



Universidad Católica de Santa María

**Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotecnológicas**

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

**Formulación y evaluación de la actividad antibacteriana de un jabón
líquido con aceite esencial de *Tagetes Minuta* mediante ensayos in vitro y
pruebas de recuperación microbiológica en voluntarios.**

Tesis presentada por:

Calderon Flores, Stephany Dayane

ORCID: 0009-0007-8467-2857

Rivera Jahuir, Diana Karoline

ORCID: 0009-0008-1513-42785

para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

Asesor (a):

Dra. Nieto Montesinos, Rita Milagros

ORCID: 0000-0002-5671-4593

Arequipa - Perú

2026

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FARMACIA Y BIOQUIMICA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 14 de Junio del 2026

Dictamen: 015214-C-EPFyB-2026

Visto el borrador del expediente 015214, presentado por:

2019700412 - CALDERON FLORES STEPHANY DAYANE

2019246632 - RIVERA JAHUIRA DIANA KAROLINE

Titulado:

**FORMULACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE UN JABÓN LÍQUIDO
CON ACEITE ESENCIAL DE TAGETES MINUTA MEDIANTE ENSAYOS IN VITRO Y PRUEBAS DE
RECUPERACIÓN MICROBIOLÓGICA EN VOLUNTARIOS.**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

Título Profesional/Título de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

**29520165 - TORRES VELA FERNANDO ANTERO
DICTAMINADOR**



**41158700 - MARCILLA TRUYENQUE SHANERI
DICTAMINADOR**



**45767861 - CHOQUENAIRA QUISPE CELIA
DICTAMINADOR**



FORMULACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE UN JABÓN LÍQUIDO CON ESENCIAL DE TAGETES MINUTA MEDIANTE ENSAYOS IN VITRO Y PRUEBAS DE RECUPERACIÓN MICROBIOLÓGICA EN VOLUNTARIOS.

INFORME DE ORIGINALIDAD

2%

INDICE DE SIMILITUD

3%

FUENTES DE INTERNET

4%

PUBLICACIONES

1%

TRABAJOS DEL ESTUD

FUENTES PRIMARIAS

1

repositorio.uap.edu.pe

Fuente de Internet

2

repositorio.uma.edu.pe

Fuente de Internet

3

repositorio.unf.edu.pe

Fuente de Internet

Excluir citas

Excluir bibliografía

Apagado

Apagado

Excluir coincidencias

< 1%

Dedicatoria

Dedico este trabajo a Dios, por haberme dado la fuerza, la sabiduría y la salud necesarias para culminar esta etapa de mi vida.

A mis padres, Víctor Guillermo Calderón Ayma y Giovanna Lili Flores Mendoza, por su amor incondicional, sus sacrificios y su constante apoyo. Gracias por ser el pilar fundamental en mi formación, no solo académica, sino también personal. Todo lo que soy y lo que he logrado se lo debo a ustedes.

Con todo mi amor y gratitud, dedico este trabajo a las personas que han sido mi pilar y mi luz en cada paso de este camino. A mi hermanito, cuya ternura y alegría me dieron razones para esforzarme más incluso en los días difíciles

A mis abuelos, Elva y Jaime que, aunque ya no están presentes, viven en mi corazón. Su amor, sus enseñanzas y su ejemplo me acompañaron en cada paso de este camino. Y a Dios por darme la vida, sabiduría y fuerza para llegar hasta aquí. Sin su guía no podría ser nada de esto posible.

Agradecimientos

Agradecemos, en primer lugar, a Dios, por habernos acompañado con sabiduría y fortaleza en cada etapa de este proceso. Por habernos dado la salud, la claridad y la constancia para llegar hasta aquí. Su presencia ha sido nuestra guía silenciosa y firme desde el inicio hasta el final.

A nuestra asesora, la Dra. Rita Nieto Montesinos, le expresamos nuestro profundo agradecimiento por su tiempo, su compromiso y su dedicación constante. Gracias por su guía clara, por su exigencia que nos impulsó a mejorar y por haber creído en el potencial de este trabajo. Su acompañamiento ha sido una pieza clave en esta etapa tan importante para nosotras.

A nuestras familias, que han sido el verdadero sostén detrás de cada logro. Gracias por su apoyo incondicional, por su paciencia y por estar siempre presentes, incluso cuando no lo decíamos en voz alta. Por celebrar cada avance y alentarnos en cada reto. Este trabajo también es reflejo del amor, los valores y la fortaleza que nos han enseñado a lo largo de la vida.

Y finalmente, a cada una de las personas que fueron parte de este proceso, ya sea con una palabra de aliento, un gesto de ayuda o simplemente estando cerca: gracias. Porque todo acompañamiento sincero deja huella, y cada huella nos ha traído hasta aquí.

¡Gracias Infinitas!

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como finalidad desarrollar y evaluar un jabón líquido elaborado con aceite esencial de *Tagetes minuta*, considerando sus propiedades y su posible aplicación en higiene personal. Se desarrolló bajo un enfoque cuantitativo, de tipo experimental y aplicado, con el objetivo de contribuir al aprovechamiento de recursos naturales con potencial antimicrobiano. Inicialmente, se procesó el material vegetal de *Tagetes minuta* a una temperatura de 25°C para la obtención de su aceite esencial mediante destilación por arrastre de vapor, técnica que permitió aislar compuestos volátiles característicos, los cuales fueron identificados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, tales como D-limoneno, trans- β -ocimeno y 2,6-dimetil-7-octen-4-ona. Como resultado, se obtuvo un volumen de 12 mL de aceite esencial, con un rendimiento de 0,16 %. Asimismo, el aceite obtenido presentó pH de 4,73, densidad de 0,87 g/mL e índice de refracción de 1,484. Posteriormente, se formuló el jabón líquido con diferentes concentraciones de aceite esencial, asegurando homogeneidad y estabilidad del producto. La actividad antibacteriana fue evaluada frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* mediante el método de difusión en agar por pozo (Kirby-Bauer modificado) y el ensayo de recuento microbiológico de superficies utilizando el método del enjuague. Los resultados mostraron un mayor efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus*, registrándose halos de inhibición de 15,77; 18,57 y 21,47 mm para las diferentes concentraciones, alcanzándose el valor máximo a una concentración de 1,5 % de aceite esencial incorporado en el jabón. En el caso de *Escherichia coli*, se obtuvieron halos de inhibición de 13,53; 15,37 y 17,60 mm, observándose igualmente el mayor efecto a la concentración de 1,5 %. En cuanto al recuento microbiológico, se obtuvo frente a *Staphylococcus aureus* un recuento inicial (No) de $1,4 \times 10^5$ UFC/mano y un recuento final (Nf) de $3,5 \times 10^2$ UFC/mano, alcanzando un porcentaje de reducción de 99,75 %. Por otro lado, frente a *Escherichia coli*, se registró un No de $1,5 \times 10^5$ UFC/mano y un Nf de $1,3 \times 10^2$ UFC/mano, con un porcentaje de reducción de 99,13 %. Asimismo, el análisis estadístico mostró diferencias significativas ($p < 0,05$), evidenciando que la formulación presentó actividad antibacteriana frente a ambas cepas evaluadas. Se observó además que, a mayor concentración de aceite esencial, mayor fue la inhibición bacteriana. Del mismo modo, el efecto antibacteriano fue superior frente a *Staphylococcus aureus* en comparación con *Escherichia coli*. En conjunto, estos hallazgos respaldan el potencial del aceite esencial de *Tagetes minuta* como ingrediente activo con propiedades antibacterianas.

Palabras clave: Actividad antibacteriana, jabón líquido, *Tagetes minuta*.

ABSTRACT

The purpose of this research study was to develop and evaluate a liquid soap made with *Tagetes minuta* essential oil, taking into account its properties and its potential application in personal hygiene. The study was conducted using a quantitative, experimental, and applied approach, with the goal of contributing to the use of natural resources with antimicrobial potential. Initially, the plant material from *Tagetes minuta* was processed at a temperature of 25°C to obtain its essential oil via steam distillation, a technique that allowed for the isolation of characteristic volatile compounds, which were identified by gas chromatography coupled with mass spectrometry, such as D-limonene, trans- β -ocimene, and 2,6-dimethyl-7-octen-4-one. As a result, a volume of 12 mL of essential oil was obtained, with a yield of 0.16%. Furthermore, the obtained oil had a pH of 4.73, a density of 0.87 g/mL, and a refractive index of 1.484. Subsequently, the liquid soap was formulated with different concentrations of essential oil, ensuring the product's homogeneity and stability. Antibacterial activity was evaluated against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* using the agar well diffusion method (modified Kirby–Bauer) and the surface microbiological count assay using the rinse method. The results showed a greater antibacterial effect against *Staphylococcus aureus*, with inhibition zones of 15.77, 18.57, and 21.47 mm for the different concentrations, with the maximum value achieved at a concentration of 1.5% essential oil incorporated into the soap. In the case of *Escherichia coli*, inhibition zones of 13.53, 15.37, and 18.50 mm were obtained, with the greatest effect also observed at a concentration of 1.5%. Regarding the microbiological count, an initial count (No) of 1.4×10^5 CFU/hand and a final count (Nf) of 3.5×10^2 CFU/hand were obtained for *Staphylococcus aureus*, resulting in a reduction percentage of 99.75%. On the other hand, against *Escherichia coli*, an initial count (No) of 1.5×10^5 CFU/hand and a final count (Nf) of 1.3×10^2 CFU/hand were recorded, with a reduction percentage of 99.13%. Furthermore, statistical analysis revealed significant differences ($p < 0.05$), demonstrating that the formulation exhibited antibacterial activity against both evaluated strains. It was also observed that higher concentrations of essential oil resulted in greater bacterial inhibition. Similarly, the antibacterial effect was greater against *Staphylococcus aureus* than against *Escherichia coli*. Taken together, these findings support the potential of *Tagetes minuta* essential oil as an active ingredient with antibacterial properties.

Keywords: Antibacterial activity, liquid soap, *Tagetes minuta*.

ÍNDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	3
TABLA DE VARIABLES E INDICADORES	3
CAPITULO I.....	5
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO.....	6
1.1. Problema Sanitario	6
1.2. Características generales y clasificación de las bacterias de estudio.....	6
1.2.1. Staphylococcus aureus	7
1.2.2. Escherichia coli.....	9
1.3. Métodos de evaluación de la actividad antibacteriana	12
1.3.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI)	12
1.3.2. Método de enjuague	13
1.4. Evaluación de superficies.....	13
1.5. Jabones	14
1.5.1. Tipos	14
1.5.2. Mecanismo de acción.....	15
1.6. Tagetes minuta (Huacatay).....	16
1.6.1. Aspectos generales.....	16
1.6.2. Descripción Botánica	16
1.6.3. Morfología	16
1.6.4. Taxonomía	17
1.6.5. Distribución geográfica.....	17
1.6.6. Propiedades terapéuticas	18
1.6.7. Composición química de su aceite esencial	18
1.7. Aceite Esencial	19
1.7.1. Definición.....	19
1.7.2. Propiedades físicas y organolépticas de los aceites esenciales	19
1.7.3. Composición química de los aceites esenciales	19
1.7.4. Actividades Farmacológicas de los aceites esenciales.....	20

1.7.5. Métodos de extracción de aceites esenciales.....	21
1.7.6. Métodos analíticos aplicados para la identificación de componentes químicos en aceites esenciales	22
CAPITULO II	25
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	26
2.1. Lugar de ejecución	26
2.2. Materiales	26
2.2.1. Material biológico	26
2.2.2. Material Botánico.....	26
2.2.3. Reactivos químicos	26
2.2.4. Medios de cultivo.....	26
2.2.5. Materiales de laboratorio.....	27
2.2.6. Aparatos y equipos.....	27
2.2.7. Otros.....	28
2.3. Métodos	28
2.3.1. Obtención del aceite esencial de “ <i>Tagetes minuta</i> ”	28
2.3.2. Evaluación organoléptica del aceite esencial	30
2.3.3. Determinación de propiedades fisicoquímicas del aceite esencial.....	30
2.3.4. Análisis cromatográfico (GC–MS)	31
2.3.5. Concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i>	31
2.3.6. Formulación del jabón líquido con diferentes concentraciones de aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i>	33
2.3.7. Elaboración del jabón líquido con diferentes concentraciones de aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i>	34
2.3.8. Control de calidad del jabón líquido con aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i>	35
2.3.9. Evaluación de la actividad antibacteriana <i>in vitro</i> del jabón líquido con aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i>	37
Preparación del jabón líquido con diferentes concentraciones del aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i>	37
2.3.10. Evaluación de la actividad antibacteriana del jabón líquido con aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i> en voluntarios mediante el método enjuague	38
2.4. Diagrama de flujo de actividades	43
CAPITULO III	44
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSION	45
5.1. Obtención del aceite esencial de “ <i>Tagetes minuta</i> ”.....	45

3.2	Evaluación organoléptica del aceite esencial	46
3.3	Determinación de propiedades fisicoquímicas del aceite esencial	47
3.4	Análisis cromatográfico (GC–MS).....	49
3.5	Concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i>	50
3.6	Obtención del jabón líquido con diferentes concentraciones de aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i>	55
3.7	Control de calidad del jabón líquido con aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i>	57
3.8	Evaluación de la actividad antibacteriana <i>in vitro</i> del jabón líquido con aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i>	63
3.9	Evaluación de la actividad antibacteriana del jabón líquido con aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i> en voluntarios mediante el método de enjuague.....	74
CONCLUSIONES		93
RECOMENDACIONES		95
ANEXOS.....		96
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		115



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Variable independiente.....	4
Tabla 2. Variable dependiente.....	4
Tabla 3. Taxonomía de <i>Tagetes minuta</i> (huacatay)	17
Tabla 4. Composición de la formulación del jabón líquido con 1,5% aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i>	34
Tabla 5. Características organolépticas del aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i> (huacatay).....	47
Tabla 6. Parámetros fisicoquímicos de control de calidad del aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i> (huacatay) (n= 3).....	49
Tabla 7. Principales componentes identificados	50
Tabla 8. Halos de inhibición (mm) obtenidos para <i>Staphylococcus aureus</i> frente a diferentes concentraciones del aceite esencial (n= 3)	51
Tabla 9. Halos de inhibición (mm) obtenidos para <i>Escherichia coli</i> frente a diferentes concentraciones del aceite esencial (n= 3)	52
Tabla 10. Resultados de la prueba de normalidad Shapiro-Wilk para el halo de inhibición (mm).....	53
Tabla 11. Comparación de medias de los halos de inhibición entre concentraciones del aceite esencial mediante prueba de Tukey (HSD).....	54
Tabla 12. Resultados de los parámetros fisicoquímicos del control de calidad del jabón líquido con aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i> (huacatay) al 0,5 %. (n=3)	58
Tabla 13. Parámetros fisicoquímicos del control de calidad del jabón líquido con aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i> (huacatay) al 1,0 %. (n=3)	59
Tabla 14. Parámetros fisicoquímicos del control de calidad del jabón líquido con aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i> (huacatay) al 1,5 %. (n=3)	62
Tabla 15. Diámetros de los halos de inhibición (mm) obtenidos frente a <i>Escherichia coli</i> mediante difusión en placa (n= 3)	65
Tabla 16. Resultados de la prueba de normalidad Shapiro-Wilk para el halo de inhibición (mm).....	66
Tabla 17. Análisis de varianza (ANOVA) del Halo de inhibición de <i>Escherichia coli</i> frente a diferentes concentraciones del aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i> “huacatay” en el jabón líquido	67

Tabla 18. Comparación múltiple de medias entre concentraciones mediante la prueba de Tukey	68
Tabla 19. Diámetros de los halos de inhibición (mm) obtenidos frente a <i>Staphylococcus aureus</i> mediante difusión en placa (n= 3)	69
Tabla 20. Resultados de la prueba de normalidad Shapiro-Wilk para el halo de inhibición (mm).....	70
Tabla 21. Análisis de varianza (ANOVA) del halo de inhibición de <i>Staphylococcus aureus</i> frente a diferentes concentraciones del aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i> “huacatay” en el jabón líquido.....	71
Tabla 22. Comparación múltiple de medias entre concentraciones mediante la prueba de Tukey	71
Tabla 23. Evaluación del supuesto de normalidad mediante la prueba de Shapiro - Wilk para el análisis ANOVA.....	73
Tabla 24. Resultados del recuento microbiológico antes del tratamiento del Grupo 1 (Sujetos sometidos a la aplicación de jabón líquido base) frente a <i>S. aureus</i> (n= 3)	75
Tabla 25. Resultados del recuento microbiológico posterior al tratamiento del Grupo 1 (Sujetos sometidos a la aplicación de jabón líquido base) frente a <i>S. aureus</i> (n= 3)	75
Tabla 26. Resultados del recuento microbiológico antes del tratamiento del Grupo 2 (Sujetos sometidos a la aplicación de jabón líquido formulado con 1,5% de aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i>) tras la recuperación bacteriana frente a <i>S. aureus</i> (n= 3)	76
Tabla 27. Resultados del recuento microbiológico posterior al tratamiento del Grupo 2 (Sujetos sometidos a la aplicación de jabón líquido formulado con 1,5% de aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i>) tras la recuperación bacteriana frente a <i>S. aureus</i> (n= 3).....	76
Tabla 28. Resultados del recuento microbiológico antes del tratamiento del Grupo 3 (Sujetos sometidos a la aplicación de jabón antibacterial de origen comercial) frente a <i>S. aureus</i> (n= 3).....	77
Tabla 29. Resultados del recuento microbiológico posterior al tratamiento del Grupo 3 (Sujetos sometidos a la aplicación de jabón antibacterial de origen comercial) frente a <i>S. aureus</i> (n= 3)	77
Tabla 30. Reducción de <i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/mano) mediante el método	

de enjuague tras la aplicación de jabones líquidos empleados en la investigación.....	78
Tabla 31. Resultados de la prueba de normalidad Shapiro-Wilk para los datos de $\log_{10}$ (Nf)	80
Tabla 32. Estadísticos de la prueba de Kruskal–Wallis para el recuento final de <i>Staphylococcus aureus</i> según el tipo de jabón líquido	80
Tabla 33. Comparación de la carga microbiana de <i>Staphylococcus aureus</i> ($\log_{10}$ Nf) entre tres tipos de jabón mediante la prueba de Kruskal–Wallis.....	81
Tabla 34. Rangos promedio del $\log_{10}$ (Nf) según el tipo de jabón líquido frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	81
Tabla 35. Resultados del recuento microbiológico antes del tratamiento del Grupo 1 (Sujetos sometidos a la aplicación de jabón líquido base) tras la recuperación bacteriana frente a <i>E. coli</i> (n= 3)	83
Tabla 36. Resultados del recuento microbiológico posterior al tratamiento del Grupo 1 (Sujetos sometidos a la aplicación de jabón líquido base) tras la recuperación bacteriana frente a <i>E. coli</i> (n= 3)	83
Tabla 37. Resultados del recuento microbiológico antes del tratamiento del Grupo 2 (Sujetos sometidos a la aplicación de jabón líquido formulado con 1,5% de aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i>) tras la recuperación bacteriana frente a <i>E. coli</i> (n= 3).....	84
Tabla 38. Resultados del recuento microbiológico posterior al tratamiento del Grupo 2 (Sujetos sometidos a la aplicación de jabón líquido formulado con 1,5% de aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i>) tras la recuperación bacteriana frente a <i>E. coli</i> (n= 3).....	84
Tabla 39. Resultados del recuento microbiológico antes del tratamiento del Grupo 3 (Sujetos sometidos a la aplicación de jabón antibacterial de origen comercial) tras la recuperación bacteriana frente a <i>E. coli</i> (n= 3).....	85
Tabla 40. Resultados del recuento microbiológico posterior al tratamiento del Grupo 3 (Sujetos sometidos a la aplicación de jabón antibacterial de origen comercial) tras la recuperación bacteriana frente a <i>E. coli</i> (n= 3).....	85
Tabla 41. Reducción de <i>Escherichia coli</i> (UFC/mano) mediante el método de enjuague tras la aplicación de jabones líquidos empleados en la investigación	86
Tabla 42. Resultados de la prueba de normalidad Shapiro-Wilk para los datos de $\log_{10}$ (Nf)	88
Tabla 43. Estadísticos de la prueba de Kruskal–Wallis para el recuento final	

de Escherichia coli según el tipo de jabón líquido	88
Tabla 44. Comparación de la carga microbiana de Escherichia coli ($\log_{10}$ Nf) entre tres tipos de jabón mediante la prueba de Kruskal–Wallis	89
Tabla 45. Rangos promedio del $\log_{10}$ (Nf) según el tipo de jabón líquido frente a Escherichia coli.	90



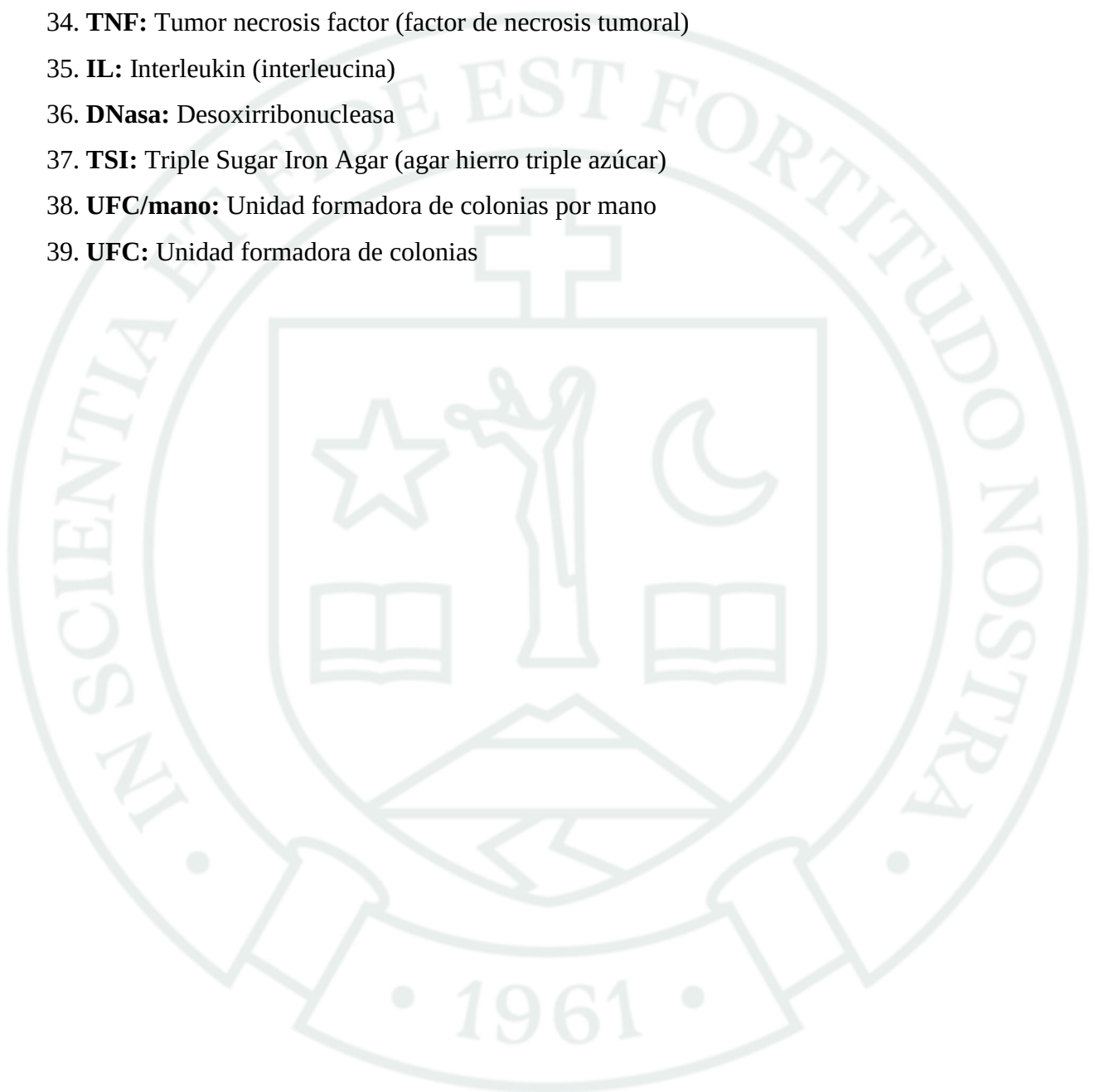
ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Flujograma de actividades	43
Figura 2. Materia prima vegetal empleada en la obtención del aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i> (huacatay).	45
Figura 3. Equipo de destilación por arrastre de vapor y separación del aceite esencial mediante pera de decantación.....	45
Figura 4. Purificación mediante tratamiento con solución sobresaturada de sal química y secado con sulfato de sodio anhidro.....	46
Figura 5. Secado y purificación mediante tratamiento con sulfato de sodio anhidro y obtención del aceite esencial libre de humedad	46
Figura 6. Insumos para la elaboración	56
Figura 7. Preparación del jabón líquido base	56
Figura 8. Incorporación del aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i>	56
Figura 9. Jabón líquido con aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i>	56
Figura 10. Determinación de pH	63
Figura 11. Determinación de la densidad.....	63
Figura 12. Determinación de % de humedad y sustancias volátiles	63
Figura 13. Activación de bacterias ATCC	64
Figura 14. Inoculo en escala de 0.5 de McFarland.....	64
Figura 15. Preparación de jabón líquido a diferentes concentraciones de aceite esencial.....	64
Figura 16. Incubación de placas	64
Figura 17. Lectura de resultados	64
Figura 18. Asepsia de manos.....	91
Figura 19. Contaminación palmar	91
Figura 20. Masaje de las manos	91
Figura 21. Recuperación bacteriana	91

LISTA DE ABREVIATURAS

1. **ADN:** Ácido desoxirribonucleico
2. **AMPc:** Adenosín monofosfato cíclico
3. **ANOVA:** Análisis de la varianza
4. **APi:** Área del pico individual
5. **ATCC:** American Type Culture Collection (Colección Americana de Cultivos Tipo)
6. **BPM:** Buenas prácticas de manufactura
7. **CMI:** Concentración mínima inhibitoria
8. **GMPc:** Guanosín monofosfato cíclico
9. **DMSO:** Dimetilsulfóxido
10. **EAST:** Enteroagregative Escherichia coli heat-stable toxin (toxina termoestable de Escherichia coli enteroagregativa)
11. **EAEC:** Enteroagregativa
12. **EHEC:** Enterohemorrágica
13. **EHEC/STEC:** Enterohemorrágica / productora de toxina Shiga
14. **EIEC:** Enteroinvasiva
15. **EPEC:** Enteropatógena
16. **ETEC:** Enterotoxigénica
17. **GC:** Cromatografía de gases
18. **GC-MS:** Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas
19. **IDSA:** Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América
20. **ISTM:** Sociedad Internacional de Medicina del Viajero
21. **LIA:** Lysine Iron Agar (agar hierro lisina)
22. **LPS:** Lipopolisacárido
23. **LT:** Toxina termolábil
24. **MIO:** Motilidad Indol Ornitina
25. **MS:** Espectrometría de masas
26. **MSCRAMM:** Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules (componentes de superficie microbianos que reconocen moléculas adhesivas de la matriz extracelular)
27. **OMS:** Organización Mundial de la Salud
28. **PCR:** Polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)

- 29. **SARM:** Staphylococcus aureus resistente a meticilina
- 30. **ST:** Salmonella Typhimurium
- 31. **SMAC:** Sorbitol MacConkey Agar (agar MacConkey con sorbitol)
- 32. **SUH:** Síndrome urémico hemolítico
- 33. **TAP:** Área total de los picos cromatográficos.
- 34. **TNF:** Tumor necrosis factor (factor de necrosis tumoral)
- 35. **IL:** Interleukin (interleucina)
- 36. **DNasa:** Desoxirribonucleasa
- 37. **TSI:** Triple Sugar Iron Agar (agar hierro triple azúcar)
- 38. **UFC/mano:** Unidad formadora de colonias por mano
- 39. **UFC:** Unidad formadora de colonias



INTRODUCCIÓN

La higiene de manos constituye una de las intervenciones más efectivas y económicas para la prevención de enfermedades infecciosas, principalmente en contextos donde el acceso a productos adecuados es limitado (1–6). Aunque la Organización Mundial de la Salud (OMS) enfatiza la importancia del lavado correcto de manos, en diversas comunidades peruanas persiste una disponibilidad insuficiente de productos de higiene que sean de bajo costo, eficaces, accesibles y con menor dependencia de compuestos sintéticos (1,4,5,7). Esta situación genera un problema de salud pública, especialmente en poblaciones vulnerables, donde el uso de jabones comerciales se ve restringido, por la presencia de químicos irritantes o por la ausencia de alternativas naturales con actividad antibacteriana comprobada (1–3,8).

En este escenario, el desarrollo de productos higiénicos basados en recursos naturales cobra especial relevancia. El huacatay (*Tagetes minuta*), hierba aromática originaria del Perú que crece de forma silvestre en la costa, sierra y selva, posee aceites esenciales con reconocidas propiedades antimicrobianas (9–11). Su amplia disponibilidad, bajo costo y renovabilidad lo convierten en una materia prima apropiada para la elaboración de jabones con menor impacto ambiental y con beneficios demostrables para la salud (12,13).

Desde el enfoque tecnológico, esta investigación se diferencia de otros estudios porque no solo se centra en evaluar la actividad antibacteriana del aceite esencial, sino en integrarlo dentro de una formulación real, lo cual implica un nivel adicional de complejidad y análisis. A diferencia de trabajos que solo estudian el aceite esencial puro o se limitan a ensayos de laboratorio aislados, esta propuesta aborda todo el proceso: la obtención del aceite de *Tagetes minuta* mediante un método accesible como el arrastre por vapor, su estabilidad dentro de una matriz tensioactiva y su comportamiento dentro de un sistema diseñado para el uso cotidiano. Este enfoque permite comprender cómo interactúan los componentes naturales en condiciones más cercanas a un producto final, lo que representa un avance tecnológico frente a formulaciones convencionales basadas únicamente en ingredientes sintéticos. Además, comparar la eficiencia y compatibilidad del aceite con un jabón base permite generar criterios más sólidos para el desarrollo de alternativas antibacterianas funcionales, sostenibles y aplicables a la industria, superando

la simple evaluación de sustancias aisladas y acercando la investigación a un nivel de innovación práctica. Ambientalmente, se propone emplear un recurso vegetal nativo y de amplia distribución en el país, reduciendo la necesidad de insumos sintéticos y la huella asociada al transporte y la producción industrial, contribuyendo así a una alternativa de menor impacto ecológico. Desde la dimensión económica, porque utiliza materia prima local de bajo costo que facilita la disponibilidad de un producto higiénico asequible para familias y comunidades con recursos limitados; y en términos de salud pública, porque el desarrollo de un jabón líquido con actividad antibacteriana potencialmente comprobable ofrece una herramienta preventiva para reducir infecciones cutáneas leves y mejorar prácticas de higiene en entornos donde el acceso a productos comerciales eficaces y no irritantes es restringido. En conjunto, este proyecto no solo explora la viabilidad técnica y la seguridad de incorporar aceite esencial de huacatay en una formulación jabonosa, sino que también plantea una alternativa sostenible, económica y orientada a la mejora de la salud comunitaria.

Diversos estudios experimentales han evidenciado el potencial del aceite esencial de *Tagetes minuta* como fuente de compuestos bioactivos con actividad antimicrobiana. En un estudio realizado a nivel de laboratorio, evaluó el rendimiento y la composición del aceite esencial de huacatay obtenido por arrastre de vapor a partir de material vegetal fresco, logrando extraer aproximadamente 40 mL de aceite a partir de 18 kg de muestra. Asimismo, se identificaron compuestos relevantes como el 3,9-epoxy-mentha-1,8(10)-diene y la trans-tagetona, confirmando la riqueza química del aceite esencial y su potencial aplicación en formulaciones con fines sanitarios (14). En concordancia con estos hallazgos, evaluaron *in vitro* la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Tagetes minuta* frente a *Streptococcus mutans*, empleando el método de difusión en disco. Los autores reportaron halos de inhibición significativos en concentraciones del 50 % y 100 %, mientras que el control negativo (DMSO) no presentó actividad antibacteriana, evidenciando que el efecto observado se debe al aceite esencial y no al solvente utilizado (15). De manera similar, demostraron la actividad antimicrobiana y antifúngica de diferentes extractos metanólicos y acuosos de especies del género *Tagetes*, incluyendo *T. patula*, *T. erecta* y *T. minuta*, frente a diversas cepas bacterianas y fúngicas. En su estudio experimental, se destacó la eficacia del extracto de *T. patula* frente a *Bacillus subtilis* y la actividad antifúngica del extracto floral frente a *P. erythrosepica*, confirmando el potencial del género *Tagetes* como fuente de compuestos bioactivos con aplicaciones sanitarias (16). A partir de estas evidencias científicas, se justifica la necesidad de

desarrollar un jabón líquido que incorpore aceite esencial de *Tagetes minuta* como agente antibacteriano, con el propósito de ofrecer una alternativa accesible, eficaz, natural y ecológica que contribuya al cuidado de la salud y a la prevención de infecciones cutáneas. Finalmente, el presente estudio tiene como propósito formular un jabón líquido incorporando aceite esencial de *Tagetes minuta* (huacatay) y evaluar su actividad antibacteriana mediante ensayos *in vitro* y pruebas de recuento microbiológico realizadas en voluntarios, frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (ATCC).

HIPÓTESIS

Dado que el aceite esencial de “*Tagetes minuta*” contiene compuestos bioactivos con actividad antibacteriana demostrada *in vitro*, es probable que al formular un jabón líquido que lo incorpora también presente dicha actividad tanto en ensayos *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, como en pruebas de recuento microbiológico realizadas en voluntarios.

OBJETIVO GENERAL

Formular un jabón líquido incorporando aceite esencial de *Tagetes minuta* (huacatay) y evaluar su actividad antibacteriana mediante ensayos *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (ATCC), así como mediante pruebas de recuento microbiológico realizadas en voluntarios.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener el aceite esencial de *Tagetes minuta* mediante destilación por arrastre de vapor de agua.
2. Formular un jabón líquido incorporando aceite esencial de *Tagetes minuta*.
3. Evaluar la actividad antibacteriana del jabón líquido formulado frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (ATCC)
4. Determinar la eficacia del jabón líquido formulado mediante pruebas de recuperación microbiológica en voluntarios, empleando el método de enjuague.
5. Análisis de datos y evaluación estadística

TABLA DE VARIABLES E INDICADORES

La presente investigación denominada “Formulación y evaluación de la actividad antibacteriana de un jabón líquido con aceite esencial de *Tagetes minuta* (huacatay)

mediante ensayos *in vitro* y pruebas de recuperación microbiológica en voluntarios presenta las siguientes variables e indicadores establecidos en la Tabla 1 y Tabla 2, según se detalla a continuación:

Tabla 1. Variable independiente

Variable	Dimensión / Componente	Indicador	Unidad
Independiente	Caracterización		
	del aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i>	Volumen añadido	mL

Fuente: Elaboración Propia

Tabla 2. Variable dependiente

Variable	Indicador	Técnica / Método	Unidad
Dependiente: Actividad antibacterial	Diámetro del halo de inhibición	Método de difusión en agar por pozo (Kirby– Bauer modificado	Milímetro (mm)
	Recuento microbiológico de superficies	Método de enjuague	UFC/mano

Fuente: Elaboración Propia



CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

El presente capítulo expone las bases teóricas y los antecedentes científicos que fundamentan la investigación. En este sentido, se aborda el problema sanitario asociado a la transmisión de enfermedades infecciosas por deficiente higiene de manos, así como los aspectos microbiológicos de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, bacterias de relevancia clínica. Asimismo, se desarrollan los fundamentos relacionados con la formulación de jabones líquidos, el potencial del aceite esencial de *Tagetes minuta* (huacatay), además de los métodos empleados para la identificación del material botánico y evaluación microbiológica.

1.1.Problema Sanitario

La higiene de manos insuficiente es una de las principales causas de transmisión de enfermedades infecciosas, ya que las manos contaminadas facilitan el paso de bacterias y virus a través del contacto directo con la boca, nariz o alimentos. Estudios científicos muestran que promover el lavado de manos con agua y jabón puede reducir hasta un 30 % los casos de diarrea en la población general, comparado con la ausencia de intervenciones de higiene. Esto se debe a que la práctica elimina gran parte de los patógenos que se transmiten por la vía fecal-oral (17,18).

En cuanto a las infecciones respiratorias agudas (IRA), revisiones sistemáticas han encontrado que la intervención de lavado de manos está asociada con una disminución de riesgo de aproximadamente 16 % a 24 % en el desarrollo de estas infecciones en la comunidad, lo que demuestra que una buena higiene de manos también ayuda a limitar la propagación de agentes causantes de enfermedades respiratorias (19–21).

Cuando no se realiza un correcto lavado de manos, la incidencia de diarreas, infecciones respiratorias y otras enfermedades prevenibles se mantiene alta, representando una carga sanitaria significativa, especialmente en niños menores de cinco años y en comunidades con recursos limitados. Por ello, mejorar las prácticas de lavado de manos es una estrategia de salud pública altamente costo-efectiva y esencial para reducir la morbilidad y mortalidad asociada con estas patologías (17,18).

1.2.Características generales y clasificación de las bacterias de estudio

Las bacterias son microorganismos unicelulares y procariotas que han habitado la Tierra desde hace millones de años, lo que explica su amplia distribución y abundancia en prácticamente todos los ecosistemas, incluidos ambientes con condiciones extremas. Se

caracterizan por carecer de núcleo y orgánulos membranosos, aunque poseen una pared celular cuya estructura principal es el peptidoglicano, componente fundamental para su forma y estabilidad. Desde el punto de vista morfológico, presentan diversas formas, como cocos, bacilos y espirilos, con tamaños que generalmente oscilan entre 0,5 y 5,0 μm . A pesar de su organización celular simple, las bacterias exhiben una notable capacidad de adaptación, lo que les permite sobrevivir y multiplicarse en condiciones adversas, incluso en ambientes con baja disponibilidad de oxígeno (22).

De acuerdo con la estructura de su pared celular, las bacterias se clasifican en Gram positivas y Gram negativas. Las bacterias Gram positivas poseen una membrana citoplasmática rodeada por una gruesa capa de peptidoglicano que contiene ácidos teicoicos y lipoteicoicos, los cuales desempeñan un papel importante en la adhesión celular, la virulencia y la respuesta inmunológica del huésped. Esta pared celular porosa facilita el intercambio de metabolitos, aunque también puede inducir respuestas inflamatorias y dificultar la fagocitosis. Por su parte, las bacterias Gram negativas presentan una envoltura celular más compleja, compuesta por una membrana citoplasmática, una delgada capa de peptidoglicano y una membrana externa rica en lipopolisacáridos. Esta estructura les confiere una mayor resistencia frente a diversos antibióticos y agentes externos. Clínicamente, las bacterias Gram negativas incluyen microorganismos de importancia médica, responsables de infecciones urinarias, respiratorias y gastrointestinales, así como infecciones asociadas a la atención en salud, lo que las convierte en un desafío relevante para la salud pública (22–24).

1.2.1. *Staphylococcus aureus*

1.2.1.1. Generalidades

Staphylococcus aureus es un coco Gram positivo que forma parte de la microbiota humana, especialmente en la piel y mucosas; sin embargo, actúa también como patógeno oportunista altamente virulento, siendo capaz de causar un amplio espectro de infecciones tanto en entornos hospitalarios como comunitarios; debido a que puede ocasionar infecciones en la piel, tejidos blandos y asociadas a dispositivos médicos. Es una de las principales causas de bacteriemia nosocomial en diferentes regiones del mundo. Se caracteriza por presentar una virulencia que depende de su capacidad de adhesión, evasión del sistema inmune y formación de biopelículas. En cuanto a su identificación se distingue por su morfología, pruebas de coagulasa y catalasa, y su crecimiento en medios selectivos como agar Baird-Parker y agar sal manitol (25).

1.2.1.2.Fisiopatología

En el huésped, genera principalmente abscesos, siendo la gravedad de la infección el resultado de la interacción entre sus factores de virulencia y la respuesta inmunológica del organismo. Las infecciones pueden clasificarse en localizadas, las cuales son favorecidas por una higiene deficiente, traumatismos o enfermedades dermatológicas y generalizadas, como la bacteriemia, que puede complicarse con endocarditis o síndrome séptico. Así mismo este patógeno presenta una notable capacidad para adherirse a las células endoteliales a través de interacciones específicas (como las MSCRAMM), facilitando su internalización. Esta invasión intracelular protege a la bacteria de los mecanismos inmunes y de ciertos antibióticos, contribuyendo a infecciones crónicas o recurrentes. En el caso de la endocarditis, las cepas involucradas muestran resistencia al suero, capacidad de adhesión a válvulas cardíacas sanas o dañadas, y producción de enzimas proteolíticas que favorecen la diseminación. Además, la activación endotelial por la bacteria puede desencadenar procesos como la formación de vegetaciones o trombos. Por otra parte, en la sepsis estafilocócica se observa una respuesta inflamatoria intensa mediada por monocitos, macrófagos y otras células inmunes, que liberan citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8), activando vías del complemento y coagulación. Estas respuestas inducen fiebre, hipotensión, coagulopatías y disfunción multiorgánica. Componentes como los peptidoglicanos, el ácido lipoteicoico y la alfatoxina pueden desencadenar estas respuestas sistémicas, semejantes a las observadas en infecciones por bacterias gramnegativas. Pese a los avances terapéuticos, la bacteriemia por *S. aureus* mantiene tasas de mortalidad elevadas (11 a 43%), con factores agravantes como edad avanzada, focos infecciosos no removidos, y comorbilidades cardíacas o neurológicas. Incluso en ausencia de endocarditis, un porcentaje importante de pacientes puede desarrollar infecciones metastásicas (26).

1.2.1.3.Identificación

La identificación de *Staphylococcus aureus* en el laboratorio inicia con el uso de la microscopia, empleando la tinción Gram para la observación de cocos Gram positivos. Para su confirmación de la especie, se emplea pruebas bioquímicas como la detección de la enzima coagulasa, debido a que a diferencia de otras especies del género *Staphylococcus*, *Staphylococcus aureus* es coagulasa positivo. De igual forma, se puede emplear la prueba de catalasa, ya que por medio de la presencia de esta enzima produce oxígeno debido a su interacción con el peróxido de hidrogeno. Adicionalmente se

emplea distintos medios de cultivo, siendo el más empleado para su identificación y crecimiento el agar Baird Parker. En este medio, las colonias se observan de color negro por consecuencia de la reducción del telurito y un halo transparente debido a la acción lipolítica sobre la yema de huevo. En cuanto al agar salado manitol, las colonias se observarán de color amarillo debido a la fermentación de manitol. Para la identificación de cepas patógenas se emplea el agar DNAsa debido a que este agar permite el estudio de la capacidad del patógeno de hidrolizar el ADN, por ello se observara la formación de halos transparentes en el medio como resultado positivo a esta capacidad (27).

1.2.1.4.Tratamiento

Para el tratamiento de *Staphylococcus aureus* se emplean diferentes esquemas; para ello depende diversos factores como el tipo de infección, la manifestación o ausencia de cepas que sean resistentes a fármacos. En general, la penicilina es un antibiótico de elección para tratar infecciones provocadas por la *Staphylococcus aureus*, por ello sigue siendo uno de los fármacos de elección siempre teniendo en cuenta que los aislamientos sean sensibles; la vancomicina es un fármaco más dirigido para aquellas cepas de SARM. Sin embargo, hay cepas que adquirieron resistencia tanto a la penicilina como la meticilina y a los β -lactámicos. Por ello se presentan situaciones en las que se necesita de una terapia alternativa, frecuentemente es necesario la reposición de líquidos en cuanto a enfermedades mediadas por toxinas y suspensión de dispositivos extraños en situaciones de endocarditis, debido a infecciones asociadas a catéteres (27,28).

1.2.2. *Escherichia coli*

1.2.2.1.Generalidades

Escherichia coli (*E. coli*) es una bacteria gramnegativa que forma parte de la microbiota intestinal normal del ser humano y de diversos mamíferos. En condiciones fisiológicas, cumple funciones importantes en el metabolismo, síntesis de vitaminas y mantenimiento del equilibrio intestinal. Sin embargo, su alta capacidad de adaptación ha permitido la evolución de múltiples cepas patógenas, agrupadas en distintos patotipos, que pueden causar infecciones tanto intestinales como extraintestinales. Esta dualidad convierte a *E. coli* en un microorganismo de gran interés clínico y epidemiológico. Por un lado, actúa como comensal beneficioso; por otro, representa un patógeno oportunista capaz de desencadenar cuadros como infecciones urinarias, septicemias, meningitis neonatales e infecciones entéricas, entre otras. La caracterización de sus mecanismos de resistencia y su propagación en el entorno

humano y veterinario son elementos clave en el abordaje integral de las enfermedades infecciosas causadas por esta especie bacteriana. Por ello, es relevante comprender la epidemiología de la resistencia antimicrobiana en *E. coli* para el diseño de estrategias de vigilancia, control y tratamiento (29,30).

1.2.2.2.Fisiopatología

La patología intestinal provocada por *Escherichia coli* (*E. coli*) inicia cuando una persona ingiere a la bacteria, debido a que presenta mecanismos que evaden las defensas naturales del organismo. Teniendo en cuenta que es una bacteria gramnegativa, la *E. coli* posee una estructura compleja y una membrana externa, la cual contiene lipopolisacáridos (LPS), que pueden desencadenar efectos tóxicos si la bacteria se destruye. Así mismo existen cepas patógenas que poseen distintos factores de virulencia, codificados por plásmidos, transposones o bacteriófagos. Clasificándose la *E. coli* en los siguientes tipos:

Enterotoxigénica (ETEC): Produce fimbrias que le permiten adherirse al intestino. Una vez unida, libera toxinas (LT y ST) que alteran los niveles celulares de AMPc y GMPc, estimulando la secreción de cloro y agua, lo que genera diarrea acuosa.

Enteropatógena (EPEC): Emplea a los pilis para formar haces y a la proteína intimin (adhesina) para adherirse a las células intestinales mediante un sistema de secreción tipo III el cual inyecta toxinas que destruyen las microvellosidades, altera la permeabilidad celular y afecta a la absorción de agua y electrolitos.

Enteroagregativa (EAEC): Se adhiere formando un patrón en forma de “ladrillos apilados”. Su virulencia es regulada por AggR, un activador que estimula la producción de fimbrias, proteínas de superficie como dispersina y toxinas como Pet, EAST-1 y ShET. Esto favorece la colonización y la diarrea persistente.

Enterohemorrágica / productora de toxina Shiga (EHEC/STEC): Libera toxinas Stx1 y Stx2 que bloquean la síntesis proteica al afectar los ribosomas, provocando daño celular, inflamación intestinal y diarrea con sangre. También pueden generar el síndrome urémico hemolítico (SUH), caracterizado por anemia, disminución de plaquetas y daño renal.

Enteroinvasiva (EIEC): Invade el revestimiento del colon, se multiplica y se propaga entre células, provocando colitis inflamatoria muy similar a la disentería.

En cuanto a otras patologías, la *E. coli* también puede causar infecciones fuera del intestino como en el tracto urinario que es el sitio más afectado fuera del intestino,

especialmente en mujeres, ya que la uretra está más cerca del ano; los pulmones pueden sufrir neumonía, especialmente en personas hospitalizadas con ventilación mecánica y en la sangre como bacteriemia, la cual iniciara con infecciones urinarias en adultos mayores o con infecciones pulmonares en pacientes internados (31).

1.2.2.3. Identificación

Su identificación de cepas patógenas de *Escherichia coli* se realiza mediante una combinación de métodos tradicionales, ensayos *in vitro* e *in vivo*, y técnicas de biología molecular. Entre estos, los métodos tradicionales y moleculares son los más empleados en el diagnóstico clínico y epidemiológico. El aislamiento bacteriano tradicional parte del cultivo directo de muestras fecales o hisopados rectales en medios selectivos como el agar MacConkey, seguido de siembras por estría cruzada e incubación a 37 °C durante 18 a 24 horas. Se seleccionan colonias típicas lactosa positivas; en casos con diarrea sanguinolenta, también se consideran colonias lactosa negativas por su posible relación con EIEC. La identificación bioquímica se lleva a cabo mediante pruebas en tubos (TSI, LIA, MIO, citrato, entre otras), mientras que la serotipificación se aplica especialmente en laboratorios con disponibilidad de antisueros polivalentes (grupos A, B, C de EPEC). En sospecha de EHEC, se emplea el agar MacConkey con sorbitol (SMAC), aunque este no es definitivo, ya que no todas las cepas son sorbitol negativas. Para incrementar la sensibilidad, se recomienda un preenriquecimiento selectivo utilizando soya tripticaseína con antibióticos como cefaxima, vancomicina o novobiocina. Entre las técnicas moleculares, destacan: El "Colony blot" que permite la detección sensible y específica de genes como LT, ST, bfp, ial o hlyA y la PCR que se basa en la amplificación *in vitro* de fragmentos específicos de DNA bacteriano ya que posteriormente los productos se visualizaran mediante electroforesis en gel de agarosa (32).

1.2.2.4. Tratamiento

El abordaje terapéutico de las infecciones intestinales por *E. coli* depende tanto del tipo de cepa implicada como de la manifestación clínica. El manejo inicial se centra en el tratamiento sintomático, ya que la diarrea puede generar un notable malestar en los pacientes. Para los casos leves, se prioriza la rehidratación y el uso de antidiarreicos como medidas fundamentales. La rehidratación oral constituye la opción de primera línea siempre que sea bien tolerada, demostrando una eficacia comparable a la hidratación intravenosa. Esta última se reserva para situaciones en las que no es posible

mantener una adecuada ingesta oral. Además, los síntomas severos pueden aliviarse mediante el empleo de agentes antimotilidad, como el subsalicilato de bismuto y la inviloperamida. En cuanto a los antibióticos no suelen emplearse como tratamiento inicial en casos de enfermedad diarreica provocada por *E. coli*, dado a su potencial para generar efectos adversos y contribuir a la aparición de cepas resistentes. Sin embargo, en pacientes que presentan cuadros clínicos severos como más de seis evacuaciones diarias, fiebre, deshidratación que amerite hospitalización, persistencia de la diarrea por más de siete días o presencia de sangre en las heces, el uso de antimicrobianos podría considerarse adecuado. Según las recomendaciones actuales de la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América (IDSA) y la Sociedad Internacional de Medicina del Viajero (ISTM), los fármacos indicados incluyen rifaximina, azitromicina y ciprofloxacino. En contraste, cuando existe sospecha de infección por EHEC/STEC, el tratamiento con antibióticos está contraindicado, especialmente en población pediátrica y adultos mayores, debido al riesgo elevado de desarrollar síndrome hemolítico urémico (33).

Debido a la importancia clínica de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, resulta fundamental emplear métodos microbiológicos estandarizados que permitan evaluar la actividad antibacteriana de nuevos productos. En este contexto, existen técnicas *in vitro* e *in vivo* que posibilitan determinar la eficacia de sustancias antimicrobianas mediante parámetros cuantificables y reproducibles.

1.3. Métodos de evaluación de la actividad antibacteriana

1.3.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI)

La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante el método de Kirby–Bauer modificado por hoyo en placa se fundamenta en la difusión del agente antimicrobiano a través del agar inoculado con el microorganismo. La muestra colocada en los pocillos difunde radialmente en el medio formando un gradiente de concentración, inhibiendo el crecimiento bacteriano alrededor del hoyo y generando halos de inhibición cuyo diámetro se relaciona con la sensibilidad bacteriana y la menor concentración capaz de inhibir visiblemente el crecimiento microbiano (34).

a. Método de hoyo en placa

El método de hoyo en placa se fundamenta en la difusión del agente antimicrobiano desde un pocillo realizado en el agar previamente inoculado con el microorganismo de

estudio. La muestra colocada en el hoyo difunde radialmente a través del medio de cultivo, y si presenta actividad antibacteriana, inhibe el crecimiento bacteriano alrededor del pocillo, formando halos de inhibición cuyo diámetro es proporcional a la eficacia antimicrobiana de la sustancia evaluada (34).

1.3.2. Método de enjuague

El método de enjuague constituye una técnica importante en microbiología para la recuperación de microorganismos presentes en superficies, mediante la combinación de fricción mecánica y el uso de una solución diluyente estéril. Este procedimiento permite cuantificar la carga microbiana total, identificar microorganismos patógenos específicos y evaluar la eficacia de procesos previos de limpieza o desinfección. Además, presenta ventajas como no requerir superficies planas, facilitar la toma de muestras en zonas de difícil acceso y reducir la manipulación directa de la muestra (35).

Las superficies representan un medio potencial para la transferencia y diseminación de microorganismos, por lo que su monitoreo microbiológico constituye una herramienta importante para el control sanitario y la prevención de la contaminación. La presencia de microorganismos en distintas superficies puede favorecer la transmisión de agentes patógenos y aumentar el riesgo de contaminación cruzada, especialmente en entornos donde se requiere un alto nivel de higiene. En este contexto, la evaluación microbiológica de superficies permite verificar las condiciones sanitarias y la eficacia de las medidas de limpieza y desinfección implementadas.

1.4. Evaluación de superficies

La evaluación microbiológica de superficies consiste en identificar y cuantificar los microorganismos presentes en superficies vivas o inertes, con el propósito de garantizar condiciones adecuadas de inocuidad y calidad sanitaria. Este análisis se fundamenta en la detección de microorganismos patógenos y de indicadores microbiológicos de contaminación, permitiendo valorar las condiciones de higiene y seguridad en entornos relacionados con la manipulación de alimentos, la elaboración de productos farmacéuticos y las áreas hospitalarias (36).

Los productos de limpieza desempeñan un papel importante en la eliminación de impurezas y sustancias presentes en diferentes superficies, siendo ampliamente utilizados

en diversos ámbitos domésticos, industriales y sanitarios. Entre ellos, los jabones destacan por sus propiedades detergentes y su capacidad para favorecer la remoción de grasas, suciedad y otros compuestos adheridos. Además, dependiendo de su composición y de los ingredientes incorporados, pueden presentar propiedades adicionales, como efectos humectantes, protectores o antimicrobianos.

1.5. Jabones

El jabón es un producto de limpieza obtenido por la saponificación, una reacción química entre grasas o aceites y una base alcalina, que forma sales de ácidos grasos con capacidad detergente. El jabón actúa reduciendo la tensión superficial del agua y emulsificando las grasas y suciedad para facilitar su eliminación, además de poder disminuir la carga microbiana en superficies y piel (37).

Los jabones se clasifican principalmente por su estado físico y aplicaciones: sólidos (en barra), líquidos, glicerinados y especializados (medicinales o con aditivos) (38).

1.5.1. Tipos

- Los jabones sólidos son los más tradicionales y se obtienen mediante saponificación con hidróxido de sodio (NaOH), produciendo barras que se utilizan ampliamente para higiene personal y doméstica (37).
- Los jabones líquidos se elaboran con hidróxido de potasio (KOH), lo que da lugar a productos más solubles en agua y de consistencia fluida o viscosa, adecuados para dispensadores y usos repetidos de higiene (38).
- Los jabones glicerinados contienen mayor cantidad de glicerina, un humectante natural que mejora la hidratación de la piel y reduce la irritación (70).
- Los jabones especializados incorporan compuestos activos como agentes antibacterianos, humectantes o aromáticos que proporcionan beneficios adicionales (68,70). Dentro de esta categoría se encuentran los jabones que incluyen aceites esenciales, los cuales son añadidos por sus propiedades aromáticas y potencial actividad biológica. Los jabones formulados con aceites esenciales contienen compuestos volátiles de origen vegetal, tales como terpenos, fenoles y aldehídos, que pueden conferir propiedades antimicrobianas, antioxidantes o antiinflamatorias, además de aportar fragancia natural al producto (40).

Los componentes con actividad antibacteriana incorporados en los jabones líquidos, como los aceites esenciales, pueden ejercer efectos bacteriostáticos o bactericidas dependiendo de la concentración empleada y del tipo de microorganismo. Estos efectos se producen mediante diversos mecanismos de acción que interfieren con estructuras y procesos esenciales para la supervivencia y desarrollo bacteriano.

1.5.2. Mecanismo de acción

Los jabones líquidos con actividad antibacteriana pueden ejercer su efecto mediante diversos mecanismos que afectan estructuras y funciones esenciales de las bacterias, ocasionando la inhibición de su crecimiento o su eliminación (41).

a. Alteración de la pared celular:

Los compuestos con actividad antibacteriana presentes en determinadas formulaciones pueden afectar la integridad de la pared celular bacteriana, debilitando su estructura y comprometiendo su estabilidad, lo que favorece el daño y la posterior destrucción celular (41).

b. Alteración de la membrana citoplasmática:

Diversos componentes bioactivos, entre ellos los aceites esenciales, pueden modificar la permeabilidad de la membrana citoplasmática bacteriana. Esta alteración provoca la pérdida de componentes intracelulares esenciales, afectando la viabilidad y supervivencia de la célula bacteriana (42).

c. Inhibición de la síntesis de proteínas:

Algunos compuestos con propiedades antibacterianas pueden interferir con la síntesis proteica bacteriana, afectando procesos fundamentales para el crecimiento, mantenimiento y reproducción de los microorganismos (43).

d. Alteración de los ácidos nucleicos:

Ciertos agentes bioactivos pueden interferir en la síntesis y función del ADN y ARN bacteriano, dificultando los procesos de replicación y expresión genética necesarios para la supervivencia celular (43).

e. Inhibición de procesos metabólicos

Los principios activos con actividad antibacteriana también pueden alterar rutas metabólicas esenciales, afectando la producción de energía y otros procesos necesarios para el crecimiento y mantenimiento bacteriano (44).

En la búsqueda de alternativas naturales con potencial antimicrobiano, diversas plantas

aromáticas han sido objeto de investigación por sus propiedades biológicas. Entre ellas, *Tagetes minuta*, conocida comúnmente como huacatay, que ha despertado interés debido a la presencia de compuestos bioactivos en su aceite esencial, los cuales han demostrado actividad frente a diferentes microorganismos de importancia sanitaria.

1.6. *Tagetes minuta* (Huacatay)

1.6.1. Aspectos generales

La “*Tagetes minuta*” perteneciente a la familia Asteraceae y popularmente conocida en Perú como huacatay (en quechua), se cultiva en las tres regiones presentes en el Perú (costa, sierra y selva), por ello es empleada en su mayoría como condimento en la gastronomía peruana. Se caracteriza por ser una planta aromática anual de crecimiento erecto que presenta una diversidad de actividades biológicas, dentro de ellas se encuentra presente las propiedades medicinales, antioxidantes y antibacterianas. Sin embargo, no solo cuenta con estas propiedades, sino también cuenta con actividad insecticida y nematocida. En cuanto a su composición se caracteriza por la presencia de una variedad de metabolitos secundarios, por lo que produce aceites esenciales que se emplean ampliamente en la cosmética, perfumería, medicina y como agente aromatizante en alimentos y bebidas (45,46).

1.6.2. Descripción Botánica

El género *Tagetes* comprende 56 especies, tanto anuales como perennes, en su mayoría herbáceas. Una variedad de ellas se cultiva comercialmente en diferentes regiones del mundo por sus múltiples aplicaciones. Entre las más comunes destacan *T. minuta*, *T. erecta*, *T. patula* y *T. tenuifolia*, siendo *T. minuta* la más estudiada debido a su capacidad de producir un aceite esencial de alta calidad, empleado en diversas industrias como la alimentaria, farmacéutica, perfumera y agrícola (47).

1.6.3. Morfología

Tagetes minuta es una planta herbácea de crecimiento erecto, que puede ser anual o perenne y alcanza una altura de hasta 4,5 metros. Sus hojas, de un tono verde ligeramente brillante, están divididas pinnadamente en cuatro a seis pares de folíolos, con bordes finamente dentados. La planta presenta numerosas inflorescencias, normalmente dispuestas en cimas planas, que miden entre 8,0 y 12,0 mm de alto. Cada flor tiene un ápice con tres a cinco lóbulos, usualmente con tres flores radiales por

cabeza de 1,0 a 2,0 mm de longitud, y entre tres a cinco flores del disco con corolas de aproximadamente 2,5 mm. Los frutos (aquenios) son planos, de color marrón oscuro, miden entre 6,0 y 8,0 mm, y presenta escamas en el papus de 2,0 a 3,0 mm. En el reverso de las hojas se observan pequeñas glándulas multicelulares de color naranja, que al romperse emiten un aroma similar al del regaliz; estas glándulas también están presentes en los tallos y brácteas involucrales. Cada cabeza floral está rodeada por cuatro o cinco brácteas fusionadas. Las semillas poseen un olor desagradable y, si se mezclan con granos durante el almacenamiento, pueden disminuir su calidad (19).

1.6.4. Taxonomía

La clasificación taxonómica permite ubicar a *Tagetes minuta* dentro del sistema de organización biológica, facilitando su identificación científica y diferenciación respecto a otras especies vegetales. En la Tabla 3 se presenta la clasificación sistemática de esta especie (48).

Tabla 3. Taxonomía de *Tagetes minuta* (huacatay)

Características	Descripción
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Subdivisión	Embryophyta
Clase	Magnoliopsida
Superorden	Asteranae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	Tagetes
Especie	<i>Tagetes minuta</i> L.

Fuente: Elaboración Propia

1.6.5. Distribución geográfica

La *Tagetes minuta* es una especie vegetal nativa de Sudamérica que evidencia una notable capacidad de adaptación ecológica, debido a que se desarrolla en una amplia

variedad de suelos y condiciones climáticas; sin embargo, su crecimiento óptimo se da en ambientes templados y subtropicales que presenten suelos bien drenados y con buena exposición a la luz solar. Su distribución natural es centrada en la región andina, especialmente en países como Perú, Bolivia, Ecuador, Colombia, Argentina y Chile. Debido a sus múltiples aplicaciones etnobotánicas, así como sus propiedades aromáticas y medicinales, esta especie ha sido incorporada y naturalizada en diversas regiones del mundo. Actualmente, se encuentra presente en América Central y del Norte (incluyendo México y Estados Unidos), en varios países africanos como Etiopía, Kenia, Sudáfrica y Madagascar, así como en naciones asiáticas tales como India, China y Pakistán. En Europa, su cultivo se da primordialmente con fines ornamentales o experimentales, mientras que en Oceanía ha sido reportada en Australia y Nueva Zelanda (49–51).

1.6.6. Propiedades terapéuticas

Se le atribuyen propiedades digestivas, carminativas y vermífugas, por lo que se emplea en el tratamiento sintomático de trastornos digestivos como dispepsia, gastritis, flatulencias, indigestión y náuseas, además de poseer acción antiparasitaria. Asimismo, diversos estudios le reconocen actividad antimicrobiana, antifúngica, antiinflamatoria, antioxidante y antiespasmódica. La infusión de sus hojas se utiliza tradicionalmente para aliviar dolores gástricos, mientras que la decocción de flores y hojas frescas se recomienda para el tratamiento de catarros y bronquitis. Las flores, por su parte, son empleadas en casos de ataques epilépticos, fiebre, dismenorrea, varices, hemorroides, conjuntivitis, resfriado común y como laxante. En la medicina tradicional china, estas se usan para tratar la tos ferina, las paperas y la mastitis; mientras que en la India también se aprovechan en la industria perfumera (52).

1.6.7. Composición química de su aceite esencial

El aceite esencial de *Tagetes minuta* se caracteriza por la presencia predominante de compuestos terpénicos, entre los que destacan la dihidrotagetona y la tagetona, ambas cetonas monoterpénicas acíclicas insaturadas, así como el ocimeno, un hidrocarburo monoterpénico acíclico insaturado, y el limoneno, un hidrocarburo monoterpénico monocíclico insaturado. Adicionalmente, se ha reportado la presencia de otros metabolitos secundarios en menores porcentajes como flavonoides, taninos y alcaloides, los cuales contribuyen a las propiedades biológicas del aceite esencial de

Tagetes minuta (53).

Considerando la creciente incorporación de compuestos naturales en formulaciones de higiene y productos con actividad antimicrobiana, resulta pertinente abordar los fundamentos científicos relacionados con los aceites esenciales. Estos metabolitos secundarios de origen vegetal han sido ampliamente estudiados por sus propiedades fisicoquímicas, composición química y actividades biológicas, las cuales sustentan su potencial aplicación en el desarrollo de productos con efecto antibacteriano.

1.7. Aceite Esencial

1.7.1. Definición

Los aceites esenciales son una combinación de compuestos volátiles que provienen del metabolismo secundario que se lleva a cabo en las plantas. En cuanto a sus características se reconocen como líquidos, aromáticos y volátiles. Se localizan en estructuras especializadas de la planta y cumplen funciones de defensa y atracción de polinizadores. Su extracción se puede realizar de distintas partes de las plantas e inclusive de la planta completa a través de procesos físicos. Estos compuestos son ampliamente utilizados en las industrias de fragancias y saborizantes debido a su aroma característico, su naturaleza oleosa y su elevada volatilidad, que les permite evaporarse con facilidad al exponerse al aire (54,55).

1.7.2. Propiedades físicas y organolépticas de los aceites esenciales

Las diferencias presentes en la composición entre los diversos aceites esenciales corroboran que se caracterizan por un conjunto de propiedades físicas comunes como su coloración a temperatura ambiente que tienden a ser incoloros o amarillentos, su menor densidad que presenta en comparación con el agua (a excepción de algunos), débilmente hidrosolubles, elevado índice de refracción y su solubilidad en alcohol, éter y solventes apolares. En relación con sus características organolépticas, dependerán de los componentes mayoritarios presentes para que establezca su sabor, olor y color (56).

1.7.3. Composición química de los aceites esenciales

Los aceites esenciales están conformados por mezclas químicas complejas y altamente variables de compuestos químicos, habitualmente entre 20 a 60 componentes, cuya composición presenta diversas proporciones y responde en gran medida a su origen

biogénico. En términos generales, estos constituyentes pertenecen predominantemente a dos grandes grupos: los terpenoides, que representan la fracción mayoritaria, y en menor medida, los compuestos aromáticos derivados del fenilpropano. Esta clasificación refleja las rutas biosintéticas diferenciadas de ambos grupos, siendo los terpenoides los componentes más comunes en la mayoría de las especies vegetales productoras de aceites esenciales. En cuanto a una perspectiva biosintética, estos compuestos pueden agruparse en dos grandes clases: hidrocarbonados y oxigenados. A su vez, la fracción oxigenada incluye compuestos como alcoholes, éteres, ésteres, aldehídos y sustancias fenólicas, los cuales no solo aportan a la diversidad química del aceite, sino que también son responsables de muchas de sus propiedades organolépticas y farmacológicas, incluido su aroma característico. Por lo tanto, su composición química está estrechamente relacionada con las propiedades biológicas de los aceites esenciales, lo que fundamenta su amplio uso en fitoterapia, cosmética y otras aplicaciones terapéuticas (55,57).

1.7.4. Actividades Farmacológicas de los aceites esenciales

Los aceites esenciales han sido ampliamente estudiados por sus diversas actividades farmacológicas, las cuales están relacionadas con la naturaleza y proporción de sus compuestos volátiles. De manera general, se les atribuyen propiedades antisépticas y bactericidas, así como efectos antiinflamatorios, digestivos, respiratorios y moduladores del sistema nervioso, dependiendo de su composición química. Algunos compuestos terpénicos y fenólicos presentes en estos aceites contribuyen a su acción antimicrobiana y antiinflamatoria, lo que ha favorecido su uso tradicional y actual en aplicaciones tópicas, respiratorias y digestivas. Asimismo, ciertas esencias pueden ejercer efectos sedantes o estimulantes sobre el sistema nervioso central, asociados principalmente a su liposolubilidad y a la interacción de sus componentes con distintos receptores biológicos. En conjunto, estas propiedades han posicionado a los aceites esenciales como ingredientes de interés en la fitoterapia, la cosmética y el desarrollo de productos de uso tópico, reconociendo que su eficacia y seguridad dependen de su composición y forma de aplicación (28, 29–36).

La extracción de aceites esenciales requiere técnicas que permitan obtener los compuestos volátiles de la planta preservando sus propiedades químicas y biológicas. La selección del método depende de la especie vegetal y de la parte de la planta utilizada, y resulta clave para garantizar la calidad y actividad del aceite esencial en aplicaciones terapéuticas

o antibacterianas.

1.7.5. Métodos de extracción de aceites esenciales

El método de extracción para un aceite esencial va a depender de la especie botánica, debido a que el método es único para cada caso. Los métodos de extracción de aceites esenciales son: prensado, destilación por arrastre de vapor, extracción con solventes volátiles y con fluidos supercríticos. Siendo la destilación por arrastre de vapor, la técnica más habitual para obtener aceites esenciales (64).

1.7.5.1.Prensado

El prensado, también llamado expresión mecánica, es un método físico de extracción de aceites esenciales que se basa en la aplicación de fuerza mecánica sobre el material vegetal para liberar los compuestos volátiles (principalmente de asas, cortezas o partes ricas en glándulas oleosas). Es especialmente usado en cortezas de cítricos, donde los aceites se encuentran en sacos resinosos superficiales y pueden liberarse eficientemente sin aplicar calor significativo, preservando así los compuestos termolábiles. El aceite se recolecta tras la presión y usualmente se filtra para separar impurezas. Este proceso no utiliza solventes químicos y mantiene la integridad de los aromas delicados asociados a los cítricos (64).

1.7.5.2.Arrastre por vapor de agua

En una cuba de metal inerte como el cobre o el acero inoxidable, con un tamiz en el fondo para que las plantas no entren en contacto directo con el agua. El vapor generado atraviesa la planta y extrae las microgotas del aceite esencial. Este vapor de agua aromático se enfría en un serpentín mediante un circuito de agua fría. A la salida del serpentín, se obtiene una mezcla de agua aromática y aceite esencial. El aceite esencial, de menor densidad que el agua, flota, lo que permite recuperarlo por la diferencia de densidad mediante un vaso florentino o esenciero (64,65).

1.7.5.3.Extracción con solventes volátiles

La extracción con solventes volátiles consiste en poner en contacto el material vegetal seco y molido con solventes orgánicos de bajo punto de ebullición (como hexano, cloroformo o etanol). Estos solventes solubilizan los aceites esenciales y otros compuestos de interés. Tras la evaporación del solvente, el aceite esencial queda como residuo junto con ceras y otras sustancias, por lo que suele requerir purificación adicional (por ejemplo, mediante destilación al vacío) para obtener un producto de

mayor pureza. Esta técnica es útil cuando los compuestos aromáticos son frágiles o cuando la destilación por vapor no es eficiente (64).

1.7.5.4.Extracción con fluidos supercríticos

La extracción por fluidos supercríticos utiliza las propiedades disolventes de ciertos fluidos a temperaturas y presiones críticas, permitiendo obtener extractos libres de solventes y de manera más rápida que los métodos tradicionales. Con dióxido de carbono, se pueden extraer compuestos valiosos como aceites esenciales, pigmentos y antioxidantes, a temperaturas moderadas y con alta selectividad. Este método ofrece ventajas como mayor rendimiento, menor tiempo y control sobre la composición del extracto, aunque también puede extraer ceras y compuestos de alto peso molecular (66). Para caracterizar los componentes químicos presentes en los aceites esenciales, se emplean métodos analíticos avanzados que permiten su separación, identificación y cuantificación con alta precisión. Son fundamentales para determinar la composición química, evaluar la pureza y relacionar los componentes con sus propiedades biológicas. Entre los métodos más utilizados destacan la cromatografía de gases, la espectrometría de masas y la combinación de ambas técnicas (GC-MS), las cuales proporcionan información detallada sobre los compuestos volátiles y no volátiles presentes en los aceites esenciales, asegurando un análisis confiable y reproducible.

1.7.6. Métodos analíticos aplicados para la identificación de componentes químicos en aceites esenciales

Los aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos químicos volátiles obtenidos de plantas aromáticas. Para identificar sus componentes se utilizan métodos analíticos como la cromatografía de gases (GC), cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), HPLC y técnicas espectroscópicas. Estas técnicas permiten separar, identificar y analizar los compuestos presentes, siendo fundamentales para el control de calidad y estudio de sus propiedades (67,68).

1.7.6.1. Cromatografía de gases (GC)

En la cromatografía de gases, la muestra es transportada por una fase móvil gaseosa inerte, generalmente helio, a través de una columna capilar que contiene la fase estacionaria y se encuentra alojada en un horno con control de temperatura. La separación de los componentes se basa en su diferente afinidad por la fase estacionaria, lo que determina sus tiempos de retención, influenciados principalmente por la presión de vapor de cada compuesto. Los analitos separados pueden ser identificados y

cuantificados mediante detectores adecuados. La introducción de la muestra en la columna puede realizarse mediante los modos split, splitless u on-column, según la naturaleza y concentración de los compuestos a analizar. Para el análisis de sustancias volátiles presentes en matrices sólidas, se emplea la técnica de extracción en espacio de cabeza (headspace), la cual permite transferir los compuestos volátiles a la fase gaseosa y analizarlos de manera eficiente mediante cromatografía de gases (69).

1.7.6.2. Espectrometría de masas (MS)

La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica de alta precisión ampliamente utilizada tanto en investigación como en análisis de rutina y control de calidad. Se caracteriza por su elevada capacidad de identificación y cuantificación de compuestos, gracias a la obtención de espectros de masas específicos para cada molécula. Destaca por su alta sensibilidad, permitiendo detectar sustancias a concentraciones muy bajas, así como por su capacidad para proporcionar información estructural e isotópica. En esta técnica, la muestra es ionizada mediante diferentes métodos, siendo el impacto electrónico uno de los más empleados. Durante la ionización se generan iones moleculares y fragmentos característicos, los cuales son acelerados y separados en función de su relación masa-carga. La detección de estos iones produce un espectro de masas distintivo que puede ser comparado con bases de datos para la identificación del compuesto analizado (69).

1.7.6.3. Acoplamiento cromatografía de gases-espectrometría de masas

La cromatografía de gases (GC) es una técnica eficaz para la separación de mezclas complejas; sin embargo, la identificación de los compuestos se basa principalmente en el tiempo de retención, lo cual resulta insuficiente para una identificación inequívoca cuando se analizan muestras con numerosos componentes. Por su parte, la espectrometría de masas (MS) permite identificar compuestos con alta especificidad, aunque requiere que estos se encuentren previamente separados para evitar la superposición de espectros. La combinación de ambas técnicas da lugar a la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), una herramienta analítica que integra la capacidad separativa de la GC con el poder de identificación de la MS, permitiendo el análisis confiable de mezclas complejas. En este sistema, los componentes separados en la columna cromatográfica ingresan de manera sucesiva al espectrómetro de masas, donde son detectados e identificados mediante sus espectros característicos. Además, el espectrómetro de masas actúa como detector

cromatográfico al registrar la corriente iónica total, generando el cromatograma correspondiente. Para el análisis de mezclas altamente complejas o la búsqueda selectiva de compuestos específicos, puede emplearse la técnica de registro de iones seleccionados (SIR), la cual incrementa la sensibilidad y selectividad del método al monitorear únicamente masas de interés, reduciendo interferencias y facilitando la identificación de los analitos (69).





CAPITULO II

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo fue desarrollado en los laboratorios F-303, H-203 y H-403 de la Universidad Católica de Santa María (sede central) Arequipa, Perú.

2.2. Materiales

2.2.1. Material biológico

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Escherichia coli*. ATCC: 25922.
- Seres humanos

2.2.2. Material Botánico

- *Tagetes minuta*

2.2.3. Reactivos químicos

- Agua destilada, grado laboratorio.
- Cloruro de sodio USP
- Alcohol etílico 70 % v/v.
- Polisorbato 80 (Tween® 80), pureza ≥ 99 %.
- Dimetilsulfóxido (DMSO), pureza $\geq 99,5$ %.
- Hidróxido de potasio (KOH), pureza $\geq 85-90$ %.
- Lauril sulfato de sodio (SLS), pureza ≥ 95 %.
- Soluciones buffer estándar
 - pH 4 (ácido acético/acetato de sodio)
 - pH 7 (fosfato monobásico/fosfato dibásico)
 - pH 10 (carbonato de sodio/bicarbonato de sodio)

2.2.4. Medios de cultivo

- Agar Manitol Salado, grado microbiológico, medio deshidratado (OXOID)
- Agar Müller-Hinton, grado microbiológico, medio deshidratado (COMEDCO)
- Agar MacConkey, grado microbiológico, medio deshidratado (COMEDCO)
- Caldo nutritivo, grado microbiológico, medio deshidratado (HIMEDIA)

2.2.5. Materiales de laboratorio

- Balones de fondo redondo de 100 mL y 500 mL (Pyrex®)
- Picnómetro (Pyrex®)
- Matraces aforados de 50 mL y 100 mL. (Pyrex®)
- Vasos de precipitados de 50 mL, 100 mL y 250 mL (Pyrex®)
- Baguetas de vidrio.
- Placas Petrie 100 mm de diámetro (Pyrex®)
- Probetas graduadas de 10 mL, 50 mL y 100 mL (Pyrex®)
- Termómetros de laboratorio.
- Tubos de ensayo dimensiones 16 × 150 mm. (Pyrex®)
- Embudos (Pyrex®)
- Mortero de porcelana.
- Pistilo de porcelana.
- Tubo refrigerante (Pyrex®)
- Pinza universal de tres dedos con doble ajuste.
- Soporte universal.
- Pera de decantación (Pyrex®)

2.2.6. Aparatos y equipos

- Extractor de esencias por arrastre de vapor (EM 15)
- Refractómetro de mano (MASTER-10α)
- Cabina de flujo laminar (Labconco)
- Cocina eléctrica de laboratorio (Hanna Instruments)
- Balanza analítica (Ohaus Pioneer)
- Incubadora microbológica (Thermo Scientific)
- Refrigeradora de laboratorio (Bosch)
- Contador de colonias (Fisherbrand)
- Agitador magnético (Scilogex)
- Estufa eléctrica de laboratorio (Thermo Scientific)
- Autoclave (Systec)
- Potenciómetro (Hanna Instruments)
- Desecador (Pyrex®)
- Regla Vernier (calibrador) (Starrett)
- Micropipetas automáticas

- Micropipeta 100 μ L (Eppendorf)
- Micropipeta 1000 μ L (Eppendorf)

2.2.7. Otros

- Asa de Kolle
- Frasco de vidrio transparente/ámbar con gotero
- Mechero Bunsen (Fisher Scientific)
- Gradilla para tubos de ensayo (AI)
- Papel aluminio
- Cámara digital (Canon)
- Espátula (AI)
- Guantes quirúrgicos estériles (Alkhofar)
- Guantes de látex estériles (Alkhofar)
- Gasas estériles (Alkhofar)
- Lápiz marcador indeleble
- Papel filtro (Whatman®)
- Gotero (Pyrex®)
- Pinza (AI)
- Parafilm® (Bemis®)
- Discos de antibiograma (ciprofloxacino), concentración estándar 5 μ g, marca (Oxoid®)

2.3. Métodos

2.3.1. Obtención del aceite esencial de “*Tagetes minuta*”

Material botánico

El material botánico utilizado en este estudio correspondió a hojas flores, y tallos frescos de *Tagetes minuta* L. (huacatay), seleccionadas en buen estado para garantizar su calidad. La identificación taxonómica del material vegetal fue confirmada por el Herbarium Arequipense (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín, mediante la constancia N° 009-2025-HUSA, asegurando la correcta determinación de la especie.

Recolección

La recolección de *Tagetes minuta* se realizó de manera manual el 22 de mayo de 2025 a las 11:00 a. m. en el distrito de La Joya, provincia de Arequipa, Perú, ubicado

aproximadamente a 1645 m s. n. m., con coordenadas geográficas cercanas a 16°25' S y 71°49' O. Durante la recolección se registró una temperatura ambiental aproximada de 25 °C y una humedad relativa cercana al 50 %, características de la zona cálida y seca de La Joya. Se seleccionaron plantas adultas y en buen estado fisiológico. El material recolectado fue trasladado en contenedores limpios y protegidos de la luz directa para evitar la pérdida de compuestos volátiles y preservar sus características organolépticas

Secado

El material recolectado se sometió a un proceso de secado de 5 días a temperatura ambiente, en un ambiente ventilado y protegido de la luz solar directa, con el fin de minimizar la degradación de los componentes aromáticos. El material vegetal se distribuyó en bandejas limpias en una única capa, permitiendo una adecuada circulación de aire.

Extracción del aceite esencial

Se realizó mediante el método de arrastre de vapor, utilizando el extractor de aceites esenciales por arrastre de vapor modelo EM 15. La extracción se realizó mediante generación de vapor de agua a temperatura cercana a 100 °C. En este sistema se procesó un total de 7,5 kg de material vegetal fresco, distribuidos en cuatro días de trabajo. Durante los tres primeros días se realizaron dos corridas diarias de 1 kg cada una, con una duración aproximada de 6 horas por corrida. En el último día se procesó 1 kg seguido de una corrida final de 500 g, completando el total establecido. La presión del sistema se mantuvo por debajo de 30 psi, monitoreada mediante manómetro y válvula de seguridad del equipo para evitar riesgos como sobrepresurización o fugas de vapor. El vapor generado atravesó el material vegetal, arrastrando los compuestos volátiles hacia el condensador, donde se obtuvo el destilado compuesto por hidrolato y aceite esencial. Posteriormente, el destilado fue sometido a un proceso de purificación. En primer lugar, se adicionó una sal química (NaCl) para facilitar la separación clara de las fases aceite – hidrolato por sobresaturación. Luego, la fase oleosa fue recuperada cuidadosamente y tratada con sulfato de sodio anhidro, con el fin de eliminar la humedad residual y obtener un aceite completamente seco. Finalmente, el aceite esencial purificado fue almacenado en un frasco ámbar hermético y conservado en refrigeración hasta su análisis.

2.3.2. Evaluación organoléptica del aceite esencial

La evaluación organoléptica se realizó tomando una pequeña cantidad de aceite esencial. Se registraron las características de color, olor, textura y sabor (70).

2.3.3. Determinación de propiedades fisicoquímicas del aceite esencial

a. Determinación de la densidad (método del picnómetro)

La densidad del aceite esencial se determinó empleando un picnómetro previamente limpio y seco. Primero se registró la masa del picnómetro vacío utilizando una balanza analítica. Luego, el picnómetro se llenó con agua destilada hasta la marca de aforo y se registró nuevamente su masa a 20 °C para permitir el cálculo del volumen real del recipiente. Posteriormente, el picnómetro se llenó con el aceite esencial y se midió su masa. Con estos tres valores (picnómetro vacío, con agua y con aceite esencial) se aplicó la relación entre masa y volumen para calcular la densidad del aceite; dicha prueba se efectuó por triplicado (70). Además, para la determinación de la densidad se emplea la siguiente formula:

$$P_{muestra} = \frac{(P_2 - P_o)}{(P_1 - P_o)} \times P_{agua}$$

Donde:

Po = peso del picnómetro vacío y seco (g)

P1 = peso del picnómetro lleno con agua destilada (g)

P2 = peso del picnómetro lleno con la muestra (g)

Pagua = densidad del agua a la temperatura de trabajo (0,997 g/mL a 25 °C)

b. pH

La medición del pH se realizó utilizando un potenciómetro (Hanna Instruments). Antes de cada determinación, el electrodo fue calibrado con soluciones buffer estándar de pH 7 (fosfato monobásico/fosfato dibásico), pH 4 (ácido acético/acetato de sodio) y pH 10 (carbonato de sodio/bicarbonato de sodio) garantizando la precisión de las lecturas; dicha determinación se efectuó por triplicado (70).

c. Índice de refracción

El índice de refracción se determinó utilizando un refractómetro de mano (MASTER-10α), previamente calibrado con agua destilada a 20 °C. Posteriormente, se colocó una

gota de aceite esencial sobre la superficie de lectura, se cerró la lámina del equipo y se procedió a realizar la medición correspondiente; dicha evaluación se efectuó por triplicado (68).

d. Solubilidad

Se evaluó cualitativamente utilizando cuatro solventes: etanol al 70 %, agua destilada, DMSO y cloroformo. En tubos de ensayo separados se midieron 1 mL de cada solvente y se añadieron 100 µL de aceite esencial. Las mezclas se agitaron suavemente y se observaron los cambios inmediatamente y después de 5 minutos, se registró la miscibilidad o presencia de separación de fases; dicha evaluación se efectuó por triplicado (70).

2.3.4. Análisis cromatográfico (GC–MS)

El perfil químico del aceite esencial fue determinado mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC–MS) en el laboratorio externo “Laboratorios Slab Perú”. Para el análisis se empleó una muestra de 20 µL de aceite esencial, la cual fue procesada conforme a los procedimientos estandarizados del laboratorio para la identificación de compuestos volátiles.

La identificación de los componentes se realizó mediante el software GCMS Solution® del equipo SHIMADZU, utilizando la librería espectral NIST 2014. El grado de coincidencia entre los espectros obtenidos y los de referencia se expresó mediante el índice de similitud (Similarity Index, SI), considerando aceptables valores comprendidos entre 85 y 100.

El análisis semicuantitativo de los compuestos se efectuó mediante el cálculo del área relativa de cada componente, empleando la fórmula: $\text{área relativa del compuesto (\%)} = (\text{APi} / \text{TAP}) \times 100$, donde APi corresponde al área del pico individual y TAP al área total de los picos cromatográficos.

2.3.5. Concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *Tagetes minuta*

Preparación del inóculo bacteriano

Se emplearon cepas ATCC de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. De cada microorganismo se seleccionaron tres colonias aisladas de un cultivo reciente en agar Mueller-Hinton y se transfirieron a un tubo de ensayo que contenían 5 mL de caldo nutritivo. Las suspensiones se homogenizaron por agitación suave. Los tubos se

incubaron a 37 °C durante 6 horas, hasta obtener una turbidez equivalente al estándar 0.5 de la escala de McFarland, correspondiente a aproximadamente 1.5×10^8 UFC/mL (72).

a. Aplicación de la técnica de siembra en manto

Las placas de agar Mueller–Hinton previamente solidificadas se inocularon utilizando un hisopo estéril sumergido en el inóculo ajustado. El hisopo se presionó contra la pared del tubo para retirar el exceso de líquido y se procedió a sembrar la superficie del agar en tres direcciones, asegurando una cobertura uniforme (72).

b. Preparación de las soluciones de aceite esencial

Para la preparación, el aceite esencial de *Tagetes minuta* se diluyó en dimetilsulfóxido (DMSO) debido a que en estudios previos sobre aceites esenciales de *Tagetes* se ha demostrado que la dilución en DMSO permite una adecuada dispersión en medios de cultivo, favoreciendo la interacción del compuesto con los microorganismos. Siguiendo metodologías similares, se prepararon concentraciones de 75%, 50% y 25% del aceite esencial de *Tagetes minuta* para evaluar su efecto antibacteriano, permitiendo establecer una relación dosis-respuesta y comparar la actividad en diferentes niveles de concentración. Cada solución se dispuso en un volumen final de 100 µL por pocillo para asegurar uniformidad y reproducibilidad de los ensayos. Para ello, se mezclaron 25 µL de aceite esencial con 75 µL de DMSO para obtener la concentración de 25%, 50 µL de aceite esencial con 50 µL de DMSO para la concentración 50%, y 75 µL de aceite esencial con 25 µL de DMSO para la concentración 75%. En todos los casos, el volumen final aplicado en cada pocillo fue de 100 µL. El DMSO se empleó además como control negativo (100 µL de DMSO puro), mientras que como control positivo se empleó discos de ciprofloxacino a 5 µg por disco/pocillo (71).

c. Formación de los pozos en el agar

Con un sacabocados estéril se realizaron pocillos de 6 mm de diámetro en el centro de cada placa previamente inoculada. Los cilindros de agar retirados fueron descartados con un asa estéril. Cada pocillo se llenó cuidadosamente con 100 µL de la muestra correspondiente (concentración evaluada o control). Las placas se dejaron en reposo por una hora, para permitir la difusión del aceite esencial en el agar (72).

Posteriormente las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 horas, tras lo cual se observaron los pozos y se midieron los halos de inhibición para evaluar la actividad

antibacteriana. Cada concentración y control se evaluó por triplicado, empleando un total de seis placas, tres correspondientes a *Escherichia coli* y tres a *Staphylococcus aureus*, con el fin de asegurar la reproducibilidad y confiabilidad de los resultados (71).

2.3.6. Formulación del jabón líquido con diferentes concentraciones de aceite esencial de *Tagetes minuta*

Se formularon tres versiones del jabón líquido, incorporando diferentes porcentajes de aceite esencial de *Tagetes minuta* (0,5%, 1,0% y 1,5%) con el fin de evaluar cómo la concentración del aceite influye en las propiedades físicas, sensoriales y la actividad antimicrobiana del producto, considerando que los aceites esenciales pueden emplearse en concentraciones de 0,5 a 2,0% en productos de higiene para obtener efecto biológico sin comprometer la seguridad del usuario (74,75). Las formulaciones se diseñaron con el objetivo de integrar el aceite esencial como agente activo de origen natural, aprovechando sus beneficios funcionales sin comprometer la estabilidad y calidad del jabón. Para ello se empleó una base detergente suave y natural, compatible con compuestos lipofílicos, que permite incorporar de manera homogénea el aceite esencial sin afectar la estabilidad física del producto. Dichas formulaciones se presentan en la Tabla N° 4, cada una con un volumen final de 300 mL (100 %). En estas, el aceite de oliva funciona como base grasa saponificable, proporcionando los triglicéridos necesarios para la reacción de saponificación y otorgando propiedades hidratantes y emolientes a la piel, mientras que el hidróxido de potasio (KOH) actúa como agente saponificante alcalino, facilitando la conversión de los ácidos grasos en jabón y glicerina, y garantizando un producto líquido y estable. De esta manera, se logra un equilibrio entre eficacia de limpieza, suavidad cutánea y la incorporación de compuestos activos.

Tabla 4. Composición de la formulación del jabón líquido con 1,5% aceite esencial de *Tagetes minuta*

Componente	F1 (0,50 %)	F2 (1,00 %)	F3 (1,50 %)	Rol
Aceite de oliva	14,50 %	14,50 %	14,50 %	Base grasa saponificable
Hidróxido de potasio	3,55 %	3,55 %	3,55 %	Agente saponificante alcalino
Glicerina	7,25 %	7,25 %	7,25 %	Humectante y suavizante
Aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i>	0,50 %	1,00 %	1,50 %	Agente antibacteriano y colorante
Agua destilada c.s. p	100,00 %	100,00 %	100,00 %	Medio de reacción

2.3.7. Elaboración del jabón líquido con diferentes concentraciones de aceite esencial de *Tagetes minuta*

Antes de iniciar la elaboración, se prepararon tres formulaciones de jabón líquido con diferentes concentraciones de aceite esencial de *Tagetes minuta* (0,5 %, 1,0 % y 1,5%), aplicando el mismo procedimiento de elaboración para cada una. Cabe indicar que a continuación se presenta el procedimiento de elaboración únicamente de la formulación con 1,5 %, ya que fue la concentración seleccionada para la evaluación de la actividad antibacteriana en sujetos. Se realizó la medición de los materiales requeridos: 43,50 g de aceite de oliva, 10,65 g de hidróxido de potasio (KOH), 21,75 g de glicerina vegetal, 219,60 g de agua destilada y 4,50 mL (1,5%) de aceite esencial de huacatay. El proceso de elaboración comenzó vertiendo 100 mL de agua destilada en un vaso de precipitado, al cual se adicionó lentamente el KOH (10,65 g), bajo agitación constante con una varilla de vidrio, hasta asegurar su completa disolución. Durante este proceso se produjo un incremento de temperatura debido al carácter exotérmico de la disolución del KOH. La solución obtenida se dejó enfriar de manera controlada hasta alcanzar una temperatura aproximada de 30 a 35 °C. De forma paralela, se colocó un matraz en baño María y se calentaron 43,50 g de aceite de oliva hasta aproximadamente 60 °C. Al alcanzar dicha temperatura, la solución de KOH se incorporó lentamente al aceite caliente para favorecer una mezcla uniforme, aplicando agitación con una batidora a baja velocidad (200 a 400 rpm) durante 10 a 15 minutos. La mezcla resultante se

mantuvo en baño María a una temperatura de 60 a 70 °C durante aproximadamente 2 horas, con agitación intermitente (5 minutos de agitación por cada 15 minutos de reposo), hasta obtener una pasta homogénea. A esta pasta aún tibia se añadió la glicerina vegetal (21,75 g), mezclándose durante 3 minutos para favorecer su homogeneización. La pasta obtenida fue pesada y diluida con 219,60 g de agua destilada a 60 °C, agregada de forma gradual bajo agitación suave con la batidora. El producto se dejó reposar durante 12 horas a temperatura ambiente y, una vez alcanzada una temperatura inferior a 40 °C, se incorporaron 4,50 mL (1,5%) de aceite esencial de huacatay, mezclándose durante 5 minutos para asegurar su adecuada dispersión.

El jabón líquido formulado se mantuvo en reposo durante 24 horas y se envasó en frascos de vidrio ámbar previamente esterilizados, los cuales fueron rotulados con la información correspondiente (nombre del producto, lote, fecha de elaboración y concentración de aceite esencial).

2.3.8. Control de calidad del jabón líquido con aceite esencial de *Tagetes minuta*

Permite verificar que el producto cumpla con parámetros fisicoquímicos y de estabilidad adecuados. Para ello se evalúan características como pH, porcentaje de humedad y sólidos totales, sustancias volátiles y densidad. Estas pruebas aseguran la calidad, seguridad y eficacia del jabón (76).

a. Determinación de pH

El ensayo se realizó en las tres formulaciones de jabón líquido con diferentes concentraciones de aceite esencial de *Tagetes minuta* (0,5 %, 1 % y 1,5 %), así como en el jabón líquido base y en un jabón líquido de origen comercial utilizado como referencia. Para ello, el equipo fue calibrado con soluciones buffer estándar; empezando con un buffer de pH 7 (fosfato monobásico/fosfato dibásico), luego con un buffer de pH 4 (ácido acético/acetato de sodio) y finalizando la calibración con un buffer de pH 10 (carbonato de sodio/bicarbonato de sodio), previamente a su uso. A continuación, se tomó 1 mL del jabón líquido correspondiente y se añadió a 100 mL de agua destilada en un vaso de precipitados. El electrodo del potenciómetro (Hanna Instruments) se colocó en la solución durante un par de minutos, hasta obtener una lectura estable. Una vez registrado el valor correspondiente, el electrodo fue enjuagado con agua destilada antes de proceder con las mediciones subsecuentes. Dicho ensayo fue realizado por triplicado (77).

b. Evaluación del porcentaje de humedad y sustancias volátiles

El ensayo se realizó en las tres formulaciones de jabón líquido con diferentes concentraciones de aceite esencial de *Tagetes minuta* (0,5 %, 1 % y 1,5 %), así como en el jabón líquido base y en un jabón líquido de origen comercial utilizado como referencia. Se tomó 1 g de la muestra y se colocó en una cápsula de porcelana previamente pesada. El conjunto fue sometido a un proceso de secado a temperatura 110 °C de en estufa y, posteriormente, enfriado en un desecador para registrar su nueva masa. Este ciclo de secado, enfriamiento y pesada se repitió de manera sucesiva hasta obtener un valor de peso constante, criterio que indica la eliminación de la humedad presente en la muestra; dicho ensayo se realizó por triplicado (78). Además, para la determinación del porcentaje se emplea la siguiente formula:

$$\% \text{ Humedad y sustancias volatiles} = \frac{(P1 - P2)}{(P1 - P0)} \times 100$$

Donde:

Po = peso del recipiente vacío y seco (g)

P1 = peso del recipiente + muestra antes del secado (g)

P2 = peso del recipiente + muestra después del secado (g)

c. Determinación de sólidos totales

El ensayo se realizó en las tres formulaciones de jabón líquido con diferentes concentraciones de aceite esencial de *Tagetes minuta* (0,5 %, 1 % y 1,5 %), así como en el jabón líquido base y en un jabón líquido de origen comercial utilizado como referencia. La determinación se efectuó a partir del porcentaje de humedad previamente obtenido, por lo cual se calculó por diferencia, considerando que corresponde a la fracción de material remanente luego de la eliminación de la humedad. Este procedimiento nos permitió evaluar de manera precisa la composición y estabilidad del producto analizado; dicho ensayo se realizó por triplicado (78). Además, para la determinación del porcentaje se emplea la siguiente formula:

$$\% \text{ Sólidos totales} = 100 - \% \text{ Humedad y sustancias volátiles}$$

d. Determinación de densidad (método del picnómetro)

El ensayo se realizó en las tres formulaciones de jabón líquido con diferentes concentraciones de aceite esencial de *Tagetes minuta* (0,5 %, 1 % y 1,5 %), así como

en el jabón líquido base y en un jabón líquido de origen comercial utilizado como referencia. La densidad se determinó empleando un picnómetro previamente limpio y seco. Primero, se registró la masa del picnómetro vacío utilizando una balanza analítica. Luego, el picnómetro se llenó con agua destilada hasta la marca de aforo y se registró nuevamente su masa a 20 °C, lo que permitió calcular el volumen real del recipiente. Posteriormente, el picnómetro se llenó con el jabón líquido formulado y se midió su masa. Con estos tres valores (picnómetro vacío, con agua y con jabón líquido) se aplicó la relación entre masa y volumen para calcular la densidad del jabón. Dicho ensayo se efectuó por triplicado (70). Además, para la determinación de la densidad se emplea la siguiente formula:

$$P_{muestra} = \frac{(P_2 - P_0)}{(P_1 - P_0)} \times P_{agua}$$

Donde:

P₀ = peso del picnómetro vacío y seco (g)

P₁ = peso del picnómetro lleno con agua destilada (g)

P₂ = peso del picnómetro lleno con la muestra (g)

P_{agua} = densidad del agua a la temperatura de trabajo (0,997 g/mL a 25 °C)

2.3.9. Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* del jabón líquido con aceite esencial de *Tagetes minuta*

Preparación del jabón líquido con diferentes concentraciones del aceite esencial de *Tagetes minuta*

Se prepararon tres formulaciones de jabón líquido con aceite esencial de *Tagetes minuta* a concentraciones de 0,5 %, 1,0 % y 1,5 %, utilizando un volumen final de 300 mL de solución detergente base. Para ello, se incorporaron 1,5 mL, 3,0 mL y 4,5 mL de aceite esencial, respectivamente. De cada formulación se aplicaron 100 µL por pocillo. La solución detergente base se utilizó como control negativo (100 µL), mientras que como control positivo se emplearon discos de ciprofloxacino de 5 µg, de acuerdo con los estándares de sensibilidad antimicrobiana.

a. Preparación del inóculo bacteriano

Se emplearon cepas ATCC de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. De cada

microorganismo se seleccionaron tres colonias aisladas de los cultivos tanto agar Manitol Salado y MacConkey respectivamente y se transfirieron a un tubo de ensayo que contenían 5 mL de caldo nutritivo. Las suspensiones se homogenizaron por agitación suave. Los tubos se incubaron a 37 °C durante 6 horas, hasta obtener una turbidez equivalente al estándar 0.5 de la escala de McFarland, correspondiente a aproximadamente 1.5×10^8 UFC/mL (72).

b. Aplicación de la técnica de siembra en manto

Las placas de agar Mueller–Hinton previamente solidificadas se inocularon utilizando un hisopo estéril sumergido en el inóculo ajustado. El hisopo se presionó contra la pared del tubo para retirar el exceso de líquido y se procedió a sembrar la superficie del agar en tres direcciones, asegurando una cobertura uniforme (72).

c. Formación de los pozos en el agar

Con un sacabocados estéril se realizaron pocillos de 10 mm de diámetro en el centro de cada placa previamente inoculada. Los cilindros de agar retirados fueron descartados con un asa estéril. Cada pocillo se llenó cuidadosamente con 100 µL de la muestra correspondiente (concentración evaluada o control). Las placas se dejaron en reposo por una hora, para permitir la difusión del aceite esencial en el agar (72).

Posteriormente las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 horas, tras lo cual se observaron los pozos y se midieron los halos de inhibición para evaluar la actividad antibacteriana. Cada concentración y control se evaluó por triplicado, empleando un total de seis placas, tres correspondientes a *Escherichia coli* y tres a *Staphylococcus aureus*, con el fin de asegurar la reproducibilidad y confiabilidad de los resultados (71).

2.3.10. Evaluación de la actividad antibacteriana del jabón líquido con aceite esencial de *Tagetes minuta* en voluntarios mediante el método enjuague

I. Aprobación del Comité de Ética

La presente investigación, al involucrar la participación de sujetos voluntarios sanos para la evaluación mediante el método de enjuague, fue sometida a la evaluación y aprobación del Comité de Ética correspondiente. El estudio se

desarrolló respetando los principios éticos de la investigación en seres humanos. Todos los participantes fueron informados sobre los objetivos y procedimientos del estudio, así como sobre los riesgos mínimos asociados, y otorgaron su consentimiento informado de manera voluntaria. Asimismo, se garantizó la confidencialidad de la información y el derecho de los participantes a retirarse del estudio en cualquier momento.

II. Consentimiento informado

Previo a la ejecución del ensayo, mediante el método de enjuague, se solicitó la participación voluntaria de los sujetos de estudio, a quienes se les proporcionó información clara, completa y comprensible sobre los objetivos del estudio, los procedimientos a realizar, los posibles riesgos y beneficios, así como la confidencialidad de los datos obtenidos. A cada participante se le explicó detalladamente el procedimiento experimental, incluyendo la exposición bacteriana artificial, el lavado de manos con los diferentes jabones líquidos y la posterior recuperación bacteriana. Asimismo, se enfatizó que la participación era completamente voluntaria y que los sujetos podían retirarse del estudio en cualquier momento. El consentimiento informado fue otorgado de manera escrita por cada participante antes del inicio del estudio, dejando constancia de su aceptación libre y consciente para formar parte de la investigación. Se garantizó en todo momento la protección de la integridad física de los participantes, seleccionándose únicamente sujetos con piel íntegra a nivel de manos y antebrazos, y empleándose procedimientos de asepsia y desinfección para evitar cualquier riesgo.

La información personal de los participantes fue tratada de forma confidencial y utilizada exclusivamente con fines académicos y científicos, respetando los principios éticos establecidos en la Declaración de Helsinki y las normativas nacionales vigentes para investigaciones que involucran seres humanos (79).

III. Muestra de estudio

La muestra de estudio estuvo constituida por nueve sujetos, de ambos sexos, con edades comprendidas entre 20 a 30 años, quienes presentaban la piel íntegra a nivel de manos y antebrazos. Los participantes fueron distribuidos en tres grupos experimentales: el Grupo 1, conformado por tres sujetos en los cuales se evaluó

la base del jabón líquido; el Grupo 2, integrado por tres sujetos en cuyas manos se evaluó el jabón líquido formulado con aceite esencial de *Tagetes minuta*; y el Grupo 3, compuesto por tres sujetos en los que se evaluó un jabón antibacterial de origen comercial.

IV. Agentes microbiológicos empleados

Para la evaluación antibacteriana se emplearon las cepas *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, las cuales fueron previamente activadas y cultivadas en agar Mueller-Hinton. A partir de los cultivos obtenidos, se seleccionaron colonias representativas que fueron transferidas a un recipiente estéril con caldo nutritivo, preparándose posteriormente una suspensión bacteriana mediante dilución en suero fisiológico estéril. La preparación de esta suspensión se realizó el mismo día del ensayo, con la finalidad de asegurar la viabilidad y homogeneidad del inóculo (78).

V. Procedimiento estandarizado de asepsia de manos

Previamente, los sujetos fueron instruidos mediante el protocolo de higiene de manos estandarizado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (8), con el propósito de uniformizar el procedimiento de lavado y minimizar la influencia de variables intervinientes, tales como el tiempo de ejecución y el grado de escrupulosidad, que podrían afectar los resultados del estudio. Con este fin, se proporcionó a los participantes un material informativo ilustrado que describía de manera clara y secuencial el procedimiento correcto de lavado de manos.

VI. Asepsia de manos

Las manos de los sujetos fueron previamente desinfectadas y lavadas con jabón líquido no antibacterial, aplicada sobre la superficie ahuecada de la palma izquierda. El producto fue distribuido con la mano contraria mediante movimientos uniformes, manteniéndose el lavado durante un tiempo aproximado de 10 a 15 segundos de manera vigorosa. Este procedimiento incluyó, además, la higiene de la porción distal del antebrazo, con el fin de asegurar una limpieza homogénea de la zona evaluada. A continuación, las manos fueron enjuagadas bajo un chorro continuo de agua durante aproximadamente 30 segundos, tras lo cual los sujetos procedieron al secado de las manos y muñecas, asegurando la eliminación del exceso de humedad. Con el propósito de reforzar la asepsia, se

aplicó alcohol al 70 % mediante un frasco atomizador, permitiendo posteriormente que los sujetos secaran sus manos de forma natural.

VII. Exposición bacteriana artificial palmar

Se utilizaron gasas estériles previamente impregnadas con 30 mL de la suspensión bacteriana. Dichas gasas fueron aplicadas de manera uniforme sobre toda la superficie palmar y los espacios interdigitales de los sujetos. Posteriormente, se permitió el secado natural de las manos, sin el empleo de material absorbente, durante un periodo establecido. Una vez completado el secado, se procedió a la recuperación de los microorganismos mediante la aplicación del método de enjuague (78).

VIII. Aplicación de los jabones líquidos

Luego de la recuperación bacteriana, se procedió a la aplicación de los diferentes jabones líquidos en los sujetos, de acuerdo con el grupo experimental asignado. Para ello, cada participante realizó el lavado de manos empleando el jabón líquido correspondiente. La cantidad de jabón líquido se aplicó sobre la superficie de cada mano, tras lo cual se efectuó el lavado siguiendo el procedimiento correcto de higiene de manos establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (8).

IX. Recuperación bacteriana

Este procedimiento se realizó en cuatro oportunidades en cada sujeto, las dos primeras se llevaron a cabo para la recuperación y cuantificación de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* antes de la aplicación del jabón líquido correspondiente, con el fin de determinar el número inicial de microorganismos. Las dos evaluaciones posteriores se efectuaron tras la aplicación del jabón líquido correspondiente, permitiendo establecer la carga microbiana restante. Para la recuperación bacteriana se emplearon guantes estériles de talla grande. Una vez colocado el guante, se introdujo una solución neutralizante, realizándose un masaje cuidadoso de palmas y dedos durante un minuto para favorecer la liberación de los microorganismos. Posteriormente, se tomó una alícuota de la solución recuperada, la cual fue sometida a diluciones seriadas y sembrada en el medio de cultivo correspondiente, cada determinación se llevó a cabo por triplicado. Finalmente, los sujetos fueron desinfectados siguiendo el

procedimiento de desinfección previamente establecido (80–84).



2.4. Diagrama de flujo de actividades

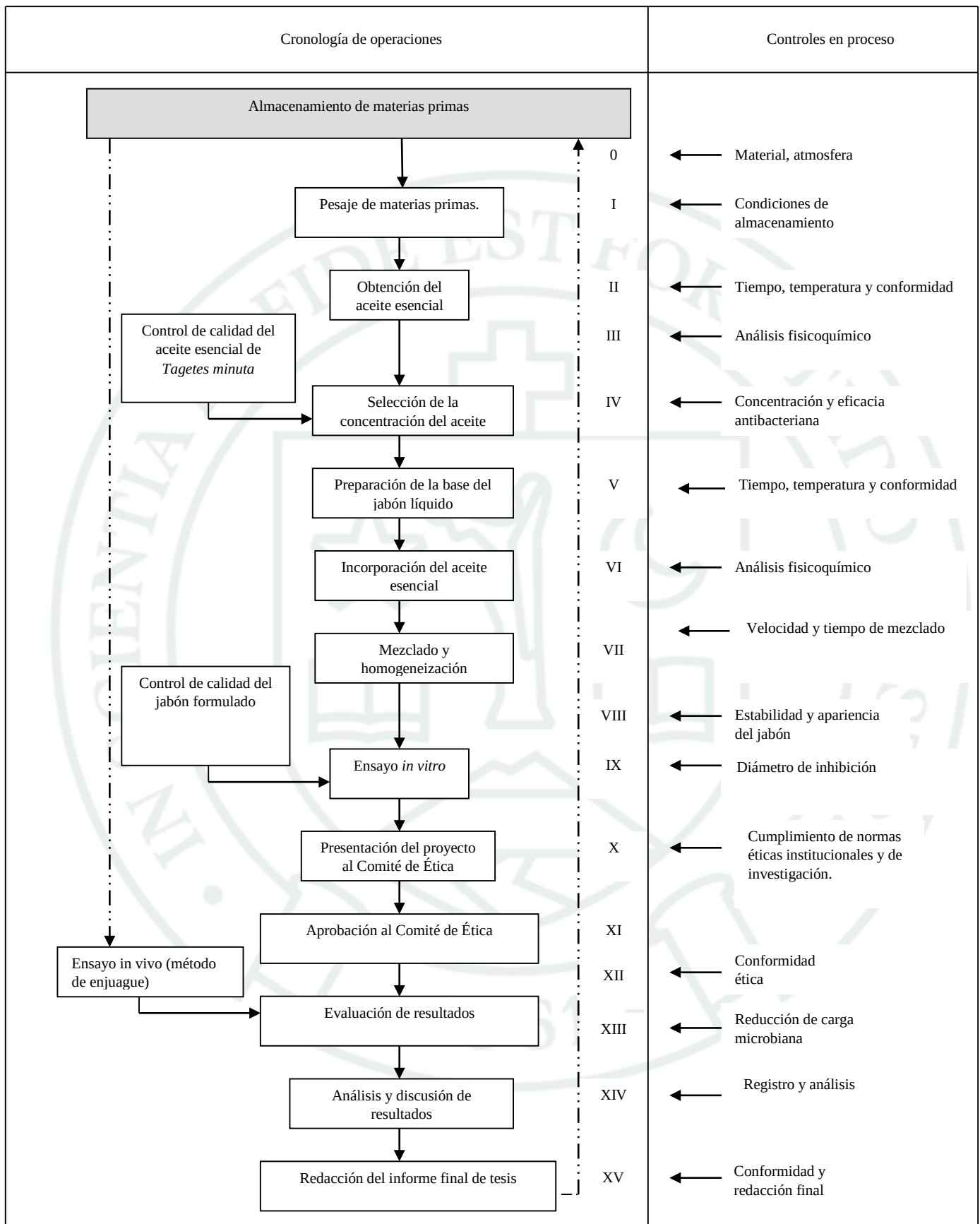


Figura 1. Flujograma de actividades



CAPITULO III

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSION

5.1. Obtención del aceite esencial de “*Tagetes minuta*”

La obtención del aceite esencial de *Tagetes minuta* se realizó conforme al procedimiento descrito en la metodología (85). A partir del procesamiento de la biomasa vegetal se obtuvo un volumen total de 12 mL de aceite esencial. El rendimiento de extracción obtenido fue de 0,16 % (v/v), valor que se encuentra dentro del rango reportado para *Tagetes minuta*, cuyos rendimientos oscilan entre 0,10 y 0,25 % dependiendo del método de extracción y las condiciones de destilación (85–87). La variación en el rendimiento de extracción puede atribuirse al estado de la materia prima y a las condiciones del proceso, tal como ha sido reportado por otros autores, quienes señalan que el contenido de aceites esenciales y el tiempo de destilación influyen directamente en la eficiencia de extracción (86–89). El rendimiento obtenido puede considerarse adecuado para una especie aromática como *Tagetes minuta*, ya que se trata de una planta cuyo contenido de aceite esencial suele ser bajo a moderado en comparación con otras especies utilizadas con fines industriales (90,91). En este sentido, el valor alcanzado sugiere que la biomasa empleada presentó características favorables para la extracción, lo que permite inferir que el material vegetal fue apto para el proceso. Asimismo, la obtención del aceite esencial bajo estas condiciones confirma que la destilación por arrastre de vapor es un método eficiente para este tipo de matriz vegetal, permitiendo la recuperación de los compuestos volátiles sin evidenciar pérdidas relevantes (91). El desarrollo del cálculo correspondiente se presenta en el Anexo 3.



Figura 3. Materia prima vegetal empleada en la obtención del aceite esencial de *Tagetes minuta* (huacatay).



Figura 2. Equipo de destilación por arrastre de vapor y separación del aceite esencial mediante pera de decantación



Figura 5. Purificación mediante tratamiento con solución sobresaturada de sal química y secado con sulfato de sodio anhidro.



Figura 4. Secado y purificación mediante tratamiento con sulfato de sodio anhidro y obtención del aceite esencial libre de humedad

3.2 Evaluación organoléptica del aceite esencial

Las características organolépticas del aceite esencial de *Tagetes minuta* obtenidas en el presente estudio se presentan en la Tabla N° 5 y concuerdan con lo reportado por otros autores, quienes describen un aceite de color amarillo a ámbar, con olor penetrante y especiado característico de la especie, atribuible a su composición rica en monoterpenos y cetonas (85,92,93). Estas características sensoriales son consideradas propias del aceite esencial de *T. minuta* y constituyen un indicador preliminar de su calidad y autenticidad. Asimismo, la textura viscosa observada, tal como se detalla en la Tabla N° 5, puede estar relacionada con la composición química del aceite esencial y las condiciones del proceso de destilación, tal como indican estudios previos sobre aceites esenciales obtenidos por arrastre de vapor (85,87).

Tabla 5. Características organolépticas del aceite esencial de *Tagetes minuta* (huacatay).

Parámetro	Descripción
Color	Ámbar
Olor	Penetrante y especiado característico del huacatay
Textura	Viscosa
Sabor	Ligeramente picante y amargo

Fuente: Elaboración Propia

3.3 Determinación de propiedades fisicoquímicas del aceite esencial

En la Tabla N° 6, la evaluación fisicoquímica del aceite esencial de *Tagetes minuta* evidenció resultados concordantes con los parámetros reportados en la literatura para esta especie, lo que sugiere una adecuada calidad y conservación de sus propiedades. El pH promedio obtenido ($4,73 \pm 0,058$) se encontró dentro del intervalo descrito para aceites esenciales, generalmente comprendido entre 4,0 y 6,0. Este comportamiento podría atribuirse a la presencia de compuestos oxigenados, como alcoholes y cetonas, los cuales influyen en las propiedades fisicoquímicas y biológicas del aceite, incluyendo su potencial actividad antimicrobiana (94). La densidad registrada ($0,87 \pm 0,006$ g/mL) fue inferior a la del agua, resultado esperado para aceites esenciales ricos en terpenos y terpenoides. Este parámetro constituye un indicador importante de identidad y pureza, ya que variaciones significativas pueden asociarse con modificaciones en la composición química, el método de extracción o incluso posibles adulteraciones. El valor obtenido coincide con el rango reportado para este tipo de metabolitos (95). Asimismo, el índice de refracción promedio ($1,484 \pm 0,001$) se encontró dentro de los valores descritos para *Tagetes minuta* (93), lo que podría indicar estabilidad en la composición química del aceite esencial y una adecuada concentración de sus componentes volátiles. Este parámetro es ampliamente utilizado como criterio de control de calidad, debido a que puede reflejar cambios relacionados con la presencia de impurezas o alteraciones en la composición química. En relación con la solubilidad, la insolubilidad en agua y la alta solubilidad en alcohol etílico, cloroformo y DMSO son coherentes con la naturaleza lipofílica de los aceites esenciales, los cuales presentan mayor afinidad por solventes orgánicos (96). En conjunto, los resultados obtenidos por triplicado y expresados como

promedio $\pm$ desviación estándar evidencian una buena reproducibilidad experimental y confirman que el aceite esencial evaluado cumple con los parámetros fisicoquímicos de calidad reportados para *Tagetes minuta* en estudios previos (97–99).



Tabla 6. Parámetros fisicoquímicos de control de calidad del aceite esencial de *Tagetes minuta* (huacatay) (n= 3)

Parámetro	Ensayos	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variabilidad (%)
pH	4.80, 4.70, 4.70	4.73	±0.058	1.23
Densidad (g/mL)	0.87, 0.88, 0.87	0.87	±0.006	0.69
Índice de refracción (20 °C)	1.483, 1.484, 1.485	1.48	±0.001	0.07
Solubilidad en agua destilada	No presentó solubilidad	—	—	—
Solubilidad en alcohol etílico	Presentó disolución homogénea	—	—	—
Solubilidad en cloroformo	Presentó disolución completa e inmediata	—	—	—
Solubilidad en DMSO	Presentó disolución completa e inmediata	—	—	—

Fuente: Elaboración Propia

3.4 Análisis cromatográfico (GC–MS)

La Tabla N° 7 muestra los principales componentes químicos identificados en el aceite esencial de *Tagetes minuta* mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), así como su porcentaje de área relativa.

Tabla 7. Principales componentes identificados

Componente Identificado	Clase química	Área relativa (%)
2,6-Dimetil-7-octen-4-ona	Cetona	34.21
	monoterpénica	
trans- β -Ocimeno	Monoterpeno	29.79
D-Limoneno	Monoterpeno	5.14
(Z)-2,6-dimetil-5,7-octadien-4-ona	Cetona	4.59
	monoterpénica	
(E,Z)-2,6-dimetil-2,4,6-octatrieno	Monoterpeno	2.37
Cariofileno	Sesquiterpeno	0.94
Germacreno D	Sesquiterpeno	0.21
Linalool	Alcohol	0.18
	monoterpénico	
Terpinen-4-ol	Alcohol	0.09
	monoterpénico	

Fuente: Elaboración Propia

El análisis cromatográfico mediante GC-MS del aceite esencial de *Tagetes minuta* evidenció una composición dominada por monoterpenos y cetonas monoterpénicas, compuestos ampliamente asociados a actividad antimicrobiana (92,100). El componente mayoritario fue la 2,6-dimetil-7-octen-4-ona (34,21 %), seguido del trans- β -ocimeno (29,79 %) y el D-limoneno (5,14 %), los cuales han sido reportados como responsables de la actividad antibacteriana del huacatay (87,92,93,100,101). Asimismo, se identificó la presencia de otros terpenoides como linalool, terpinen-4-ol, cariofileno y germacreno D, aunque en menor proporción, podría contribuir mediante un efecto sinérgico que potencia la actividad antimicrobiana observada en los ensayos *in vitro* e *in vivo* del jabón líquido formulado (87,88,92).

3.5 Concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *Tagetes minuta*

En las Tablas N° 8 y 9 se muestran los resultados obtenidos, los cuales evidencian una relación dosis–respuesta, donde el incremento de la concentración del aceite esencial de *Tagetes minuta* (25 %, 50 % y 75 %) produjo halos de inhibición

progresivamente mayores frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, indicando mayor eficacia antibacteriana a concentraciones más altas. Este comportamiento concuerda con estudios nacionales que reportaron zonas de inhibición crecientes de *T. minuta* al aumentar su concentración, especialmente frente a *S. aureus* y *E. coli* mediante métodos de difusión en agar (102). De igual forma, otras investigaciones con *T. minuta* frente a diferentes bacterias también describen mayor inhibición a concentraciones elevadas y ausencia de efecto en controles negativos, validando el método empleado (93,102,103). El efecto antibacteriano se atribuye a terpenos del aceite esencial (como ocimeno, limoneno y linalool) capaces de alterar la membrana bacteriana, mecanismo descrito para *T. minuta* frente a bacterias Gram positiva como *Staphylococcus aureus* y Gram negativa como *Escherichia coli* (103). En conjunto, los resultados obtenidos confirman que el aceite esencial de *Tagetes minuta* presenta actividad antibacteriana dependiente de la concentración y respaldan su uso potencial en formulaciones como jabón líquido.

a) *Staphylococcus aureus* ATCC

Tabla 8. Halos de inhibición (mm) obtenidos para *Staphylococcus aureus* frente a diferentes concentraciones del aceite esencial (n= 3)

Tratamiento	Ensayo 1 (mm)	Ensayo 2 (mm)	Ensayo 3 (mm)	Promedio (mm)	Desviación estándar	Coefficiente de variabilidad (%)
Aceite 25 %	10.20	10.50	10.10	10.27	0.21	2.05
Aceite 50 %	13.40	13.80	13.60	13.60	0.20	1.47
Aceite 75 %	16.50	16.80	16.60	16.63	0.15	0.90
Control negativo (DMSO)	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
Control positivo (Ciprofloxacino 5 µg)	24.50	24.80	24.60	24.63	0.15	0.61

Fuente: Elaboración Propia

b) *Escherichia coli* ATCC

Tabla 9. Halos de inhibición (mm) obtenidos para *Escherichia coli* frente a diferentes concentraciones del aceite esencial (n= 3)

Tratamiento	Ensayo 1 (mm)	Ensayo 2 (mm)	Ensayo 3 (mm)	Promedio (mm)	Desviación estándar	Coefficiente de variabilidad (%)
Aceite 25 %	8.1	8.4	8.2	8.23	0.15	1.85
Aceite 50 %	11.3	11.6	11.4	11.43	0.15	1.34
Aceite 75 %	14.2	14.5	14.3	14.33	0.15	1.07
Control negativo (DMSO)	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
Control positivo (Ciprofloxacino 5 µg)	22.1	22.4	22.3	22.27	0.15	0.69

Fuente: Elaboración Propia

Con la finalidad de verificar el cumplimiento del supuesto de normalidad de los datos correspondientes a los halos de inhibición (mm), se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk, recomendada para muestras pequeñas ($n < 50$). El resultado obtenido se presenta en la Tabla N° 10, el cual mostró un valor de significancia $p = 0,265 (> 0,05)$, lo que indica que no se rechaza la hipótesis nula de normalidad y, por tanto, los datos no presentan indicios de desviarse de una distribución normal. En consecuencia, se considera adecuado emplear una prueba estadística paramétrica, específicamente un análisis de varianza (ANOVA), para evaluar las diferencias entre los grupos estudiados.

Tabla 10. Resultados de la prueba de normalidad Shapiro-Wilk para el halo de inhibición (mm)

Pruebas de normalidad			
Shapiro-Wilk			
Halo (mm)	Estadístico	gl	Sig.
	0.938	18	0.265

En la Tabla N° 11 se presenta el análisis por medio de la prueba de Tukey de la actividad antibacteriana del aceite esencial realizado para evaluar el efecto de la concentración del aceite esencial de *Tagetes minuta* y el tipo de bacteria sobre el diámetro del halo de inhibición frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Los resultados obtenidos mediante ANOVA de dos vías, indican que la concentración del aceite esencial de *Tagetes minuta* ejerce un efecto estadísticamente significativo sobre el crecimiento bacteriano, observándose diferencias significativas entre todas las concentraciones evaluadas ($p < 0,05$). En este sentido, el mayor diámetro del halo de inhibición se obtuvo con la concentración del 75 %, seguida de las concentraciones del 50 % y 25 %, lo que evidencia un incremento progresivo de la actividad antibacteriana conforme aumenta la concentración del aceite esencial.

Las medias del diámetro del halo de inhibición obtenidas para las concentraciones del 75 %, 50 % y 25 % fueron de 15,48 mm, 12,52 mm y 9,25 mm, respectivamente, y las comparaciones múltiples realizadas mediante la prueba post hoc de Tukey confirmaron que las diferencias entre cada par de concentraciones fueron estadísticamente significativas ($p = 0,000$). Este comportamiento concuerda con lo reportado en la literatura, donde se describe que el efecto antibacteriano de los aceites esenciales es dependiente de la concentración, debido a una mayor disponibilidad de compuestos bioactivos capaces de alterar la integridad de la membrana celular bacteriana (104,105). Asimismo, el análisis de varianza evidenció que el tipo de bacteria también influye significativamente en el diámetro del halo de inhibición, observándose una mayor susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* en comparación con *Escherichia coli*. Esta diferencia puede atribuirse a la estructura de la pared celular, además las bacterias Gram positivas presentan una membrana más permeable a los compuestos lipofílicos presentes

en los aceites esenciales, mientras que las bacterias Gram negativas poseen una membrana externa que actúa como barrera adicional (105,106). Por otro lado, no se encontró una interacción significativa entre la concentración del aceite esencial y el tipo de bacteria, lo que indica que el efecto de la concentración es consistente en ambas especies bacterianas evaluadas.

Finalmente, el cumplimiento del supuesto de homogeneidad de varianzas confirma la validez del análisis estadístico aplicado. En conjunto, estos resultados demuestran que el aceite esencial de *Tagetes minuta* presenta una actividad antibacteriana significativa, especialmente frente a *Staphylococcus aureus*, y que dicho efecto se incrementa de manera proporcional al aumento de la concentración, lo que respalda su potencial uso como agente antimicrobiano natural.

Tabla 11. Comparación de medias de los halos de inhibición entre concentraciones del aceite esencial mediante prueba de Tukey (HSD)

Comparaciones múltiples						
HSD Tukey						
(I) Concentración (%)	(J) Concentración (%)	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
25%	50%	-3,267*	0.0991	0.000	-3.531	-3.002
	75%	-6,233*	0.0991	0.000	-6.498	-5.969
50%	25%	3,267*	0.0991	0.000	3.002	3.531
	75%	-2,967*	0.0991	0.000	-3.231	-2.702
75%	25%	6,233*	0.0991	0.000	5.969	6.498
	50%	2,967*	0.0991	0.000	2.702	3.231

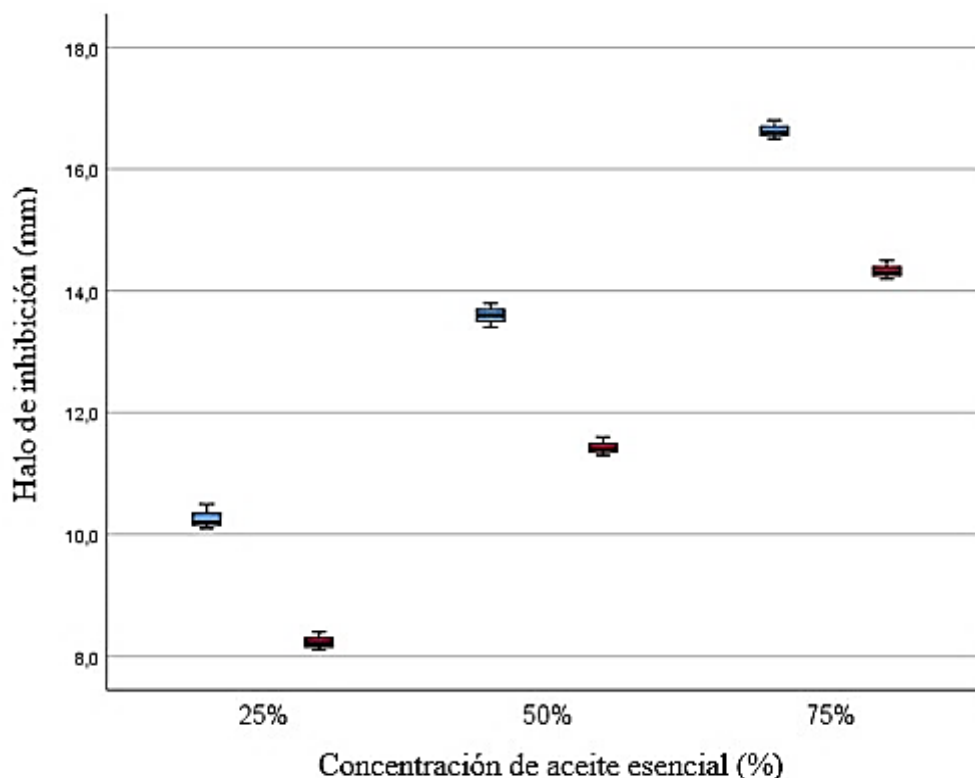


Gráfico 1 Análisis de varianza (ANOVA de dos vías) del efecto de la concentración del aceite esencial de *Tagetes minuta* y el tipo de bacteria sobre el diámetro del halo de inhibición. Bacteria: ■ *Staphylococcus aureus* ■ *Escherichia coli*

3.6 Obtención del jabón líquido con diferentes concentraciones de aceite esencial de *Tagetes minuta*

Como resultado del proceso de elaboración, se obtuvieron tres formulaciones de jabón líquido con diferentes concentraciones de aceite esencial de *Tagetes minuta* (0,5%, 1% y 1,5%), las cuales presentaron un aspecto amarillento y olor característico del aceite esencial. El producto final de las tres formulaciones mostró una adecuada fluidez, textura homogénea y estabilidad visual, sin evidencia de separación de fases ni precipitación. Estas características estuvieron influenciadas tanto por la incorporación del aceite esencial de *Tagetes minuta* como por el tipo de materia grasa saponificable empleada (aceite de oliva), la cual ha sido ampliamente reportada como una de las principales materias primas utilizadas en la elaboración de jabones, debido a su disponibilidad y a su contribución a la calidad del producto final (77).

En este sentido, se evidenció que las formulaciones basadas en aceite de oliva, junto con la adición de diferentes concentraciones de aceite esencial de *Tagetes minuta*, presenta un comportamiento favorable en el desarrollo del jabón líquido sin comprometer la estabilidad del producto y la compatibilidad entre la matriz detergente y el aceite esencial de *Tagetes minuta* incorporado.



Figura 6. Insumos para la elaboración



Figura 7. Preparación del jabón líquido base



Figura 8. Incorporación del aceite esencial de *Tagetes minuta*



Figura 9. Jabón líquido con aceite esencial de *Tagetes minuta*

3.7 Control de calidad del jabón líquido con aceite esencial de *Tagetes minuta*

Una vez obtenidas las formulaciones de jabón líquido con diferentes concentraciones de aceite esencial de *Tagetes minuta* (0,5 %, 1 % y 1,5 %), se realizaron los controles de calidad correspondientes tanto a las tres formulaciones, como al jabón líquido base y al jabón líquido de origen comercial. En el presente capítulo se expone mediante las Tablas N° 12, 13 y 14, los resultados de las diferentes formulaciones con fines comparativos y de referencia metodológica. La evaluación de los distintos parámetros fisicoquímicos se llevó a cabo por triplicado, con el fin de determinar la reproducibilidad y estabilidad de los parámetros analizados.

En la Tabla N° 12 se presentan los resultados de los parámetros fisicoquímicos evaluados de la formulación con 0,5 % de aceite esencial de *Tagetes minuta*, los cuales se expresan como valores promedio, evidenciándose una adecuada concordancia entre los ensayos realizados.

Tabla 12. Resultados de los parámetros fisicoquímicos del control de calidad del jabón líquido con aceite esencial de *Tagetes minuta* (huacatay) al 0,5 %. (n=3)

Parámetro	Muestra	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio	Desviación Estándar	CV (%)
pH	Jabón líquido con aceite esencial 0,5 %	8,85	8,88	8,82	8,85	0,03	0,34
% de humedad y sustancias volátiles	Jabón líquido con aceite esencial 0,5 %	86,40	86,55	86,35	86,43	0,10	0,12
% de sólidos totales	Jabón líquido con aceite esencial 0,5 %	13,60	13,45	13,65	13,57	0,10	0,74
Densidad (g/mL)	Jabón líquido con aceite esencial 0,5 %	0,99	0,99	0,98	0,99	0,01	1,01

Fuente: Elaboración Propia

En la Tabla N° 13 se presentan los resultados de los parámetros fisicoquímicos evaluados de la formulación con 1,0 % de aceite esencial de *Tagetes minuta*, los cuales se expresan como valores promedio, evidenciándose una adecuada concordancia entre los ensayos realizados.

Tabla 13. Parámetros fisicoquímicos del control de calidad del jabón líquido con aceite esencial de *Tagetes minuta* (huacatay) al 1,0 %. (n=3)

Parámetro	Muestra	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio	Desviación Estándar	CV (%)
pH	Jabón líquido						
	con aceite esencial 1,0 %	8,70	8,68	8,72	8,70	0,02	0,23
% de humedad y sustancias volátiles	Jabón líquido						
	con aceite esencial 1,0 %	87,10	87,05	86,95	87,03	0,08	0,09
% de sólidos totales	Jabón líquido						
	con aceite esencial 1,0 %	12,95	13,05	13,00	13,00	0,05	0,38
Densidad (g/mL)	Jabón líquido						
	con aceite esencial 1,0 %	0,98	0,98	0,98	0,98	0,00	0,00

Fuente: *Elaboración propia*

En la Tabla N° 14 se presentan los resultados de los parámetros fisicoquímicos evaluados de la formulación con 1,5 % de aceite esencial de *Tagetes minuta*, los cuales se expresan como valores promedio, evidenciándose una adecuada concordancia entre los ensayos realizados. En relación con el pH, la base de jabón líquido presentó un valor promedio de $(9,33 \pm 0,02)$, mientras que el jabón líquido formulado con 1,5% de aceite esencial de *Tagetes minuta* mostró un pH ligeramente inferior de $(8,59 \pm 0,02)$. Esta disminución puede atribuirse a la incorporación del aceite esencial, cuyos componentes químicos,

como terpenos y compuestos oxigenados, pueden interactuar con el sistema detergente e influir en el equilibrio ácido-base de la formulación, tal como ha sido reportado para aceites esenciales incorporados en productos cosméticos y detergentes (107,108). Por su parte, el jabón antibacterial comercial registró un pH promedio de (8,20). Este valor, al igual que los obtenidos para la base de jabón líquido y el jabón formulado con aceite esencial, se encuentra dentro de los rangos aceptables para productos detergentes de uso tópico, los cuales suelen presentar un pH ligeramente alcalino, generalmente comprendido entre 8 y 10 (109–111). En este sentido, los resultados evidencian que la incorporación del aceite esencial de *Tagetes minuta* no generó alteraciones en el pH de la formulación.

Respecto al porcentaje de humedad y sustancias volátiles, la base de jabón líquido presentó un valor promedio de ($86,04 \pm 0,08$ %), mientras que el jabón formulado con 1,5% de aceite esencial registró ($87,00 \pm 0,08$ %) y el jabón antibacterial comercial ($88,04 \pm 0,10$ %). El ligero incremento observado en la formulación con aceite esencial puede atribuirse a la presencia de compuestos volátiles propios del aceite esencial, como monoterpenos y sesquiterpenos, los cuales contribuyen al aumento de la fracción volátil del producto (112). Asimismo, la naturaleza higroscópica de los sistemas detergentes líquidos, asociada a la presencia de agua y glicerina, favorece la retención de humedad, lo que concuerda con lo reportado en formulaciones cosméticas similares (110).

En relación con el porcentaje de sólidos totales, la base de jabón líquido presentó un valor promedio de ($13,96 \pm 0,08$ %), el jabón líquido con 1,5% de aceite esencial ($13,00 \pm 0,08$ %) y el jabón antibacterial comercial ($11,96 \pm 0,10$ %). Estos resultados evidencian que la incorporación del aceite esencial no produjo variaciones en el contenido de sólidos, manteniendo características fisicoquímicas comparables a las de un producto comercial. Finalmente, la densidad mostró valores promedio de ($0,98 \pm 0,00$ g/mL) tanto para la base de jabón líquido como para el jabón líquido con 1,5% de aceite esencial, mientras que el jabón antibacterial comercial presentó una densidad ligeramente superior ($1,01 \pm 0,00$ g/mL). La similitud en los valores de densidad entre la base y la formulación con aceite esencial indica que la adición del aceite esencial no afectó en esta propiedad, lo que sugiere una adecuada compatibilidad entre la matriz detergente y el componente natural añadido. En conjunto, los resultados fisicoquímicos obtenidos evidencian que el jabón líquido formulado con aceite esencial de *Tagetes minuta* presenta características comparables a las de un jabón antibacterial comercial, manteniendo parámetros

adecuados para su uso como solución detergente y demostrando estabilidad y reproducibilidad en los ensayos realizados.

Aunque en formulaciones cosméticas se suele considerar una variación cercana al 3 % entre concentraciones como un cambio claramente perceptible en algunos parámetros fisicoquímicos (113–115), en el presente estudio se observaron variaciones menores entre las formulaciones con 0,5 %, 1 % y 1,5 % de aceite esencial. Este comportamiento puede explicarse por el bajo porcentaje de incorporación del aceite esencial en relación con la matriz total del jabón líquido, donde la base formulada actúa como un sistema amortiguador que atenúa cambios bruscos en propiedades como pH, densidad y contenido de sólidos (115). Asimismo, diversos autores señalan que, cuando los aceites esenciales se incorporan en concentraciones bajas a moderadas, los cambios fisicoquímicos pueden ser graduales y no necesariamente proporcionales, especialmente en sistemas acuosos con agentes tensioactivos (113,115). En este sentido, las variaciones observadas, aunque inferiores al 3 %, son técnicamente aceptables, reproducibles y coherentes con formulaciones cosméticas estables, sin afectar la calidad ni la funcionalidad del producto final.

Tabla 14. Parámetros fisicoquímicos del control de calidad del jabón líquido con aceite esencial de *Tagetes minuta* (huacatay) al 1,5 %. (n=3)

Parámetro	Muestra	Ensayos			Promedio	Desviación Estándar	CV (%)
pH	Base de jabón líquido	9.33	9.31	9.35	9.33	0.02	0.21
	Jabón líquido con aceite esencial al 1.5%	8.59	8.57	8.61	8.59	0.02	0.23
	Jabón antibacterial comercial	8.20	8.18	8.22	8.20	0.02	0.24
% de humedad y sustancias volátiles	Base de jabón líquido	86.04	86.12	85.96	86.04	0.08	0.09
	Jabón líquido con aceite esencial al 1.5%	87.00	87.08	86.92	87.00	0.08	0.09
	Jabón antibacterial comercial	88.01	88.15	87.95	88.04	0.10	0.11
% de sólidos totales	Base de jabón líquido	13.96	13.88	14.04	13.96	0.08	0.57
	Jabón líquido con aceite esencial al 1.5%	13.00	12.92	13.08	13.00	0.08	0.62
	Jabón antibacterial comercial	11.99	11.85	12.05	11.96	0.10	0.84
Densidad (g/mL)	Base de jabón líquido	0.98	0.98	0.98	0.98	0.00	0.00
	Jabón líquido con aceite esencial al 1.5%	0.98	0.98	0.98	0.98	0.00	0.00
	Jabón antibacterial comercial	1.01	1.01	1.01	1.01	0.00	0.00

Fuente: *Elaboración propia*



Figura 10.
Determinación de pH



Figura 11.
Determinación de la
densidad

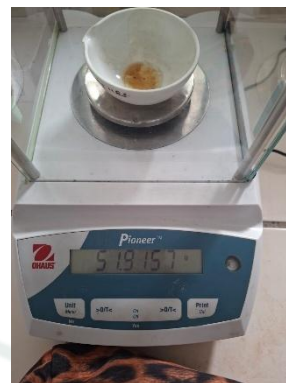


Figura 12.
Determinación de % de
humedad y sustancias
volátiles

3.8 Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* del jabón líquido con aceite esencial de *Tagetes minuta*

La actividad antibacteriana *in vitro* de los jabones líquidos formulados con diferentes concentraciones de aceite esencial de *Tagetes minuta* fue evaluada mediante el método de difusión en agar por pozos frente a cepas ATCC de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Tras 24 horas de incubación a 37 °C, se observó la formación de halos de inhibición en las muestras que contenían aceite esencial, cuyo diámetro aumentó conforme se incrementó la concentración, evidenciando una relación dosis–respuesta. *Staphylococcus aureus* presentó mayor susceptibilidad que *E. coli*. El control negativo no mostró actividad antibacteriana, mientras que el control positivo (ciprofloxacino) presentó halos bien definidos. Estos resultados confirman que el jabón líquido formulado con aceite esencial de *Tagetes minuta* posee actividad antibacteriana *in vitro* dependiente de la concentración.



Figura 13. Activación de bacterias ATCC



Figura 14. Inoculo en escala de 0.5 de McFarland



Figura 15. Preparación de jabón líquido a diferentes concentraciones de aceite esencial



Figura 16. Incubación de placas

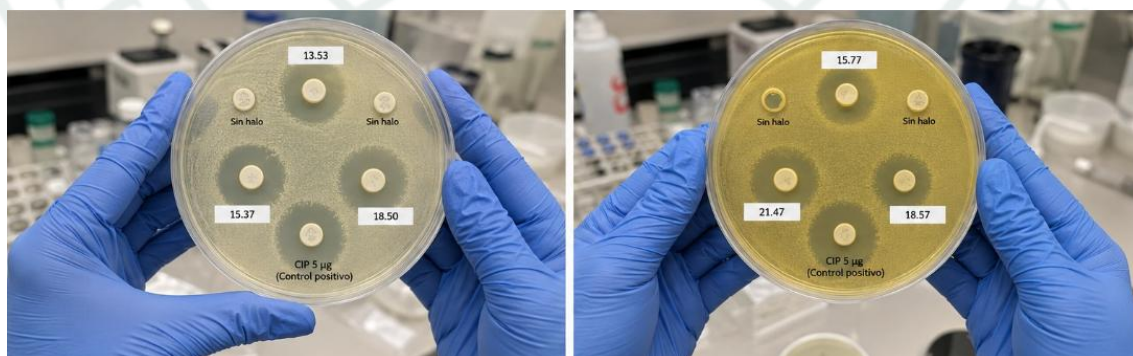


Figura 17. Lectura de resultados

En la Tabla N° 15 se presentan los resultados de la actividad antibacteriana del jabón líquido formulado con diferentes concentraciones de aceite esencial de *Tagetes minuta*, evaluada mediante el método de difusión en agar por pozos frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Se muestran los valores de los halos de inhibición obtenidos por triplicado, así como el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación (CV %), incluyendo el control positivo y el control negativo.

Tabla 15. Diámetros de los halos de inhibición (mm) obtenidos frente a *Escherichia coli* mediante difusión en placa (n= 3)

Concentración del aceite esencial en el Jabón líquido	Halo de inhibición (mm)			Promedio (mm)	Desviación estándar	CV (%)
	1	2	3			
0.5 %	13.20	13.60	13.80	13.53	0.31	2.29
1.0 %	15.10	15.40	15.60	15.37	0.25	1.63
1.5 %	17.30	17.60	17.90	17.60	0.30	1.70
Control positivo (Ciprofloxacino 5µg)	32.10	31.80	32.40	32.10	0.30	0.93
Control negativo (jabón líquido base)	6.00	6.00	6.00	6.00	0.00	0.00

NOTA: Los valores corresponden al diámetro del halo de inhibición expresado en milímetros (mm), incluyendo el diámetro del pozo (6 mm). Los ensayos se realizaron por triplicado frente a la cepa bacteriana evaluada mediante el método de difusión en agar por pozos.

Con la finalidad de verificar el cumplimiento del supuesto de normalidad de los datos correspondientes a los halos de inhibición (mm), se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk, recomendada para muestras pequeñas ($n < 50$). El resultado obtenido se presenta en la Tabla N° 16, el cual mostró un valor de significancia $p = 0,314 (> 0,05)$, lo que indica que no se rechaza la hipótesis nula de normalidad y, por tanto, no existe evidencia de que los datos se desvíen de una distribución normal. En consecuencia, se justifica el uso de una prueba estadística paramétrica, específicamente un análisis de varianza (ANOVA), para evaluar las diferencias entre los grupos estudiados.

Tabla 16. Resultados de la prueba de normalidad Shapiro-Wilk para el halo de inhibición (mm)

Pruebas de normalidad			
Halo de inhibición (mm)	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
	0.910	9	0.314

En la Tabla N° 17 se presenta el análisis de varianza (ANOVA) aplicado a los halos de inhibición de *Escherichia coli* frente a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Tagetes minuta* “huacatay” en el jabón líquido. Los resultados muestran diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones evaluadas ($p = 0,000$), lo que evidencia un efecto dependiente de la dosis. El diámetro promedio del halo de inhibición aumentó proporcionalmente con la concentración del aceite esencial de *Tagetes minuta* “huacatay” en el jabón líquido: 13,53 mm para 0,5 %, 15,37 mm para 1,0 % y 17,60 mm para 1,5 %, confirmando que a mayor concentración existe mayor actividad antibacteriana.

Estos resultados fueron corroborados por la prueba post hoc de Tukey (Tabla N° 18), la cual evidenció que todas las concentraciones difieren significativamente entre sí ($p < 0,05$). Esto indica que cada nivel de formulación produjo efectos antibacterianos distintos sobre *E. coli*, estableciendo claramente una relación dosis–respuesta. Este comportamiento concuerda con estudios previos realizados con aceites esenciales, donde se reporta que el incremento en la concentración genera halos de inhibición más amplios frente a microorganismos como *E. coli* (107–109).

Asimismo, investigaciones que emplean el método de difusión en agar han reportado un incremento significativo del efecto antibacteriano al aumentar la concentración del aceite esencial de *Tagetes minuta*, lo que respalda el uso de pruebas estadísticas como el ANOVA y la prueba post hoc de Tukey para la comparación entre distintos niveles de tratamiento. En particular, diversos estudios señalan que el aceite esencial de *Tagetes minuta* presenta una actividad antibacteriana dependiente de la concentración frente a

bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluyendo *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, resultados que concuerdan con la tendencia observada en el presente estudio (107,109,110).

Este efecto se atribuye a la presencia de compuestos bioactivos característicos del aceite esencial de *Tagetes minuta*, como monoterpenos y cetonas, los cuales pueden alterar la permeabilidad de la membrana celular bacteriana, provocando la fuga de componentes intracelulares y la posterior muerte celular. Dicho mecanismo ha sido descrito principalmente para *Staphylococcus aureus*, donde la ausencia de una membrana externa favorece una mayor susceptibilidad, mientras que en *Escherichia coli* la presencia de una membrana externa rica en lipopolisacáridos puede limitar la acción del aceite esencial. Este comportamiento explica por qué el efecto inhibitorio es más marcado a concentraciones elevadas y es consistente con los resultados obtenidos en esta investigación (83,93,107,109,111).

En conjunto, los resultados confirman que la actividad antibacteriana del jabón líquido formulado con aceite esencial de *Tagetes minuta* frente a *E. coli* es dependiente de la concentración, y que incrementos en el porcentaje de aceite esencial dentro de la matriz del detergente conducen a una mayor inhibición del crecimiento bacteriano.

Tabla 17. Análisis de varianza (ANOVA) del Halo de inhibición de *Escherichia coli* frente a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Tagetes minuta* “huacatay” en el jabón líquido

Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	24,887	2	12,443	151,338	0,000
Dentro de grupos	0,493	6	0,082	—	—
Total	25,380	8	—	—	—

Tabla 18. Comparación múltiple de medias entre concentraciones mediante la prueba de Tukey

(I) Concentración	(J) Concentración	Diferencia de medias (I-J)	Desv. error	Sig.	IC 95% Límite inferior	IC 95% Límite superior
0,5 %	1,0 %	-1,8333*	0,2341	0,001	-2,552	-1,115
0,5 %	1,5 %	-4,0667*	0,2341	0,000	-4,785	-3,348
1,0 %	1,5 %	-2,2333*	0,2341	0,000	-2,952	-1,515

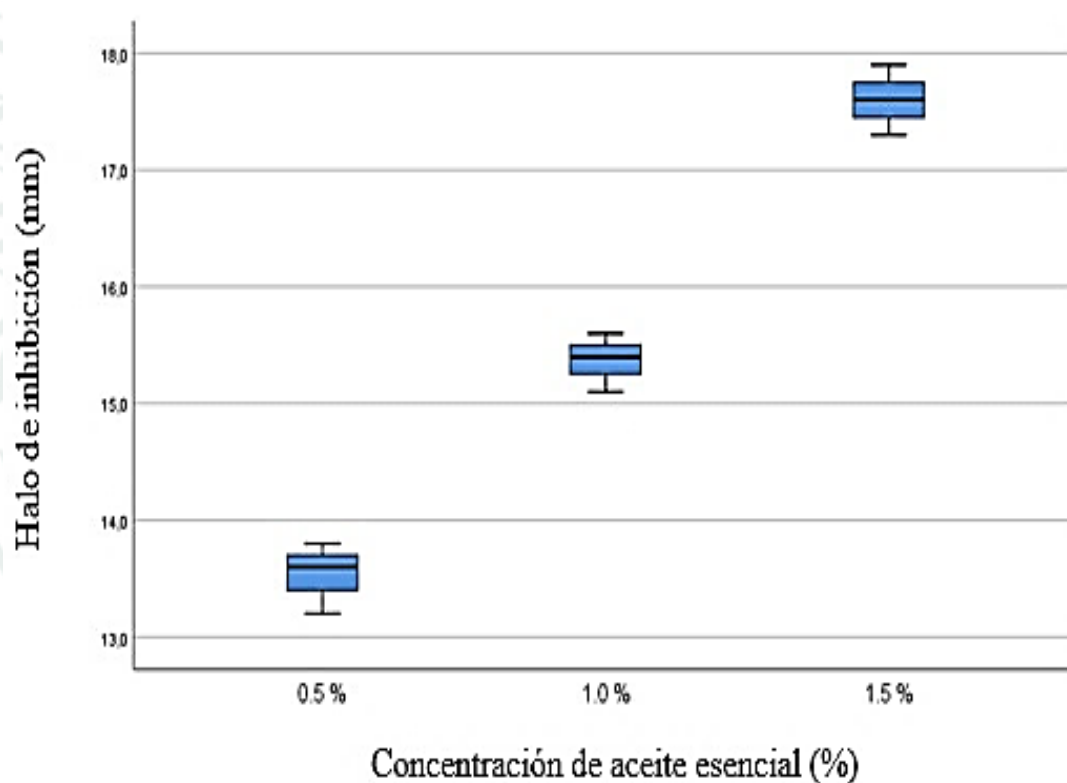


Gráfico 2. Análisis de varianza (ANOVA) del Halo de inhibición de *Escherichia coli* frente a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Tagetes minuta* "huacatay" en el jabón líquido

En la Tabla N° 19 se presentan los resultados de la actividad antibacteriana del jabón líquido formulado con diferentes concentraciones de aceite esencial de *Tagetes minuta*, evaluada frente a *Staphylococcus aureus* mediante el método de difusión en agar por pozos. Se muestran los halos de inhibición obtenidos por triplicado, así como el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación (CV %), incluyendo el control positivo (Ciprofloxacino 5 µg) y el control negativo (jabón líquido base).

Tabla 19. Diámetros de los halos de inhibición (mm) obtenidos frente a *Staphylococcus aureus* mediante difusión en placa (n= 3)

Concentración del aceite esencial en el jabón líquido	Halo de inhibición (mm)			Promedio (mm)	Desviación estándar	CV (%)
	1	2	3			
0.5 %	15.40	15.80	16.10	15.77	0.35	2.22
1.0 %	18.20	18.60	18.90	18.57	0.35	1.89
1.5 %	21.10	21.50	21.80	21.47	0.35	1.63
Control positivo (Ciprofloxacino 5µg)	33.20	33.60	34.10	33.63	0.45	1.34
Control negativo (jabón líquido base)	6.00	6.00	6.00	6.00	0.00	0.00

NOTA: Los valores corresponden al diámetro del halo de inhibición expresado en milímetros (mm), incluyendo el diámetro del pozo (6 mm). Los ensayos se realizaron por triplicado frente a la cepa bacteriana evaluada mediante el método de difusión en agar por pozos.

Con la finalidad de verificar el cumplimiento del supuesto de normalidad de los datos correspondientes a los halos de inhibición (mm), se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk, recomendada para muestras pequeñas ($n < 50$). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla N° 20, los cuales mostraron un valor de significancia $p = 0,252 (> 0,05)$, lo que indica que no se rechaza la hipótesis nula de normalidad; por tanto, los datos pueden considerarse distribuidos normalmente. En consecuencia, resulta adecuado aplicar una prueba estadística paramétrica, específicamente un análisis de varianza (ANOVA), para comparar los grupos analizados.

Tabla 20. Resultados de la prueba de normalidad Shapiro-Wilk para el halo de inhibición (mm)

Pruebas de normalidad			
Shapiro-Wilk			
	Estadístico	gl	Sig.
Halo de inhibición			
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.900	9	0.252

En la Tabla N° 21, se muestra el análisis de varianza (ANOVA) sobre el halo de inhibición de *Staphylococcus aureus* frente a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Tagetes minuta* “huacatay” en el jabón líquido, mostró diferencias altamente significativas en los halos de inhibición de *Staphylococcus aureus* frente a distintas concentraciones del aceite esencial de *Tagetes minuta* “huacatay” en el jabón líquido ($F = 197,595$; $p = 0,000$), evidenciando un efecto dependiente de la dosis. El diámetro promedio del halo aumentó con la concentración: 15,77 mm (0,5 %), 18,57 mm (1,0 %) y 21,47 mm (1,5 %).

La prueba de Tukey (Tabla N° 22) confirmó diferencias estadísticamente significativas entre todas las concentraciones evaluadas ($p < 0,05$), lo que indica que cada nivel de tratamiento produjo un efecto antibacteriano distinto. Este comportamiento dosis–respuesta concuerda con estudios que reportan un incremento del diámetro del halo de inhibición de *Staphylococcus aureus* al aumentar la concentración del aceite esencial de *Tagetes minuta* en ensayos de difusión en agar, evidenciando una relación directa entre la dosis aplicada y la actividad antibacteriana (109,112).

A nivel mecanístico, compuestos como monoterpenos y fenoles alteran la permeabilidad de la membrana bacteriana y los procesos metabólicos, generando mayor inhibición a concentraciones más altas (122). En conjunto, los resultados confirman que la actividad antibacteriana del jabón líquido con *Tagetes minuta* frente a *S. aureus* es directamente proporcional a la concentración del aceite esencial.

Tabla 21. Análisis de varianza (ANOVA) del halo de inhibición de *Staphylococcus aureus* frente a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Tagetes minuta* “huacatay” en el jabón líquido

Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	48,740	2	24,370	197,595	0,000
Dentro de grupos	0,740	6	0,123	—	—
Total	49,480	8	—	—	—

Tabla 22. Comparación múltiple de medias entre concentraciones mediante la prueba de Tukey

(I) Concentración n	(J) Concentración	Diferencia de medias (I-J)	Desv. error	Sig.	IC 95% Límite inferior	IC 95% Límite superior
0,5 %	1,0 %	-2,8000*	0,2867	0,000	-3,680	-1,920
0,5 %	1,5 %	-5,7000*	0,2867	0,000	-6,580	-4,820
1,0 %	1,5 %	-2,9000*	0,2867	0,000	-3,780	-2,020

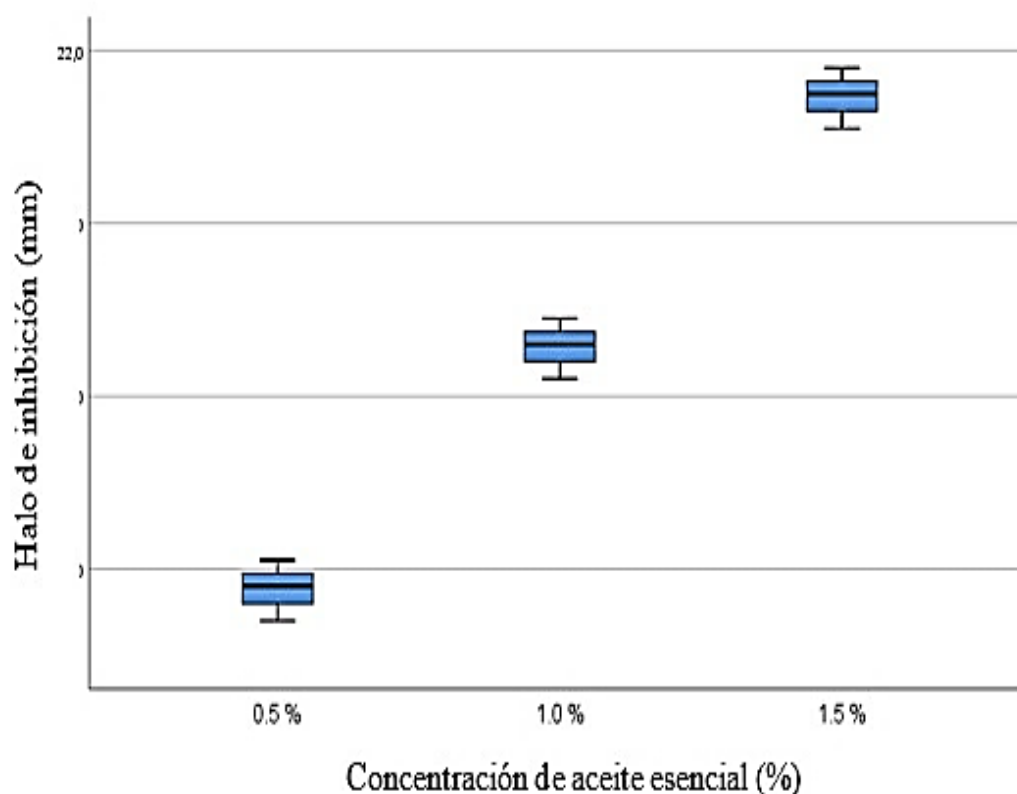


Gráfico 3. Análisis de varianza (ANOVA) del halo de inhibición de *Staphylococcus aureus* frente a diferentes concentraciones del jabón líquido con aceite esencial de *Tagetes minuta* (“huacatay”)

Con el propósito de evaluar el supuesto de normalidad, se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk a los datos analizados. El resultado obtenido se presenta en la Tabla N° 23, el cual mostró un valor de significancia $p = 0,316 (> 0,05)$, lo que indica que no se rechaza la hipótesis nula de normalidad y, por tanto, no se evidencia una desviación significativa respecto a una distribución normal. En consecuencia, resulta apropiado emplear una prueba estadística paramétrica, específicamente un análisis de varianza (ANOVA), para comparar los grupos estudiados.

Tabla 23. Evaluación del supuesto de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk para el análisis ANOVA

Pruebas de normalidad			
Shapiro-Wilk			
Halo (mm)	Estadístico	gl	Sig.
	0.942	18	0.316

El análisis de los resultados confirmó el cumplimiento del supuesto de homogeneidad de varianzas ($p > 0,99$), validando el uso de pruebas paramétricas. Se observaron diferencias altamente significativas según el tipo de bacteria: *Staphylococcus aureus* presentó mayores halos de inhibición (18,60 mm) que *Escherichia coli* (15,50 mm; $p = 0,000$), lo que indica mayor susceptibilidad de *S. aureus*. Este comportamiento concuerda con reportes donde bacterias Gram positivas suelen ser más sensibles a aceites esenciales que las Gram negativas, debido a diferencias estructurales en la pared celular (109,111).

Respecto a la concentración, se evidenció un efecto dosis–respuesta: 14,65 mm (0,5 %), 16,97 mm (1,0 %) y 19,53 mm (1,5 %), con $p = 0,000$. Este patrón coincide con estudios de difusión en agar que muestran incremento del halo al aumentar la concentración de aceites esenciales (120–122). La interacción bacteria–concentración fue significativa, indicando que el efecto del aceite esencial de *Tagetes minuta* en el jabón líquido varía según la bacteria; *S. aureus* mostró un incremento más marcado, coherente con su mayor sensibilidad. La prueba de Tukey confirmó que todas las concentraciones difieren entre sí ($p < 0,05$). En conjunto, los resultados demuestran que la actividad antibacteriana del jabón líquido con aceite esencial de *Tagetes minuta* depende tanto del tipo de bacteria como de la concentración, siendo *S. aureus* la más susceptible.

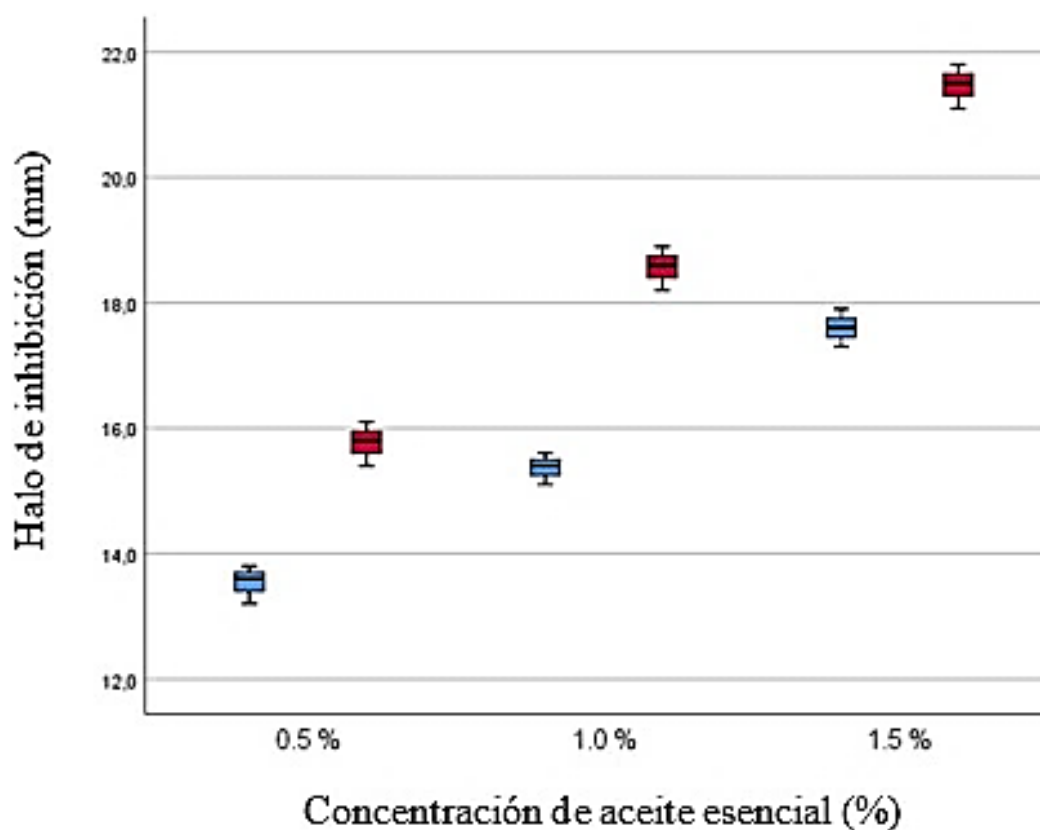


Gráfico 4 Comparación del halo de inhibición en *S. aureus* y *E. coli* según concentración del aceite esencial de *Tagetes minuta* “huacatay” en el jabón líquido

Bacteria: ■ *Staphylococcus aureus* ■ *Escherichia coli*

3.9 Evaluación de la actividad antibacteriana del jabón líquido con aceite esencial de *Tagetes minuta* en voluntarios mediante el método de enjuague

La actividad antibacteriana del jabón líquido con 1,5% de aceite esencial de *Tagetes minuta* fue evaluada en 9 voluntarios mediante el método de enjuague, comparándose con la base del jabón líquido y con un jabón antibacterial de origen comercial. Tras la aplicación de las formulaciones, se obtuvo los siguientes resultados presentados en las Tablas N° 24, 25, 26, 27, 28 y 29; en las cuales se presenta el recuento de unidades formadoras de colonias por mano (UFC/mano) obtenidas antes y posteriormente en tres ensayos realizados a tres sujetos diferentes.

Tabla 24. Resultados del recuento microbiológico antes del tratamiento del Grupo 1 (Sujetos sometidos a la aplicación de jabón líquido base) frente a *S. aureus* (n= 3)

Sujeto	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
	(UFC/mano)	(UFC/mano)	(UFC/mano)
1	$1,46 \times 10^5$	$1,49 \times 10^5$	$1,50 \times 10^5$
2	$1,50 \times 10^5$	$1,52 \times 10^5$	$1,51 \times 10^5$
3	$1,49 \times 10^5$	$1,52 \times 10^5$	$1,52 \times 10^5$

Nota: Los valores expresan el número de unidades formadoras de colonias por mano (UFC/mano) de *Staphylococcus aureus* recuperadas antes del tratamiento aplicado en el Grupo 1, determinadas mediante el método de enjuague. Cada muestra fue sembrada y analizada por triplicado, y los resultados se presentan en notación científica (UFC/mano), observándose una baja variabilidad entre los ensayos realizados.

Tabla 25. Resultados del recuento microbiológico posterior al tratamiento del Grupo 1 (Sujetos sometidos a la aplicación de jabón líquido base) frente a *S. aureus* (n= 3)

Sujeto	Ensayo		
	1	2	3
	(UFC/mano)	(UFC/mano)	(UFC/mano)
1	9.8×10^4	9.2×10^4	9.5×10^4
2	8.7×10^4	8.9×10^4	9.1×10^4
3	9.3×10^4	9.0×10^4	9.4×10^4

Nota: Los valores expresan el número de unidades formadoras de colonias por mano (UFC/mano) de *Staphylococcus aureus* recuperadas posteriormente al tratamiento aplicado en el Grupo 1, determinadas mediante el método de enjuague. Cada muestra fue sembrada y analizada por triplicado, y los resultados se presentan en notación científica (UFC/mano), observándose una baja variabilidad entre los ensayos realizados.

Tabla 26. Resultados del recuento microbiológico antes del tratamiento del Grupo 2 (Sujetos sometidos a la aplicación de jabón líquido formulado con 1,5% de aceite esencial de *Tagetes minuta*) tras la recuperación bacteriana frente a *S. aureus* (n= 3)

Sujeto	Ensayo 1 (UFC/mano)	Ensayo 2 (UFC/mano)	Ensayo 3 (UFC/mano)
4	$1,37 \times 10^5$	$1,39 \times 10^5$	$1,38 \times 10^5$
5	$1,40 \times 10^5$	$1,42 \times 10^5$	$1,41 \times 10^5$
6	$1,40 \times 10^5$	$1,42 \times 10^5$	$1,41 \times 10^5$

Nota: Los valores expresan el número de unidades formadoras de colonias por mano (UFC/mano) de *Staphylococcus aureus* recuperadas antes del tratamiento aplicado en el Grupo 2, determinadas mediante el método de enjuague. Cada muestra fue sembrada y analizada por triplicado, y los resultados se presentan en notación científica (UFC/mano), observándose una baja variabilidad entre los ensayos realizados.

Tabla 27. Resultados del recuento microbiológico posterior al tratamiento del Grupo 2 (Sujetos sometidos a la aplicación de jabón líquido formulado con 1,5% de aceite esencial de *Tagetes minuta*) tras la recuperación bacteriana frente a *S. aureus* (n= 3)

Sujeto	Ensayo		
	1 (UFC/mano)	2 (UFC/mano)	3 (UFC/mano)
4	3.4×10^2	3.6×10^2	3.5×10^2
5	3.8×10^2	3.7×10^2	3.9×10^2
6	3.2×10^2	3.4×10^2	3.3×10^2

Nota: Los valores expresan el número de unidades formadoras de colonias por mano (UFC/mano) de *Staphylococcus aureus* recuperadas posteriormente al tratamiento aplicado en el Grupo 2, determinadas mediante el método de enjuague. Cada muestra fue sembrada y analizada por triplicado, y los resultados se presentan en notación científica (UFC/mano), observándose una baja variabilidad entre los ensayos realizados.

Tabla 28. Resultados del recuento microbiológico antes del tratamiento del Grupo 3 (Sujetos sometidos a la aplicación de jabón antibacterial de origen comercial) frente a *S. aureus* (n= 3)

Sujeto	Ensayo 1 (UFC/mano)	Ensayo 2 (UFC/mano)	Ensayo 3 (UFC/mano)
7	$1,58 \times 10^5$	$1,59 \times 10^5$	$1,60 \times 10^5$
8	$1,60 \times 10^5$	$1,62 \times 10^5$	$1,61 \times 10^5$
9	$1,59 \times 10^5$	$1,61 \times 10^5$	$1,60 \times 10^5$

Nota: Los valores expresan el número de unidades formadoras de colonias por mano (UFC/mano) de *Staphylococcus aureus* recuperadas antes del tratamiento aplicado en el Grupo 3, determinadas mediante el método de enjuague. Cada muestra fue sembrada y analizada por triplicado, y los resultados se presentan en notación científica (UFC/mano), observándose una baja variabilidad entre los ensayos realizados.

Tabla 29. Resultados del recuento microbiológico posterior al tratamiento del Grupo 3 (Sujetos sometidos a la aplicación de jabón antibacterial de origen comercial) frente a *S. aureus* (n= 3)

Sujeto	Ensayo		
	1 (UFC/mano)	2 (UFC/mano)	3 (UFC/mano)
7	$2,6 \times 10^2$	$2,8 \times 10^2$	$2,7 \times 10^2$
8	$2,4 \times 10^2$	$2,5 \times 10^2$	$2,6 \times 10^2$
9	$2,9 \times 10^2$	$2,7 \times 10^2$	$2,8 \times 10^2$

Nota: Los valores expresan el número de unidades formadoras de colonias por mano (UFC/mano) de *Staphylococcus aureus* recuperadas posteriormente al tratamiento aplicado en el Grupo 3, determinadas mediante el método de enjuague. Cada muestra fue sembrada y analizada por triplicado, y los resultados se presentan en notación científica (UFC/mano), observándose una baja variabilidad entre los ensayos realizados.

En el ensayo de recuperación microbiológica en voluntarios, mediante el método de enjuague frente a *Staphylococcus aureus*, el jabón líquido con 1,5% de aceite esencial de *Tagetes minuta* mostró, como se observa en la Tabla N° 30, una reducción significativa de la carga bacteriana, superior a 2,5 log₁₀. Por su parte, la base del jabón presentó una reducción limitada (0,21 log₁₀), atribuible principalmente al efecto mecánico del lavado (123), mientras que el jabón antibacterial comercial evidenció la mayor eficacia, alcanzando una reducción de 2,77 log₁₀ y un porcentaje de eliminación de 99,83%.

Para evaluar la eficacia de las soluciones detergentes, en la misma tabla se calcularon dos indicadores: la reducción logarítmica (log₁₀) y la reducción porcentual (%). La reducción log₁₀ se obtuvo mediante la diferencia entre el logaritmo en base 10 del número inicial de bacterias (N₀) y el número final (N_f), según la expresión log₁₀ (N₀) – log₁₀ (N_f). Por otro lado, la reducción porcentual se determinó mediante la fórmula $((N_0 - N_f)/N_0) \times 100$, la cual indica el porcentaje de bacterias eliminadas respecto al total inicial. Estos indicadores permiten evidenciar la efectividad de cada solución, mostrando que aquellas con mayores valores presentan una mayor capacidad antibacteriana.

Tabla 30. Reducción de *Staphylococcus aureus* (UFC/mano) mediante el método de enjuague tras la aplicación de jabones líquidos empleados en la investigación

TIPO DE SOLUCIÓN DETERGENTE	No PROMEDIO (UFC/mano)	Nf PROMEDIO (UFC/mano)	Reducción log ₁₀	Reducción (%)
Jabón líquido base	1.5 x 10 ⁵	9.2 x 10 ⁴	0.21	38.7
Jabón líquido con aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i>	1.4 x 10 ⁵	3.5 x 10 ²	2.60	99.75
Jabón comercial	1.6 x 10 ⁵	2.7 x 10 ²	2.77	99.83

Recuento de *Staphylococcus aureus* en voluntarios mediante el método del jugo de guante

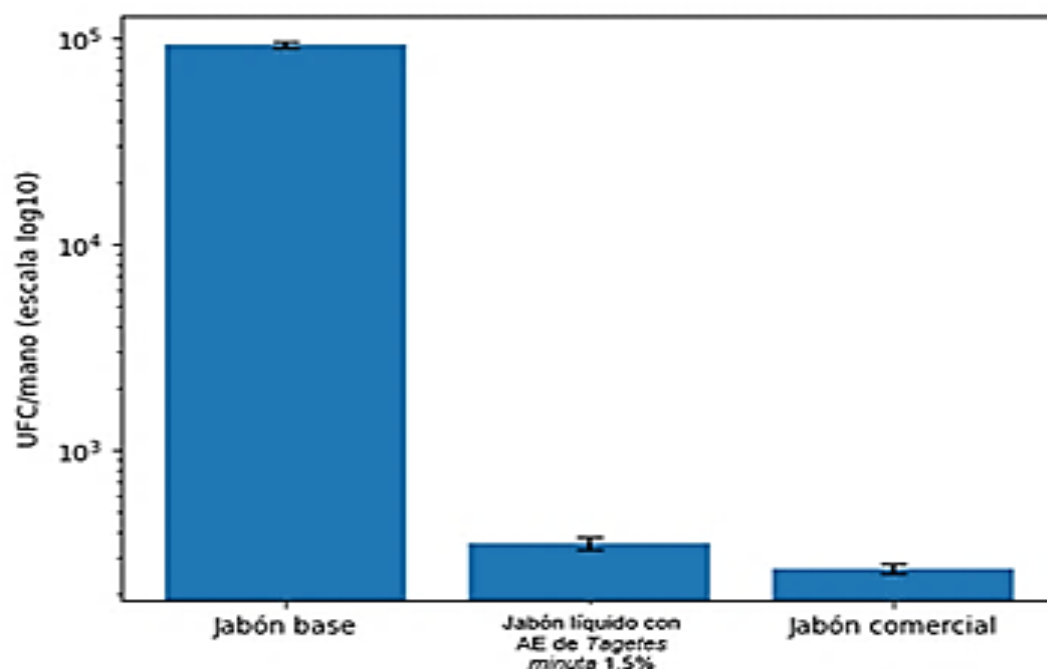


Gráfico 5. Recuento de *Staphylococcus aureus* (UFC/mano) en voluntarios tras la aplicación de jabón líquido base, jabón base con 1,5% de aceite esencial de *Tagetes minuta* y jabón antibacterial comercial, determinado mediante el método de enjuague. Los datos se expresan como media $\pm$ desviación estándar ($n = 3$) en escala logarítmica ($\log_{10}$), evidenciando una reducción significativa de la carga bacteriana en los tratamientos evaluados.

Debido a que la prueba de Shapiro-Wilk, cuyos resultados se presentan en la Tabla N° 31, arrojó un valor de significancia $p = 0,001$ ($< 0,05$), se rechaza la hipótesis nula de normalidad, evidenciándose una desviación significativa respecto a una distribución normal en los datos de $\log_{10}$ (Nf). Esta falta de normalidad, sumada al tamaño muestral reducido, justifica el empleo de la prueba no paramétrica de Kruskal–Wallis para comparar la carga microbiana final entre los tres tipos de jabón evaluados.

Tabla 31. Resultados de la prueba de normalidad Shapiro-Wilk para los datos de $\log_{10}$ (Nf)

Prueba de normalidad			
Shapiro-Wilk			
$\log_{10}(\text{Nf})$	Estadístico	gl	Sig.
	0.657	9	0.001

En cuanto a la comparación de la carga microbiana final de *Staphylococcus aureus*, expresada como $\log_{10}$ (Nf), entre los tres tipos de jabón evaluados fue realizada mediante la prueba no paramétrica de Kruskal–Wallis, debido al reducido tamaño muestral y a la naturaleza no normal de los datos. Los resultados obtenidos de la prueba se presentan en las Tablas N° 32 y 33; evidenciando diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($H = 7,200$; $gl = 2$; $p = 0,027$), lo que indica que la carga bacteriana residual tras el lavado no fue homogénea entre los grupos analizados.

Tabla 32. Estadísticos de la prueba de Kruskal–Wallis para el recuento final de *Staphylococcus aureus* según el tipo de jabón líquido

Estadísticos de prueba	
H de Kruskal-Wallis	7,200
gl	2
Sig. asintótica	,027

Tabla 33. Comparación de la carga microbiana de *Staphylococcus aureus* ($\log_{10}$ Nf) entre tres tipos de jabón mediante la prueba de Kruskal–Wallis

Sujeto	Grupo	$\log_{10}$ (Nf)
1	1	4.978
2		4.949
3		4.965
4	2	2.544
5		2.580
6		2.518
7	3	2.431
8		2.398
9		2.447

Tal como se muestra en la Tabla N° 34, el análisis de los rangos promedio evidenció que la base del jabón líquido base presentó el rango más alto ($R = 8,00$), lo que corresponde a la mayor carga microbiana residual y, por tanto, a la menor eficacia antibacteriana. En contraste, el jabón antibacterial de origen comercial mostró el rango promedio más bajo ($R = 2,00$), indicando la mayor capacidad de reducción bacteriana. Por su parte, el jabón líquido formulado con 1,5% de aceite esencial de *Tagetes minuta* presentó un rango intermedio ($R = 5,00$), lo que refleja una eficacia antibacteriana significativa, superior a la base del jabón líquido base, aunque inferior a la del jabón comercial

Tabla 34. Rangos promedio del $\log_{10}$ (Nf) según el tipo de jabón líquido frente a *Staphylococcus aureus*

	Grupo	N	Rango promedio
$\log_{10}$ (Nf)	Base del jabón líquido	3	8,00
	Jabón líquido formulado con aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i>	3	5,00
	Jabón antibacterial de origen comercial	3	2,00
	Total	9	

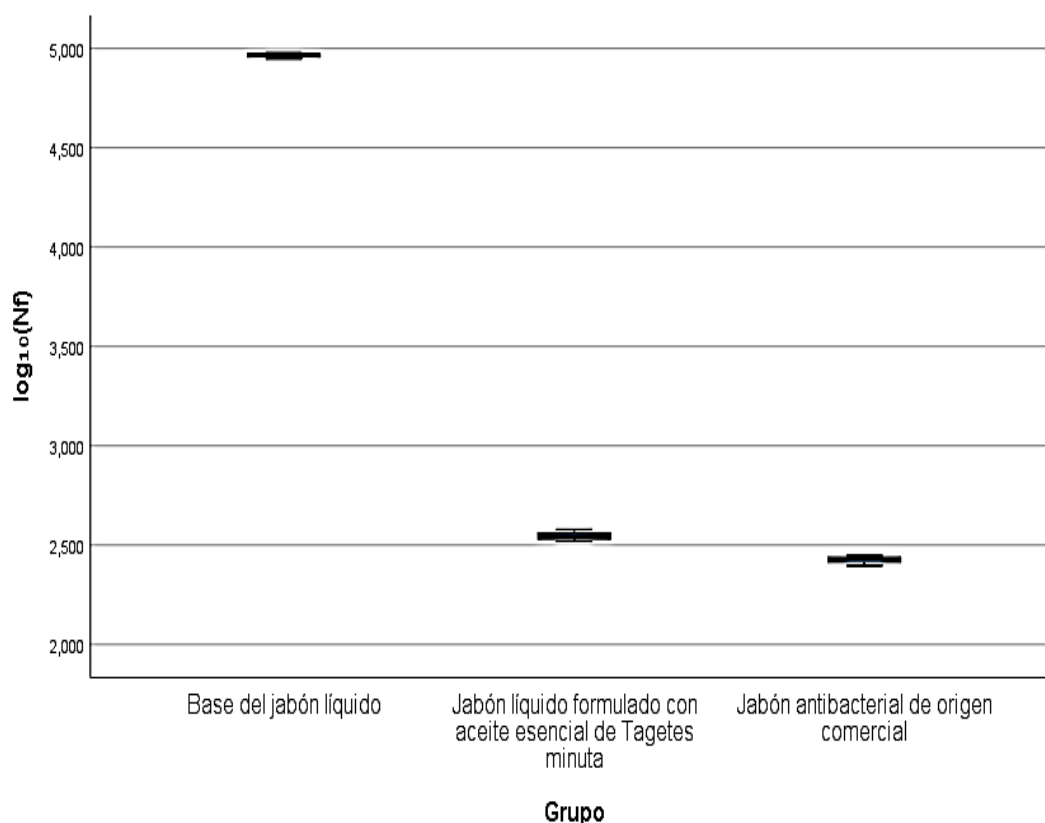


Gráfico 6. Comparación de la carga microbiana de *Staphylococcus aureus* (log₁₀ Nf) entre tres tipos de jabón mediante la prueba de Kruskal–Wallis

Según se observa en las Tablas N° 35, 36, 37, 38, 39 y 40, los resultados antes y después de la recuperación bacteriana frente a *Escherichia coli* evidencian diferencias marcadas entre los grupos evaluados. El Grupo 1 presentó los valores más elevados, con recuentos del orden de 10⁵ UFC/mano, lo que indica una mayor carga microbiana residual tras el tratamiento aplicado. En contraste, el Grupo 2 mostró una reducción considerable, con valores del orden de 10³ UFC/mano, evidenciando una disminución significativa de la población bacteriana.

Por su parte, el Grupo 3 registró los valores más bajos, del orden de 10² UFC/mano, lo que refleja la mayor eficacia en la reducción de *E. coli* entre los tratamientos evaluados. Asimismo, en los tres grupos se observa una variabilidad mínima entre los ensayos realizados por triplicado, lo que demuestra una adecuada reproducibilidad del método de enjuague y consistencia en los resultados obtenidos.

Tabla 35. Resultados del recuento microbiológico antes del tratamiento del Grupo 1 (Sujetos sometidos a la aplicación de jabón líquido base) tras la recuperación bacteriana frente a *E. coli* (n= 3)

Sujeto	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
	(UFC/mano)	(UFC/mano)	(UFC/mano)
1	$1,58 \times 10^5$	$1,61 \times 10^5$	$1,60 \times 10^5$
2	$1,62 \times 10^5$	$1,59 \times 10^5$	$1,61 \times 10^5$
3	$1,60 \times 10^5$	$1,58 \times 10^5$	$1,61 \times 10^5$

Nota: Los valores expresan el número de unidades formadoras de colonias por mano (UFC/mano) de *E. coli* recuperadas antes del tratamiento aplicado en el Grupo 1, determinadas mediante el método de enjuague. Cada muestra fue sembrada y analizada por triplicado, y los resultados se presentan en notación científica (UFC/mano), observándose una baja variabilidad entre los ensayos realizados.

Tabla 36. Resultados del recuento microbiológico posterior al tratamiento del Grupo 1 (Sujetos sometidos a la aplicación de jabón líquido base) tras la recuperación bacteriana frente a *E. coli* (n= 3)

Sujeto	Ensayo		
	1	2	3
	(UFC/mano)	(UFC/mano)	(UFC/mano)
1	1.1×10^5	1.0×10^5	1.2×10^5
2	1.0×10^5	1.1×10^5	1.2×10^5
3	1.2×10^5	1.1×10^5	1.0×10^5

Nota: Los valores expresan el número de unidades formadoras de colonias por mano (UFC/mano) de *E. coli* recuperadas posteriormente al tratamiento aplicado en el Grupo 1, determinadas mediante el método de enjuague. Cada muestra fue sembrada y analizada por triplicado, y los resultados se presentan en notación científica (UFC/mano), observándose una baja variabilidad entre los ensayos realizados.

Tabla 37. Resultados del recuento microbiológico antes del tratamiento del Grupo 2 (Sujetos sometidos a la aplicación de jabón líquido formulado con 1,5% de aceite esencial de *Tagetes minuta*) tras la recuperación bacteriana frente a *E. coli* (n= 3)

Sujeto	Ensayo 1 (UFC/mano)	Ensayo 2 (UFC/mano)	Ensayo 3 (UFC/mano)
4	$1,49 \times 10^5$	$1,51 \times 10^5$	$1,50 \times 10^5$
5	$1,52 \times 10^5$	$1,48 \times 10^5$	$1,50 \times 10^5$
6	$1,50 \times 10^5$	$1,49 \times 10^5$	$1,51 \times 10^5$

Nota: Los valores expresan el número de unidades formadoras de colonias por mano (UFC/mano) de *E. coli* recuperadas antes del tratamiento aplicado en el Grupo 2, determinadas mediante el método de enjuague. Cada muestra fue sembrada y analizada por triplicado, y los resultados se presentan en notación científica (UFC/mano), observándose una baja variabilidad entre los ensayos realizados.

Tabla 38. Resultados del recuento microbiológico posterior al tratamiento del Grupo 2 (Sujetos sometidos a la aplicación de jabón líquido formulado con 1,5% de aceite esencial de *Tagetes minuta*) tras la recuperación bacteriana frente a *E. coli* (n= 3)

Sujeto	Ensayo		
	1 (UFC/mano)	2 (UFC/mano)	3 (UFC/mano)
4	1.3×10^3	1.1×10^3	1.2×10^3
5	1.5×10^3	1.4×10^3	1.6×10^3
6	1.2×10^3	1.3×10^3	1.1×10^3

Nota: Los valores expresan el número de unidades formadoras de colonias por mano (UFC/mano) de *E. coli* recuperadas posteriormente al tratamiento aplicado en el Grupo 2, determinadas mediante el método de enjuague. Cada muestra fue sembrada y analizada por triplicado, y los resultados se presentan en notación científica (UFC/mano), observándose una

baja variabilidad entre los ensayos realizados.

Tabla 39. Resultados del recuento microbiológico antes del tratamiento del Grupo 3 (Sujetos sometidos a la aplicación de jabón antibacterial de origen comercial) tras la recuperación bacteriana frente a *E. coli* (n= 3)

Sujeto	Ensayo 1 (UFC/mano)	Ensayo 2 (UFC/mano)	Ensayo 3 (UFC/mano)
7	$1,69 \times 10^5$	$1,71 \times 10^5$	$1,70 \times 10^5$
8	$1,72 \times 10^5$	$1,68 \times 10^5$	$1,70 \times 10^5$
9	$1,70 \times 10^5$	$1,71 \times 10^5$	$1,69 \times 10^5$

Nota: Los valores expresan el número de unidades formadoras de colonias por mano (UFC/mano) de *E. coli* recuperadas antes del tratamiento aplicado en el Grupo 3, determinadas mediante el método de enjuague. Cada muestra fue sembrada y analizada por triplicado, y los resultados se presentan en notación científica (UFC/mano), observándose una baja variabilidad entre los ensayos realizados.

Tabla 40. Resultados del recuento microbiológico posterior al tratamiento del Grupo 3 (Sujetos sometidos a la aplicación de jabón antibacterial de origen comercial) tras la recuperación bacteriana frente a *E. coli* (n= 3)

Sujeto	Ensayo		
	1 (UFC/mano)	2 (UFC/mano)	3 (UFC/mano)
7	8.0×10^2	7.5×10^2	8.2×10^2
8	7.8×10^2	8.1×10^2	7.6×10^2
9	8.4×10^2	8.0×10^2	7.9×10^2

Nota: Los valores expresan el número de unidades formadoras de colonias por mano (UFC/mano) de *E. coli* recuperadas posteriormente al tratamiento aplicado en el Grupo 3, determinadas mediante el método de enjuague. Cada muestra fue sembrada y analizada por triplicado, y los resultados se presentan en notación científica (UFC/mano), observándose una

baja variabilidad entre los ensayos realizados.

En el ensayo de recuperación microbiológica en voluntarios mediante el método de enjuague frente a *Escherichia coli*, los resultados presentados en la Tabla N° 41 muestran que el jabón líquido con aceite esencial de *Tagetes minuta* evidenció una reducción significativa de la carga bacteriana, superior a 2 log₁₀ (2,06 log₁₀). Por su parte, la base del jabón mostró una disminución limitada (0,16 log₁₀), atribuible principalmente al efecto mecánico del lavado (123), mientras que el jabón antibacteriano comercial presentó la mayor eficacia antibacteriana, alcanzando una reducción de 2,33 log₁₀ y un porcentaje de eliminación de 99,53%.

Para evaluar la eficacia de las soluciones detergentes, en la misma tabla se calcularon dos indicadores: la reducción logarítmica (log₁₀) y la reducción porcentual (%). La reducción log₁₀ se obtuvo mediante la diferencia entre el logaritmo en base 10 del número inicial de bacterias (N₀) y el número final (N_f), según la expresión log₁₀ (N₀) – log₁₀ (N_f). Por otro lado, la reducción porcentual se determinó mediante la fórmula $((N_0 - N_f)/N_0) \times 100$, la cual indica el porcentaje de bacterias eliminadas respecto al total inicial. Estos indicadores permiten evidenciar la efectividad de cada solución, mostrando que aquellas con mayores valores presentan una mayor capacidad antibacteriana.

Tabla 41. Reducción de *Escherichia coli* (UFC/mano) mediante el método de enjuague tras la aplicación de jabones líquidos empleados en la investigación

TIPO DE SOLUCIÓN DETERGENTE	No PROMEDIO (UFC/mano)	Nf PROMEDIO (UFC/mano)	Reducción log ₁₀	Reducción (%)
Jabón líquido base	1.6 x 10 ⁵	1.1 x 10 ⁵	0.16	31.3
Jabón líquido con aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i>	1.5 x 10 ⁵	1.3 x 10 ³	2.06	99.13
Jabón comercial	1.7 x 10 ⁵	8.0 x 10 ²	2.33	99.53

Recuento de *Escherichia coli* en voluntarios mediante el método del jugo de guante

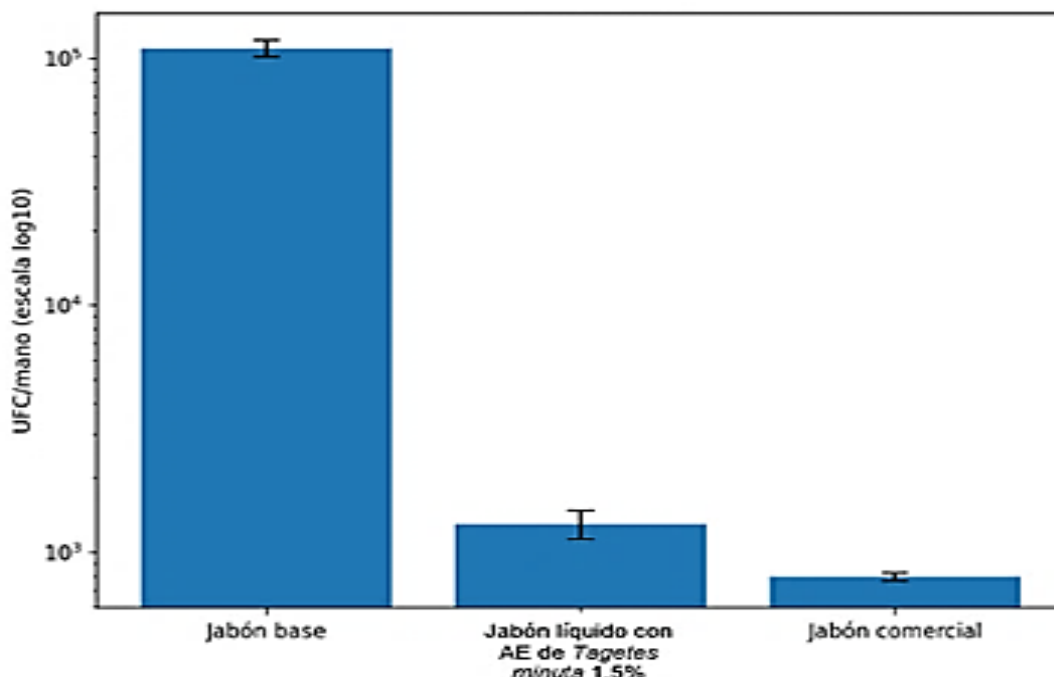


Gráfico 7. Recuento de *Escherichia coli* (UFC/mano) en voluntarios tras la aplicación de jabón líquido base, jabón base con 1,5% de aceite esencial de *Tagetes minuta* y jabón antibacterial comercial, determinado mediante el método de enjuague. Los datos se expresan como media $\pm$ desviación estándar ($n = 3$) en escala logarítmica ($\log_{10}$), evidenciando diferencias en la carga bacteriana residual entre los tratamientos evaluados. Debido a que la prueba de Shapiro-Wilk, cuyos resultados se presentan en la Tabla N° 42, arrojó un valor de significancia $p = 0,001$ ($< 0,05$), se rechaza la hipótesis nula de normalidad, evidenciándose una desviación significativa respecto a una distribución normal en los datos de $\log_{10}$ (Nf). En consecuencia, no resulta apropiado aplicar pruebas estadísticas paramétricas; por ello, se justifica el empleo de la prueba no paramétrica de Kruskal–Wallis para comparar la carga microbiana entre los grupos evaluados.

Tabla 42. Resultados de la prueba de normalidad Shapiro-Wilk para los datos de $\log_{10}$ (Nf)

Pruebas de normalidad			
Shapiro-Wilk			
	Estadístico	gl	Sig.
$\log_{10}(\text{Nf})$	0.684	9	0.001

En cuanto a la comparación de la carga microbiana final de *Escherichia coli*, expresada como $\log_{10}$ (Nf), entre los tres tipos de jabón evaluados, esta fue realizada mediante la prueba no paramétrica de Kruskal–Wallis, debido al reducido tamaño muestral y a la naturaleza no normal de los datos. Los resultados de la prueba, presentados en las Tablas N° 43 y 44, evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($H = 7,513$; $gl = 2$; $p = 0,023$), lo que indica que el tipo de jabón influyó de manera significativa en la carga bacteriana residual de *E. coli* tras el lavado.

Tabla 43. Estadísticos de la prueba de Kruskal–Wallis para el recuento final de *Escherichia coli* según el tipo de jabón líquido

Estadísticos de prueba	
H de Kruskal-Wallis	7.513
gl	2
Sig. asintótica	0.023

Tabla 44. Comparación de la carga microbiana de *Escherichia coli* ($\log_{10}$ Nf) entre tres tipos de jabón mediante la prueba de Kruskal–Wallis

Sujeto	Grupo	$\log_{10}(\text{Nf})$
1	1	5.040
2		5.040
3		5.040
4	2	3.078
5		3.175
6		3.078
7	3	2.897
8		2.894
9		2.908

Según se muestra en la Tabla N° 45, el análisis de los rangos promedio mostró que la base del jabón líquido presentó el rango más elevado ($R = 8,00$), correspondiente a la mayor carga microbiana residual y, por ende, a la menor eficacia antibacteriana. En contraste, el jabón antibacterial de origen comercial obtuvo el rango promedio más bajo ($R = 2,00$), evidenciando la mayor capacidad de reducción bacteriana. Por su parte, el jabón líquido formulado con aceite esencial de *Tagetes minuta* mostró un rango intermedio ($R = 5,00$), lo que refleja una eficacia antibacteriana significativa, superior a la base del jabón líquido, aunque inferior a la del jabón comercial.

Tabla 45. Rangos promedio del $\log_{10}$ (Nf) según el tipo de jabón líquido frente a *Escherichia coli*.

	Grupo	N	Rango promedio
$\log_{10}(\text{Nf})$	Base del jabón líquido	3	8.00
	Jabón líquido formulado con aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i>	3	5.00
	Jabón antibacterial de origen comercial	3	2.00
	Total	9	

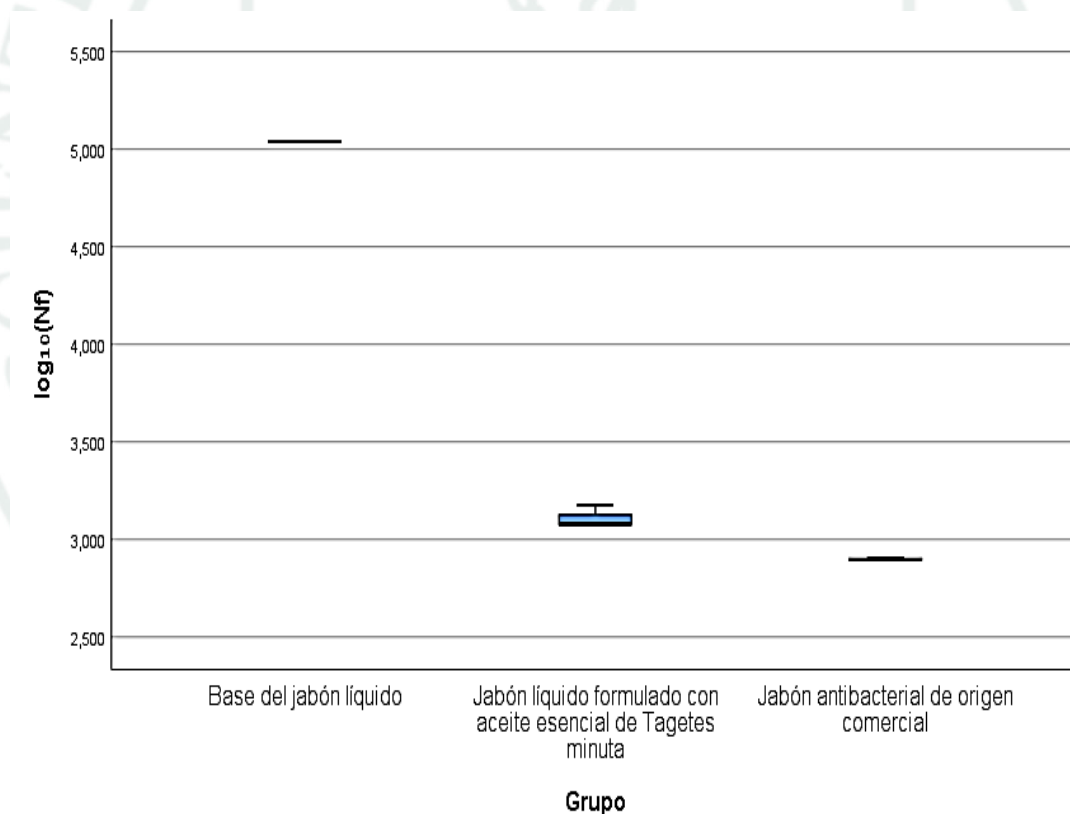


Gráfico 8. Comparación de la carga microbiana de *Escherichia coli* ($\log_{10}$ Nf) entre tres tipos de jabón mediante la prueba de Kruskal–Wallis



Figura 19.
Asepsia de manos



Figura 18.
Contaminación
palmar



Figura 21. Masaje
de las manos



Figura 20.
Recuperación
bacteriana

Los resultados obtenidos en la presente investigación evidencian que el aceite esencial de *Tagetes minuta* (huacatay), extraído mediante destilación por arrastre de vapor de agua, conserva compuestos volátiles con actividad antibacteriana, lo cual se reflejó tanto en los ensayos in vitro como en las pruebas de recuperación microbiológica en voluntarios. La eficacia observada puede atribuirse a la presencia de metabolitos bioactivos característicos del aceite esencial de esta especie, como monoterpenos y cetonas terpénicas, previamente reportados por otros autores como responsables de la inhibición del crecimiento bacteriano (90,104,106).

La actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* demostró que el aceite esencial de *Tagetes minuta* es capaz de actuar tanto sobre bacterias Gram positivas como Gram negativas, aunque con variaciones en la magnitud del efecto inhibitorio. Este comportamiento es consistente con estudios previos que indican que las bacterias Gram negativas suelen presentar mayor resistencia debido a la complejidad de su membrana externa, rica en lipopolisacáridos, lo que limita la penetración de

compuestos hidrofóbicos presentes en los aceites esenciales (81,82,90).

Asimismo, se observó que la eficacia antibacteriana del jabón líquido formulado aumentó conforme se incrementó la concentración del aceite esencial incorporado, lo que sugiere una relación dosis-respuesta. Este hallazgo concuerda con investigaciones previas en las que concentraciones más elevadas de aceites esenciales generan una mayor alteración de la membrana celular bacteriana, provocando pérdida de integridad, fuga de componentes intracelulares y, finalmente, inhibición del crecimiento microbiano (90).

La incorporación del aceite esencial de *Tagetes minuta* en una matriz detergente permitió evaluar su desempeño en una formulación de uso real, superando las limitaciones de estudios que analizan únicamente el aceite en estado puro. En este sentido, los resultados obtenidos en las pruebas de recuperación microbiológica mediante el método de enjuague evidenciaron una reducción significativa de la carga bacteriana en las manos de los voluntarios, lo que confirma que el aceite mantiene su actividad antibacteriana aun en presencia de tensioactivos y bajo condiciones de uso tópico.

Finalmente, la ausencia de efectos adversos y la adecuada tolerancia cutánea observada en los voluntarios respaldan la seguridad del jabón líquido formulado, lo cual resulta fundamental para su potencial aplicación en higiene personal. En conjunto, estos hallazgos confirman que el aceite esencial de *Tagetes minuta* no solo presenta actividad antibacteriana comprobable en condiciones de laboratorio, sino que también es eficaz y seguro cuando se incorpora en una formulación detergente destinada al uso cotidiano.

CONCLUSIONES

PRIMERA

Se logró obtener el aceite esencial de *Tagetes minuta* mediante el método de destilación por arrastre de vapor de agua, obteniéndose 12 mL de aceite esencial, con un rendimiento de extracción de 0,16 %. El producto presentó características fisicoquímicas y organolépticas compatibles con las reportadas para aceites esenciales de esta especie vegetal. Asimismo, el análisis cromatográfico evidenció la presencia de compuestos terpénicos relacionados con actividad antibacteriana, destacando como componentes mayoritarios la 7-octen-4-ona, 2,6-dimetil (34,21 %) y el trans- β -ocimeno (29,79 %), además de otros compuestos como D-limoneno, linalool y terpinen-4-ol, los cuales han sido asociados con actividad antimicrobiana.

SEGUNDA

Se formuló un jabón líquido incorporando aceite esencial de *Tagetes minuta* en diferentes concentraciones (0,5 %, 1,0 % y 1,5 %), obteniéndose formulaciones homogéneas, con adecuada apariencia física y condiciones compatibles para su aplicación tópica. La formulación seleccionada correspondió a la concentración de 1,5 % de aceite esencial, la cual presentó características organolépticas adecuadas y cumplió con los parámetros de control de calidad evaluados, registrando un pH de 8,59, una densidad de 0,982 g/mL, un contenido de humedad y sustancias volátiles de 87 % y un contenido de sólidos totales de 13 %, valores compatibles con un jabón líquido de uso tópico.

TERCERA

El jabón líquido formulado presentó actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922 mediante ensayos in vitro empleando el método de difusión en agar tipo Kirby–Bauer modificado por hoyo en placa, evidenciándose halos de inhibición y diferencias en la eficacia según la concentración de aceite esencial incorporada. La formulación con 1,5 % de aceite esencial mostró la mayor actividad antibacteriana, con halos de inhibición de 21,47 mm frente a *S. aureus* y 18,50 mm frente a *E. coli*, seguida por las concentraciones de 1,0 % y 0,5 %, lo que evidencia una relación directa entre el incremento de la concentración del aceite esencial y la actividad antibacteriana del jabón.

CUARTA

La evaluación microbiológica mediante el método de enjuague de guante permitió evidenciar una reducción de la carga bacteriana en las manos de los voluntarios tras la aplicación del jabón líquido formulado, demostrando eficacia antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

QUINTA

El análisis estadístico realizado permitió establecer diferencias significativas entre las formulaciones evaluadas, observándose que las mayores concentraciones de aceite esencial presentaron mejor actividad antibacteriana frente a las bacterias estudiadas. Los resultados evidenciaron que la formulación con 1,5 % de aceite esencial obtuvo los mayores halos de inhibición y el mayor porcentaje de reducción bacteriana. Asimismo, las pruebas estadísticas aplicadas confirmaron diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$), respaldando que el incremento de la concentración del aceite esencial de *Tagetes minuta* mejora la eficacia antibacteriana del jabón líquido frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda a los investigadores y estudiantes de ciencias farmacéuticas y afines continuar evaluando el aceite esencial de *Tagetes minuta* en diferentes formulaciones cosméticas o sanitarias, con el fin de ampliar su aplicación como agente antimicrobiano natural.
- Se sugiere evaluar concentraciones mayores o menores de aceite esencial de huacatay, así como combinaciones con otros aceites esenciales, para optimizar la actividad antimicrobiana y las propiedades sensoriales del jabón.
- Para futuros estudios, se recomienda probar la actividad antibacteriana y antifúngica del jabón frente a más cepas patógenas, incluyendo bacterias resistentes, para determinar un perfil antimicrobiano más completo.
- Sería recomendable investigar la estabilidad del jabón y del aceite esencial durante periodos prolongados, incluyendo cambios de color, olor y viscosidad, para garantizar su calidad durante toda su vida útil.
- Se sugiere realizar estudios más extensos sobre irritación cutánea, alergias y percepción sensorial en distintos grupos de usuarios, para confirmar la seguridad y aceptación del producto.
- Para futuras investigaciones, se puede explorar la producción a escala industrial del jabón y analizar su impacto ambiental, considerando que los aceites esenciales naturales pueden ser una alternativa sostenible frente a productos químicos.

ANEXOS

Anexo 1. Constancia de determinación taxonómica del material vegetal (*Tagetes minuta* L.) emitida por el Herbarium Arequipense (HUSA).

Anexo 2. Informe de análisis GC-MS del aceite esencial de *Tagetes minuta*

Anexo 3. Rendimiento porcentual del aceite esencial de *Tagetes minuta* obtenido por destilación por arrastre de vapor

Anexo 4. Desarrollo de los cálculos de control de calidad del jabón líquido con 1,5% de aceite esencial de *Tagetes minuta*

Anexo 5 Descripción y preparación de los medios de cultivo utilizados

Anexo 6. Certificado de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Anexo 7. Certificado de *Escherichia coli*. ATCC: 25922.

Anexo 8. Dictamen del Comité de Ética en Investigación de la Universidad Católica de Santa María.

Anexo 1. Constancia de determinación taxonómica del material vegetal (*Tagetes minuta* L.) emitida por el Herbarium Arequipense (HUSA).



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



CONSTANCIA N° 009-2025-HUSA

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

HACE CONSTAR:

Que la muestra biológica presentada por Stephany Dayane, Calderón Flores y Diana Karoline, Rivera Jahuir, procedentes de la Universidad Católica de Santa María, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, para la realización de su tesis **Formulación y evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de una solución detergente (jabón líquido) con aceite esencial de “*Tagetes minuta*” (huacatay)**. La muestra fue traída al Laboratorio de Botánica al estado fenológico fresco, para su determinación en el Herbarium Arequipense (HUSA) y corresponde a la siguiente especie.

División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Subfamilia	Asteroideae
Tribu	Tageteae
Genero	Tagetes
Especie	Tagetes minuta L.

Se le expide la presente a solicitud del interesado

Mg. Leoncio Mariño Herrera
DIRECTOR
Herbarium Arequipense (HUSA)

Arequipa, 23 de Mayo del 2025

Anexo 2. Informe de análisis GC-MS del aceite esencial de Tagetes minuta



SISTEMA DE SERVICIOS Y ANÁLISIS QUÍMICOS S.A.C.

INFORME DE ENSAYO

IE-2025-3659

1. DATOS DEL CLIENTE

- 1.1 Cliente : STEPHANY DAYANE CALDERON FLORES
1.2 RUC o DNI : 71551017
1.3 Dirección : CALLE CARAVLI 304 SOCABAYA

2. DATOS DE LA MUESTRA

- 2.1 Producto : ACEITE ESENCIAL
2.2 Muestreado por : CLIENTE ⁽¹⁾
2.3 Número de Muestras : 01
2.4 Fecha de Recepción : 2025-09-09
2.5 Periodo de Ensayo : 2025-09-09 al 2025-09-25
2.6 Fecha de Emisión : 2025-09-26
2.7 Fecha y Hora de Muestreo : No Precisa
2.8 N° de cotización : COT-153060-SL25

3. ENSAYO SOLICITADO - METODOLOGÍA UTILIZADA

ENSAYO	MÉTODO
Identificación de componentes GC-MS (Barrido cromatográfico)	Cromatografía de Gases acoplado a espectrómetro de Masas (GC-MS)

4. RESULTADOS

4.1. DESCRIPCIÓN DE MUESTRA: Aceite esencial de "Tagetes minuta" (huacatay) ⁽¹⁾

Información Adicional de la Muestra: Aceite esencial de Tagetes minuta (huacatay), extraído mediante destilación por arrastre de vapor en el laboratorio de la Universidad Católica Santa María de Arequipa. La materia prima fue recolectada en la provincia de Arequipa (la "joya Arequipa"). El aceite se presenta en un frasco ámbar hermético para preservación. La muestra servirá como parte del proyecto de tesis: "Formulación y evaluación de la actividad antibacteriana in vitro e in vivo de una solución detergente (jabón líquido) con aceite esencial de Tagetes minuta (huacatay)", cuyos autores son Calderón Flores, Stephany Dayane y Rivera Jahuir, Diana Karoline. ⁽²⁾


DIEGO ROMÁN PELAGARI D'AFRIGO
QUÍMICO
CQP, 1337

4.2. RESULTADOS OBTENIDOS DE ANÁLISIS CUALITATIVO Y SEMICUALITATIVO DE LOS COMPONENTES DE LA MUESTRA ^(1,2)

Tabla N°1: RESULTADOS OBTENIDOS QUE PRESENTAN MAYOR ÁREA RELATIVA

Código de Muestra	Componente identificado	Unidad	Resultados
S-4890	7-Octen-4-one, 2,6-dimethyl	%	34.21
	Trans-beta-Ocimene	%	29.79
	D-Limonos	%	5.14
	5,7-Octadien-4-one, 2,6-dimethyl-, (Z)	%	4.59
	2,4,6-Octatriene, 2,6-dimethyl-, (E,Z)	%	2.37

⁽¹⁾ La identificación (análisis cualitativo) de los compuestos es el resultado probabilístico obtenido por el software del equipo GCMS solution de SHIMADZU utilizando la librería NIST 2014. La probabilidad se mide por el SI (Similarity index) que se encuentra en cada espectro de masa (en el texto superior a la gráfica). Normalmente se usa el rango de SI de 85 a 100.

⁽²⁾ El análisis semicuantitativo se basa en la siguiente fórmula: área relativa del compuesto (%) = $(AP_i / TAP) \times 100$, donde APi: Área de pico individual, TAP: Área de picos totales.

INFORME DE ENSAYO IE-2025-3659

4.3. RESULTADOS OBTENIDOS DE DATOS CROMATOGRÁFICOS DE LOS COMPONENTES DE LA MUESTRA

Tabla N°2: RESULTADOS OBTENIDOS

Código de Muestra	Componente identificado	Área	Tiempo	Unidad	Resultados
S-4890	Butanoic acid, 2-methyl-, ethyl ester	7204936	4.060	%	0.72
	1-Butanol, 2-methyl-, acetate	1105128	4.988	%	0.11
	3-Decyne	1637131	6.936	%	0.16
	.alpha.-Pinene	913545	7.230	%	0.09
	Bicyclo[3.1.0]hexane, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-	3222376	9.770	%	0.32
	Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene-, (1S)-	779507	9.910	%	0.08
	o-Cymene	1077388	13.517	%	0.11
	D-Limonene	51451103	13.813	%	5.14
	Trans- beta -Ocimene	297947049	14.929	%	29.79
	.beta.-Ocimene	3130211	15.396	%	0.31
	7-Octen-4-one, 2,6-dimethyl-	342119897	15.938	%	34.21
	2-Pentene, 3-methyl-	1312895	17.068	%	0.13
	Carvenone	2629975	17.911	%	0.26
	Linalool	1835044	18.622	%	0.18
	1,5-Heptadien-4-one, 3,3,6-trimethyl-	1241225	19.505	%	0.12
	2,4,6-Octatriene, 2,6-dimethyl-, (E,Z)-	23745771	20.278	%	2.37
	4,5-Heptadien-2-one, 3,3,6-trimethyl-	2391335	20.560	%	0.24
	5,7-Octadien-4-one, 2,6-dimethyl-, (E)-	9304404	21.201	%	0.93
	Cyclohexanone, 5-methyl-2-(1-methylethyl)-, cis-	7946019	21.440	%	0.79
	5,7-Octadien-4-one, 2,6-dimethyl-, (Z)-	45891231	21.709	%	4.59
	Cyclohexanemethanol, 4-(1-methylethyl)-, cis-	700124	22.135	%	0.07
	Cyclohexanol, 5-methyl-2-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,2.beta.,5.alpha.)-(+/-)-	9012083	22.570	%	0.90
	Terpinen-4-ol	883385	22.736	%	0.09
	(Z)-2,6-Dimethylocta-2,5,7-trien-4-one	1740386	25.701	%	0.17

Tabla N°3: RESULTADOS OBTENIDOS(CONTINUACIÓN)

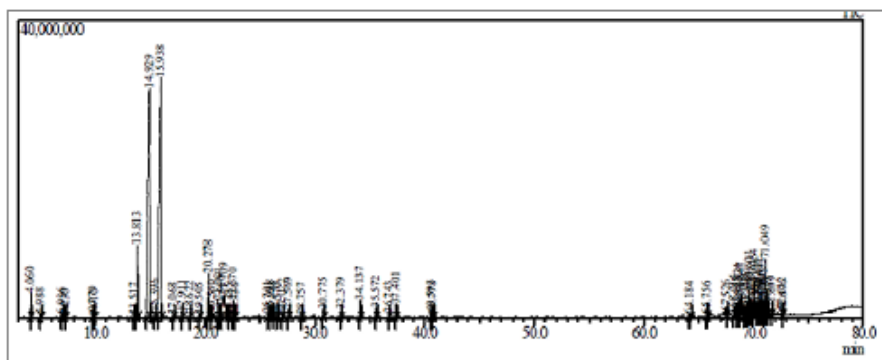
Código de Muestra	Componente identificado	Área	Tiempo	Unidad	Resultados
S-4890	Cyclohexane, 2-chloro-4-methyl-1-(1-methylethyl)-, [1S-(1.alpha.,2.beta.,4.beta.)]-	2271511	25.938	%	0.23
	1,7-Octadiene-3,6-diol, 2,6-dimethyl-	1707960	26.188	%	0.17
	Bicyclo[3.1.1]heptan-3-ol, 2,6,6-trimethyl-, (1.alpha.,2.beta.,3.alpha.,5.alpha.)-	798630	26.570	%	0.08
	Linalyl acetate	2692565	27.022	%	0.27
	2-Cyclohexen-1-one, 3-methyl-6-(1-methylethenyl)-, (S)-	4410609	27.569	%	0.44
	Cyclohexanol, 5-methyl-2-(1-methylethenyl)-, acetate	775490	28.757	%	0.08
	2-Cyclohexen-1-one, 3-methyl-6-(1-methylethylidene)-	3868946	30.775	%	0.39
	Modoprene	3967329	32.379	%	0.40
	Caryophyllene	9355547	34.137	%	0.94
	Humulene	4693045	35.572	%	0.47
	Germacrene D	2094502	36.743	%	0.21
	(1S,2E,6E,10R)-3,7,11,11-Tetramethylbicyclo[8.1.0]undeca-2,6-diene	7187504	37.401	%	0.72
	1H-Cycloprop[e]azulen-7-ol, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene-, [1ar-(1a.alpha.,4a)]	2337396	40.593	%	0.23
	Caryophyllene oxide	1822943	40.778	%	0.18
	Tumerone	2509006	64.184	%	0.25
	Chrysantenyl 2-methylbutanoate	1407811	65.756	%	0.14
	Gibberellic acid	2606924	67.526	%	0.26
	(E)-gamma-Atlantone	3479647	68.214	%	0.35
	Benzene, (2,2-dimethyl-1-methylenepropyl)-	1943076	68.455	%	0.19
	1,3,5-Cycloheptatriene, 2,5-bis(tetrahydropyranyloxymethyl)-7,7-dimethyl-	8674324	68.624	%	0.87
	Chrysantenyl 2-methylbutanoate	10275351	68.867	%	1.03
	(E)-gamma-Atlantone	6351202	69.203	%	0.64
	Pentadiolic acid, (p-t-butylphenyl) ester	2124451	69.343	%	0.21

INFORME DE ENSAYO IE-2025-3659

Tabla N°4: RESULTADOS OBTENIDOS(CONTINUACIÓN)

Código de Muestra	Componente identificado	Área	Tiempo	Unidad	Resultados
S-4890	Cyclopropanecarboxylic acid, 2-methyl-, 2,6-di-t-butyl-4-methylphenyl ester	16549517	69.601	%	1.65
	(Z)-2-Methyl-6-(4-methyl-5-(3-methylbut-2-enyl)cyclohex-3-en-1-yl) hepta-2,5-dien-4-	8096530	69.715	%	0.81
	Isolongifolene, 9,10-dehydro-	1515024	69.945	%	0.15
	Cyclopropanecarboxylic acid, 2-methyl-, 2,6-di-t-butyl-4-methylphenyl ester	11781779	70.054	%	1.18
	Cholesta-8,24-dien-3-ol, 4-methyl-, (3 beta., 4.alpha.)-	1138582	70.315	%	0.11
	1,3-Benzenediol, o-chloroacetyl-o'-cyclohexanecarbonyl-	2440013	70.407	%	0.24
	2,2,6-Trimethyl-6-(4-methylcyclohex-3-en-1-yl)dihydro-2H-pyran-4(3H)-one	9530998	70.477	%	0.95
	3,5-Decadien-7-yne, 6-t-butyl-2,2,9,9-tetramethyl	1708436	70.567	%	0.17
	3-Methyl-2-butenic acid, cyclobutyl ester	8260189	70.693	%	0.83
	2-Naphthalenepropanoic acid, .beta.-ethyl-3-methoxy-.alpha.,.alpha.-dimethyl-,methyl	663177	70.826	%	0.07
	1,2,5,5,8a-Pentamethyl-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydronaphthalen-1-ol	4539414	70.895	%	0.45
	Cyclopropanecarboxylic acid,2-methyl-, 2,6-di-t-butyl-4-methylphenyl ester	18151601	71.049	%	1.82
	(3As,4r,7r)-1,4,9,9-Tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-4H-3a,7-methanoazulene	2808605	71.151	%	0.28
	4,4-Dimethyl-3-(3-methylbut-3-enylidene)-2-methylebicyclo[4.1.0]heptane	2036946	71.316	%	0.20
	Anthracene, 1,2,3,4,5,6,7,8-octahydro-	1640008	71.699	%	0.16
	2-Butenoic acid, 2-methyl-, dodecahydro-8-hydroxy-8a-methyl-3,5-bis(methylene)-2-oxo	1516284	72.612	%	0.15
	Isolongifolene, 9,10-dehydro-	1083035	72.676	%	0.11

INFORME DE ENSAYO IE-2025-3659



INFORME DE ENSAYO IE-2025-3659

Leyenda

^(C) Información suministrada por el cliente.

- Sin la aprobación del laboratorio Sistema de Servicios y Análisis Químicos S.A.C. no se debe reproducir el informe de ensayo parcial, excepto cuando se reproduce en su totalidad.
- Los resultados de los ensayos se aplican a la muestra cómo se recibió y no se deben usar como una declaración de conformidad con una especificación o normas de productos de la entidad que lo produce.
- El laboratorio no es responsable de la información que ha sido identificada como suministrada por el cliente.
- Los resultados se relacionan solamente con los ítems sometidos a ensayo.
- Este laboratorio está acreditado de acuerdo con la norma internacional reconocida ISO / IEC 17025. Esta acreditación demuestra la competencia técnica para un alcance definido y el funcionamiento de un sistema de gestión de calidad de laboratorio.



Anexo 3. Cálculo del rendimiento del aceite esencial de *Tagetes minuta*

En el presente anexo se detalla el procedimiento de cálculo del rendimiento del aceite esencial de *Tagetes minuta* obtenido mediante destilación por arrastre de vapor, a partir de la biomasa vegetal procesada.

Datos del proceso de obtención

Se procesó un total de 7.5 kg (7500 g) de biomasa vegetal fresca constituida por hojas, flores y tallos de *Tagetes minuta*, previamente sometida a secado a temperatura ambiente. Al finalizar el proceso de destilación se recolectó un volumen total de 12 mL de aceite esencial.

Fórmula empleada

Rendimiento (% v/w) = (Volumen de aceite esencial obtenido (mL) / Masa del material botánico (g)) × 100

Desarrollo del cálculo

$$\text{Rendimiento (\%v/w)} = \frac{\text{Volumen de aceite (mL)}}{\text{Masa del material botánico (g)}} * 100$$

$$\text{Rendimiento (\%v/w)} = \frac{12 \text{ (mL)}}{7500 \text{ (g)}} * 100$$

$$\text{Rendimiento (\%v/w)} = 0.16\%$$

Anexo 4. Desarrollo de los cálculos de control de calidad del jabón líquido con 1,5% de aceite esencial de *Tagetes minuta*

Porcentaje de humedad y sustancias volátiles del jabón líquido base

$$P_o = 51.88 \text{ g}$$

$$P_1 = 52.88 \text{ g}$$

$$P_2 = 52.0196 \text{ g}$$

7

$$\% \text{ Humedad y sustancias volatiles} = \frac{(52.88 - 52.0196)}{(52.88 - 51.88)} \times 100$$

$$\% \text{ Humedad y sustancias volatiles} = \frac{0.8604}{1} \times 100 = 86.04\%$$

Determinación de sólidos totales del jabón líquido base

$$\% \text{ Solidos totales} = 100 - 86.04 \%$$

$$\% \text{ Solidos totales} = 13.96 \%$$

Determinación de densidad del jabón líquido base

$$P_o = 13.59 \text{ g}$$

$$P_1 = 23.78 \text{ g}$$

$$P_2 = 23.63 \text{ g}$$

Pagua = densidad del agua a la temperatura de trabajo (0.997 g/mL a 25 °C)

$$P_{\text{muestra}} = \frac{(23.63 - 13.59)}{(23.78 - 13.59)} \times P_{\text{agua}}$$

$$P_{\text{muestra}} = \frac{(10.04)}{(10.19)} \times P_{\text{agua}}$$

$$P_{\text{muestra}} = 0.9852 \times 0.997$$

$$P_{\text{muestra}} = 0.982$$

Porcentaje de humedad y sustancias volátiles del jabón líquido con 1,5% de aceite esencial de *Tagetes minuta*

$$P_o = 51.88 \text{ g}$$

$$P1 = 52,88 \text{ g}$$

$$P2 = 52,01 \text{ g}$$

7

$$\% \text{ Humedad y sustancias volatiles} = \frac{(52,88 - 52,01)}{(52,88 - 51,88)} \times 100$$

$$\% \text{ Humedad y sustancias volatiles} = \frac{0,87}{1} \times 100 = 87\%$$

Determinación de sólidos totales del jabón líquido con 1,5% de aceite esencial de *Tagetes minuta*

$$\% \text{ Solidos totales} = 100 - 87 \%$$

$$\% \text{ Solidos totales} = 13 \%$$

Determinación de densidad del jabón líquido con 1,5% de aceite esencial de *Tagetes minuta*

$$Po = 13,59 \text{ g}$$

$$P1 = 23,78 \text{ g}$$

$$P2 = 23,63 \text{ g}$$

Pagua = densidad del agua a la temperatura de trabajo (0,997 g/mL a 25 °C)

$$P_{\text{muestra}} = \frac{(23,63 - 13,59)}{(23,78 - 13,59)} \times P_{\text{agua}}$$

$$P_{\text{muestra}} = \frac{(10,04)}{(10,19)} \times P_{\text{agua}}$$

$$P_{\text{muestra}} = 0,9852 \times 0,997$$

$$P_{\text{muestra}} = 0,982$$

Porcentaje de humedad y sustancias volátiles del jabón líquido comercial

$$Po = 51,88 \text{ g}$$

$$P1 = 52,88 \text{ g}$$

$$P2 = 51,99 \text{ g}$$

7

$$\% \text{ Humedad y sustancias volatiles} = \frac{(52,88 - 51,99)}{(52,88 - 51,88)} \times 100$$

$$\% \text{ Humedad y sustancias volatiles} = \frac{0,8801}{1} \times 100 = 88,01\%$$

Determinación de sólidos totales del jabón líquido comercial

$$\% \text{ Solidos totales} = 100 - 88,01 \%$$

$$\% \text{ Solidos totales} = 11,99 \%$$

Determinación de densidad del jabón líquido comercial

$$P_0 = 13,59 \text{ g}$$

$$P_1 = 23,63 \text{ g}$$

$$P_2 = 23,73 \text{ g}$$

Pagua = densidad del agua a la temperatura de trabajo (0,997 g/mL a 25 °C)

$$P_{\text{muestra}} = \frac{(23,73 - 13,59)}{(23,63 - 13,59)} \times P_{\text{agua}}$$

$$P_{\text{muestra}} = \frac{(10,14)}{(10,04)} \times P_{\text{agua}}$$

$$P_{\text{muestra}} = 1,0099 \times 0,997$$

$$P_{\text{muestra}} = 1,001$$

Anexo 5. Descripción y preparación de los medios de cultivo utilizados

Agar Mueller–Hinton

Es un medio de cultivo de uso extensivo en microbiología, empleado para evaluar la susceptibilidad de los microorganismos frente a distintos agentes antimicrobianos. El presente documento describe los fundamentos esenciales de este medio, así como su composición, proceso de preparación y su aplicación en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana, denominadas antibiogramas (124)(31).

Fundamento

Es un medio de cultivo formulado específicamente para la realización de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, conocidas como antibiogramas. Sus características composicionales y físicas generan condiciones óptimas para la evaluación de la actividad de agentes antimicrobianos frente a bacterias patógenas. Entre sus principales fundamentos se encuentran la capacidad de favorecer un crecimiento bacteriano homogéneo, permitir una difusión apropiada de los antibióticos y reducir la interferencia de sustancias que puedan inhibir su acción (124).

Composición

Está constituido principalmente por extracto de carne bovina y caseína hidrolizada, componentes que aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano. Asimismo, incorpora almidón, cuya función es captar el exceso de iones metálicos que podrían interferir con la actividad de los antibióticos. La proporción de agar es controlada de manera precisa para obtener una textura firme pero no excesivamente rígida, lo que favorece una difusión adecuada de los agentes antimicrobianos a través del medio (124).

Preparación

El procedimiento se inicia con la reconstitución del medio, utilizando 38 g del preparado deshidratado por cada litro de agua destilada. Posteriormente, la mezcla se deja reposar durante aproximadamente 10 minutos para permitir una adecuada hidratación. A continuación, se lleva a ebullición con agitación constante hasta lograr su completa disolución, se distribuye en recipientes apropiados y finalmente se esteriliza en autoclave a 121 °C.

Agar Manitol Salado

Es un medio de cultivo con propiedades selectivas y diferenciales, empleado para el aislamiento y la identificación de estafilococos a partir de distintos tipos de muestras. Su formulación se encuentra armonizada y cumple con los criterios establecidos por las

Farmacopeas Europea, Japonesa y de los Estados Unidos (EP, JP y USP) (125).

Fundamento

El medio de cultivo contiene extracto de carne, peptona y tripteína como fuentes de nutrientes esenciales para el crecimiento microbiano. El manitol actúa como carbohidrato fermentable, mientras que el cloruro de sodio, en alta concentración, confiere selectividad al inhibir la flora acompañante. El rojo fenol se utiliza como indicador de pH y el agar como agente solidificante. Este medio es selectivo por su elevada concentración salina y diferencial por la fermentación del manitol. Los microorganismos que fermentan manitol producen ácidos que disminuyen el pH y provocan el viraje del indicador de rojo a amarillo. Los estafilococos coagulasa positivos forman colonias amarillas, mientras que los no fermentadores producen colonias rojas o púrpuras. Es recomendado para el aislamiento de estafilococos patógenos en muestras clínicas y productos de importancia sanitaria (125).

Composición

El medio de cultivo está compuesto por extracto de carne (1,0 g/L), peptona de carne (5,0 g/L) y tripteína (5,0 g/L), los cuales aportan los nutrientes necesarios para el crecimiento microbiano. Además, contiene manitol (10,0 g/L) como carbohidrato fermentable, cloruro de sodio (75,0 g/L) en alta concentración como agente selectivo, rojo de fenol (0,025 g/L) como indicador de pH y agar (15,0 g/L) como agente solidificante (125).

Preparación

Se disuelven 111 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada, dejando reposar la mezcla durante 5 minutos para favorecer su adecuada hidratación. A continuación, se calienta con agitación constante hasta alcanzar la ebullición, manteniéndola durante 1 a 2 minutos para asegurar la completa disolución del medio. Finalmente, el preparado se distribuye en recipientes apropiados y se esteriliza en autoclave a 118–121 °C durante 15 minutos (125).

Anexo 6. Certificado de *Staphylococcus aureus* ATCC: 25923



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

SPECIFICATIONS: Product Name: <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Catalog Number: 0360 Lot Number: 360-95** Reference Number: ATCC® 25923™ Passage from Reference: 3 Recovery: 3.1E+08 Expiration Date: 2026/05/12	RELEASE INFORMATION: Quality Control Technologist: Tracy A Blenker Release Date: 2024/05/10
---	--

Performance	
Macroscopic Features: Medium to large, convex, entire edge, both white and pale white colonies, smooth, opaque, beta hemolytic	Medium: SBAP
Microscopic Features: Gram positive cocci occurring singly, in pairs and in irregular clusters	Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF (1)	
See attached ID System results document.	
Other Features/ Challenges: Results (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): positive (1) Coagulase (rabbit plasma - tube): positive (1) Beta Lactamase (Cefinase Disk): negative (1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 27 - 35 mm (1) Penicillin (10 units - Disk Susceptibility): 26 - 37 mm (1) Oxacillin (1 mcg - Disk Susceptibility): 18 - 24 mm	
 Amanda Kuperus Director of Quality Control AUTHORIZED SIGNATURE	
**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number. <u>Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</u> Individual products are traceable to a recognized culture collection. (1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025.  TESTING CERT #2655.01 ATCC Licensed Derivative (*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.	

Anexo 7. Certificado de *Escherichia coli* ATCC: 25922.



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

SPECIFICATIONS: Product Name: <i>Escherichia coli</i> Catalog Number: 0335 Lot Number: 335-595** Reference Number: ATCC® 25922™* Passage from Reference: 3 Expiration Date: 2027/04/30	RELEASE INFORMATION: Quality Control Technologist: Glenna L. Jaede Release Date: 2025/04/28
---	--

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

Anexo 8. Dictamen del Comité de Ética en Investigación de la Universidad Católica de Santa María.

COMITÉ DE ÉTICA INSTITUCIONAL DE INVESTIGACIÓN UCSM



**DICTAMEN COMITÉ DE ETICA DE INVESTIGACION
UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA**

Arequipa, 12 de agosto de 2025

Investigadoras Calderón Flores, Stephany Dayane
 Rivera Jahuir, Diana Karoline

Presente.-

De mi especial consideración.

Me dirijo a ustedes para hacerles llegar el resultado de la evaluación de su proyecto de investigación y dictamen del Comité Institucional de Ética de Investigación.

TÍTULO: "Formulación y evaluación de la actividad antibacteriana in vitro e in vivo de una solución detergente (jabón líquido) con aceite esencial de "Tagetes minuta" (huacatay)".

Investigadoras: Calderón Flores, Stephany Dayane y Rivera Jahuir, Diana Karoline.

TIPO Y DISEÑO: Transversal, cuantitativa, descriptiva, experimental, longitudinal – transeccional.

OBJETIVO: La investigación tiene como objetivo: Formular y evaluar la actividad antibacteriana in vitro e in vivo de una solución detergente (jabón líquido) con aceite esencial de "Tagetes minuta" (huacatay).



PROCEDIMIENTOS: Laboratorial.

COMITÉ DE ÉTICA INSTITUCIONAL DE INVESTIGACIÓN UCSM



**DICTAMEN COMITÉ DE ETICA DE INVESTIGACION
UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA**

SUJETOS DE ESTUDIO:

Sujetos en un rango de edad entre 20 a 40 años, de ambos sexos y que presenten la piel intacta a nivel de manos y antebrazos, con un buen estado de salud y sin haber hecho uso previo de productos antibacterianos en las últimas 24 horas.

RIESGO DEL ESTUDIO:

Mínimo.

OBSERVACIONES, SUGERENCIAS:

Debe proteger confidencialidad de la data sensible.

DICTAMEN:

DICTAMEN FAVORABLE 262 – 2025 CIEI-UCSM



VIGENCIA:

La aprobación tiene vigencia desde la emisión del presente dictamen hasta el 12 de agosto de 2026.

Agueda Muñoz Del Carpio Toia
Comité Institucional de Ética de la Investigación UCSM

Cualquier duda comunicarse a: comiteeticainvestigacionucsm@gmail.com

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD.
2. M^a Janeiro Arocas J, García Nieves A, Santalla Borreiros F, Gil Man-so P, Prieto Riaño R, González Martín C, et al. INFECCIONES BACTERIANAS DE LA PIEL.
3. Higiene LA, Manos DE. Estado Mundial de [Internet]. Available from: www.unicef.org/wash
4. Guía de la OMS sobre Higiene de Manos en la Atención de la Salud: Resumen Primer Desafío Global de Seguridad del Paciente Una Atención Limpia es una Atención Segura a.
5. HAND HYGIENE FOR ALL.
6. Foro de las Sociedades Respiratorias Internacionales El impacto mundial de la Enfermedad Respiratoria.
7. Guidelines on hand hygiene in community settings.
8. Hernán J, Martínez U, Alberto L, Saldarriaga M, Barbosa JM, Fonnegra WR. MINISTERIO DE SALUD Y PROTECCIÓN SOCIAL CAROLINA CORCHO MEJÍA Ministra de Salud y Protección Social.
9. Latifian E, Otur C, Abanoz-Secgin B, Arslanoglu SF, Kurt-Kizildogan A. Evaluation of antimicrobial activity In extracts of different parts of three tagetes species. Turkish Journal of Field Crops. 2021;26(1):117–22. doi:10.17557/tjfc.950272
10. Bordón A, Rodríguez SA, Chaves DS de A, Cutró AC, Hollmann A. Antimicrobial Action of Essential Oil of Tagetes minuta: Role of the Bacterial Membrane in the Mechanism of Action. Antibiotics. 2025 Jul 1;14(7). doi:10.3390/antibiotics14070632
11. Pandey AK, Kumar P, Saxena MJ, Maurya P. Distribution of aromatic plants in the world and their properties. In: Feed Additives: Aromatic Plants and Herbs in Animal Nutrition and Health. Elsevier; 2019. p. 89–114. doi:10.1016/B978-0-12-814700-9.00006-6
12. Uzwatania F, Surya Ningrum R, Resti S. FORMULATION OF LIQUID HAND SOAP MADE FROM NEEM SEED OIL AND LEMONGRASS ESSENTIAL OIL. Indonesian Journal of Applied Research.
13. Nuryati A, Setiawan B, Martsiningsih MA. Herbal Soap Formulation as Anti-Bacterial in the Context of Increasing the Community's Healthy Living Movement. Journal of Health Sciences. 2024;5(4):p.
14. SOSA AL. UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA QUÍMICA.

2022.

15. Obtenor P, Título EL, De P, Farmacéutico Q, Campos Quiroz B, Grace A, et al. FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA TESIS EFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE Tagetes minuta L. (HUACATAY) FRENTE A Streptococcus mutans.
16. Latifian E, Otur C, Abanoz-seçgin B, Funda ARSLANOGLU S, Kurt-kizildogan A. EVALUATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY IN EXTRACTS OF DIFFERENT PARTS OF THREE TAGETES SPECIES. Vol. 26. 2021;26(1):117–22. doi:10.17557/tjfc.950272
17. Higiene LA, Manos DE. Estado Mundial de [Internet]. Available from: www.unicef.org/wash
18. Ejemot-Nwadiaro RI, Ehiri JE, Arikpo D, Meremikwu MM, Critchley JA. Hand washing promotion for preventing diarrhoea. Cochrane Database of Systematic Reviews. John Wiley and Sons Ltd; 2015. doi:10.1002/14651858.CD004265.pub3 PubMed PMID: 26346329.
19. Mo Y, Pham TM, Lim C, Horby P, Stewardson AJ, Harbarth S, et al. The effect of hand hygiene frequency on reducing acute respiratory infections in the community: a meta-analysis. Epidemiology and Infection. Cambridge University Press; 2022. doi:10.1017/S0950268822000516 PubMed PMID: 35445655.
20. Rabie T, Curtis V. Handwashing and risk of respiratory infections: A quantitative systematic review. Tropical Medicine and International Health. 2006. p. 258–67. doi:10.1111/j.1365-3156.2006.01568.x PubMed PMID: 16553905.
21. Higiene LA, Manos DE. Estado Mundial de [Internet]. Available from: www.unicef.org/wash
22. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. The Bacterial Cell Envelope [Internet]. doi:10.1101/cshperspect.a000414
23. Whitfield C, Stephen Trent M. Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides. Annu Rev Biochem. 2014 Jun 2;83(Volume 83, 2014):99–128. doi:10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-060713-035600/CITE/REFWORKS PubMed PMID: 24580642.
24. Nikaido H. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. Antimicrob Agents Chemother. 1989;33(11):1831–6. doi:10.1128/AAC.33.11.1831 PubMed PMID: 2692513.
25. Pasachova Garzón J, Ramírez Martínez S, Muñoz Molina L, Pasachova Garzón J,

- Ramírez Martínez S, Muñoz Molina L. Staphylococcus aureus: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. Nova [Internet]. 2019 [cited 2025 May 10];17(32):25–38. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702019000200025&lng=en&nrm=iso&tlng=es
26. Hurtado MP, de la Parte MA, Brito A. Staphylococcus aureus: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología [Internet]. 2002 [cited 2025 Jul 1];22(2):112–8. Available from: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562002000200003&lng=es&nrm=iso&tlng=es
27. Pasachova Garzón J, Ramírez Martínez S, Muñoz Molina L, Pasachova Garzón J, Ramírez Martínez S, Muñoz Molina L. Staphylococcus aureus: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. Nova [Internet]. 2019 [cited 2025 Jul 6];17(32):25–38. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702019000200025&lng=en&nrm=iso&tlng=es
28. Bennett RW, Hait JM, Tallent SM. Staphylococcus aureus Infection. Guide to Foodborne Pathogens, Second Edition. 2023 Jul 17;26–44. doi:10.1002/9781118684856.ch2 PubMed PMID: 28722898.
29. Sun W, Chen J, Zhu X, Xue Y. Characterization of resistance patterns and genetic diversity of Escherichia coli isolated from geese in Northeastern China. Poult Sci. 2025 May 1;104(5):105036. doi:10.1016/J.PSJ.2025.105036
30. Rodríguez-Angeles G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli. Salud Publica Mex [Internet]. 2002 [cited 2025 Jun 25];44(5):464–75. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342002000500011&lng=es&nrm=iso&tlng=es
31. Jnani D, Ray SD. Escherichia coli Infection. Encyclopedia of Toxicology, Fourth Edition: Volume 1-9. 2023 Jul 13;4:V4-357-V4-367. doi:10.1016/B978-0-12-824315-2.00190-1 PubMed PMID: 33231968.
32. Rodríguez-Angeles G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli. Salud Publica Mex [Internet]. 2002 [cited 2025 Jul 9];44(5):464–75. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342002000500011&lng=es&nrm=iso&tlng=es

36342002000500011&lng=es&nrm=iso&tlng=es

33. Jnani D, Ray SD. Escherichia coli Infection. Encyclopedia of Toxicology, Fourth Edition: Volume 1-9. 2023 Jul 13;4:V4-357-V4-367. doi:10.1016/B978-0-12-824315-2.00190-1 PubMed PMID: 33231968.
34. UNI PRO FACUL.
35. Comité de Prevención y Control de IIH INMP Manual de Higiene de Manos 0 INSTITUTO NACIONAL MATERNO PERINATAL MANUAL DE HIGIENE DE MANOS COMITÉ DE PREVENCIÓN Y CONTROL DE INFECCIONES INTRAHOSPITALARIA-INMP.
36. microbiológico.
37. Chino L, César J, Portugal IV. Universidad Católica Santa María Facultad de Ciencias e Ingenierías Físicas y Formales Escuela Profesional de Ingeniería Industrial Tesis presentada por el Bachiller. 2018.
38. Químicas C, Morell Pérez L, Bravo Sánchez L, Lázaro M, Quintana P, Abreu-Naranjo R, et al. Portoviejo-Manabí-Ecuador BASES DE LA CIENCIA Revista Científica Facultad de Ciencias Básicas. revista.bdlaciencia@utm.edu.ec. 2024;9(13). doi:10.33936/revbasdelaciencia.v9i3.6490
39. UDLA-EC-TIAG-2016-31.
40. Nafisah U, Suhesti I, Albetia P. Formulation and anti-bacterial of liquid soap combination of Citronella (*Cymbopogon nardus* L. Rendle), Cinnamon (*Cinnamomum burmanni* Ness Ex Bi.), and Orange Lemon (*Citrus lemon* L.) Essential Oils on *Staphylococcus epidermidis*. Media Farmasi: Jurnal Ilmu Farmasi. 2022 Aug 22;19(2):63. doi:10.12928/mf.v19i2.22387
41. Haw S, Currie D, Eadie D, Pearce J, MacGregor A, Stead M, et al. Small retailers' perspectives on the implementation and impact of point-of-sale legislation [Internet]. 2020 [cited 2026 May 16]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553067/>
42. Swamy MK, Akhtar MS, Sinniah UR. Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. Evid Based Complement Alternat Med. 2016;2016:3012462. doi:10.1155/2016/3012462 PubMed PMID: 28090211.
43. Hindler JF, Munro S. Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical Microbiology Procedures Handbook: Third Edition. 2024 May 27;2-3:5.0.1-5.18.2.1. doi:10.1128/9781555817435.ch5 PubMed PMID: 30969536.

44. Haw S, Currie D, Eadie D, Pearce J, MacGregor A, Stead M, et al. Small retailers' perspectives on the implementation and impact of point-of-sale legislation [Internet]. 2020 [cited 2026 May 16]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553067/>
45. Kyarimpa CM, Böhmendorfer S, Wasswa J, Kiremire BT, Ndiege IO, Kabasa JD. Essential oil and composition of *Tagetes minuta* from Uganda. Larvicidal activity on *Anopheles gambiae*. Ind Crops Prod. 2014 Dec 1;62:400–4. doi:10.1016/J.INDCROP.2014.09.006
46. (PDF) EFECTO TÓXICO AGUDO Y CRÓNICO DE TAGETES MINUTA “MENTA NEGRA” (ASTERACEAE) Y CARBARIL SOBRE SEIS ENTOMÓFAGOS IMPORTANTES EN EL CONTROL BIOLÓGICO [Internet]. [cited 2025 May 4]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/317105905_ACUTE_AND_CHRONIC_TOXIC_EFFECT_OF_TAGETES_MINUTA_BLACK_MINT_ASTERACEAE_AND_CARBARIL_ON_SIX_IMPORTANT_ENTOMOPHAGES_IN_BIOLOGICAL_CONTROL
47. Cornelius WW, Wycliffe W. *Tagetes* (*Tagetes minuta*) Oils. Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety. 2016 Jan 1;791–802. doi:10.1016/B978-0-12-416641-7.00090-0
48. Verma N, Aggarwal N, Sood P. Exploring the phytochemistry and biological potential of *Tagetes minuta* (L.): A comprehensive review. South African Journal of Botany. 2024 May 1;168:175–95. doi:10.1016/J.SAJB.2024.03.004
49. Rocabado G, Gonzáles E, De F, Fuente L, Araya P. Artículos Originales ESTUDIOS DE LA ACTIVIDAD ANSIOLITICA-SEDANTE DE LA ESPECIE TAGETES MINUTA L. STUDIES-SEDATIVE ANXIOLYTIC ACTIVITY SPECIES TAGETES MINUTA L. Rev Med La Paz. 2011;17(1):22–5.
50. Gil A, Ghera CM, Leicach S. Essential oil yield and composition of *Tagetes minuta* accessions from Argentina. Biochem Syst Ecol. 2000 Mar 1;28(3):261–74. doi:10.1016/S0305-1978(99)00062-9
51. GS C, V K, S G, A K, N G, L K. PHYTOCHEMICAL AND PHARMACOLOGICAL ASPECTS OF CLITORIA TERNATEA- A REVIEW. Journal of Applied Pharmaceutical Sciences and Research. 2018 Jan 1;3–9. doi:10.31069/JAPSR.V1I2.13061
52. Pure Malmorejon N. Efecto de la concentración del aceite esencial de las hojas del *Tagetes minuta* (huacatay) sobre su actividad antimicrobiana [Internet]. 2018 [cited 2025

- Jul 17]. Available from: <https://repositorio.uap.edu.pe/xmlui/handle/20.500.12990/3469>
53. FACULTAD DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIAS DE LA SALUD ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA.
 54. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int J Food Microbiol.* 2004 Aug 1;94(3):223–53. doi:10.1016/J.IJFOODMICRO.2004.03.022 PubMed PMID: 15246235.
 55. De Aceite C, De Huacatay E. Caracterización de aceite esencial de huacatay (*Tagetes minuta* L.) obtenido por arrastre de vapor. Universidad Nacional del Altiplano [Internet]. 2022 Jul 22 [cited 2025 May 6]. Available from: <https://repositorio.unap.edu.pe/handle/20.500.14082/18665>
 56. De F, Farmacéuticas C, Biotecnológicas Y, Profesional E, Farmacia DE, Bioquímica Y. UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA.
 57. Jean Bruneton. *Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinales*. 2, ilustrada ed. Acribia, Editorial, S.A.; 2001. 1–1100 p.
 58. Pío Font Quer. *Plantas medicinales: El Dioscórides renovado*. 10°. Barcelona: Ediciones Península; 2009.
 59. Carson CF, Hammer KA, Riley T V. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: A review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin Microbiol Rev.* 2006 Jan;19(1):50–62. doi:10.1128/CMR.19.1.50-62.2006, PubMed PMID: 16418522.
 60. Dadalıoğlu I, Evrendilek GA. Chemical compositions and antibacterial effects of essential oils of Turkish oregano (*Origanum minutiflorum*), bay laurel (*Laurus nobilis*), Spanish lavender (*Lavandula stoechas* L.), and fennel (*Foeniculum vulgare*) on common foodborne pathogens. *J Agric Food Chem.* 2004 Dec 29;52(26):8255–60. doi:10.1021/JF049033E,
 61. Inouye S, Takizawa T, Yamaguchi H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2001;47(5):565–73. doi:10.1093/JAC/47.5.565, PubMed PMID: 11328766.
 62. Cristani M, D'Arrigo M, Mandalari G, Castelli F, Sarpietro MG, Micieli D, et al. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. *J Agric Food Chem.* 2007 Jul 25;55(15):6300–8. doi:10.1021/JF070094X, PubMed PMID: 17602646.
 63. Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristani M, Daniele C, et al. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob Agents*

- Chemother. 2005 Jun;49(6):2474–8. doi:10.1128/AAC.49.6.2474-2478.2005, PubMed PMID: 15917549.
64. Meléndez LA, Manuel S, Cosío R. Margarito Rodríguez Álvarez [Internet]. Available from: <http://www.cibnor.mx>
 65. LOS ACEITES ESENCIALES.
 66. Peredo -Luna HA, Palou -García E, López -Malo A. Aceites esenciales: métodos de extracción. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 2009;3(1):24–32.
 67. content.
 68. Usos Química PY, Usos Jorge Antonio Pino Alea Jorge Antonio Pino Alea PY. ACEITES ESENCIALES ESENCIALES [Internet]. Available from: <https://www.facebook.com/pages/Interfase->
 69. Gutiérrez MC, Droguet M, Carmen M, Bouzán G, En Química D. LA CROMATOGRAFÍA DE GASES Y LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS: IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS CAUSANTES DE MAL OLOR. N°. 2002;122:35.
 70. De C. UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA SEDE CUENCA.
 71. Pardo FT, Aparco RH, Quispe IM, Pacheco NFF, Cerna HWA, Chipana SQ, et al. Compuestos bioactivos y actividad antioxidante de aceites esenciales en hojas de plantas medicinales. *Alfa Revista de Investigación en Ciencias Agronómicas y Veterinaria*. 2023 Sep 23;7(21):547–59. doi:10.33996/REVISTAALFA.V7I21.235
 72. ALEJO MENDOZA R. “ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE Tagetes Elliptica” (Chinchu) . [Lima]: UAP; 2015.
 73. Biotecnología En Alimentos ME. UNIVERSIDAD NACIONAL DE ITAPÚA FACULTAD DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA PROGRAMA PARAGUAYO PARA EL DESARROLLO DE LA CIENCIA Y TECNOLOGÍA “ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DE EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS SECOS DE YERBA MATE ELABORADA PROCEDENTE DE PARAGUAY” AUTOR....
 74. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int J Food Microbiol*. 2004 Aug 1;94(3):223–53. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022 PubMed PMID: 15246235.
 75. Tisserand R, Young R. Essential Oil Safety: A Guide for Health Care Professionals. *Essential Oil Safety: A Guide for Health Care Professionals: Second Edition*. 2013 Nov 13;1–780. doi:10.1016/C2009-0-52351-3
 76. Flores BM, Eulalia L. UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA FACULTAD

DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS
 ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA FORMULACIÓN,
 ELABORACIÓN Y CONTROL DE CALIDAD FISICOQUÍMICO DE CUATRO
 TIPOS DE JABÓN LÍQUIDO CON BASE DE ACEITES VEGETALES TESIS
 PRESENTADA POR. 2016.

77. Flores BM, Eulalia L. Formulación, Elaboración y Control de Calidad Fisicoquímico de Cuatro Tipos de Jabón Líquido con Base de Aceites Vegetales [Internet]. Universidad Católica de Santa María; 2016 [cited 2025 Mar 13]. Available from: <https://repositorio.ucsm.edu.pe/handle/20.500.12920/5495>
78. 65.1407.FB [Internet]. [cited 2026 Jan 9]. Available from: <https://files.ucsm.edu.pe/tesis/65.1407.FB/index.html>
79. Declaration of Helsinki | Forskningsetikk [Internet]. [cited 2026 Jan 9]. Available from: https://www.forskningsetikk.no/en/resources/the-research-ethics-library/legal-statutes-and-guidelines/declaration-of-helsinki/?utm_source=chatgpt.com
80. Huan Chen J, Chen H, Huang S, Lin J, Zheng Y, Xie M, et al. Endophenotyping reveals differential phenotype-genotype correlations between myopia-associated polymorphisms and eye biometric parameters [Internet]. 2012. Available from: <http://www.molvis.org/molvis/v18/a82>
81. Heres L, Engel B, Urlings HAP, Wagenaar JA, Van Knapen F. Effect of acidified feed on susceptibility of broiler chickens to intestinal infection by *Campylobacter* and *Salmonella*. *Vet Microbiol*. 2004 Apr 19;99(3–4):259–67. doi:10.1016/j.vetmic.2003.12.008 PubMed PMID: 15066728.
82. WHO guidelines on hand hygiene in health care. World Health Organization; 2009. 262 p.
83. Kampf G, Ostermeyer C, Heeg P, Paulson D. Evaluation of two methods of determining the efficacies of two alcohol-based hand rubs for surgical hand antisepsis. *Appl Environ Microbiol*. 2006 Jun;72(6):3856–61. doi:10.1128/AEM.02746-05 PubMed PMID: 16751489.
84. Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings </P><P>Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force </H3></P><P>Prepared by </P><P>John M. Boyce, M.D... [Internet]. [cited 2026 Jan 10]. Available from: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5116a1.htm>
85. Gakuubi MM, Wagacha JM, Dossaji SF, Wanzala W. Chemical Composition and

Antibacterial Activity of Essential Oils of *Tagetes minuta* (Asteraceae) against Selected Plant Pathogenic Bacteria. *Int J Microbiol.* 2016;2016. doi:10.1155/2016/7352509

86. Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional.
87. Walia S, Mukhia S, Bhatt V, Kumar R, Kumar R. Variability in chemical composition and antimicrobial activity of *Tagetes minuta* L. essential oil collected from different locations of Himalaya. *Ind Crops Prod.* 2020 Aug 1;150. doi:10.1016/j.indcrop.2020.112449
88. Gakuubi MM, Wagacha JM, Dossaji SF, Wanzala W. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils of *Tagetes minuta* (Asteraceae) against Selected Plant Pathogenic Bacteria. *Int J Microbiol.* 2016;2016. doi:10.1155/2016/7352509
89. HUAMÁN LISUNDE M. APROBACIÓN DEL ASESOR. ANDAHUAYLAS; 2020.
90. Rezaei F, Jamei R, Heidari R. Evaluation of volatile profile, fatty acids composition and in vitro bioactivity of *Tagetes minuta* growing wild in Northern Iran. *Adv Pharm Bull.* 2018;8(1):115–21. doi:10.15171/apb.2018.014
91. Bahadırılı NP. Essential oil content and compositions of naturalized *tagetes minuta* L. (wild marigold). *Natural Volatiles and Essential Oils.* 2020;7(2):17–21. doi:10.37929/nveo.704056
92. Ruiz Yandira Elizabeth A. EFECTO ANTIMICROBIANO in vitro DEL ACEITE ESENCIAL DE *Tagetes minuta* SOBRE *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. 2023.
93. Gakuubi MM, Wagacha JM, Dossaji SF, Wanzala W. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils of *Tagetes minuta* (Asteraceae) against Selected Plant Pathogenic Bacteria. *Int J Microbiol.* 2016;2016. doi:10.1155/2016/7352509
94. de Hooge IE, van Dulm E, van Trijp HCM. Cosmetic specifications in the food waste issue: Supply chain considerations and practices concerning suboptimal food products. *J Clean Prod.* 2018 May 10;183:698–709. doi:10.1016/j.jclepro.2018.02.132
95. Boughendjioua H, Djeddi S, Hicham Boughendjioua, Samah Djeddi. Organoleptic and Physicochemical Properties of Algerian Lemon Essential Oil. *World Journal of Applied Chemistry.* 2017;2(3):96–100. doi:10.11648/j.wjac.20170203.14
96. Moreira S, Rivadeneira C, Tumbaco J, Ponce W. Evaluación de las Características Fisicoquímicas del Aceite de Eucalipto a partir de dos Métodos de Destilación. *Revista de Investigaciones en Energía Medio Ambiente y Tecnología RIEMAT* ISSN 2588-0721. 2024 Oct 15;9(2):35–47. doi:10.33936/riemat.v9i2.7043
97. Medina Huaracaya - Meza Beltran.

98. Ruiz Yandira Elizabeth A. EFECTO ANTIMICROBIANO in vitro DEL ACEITE ESENCIAL DE *Tagetes minuta* SOBRE *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. 2024.
99. Gakuubi MM, Wagacha JM, Dossaji SF, Wanzala W. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils of *Tagetes minuta* (Asteraceae) against Selected Plant Pathogenic Bacteria. *Int J Microbiol.* 2016;2016. doi:10.1155/2016/7352509
100. Boughendjioua H, Djeddi S, Hicham Boughendjioua, Samah Djeddi. Organoleptic and Physicochemical Properties of Algerian Lemon Essential Oil. *World Journal of Applied Chemistry.* 2017;2(3):96–100. doi:10.11648/j.wjac.20170203.14
101. Del Carpio Jiménez C, Urrunaga Ormachea M, Gutierrez Chavez RG, Tomaylla Cruz C. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS, COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACEITE ESENCIAL DE *Citrus jambhiri* (Limón rugoso). *Revista de la Sociedad Química del Perú.* 2022 Sep 30;88(3). doi:10.37761/rsqp.v88i3.403
102. FACULTAD DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIAS DE LA SALUD ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA.
103. Bordón A, Rodríguez SA, Chaves DS de A, Cutró AC, Hollmann A. Antimicrobial Action of Essential Oil of *Tagetes minuta*: Role of the Bacterial Membrane in the Mechanism of Action. *Antibiotics.* 2025 Jul 1;14(7). doi:10.3390/antibiotics14070632
104. Bassolé IHN, Juliani HR. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules.* 2012. p. 3989–4006. doi:10.3390/molecules17043989 PubMed PMID: 22469594.
105. Nazzaro F, Fratianni F, De Martino L, Coppola R, De Feo V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals.* MDPI AG; 2013. p. 1451–74. doi:10.3390/ph6121451
106. Burt S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *International Journal of Food Microbiology.* 2004. p. 223–53. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022 PubMed PMID: 15246235.
107. Rowe CR, Sheskey JP, Quinn EM. Handbook of Pharmaceutical Excipients [Internet]. Vol. 40. 2009;40(3):9823. doi:10.1017/CBO9781107415324.004 PubMed PMID: 252464003.
108. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology.* 2008 Feb 1;46(2):446–75. doi:10.1016/J.FCT.2007.09.106 PubMed PMID: 17996351.

109. Wilkinson JB, Moore RJ. *Cosmeticología de Harry* [Internet]. 1990 [cited 2026 Jan 10];1062. Available from: https://books.google.com/books/about/Cosmetolog%C3%ADa_de_Harry.html?id=fnQ9mGMH15oC
110. Barel AO, Paye M, Maibach HI, editors. *Handbook of Cosmetic Science and Technology* [Internet]. 2014 Apr 9. doi:10.1201/B16716
111. CDC C for DC and P. Invasive group A streptococcus in a skilled nursing facility-- Pennsylvania, 2009-2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2011;60:1445–9. PubMed PMID: 22031216.
112. Burt S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *Int J Food Microbiol*. 2004 Aug 1;94(3):223–53. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022 PubMed PMID: 15246235.
113. Burt S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *International Journal of Food Microbiology*. 2004. p. 223–53. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022 PubMed PMID: 15246235.
114. Desarrollo de un cosmético tipo gel con propiedades antioxidante usando como activo aceite esencial de *Citrus sinensis*. 2020.
115. Shkreli R, Terziu R, Memushaj L, Dharmo K. Formulation and stability evaluation of a cosmetics emulsion loaded with different concentrations of synthetic and natural preservative.
116. Angane M, Swift S, Huang K, Butts CA, Quek SY. Essential Oils and Their Major Components: An Updated Review on Antimicrobial Activities, Mechanism of Action and Their Potential Application in the Food Industry. *Foods*. MDPI; 2022. doi:10.3390/foods11030464
117. Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complement Altern Med*. 2006 Nov 30;6. doi:10.1186/1472-6882-6-39 PubMed PMID: 17134518.
118. Iseppi R, Mariani M, Condò C, Sabia C, Messi P. Essential oils: A natural weapon against antibiotic-resistant bacteria responsible for nosocomial infections. *Antibiotics*. 2021;10(4). doi:10.3390/antibiotics10040417
119. adminrfsalud,+593-1996-1-CE.
120. Galgano M, Capozza P, Pellegrini F, Cordisco M, Sposato A, Sblano S, et al. Antimicrobial Activity of Essential Oils Evaluated In Vitro against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*. 2022 Jul 1;11(7). doi:10.3390/antibiotics11070979

121. adminrfsalud,+593-1996-1-CE (1).
122. Angane M, Swift S, Huang K, Butts CA, Quek SY. Essential Oils and Their Major Components: An Updated Review on Antimicrobial Activities, Mechanism of Action and Their Potential Application in the Food Industry. *Foods*. MDPI; 2022. doi:10.3390/foods11030464
123. Manual técnico de referencia para la higiene de la manos: dirigido a los profesionales sanitarios, a los formadores y a los observadores de las prácticas de higiene de las manos [Internet]. [cited 2026 Jan 10]. Available from: <https://www.who.int/es/publications/i/item/9789241598606>
124. (4) Agar Mueller Hinton: Fundamentos, aplicaciones y Técnica de Kirby-Bauer | LinkedIn [Internet]. [cited 2025 Dec 19]. Available from: <https://www.linkedin.com/pulse/agar-mueller-hinton-fundamentos-aplicaciones-y-t%C3%A9cnica-de-olcve/>
125. Laboratorios Britania a.a. Manitol Salado Agar [Internet]. [cited 2025 Dec 20]. Available from: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_607073c954fa9.pdf