (en adelante, los “Contenidos”) que serán incluidos en el repositorio institucional de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno.

También, doy seguridad de que los contenidos entregados se encuentran libres de toda contraseña, restricción o medida tecnológica de protección, con la finalidad de permitir que se puedan leer, descargar, reproducir, distribuir, imprimir, buscar y enlazar los textos completos, sin limitación alguna.

Autorizo a la Universidad Nacional del Altiplano de Puno a publicar los Contenidos en el Repositorio Institucional y, en consecuencia, en el Repositorio Nacional Digital de Ciencia, Tecnología e Innovación de Acceso Abierto, sobre la base de lo establecido en la Ley N° 30035, sus normas reglamentarias, modificatorias, sustitutorias y conexas, y de acuerdo con las políticas de acceso abierto que la Universidad aplique en relación con sus Repositorios Institucionales. Autorizo expresamente toda consulta y uso de los Contenidos, por parte de cualquier persona, por el tiempo de duración de los derechos patrimoniales de autor y derechos conexos, a título gratuito y a nivel mundial.

En consecuencia, la Universidad tendrá la posibilidad de divulgar y difundir los Contenidos, de manera total o parcial, sin limitación alguna y sin derecho a pago de contraprestación, remuneración ni regalía alguna a favor mío; en los medios, canales y plataformas que la Universidad y/o el Estado de la República del Perú determinen, a nivel mundial, sin restricción geográfica alguna y de manera indefinida, pudiendo crear y/o extraer los metadatos sobre los Contenidos, e incluir los Contenidos en los índices y buscadores que estimen necesarios para promover su difusión.

Autorizo que los Contenidos sean puestos a disposición del público a través de la siguiente licencia:

Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. Para ver una copia de esta licencia, visita: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

En señal de conformidad, suscribo el presente documento.

Puno 17 de enero del 2024

FIRMA (obligatoria)



Huella



DECLARACIÓN JURADA DE AUTENTICIDAD DE TESIS

Por el presente documento, Yo Fanny Magali Flores Balda,
identificado con DNI 73504924 en mi condición de egresado de:

Escuela Profesional, Programa de Segunda Especialidad, Programa de Maestría o Doctorado
de Biología

informo que he elaborado el/la Tesis o Trabajo de Investigación denominada:

"Aislamiento, caracterización fitoquímica de compuestos volátiles y actividad antimicrobiana del aceite esencial de Tanacetum vulgare L frente a Escherichia coli, Staphylococcus aureus y Candida albicans multiresistentes"

Es un tema original.

Declaro que el presente trabajo de tesis es elaborado por mi persona y **no existe plagio/copia** de ninguna naturaleza, en especial de otro documento de investigación (tesis, revista, texto, congreso, o similar) presentado por persona natural o jurídica alguna ante instituciones académicas, profesionales, de investigación o similares, en el país o en el extranjero.

Dejo constancia que las citas de otros autores han sido debidamente identificadas en el trabajo de investigación, por lo que no asumiré como tuyas las opiniones vertidas por terceros, ya sea de fuentes encontradas en medios escritos, digitales o Internet.

Asimismo, ratifico que soy plenamente consciente de todo el contenido de la tesis y asumo la responsabilidad de cualquier error u omisión en el documento, así como de las connotaciones éticas y legales involucradas.

En caso de incumplimiento de esta declaración, me someto a las disposiciones legales vigentes y a las sanciones correspondientes de igual forma me someto a las sanciones establecidas en las Directivas y otras normas internas, así como las que me alcancen del Código Civil y Normas Legales conexas por el incumplimiento del presente compromiso

Puno 17 de enero del 2024

FIRMA (obligatoria)



Huella