

**UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y  
BIOQUÍMICA**



**Tesis para optar el Título Profesional de Químico  
Farmacéutico y Bioquímico**

**TESISTAS:**

**Bach. Ramírez Heredia Rosa Candelaria  
Bach. Soto Macetas Rudy Wider**

**ASESOR:**

**Dra. Q.F Hedly Teresa Morales Quispe**

**LIMA- PERÚ  
2018**

“EFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE LAS  
HOJAS DE MOLLE (*Schinus molle* L.) FRENTE A CEPAS DE  
*Escherichia coli*” IN VITRO

## **DEDICATORIA**

A mis padres, por ayudarme a seguir adelante, por su comprensión e infinito amor.

A mis hijos, por ser la luz de mi vida, el motivo y motor de esta travesía.

A mis familiares y amigos, por su apoyo incondicional y hacer posible este momento.

**Rosa Ramírez**

A Dios, por permitir culminar mi carrera.

A mis padres y familia entera, por ser ejemplo de perseverancia y constancia.

A mi asesora, por su apoyo incondicional en la formación de mi carrera.

**Rudy Soto**

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios.

A la Universidad Inca Garcilaso de la Vega, Alma Mater, en cuyas aulas se forman grandes profesionales para el desarrollo del país.

A la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, donde adquirimos conocimientos de excelentes docentes para mi desarrollo profesional.

A nuestra asesora Dra. Q.F Heddy Teresa Morales Quispe, por su apoyo, dedicación, experiencia y capacidad para guiarnos en el desarrollo de esta tesis.

A la Mg. Hilda Moroni, docente del Dpto. de Microbiología de la Facultad de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por su orientación desinteresada.

A los docentes de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega, que con sus consejos acertados aportaron al presente estudio.

Al personal del Laboratorio de la especialidad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica, por su disposición y paciencia durante la ejecución del proyecto.

**Rosa y Rudy**

## INDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
INDICE GENERAL.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
1.1 Realidad problemática.....	3
1.2. Formulación del problema.....	4
1.2.1. Problema general.....	4
1.2.2. Problemas específicos.....	4
1.3. Objetivos de la investigación.....	4
1.3.1. Objetivo general.....	4
1.3.2. Objetivos específicos.....	4
1.4. Justificación e importancia del estudio.....	5
CAPÍTULO II.....	7
MARCO TEÓRICO.....	7
2.1. Antecedentes de la investigación:.....	7
2.1.1. Antecedentes nacionales:.....	7
2.1.2. Antecedentes internacionales.....	11
2.2. Bases teóricas.....	15
2.2.1. Generalidades de molle ( <i>Schinus molle</i> L).....	15
2.2.2. Aceites Esenciales:.....	20
2.2.3. Metabolitos secundarios volátiles reconocidos en el aceite esencial.....	29
2.2.4. Métodos de obtención de aceites esenciales.....	31
2.2.5. Métodos de análisis de calidad de los aceites esenciales.....	36
2.2.6. Actividad antibacteriana in vitro.....	38
2.2.7. Generalidades del Ciprofloxacino.....	46
2.3. Formulación de hipótesis.....	50
2.3.1. Hipótesis general:.....	50
2.3.2. Hipótesis específicas:.....	50
2.4. Variables.....	50
2.5. Marco conceptual.....	51
2.5.1. Definición de términos básicos.....	51
CAPÍTULO III.....	54
METODOLOGÍA.....	54

3.1. Tipo de investigación.....	54
3.2. Diseño .....	54
3.3. Población y muestra.....	54
3.5 Técnicas e instrumentos de recolección de datos .....	56
3.6. Procedimiento experimental.....	56
3.7 Obtención del aceite esencial de las hojas de molle ( <i>Schinus molle</i> L.).....	57
3.8. Actividad antibacteriana.....	60
3.8.1. Obtención del microorganismo .....	60
3.8.2. Reactivación de la cepa bacteriana .....	60
3.8.3. Preparación del inóculo bacteriano.....	60
3.8.4. Preparación de la sustancia vegetal para el estudio.....	60
3.8.5. Preparación de los discos de sensibilidad .....	61
3.8.6. Sensibilidad antibacteriana por el Método de disco difusión. ....	61
3.8.7. Sembrado del inóculo bacteriano .....	62
3.8.8. Aplicación de los discos en las placas inoculadas.....	62
3.8.9. Incubación: .....	63
3.8.10. Lectura del efecto antibacteriano del aceite esencial de las hojas de molle ( <i>Shinus molle</i> L.).....	63
PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.....	65
4.1. Procesamiento de los datos.....	65
4.2. Análisis Cromatográfico (GC-FID). ....	66
4.2.1. Metabolitos volátiles secundarios del aceite esencial de las hojas de molle ( <i>Shinus molle</i> ).....	66
4.2.2 Importancia de los metabolitos volátiles hallados .....	67
4.3. Actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de molle .....	68
4.4. Presentación y análisis de los resultados estadísticos .....	70
4.4.1. Datos estadísticos .....	71
<b>4.2 Prueba de Hipótesis</b> .....	76
4.4.3 Análisis por Kruskal-Wallis: comparación de tres o más grupos a las 24, 48 y 72 horas.....	78
4.4.4 Estadísticos descriptivos del análisis de Kruskal-Wallis a las 24 horas.....	79
4.4.5 Prueba de Kruskal-Wallis entre las muestras en estudio.....	82
4.4.6 Grado de sensibilidad según Duraffourd – Lapraz.....	82
4.5 Discusión de resultados.....	83
CAPÍTULO V .....	86
5.1. Conclusiones.....	86
5.2. Recomendaciones .....	87
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	88
ANEXOS .....	100

## ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1: Compuestos químicos del aceite esencial de Schinus molle L. (Molle).</i>	27
<i>Tabla 2: Operacionalización de las variables.</i>	51
<i>Tabla 3: Tiempos de retención e identificación de los metabolitos secundarios aislados por GCFID del aceite esencial de Schinus molle L. (molle)</i>	66
<i>Tabla 4: Resultados de lecturas de los halos de inhibición en mm de los cinco grupos de estudio en diferentes tiempos.</i>	72
<i>Tabla 5: Prueba de Shapiro-Wilk</i>	78
<i>Tabla 6: Análisis de Kruskal-Wallis a las 24 horas</i>	79
<i>Tabla 7: Análisis de Kruskal-Wallis a las 48 horas</i>	80
<i>Tabla 8: Análisis de Kruskal-Wallis a las 72 horas</i>	81
<i>Tabla 9: Efecto antibacteriano del aceite esencial de las hojas de molle (Schinus molle L.), concentración: 100 %, 50 % y al 25 % en cepas de Scherichia coli (ATCC® 25922™), según la según escala de Duraffourd y Lapraz.</i>	83

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura N° 1:</b> Descripción botánica de <i>Schinus- Molle</i> . (Kasimala, 2010).....	19
Figura 2: Estructura química del ácido gálico (A) y (B) elágico.....	24
Figura 3: Estructura de base de datos de taninos condensados.....	24
Figura 4: Estructura del flavonoide .....	25
Figura 5: Glucósido de esterol y Sitosterol. ....	26
Figura 6: Estructura molecular de los componentes volátiles más comunes del aceite esencial de <i>Shinus molle (molle)</i> . ....	30
Figura 7: Instalación de la destilación hidráulica.....	32
Figura 8: Montaje de la formación de vapor de agua.....	33
Figura 9: Extracción asistida por microondas.....	34
Figura 10: : Técnica de extracción de grasa.....	34
Figura 11: Los diferentes tipos de extracción de disolventes volátiles.....	35
Figura 12: Susceptibilidad antibacteriana (Método de disco difusión) de <i>Escherichia coli</i> (ATCC® 25922™), frente al aceite esencial de las hojas de molle ( <i>Shinus molle</i> L.), concentración al 25% con un halo de inhibición de Medio de 9mm (escala de Duraffourd-Lapraz.....	68
Figura 13: Susceptibilidad antibacteriana (Método de disco difusión) de <i>Escherichia coli</i> (ATCC® 25922™), frente al aceite esencial de las hojas de molle ( <i>Shinus molle</i> L.), concentración de 50% con un halo de inhibición de Medio de 14mm (escala de Duraffourd-Lapraz .....	69
Figura 14: Susceptibilidad antibacteriana (Método de disco difusión) de <i>Escherichia coli</i> (ATCC® 25922™), frente al aceite esencial de las hojas de molle ( <i>Shinus molle</i> L.), al 100% con un halo de inhibición promedio de 29mm (escala de Duraffourd-Lapraz).....	69
Figura 15: Elaboración propia .....	70
Figura 16: Susceptibilidad antibacteriana (Método de disco difusión) de <i>Escherichia coli</i> (ATCC® 25922™), frente al control negativo: agua destilada con un halo de inhibición de 0mm / 6 mm incluyen el disco de sensibilidad en las mediciones. (Escala de Duraffourd-.....	70
Figura 17: Medias de los halos de inhibición en cepas de <i>Escherichia coli</i> (ATCC® 25922™) a las 24 horas de incubación a 37°C. ....	73
Figura 18: Medias de los halos de inhibición en cepas de <i>Escherichia coli</i> (ATCC® 25922™) a las 48 horas de incubación a 37°C. ....	74
Figura 19: Medias de los halos de inhibición en cepas de <i>Escherichia coli</i> (ATCC® 25922™) a las 72 horas de incubación a 37°C.....	75
Figura 20: : Pruebas de normalidad Kolmogorov - Smirnov y Shapiro – wilk de las muestras en estudio obtenido de SPSS® .....	77
Figura 21: Kruskal-Wallis de muestras independientes.....	82
Figura 22:Árbol, hojas y flores de <i>Schinus molle</i> L. (Molle). ....	108
<b>Figura N° 23:</b> Figura 23: Metabolitos secundarios, Alcaloides.....	110
Figura 24: Metabolitos secundarios, flavonoides. ....	110
Figura 25: Ensayo de solubilidad.....	111
Figura 26:Sembrado en cromatografía de capa fina. ....	111
Figura 27: preparación del solvente, corrida de las muestras.....	112
Figura 28: manchas de desplazamiento en la luz UV 254 nm. ....	112
Figura 29: resultados de Cromatografía capa fina .....	112
Figura 30: Obtención del aceite esencial de las hojas de molle ( <i>Schinus molle</i> .....	114
Figura 31: equipo de extracción.....	114
Figura 32: dilución de las concentraciones.....	115
Figura 33:bacteria <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922. ....	115
Figura 34: Activación de las cepas bacteriana.....	116
Figura 35:Estandarización del inóculo bacteriano según la escala de 0.5 Mc Farland. ....	116
Figura 36: Cepas puras de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	117
Figura 37: Sembrado del inóculo bacteriano en agar Müeller Hinton:.....	118
Figura 38:Aplicación de los discos de sensibilidad en las placas sembradas.....	118
Figura 39:Incubación a 37 °C por un periodo de 24, 48 y 72 horas.....	119
Figura 40:Estufa conteniendo las placas Petri sembradas. ....	119



*Figura 41: Halos de inhibición del aceite esencial al 50 y 100% en cultivos bacteriano de E. coli a las 72 horas con el control negativo. .... 121*

## INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1 .....	101
ANEXO 2:Constancia emitida por el Herbario San Marcos (USM) .....	103
ANEXO 3: Certificado de calidad de las Cepas Escherichia Coli. (ATCC 29522) .....	105
ANEXO 4: Certificado de calidad de los medios de cultivo Agar .....	107
ANEXO 5: Materia Prima .....	108
ANEXO 6:Tamizaje fitoquímico del extracto de hojas <i>Shinus molle</i> L. ( <i>molle</i> ) .....	110
ANEXO 7:Prueba de Solubilidad del extracto de las hojas del “molle” .....	110
ANEXO 8: Cromatografía en capa fina del extracto de la hoja de <i>Shinus molle</i> ( <i>molle</i> ). .....	111
ANEXO 9: Cuantificación de Flavonoides totales por espectrofotometría UV-VIS.....	113
ANEXO 10: Preparación de los grupos experimentales .....	114
ANEXO 11: Evaluación del Efecto Antibacteriano del Aceite Esencial de <i>Schinus molle</i> L. ( <i>molle</i> ). .....	115
ANEXO 12:Resultadoen placas de loshalos de inhibicion .....	120
ANEXO 13: Resultados de Cromatografía (FID). .....	122

## RESUMEN

El presente estudio de tipo descriptivo-explicativo, ejecutado mediante un diseño cuasi experimental, ha sido realizado con el objetivo de evaluar la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de las hojas de molle (*Schinus molle L.*) como sustancia natural, comparada con el Ciprofloxacino sobre cepas de *Escherichia coli* (ATCC® 25922™). El procedimiento experimental in vitro se efectuó utilizando 25 placas con agar Müller Hilton, para un tamaño muestral de 80 mediciones de halos de inhibición; para la siembra microbiológica se utilizó el Método difusión en disco, estandarizado por Kirby-Bauer, en cinco grupos de estudio; se usó el aceite esencial de las hojas de molle (*Schinus molle L.*) en diferentes concentraciones al 100%, 50% y 25%, Ciprofloxacino (control positivo) y agua destilada (control negativo), las cuales fueron evaluadas a las 24, 48 y 72 horas de incubación a 37°C, midiendo los halos de inhibición en mm., y el análisis cromatográfico (GC-FID) para la identificación de metabolitos secundarios volátiles. Los datos fueron procesados a través del programa estadístico SPSS® mediante las pruebas de normalidad Kolmogorov-Smirnov y la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, trabajados a un nivel de confianza del 95%. Los resultados obtenidos del análisis cromatográfico expresan que los cinco elementos más relevantes que componen la muestra de aceite esencial son: limoneno,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno,  $\beta$ -mirceno y  $\alpha$ -felandreno. Asimismo, la concentración que tuvo mayor efecto antibacteriano frente a cepas de *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) fue al 100% , con un halo de inhibición de 29.4 mm, seguida de la concentración 50%, con un halo de inhibición de 14.7mm, según la escala de Duraffourd – Lapraz, a un valor de significancia ( $p > 0.05$ ), En conclusión, el aceite esencial de las hojas de molle (*Schinus molle L.*) presenta efecto antibacteriano frente a cepas de *Escherichia coli*.

Palabras clave: Aceite esencial de las hojas de molle (*Schinus molle L.*); metabolitos secundarios volátiles; efecto antibacteriano; *Escherichia coli*; Ciprofloxacino.

## ABSTRACT

The present study of descriptive-explanatory type, executed by means of a quasi-experimental design, has been carried out with the objective of evaluating the in vitro antibacterial activity of the essential oil of molle leaves (*Schinus molle L.*) natural substance as compared with ciprofloxacin on *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) strains. Materials and Methods: experimental, in vitro study, 25 boxes Müller Hilton agar for a sample size of 80 measurements of inhibition halos was used for the seeding to method Disk diffusion, standardized by Kirby-Bauer in five study groups, the essential oil of the molle leaves (*Schinus molle L.*) in different concentration 100% ,50%, and 25% also it was used the ciprofloxacin as a positive control, distilled water as negative control, behavior that it was evaluated at 24, 48 and 72 hours of exposure incubation 37°C measuring the inhibition halos in mm. and Chromatographic analysis (GC-FID) for the identification of volatile secondary metabolites. Data were processed through the SPSS® statistical software using the Kolmogorov-Smirnov normality tests and Shapiro-Wilk and tests nonparametric Kruskal-Wallis it was work at a confidence level of 95%. Results: The five most relevant elements volatile secondary metabolites that make up the sample of essential oil are: Limonene,  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene,  $\beta$ -myrcene,  $\alpha$ -phellandrene, Likewise, The concentration that had the highest antibacterial effect against strains of *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) was 100% with an inhibition halo of 29.4 mm, followed by 50% concentration with an inhibition halo of 14.7 mm, with values of significance ( $p > 0.05$ ). Conclusion: The essential oil of the leaves of molle (*Schinus molle L.*) has antibacterial effect against strains of *Escherichia coli*.

Key words: Essencial oil of molle leaves (*Schinus molle L.*); volatile secondary metabolites; antibacterial effect; *Escherichia coli*; Ciprofloxacin.

## INTRODUCCIÓN

En el mundo entero el uso de plantas medicinales se emplean en diversas culturas para tratar y prevenir muchas enfermedades que afectan al ser humano. Nuestro país se caracteriza por la diversificación de estas plantas, las cuales eran usadas por nuestros ancestros para curar las enfermedades, mediante esencias, parches de plantas, masajes, entre otros; estos se complementaban con rituales, ruegos y suplicas sagradas a dioses de la naturaleza. Es el caso de la existencia del *Schinus molle L.*. Esta planta es reconocida por sus propiedades antibacterianas, antimicrobianas, cicatrizantes, etc. Es por eso que se tuvo el interés de conocer sus principios activos y su acción farmacológica (Gonzales, 1998). Es una especie ampliamente distribuida en el Perú que se ha adaptado a diversas extensiones; contiene propiedades curativas en sus distintas partes, las cuales se tratan de demostrar en numerosos estudios realizados en diferentes países. Como un medio efectivo de brindar calidad de vida a los ciudadanos que sufren ciertas afecciones y/o enfermedades crónicas, se plantea su utilización con fines medicinales (Arroyo et al., 2007). La creciente demanda en la utilización y mercadeo de fitofármacos con propiedades curativas o preventivas que ayudan al organismo a recuperarse de los desequilibrios producidos por las enfermedades o a protegerse de ellos, han mostrado un aumento en el consumo de la población en general. (García et al., 2004).

El objetivo de esta investigación fue, justamente, comprobar que el aceite esencial de las hojas de molle (*Schinus molle L.*) tiene efecto antibacteriano en cepas de *Escherichia coli*, comparado con el Ciprofloxacino, en cultivos bacterianos, usando el agar Müller Hilton por el método de difusión en disco; pues, se conoce que un porcentaje de pacientes ya presentaron o están presentando resistencia al Ciprofloxacino, por ello, el motivo de esta investigación.

La presente tesis que expone el planteamiento, marco teórico, proceso metodológico, resultados, conclusiones y recomendaciones del estudio se integran en seis capítulos, a saber:

El primer capítulo aborda el problema de la investigación, los objetivos, la justificación e importancia del estudio.

El segundo capítulo desarrolla el marco teórico, teniendo en consideración los antecedentes, las bases teóricas, la formulación de las hipótesis, las variables, así como el marco conceptual.

El capítulo tercero se refiere a la metodología que comprende el tipo, diseño, la formulación de las hipótesis, las técnicas e instrumentos de recolección de datos, y el procedimiento experimental asumido.

El cuarto capítulo aborda la presentación y el análisis de los resultados.

El quinto capítulo expone las conclusiones y recomendaciones.

El capítulo sexto presenta las referencias bibliográficas consultadas.

Finalmente, la tesis que presentamos a la comunidad académica y al público, en general, dada la alta significatividad del tema estudiado en campo de la salud, consideramos que será un gran aporte para el tratamiento alternativo de las enfermedades infecciosas, promoviendo así la calidad de vida de las poblaciones.

# CAPÍTULO I

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

### 1.1 Realidad problemática

El uso de plantas medicinales, estuvo presente en diferentes culturas y en nuestros antepasados los cuales fueron transmitidos de generación en generación. Demostrar mediante estudios in vitro su eficiencia y eficacia nos proporciona el soporte necesario para confiar en su eficiencia y eficacia para el uso terapéutico. (Abad M.J., 2007).

La OMS define a *Escherichia coli* como una bacteria que normalmente se encuentra alojada en el intestino de los seres humanos y animales. En su mayoría la cepa *Escherichia coli* no generan enfermedad. No obstante, existen algunas que sí desarrollan enfermedades graves, para contrarrestar estas patologías, se han efectuado avances científicos en las últimas décadas, con el propósito de buscar nuevas drogas para esta bacteria que muchas veces presenta mutaciones como medida de defensa, aumentando progresivamente las infecciones producidas por enterobacterias (OMS., 2002-2005).

Demostrar el efecto antibacteriano del aceite de *Schinus molle L* sobre las cepas de *Escherichia coli*, tendría gran relevancia en la industria farmacéutica y un menor costo en la producción, aumentando las posibilidades de su uso como un producto natural antibacteriano, evitando así los efectos secundarios que producen sus pares sintéticos. (Morales R.,2010). En nuestro país y a nivel internacional se han desarrollado estudios usando plantas medicinales como una buena alternativa de tratamiento frente a la invasión de microorganismos que puedan poner en riesgo nuestra salud.

En el presente trabajo se pretende rescatar el empleo del *Schinus molle* L. como tratamiento alternativo antibacteriano que nos ofrece esta planta milenaria. (1)

## 1.2. Formulación del problema

### 1.2.1. Problema general

¿El aceite esencial de las hojas de molle (*Schinus molle* L.) presenta efecto antibacteriano en cepas de *Escherichia coli* in vitro?

### 1.2.2. Problemas específicos

- ❖ ¿Qué tipos de metabolitos secundarios presentan en mayor proporción el aceite esencial de las hojas de molle (*Schinus molle* L.) que posea actividad antibacteriana en cepas de *Escherichia coli* in vitro?
- ❖ ¿En qué nivel de concentración el aceite esencial de las hojas de molle (*Schinus molle* L.) posee actividad antibacteriana en cepas de *Escherichia coli* in vitro?
- ❖ ¿Cuál será la actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de molle (*Schinus molle* L.) comparado con ciprofloxacino en cepas de *Escherichia coli* in vitro?

## 1.3. Objetivos de la investigación

### 1.3.1. Objetivo general

Comprobar que el aceite esencial de las hojas de molle (*Schinus molle* L.) tiene efecto antibacteriano en cepas de *Escherichia coli* in vitro.

### 1.3.2. Objetivos específicos

- ❖ Identificar qué tipos de metabolitos secundarios presentan en mayor proporción el aceite esencial de las hojas de molle (*Schinus molle* L.) que posee actividad antibacteriana en cepas de *Escherichia coli* in vitro.
- ❖ Precisar la concentración del aceite esencial de las hojas de molle (*Schinus molle* L.) con actividad antibacteriana en cepas *Escherichia coli* in vitro.
- ❖ Comparar la actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de



molle (*Schinus molle* L.) con Ciprofloxacino en cepas de *Escherichia coli* in vitro.

#### **1.4. Justificación e importancia del estudio**

En la actualidad la utilización empírica de las plantas medicinales han sido reconocidas en nuestro país, como en múltiples culturas del mundo, y transmitidas a través de generaciones. Sin embargo, la alta demanda y la creciente desconfianza hacia sus pares sintéticos, nos obliga a proponer el uso de sustancias accesibles naturales para aliviar nuestras molestias. ( Lock O.,1994)

Las infecciones producidas por la presencia de bacterias, principalmente por *Escherichia coli*, entre otras, considerándose como un problema de salud, afectando a la población en general, con una prevalencia en las mujeres debido a la anatomía, de que la uretra es corta y la cercanía de la vagina con el ano, favoreciendo muchas veces la contaminación.

El aceite de las hojas de molle (*Schinus molle* L.) se puede utilizar como tratamiento antibacteriano alternativo, evitando así crear resistencia antibacteriana y efectos secundarios en los pacientes, además, poder difundir el uso de dicha sustancia, permitiendo el crecimiento de la industria de productos naturales.

La investigación es importante porque ya algunos pacientes hicieron resistencia al antibiótico Ciprofloxacino, el cual si el aceite esencial de las hojas de molle (*Schinus molle* L.) presenta efecto antibacteriano, sería una buena alternativa para tratar enfermedades causadas por esta bacteria; también, porque nuestro sistema de salud no cuenta con la cantidad de medicamentos para la población, y estos no llegan a todos los rincones del país, además, debemos estar a la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas y porque los beneficiarios de esta investigación será la población de escasos recursos económicos de la ciudad de lima y del interior del país (Jiménez M., 2000).

Se cuenta con la especie biológica de estudio y, además, la Universidad cuenta con todos los materiales reactivos y equipos para el desarrollo este proyecto,

asimismo, el costo de investigación no es muy elevado, lo cual permitió terminar con éxito la parte experimental.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Antecedentes de la investigación:

##### 2.1.1. Antecedentes nacionales:

**Clemente Cl. (2017)**, desarrolló una investigación in vitro sobre la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle L.* "molle", con el frente a cultivos de "*Streptococcus mutans* "ATCC 25175". Las soluciones empleadas en parte experimental, fue la obtención del extracto etanólico a concentraciones de 500 y 1000 mg/mL, el gluconato de clorhexidina 0,12 % como control positivo y agua destilada como control negativo. Se realizó el estudio de la actividad antimicrobiana con el método de difusión en disco utilizando la técnica de siembra en superficie, con las soluciones experimentales en condiciones de anaerobiosis por 48 y 72 horas a 37°C, para luego proceder a la lectura de diámetros de halo de inhibición con un vernier. Mediante el análisis cualitativo se determinó la presencia de metabolitos: flavonoides, alcaloides, carbohidrato, esteroides y/o triterpenos, azúcares reductores y compuestos fenólicos. Los resultados se analizaron mediante el porcentaje de inhibición del crecimiento. El extracto etanólico a concentraciones de 500 y 1000mg/mL, demostró tener actividad antimicrobiana sobre *Streptococcus mutans*"ATCC 25175" y de la comparación realizada, el gluconato de clorhexidina produjo mayor inhibición. En conclusión, el extracto etanólico de *Schinus molle L.* "Molle" presenta actividad antimicrobiana sobre *Streptococcus mutans* "ATCC 25175" y el gluconato de clorhexidina es cualitativamente similar al extracto etanólico. (9).

**Trejo C. (2015)**, el estudio in vivo tuvo como objetivo determinar el efecto antidiarreico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Schinus molle L.* "molle", en cobayos. En la parte del análisis de su composición química encontró metabolitos secundarios como los compuestos fenólicos y/o taninos, flavonoides, triterpenos y esteroides, catequinas, resinas,

saponinas, azúcares reductores y cumarinas. Para ello, se usó 25 cobayos de 500 y 600 g de peso distribuidos aleatoriamente en cinco tratamientos: agua destilada (blanco), Loperamida (estándar), extracto hidroalcohólico de las hojas de *Schinus molle* L. "molle" a 100, 200 y 300 mg/kg de peso. Los resultados muestran que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Schinus molle* L. "molle" a 100 mg/Kg de 39,1 %, a 200 mg/Kg de 34,8%, a 300 mg/Kg de 92.7%, teniendo similar efecto antidiarreico el de 300 mg/Kg frente al estándar Loperamida 2 mg/Kg que representa el 100% del efecto antidiarreico. Se concluye que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Schinus molle* a dosis de 300 mg/Kg de peso, tiene mayor efecto antidiarreico estadísticamente similar a la Loperamida. (13)

**Herrera Ascoy N. (2013)**, en este estudio evaluó el efecto del extracto hidroalcohólico de hojas de *Schinus molle* L. "molle" sobre la viabilidad de *Streptococcus β-hemolítico*, la recolección del material en estudios se procedió de acuerdo a las normas y referencias establecidas. En la parte experimental trabajó con cuatro concentraciones distintas (250, 500, 750 y 1000 mg/mL) de extracto hidroalcohólico de hojas de *Schinus molle* L. y el producto sintético: Penicilina como control de inhibición. Para evaluar el efecto del extracto sobre el microorganismo utilizó el método de Kirby Bauer modificado, sembrándose un inóculo estandarizado con el patrón de turbiedad de 0.5 del Nefelómetro de Mc Farland en placas con Agar Müller Hinton por la técnica de siembra en superficie. Los resultados fueron expresados en diámetro (mm) de los halos de inhibición del crecimiento de *Streptococcus β-hemolítico*, encontrándose que las concentraciones empleadas afectan la viabilidad "in vitro" de este microorganismo. Concluye que a medida que aumentan las concentraciones de extracto hidroalcohólico de hojas de *Schinus molle* L. "molle" en el rango de 250 a 1000 mg/mL aumenta el diámetro del halo de inhibición del crecimiento de *Streptococcus β-hemolítico*. (12).

**Llanos Arapa S. (2012)**, dicho estudio estuvo orientado en la Extracción y caracterización del aceite esencial del fruto del molle (*Schinus molle L.*), recolectadas en la Región Tacna, así como a la caracterización físico-química e identificación de los componentes principales de dicho aceite de *Schinus molle L.*; probándose también su actividad antimicótica ante *Penicillium italicum*. Se utilizaron materiales cumpliendo con los parámetros establecidos por la Norma Técnica Peruana NTP-ITINTEC, cromatografía de gases con detector de ionización de llama (FID), aceite esencial por el método de destilación por arrastre de vapor de agua, además, se determinó el contenido de humedad (18,158%), cenizas (3,785%) y proteínas (5,280%) para los frutos de Los Palos (provincia de Ayacucho); y el contenido de humedad (21,875%), cenizas (3,353%) y proteínas (5,560%) para los de Tarata. El aceite esencial su rendimiento para el lote N° 01 (Los Palos) fue 6,575% (v/p), y para el lote N° 02 (Tarata) fue 7,705% (v/p). Las características físico-químicas del aceite esencial lote N° 01 (Los Palos) fueron: índice de refracción (1,478), densidad (0,846 g/cm<sup>3</sup>), densidad relativa (0,847), punto de congelación (-35°C), índice de acidez (6,023 mg KOH/g) e índice de éster (17,008); y para el aceite esencial lote N° 02 (Tarata): índice de refracción (1,477), densidad (0,831 g/cm<sup>3</sup>), densidad relativa (0,832), punto de congelación (-35°C), índice de acidez (12,718 mg KOH/g) e índice de éster (23,148). Ambos aceites se analizaron por cromatografía de gases con detector FID, se identificaron los monoterpenos: limoneno,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno,  $\beta$ -mirceno, y  $\alpha$ -felandreno. Se concluye: Hay diferencias significativas de las 2 muestras recolectadas en diferentes lugares, los aceites esenciales de molle inhibieron el desarrollo del hongo *Penicillium italicum*. (3)

**Annacone J. (2010)**, realizó un estudio donde evalúa el efecto ecotoxicológico del extracto acuoso del *Schinus molle L.* (anacardiaceae) a cuatro controladores biológicos de plagas agrícolas en el Perú. Estos organismos son: *Ceraeochrysa cincta* (Schneider) (*Neuroptera: Chrysopidae*), *Chrysoperla asoralis* (Bank) (*Neuroptera: Chrysopidae*)

*Telenomus insidiosus* Say (*Anthocoridae: Hemiptera*) en huevos, larva y adultos, bajo condiciones de laboratorio. Para ello se empleó cinco concentraciones acuosas de hojas de *S. molle* (p/v): 1.5%, 2.5%, 5%, 10% y 20%. Los parámetros de toxicidad aguda empleados fueron la concentración letal (CL50) y la efectiva media (CE50). Los organismos se desarrollaron en condiciones de laboratorio, se siguieron protocolos establecidos bajo normas internacionales para el cuidado del medio ambiente y ecosistema. Se tuvo un cuidado especial en analizar la posibilidad de riesgo ecológico del empleo de este insecticida botánico en el agro ecosistema peruano. Los resultados obtenidos confirman que los organismos toleran ciertas concentraciones, el efecto de toxicidad en menor tiempo y frecuencia es la 10% y 20% para todas las especies de plaga agrícola usadas en el experimento. Se concluye que la toxicidad del extracto del *Schinus molle* L. al 10 y 20% pueden ser usados como control biológico natural frente a plagas agrícolas. (2).

**Alba G. et al. (2009)**, en el presente trabajo evalúan la actividad cicatrizante de una pomada con aceite esencial de *Schinus molle* L. (Molle), en diferentes concentraciones en ganado vacuno con heridas infectadas y en ratones albinos. Para ello, utilizaron 40 ratones albinos, distribuidos al azar en 5 grupos; a los que se les depiló el lomo con un depilatorio comercial, después de un reposo de 24 horas, realizaron dos incisiones sobre el lomo. Inicialmente, se les colocó tópicamente la base de la pomada a un grupo de vacuno dos veces por día por siete días, construida en 100% por vaselina, constituyéndose en el grupo control. Por otro lado, a otros tres grupos se les aplicó la pomada con tres niveles de concentración (1,75; 2.0 y 3,75%, respectivamente); mientras que a un cuarto grupo (+) se le colocó el producto comercial, siendo este último el grupo de referencia farmacológico, posteriormente se sacrificaron por dislocación cervical, evaluándose las lesiones, procediendo medir la fuerza o tensión en gramos abriendo la herida cicatrizada, para esto se usó el dinamómetro; en la otra incisión se les retiró conservándola en formol al 10% para un respectivo análisis histopatológico. Al analizar los resultados obtenidos, se logró observar que el producto

natural del *Schinus molle L* contenía propiedades cicatrizantes en heridas infectadas en ganado vacuno se sanaron en una buena manera; del mismo modo, los experimentos realizados en ratones de cepa Balb C 53, confirmaron la experiencia antes mencionada, siendo la concentración al 2% la que presentó mayor poder cicatrizante. (4).

**Méndez K. (2004)**, el presente trabajo de investigación tuvo como objeto comparar la efectividad antibacteriana del aceite esencial del *Schinus Molle L* frente al paramonoclorofenol alcanforado en cepas de *Streptococcus oralis*, para ello usaron cepas estándar y el producto natural del aceite esencial del *Schinus Molle*, se reactivaron los *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) y luego fueron sembrados en placas petri que contenían el medio de cultivo Mueller Hinton con pozos de 6 mm. de diámetro donde se vertieron aproximadamente 20 ul. del aceite esencia), paramonoclorofenol alcanforado, gluconato de clorhexidina al 2% y agua destilada. Las placas se incubaron a 37°C incluyéndose dos placas controles para comprobar la viabilidad de las bacterias y la esterilidad del medio, después de las cuales se realizó la medición de los halos de inhibición con un calibrador vernier o regla pie de rey a las 24 y 72 horas. Los resultados obtenidos fueron: el gluconato de clorhexidina al 2% posee significativamente mayor efecto inhibitorio que el aceite esencial de *Schinus Molle L* frente al paramonoclorofenol alcanforado en cepas de *Streptococcus oralis* CCUG27680, *Enterococcus faecalis* OMGS3372 y *Fusobacterium sp*, mediante la prueba de difusión en agar por discos. El aceite esencial del *Schinus Molle* Linneo presentó un mayor efecto antimicrobiano frente al *Streptococcus oralis* comparado con el paramonoclorofenol alcanforado, asimismo, el efecto fue similar frente al *E. faecalis* y *Fusobacterium sp*.

### **2.1.2. Antecedentes internacionales**

**Rivadeneira-Cajas D. et al. (2015)**, el presente estudio in vitro tuvo como objeto evaluar el potencial antimicrobiano del aceite esencial de *Schinus molle l.* (molle) sobre *Streptococcus mutans*. Para dicho estudio se

usó el aceite esencial del molle como sustancia natural comparada con el gluconato de clorhexidina al 0,12% sobre cepas de *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) (ATCC 25175). se utilizaron placas Petri con Agar sangre para la siembra con el método de difusión en disco por cada concentración del aceite esencial de *S. molle* al 100 y 50%, simultáneamente, se logró usar el hidrolato o residuo de vapor de condensación del aceite, gluconato de clorhexidina (control positivo), agua destilada (control negativo), lográndose comparar el gluconato de clorhexidina al 0,12% con el efecto antimicrobiano de las sustancias naturales, cuyo comportamiento se evaluaron a 24 y 72 horas de exposición. Al analizar las concentraciones, así como el residuo del aceite de *S. molle*, provocaron efecto antimicrobiano frente a la cepa de *S. mutans* (ATCC 25175), con valores de significancia ( $p > 0,05$ ) y de la comparación, el gluconato de clorhexidina al 0,12% produjo mayor inhibición, pero disminuyó parcialmente su efecto a las 72 h, mientras que las concentraciones al 100 y 50% potencializaron su efecto en un 0,8% a las 72 h. Se concluye que, si existió un potencial efecto antimicrobiano del aceite esencial de *S. molle* sobre la cepa bacteriana y en cuanto al gluconato de clorhexidina, fue cualitativamente similar al aceite. (7).

**Cruz-Carrillo A. et al (2010)**, realizó un estudio para evaluación in vitro para analizar el efecto antibacteriano de los extractos de cuatro especies vegetales: *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* Y *Silybum marianum*". El ensayo experimental, se realizó en dos etapas, una relacionada con la preparación de esencias vegetales en el Laboratorio de Control Biológico, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia; mientras que la otra consistió en relacionar con la aplicación de pruebas microbiológicas, realizadas en el laboratorio de microbiología de la misma universidad. La preparación de extractos etanólicos partiendo de las hojas secas de *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* y *Silybum marianum*, siendo sometidos a un análisis microbiológico in vitro para analizar la actividad antibacteriana, sus concentraciones mínimas inhibitoria y bactericida con respuesta al



*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*. La preparación de cinco cajas de Petri con agar Muller-Hinton y con cinco hoyos con un diámetro de 11mm, cuatro para los extractos y una para control negativo. Añadiéndose en las perforaciones alícuotas de 0,2mL de las diluciones madre de los extractos, evaluándose para cada caja una concentración diferente, para cada uno de los extractos. Luego, se compararon con un fármaco estándar llamado cloranfenicol o gentamicina. El análisis de los resultados mostraron que los extractos tenían actividad contra *S. aureus*; siendo las que mejor exhibieron actividad fue *B. pilosa* y *L. camara*, *S. molle* y *S. marianum* mostrándose una capacidad moderada para inhibir el crecimiento de *S. aureus*. Por lo tanto, se demostró que las plantas seleccionadas tienen actividad antibacteriana frente a *S. aureus*. (8).

**Baroni, E. et al (2010)**, realizaron un estudio con el objetivo de evaluar in vitro el efecto del suero bovino y la concentración bacteriana en la actividad de ciprofloxacina sobre una cepa de *Escherichia coli* (ATCC 25922); para ello, usaron como referencia (CMI) las concentraciones inhibitorias mínimas en caldo Mueller Hinton y en presencia de suero bovino fueron de 0,0188 y 0,0047 µg/ml respectivamente, mientras que el valor de la concentración preventiva de mutantes estimada en agar Mueller Hinton fue de 0,60 µg/ml. Los ensayos de curvas de muerte bacteriana preparados en caldo Mueller Hinton, mostraron que ninguna concentración llegaron una eficacia del 99,9% (efecto bactericida) una vez finalizado el respectivo ensayo. Por otro lado, se logró analizar que la actividad bactericida se acrecentó bajo la presencia de suero bovino en forma directa al ir aumentando las concentraciones, con una eficacia del 99,9% (efecto bactericida) y (efecto de erradicación bacteriana). En el ensayo de curva muerte construida en caldo Mueller Hinton, en presencia de una alta concentración bacteriana, se observó que ninguna concentración redujo el número de bacterias viables compatible a un efecto bactericida. Los resultados mostraron que la eficacia del ciprofloxacino en la cepa de *Escherichia coli* fue restringida por la carga bacteriana y los factores de

respuesta inmune presentes en el suero. En base a lo desarrollado, se concluye que el tamaño del inóculo y el efecto del suero juega un papel importante en la actividad antibacteriana de la ciprofloxacina sobre *Escherichia coli*. (11).

**Vázquez-Gonzales J. (2011)**, el objetivo de su estudio fue establecer el efecto antimicótico in vitro del aceite de molle (*Schinus molle*) sobre *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533. Para ello, realizó las pruebas en el laboratorio de la Escuela Académica Profesional de Medicina Veterinaria, durante el intervalo de tiempo de marzo a agosto del año 2011. En ese lugar, hizo ensayos utilizando 24 placas petri para sembrarse la cepa liofilizada de *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533 en Agar Mycosel. Dividió las placas en cuatro cuadrantes y colocó discos de sensibilidad empapados de aceite de molle con concentraciones de 2%, 4%, 6%, 8%, 10% y 12%; usó aceite mineral de control. Los halos de inhibición los midió con un vernier, observándose que existe inhibición de crecimiento en todas las concentraciones en promedios de 0,61 mm, 0,81 mm, 0,83 mm, 0,88 mm, 0,90 mm y 1,23 mm. Se concluye que el aceite esencial de *Schinus molle* Linneo en las diferentes concentraciones antes mencionadas, permiten controlar el crecimiento de *Trichophyton mentagrophytes*, siendo un método ecológico y económico para combatir este hongo. Por lo tanto, el aceite de molle logra inhibir el aumento en diversas bacterias y en algunos hongos por su contenido de terpenos, alfa-pineno, beta-pineno, sesquiterpenos, monoterpenos y taninos. (9).

**Díaz C. et al. (2008)**, realizaron un estudio en la Universidad de Costa Rica, con el objeto de demostrar la composición química del aceite esencial de *Schinus molle* y su actividad citotóxica en líneas celulares tumorales. Se caracterizó en términos de su composición química, actividad antioxidante, capacidad de inducir citotoxicidad y el mecanismo de muerte celular involucrado en el proceso. Como resultado, identificaron 42 constituyentes, que representan el 97.2% del petróleo total. Los principales constituyentes

del aceite fueron beta-pineno y alfa-pineno. La actividad antioxidante mostró un IC (50) de 36.3 microg mL. El aceite esencial era citotóxico en varias líneas celulares, demostrando que es más efectivo en carcinoma de mama y líneas celulares leucémicas. El LD (50) para la citotoxicidad a las 48 h en K562 correspondió a 78.7 microg mL, que era muy similar al LD (50) obtenido cuando se midió la apoptosis. El aceite esencial no indujo una necrosis significativa de hasta 200 microg mL, que junto con los resultados anteriores indican que la apoptosis es el principal mecanismo de toxicidad inducido por el aceite esencial de *S. molle* en esta línea celular. Estos resultados permiten concluir que el aceite esencial probado fue débil antioxidante e indujo citotoxicidad en diferentes tipos de células por un mecanismo relacionado con la apoptosis. (15).

## **2.2. Bases teóricas**

### **2.2.1. Generalidades de molle (*Schinus molle* L).**

El "molle" ha sido considerado como un árbol originario del Perú y extendido a toda el área andina durante el período pre-hispánico (Ecuador a Chile y Bolivia).

En los Andes peruanos, donde fue nombrado "*Molle*" (pronunciado "moye"), se utiliza como combustible, como una barrera en los campos y pastos, se planta a lo largo de muros de piedra seca para apoyarlos.

Después de la Conquista, fue llevado por los españoles a Centroamérica y a México, donde recibió, por eso, el nombre de "Perú" o de "Árbol del Perú". Posteriormente, a fines del siglo XVIII, se introdujo en California, a partir de la Misión de San Luis Rey en San Diego. Parece que, simultáneamente, llegó a Europa, ya que varios botánicos de ese siglo lo mencionan en España. En la actualidad, existe en todo el trópico y su uso es mencionado en el Mediterráneo, en África y en la India (Orozco, 2013).

#### **2.2.1.1. Descripción y Etiología**

Se ha mencionado que *Schinus* corresponde al nombre del género de la planta, el cual es de origen griego para designar al lentisco, un árbol

parecido al *Schinus molle* (Molle), (falsa pimienta) es una especie de planta perteneciente a la familia de la Anacardiaceae (subfamilia de los Anacardioides), debido a que provoca una resina olorosa con características muy parecidas a la del lentisco. El término “Molle” se refiere a un nombre genérico para esta planta, el cual fue usado antiguamente por el científico francés Tournefort, primer botánico quien estableció el género de las plantas. Por otro lado, Cárdenas (1989), señala que el término deriva del nombre quechua mullí, y no como es referido en el latín molle que significa “flojo”.

Los nombres más comunes del *Schinus molle* podemos encontrar a los siguientes términos: pirul, pirú, árbol del Perú; molle, cuyash, huaribay; aymara, muelle, falso pimienta, pimienta, mullí, aguaribay, árbol de la pimienta, Gualeguay, pimentero” (Orozco, 2013, p. 27).

Esta planta produce una resina olorosa muy similar a la del lentisco. “Molle fue un antiguo nombre genérico para esta planta, utilizado por el científico francés Tournefort quien fue el primer botánico en dar a conocer el género de las plantas, además deriva del nombre quechua mullí, no del latín molle “flojo” (Cárdenas, 1989).

Entre los nombres más comunes del *Schinus molle* encontramos: pirul, pirú, árbol del Perú; molle, cuyash, huaribay; aymara, muelle, falso pimienta, pimienta, mullí, aguaribay, árbol de la pimienta, Gualeguay, pimentero” (Orozco, 2013, p. 27).

#### **2.2.1.2. Distribución y habitat**

Se encuentra en el Andino de los desiertos del Perú, sino también en el centro de Chile y la Argentina.

Se distribuye naturalmente desde los 10°S en Perú hasta los 34°S en Argentina El *Schinus molle* L. es propio de las regiones cálidas y secas de Sudamérica.

(Salazar Rodolfo, 2001), comenta que el *Schinus molle* se aloja en las vertientes occidentales de los andes peruanos, laderas occidentales de la

región interandina, en la costa y en los valles. Ahora bien, Alba, Bonilla, & Arroyo (2009) afirman que su límite superior de distribución es alrededor de 3500 msnm, en el centro y sur del Perú. Su distribución altitudinal varía de 0 a 3800 msnm, con precipitaciones anuales de 300 a 2000 mm y temperaturas de 18 a 34°C. Tiene gran capacidad de rebrote. Progresa en terrenos secos y rocosos gracias a sus raíces bien desarrolladas, las que puede llegar hasta 20 a 30 m de profundidad para buscar agua, requiriendo un tipo de suelo levemente alcalinos con preferencia hacia la neutralidad, siendo exigente con respecto a la luz, no muy resistente al frío, resistente a las termitas y que pueda soportar sequías. (Salazar, 2001).

#### **2.2.1.3. Clasificación Taxonomía**

Kasimala (2010) presenta en su estudio la siguiente clasificación taxonómica:

- ◆ DIVISIÓN: Spermaphytes
- ◆ SUB DIVISIÓN: angiospermas
- ◆ CLASE: dicotiledóneas
- ◆ SUB CLASE: Rosidae
- ◆ ORDEN: Spindales
- ◆ FAMILIA: Anacardiaceae o Terebinthaceae
- ◆ GÉNERO: Schinus
- ◆ ESPECIE: *Schinus molle L.*

#### **2.2.1.4. Descripción Botánico**

El molle (*Schinus Molle L.*) tiene un olor persistente de hojas de roble, que explica su pertenencia a la familia de la Anacardiaceae (Anacardiaceae o Terebinthaceae). (Kasimala, 2010)

**Etiología:** La palabra molle proviene posiblemente de la palabra quechua "mulli", aunque hay otra opción que refiere que es de origen Quiché, en donde "MO" significa cierta clase de mosquito y "LE", hoja. Es decir, hojas de mosquito.

**Forma:** Es un árbol perennifolio, de 4 a 8 metros de altura en algunos lugares propicios pueden llegar a medir hasta 15 metros de altura, tiene un diámetro a la altura de pecho de 25 a 35 cm.

**Copa/hojas:** copa redondeada y abierta, proporcionando sombra moderada. Hojas compuestas, alternas, de sombra, de 15 a 41 folios alternos, con nervadura central bien marcada y prominente en ambas caras, generalmente apareados, de 0.85 a 5 cm de largo, estrechamente lanceoladas, de color verde amarillento.

**Ramas/Tronco/tallo:** tronco nudoso, ramas flexibles, colgantes y abiertas. El tallo es grueso, tortuoso, con frecuentes excreciones corticales y resina blanquecina. La corteza es gruesa, fisurada, color marrón oscuro, madera dura y compacta.

**Flores:** panículas axilares en las hojas terminales, de 10 a 15 cm, flores muy pequeñas y numerosas, de color amarillento, miden 6mm transversalmente. las flores masculinas o estaminadas constan de cáliz y corola de 5 piezas, 10 estambres desiguales insertados sobre un disco, de los cuales 5 alternan en los pétalos, tienen un ovario globoso súpero, uniovular, 3 carpelos y 5 lóculos conteniendo una semilla por lóculo, terminan en 3 pistilos y estigmas en forma de cabezuela, tienen 8-10 estaminodios pequeños.

**Frutos:** drupas en racimos colgantes, cada fruto de 5 a 9 mm de diámetro, con epicarpio rosado o rojizo brillante, con exocarpo coriáceo, seco en la madurez, el mesocarpo forma parte de la dispersión. Tiene sabor ardiente y picante. Inmaduro es carnoso y de color verde.

**Semillas:** negras lisas y opacas, conteniendo el embrión en dos cotiledones.

**Raíz:** sistema radical extendido y superficial.

**Sexualidad:** dioica.

**Numero de cromosomas:**  $2n=28$



**Rama**

**Hojas**

**Semillas**

**Frutos**

**Figura N° 1:** Descripción botánica de *Schinus- Molle*. (Kasimala, 2010)

#### **2.2.1.5. Usos del molle (*Schinus molle* L.)**

Se le ha atribuido el poder antiséptico, antiespasmódico y sedante, estimula la secreción gástrica por lo que son digestivos, además de estimulación uterina, antiinflamatorio en casos de cervicitis y vaginitis. (González, 2009).

Las medicinas tradicionales practicadas en ambos lados del mar Mediterráneo utilizan los aceites esenciales de *Schinus molle* (Molle) como analgésicos, antiinflamatorios, antitumorales, antibacterianos e insecticidas. Los estudios experimentales sobre *Schinus molle* L. (Molle) han revelado diferentes actividades biológicas y farmacológicas de *Schinus molle* L. (Molle) que demuestran que esta planta es hipotensora, antitumoral, antibacteriano, antihongos, antiinflamatorias, analgésico y antidepresivo, pero ningún estudio se ha realizado contra los agentes patógenos de las plantas. Los extractos de las hojas de mostraron un alto nivel de efecto anti microbiana contra la *Agrobacterium tumefaciens* y el *Bacillus subtilis*. Este extracto también se utiliza para tratar la ceguera y el reumatismo. Otros efectos medicinales del aceite de corteza se conocen para tratar las úlceras, uretritis, verrugas, heridas y enfermedades venéreas. (Ayala, Nielsen & Bravo, 1980). El “molle” a la vez se emplea en las llamadas “limpias” o “barridos”, para curar el mal de aire, susto y espanto en algunas culturas (CONAFOR, 2012).

En la industria textil las hojas, ramas, corteza y raíz se han empleado para el teñido amarillo pálido de tejidos de lana. Por otro lado, se considera que las

semillas contienen aceites de los cuales se obtiene un fijador que se emplea en la elaboración de perfumes, lociones, talcos y desodorantes. Su ceniza rica en potasa se ha usado como blanqueador de ropa. Además, en la industria maderera esta especie se ha utilizado para fabricar implementos de trabajo, tales como mangos de herramientas, estacas, enseres rurales y fustes de sillas de montar. Además, la resina se ha empleado en la fabricación de barnices (Batis, 1999).

### **2.2.2. Aceites Esenciales:**

#### **❖ Características**

Los aceites esenciales son compuestos vegetales que debido a su consistencia son muy volátiles y de olor intenso. Se incluyen dentro de este grupo solamente aquellas especies de plantas medicinales que las contienen en concentraciones elevadas, entre 0,1 y 10 %.

Después de haber triturado un pétalo de flor, una ramita o cualquier parte de una planta, un fragante emerge, significa que se libera un aceite esencial. (García, 1988)

Según Elsa y Col, 2006, los aceites esenciales, esencias, también conocido como son mezclas de sustancias aromáticas producidas por muchas plantas y presentar en forma de pequeñas gotas en las hojas, frutos, resina, las ramas, la piel de madera. Están presentes en pequeñas cantidades en comparación con la masa de la planta: son altamente volátiles y aromáticas, es decir que evapora rápidamente en el aire. Los estudios in vitro e in situ reportados en frutas, hortalizas y lácticos, han indicado que se requieren muy bajas concentraciones para lograr un efecto bioconservador.

Los aceites esenciales líquidos a temperatura ambiente, y por su volatilidad, han sido extraíbles por destilación en corriente de vapor de agua, aunque existen otros métodos. (Orlando, 2004). En general se han considerado como los responsables del olor de las plantas, además pueden encontrarse y obtenerse de diferentes órganos: raíz, rizoma (jengibre), leño (alcanfor), hoja (eucalipto), fruto (anís), sumidades floridas. (Bruneton, 2001).



Es importante distinguir entre los aceites esenciales, aceites fijos y grasas en la planta. De hecho:

- Solo los aceites esenciales son volátiles, lo que los diferencia de los aceites y grasas fijos.
- Se distinguen de los aceites fijos por sus composiciones químicas y características físicas.
- Se asocian frecuentemente con otras sustancias como encías y resinas.
- Además, ellos mismos tienden a resinificarse por exposición al aire.

Así tenemos que, para la albahaca, hierbabuena, menta, romero o salvia, se utilizan las hojas, mientras que son las raíces las que se emplean en el caso de la angélica, valeriana o vetiver, los frutos para pimienta y nuez moscada; las semillas para anís, omíno, hinojo. Y las flores para rosa, manzanilla o lavanda. (Matsuo, et al., 2012).

### ❖ **Propiedades físico-químicas de los aceites esenciales**

#### **Propiedades físicas**

Los aceites esenciales tienen en común una serie de propiedades físicas (Lagos, 2012):

- Son solubles en alcohol, éter, cloroformo, aceites fijos, emulsionantes y en la mayoría de los solventes orgánicos y poco solubles en agua a los que, sin embargo, comunican su olor.
- Su punto de ebullición varía de 160 ° C a 240 ° C.
- Su densidad es generalmente más baja que la del agua, varía de 0.75 a 0.99 (los aceites esenciales de sazafrán, clavo de olor o canela son excepciones).
- Tienen un alto índice de refracción.
- Son dextrogiros o levógiros, raramente inactivos en la luz polarizada.
- Disuelve las grasas, el yodo sufre fósforo y reduce ciertas sales.
- Son perfumes, y están limitados en su conservación.
- Son muy resistentes a la intemperie y sensibles a la oxidación (pero no rancio).

- Son sustancias de consistencia oleosa, más o menos fluida o incluso retinoide, muy olorosa y volátil.
- A temperatura ambiente, generalmente son líquidos, incoloros o de color amarillo pálido, pero hay algunas excepciones.
- Son estimulantes, se usan tanto en interiores como fuera del cuerpo, a veces puros. Generalmente disuelto en alcohol o un solvente adecuado.

### **Propiedades químicas de los aceites esenciales**

La determinación de la composición química ha interesado a muchos investigadores y los métodos de análisis químicos más sofisticados han permitido identificar una gran cantidad de constituyentes de aceites esenciales. Los aceites esenciales son mezclas más o menos complejas cuyos componentes desempeñan el papel de perfume de importancia desigual: algunos contribuyen poderosamente al aroma de la esencia, otros simplemente participan en la armonía de la mezcla, de otros son completamente inodoros o sin olor.

Los componentes de los aceites esenciales pertenecen casi exclusivamente a dos grupos caracterizados por distintos orígenes biogénicos: el grupo Terpenoide por un lado y el grupo de compuestos aromáticos derivados del fenilpropano, mucho menos común, por otro lado. Los compuestos terpénicos proceden de la condensación del isopropeno y pueden o no tener oxígeno. Los que carecen de oxígeno son hidrocarburos: monoterpenos y sesquiterpenos. que pueden ser aromáticos y alifáticos. (Zekari Dan, 2006).

Los monoterpenos y sesquiterpenos de 10 y 15 átomos de carbonos derivados de geranilpirofosfato (GPP) y farnesilpirofosfato (FPP) respectivamente, de acuerdo con su estructura se les clasifica según el número de ciclos como acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, etc.

La composición del aceite esencial del *Schinus molle* Linneo es básicamente de terpenos, siendo los monoterpenos los de mayor abundancia. Pero existen muchos compuestos en este aceite, variando tanto en su composición como en el contenido de los mismos. Las composiciones químicas de los aceites

esenciales extraídos de plantas aromáticas dependen de varios factores: los factores geográficos (ubicación), los factores ecológicos (hábitat), siendo el clima y la calidad de suelo muy importantes en estos dos últimos, la variabilidad genética (genotipo), la extracción específica de la parte de la planta (raíz, fruto, hoja, etc.), el pre-tratamiento que se realice al material herbáceo (lavado, secado, molienda) y finalmente el proceso de extracción. (Milojević et al., 2008)

**Monoterpenos:** Los terpenos de función aldehídos se hallan distribuidos ampliamente en las plantas especialmente valiosas por sus propiedades aromáticas y considerándose un índice de calidad en el valor de los aceites esenciales, muchos de los monoterpenos experimentan cierre de anillo produciendo ácidos cíclicos insaturados. Los principales monoterpenos responsables del aroma son alcoholes y aldehídos.

**Sesquiterpenos:** Los sesquiterpenos tienen propiedades débiles y son menos volátiles, tienen una densidad aproximada de 0.9 g/ml, su viscosidad es mayor que la de los monoterpenos.

### **Serie aromática**

**Fenilpropanos:** son sustancias naturales ampliamente distribuidas en los vegetales caracterizados por un anillo aromático unido a una cadena de 3 carbonos y derivados biosintéticamente del ácido shikimico.

### **Síntesis fitoquímicos**

El análisis fitoquímico destaca la presencia de las familias de la molécula activa, es una prueba cualitativa que permite destacar los compuestos químicos encontrados en una planta u otros productos tales como: flavonoides, taninos, alcaloides, saponinas, antraquinonas. (González, 2009).

### **Taninos**

Comúnmente conocidos como "Taninos" de sustancias de origen vegetal, no fenólico de poli estructura nitrogenada, soluble en agua, alcohol, acetona, poco soluble en éter, sabor astringente.

### **Clasificación de los taninos:**

Hay dos categorías de taninos, de diverso origen biogénico: taninos hidrolisables y taninos condensados,

**Taninos hidrolizables:** son ésteres de un azúcar, un fenol, derivados de ácido o ácidos fenoles; la molécula de carbohidrato es la glucosa general, pero en algunos casos de polisacáridos. Se divide en: Galio taninos y Elagio taninos

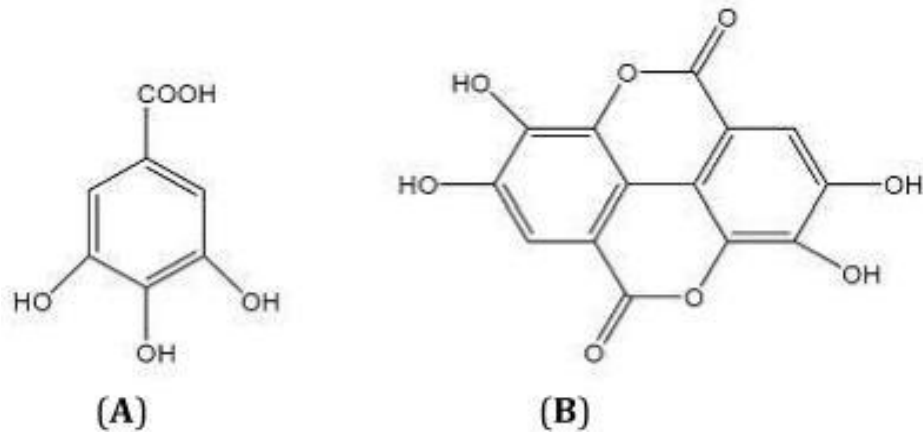


Figura 2: Estructura química del ácido gálico (A) y (B) elágico.

**Taninos condensados:** son una clase de flavonoides (sintetizados por las plantas por la "vía biosintética de los flavonoides") que son los pigmentos principales de muchas semillas. Son polímeros formados por unidades de antocianidina (un flavonoide), cuenta de 2 a 20 unidades.

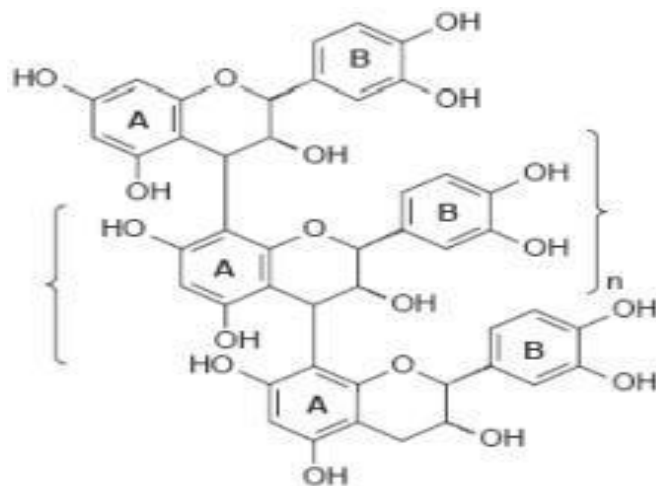


Figura 3: Estructura de base de datos de taninos condensados

## Flavonoides

El flavonoide del término del latín "flavus", lo que significa "amarillo", se refiere a una gama muy amplia de compuestos naturales pertenecientes a la familia de los fenoles de la poli. Se consideran pigmentos vegetales, casi universal. Casi siempre se encuentra disuelto en las vacuolas como glucósidos, soluble en agua. Son responsables de la coloración de las flores de fruta y a veces las hojas.

### Clasificación y estructura

Los flavonoides tienen origen biosintético común que explica el hecho de que tienen la misma básica a 15 átomos del esqueleto de carbono, que consta de dos unidades aromáticas, dos ciclos en C6 (A y B), conectados por una cadena a C3. Se pueden agrupar en varias clases según el grado de oxidación del núcleo central tiránico. Flavonas, flavanoles, flavanonas, antocianidinas, isoflavonas.

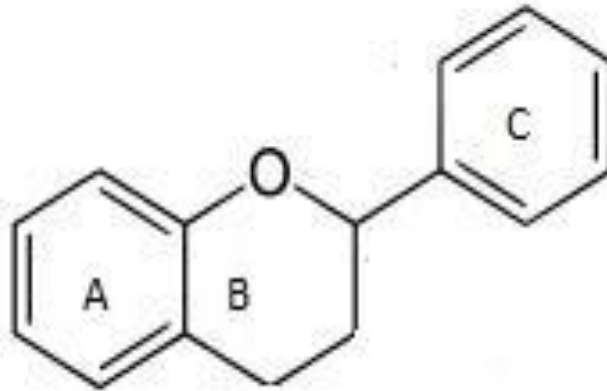


Figura 4: Estructura del flavonoide

## Alcaloides

Los alcaloides son sustancias de origen biológico y a menudo (son raros en el reino animal), de sustancias nitrogenadas, reacción alcalina (alcaloides + sales ácidas). Sus nombres a menudo terminan con "INE". Alcaloides siempre contienen carbono, hidrógeno y nitrógeno y más a menudo y más oxígeno (excepcionalmente algunos alcaloides contienen azufre). Alcaloides, por lo tanto son productos de aminoácidos naturales que tienen efectos fisiológicos sobre el cuerpo humano.

## Saponinas

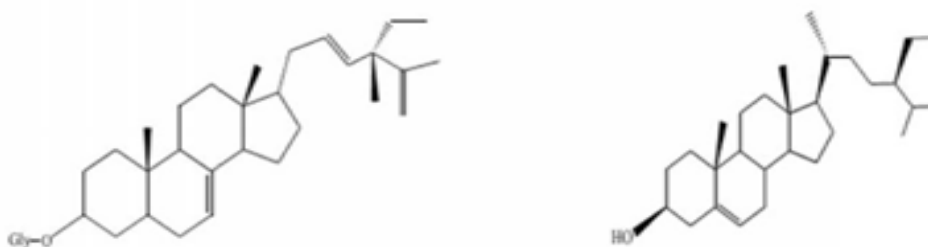
Las saponinas son generalmente conocidas como compuestos no volátiles, tensados y activos, que se distribuyen principalmente en el reino vegetal. El nombre "saponina" se deriva de la palabra latina *sapo*, que significa "jabón". De hecho, las moléculas de saponina en agua forman una solución espumosa.

## Estructura y clasificación

Estructuralmente, saponinas pueden clasificarse en dos grupos según la naturaleza de la saponina esteroide, genuino y tipo de patrón de saponina.

## Esteroides, esterol y terpenoides

Los esteroides, esterol y terpenoides son, sin duda, los metabolitos vegetales más conocidos e incluyen varios subgrupos. Los esterol desempeñan un papel importante en la calidad de las grasas y los aceites. Están en forma de alcoholes libres (por ejemplo: sitosterol), o en forma de ésteres asociados con glucosas (ejemplo: esterol glucósidos)



*Figura 5: Glucósido de esterol y Sitosterol.*

El análisis fitoquímico del molle revela que la planta de molle contiene taninos, alcaloides, flavonoides, saponinas, esteroides, esterol, terpenos, gomas, resinas, y aceites esenciales.

Tabla 1: Compuestos químicos del aceite esencial de *Schinus molle* L. (Molle).

<b>COMPONETES</b>	<b>CANTIDAD</b>
<b><math>\alpha</math> – Pineno</b>	<b>11.9 %</b>
Canfeno	0.24 %
Sabineno	0.67 %
<b><math>\beta</math>-Pineno</b>	<b>13.53 %</b>
<b><math>\beta</math>-Mirceno</b>	<b>30.12 %</b>
<b><math>\alpha</math>-Felandreno</b>	<b>26.42 %</b>
P-Cimeno	1.24 %
<b>Limoneno</b>	<b>9.85 %</b>
<b><math>\beta</math>-Felandreno</b>	<b>5.67 %</b>
Octanoato de metilo	0.43 %
$\beta$ -Elemeno	0.16 %
$\alpha$ - Gurjuneno	0.28 %
B-Cariofileno	0.46 %
$\alpha$ -Humuleno	0.12 %
Biciclogermacreno	0.38 %
$\beta$ -Cadineno	0.17 %

Fuente: Extracción y Caracterización del aceite esencial *Schinus molle* L. (Molle). Carrasco 1998.

#### ❖ **Propiedades biológicas de los aceites esenciales**

Desde la antigüedad, las especies aromáticas y sus aceites esenciales se han empleado en preparaciones culinarias no sólo como agentes saborizantes y aromatizantes, sino también como conservantes naturales en alimentos y en otros productos, donde los aceites esenciales pueden detener, prevenir o inhibir el deterioro oxidativo y los daños causados por bacterias, hongos u otros microorganismos. De esta manera, y debido a la creciente presión de los consumidores, actualmente las industrias de alimentos y cosméticos han disminuido el uso de conservantes sintéticos en

sus productos, reemplazándolos por sustancias de origen natural (Vargas y Bottia, 2008).

### **Actividad antioxidante**

En muchos estudios sobre especies vegetales se ha aislado una amplia variedad de compuestos antioxidantes fenólicos lo cual los coloca en la categoría de los antioxidantes más interesantes y promisorios, en general flavonoides. Estos antioxidantes son sustancias importantes en el área de farmacología, principalmente por su capacidad de contrarrestar la formación de radicales, cuya influencia se ve reflejada en las propiedades que poseen, así como antivirales, antialérgicas, anti-inflamatorias, antimicrobianas, etc. Cabe resaltar que la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos presentes en las plantas aromáticas depende de su estructura y, particularmente, del número y la posición el grupo hidroxilo (Díaz, 2007).

### **Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales**

Desde hace más de tres décadas se ha descrito a los fungicidas de origen natural, como agentes de gran capacidad biodegradable y de efectos secundarios menores, en comparación a los fungicidas comúnmente comercializados (Dikshit et al., 1986). Así por ejemplo, se ha comprobado que al incorporar aceite esencial de árbol de té en recubrimientos a base de polímeros derivados de la celulosa constituye una alternativa eficaz para el control en pos cosecha de *Penicillium italicum* en naranjas (Sánchez et al., 2007). También, el aceite esencial de jengibre puede ejercer una acción antimicrobiana sobre el *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis* (Vásquez et al., 2001). El aceite esencial de la “hierba de limón” (*Cymbopogon citratus*) mostró una notable actividad antifúngica frente a *Trichophyton rubrum* (la formulación desarrollada resultó no irritante y se propuso usar como antidermatofítica) (Guerra et al., 2004). Para la evaluación de las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales se aplican los métodos convencionales de ensayo para antibióticos. Existen dos



técnicas básicas usadas, el método de difusión en agar y el método de diluciones (Vargas y Bottia, 2008).

### **Aplicaciones de los aceites esenciales en la industria**

Los aceites esenciales tienen un amplio rango de aplicación en la industria. La figura N° 01, proporciona una vista general de su uso en las diferentes ramas de consumo. El tipo de aceite esencial y su calidad final determinarán en qué producto será incorporado; los aceites pueden ser empleados como materia prima en diferentes tipos de industria en general, cosmética, alimenticia, bebidas, textil, etc.; mientras que en otras industrias, como la farmacéutica, se pueden usar productos aislados de las mismas esencias (Díaz, 2007).

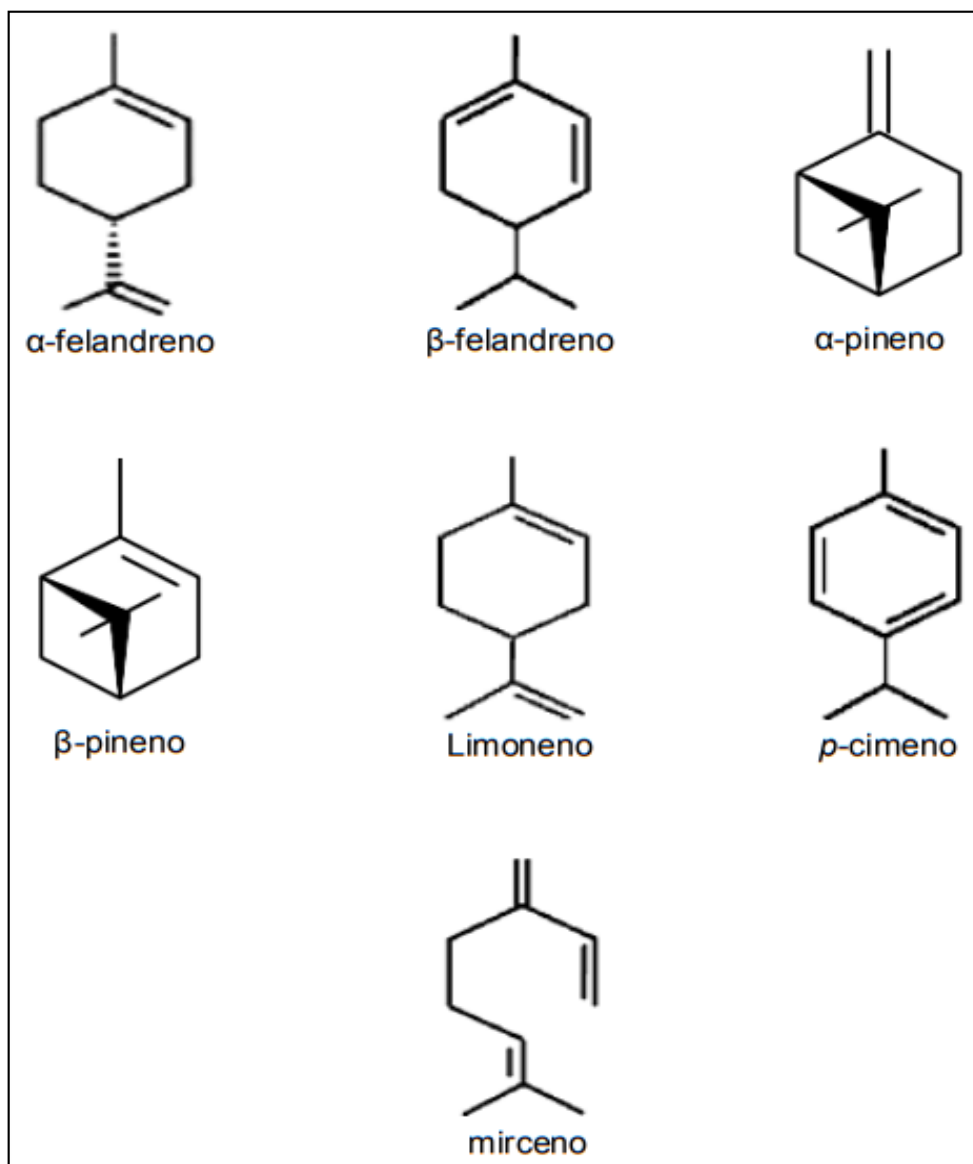
#### **2.2.3. Metabolitos secundarios volátiles reconocidos en el aceite esencial**

Dikshit et al. (1986) reconoció la presencia de mirceno,  $\alpha$ -felandreno,  $\beta$ -felandreno, p-cimeno,  $\beta$ -cariofileno y D-limoneno, como componentes mayoritarios del aceite esencial obtenido de las hojas del molle.

Según Viturro et al. (2010) en muestras de aceite esencial de molle de Costa Rica, Brasil, Ecuador, Perú, Bolivia y Argentina; en dicho resumen se puede notar que los compuestos  $\alpha$ - felandreno,  $\beta$ -felandreno,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, limoneno, p-cimeno y mirceno son los más comunes:

- ◆  $\alpha$ -felandreno: Fórmula química: C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>.  
Nombre IUPAC: 2-methyl-5-(1-methylethyl)-1,3-cyclohexadiene.
- ◆  $\beta$ -felandreno: Fórmula química: C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>.  
Nombre IUPAC: 1-isopropil-4-metil-2,4-ciclohexadieno.
- ◆  $\alpha$ -pineno: Fórmula química: C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>.  
Nombre IUPAC: 2, 6, 6- trimetilbiciclo.
- ◆  $\beta$ -pineno: Fórmula química: C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>.  
Nombre IUPAC: 6,6-dimetil-2-metilenebiciclo [3.1.1] heptano.
- ◆ Limoneno: Fórmula química: C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>.  
Nombre IUPAC: 4-isopropenil-1-metilciclohexeno.

- ◆ P-cimeno: Fórmula química: C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>.  
Nombre IUPAC: 6,6-dimetil-2-metilenebicyclo [3.1.1] heptano.
- ◆ Mirceno: Fórmula química: C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>.  
Nombre IUPAC: 7-metil-3-metileno-1,6-octadieno.



Fuente: Nobre et al. (2000), Palá (2002), Quiminet (2009)

Figura 6: Estructura molecular de los componentes volátiles más comunes del aceite esencial de *Shinus molle* (molle).

#### **2.2.4. Métodos de obtención de aceites esenciales**

Los aceites esenciales se localizan en diferentes partes de la planta, dependiendo de la especie, algunos suelen localizarse en glándulas aceitosas, sacos de aceite, venas o en los cabellos glandulares, de donde pueden ser extraídos utilizando vapor de agua. Para facilitar tal proceso extractivo, y de esta forma, aumentar el rendimiento del aceites esenciales , generalmente, se hace necesario un tratamiento previo de la planta antes de su destilación, el cual depende del tipo de material vegetal con que se vaya a trabajar (Güenther, 1955); (Muñoz, 1987). Las hojas, flores y partes no fibrosas de la planta, pueden ser sometidas a destilación sin tratamiento previo, mientras que las raíces, tallos y plantas leñosas deben ser cortados en pequeños trozos, antes de ser sometidos al proceso extractivo (Güenther, 1955). El almacenamiento y secado del material vegetal se debe llevar a cabo en un ambiente seco y a temperaturas bajas, para minimizar pérdidas por evaporación y evitar procesos de oxidación y resinificación. El secado se lleva a cabo en desecadores bajo techo para evitar el contacto directo del material vegetal con los rayos solares (Güenther, 1955) (Muñoz, 1987). Existen diferentes métodos de obtención, los principales métodos utilizados para obtener aceites esenciales a partir de plantas aromáticas (Bandoni, 2000) son los siguientes:

##### **❖ Destilación con agua (hidrodestilación)**

Este método consiste en llevar a estado de ebullición una suspensión acuosa del material vegetal, de tal manera, que los vapores generados puedan ser condensados y colectados. El aceite, que es inmisible en agua, es posteriormente separado. Esta técnica es sencilla, pero de mucha precaución, ya que durante este proceso el aceite se somete a la acción de altas temperaturas, las cuales pueden ocasionar procesos indeseables, como la polimerización y resinificación de los terpenos, así como la hidrólisis de los ésteres (Schreier, 1984).

La **hidrodestilación**, asimismo, es el método normativo para la extracción de un aceite esencial, así como para control de calidad. El principio de la

destilación hidráulica es una destilación heterogénea. El proceso es sumergir la planta de crudo en un baño de agua. Todos entonces se trae a ebullición generalmente la presión atmosférica como se muestra en la figura 9. (Bandoni, 2000).

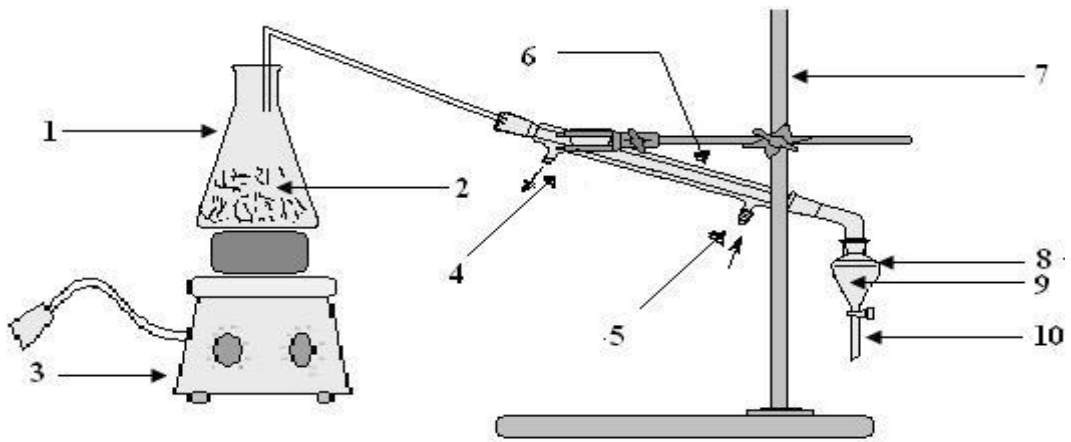


Figura 7: Instalación de la destilación hidráulica

- |                            |                             |
|----------------------------|-----------------------------|
| 1 - Botella Erlenmayer     | 6 - Refrigerante            |
| 2 - Agua y planta.         | 7 - Soporte de refrigerante |
| 3 - Calentador             | 8 - Aceite esencial         |
| 4 - Control de temperatura | 9 - Agua aromática          |
| 5 - Entrada de agua        | 10 - Bulbo                  |

#### ❖ Destilación por arrastre con vapor

La destilación por arrastre con vapor o destilación con vapor seco, que se emplea para extraer la mayoría de los aceites esenciales es una destilación de mezcla de dos líquidos inmiscibles y consiste, en una vaporización a temperaturas inferiores a las de ebullición de cada uno de los componentes volátiles por efecto de una corriente directa de vapor (Bandoni, 2000). En esta técnica el vapor de agua ligeramente sobrecalentado, proveniente de un generador, se hace llegar hasta el recipiente que contiene la planta, de donde arrastra los componentes volátiles que luego se condensan obteniéndose así una mezcla de agua y aceite, de la cual el AE se separa fácilmente por simple decantación, como se muestra en la figura 10. (Güenther, 1955) (Schreier, 1984) (Denny, 1989).

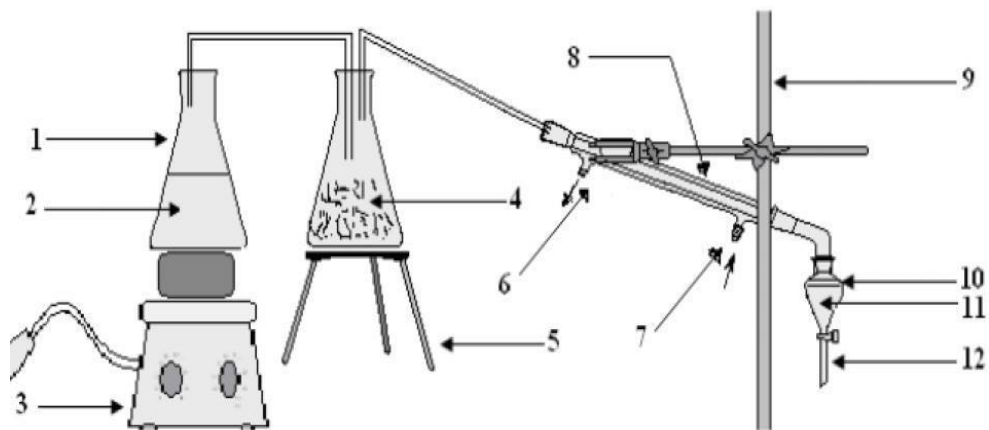


Figura 8: Montaje de la formación de vapor de agua

- |                             |                             |
|-----------------------------|-----------------------------|
| 1- La botella de Erlenmeyer | 7- Entrada al agua          |
| 2- Agua                     | 8- Refrigerante             |
| 3- Ballón calentador        | 9- Soporte del refrigerante |
| 4- Planta                   | 10- Aceite esencial         |
| 5- Soporte de Erlenmeyer    | 11- Agua aromática          |

#### ❖ Destilación con agua y vapor

En este caso, el vapor se genera dentro del propio cuerpo del alambique, donde el material vegetal se encuentra suspendido sobre un tramado (falso fondo) que impide el contacto del material vegetal con el medio líquido en ebullición. En comparación con la hidrodestilación, este sistema reduce la capacidad neta de carga de materia prima dentro del alambique, pero mejora la calidad del aceite obtenido (Bandoni, 2000).

#### ❖ Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas

Esta técnica fue inicialmente patentada en Canadá, por el Dr. J. Paré y sus colaboradores, en 1991 [Paré, 1991; 1992]. Para la extracción de los AE mediante MWHD, el material vegetal se sumerge al agua y se somete a la acción de la radiación de microondas, que, al calentar el agua hasta ebullición, produce vapores que atraviesan las estructuras celulares y permiten la expulsión del AE contenido en ellas, luego, el AE arrastrado por el vapor de agua, se condensa y se colecta (Kingston & Jassie, 1988) (Europa Patente nº 0485668A1, 1992).

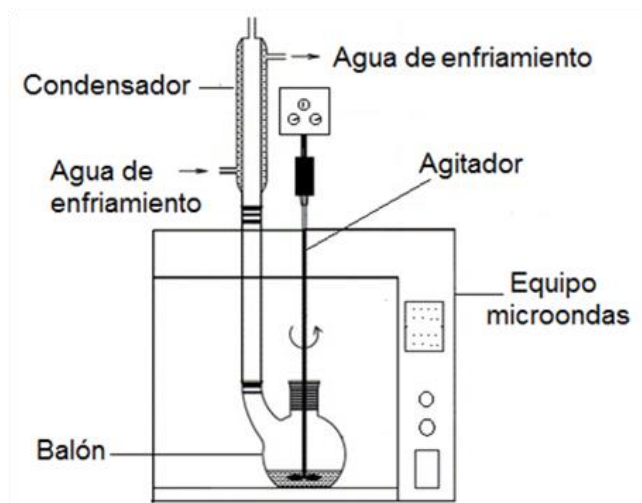


Figura 9: Extracción asistida por microondas.

### ❖ Extracción por sustancias grasas

El método de extracción de grasa se utiliza en la floración en el tratamiento de partes frágiles de plantas como las flores, que son muy sensibles a la acción de la temperatura. Hace uso de los componentes olorosos liposolubles de las plantas en la grasa. El principio es poner las flores en contacto con una sustancia grasa para saturarla con esencia vegetal. El producto obtenido es una pomada floral que luego se agota con un disolvente que se elimina a presión reducida. En esta técnica, se puede distinguir la infusión donde la saturación se realiza por difusión a la temperatura ambiente de los aromas hacia el cuerpo graso y la digestión que se practica con el calor, por inmersión de los órganos vegetales en el cuerpo graso. (Güenther, 1955) (Jennings & Rapp, 1983).



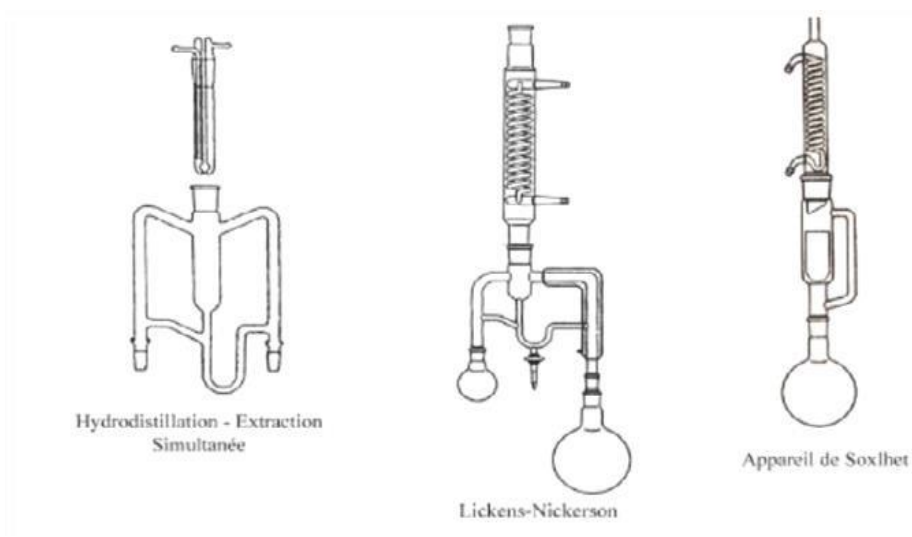
Figura 10: : Técnica de extracción de grasa.

### ❖ **Extracción con solventes**

La técnica de extracción por solvente consiste en colocar en un extractor un solvente volátil y el material vegetal a tratar. A través de sucesivos lavados, el solvente cargará moléculas aromáticas, antes de ser enviado al concentrador para ser destilado a presión atmosférica.

El producto así obtenido se llama "concreto". Este concreto se puede elaborar con alcohol absoluto, filtrado y helado para extraer las ceras vegetales. Después de una última concentración, obtenemos un "absoluto".

- Los rendimientos son generalmente más altos en comparación con la destilación.
- El uso de disolventes orgánicos que pueden conducir al riesgo de artefactos y posibilidad de contaminación de la muestra por impurezas a veces difíciles de eliminar.
- La elección del disolvente: metanol, etanol, éter de petróleo o diclorometano.
- Esta técnica de extracción se ha combinado recientemente con microondas y ultrasonidos. (Sandra & Bichhi, 1987).



*Figura 11: Los diferentes tipos de extracción de disolventes volátiles*

### ❖ **Extracción con fluidos en estado supercrítico**

El principio básico para la extracción con fluidos en estado supercrítico es el cambio de propiedades de transporte y solubilidad que presenta un

solvente en este 20 estado. El poder disolvente del CO<sub>2</sub> supercrítico es mayor para compuestos menos polares y con masa molecular pequeña. De esta manera, son muy solubles en fluido supercrítico CO<sub>2</sub> los aromas, los terpenos y los lípidos debido a su baja polaridad. Otros compuestos que pueden ser medianamente solubles, a condición de que su masa molecular sea pequeña son el agua, los ácidos grasos, alcoholes, cafeína, nicotina, colesterol, etc. (Bandoni, 2000) (Dean, 1998).

### **2.2.5. Métodos de análisis de calidad de los aceites esenciales**

Los aceites esenciales son mezclas fragantes cuya calidad y precio en el mercado están determinados principalmente por su composición química, por el contenido de las sustancias de interés, y por las propiedades fisicoquímicas y organolépticas que posee. De esta manera, el control de calidad de un aceite esencial tiene como objetivo garantizar que la esencia conserve determinadas características analíticas.

#### **❖ Cromatografía en fase gaseosa**

El principio de la GC está basado en la volatilización de la muestra en el puerto del inyector y la separación de los componentes en una columna que soporta la fase estacionaria, mientras que los componentes de la muestra son arrastrados por la fase móvil; a la salida de la columna cada componente es registrado por un detector bajo la forma de picos, que deben ser simétricos y sin superposición. La separación de componentes se lleva a cabo en virtud de la diferencia de sus coeficientes de distribución entre dos fases, los cuales dependen de su estructura, de la naturaleza de las fases (móvil o estacionaria) y de la temperatura de la columna cromatográfica. Los resultados son cuantitativos y se obtienen en un espacio de tiempo relativamente corto. Las únicas desventajas radican en que los componentes de las muestras deben ser estables a la temperatura de operación y de naturaleza volátil, para lo cual es necesario hacer un tratamiento preliminar de las muestras, lo que puede convertir el proceso en difícil y complejo (Vargas y Bottia, 2008).



### ❖ **Espectrometría de masas**

La Espectrometría de masas es una de las técnicas analíticas más completas que existen, ya que proporciona un espectro característico de cada molécula, permite medir la concentración de las sustancias y proporciona información estructural sobre la molécula analizada. Dentro del espectrómetro de masas, se procede a la ionización de la muestra mediante diferentes métodos. El sistema de ionización más frecuente es el de impacto electrónico que bombardea las moléculas con electrones de una cierta energía, capaces de provocar la emisión estimulada de un electrón de las moléculas y así ionizarlas. Además de moléculas ionizadas o iones moleculares ( $M^+$ ) también se forman iones fragmento, debido a la descomposición de los iones moleculares con exceso de energía, el tipo y proporción relativa de cada uno de estos fragmentos es característico de las moléculas analizadas y de las condiciones del proceso de ionización. Una vez ionizadas las moléculas, se aceleran y se conducen hacia el sistema colector mediante campos eléctricos o magnéticos. La velocidad alcanzada por cada ión será dependiente de su masa. La detección consecutiva de los iones formados produce el espectro de masas de la sustancia, que es diferente para cada compuesto químico y que constituye una identificación del compuesto analizado. El espectro de masas puede almacenarse en la memoria del ordenador para compararse con los espectros de una colección de espectros (o librería) y proceder a su identificación o puede estudiarse para averiguar la naturaleza de la molécula que le dio origen (Gutiérrez y Droguet, 2002).

### ❖ **Cromatografía de gases con detector de ionización de llama**

El detector de ionización de llama, FID (Flame Ionization Detector), es uno de los detectores más usados y versátiles, básicamente, es un quemador de hidrógeno/oxígeno, donde se mezcla el efluente de la columna (gas portador y analito) con hidrógeno. Inmediatamente, este gas mezclado se enciende mediante una chispa eléctrica, produciéndose una llama de alta

temperatura. La mayoría de compuestos orgánicos al someterse a altas temperaturas se pirolizan y producen iones y electrones, que son conductores eléctricos; este hecho se aprovecha estableciendo una diferencia de potencial de unos centenares de voltios entre la parte inferior del quemador y un electrodo colector situado por encima de la llama. La corriente generada es baja (del orden de los 10-12  $\text{\AA}$ ), por lo tanto debe ser el proceso de ionización que se da en la llama es complejo, pero se puede aproximar el número de iones producidos al número de átomos de carbono transformados en la llama que salen de la columna. Esto produce que sea un detector sensible a la masa más que a la concentración, por lo tanto no afectan demasiado los cambios en el flujo de salida. Existen algunos grupos funcionales que no dan respuesta en este detector, como el carbonilo, alcohol, halógeno y amina, tampoco responden gases no inflamables como el  $\text{CO}_2$ ,  $\text{SO}_2$ , agua y óxidos de nitrógeno; este hecho más que limitar el ámbito de aplicación del detector, permite el análisis de muestras contaminadas con alguno de los compuestos mencionados. La aplicación de este método permite una alta sensibilidad de 10-13 g/s, un gran intervalo lineal de respuesta (de  $10^7$ ), y un bajo ruido. Por lo general, es resistente, de bajo mantenimiento, y fácil de utilizar (Villa, 2011). Amplificada mediante un amplificador de alta impedancia.

#### **2.2.6. Actividad antibacteriana in vitro**

Estudios reportados han demostrado que, el aceite esencial de *Schinus molle* L. posee actividad antibacteriana contra cepas Gram (+), como: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, además especies de la misma familia Anacardiaceae de *Schinus molle*, mostraron efectos ante *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mutans*. *Schinus molle* a la vez posee efectos antimicrobianos sobre Gram (-) tales como: *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus vulgaris*, de igual manera, se ha evaluado las propiedades antifúngicas frente a *Cándida albicans* y *Aspergillus niger*. Se puede añadir estudios que han

determinado el efecto citotóxico ante células tumorales. Cabe recalcar que todas las investigaciones mencionadas han sido realizadas siguiendo las normas de antibiogramas establecidas en la literatura, misma metodología que se toma en consideración en el presente estudio. (Pauli, 2001); (Gonzalez, 2009); (Gualtieri, 2012); (Molinari, 2013); (Carvalho, 2013); (Álvarez & Boquet 1996); (Cedamanos & Mejía, 2014).

❖ **Generalidades de las bacterias Gram positivos y Gram negativos**  
***Escherichia Coli* (ATCC 29522)**

Son cepas con características fenotípicas y genotípicas definidas que son empleadas como control para las determinaciones microbiológicas. La norma ISO 17025:1999 se refiere a los requerimientos generales que concierne a los laboratorios de ensayos y su respectiva calibración,; siendo una norma internacional que establece que este tipo de laboratorios deben de usar un buen sistema de calidad, que sean técnicamente adecuados y son preparados para formar resultados lo más técnicamente posible y válidos, La estructura y mantenimiento del cepario dispondría de un conjunto de cepas de referencia con una confiable información, usándose en las diferentes áreas de la ciencia y la tecnología. Su almacenamiento permite tener estabilidad y reproducibilidad de características típicas, morfológicas, bioquímicas, fisiológicas y serológicas de cada una de ellas (Hernández y col., 2003).

Dominio: Bacteria o Eubacteria

Filo: Proteobacteria

Clase:  $\gamma$ - Proteobacteria

Orden: Enterobacteriales

Familia: Enterobacteriaceae

Género: *Escherichia*

Especie: *Escherichia coli*

Fuente: Manual de Bergey's. 2005.

## **Caracterización morfológica y bioquímica**

Es un bacilo que reacciona negativamente a la tinción de Gram (Gram negativo), es anaerobio facultativo, móvil por flagelos peritricos (que rodean su cuerpo), no forma esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa (Hernández y col., 2003). Su pared celular es del tipo didermo y está constituida por la membrana citoplasmática, una capa fina de peptidoglicano, entre ambas se encuentra el espacio periplásmico o periplasma, por encima se sitúa la membrana citoplasmática externa constituida por una bicapa de fosfolípidos intercalada con distintos componentes como el lipopolisacárido (LPS), lipoproteínas y porinas (Mandell y col., 2005). *E. coli* produce reacciones positivas para el rojo de metilo, indol, lisina descarboxilasa, fermenta el manitol y produce gas a partir de la glucosa (Mandell y col., 2005). Se trata de un enterobacteria catalasa positiva, oxidasa negativa, reduce el nitrato a nitrito, siendo negativa la reacción de ureasa y fenilalanina desaminasa (Mandell y col., 2005).

## **Enterobacterias**

La familia Enterobacteriaceae constituye un grupo grande y heterogéneo de bacterias Gram negativas. Reciben su nombre por la localización habitual como saprofitos en el tubo digestivo, aunque se trata de gérmenes ubicuos, encontrándose de forma universal en el suelo, el agua y la vegetación, así como formando parte de la flora intestinal normal de muchos animales además del hombre. *Escherichia coli*, el microorganismo más prevalente de esta familia, es el microorganismo de vida libre que mejor se ha estudiado. Estas bacterias pueden ser móviles (la mayoría) o inmóviles, la mayor parte de ellas fermentan la lactosa y son capaces de producir indol a partir de triptófano. (Mandell G.L., et al., 2006).

## **Historia**

Theodoro Von Escherich, pediatra y microbiólogo alemán, estudió en el año 1884 los microbios que se encontraban en el intestino infantil, a partir de sus heces, para establecer su rol en la digestión y la enfermedad. En el año 1885 publicó los resultados de su estudio, en cuyo reporte describe el

aislamiento y caracterización de bacterias de rápido crecimiento con forma de varas cortas y delgadas que llamó *Bacterium coli commune*. Aunque posteriormente el microorganismo fue descrito por varios otros investigadores con múltiples sinónimos, Escherich fue reconocido como el primero estableciéndose el nombre definitivo del microbio como *Escherichia coli*.

## **Epidemiología**

En los individuos hospitalizados o inmunodeprimidos (incluyendo los pacientes alcohólicos y diabéticos), en especial en los pacientes que reciben tratamiento antibiótico, hay colonización por Enterobacteriaceae, además de en el tubo digestivo, en la orofaringe, el aparato genitourinario y la piel. La infección por estas bacterias es frecuente en estos contextos. La proporción de aislados resistentes a múltiples antimicrobianos, incluidos aquellos que producen betalactamasas de espectro extendido (BLEE), ha aumentado de forma ininterrumpida, de modo que casi todos los aislados nosocomiales, y muchos de los aislados adquiridos en la comunidad, son ahora resistentes a varias clases importantes de antimicrobianos. Diferentes factores han contribuido al incremento de las infecciones por enterobacterias en nuestros hospitales: el uso cada vez mayor de técnicas diagnósticas y terapéuticas agresivas (catéteres intravenosos, endoscopias, intervenciones), el empleo de potentes inmunosupresores y las estancias hospitalarias prolongadas, entre otros.

## **Estructura de la membrana celular**

La envoltura celular se caracteriza por una estructura multilaminar. La membrana interna, llamada también como citoplasmática, se refiere a una doble capa de fosfolípidos con la función de regular el flujo de nutrientes, metabolitos y macromoléculas, mientras que la siguiente capa es la externa, se refiere a un peptidoglucano delgado con un espacio periplásmico que presenta una alta densidad de proteínas. La membrana externa compleja se refiere a otra doble capa de fosfolípidos que incluyen lipopolisacáridos

(LPS), se encuentra en la parte más externa y constituyen un factor importante de virulencia de estas bacterias. Las lipoproteínas se encuentran fijadas al peptidoglucano, son proteínas porinas multiméricas que ayudan al flujo de diversas sustancias, incluyendo a los antibióticos betalactámicos, y otras proteínas de la membrana externa. Entre estas proteínas hay algunas organelas complejas que están radiadas hacia el exterior; es decir, los flagelos que son estructuras usadas para la locomoción y que proceden de una disposición basal ubicada en la membrana interna, las fimbrias tienen una importante función como adhesinas, y los pili sexuales que son estructuras que están en las bacterias que presentan plásmidos conjugativos y que las bacterias usadas para mediar la transferencia conjugativa de ADN del plásmido.

#### **Patogenicidad por *Escherichia coli***

Contiene cuantiosos factores de virulencia, los cuales no están contenidos en todas las cepas. Así la mayoría de las cepas solo son capaces de producir infecciones en inmunodeprimidos, mientras que otras tienen factores específicos de virulencia (Prieto-Fraile, 1997)

#### **Infecciones intestinales**

Diferentes tipos de *Escherichia coli* causan distintos tipos de infecciones intestinales. Aunque el papel de esta bacteria como causante de diarreas infantiles se conoce desde hace muchos años, hasta hace poco no se ha identificado su papel como responsable en muchas ocasiones de la llamada diarrea de viajero (Jawetz y col, 2002)

***Escherichia coli* enterotoxigénica:** Una de las principales causas de deshidratación ocasionada por la diarrea en niños menores de dos años y de la diarrea del viajero son producidas por este tipo de bacteria, las cuales son adquiridas, generalmente, por personas provenientes de un país desarrollado quienes han visitado regiones tropicales con bajas y deficientes condiciones de higiene, presentando síntomas que tienden a ser leves con un tipo de diarrea acuosa; aunque raramente los síntomas podrían ser más complicados presentando fiebre alta, escalofríos y vómitos.

***Escherichia coli* enteropatógeno:** Este tipo de bacteria es una de las principales causas de diarreas en neonatos en países con deficientes

condiciones higiénicas, como ocurre en los países subdesarrollados. Aunque se han presentado raros casos de enfermedades en adultos en el mundo industrializado, siendo los síntomas más comunes como lesiones típicas en el área de la mucosa con la aparición de microcolonias que ocasionan la desaparición de microvellosidades adyacentes.

### **Infecciones hospitalarias**

En pacientes en estado de hospitalización clínica, la bacteria *Escherichia coli* puede colonizar el tracto respiratorio y la piel de los enfermos, al igual que otras enterobacterias o microorganismos ambientales. Esta colonización puede ser el origen de neumonías (por aspiración de secreciones respiratorias contaminadas), infecciones de heridas quirúrgicas, etc. En algunos casos, desde un foco de infección puede pasar a la sangre y originar bacteriemia y sepsis (Prieto - Fraile, 1997)

### **Infecciones respiratorias**

Las infecciones del tracto respiratorio suelen ser oportunistas. En los pacientes con enfermedades graves, la alteración de la fisiología permite la colonización de la vía respiratoria y gástrica. Generalmente, el cuadro clínico para esta enfermedad puede presentar síntomas característicos a los de una bronconeumonía, que suele afectar más a los lóbulos inferiores, con empiema afectando a un tercio de los pacientes y bacteriemia en el otro, teniendo una alta tasa de mortalidad, más del 50%, afectando más a las personas debilitadas.

### **Infecciones urinarias**

En una infección urinaria complicada, el principal huésped de bacterias alojadas en el aparato urinario es el *Escherichia coli* encontrándose también otros tipos de bacterias. Los síntomas de esta enfermedad producidas por estas bacterias presencia de un cuerpo extraño, sondaje vesical, obstrucción del flujo urinario normal llamado también hipertrofia prostática, anomalías congénitas.

En una infección urinaria, unas de sus principales causas son producidas por la bacteria de *Escherichia coli*. La mayoría de las infecciones urinarias no complicadas causadas ocurren en mujeres jóvenes, se debe a la penetración en la vejiga de las bacterias que colonizan la región periuretral (Prieto-Fraile, 1997).

La infección del tracto urinario (ITU) se distingue por la presencia de microorganismos patógenos dentro del sistema del tracto urinario, en el cual puede o no presentar síntomas. El origen bacteriano de la ITU es el más frecuente con cifras alrededor entre 80%-90%.

### **Etiología**

En la mayoría de los casos, aproximadamente 95%, existe un sólo microorganismo como responsable que causa la infección en el tracto urinario, siendo el agente etiológico más frecuente el *Escherichia coli*, generando entre el 75% a 80% de casos.

### **Bacteriemias**

*Escherichia coli* es uno de los microorganismos que con mayor frecuencia se aísla de hemocultivos, sobre todo en enfermedades con infección nosocomial. Estas bacteriemias pueden dar lugar a otras las bacteriemias por Gram negativos produciendo sepsis, y en último extremo a shock séptico desencadenando por la acción tóxica de la endotoxina o lipopolisacáridos capsular (Prieto-Fraile, 1997).

### **Septicemia**

Cuando las defensas normales del huésped son inadecuadas, la bacteria puede alcanzar el torrente sanguíneo y causar septicemia. Los recién nacidos a veces son muy susceptibles a la septicemia por *Escherichia coli* debido a que carecen de anticuerpos IgM. La septicemia también puede presentarse como consecuencia de infección del aparato urinario (Jawetz y cols. 2002).

La *Escherichia coli* se aísla de heces en medios como Mac Conkey o eosina azul de metileno (EMB) diferenciándose de las bacterias intestinales debido a características morfológicas y de afinidad a la lactosa. Es



importante resaltar, la identificación de este tipo de bacteria a nivel de especie usa procedimientos automatizados (Vitek). Para la tipificación en la serológica de *Escherichia coli* se identifican los diferentes tipos de antígenos, como son somáticos, flagelar y capsular.

Otro procedimiento en la identificación está basado en técnicas de recombinación genética que pueden permitir el desarrollo de sondas moleculares para la identificación de secuencias de genes relacionados con la producción de factores de patogenicidad de enterobacterias. Estas sondas están elaboradas con secuencias específicas de DNA marcado con fósforo radiactivo o con enzimas, que en un proceso de hibridación, reconocen secuencias de ADN complementario en las cepas problema.

Una técnica de biología molecular muy utilizada actualmente es la amplificación de secuencias específicas para un factor de virulencia (enterotoxinas, citotoxinas, adherencia, invasividad) de una cepa en particular por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

#### Tratamiento

El tratamiento para tratar los síntomas de una ITU depende del grado de complicación, teniendo en cuenta los factores de riesgos. Al momento de escoger el tratamiento más idóneo, debe de hacerse de una manera empírica hasta que se logren obtener los resultados del urocultivo y antibiograma, en el cual el médico debe de recetar un antibiótico efectivo sobre el agente que se cree que sea el sospechoso de estar produciendo esta enfermedad, cuyo fin en el tratamiento deben ser la adquisición de respuesta rápida y que sea bien efectiva, evitando la recurrencia y tratando en lo posible de resistencia a los antibióticos.

Recientemente, *Escherichia coli* viene presentando una creciente resistencia a los antibióticos tradicionales, tales la ampicilina, amoxicilina y

a las cefalosporinas de primera y segunda generaciones, en el cual estos no deberían ser utilizados en el tratamiento empírico de la pielonefritis. Unos de los antibióticos más usados son la ciprofloxacina y la norfloxacina. Sin embargo, el uso de fluoroquinolonas como terapia de primera línea para el tratamiento.

#### Prevención y control

Al momento de buscar un control general para las infecciones causadas por la cepa de *Escherichia coli*, se deben buscar en mejorar las condiciones higiénicas, sanitarias, ambientales, así como una debida adecuación y preparación de alimentos, claro sin dejar por fuera una buena higiene personal, para así evitar en contraer enfermedades. Estas deben medidas de aplicarse también en las hospitalarias para evitar posibles brotes. Adicionalmente, se desarrollan estudios en la búsqueda de productos inmunizantes con enterotoxinas y de elementos adherentes que contengan a las cepas de los diferentes grupos de E. coli asociadas con procesos diarreicos, los cuales pueden contribuir reducir la morbilidad producida por estas bacterias, caso particular como la población infantil y en los individuos que viajan de una zona de bajo riesgo de diarrea a una de alta prevalencia.

#### **2.2.7. Generalidades del Ciprofloxacino**

##### **❖ Descripción**

El agente Ciprofloxacino es un antibiótico amplio espectro antimicrobiano de la familia de las Fluoroquinolonas, es un poderoso medicamento que combate gérmenes Gram Negativos aerobios, que incluyen también agentes patógenos entéricos, como las *Pseudomonas* y *Serratia marcescens*, Además, es un agente que es activo frente a gérmenes Gram-positivos, pero recientemente se han observados que se ha formado resistencia en algunas cepas como son los *Staphylococcus aureus* y *pneumococos*. Es importante tener en cuenta que no es activo cuando se comprueban la existencia de bacterias anaeróbicas. En

ocasiones se usa combinándose con otros antibacterianos para tratar tratamientos de las infecciones por micobacterias (M. tuberculosis y MAC).

### **Mecanismo de acción**

Los efectos antibacterianos del antibiótico ciprofloxacino es gracias a su acción inhibitoria de la topoisomerasa IV y la DNA-girasa de tipo bacteriana. Estas topoisomerasas perturban el DNA encajando pliegues helicoidales de doble cadena, ayudando la facilitación del extendido de las cadenas. La DNA-girasa presenta dos subunidades codificadas por el gen *gyrA*, estas actúan quebrando las cadenas del cromosoma bacteriano, pegándolas posteriormente una vez creadas la supe hélice. Las quinolonas logran la inhibición de estas subunidades evitando cuando se replican y la transcripción del DNA bacteriano, pero desconoce con precisión debido a la acción de la DNA-girasa, la cual conlleva a la muerte de la bacteria. Es importante resaltar, que las células humanas presentan una topoisomerasa que procede de una manera similar a la DNA-girasa bacteriana, pero esta enzima generalmente no es afectada por las concentraciones bactericidas del ciprofloxacino.

**Farmacocinética:** El ciprofloxacino se suministra por vía intravenosa e oral, el absorbiéndose de una manera rápida en el tracto digestivo, lográndose probar un mínimo en el metabolismo de primer paso. En estudios se ha demostrado en ayunas se podría absorber como 70% de la dosis suministrada, que conlleva a concentraciones plasmáticas máximas en apenas de 30 a 150 minutos. Mientras que cuando se suministra con las comidas se retardan las concentraciones, pero de igual manera la absorción en total no es afectada. (CAF DIGEMID)

### **Indicaciones y Posología**

Las infecciones urinarias de grado moderadas no complicadas deben tratarse de la siguiente manera:

- ◆ Adultos se debe suministrar una dosis oral de 250-500 mg cada 12 horas de 7 a 14 días.
- ◆ En pacientes hospitalizados por lo general las dosis lo determina el médico tratante, pero por lo general se debe suministrar una dosis intravenosa de 200 mg cada 12 horas, según sea el caso.

En las infecciones urinarias graves y/o complicadas:

- ◆ Administración oral: Adultos: 500 mg cada 12 horas durante 7 a 14 días.
- ◆ Administración intravenosa: Adultos: 400 mg cada 12 horas.

### **Contraindicaciones**

Se debe evitar El ciprofloxacino en pacientes con hipersensibilidad a las quinolonas debido que producen artropatías al administrado experimental a animales inmaduros, haciéndose necesario precauciones sobre todo cuando se suministra en el área pediatría. Aunque, la incidencia es relativamente baja con valores cercanos a 1,5%, las cuales logran desaparecer una vez que se para el tratamiento. Se ha demostrado que estas fluoroquinolonas están relacionadas a rupturas de tendones, por lo cual se debe parar el tratamiento lo antes posible una vez que haya iniciado el tratamiento.

El ciprofloxacino se está dentro de la categoría C, catalogada como de alto riesgo en el embarazo, debido que atraviesa a la barrera de tiene la placenta, y es excretada en la leche materna, lo cual se recomienda no ser usada durante el embarazo o la lactancia.

### **Interacciones**

El ciprofloxacino minimiza el aclaramiento hepático de la cafeína y de la teofilina, en la cual se puede desarrollarse efectos tóxicos como náuseas y vómitos, ansiedad, nerviosismo, taquicardia o convulsiones. Se debe prestar atención en la interacción de una dosis-dependiente en que los individuos quienes consuman cafeína en grandes cantidades.

La absorción oral del de este antibiótico puede ser afectada de manera directa por sales de aluminio, calcio, hierro y cinc, aumentando la afectación en caso particular si se suministran una hora antes del antibiótico.

Un aumento en el tiempo de la protrombina y del INR en individuos que reciben tratamiento con warfarina y ciprofloxacino, la interacción de 2 a 16 días de haberse iniciado el tratamiento con el antibiótico en los pacientes anti coagulados estabilizados. Sin embargo, las dosis de 500 mg 2 veces al día del ciprofloxacino no parecen afectar de forma significativa el tratamiento anticoagulante. (Lancet 1989).

### **Recomendaciones**

Las quinolonas están dentro del ciprofloxacino y de ser usadas se debe prestar especial precaución en individuos con enfermedades del sistema nervioso central y enfermedades cerebrovasculares, siendo un factor preocupante de riesgo alto evitando las convulsiones, minimizando su aparición. Este tipo de antibiótico afecta a individuos con insuficiencia renal, ya que es excretada en por vía renal. Por lo tanto, se debe de aplicarse con cuidado las dosis minimizando en lo posible su prolongación y altas dosis. Es importante resaltar que no es necesario realizar un ajuste de la dosis en los adultos mayores, mayores de 65 años, siempre y cuando no presenten problemas de índole renal.

Adicionalmente, se debería de suministrar este antibiótico con la debida precaución en personas que tengan o presenten una alta deshidratación por la posibilidad de adquirir cristaliuria, debido que se concentra en exceso en la orina.

Pueden presentarse efectos adversos gastrointestinales en particular en pacientes con colitis, y puede producirse super infecciones por gérmenes no sensibles. También puede ocurrir candidiasis (CAF DIGEMID).

## 2.3. Formulación de hipótesis

### 2.3.1. Hipótesis general:

**HG:** El aceite esencial de las hojas de molle (*Schinus molle* L.) presenta efecto antibacteriano significativo en cepas de *Escherichia coli*, in vitro.

### 2.3.2. Hipótesis específicas:

- ❖ **H1:** Existen metabolitos secundarios en mayor proporción en el aceite esencial de las hojas de molle (*Schinus molle* L.) con actividad antibacteriana en cepas de *Escherichia coli*, in vitro.
- ❖ **H2:** Existe una alta concentración del aceite esencial *Schinus molle* L. (Molle) con efecto antibacteriano en cepas de *Escherichia coli* in vitro.
- ❖ **H3:** El aceite esencial de las hojas de molle (*Schinus molle* L.), al ser comparado con el Ciprofloxacino presenta igual actividad antibacteriana, frente a cepas de *Escherichia coli*.

## 2.4. Variables

### 2.4.1 Operacionalización de variables e indicadores

- ♣ **Variable Independiente:**  
Aceite esencial de las hojas de molle (*Schinus molle*)
- ♣ **Variable dependiente:**  
Efecto antibacteriano
- ♣ **Variable interviniente:**  
Periodo de incubación

Tabla 2: Operacionalización de las variables.

VARIABLE	DEFINICIÓN	DIMENSIONES	INDICADORES
<b>V.I</b> Aceite esencial de las hojas de molle ( <i>Schinus molle</i> L.)	Producto obtenido de las hojas de molle ( <i>Schinus molle</i> L.).	Fitoquímico Organoléptico	Identificación de metabolitos secundarios  Concentración a determinar. Aceite al 25% Aceite al 50% Aceite al 100% Ciprofloxacino
<b>V.D</b> Efecto Antibacteriano	Efecto del producto en estudio sobre el microorganismo: cepas de <i>Escherichia coli</i> (ATCC 29522)	Microbiológica	Medición del diámetro de inhibición. (Halos de inhibición)
<b>V.IN</b> Periodo de incubación	Tiempo necesario para que se produzca una respuesta	observacional	24, 48 y 72horas

## 2.5. Marco conceptual

### 2.5.1. Definición de términos básicos

**Aceite esencial:** también denominada esencia. Producto de las plantas que comunican a los órganos que las contienen, olor agradable. Químicamente son mezclas complejas de sustancias volátiles, generalmente líquidas, que pueden extraerse por destilación, por arrastre o por vapor de agua. Poseen las siguientes propiedades: antisépticos, digestivos, antiespasmódicos y sedantes (Guerra L., 2011).

**In vitro:** es una técnica que consiste en realizar un experimento ya sea en tubo de ensayo o un ambiente controlado (laboratorio).

**Patógeno:** microorganismo que daña a un huésped por invasión, lesión o porque producen sustancias tóxicas.

**Cromatografía:** es un método en las que los componentes se han de separar y se distribuye en dos fases, una está en reposo, (fase estacionaria) y la otra se mueve en dirección definida (fase móvil).

**Müller Hinton agar:** es un medio que carece de inhibidores, sustancia gelatinosa que se usa como medio de cultivo para el crecimiento de una gran cantidad de microorganismos tanto Gram positivos como Gram negativo y hongos. Recomendado universalmente para la realización de la prueba de sensibilidad. Medio de cultivo nutritivo no selectivo que promueve el desarrollo microbiano.

**Halos de inhibición:** es la zona alrededor de un disco de antibiótico, en el que no se produce crecimiento bacteriano en una placa de agar inoculado con gérmenes.

**Agente antibacteriano:** el término se refiere a una sustancia cuyas propiedades son capaces de eliminar agentes bacterianos o la inhibición de su crecimiento o proliferación sin incurrir en el daño del objeto, ambiente u organismo que las porta. Son en esencia fármacos como es el caso de los antibióticos u otros agentes químicos capaces de combatir estos cuerpos. (David V.2010).

**Bacteria Gram positivas:** se caracterizan porque ser uno de las grandes bacterias, que se pueden teñir de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram. Es importante resaltar, que esta característica química se relaciona estrechamente conectada a la estructura de la cobertura celular, en la que se refleja una clase natural de clasificación bacteriana. La cobertura celular de las bacterias Gram positivas presenta una membrana citoplasmática, además de tener una pared celular integrada por una gruesa capa de peptidoglucano, que rodea a la anterior. (Cavalier-Smith, T. (2006).

**Bacterias Gram negativas:** se distinguen porque no se tiñen de azul oscuro o de violeta por la tinción de Gram, y lo hacen de un color rosado claro, de allí es donde nace el nombre de gramnegativos, en la cual esa característica está unida a la estructura de la cobertura celular, pues tiene una doble membrana celular, refiriéndose a la presentación de dos membranas lipídicas donde se localizan en una fina pared celular de peptidoglucano, a diferencia de las bacterias Gram positivas sólo tienen una membrana lipídica y la pared de peptidoglucano es de mayor grosor. (Cavalier-Smith, T. (2006).



**Bacterias anaerobias facultativas:** bacterias que se caracterizan por una peculiar versatilidad en el aspecto respiratorio, pues se desarrollan tanto en presencia como en ausencia de oxígeno atmosférico ( Cavalier-Smith, T. (2006).

**Inhibición bacteriana:** se manifiesta con la formación del halo de inhibición bacteriano alrededor de pozos que contienen sustancias antibacterianas en un agar con cultivos microbiológicos en placas Petri.

**Cepa bacteriana:** todos los organismos descendientes de un cultivo puro, por tanto, con fenotipo y genotipo definidos, están pueden ser clínicas o procedentes de un cepario, cultivadas bajo ciertos estándares (NCCLS 1997).

**Efecto inhibidor:** es el impedimento del crecimiento o destrucción (muerte) de bacterias por la actividad de un agente antibacteriano natural o sintético, su mecanismo de acción depende de la sustancia antibacteriana; puede ser por aumento de la permeabilidad de la membrana citoplasmática alterando los procesos esenciales de la célula bacteriana y finalmente provoca su muerte o aprovechando la estructura o función bioquímica entre el huésped y las bacterias, causando por mecanismos específicos la muerte o inhibición del crecimiento de la bacteria. Para evaluar in vitro el efecto inhibidor se empleará el método de difusión en placas.

**Extractos vegetales:** se define como extracto vegetal el producto líquido obtenido a partir de plantas o parte de ellas con varios procedimientos y con varios solventes (Morales R.2000).

**Solubilidad:** capacidad de disolución de un compuesto químico; depende de la forma en que se encuentran: aglicones libres (son insolubles en agua) o heterósidos (son solubles en agua y mezclas hidroalcohólicas e insolubles en disolventes orgánicos apolares. (Díaz C. et al, 2008).

**Actividad antimicrobiana:** capacidad que presenta un compuesto para inhibir el aumento de población bacteriana o para eliminarla, se puede expresar cuantitativamente con pruebas in vitro (Thaweboon, 2009).

## **CAPÍTULO III**

### **METODOLOGÍA**

#### **3.1. Tipo de investigación**

- ◆ **Descriptivo- Explicativo**

Es descriptivo porque se buscó señalar las características del material vegetal en una situación experimental.

Explicativo, debido a que se buscó determinar los efectos antibacterianos in vitro del material vegetal, frente a cepas bacterianas.

- ◆ **Comparativo**

Se estableció la comparación de la muestra vegetal con el producto comercial (Ciprofloxacino) , frente a cepas bacterianas.

La investigación realizada pertenece al nivel de investigación aplicada, pues, sus resultados servirán para posibilitar tratamientos terapéuticos alternativos en poblaciones vulnerables.

#### **3.2. Diseño**

Esta investigación asumió un diseño cuasi experimental, donde la muestra vegetal fue sometida a experimento microbiológico “in vitro”.

#### **3.3. Población y muestra**

- ◆ **Población vegetal:**

Se recolectaron plantas de molle (*Schinus molle L.*) del distrito de Lurigancho-Chosica, departamento de Lima.

- ◆ **Muestra vegetal:**

8 kilos de hojas de molle (*Schinus Molle L.*)

- ◆ **Población microbiológica:**

Microorganismo bacteriano de *Escherichia coli*

- ◆ **Muestra microbiológica:**

Cepas estandarizadas: *Escherichia coli* (ATCC® 25922™)

- ◆ **Tamaño muestral:** 80 mediciones o determinaciones.

### **3.4 Material de laboratorio**

#### **Materiales de vidrio**

- Asa de siembra.
  - Balones de vidrio de 100, 250, 500 ml.
  - Matraces de 100 y 250 ml.
  - Pipetas de 1, 5 y 10 ml.
  - Placas petri de 10 x 150 mm.
  - Probetas de 25 y 50 ml.
  - Tubos de ensayo 13 x 100 mm y 15 x 150 mm.
  - Vasos de precipitación de 250 y 500 m.

#### **Equipos**

- Autoclave.
- Balanza analítica.
- Estufa de cultivo a 37°C.
- Mechero Bunsen.
- Micro pipetas de rango de 5-10 µl, 20-200 µl y 100-1000 µl.
- Refrigerador.  
Equipo de Destilación por arrastre de vapor.

#### **Medios de cultivo**

- Agar Nutritivo.
- Agar Müeller Hinton.
- Caldo Müeller Hinton.

#### **Reactivos**

- Alcohol 70°.
- Agua destilada.
  
- Dimetilsulfóxido (DMSO).

#### **Otros materiales**

- Discos de papel filtro.
- Espátulas.

- Gradillas.
- Pinzas estériles.
- Vernier

### 3.5 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Se elaboró una ficha de datos en donde se anotaron los resultados del método de difusión en placas con discos de papel filtro. La recolección de los datos se realizó de forma manual y visión directa.

Para la medición de los halos se utilizó el instrumento vernier calibrada en milímetros. Se verificó cada una de las fichas para evitar errores u omisiones en los datos que pudieran perjudicar la investigación. Para la interpretación de los resultados en la evaluación de tipo cuantitativa se tomó como referencia los diámetros de halo de inhibición y para la interpretación de los resultados en la evaluación de tipo cualitativa se tomó como referencia las pautas por Duraffourd (1983).

### 3.6. Procedimiento experimental

#### ❖ Recolección de la muestra vegetal *Schinus molle* L. (Molle)

Se recolectaron las hojas de *Schinus molle* L. "molle" en el Pueblo de San Antonio de Chaclla, (Distrito de Chosica), departamento de Lima, La temperatura media oscila entre los 18° C. a 26° C. ubicación geográfica: Altitud 911 msnm, Latitud Sur 11°56'14", Longitud Oeste 76°42'13". La muestra fue recolectada el 28 de enero entre las 7 am y 9 am. Se tuvo un cuidado en la selección solo se tomaron las hojas verdes y que hayan alcanzado un buen estado biológico, posteriormente se mantuvo un buen estado de conservación, hasta la realización de la extracción. (Anexo 1).

#### ❖ Preparación de la Muestra

**Limpieza:** eliminar residuos que podrían contaminar la muestra.

**Secado:** bajo sombra a temperatura Ambiente.

**Selección:** eliminar las hojas que presentan signos de deterioro.

**Maceración:** durante 8 días. (Anexo N° 2)

### **3.7 Obtención del aceite esencial de las hojas de molle (*Schinus molle* L.)**

Las hojas de cada planta, se secaron a temperatura ambiente, durante ocho días en un lugar seco bajo cubierta y se trituraron manualmente, logrando una cantidad de 800g. El material triturado fue sometido a un en un balón de fondo plano con 2 litros de agua destilada, el método usado para la extracción es: método de arrastre con vapor de agua, donde éste es arrastrado por la corriente de vapor de agua que se genera en la fuente de vapor, luego esta mezcla (vapor de agua y aceite) es condensada mediante su paso por un refrigerante de vidrio, para luego separar el aceite del agua por simple diferencias densidades, el procedimiento duro 6 horas, a una temperatura de 110 V. (Motle, 1977); (Guarnizo, 2009),

El aceite esencial destilado se recibió en un depósito estéril y cerrado, aquí se pudo observar un estado difásico entre agua y aceite esencial, debido a las diferencias de densidad. Esto permitió separar el aceite esencial mediante el uso de pipetas Pasteur a un tubo de vidrio con tapa rosca cerrado herméticamente envolviéndolo en papel aluminio y almacenado a temperatura ambiente y en oscuridad hasta su utilización. (Lagos, 2012). (Anexo 7).

#### **- Análisis de calidad del aceite esencial de las hojas de molle:**

##### **♦ Características organolépticas:**

Aspecto: Líquido cristalino  
Color : Amarillo claro  
Olor : Ligeramente teáceo

##### **♦ Determinación de la concentración del aceite esencial**

Probeta de 5 ml. vacía = 16.311 g.  
Probeta de 5 ml. con aceite = 19.958 g.  
Masa = 19.958 – 16.311 = 3.648g

Volumen = **3.980ml.**

$$d = \frac{m}{v}$$

D = densidad

M = masa

V = volume

$$d = \frac{M}{V} \quad \frac{3.648 \text{ g}}{3.880 \text{ mL}} \quad d = 0,9165 \text{ g/ml}$$

$$\begin{aligned} \text{cc} &= 1000\text{mg} \text{ ----- } 1\text{g} \\ X &\text{ ----- } 0,9165\text{g} \\ X &= \mathbf{916.5 \text{ mg/mL}} \end{aligned}$$

### **Rendimiento del aceite esencial de las hojas de molle (RAE)**

Se determinó el % de RAE por el método gravimetría-volumétrico, para ello se realizó el método de arrastre por vapor de agua en un equipo de destilación de vidrio. Obteniéndose 3.980 ml de aceite esencial a partir de la destilación de 8 kg de las hojas, colocamos 500 gramos por una repetición de 5 veces en el equipo de arrastre por vapor. Obteniendo un determinado volumen. (Lagos, 2012), (Azaña, 2010).

Para determinar la eficacia del aceite esencial. Se aplicó la siguiente formula:

Se logró un rendimiento del 0,22 %

$$\% \text{ RAE} = \frac{\text{Vol. A.E. (ml)}}{\text{P. muestra (g)}} \times 100\%$$

% RAE = Porcentaje de rendimiento del aceite esencial.

Vol. AE = Volumen del aceite esencial obtenido. (3.80 ml)

P. muestra = Peso de la muestra a destilar. (2000 g)

$$\% \text{ RAE} = \frac{3.80 \text{ ml}}{2000} \times 100 = 0.19$$

% RAE = 0, 22

Dikshit et al. (1986) Instituto Central de Plantas Medicinales y aromáticas, India: Hojas frescas Hasta 0,8% (0,05-0,89).

#### **Índice de refracción:**

Índice de refracción es el cambio de dirección que experimenta una onda al pasar de un medio a otro distinto. Es una constante que depende del carácter y del estado de la sustancia analizada. Es un indicador de pureza, el valor está relacionado con el grado de saturación, con la razón cis/trans de los dobles enlaces y puede estar influenciado con el daño que sufre el aceite tras la oxidación. Valor normal 1.4600 y 1.5000 a más o menos 15 o 20 grados centígrados.

#### **Análisis cromatográfico del aceite esencial de las hojas de molle**

Se realizó íntegramente en el Laboratorio de Química Inorgánica N° 12, en la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería (UNI). Para realizar esta determinación, se inyectó la muestra en un cromatógrafo de gases equipado con detector de ionización de llama (FID). El equipo empleado ha sido un Varian modelo 450GC; la separación cromatográfica se ha realizado a través de una columna capilar SUPELCOWAX T10 (de 30 m de longitud, 530 µm de diámetro interno, 1 µm de espesor, y de fase estacionaria) con inyector tipo split: 1/20, y el software usado fue el Galaxie versión 1.9.302.952.

La operación de inyección fue en modo split (partición de la muestra antes que ingrese a la columna); el gas portador fue helio cuya velocidad o flujo de gas de arrastre fue de 5 ml/min; con temperaturas del horno programadas de 70°C a 160°C (con una pendiente o razón de incremento de 4°C/min), y la temperatura del inyector fue de 250°C. Las condiciones ambientales en las que se llevó a cabo la determinación fueron, 23°C y 68% de humedad relativa.

### **3.8. Actividad antibacteriana**

#### **3.8.1. Obtención del microorganismo**

Se trabajó con una cepa de bacteria estándar de *Escherichia coli* (ATCC® 25922™)(American Type Culture Collection), producto diseñado solo para propósito de estudio en investigaciones científicas in vitro, información proporcionada por el Departamento de Salud y Servicios Humanos para el Control y Prevención de Enfermedades y los Institutos Nacionales para la Salud EE.UU. La bacteria fue adquirida a través del Laboratorio GenLab.

#### **3.8.2. Reactivación de la cepa bacteriana**

La cepa bacteriana de *Escherichia coli* (ATCC® 25922™), vino en un tubo estéril la cual previamente se lo rehidrató con 0.5ml de peptona, se tomó algunas gotas de la dilución para sembrarlas en agar sangre, se incubó de 24-48 horas a 37°C, de donde se tomó las colonias para la siembra en nuestro estudio, en agar Müeller Hinton por 24, 48 horas a 37°C. (Álvarez & Boquet, 1996).

#### **3.8.3. Preparación del inóculo bacteriano**

Método de suspensión directa de colonias: este método es el más adecuado para la preparación del inóculo.

Se tomó con un asa de kolle, 2 a 3 colonias del agar Müeller Hinton previamente reactivadas, que se transfirieron a un tubo que contenía 5 ml. solución salina 0.9%, se homogenizaron con el uso de un vortex,, hasta alcanzar una turbidez de  $(1 \times 10^8 \text{ UFC/ml})$  coincida con el estándar N° 0.5 de la escala de Mc Farland. (Álvarez & Boquet, 1996). Esto se logró, comparando al tubo patrón que fue adquirido de una casa comercial de laboratorio GenLab.

#### **3.8.4. Preparación de la sustancia vegetal para el estudio**

El aceite esencial estuvo en refrigeración hasta el momento de su uso, para eso se procedió a realizar las diluciones utilizando como el solvente el dimetilsulfóxido (DMSO). (Cedamanos & Mejía, 2014).

- ◆ Concentración: 100%, se usa el aceite esencial directamente (puro) volumen final 500ml.



- ◆ Concentración: 50%, se prepara: en un tubo estéril se coloca 250ml de aceite y 250 ml DMSO con un volumen final de 500ml. (Dilución 1:1).
- ◆ Concentración: 25%, se prepara: en un tubo estéril se 125 ml de aceite y 375 ml de DMSO con un volumen final de 500ml. (Dilución 1:3). (Anexo N° 8).

### **3.8.5. Preparación de los discos de sensibilidad**

Para esta prueba se prepararon discos de sensibilidad con antibióticos de papel filtro (Wathman N° 42) de aproximadamente 6 mm de diámetro, que se colocaron en un beaker de 100 ml con agua destilada para su esterilización y desnaturalización del antibiótico en autoclave (121°C, 15 lb por 15 minutos). Posteriormente, se vació el agua del beaker que contiene la solución desnaturalizada y el beaker conteniendo los discos se los llevó a estufa regulada a 100°C por 1 hora para su secado, y posteriormente ser usados. La actividad antibacteriana del aceite esencial se evaluó por el método de difusión en disco. Se impregnaron los discos previamente esterilizados de 6 mm de diámetro con una cantidad determinada correspondiente a los cinco grupos de estudio.

### **3.8.6. Sensibilidad antibacteriana por el Método de disco difusión.**

Método de Kirby-Bauer.(Método disco-placa-cultivo).(Udayakumar & Hazzena, 2002). Se empleó el agar Müller Hinton, dado que se considera el mejor medio para las pruebas de sensibilidad de rutina y se preparó como indica la casa comercial, las cuales fueron adquiridas en Laboratorio de microbiológico Arez. Este método, que sufrió diferentes modificaciones hasta que fue estandarizado por Kirby-Bauer en los Estados Unidos en 1966, representa la prueba de susceptibilidad más ampliamente utilizada en bacteriología clínica porque permite obtener resultados bastante exactos mediante un método cuantitativo, semicuantitativo o cualitativo, este último es el más utilizado.

El Comité de Expertos de la OMS (NCCLS en su documento M7-T) publicó las “Normas” para efectuar algunas modificaciones al descrito por Bauer, de manera que los resultados sean comparables en todas partes del mundo.

### **3.8.7. Sembrado del inóculo bacteriano**

Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo bacteriano de *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) (estándar N° 0.5 de la escala de Mc Farland), con ayuda de la micropipeta, se transfirieron 100 µl de la suspensión bacteriana en placas de agar Müeller Hinton, con el asa de siembra, se diseminó en la superficie para asegurar una distribución uniforme del inóculo. Se dejó secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos.

### **3.8.8. Aplicación de los discos en las placas inoculadas**

Posteriormente con unas pinzas estériles se procedió a colocar los discos de sensibilidad a las placas:

Se utilizaron 5 grupos: control positivo, control negativo, aceite esencial al 100%, 50% y 25%. Cada uno de los grupos cuenta con 20 repeticiones.

Se procedió de la siguiente manera:

- ♦ **Grupo I:** control positivo, formado Ciprofloxacino 500mg, se dividió la placa Petri en cuatro cuadrantes, donde se colocaron a cada uno de ellos se colocaron los discos de sensibilidad previamente sumergida en la muestra de interés. Se utilizaron un total de 20 repeticiones.
- ♦ **Grupo II:** control negativo, formado por agua destilada, se dividió la placa Petri en cuatro cuadrantes, donde se colocaron los discos de sensibilidad previamente sumergida en la muestra de interés. Se utilizaron un total de 20 repeticiones.
- ♦ **Grupo III:** aceite esencial puro al 100%, se dividió la placa Petri en cuatro cuadrantes, donde se colocaron los discos de sensibilidad previamente sumergida en la muestra de interés. Se utilizaron un total de 20 repeticiones.

- ♦ **Grupo IV:** aceite esencial con una concentración al 50%, se dividió la placa Petri en cuatro cuadrantes, donde se colocaron los discos de sensibilidad previamente sumergida en la muestra de interés. Se utilizaron un total de 20 repeticiones.
- ♦ **Grupo V:** aceite esencial con una concentración al 25%, se dividió la placa Petri en cuatro cuadrantes, donde se colocaron los discos de sensibilidad previamente sumergida en la muestra de interés. Se utilizaron un total de 20 repeticiones.

### **3.8.9. Incubación:**

Una vez identificadas y rotuladas las placas se llevaron a incubación a 37 °C .De tal manera que tuvimos 5 grupos de trabajo (control +, control -, concentración del Molle al 100%, 50% y 25%.)

Las lecturas del halo de inhibición se realizaron por un periodo de 24, 48, 72 horas, con la ayuda del vernier previamente calibrado.

Posteriormente, se midió el diámetro del halo de inhibición del crecimiento de los microorganismos y el cálculo del porcentaje del efecto inhibitorio relativo respecto al control positivo, que se procedió aplicando la siguiente expresión (Martínez, 1996).

### **3.8.10. Lectura del efecto antibacteriano del aceite esencial de las hojas de molle (*Shinus molle L.*).**

La lectura del efecto se realiza a las 24, 48 y 72 horas, una vez transcurrido el tiempo indicado se procede a la medición e interpretación de la zona circunda el disco, llamada halo de inhibición. Este informa si el microorganismo es sensible, resistente o intermedio. La falta de desarrollo alrededor del disco indica que la bacteria es “sensible” al antimicrobiano selectivo, lo que significa que después de tratar al paciente infectado por el microorganismo con las dosis habituales de dicho antimicrobiano se observará una respuesta favorable al tratamiento. El crecimiento del microorganismo alrededor del disco indica una cepa “resistente”, es decir, una con la cual no se obtendrá ninguna respuesta terapéutica.

El tamaño de cada halo de inhibición depende de la sensibilidad de la cepa al antimicrobiano, de la velocidad de crecimiento del microorganismo, de la cantidad (carga) de antimicrobiano selectivo presente en el disco y de la capacidad para difundir en el medio.

Para la interpretación de los resultados se tomó como referencias las pautas por (Duraffourd y Lapraz, 1983). La evaluación se realizó tanto cuantitativamente por medición numérica de los halos de inhibición, y cualitativamente siguiendo las pautas por Duraffourd; para demostrar la susceptibilidad que tienen los microorganismos al aceite esenciales.

**Nula (-):** para un diámetro inferior a 8 mm.

**Sensibilidad baja (sensible +):** para un diámetro entre 9 a 14 mm.

**Sensibilidad Medio (sensible ++):** para un diámetro entre 14 y 20 mm.

**Sensibilidad alta (+++):** para un diámetro superior a 20 mm.

## CAPÍTULO IV

### PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Se realizó el estudio in vitro en la especie bacteriana: de *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) de la actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de *Schinus molle* L. (Molle), Se trabajaron 5 grupos de estudio en los que incluye control positivo al ciprofloxacino, control negativo al agua destilada y diferentes concentraciones del aceite, cada una de ellas con 20 repeticiones por cada sustancia a las 24, 48 y 72 horas. Comprobándose sensibilidad de la bacteria mencionada.

Los resultados obtenidos en las diferentes pruebas realizadas a la planta en estudio han sido agrupados en tablas y gráficos, para la mejor interpretación de los resultados que se detallan a continuación. Se utilizó el diseño completamente aleatorio, debido a que este es un diseño de simple distribución, siendo útil para métodos y técnicas de laboratorio.

#### 4.1. Procesamiento de los datos

Se utilizó el programa SPSS® , programa estadístico que permitió obtener referencias y cálculos estadísticos, utilizando estadística no paramétrica bajo pruebas de normalidad Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk, determinando el análisis de Kruskal-Wallis, para comparar el efecto de varias sustancias empleadas en el estudio a las 24, 48 y 72 horas.

Evaluación de la susceptibilidad de la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 por método de difusión en placas con discos de papel filtro, impregnados en: Aceite esencial de *Schinus molle* (molle) 25% ,50% y 100%, Ciprofloxacino 500mg, .Agua destilada.

## 4.2. Análisis Cromatográfico (GC-FID).

### 4.2.1. Metabolitos volátiles secundarios del aceite esencial de las hojas de molle (*Shinus molle*).

De acuerdo al análisis de cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID), el cromatograma resultante (Anexo N° 15) registró cinco picos que representan los cinco metabolitos volátiles mayoritarios presentes en la muestra de aceite. Para identificar tales compuestos fue necesario comparar el tiempo de retención experimental en minutos, con el tiempo de retención teórico también en minutos; ya que en el ensayo, a la salida de la columna cada componente es registrado por el detector en un determinado tiempo y bajo la forma de picos; estos tiempos fueron comparados con tiempos de retención estándares establecidos para cada tipo de compuesto (estándares pertenecientes al laboratorio N° 12 de la Universidad Nacional de Ingeniería de Lima (UNI), Perú).

El tiempo de retención experimental, el tiempo de retención teórico y el área de cada pico, se registran en el cuadro leyenda del mismo cromatograma (Anexo N° 11). Los elementos identificados según su tiempo de retención, se registran en la tabla N° 9.

Tabla 3: Tiempos de retención e identificación de los metabolitos secundarios aislados por GCFID del aceite esencial de *Shinus molle* L. (molle)

N°	TRE (min)	TRT (min)	% Área	Identificación
1	3,24	3,22	0,23	Limoneno
2	5,13	5,03	0,100	$\alpha$ -pineno
3	5,73	5,82	0,034	$\beta$ -pineno
4	5,96	5,22	0,029	$\beta$ -mirceno
5	7,20	6,60	0,011	$\alpha$ -felandreno

Fuente: Universidad Nacional de Ingeniería (UNI).

TRE (min): Tiempo de retención experimental en minutos.

TRT (min): Tiempo de retención teórico en minutos;

GC-FID: cromatografía de gases con detector de ionización de llama FID.

De acuerdo a los estudios precedentes, como los de Viturro et al.(2010), los elementos identificados en el cuadro anterior, pertenecen al grupo de componentes característicos del aceite esencial de molle peruano (Ayacucho), a excepción del  $\beta$ -mirceno; no obstante Viturro et al. (2010) lograron reconocer otros compuestos como el p-cimeno,  $\Delta$ -cadineno, T-cariofileno, D-germacreno, B-germacreno, aunque en proporciones muy bajas.

#### 4.2.2 Importancia de los metabolitos volátiles hallados

♦ **Limoneno:** Fórmula química: C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>

El limoneno tiene un amplio uso en la industria farmacéutica y alimentaria como aromatizante y para dar sabor. Es usado, por ejemplo, en la obtención de sabores artificiales y en la fabricación de dulces, bebidas o goma de mascar. También es empleado como disolvente de resinas, pigmentos, tintas, pinturas, en la fabricación de adhesivos o como aditivo en fragancias. Otro de sus usos es el de insecticida porque no es tóxico para los seres humanos y animales domésticos, ni perjudicial para la jardinería.

♦  **$\alpha$ -pineno:** Fórmula química: C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>

El  $\beta$ -pineno es un monoterpeneo bicíclico, precursores de fragancias; precisamente la industria de fragancias y saborizantes. Empleado principalmente en la producción de mirceno y geraniol, resinas terpénicas, y como precursor para producir acetato de nopilo, el cual se utiliza para la elaboración de perfumes; así mismo, el  $\beta$ -pineno reacciona con paraformaldehído para formar el nopol, un alcohol utilizado en diversos productos de uso doméstico y como materia prima para la obtención de otros compuestos sintéticos (Alarcón et al., 2005).

♦  **$\beta$ -mirceno:** Fórmula química: C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>

Se usa como un intermediario para la producción de diversas fragancias.

♦  **$\alpha$ -felandreno:** Fórmula química: C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>

Tiene aplicaciones industriales mayormente como un producto químico para síntesis; participando en mezclas con otros metabolitos volátiles como el pineno y limoneno, para aromatizar bebidas, licores, perfumes, dentífricos, jabones y cremas cosméticas (Ortuño, 2006).

#### 4.3. Actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de molle

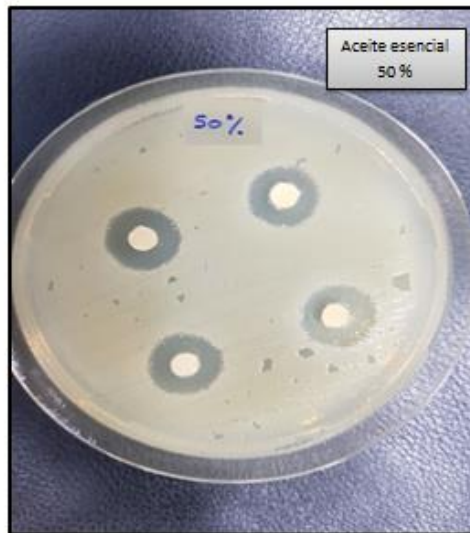
Se evaluó la actividad antibacteriana del aceites esencial *Schinus molle* L.(molle) frente a cepas de *Escherichia coli* (ATCC® 25922™), el resultados de la actividad antibacteriana (Anexo N° 14), en los cinco grupos en estudio, se realizó la lectura de los halos de inhibición en un periodo de tiempo de 24, 48 y 27 horas.



Fuente: Elaboración propia

Figura 12: Susceptibilidad antibacteriana (Método de disco difusión) de *Escherichia coli* (ATCC® 25922™), frente al aceite esencial de las hojas de molle (*Shinus molle* L.), concentración al 25% con un halo de inhibición de Medio de 9mm (escala de Duraffourd-Lapraz)





Fuente: Elaboración propia

Figura 13: Susceptibilidad antibacteriana (Método de disco difusión) de *Escherichia coli* (ATCC® 25922™), frente al aceite esencial de las hojas de molle (*Shinus molle* L.), concentración de 50% con un halo de inhibición de Medio de 14mm (escala de Duraffourd-Lapra)



Fuente: Elaboración propia

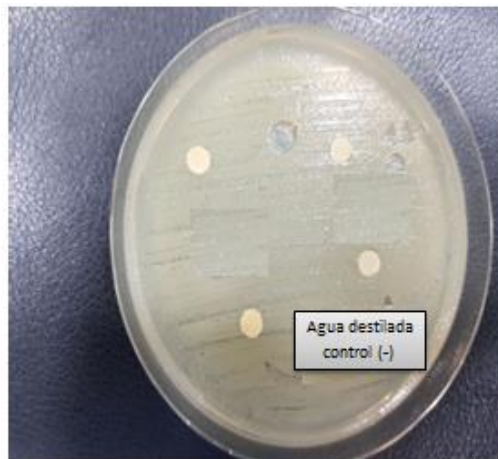
Figura 14: Susceptibilidad antibacteriana (Método de disco difusión) de *Escherichia coli* (ATCC® 25922™), frente al aceite esencial de las hojas de molle (*Shinus molle* L.), al 100% con un halo de inhibición promedio de 29mm (escala de Duraffourd-Lapraz).

Es posible que la actividad antibacteriana se deba a las mezclas y cantidad de los componentes del aceite esencial de las hojas de molle (*Shinus molle* L.), en especial de sus componentes volátiles, alteren la permeabilidad de la membrana plasmática de la célula bacteriana, haciéndola más vulnerable a los cambios del medio y susceptible al envejecimiento, ya que

actualmente no se tiene un conocimiento exacto de cuál es el mecanismo de acción de los aceites esenciales, así mismo, los aceites esenciales provocan la modificación del pH del medio impidiendo el normal desarrollo de la bacteria.



Fuente: Elaboración propia  
Figura 15: Elaboración propia



Fuente: Elaboración propia

Figura 16: Susceptibilidad antibacteriana (Método de disco difusión) de *Escherichia coli* (ATCC® 25922™), frente al control negativo: agua destilada con un halo de inhibición de 0mm / 6 mm incluyen el disco de sensibilidad en las mediciones. (Escala de Duraffourd-

#### 4.4. Presentación y análisis de los resultados estadísticos

Se realizó el estudio in vitro en la especie bacteriana: de *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) y de la actividad antibacteriana del aceite esencial

de las hojas de molle (*Schinus molle* L), Se trabajaron 5 grupos de estudio en los que incluye control positivo al ciprofloxacino, control negativo al agua destilada y diferentes concentraciones del aceite, cada una de ellas con 20 repeticiones por cada sustancia a las 24, 48 y 72 horas. Comprobándose sensibilidad de la bacteria mencionada.

Los resultados obtenidos en las diferentes pruebas realizadas a la planta en estudio han sido agrupados en tablas y gráficos, para la mejor interpretación de los resultados se utilizó el diseño completamente aleatorio, debido a que este es un diseño de simple distribución, siendo útil para métodos y técnicas de laboratorio microbiológicos.

Los datos fueron procesados a través del programa estadístico SPSS® mediante las pruebas de normalidad Kolmogorov-Smirnov y prueba no paramétrica Kruskal-Wallis trabajados a un nivel de confianza del 95%.

#### **4.4.1. Datos estadísticos**

Los Datos obtenidos de los halos de inhibición o susceptibilidad de la cepa de *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) por método de difusión en placas con discos de papel filtro, impregnados en: aceite esencial de las hojas de molle (*Schinus molle*) al 100%, 50%, y 25%, agua destilada como control negativo y Ciprofloxacino como control positivo.

En la ficha de recolección de datos se han registrado todas las lecturas de los tamaños de los halos de inhibición en mm. de los cinco grupos, cada grupo con 20 repeticiones; la sustancia empleada en el estudio son las hojas de molle (*Shinus molle* L.) frente a la cepa de *Escherichia coli* (ATCC® 25922™), por el método de difusión en disco, en este caso se determinó la Media de cada grupo y el periodo o tiempo de incubación que fueron tomadas a las 24, 48 y 72 horas.

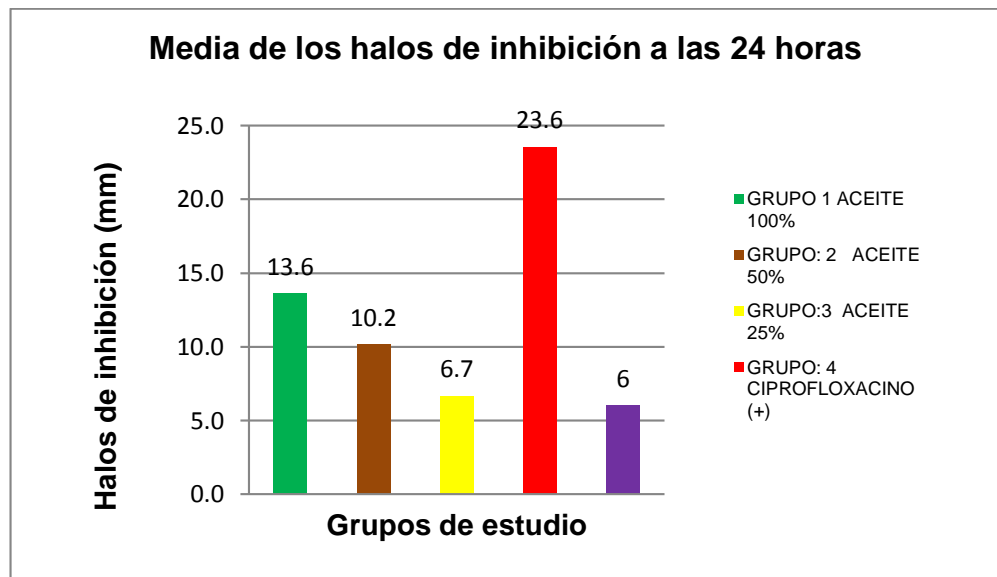
Tabla 4: Resultados de lecturas de los halos de inhibición en mm de los cinco grupos de estudio en diferentes tiempos.

RESULTADOS: LECTURAS DE LOS HALOS DE INHIBICION EN mm															
	GRUPO 1 ACEITE 100%			GRUPO: 2 ACEITE 50%			GRUPO:3 ACEITE 25%			GRUPO: 4 CIPROFLOXACIN O (+)			GRUPO: 5 AGUA CONTROL (-)		
Repetición	24 h.	48h.	72 h.	24 h.	48h.	72 h.	24 h.	48h.	72 h.	24 h.	48h.	72 h.	24 h.	48h.	72 h.
1	12	18	25	10	12	13	6	8	10	21	34	38	6	6	6
2	13	24	29	9	12	13	7	9	12	24	35	37	6	6	6
3	14	21	25	11	13	14	8	10	11	23	36	39	6	6	6
4	13	20	28	12	14	15	7	9	10	26	37	39	6	6	6
5	12	19	26	12	15	16	6	8	11	25	34	36	6	6	6
6	13	18	29	11	14	16	7	9	12	24	36	37	6	6	6
7	14	20	27	10	13	14	6	7	10	23	32	34	6	6	6
8	15	22	30	11	13	14	7	8	8	23	34	35	6	6	6
9	12	23	29	9	12	15	6	7	9	25	36	37	6	6	6
10	16	28	32	10	13	15	7	8	8	23	32	34	6	6	6
11	14	23	30	11	12	14	7	9	10	22	31	32	6	6	6
12	15	26	31	9	13	15	6	7	8	23	33	34	6	6	6
13	13	20	27	10	14	14	7	8	9	22	28	30	6	6	6
14	15	24	30	10	13	14	6	8	8	23	31	31	6	6	6
15	12	21	27	9	14	15	7	7	9	24	29	32	6	6	6
16	15	25	33	8	10	13	7	8	10	21	28	30	6	6	6
17	13	24	33	10	14	15	6	8	9	20	29	33	6	6	6
18	12	23	31	11	14	16	6	8	10	25	33	35	6	6	6
19	16	24	32	10	15	16	7	9	11	26	37	38	6	6	6
20	13	25	33	9	14	16	7	9	12	28	39	40	6	6	6
MEDIANA	13	23	29.5	10	13	15	7	8	10	23	33.5	35	6	6	6

Fuente: Elaboración propia.

**Interpretación:**

- ◆ Nulo: < 8mm
- ◆ Sensible límite: 9-14
- ◆ Sensible medio 15-19mm
- ◆ Sensible Alto: > 20mm.

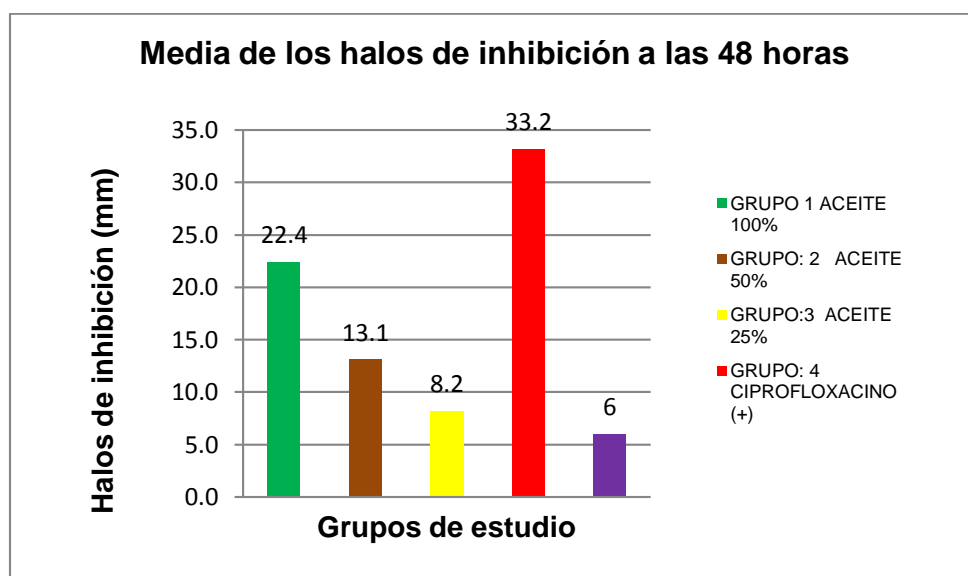


Fuente: Elaboración propia.

Figura 17: Medias de los halos de inhibición en cepas de *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) a las 24 horas de incubación a 37°C.

(Los valores de halos de inhibición incluyen tamaño de discos 6 mm)

En la figura se muestra la Media de los halos de inhibición de los 5 grupos en estudio a las 24 horas de incubación, producidas por acción del aceite esencial de las hojas de molle (*Shinus molle L.*) en diferentes concentraciones, frente a cepas de *Escherichia coli* (ATCC® 25922™). Apareciéndose que al aumentar las concentraciones del aceite, mayor es el efecto antibacteriano. El grupo N°4 (control positivo) ciprofloxacino tuvo una tendencia positiva con respecto a los demás grupos, muestra mayor efecto antibacteriano, con un halo de inhibición de 23.6 mm, mientras las concentraciones de los aceites esenciales de las hojas de molle (*Shinus molle L.*) al 100% es de 13.6mm, al 50% 10.2mm. La sensibilidad de ambos grupos está en el límite (8-14mm) . El grupo N°3 una concentración al 25% de aceite esencial, no presenta ningún efecto antibacteriano, puesto que según la escala de DURAFFOURD, los valores de < 8mm, su acción es nula. El control negativo, no se evidencia halos de inhibición porque contiene solo agua.

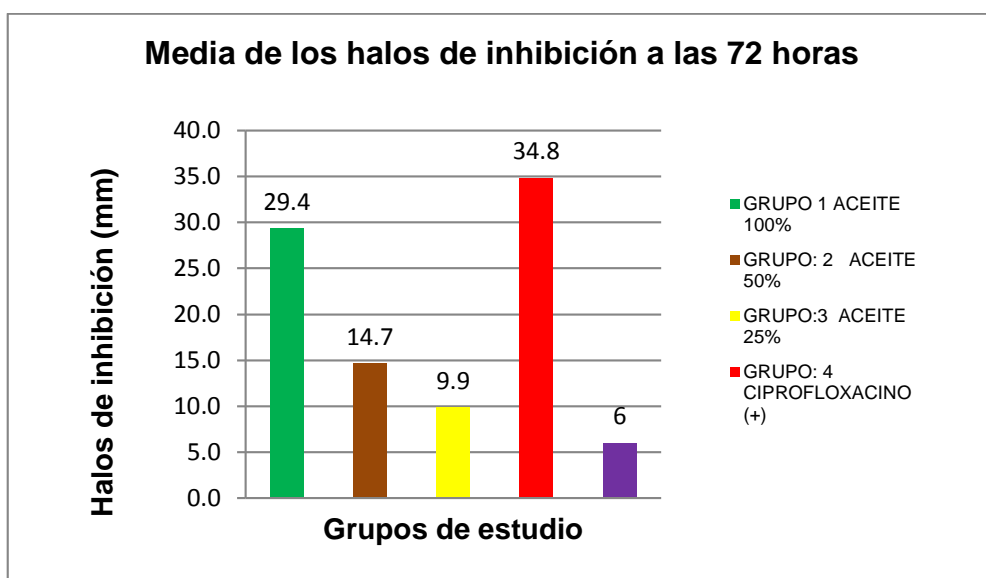


Fuente: Elaboración propia.

Figura 18: Medias de los halos de inhibición en cepas de *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) a las 48 horas de incubación a 37°C.

**(Los valores de halos de inhibición incluyen tamaño de discos 6 mm)**

En la presente figura se muestra la Media de los halos de inhibición de los 5 grupos en estudio a las 48 horas de incubación, producidas por acción del aceite esencial de las hojas de molle (*Shinus molle L.*) en diferentes concentraciones, frente a cepas de *Escherichia coli* (ATCC® 25922™). Apareciéndose que al aumentar las concentraciones del aceite, mayor es el efecto antibacteriano. El grupo N°4 (control positivo) ciprofloxacino tuvo mayor efecto antibacteriano, con un halo de inhibición de 33.2 mm, seguido el aceite esencial con una concentración de 100% de 22.4mm, al 50% 13.1mm. El grupo N°3 una concentración al 25% de aceite esencial, no presenta ningún efecto antibacteriano, puesto que según la escala de DURAFFOURD, los valores de < 8mm, su acción es nula, por ser control negativo, no se evidencia halos de inhibición porque contiene solo agua.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 19: Medias de los halos de inhibición en cepas de *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) a las 72 horas de incubación a 37°C

**(Los valores de halos de inhibición incluyen tamaño de discos 6 mm)**

En la figura se muestra la Media de los halos de inhibición de los 5 grupos en estudio a las 72 horas de incubación, producidas por acción del aceite esencial de las hojas de molle (*Shinus molle* L.) en diferentes concentraciones, frente a cepas de *Escherichia coli* (ATCC® 25922™). Apreciándose que al aumentar las concentraciones del aceite, mayor es el efecto antibacteriano. El grupo N°4 (control positivo) ciprofloxacino su efecto antibacteriano 34.8mm, se ha detenido con respecto a los demás grupos, el aceite esencial: la concentración de 100% de 29.4mm, al 50% 14.7.1mm (sensibilidad media ++) al 25% el diámetro de inhibición es 9.9mm (sensibilidad limite +). Según la escala de DURAFFOURD, los valores de < 8mm, su acción es nula. El control negativo, no se evidencia halos de inhibición porque contiene solo agua.

## 4.2 Prueba de Hipótesis

### Contrastación de la Hipótesis General

El aceite esencial de las hojas de molle (*Shinus molle L*) presenta significativamente efecto antibacteriano en cepas de *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) in vitro, comparado con el Ciprofloxacino.

### Hipótesis estadística

**H0:** El efecto antibacteriano con respecto al diámetro de los halos de inhibición es igual en los grupos de estudio.

**H1:** El efecto antibacteriano con respecto al diámetro de los halos de Inhibición son diferentes entre los grupos de estudio.

### Nivel de Significancia

Para la presente investigación se trabajó con un nivel de confianza del 95%, correspondiente a un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 5% = 0.05.

### Determinación del Estadígrafo

Se identificó que la variable de agrupación determina cinco grupos, con lo que se estableció la necesidad de utilizar estadígrafos para más de dos muestras independientes



### a) Determinación de la distribución normal de los datos

Se aplicó la prueba de normalidad como análisis estadístico, en función del tamaño de la muestra de estudio. Para la Prueba de Normalidad de datos inicialmente se verificó que las muestras tomadas provengan de una población con distribución normal. Esto fue realizado con las pruebas de Kolmogorov - Smirnov y Shapiro – Wilk, donde probamos: Ho (hipótesis nula) donde la muestra proviene de una población con distribución normal y Ha (Hipótesis alterna) donde la muestra no proviene de una población con distribución normal, como se expresa en la siguiente tabla.

Pruebas de normalidad						
Concentraciones	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
GRUPO 1 ACEITE 100%	,142	45	,023	,919	45	,004
GRUPO 2 ACEITE 50%	,154	45	,009	,937	45	,016
GRUPO 3 ACEITE 25%	,194	45	,000	,916	45	,003
GRUPO 4 CONTROL POSITIVO CIPROFLOXACINO (+)	,152	45	,011	,903	45	,001
GRUPO 5 CONTROL NEGATIVO AGUA	.	44	.	.	44	.

Fuente: Elaboración propia.

Figura 20: : Pruebas de normalidad Kolmogorov - Smirnov y Shapiro – wilk de las muestras en estudio obtenido de SPSS®

La figura nos muestra la prueba de Shapiro-Wilk, que se utiliza en muestras realizadas con menos de 50 repeticiones. Al aplicar la prueba de Shapiro-Wilk se obtuvo una Sig. Asintót. (p) < 0.05 en todos los grupos que contienen diferentes concentraciones de *Shinus molle* (molle) es menor a 0,05 (estadísticamente significativo), es decir, que se tiene un 95% de confiabilidad. Bajo este resultado se rechaza la hipótesis nula (Ho) y se acepta la hipótesis alterna (H1), la misma que demuestra la existencia de

diferencias de sus medias respecto al valor de la tendencia central de las poblaciones. Lo cual nos demuestra que no todas las medias son iguales.

Según la tabla N° 5, La prueba de Shapiro-Wilk, donde nos indica que los valores de significancia son menores que 0,05 . significa que tenemos un 95% de confiabilidad, por ello se rechaza la Ho para todas las muestras, debido a que menciona que las muestras proceden de poblaciones con la misma distribución de probabilidad (medias similares); por lo tanto, se toma la Ha donde ninguna de las sustancias proviene de una población con distribución normal.

Tabla 5: Prueba de Shapiro-Wilk

				Shapiro-Wilk		
				Estadístico	gl	Sig.
GRUPO 1 ACEITE 100%	0.142	45	0.023	0.919	45	0.004
GRUPO 2 ACEITE 50%	0.154	45	0.009	0.937	45	0.016
GRUPO 3 ACEITE 25%	0.194	45	0.000	0.916	45	0.003
GRUPO 4 CONTROL POSITIVO CIPROFLOXACINO (+)	0.152	45	0.011	0.903	45	0.001
GRUPO 5 CONTROL NEGATIVO AGUA		44			44	

Fuente: Elaboración propia.

#### 4.4.3 Análisis por Kruskal-Wallis: comparación de tres o más grupos a las 24, 48 y 72 horas.

Se determinó realizar pruebas no paramétricas para demostrar la igualdad de medias (promedios); una de estas pruebas es la Kruskal-Wallis, prueba no paramétrica utilizada para la comparación de varias muestras o grupos.

#### Toma de Decisión

Al encontrarse un P-Valor menor a 0.05, se rechazó la hipótesis nula, por lo que se establece que hay dependencia de las variables; es decir, que los halos

de inhibición varían significativamente con el tiempo de incubación, a mayor concentración, mayor halo de inhibición.

#### 4.4.4 Estadísticos descriptivos del análisis de Kruskal-Wallis a las 24 horas

La siguiente tabla obtenida del sistema SPSS®, según análisis de Kruskal-Wallis, describe los datos de mayor importancia e incidencia del estudio realizado, muestra en relación al número de repeticiones de las pruebas (N) los valores de máximos, mínimos, medias y desviación estándar para cada grupo de estudio y sus respectivas concentraciones correspondientes a las 24 horas.

En la tabla N° 6, se describe la relación existente entre cada grupo de estudio. Se muestran los resultados de los diámetros de inhibición: mínimo, máximo, DS y las Medias de los datos obtenidos en milímetros, que fueron leídas a las 24 horas, en donde se puede observar que el efecto antibacteriano del aceite esencial de las hojas de molle (*Schinus molle L.*) no alcanza la sensibilidad adecuada, la concentración al 100% muestra una sensibilidad limite; en las demás concentraciones el efecto es nulo. El control positivo Ciprofloxacino muestra una buena sensibilidad con un diámetro de inhibición 28mm, tendencia a incrementar su poder de acción frente a la *Escherichia coli* (ATCC® 25922™); el control negativo no muestra ningún halo de inhibición

Tabla 6: Análisis de Kruskal-Wallis a las 24 horas

Estadístico Descriptivo	24 horas				
	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. Estándar
GRUPO 1 ACEITE 100%	20	12	16	13	1.35
GRUPO 2 ACEITE 50%	20	8	12	10	1.07
GRUPO 3 ACEITE 25%	20	6	8	6	0.59
GRUPO 4 CONTROL POSITIVO	20	20	28	23	1.93
GRUPO 5 CONTROL NEGATIVO AGUA	20	6	6	6	0.0

Fuente: Elaboración propia.

En la tabla N° 7, se describe la relación existente entre cada grupo de estudio; se muestra el resultado de los diámetros de inhibición: mínimo, máximo, DS y las Medias de los datos obtenidos en milímetros, que fueron leídas a las 48 horas, en donde podemos observar que el efecto antibacteriano del aceite esencial de las hojas de molle (*Schinus molle L.*) ha tenido una tendencia positiva, alcanza la sensibilidad efectiva, la concentraciones al 100% muestra una sensibilidad alta con una media de 22 mm, al 50% una sensibilidad limite 13mm, al 25% el efecto es nulo. El control positivo Ciprofloxacino muestra la Media de inhibición 33mm, mostrando una tendencia a incrementar su poder de acción frente a la *Escherichia coli* (ATCC® 25922™); el control negativo no muestra ningún halo de inhibición

Tabla 7: Análisis de Kruskal-Wallis a las 48 horas

Estadístico Descriptivo 48 horas					
	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. Estándar
GRUPO 1 ACEITE 100%	20	18	28	22	2.72
GRUPO 2 ACEITE 50%	20	10	15	13	1.21
GRUPO 3 ACEITE 25%	20	7	10	8	0.83
GRUPO 4 CONTROL POSITIVO	20	28	39	33	3.19
GRUPO 5 CONTROL NEGATIVO AGUA	20	6	6	6	0.0

Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla N° 8, se describe la relación existente entre cada grupo de estudio; se muestra el resultado de los diámetros de inhibición: mínimo, máximo, DS y las Medias de los datos obtenidos en milímetros, que fueron leídas a la 72 horas, en donde podemos observar que el efecto antibacteriano del aceite esencial de las hojas de molle (*Schinus molle L.*) ha tenido una tendencia positiva a través del tiempo, alcanza la sensibilidad efectiva; la concentraciones al 100% muestra una muy sensibilidad con una Media de 29 mm, al 50% una sensibilidad limite 14 mm; este valor se mantiene en el tiempo, con una sensibilidad al límite medio; al 25% el efecto es nulo. El control positivo Ciprofloxacino se ha detenido el crecimiento del diámetro con

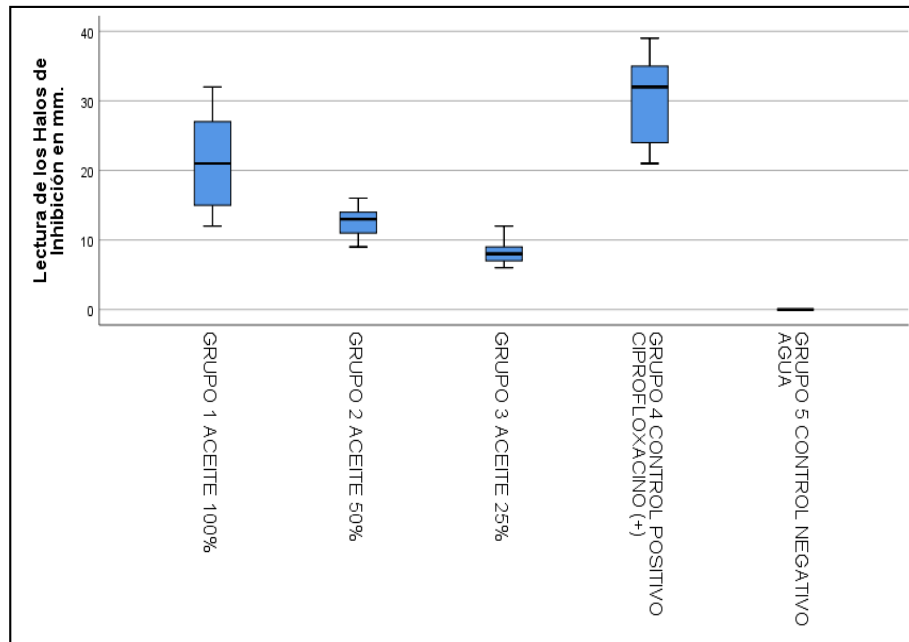
una Media de inhibición 34mm. Se puede afirmar que si posee efecto antibacteriano del aceite esencial de las hojas de molle (*Schinus molle L.*) frente a la *Escherichia coli* (ATCC® 25922™), en las concentraciones 100 y 50%. El control negativo no muestra halos de inhibición.

Tabla 8: Análisis de Kruskal-Wallis a las 72 horas

<b>Estadístico Descriptivo 72 horas</b>					
	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. Estándar
GRUPO 1 ACEITE 100%	20	25	33	29	2.6
GRUPO 2 ACEITE 50%	20	13	16	14	1.04
GRUPO 3 ACEITE 25%	20	8	11	9.8	1.35
GRUPO 4 CONTROL POSITIVO	20	30	39	34	2.84
GRUPO 5 CONTROL NEGATIVO AGUA	20	6	6	6	0.0

Fuente: Elaboración propia.

#### 4.4.5 Prueba de Kruskal-Wallis entre las muestras en estudio



Fuente: Elaboración propia.

Figura 21: Kruskal-Wallis de muestras independientes

#### 4.4.6 Grado de sensibilidad según Duraffourd – Lapraz

Determinación del grado de sensibilidad de cepas de *Escherichia coli* (ATCC® 25922™), frente a diferentes grupos a distintas concentraciones. En esta tabla se observa el análisis cualitativo según las pautas de Duraffourd-Lapraz los cuales determinan que halos que obtengan 8mm o inferiores tendrán un efecto nulo antibacteriano, de 9 a 14mm obtendrán una sensibilidad límite, de 15 a 19mm una sensibilidad media y sumamente sensible si fue superior a 20mm.

Se puede observar que las concentraciones al 100% tienen una sensibilidad alta (+++) de 85% de los resultados, mientras un 15% tienen una sensibilidad media (++) al 80% y un 20% presentan una sensibilidad límite (+). La concentración al 25%, tiene 90% una sensibilidad nula. El control positivo Ciprofloxacino, tiene una sensibilidad alta (+++), superior a cualquier sustancia natural.

Tabla 9: Efecto antibacteriano del aceite esencial de las hojas de molle (*Schinus molle* L.), concentración: 100 %, 50 % y al 25 % en cepas de *Scherichia coli* (ATCC® 25922™), según la según escala de Duraffourd y Lapraz.

GRUPOS	Halos de Inhibición				Numero de repeticiones
	Sensibilidad Nula (-) menos de 8mm	Sensibilidad limite(+) 9-14mm	Sensibilidad media(++) 15-19mm	Sensibilidad alta(+++) mayor 20mm	
<b>GRUPO 1 ACEITE 100%</b>	0 (0%)	0 (0%)	3 (15%)	17(85%)	20
<b>GRUPO 2 ACEITE 50%</b>	0 (0%)	4(20%)	16(80%)	0 (0%)	20
<b>GRUPO 3 ACEITE 25%</b>	18(90%)	2(10%)	0 (0%)	0 (0%)	20
<b>GRUPO 4 CONTROL POSITIVO</b>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	20(100%)	20
<b>GRUPO 5 CONTROL NEGATIVO AGUA</b>	20 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	20
<b>Total</b>	38	6	19	37	100

Fuente : Propia

#### 4.5 Discusión de resultados

Los metabolitos secundarios volátiles hallados en el presente estudio difieren de algunas investigaciones. Los resultados obtenidos mediante el cromatógrafo de gases, acoplado a detector de ionización en llama (GC-FID) expresan haber sido identificados cinco metabolitos:  $\beta$ -mirceno,  $\alpha$ -felandreno,  $\alpha$ -pineno, limoneno,  $\beta$ -felandreno como componentes mayoritarios; sin embargo, Dikshit et al. (1986) reconoció la presencia adicional de otros componente tales como el p-cimeno,  $\beta$ -cariofileno y D-limoneno, que forman parte de los componentes mayoritarios del aceite esencial obtenido de las hojas de molle (*Shinu molle* L). Viturro et al. (2010) hicieron un análisis a gran escala en muestras de aceite esencial del fruto del molle de Costa Rica, Brasil, Ecuador, Perú, Bolivia y Argentina; en dicho resumen se puede notar que los

compuestos  $\alpha$ - felandreno,  $\beta$ -felandreno,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, limoneno, p-cimeno y mirceno son los más comunes, por otra parte, las investigaciones realizadas por Guerra, L. (2011), determinan que los componentes mayoritarios del aceite esencial del fruto de *Schinus molle* son: mirceno,  $\alpha$ -felandreno,  $\delta$ -cadineno, limoneno,  $\alpha$ -cadinol y  $\beta$ -felandreno, al igual que Devici et al. (2010) que analizaron el aceite de *Schinus molle* de la región de Turquía, encontrando que los compuestos volátiles mayoritarios son:  $\alpha$ -cadinol y  $\delta$ -cadineno (Devici O., et al., 2010).

Cuando se evaluó el efecto antibacteriano del aceite esencial de las hojas de molle (*Shinus molle* L.) en cinco grupos, usando concentraciones al 100%, 50% y 25% con controles, positivo (ciprofloxacino), negativo (agua destilada), la respuesta de los diámetros o halos de inhibición se realizaron en tres tiempos 24, 48 y 72 horas de periodo de incubación; sin embargo, Rivadeneira-Cajas, D. et al. (2015); evaluaron in vitro el potencial biosida del aceite en un periodo de incubación de 24 y 72 horas. Las concentraciones usadas para evaluar la actividad antibacteriana varían de un investigador a otro, como Cedamanos, et al. (2014), que usaron *S. mutans* ATCC 25175 frente al aceite esencial de *Schinus molle*, cuyo efecto fue de alto grado a concentraciones del 25% y 50% a las 24 horas, usando la técnica de difusión en pozos; al igual, Gonzales E. (1998), utilizó varias bacterias Gram positivas y Gram negativas, las respuestas del efecto fueron leídas a las 24 horas de incubación.

En la prueba de susceptibilidad, se empleó el método Difusión en disco, estandarizado por Kirby-Bauer, método que tiene gran utilidad en los ensayos in vitro, el cual se fundamenta en la inhibición del crecimiento bacteriano, mediante la difusión de sustancias activas en un medio sólido y posteriormente se evidencia por la formación de halos claros. El procedimiento experimental se procedió de acuerdo a las recomendaciones NCCLS ((National Committee For Clinical Laboratory Standards, 2000).



Se comprobó que el efecto antibacteriano del aceite esencial de las hojas de molle con el ciprofloxacino frente a cepas de *Escherichia coli*, muestran la eficacia del producto natural, al igual que Baroni E. (2010) que comparó ambos productos, observando halos de inhibición semejantes al presente estudio; asimismo, Vázquez-Gonzales J. (2011) compara el efecto inhibidor del molle con un producto comercial, que al observar la respuesta comparativa, resalta el beneficio de la planta para ser usado como una alternativa terapéutica, un método ecológico y económico para combatir infecciones microbianas.

## CAPÍTULO V

### 5.1. Conclusiones

- ❖ El análisis de cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID) identificó cinco componentes terpénicos mayoritarios en el aceite esencial de la hojas de molle (*Shinus molle L.*), de los cuales cuatro son monoterpenos cíclicos: limoneno,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno y  $\alpha$ -felandreno, y un monoterpeno acíclico: el  $\beta$ -mirceno.
- ❖ La concentración del aceite esencial de la hojas de molle (*Shinus molle L.*) que tiene mayor efecto antibacteriano, frente a cepas de *Escherichia coli* (ATCC® 25922) es la concentración al 100 por ciento, con un halo de inhibición de 29.4 mm, seguida de la concentración al 50 por ciento que tuvo 14.7mm., según la escala de Duraffourd .
- ❖ El aceite esencial de la hojas de molle (*Shinus molle L.*), al 100 por ciento de concentración, presenta efecto antibacteriano, en cepas de *Escherichia coli* (ATCC® 25922), en comparación con el Ciprofloxacino. Ambos productos presentan sensibilidad alta (> de 20mm).

## 5.2. Recomendaciones

1. Complementar estudios de la composición química del aceite esencial de las hojas de molle (*Shinus molle L.*) en diferentes regiones del Perú para determinar los componentes volátiles mayoritarios responsables del efecto antibacteriano en cepas de interés clínico.
2. Realizar nuevos trabajos de investigación sobre el aprovechamiento del aceite esencial de molle en el campo farmacéutico, cosmético y alimentario, teniendo como base este estudio, ya que las mezclas de sus componentes químicos hacen de este un producto potencialmente industrializable.
3. Realizar extracciones de diferentes partes de la planta (fruto, semilla, tallos frescos, etc.), ya que de ello depende la cantidad y calidad de aceite esencial.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

No hay ninguna fuente en el documento actual.

No hay ninguna fuente en el documento actual.

1. Olga Lock de Ugaz (1994) Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. 2° ed. Peru.
1. Iannacone J. Alvarino L. (1994.) "Toxicidad de *Schinus molle* L. (Anacardiaceae) a cuatro controladores Olga Lock de Ugaz. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. 2° ed. Peru:
2. Iannacone J. Alvarino L. (2010) "Toxicidad de *Schinus molle* L. (Anacardiaceae) a cuatro controladores biológicos de plagas agrícolas en el Perú. Artículo Scielo versión On-line ISSN2448-8445 <http://www.scielo.org.mx/scielo.php>
3. Llanos Arapa S. (2012) Extracción y caracterización del aceite esencial de molle (*Schinus molle* L.) Escuela Académica Profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias Facultad de Ciencias Agropecuarias UNJBG, Tacna-Perú.
4. Alba, A., (2009). Actividad cicatrizante de una pomada con aceite esencial de *Schinus molle* L. (molle) en ganado vacuno con heridas infectadas y en ratones. Ciencia e Investigación.
5. Annacone J. et al (2010). Toxicidad de *Schinus molle* L. (Anacardiaceae) a cuatro controladores biológicos de plagas agrícolas en el Perú.
6. Méndez K. (2004) "Estudio comparativo in vitro del efecto antibacteriano del *Schinus molle* y el paramonoclorofenol alcanforado en bacterias anaerobias facultativas y estrictas de necrosis pulpar" [Tesis para optar el título de cirujano-dentista]. Universidad Nacional Federico Villarreal. Lima.
7. Daysi Rivadeneira-Cajas, Patricia Álvarez-Velasco "aceite esencial de *Schinus molle* L. (molle) como potencial antimicrobiano sobre *Streptococcus mutans*. estudio in vitro.
8. Cruz-Carrillo Anastasia, et al , evaluación in vitro del efecto antibacteriano de los extractos de *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* y *Silybum marianum*.

9. Guerra L. 2011, evaluación de la actividad antimicrobiana y antioxidante de aceites esenciales de plantas usadas n medicina tradicional.  
[Tesis Doctoral facultad de ciencias Biologicas]. Universidad nacional del sur.Argentina.URI:  
<http://repositoriodigital.uns.edu.ar/handle/123456789/2100>.
10. Clemente Sotteccani Claudia. Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. “molle”. [Tesis para optar el Título profesional de Químico Farmacéutico]. Universidad Alas Peruanas. Lima 2017.
11. Gonzalez, A. (2009). Actividad cicatrizante de una pomada con aceite esencial de *Schinus molle* L. “molle” en ganado vacuno con heridas infectadas y en ratones. Tesis de grado,Farmacia y Bioquímica ,Ibarra, Ecuador. Baroni, E.et al “Actividad antibacteriana in vitro de ciprofloxacina sobre *Escherichia coli*: efecto del suero bovino y tamaño del inóculo (2014).
12. Herrrera Ascoy, Nereyda Pamela. Efecto del extracto hidroalcohólico de hojas de *Schinus molle* L. “molle” sobre la viabilidad de *Streptococcus β-hemolítico* “in vitro”. [Tesis Doctoral facultad de ciencias Biologicas]. Universidad Nacional de Trujillo.Peru 2013. URI:  
<http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/3467>.
13. Trejo R. Efecto antidiarreico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Schinus molle* L.(molle). [Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico]. Universidad Nacional San Cristobal de Huamanga. Ayacucho – Peru 2014.
14. Molinari E. Estudio fitoquímica y potencial biosida de los aceites extraídos de *Schinus molle*. [Tesis de grado]. Perú: Universidad Nacional Agraria la Molina; 2013.

15. Dikshit, A., Naqvi, A. y Husain, A. (1986). *Schinus molle*: a New Source of Natural Fungitoxicant. Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants of India. Recuperado el 08 de octubre de 2010.  
<http://aem.asm.org/cgi/reprint/51/5/1085.pdf>.
16. Diaz C. et al. Composición química del aceite esencial de *Schinus molle* y su actividad citotóxica en líneas celulares tumorales. Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. *Nat Prod Res.* 2008; 22 (17): 1521-34. doi: 10.1080 / 14786410701848154.
17. Alonso MJ, Allue J. Fitoterapia para los trastornos urinarios: retención hídrica, infecciones urinarias, litiasis renal. En: Castillo E, Martínez I. *Manual de Fitoterapia*. Elsevier Masson, Barcelona, 2007, pp 315-327.
18. Sánchez Merino J. et al. Sensibilidad microbiana de *Escherichia coli* en infecciones urinarias extrahospitalarias. *Rev. Scielo, Actas Urol Esp* vol.27 no.10 nov./dic. 2003. ISSN 0210-4806.
19. Jiménez M, Fernández e. Infecciones urinarias en la mujer y en el paciente geriátrico. En: Navío S, editor. *Patología urológica infecciosa*. Madrid. Aula Médica, Ediciones 1999: 87-102.
20. NCCLS: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically - fourth edition; approved standard. NCCLS document M7-A4 (ISBN 1-56238-309-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400; Wayne, Pennsylvania 19087, USA 1997.
21. Fernández a, Lantero m, Gastañares MJ et al. *Escherichia coli* resistente a quinolonas en el área sanitaria de un hospital de 650 camas. *Actas Urol Esp* 1994; 18 (6): 634-638.
22. Albarracín, G. y Gallo, S. (2003). Comparación de dos métodos de extracción de aceite esencial de *Piper aduncum* (cordoncillo) procedente de la zona cafetera. Universidad Nacional de Colombia. mayode2010 de

<http://www.digital.unal.edu.co/dspace/bitstream/10245/1574/1/gloriacristinaalbarracinmontoya.2003.pdf>.

23. Pigrau Serrallach C. Servicio de Enfermedades Infecciosas Hospital Vall d'Hebron Universitat Autònoma. Barcelona. REV. 2013 Ergon C/ Arboleda, 1. 28221 Majadahonda (Madrid).
24. Naber KG. Which fluoroquinolones are suitable for the treatment of urinary tract infections? *Int J Antimicrob Agents*. 2001;17(4):331-341.
25. Matthew A. Croxen et al. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* October 2013 26(4): 822-880.
26. Morales R. Estudio de la extracción del aceite esencial de la semilla del *Schinus molle* Linneo a escala banco. [Tesis, para optar el título de ingeniero químico]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2000.
27. Toledo E. Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) sobre distintas cepas aisladas de alimentos. Lima: Universidad Nacional del Callao; 2006.
28. Diaz P, Torres R. Actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de *Schinus molle*. [Tesis, para optar el título de ingeniero químico farmacéutico]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 1998.
29. Bandoni, A., Retta, D., Di Leo Lira, P. y Van Baren, C. (2009). ¿Son realmente útiles los aceites esenciales? *Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica*. Recuperado el 21 de junio de 2010. En: <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/856/85611977001.pdf>.
30. Abasto K, Avilés E, Céspedes G, Claros E, Guillén V, Luna N, Morales M. Plantas medicinales y sus usos. *Revista científica Burbuja universitaria*. [Revista en Internet]. Citado el 24 mayo de 2010. En: <http://www.univalle.edu/publicaciones/brujula/brujula17/pagina10.htm>.

31. Milojević S. Z., T. D. Stojanović, R. Palić, M. L. Lazić, V. B. Veljković. "Kinetics of distillation of essential oil from comminuted ripe juniper (*Juniperus communis* L.) berries". *Biochemical Engineering Journal* 39: 547-553, 2008.
32. Lagos E. Determinación de la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial *Thymus vulgaris* L. "tomillo" frente a *Porphyromonas gingivalis* atcc 33277 causante de gingivitis. [Tesis de grado]. Perú: Unidad Nacional Jorge Basadre Groh; 2012.
33. Vargas, A. y Bottia, E. (2008). Estudio de la composición química de los aceites esenciales de seis especies vegetales cultivadas en los Municipios de Bolívar y el Peñón. Universidad Industrial de Santander. Ruperado. <http://cromatografia.uis.edu.co/cromatografia/investigacion/cibimol/tesis%20cibimol/Edwin%20Bottia%20y%20Adriana%20Vargas.pdf>.
34. Durafford, C. y Lapraz, J. 1983. Cuadernos de Fitoterapia Clínica. Editorial Masson S.A. Barcelona.
35. García J. y Picasso J. 2000. "Compendio de Microbiología Médica". Ediciones Harcourt, S.A. Madrid España.
36. Huguet, J. 2002. Determinación de factores de virulencia asociados a *Escherichia coli* Enterocolítico hemorrágico en cepas peruanas aisladas entre 1999-2001. *Revista Peruana Medicina Experimental (Perú)*. vol.19(2).
37. Viturro, C., Bandoni, A., Dellacassa, E., Serafini, L. y Elder, H. (2010). Normalización de productos naturales obtenidos de especies de la flora aromática latinoamericana- Problemática *Schinus* en Latinoamérica. Proyecto CYTED IV.20. Recuperado el 09 de agosto de 2011, de <http://www.pucrs.br/edipucrs>.
38. Lock de Ugaz, O. 1994. Investigación Fitoquímica, Métodos en el Estudio de Productos Naturales. 2da Edición. Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima.



39. National committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M7-A5. Wayne.
40. Vargas, A. y Bottia, E. 2008. Estudio de la composición química de los aceites esenciales de seis especies vegetales cultivadas en los Municipios de Bolívar y el Peñón. Tesis de la Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga – Colombia.
41. Universidad Nacional de Ingeniería – UNI. (2012). Determinación de la composición química del aceite esencial de molle, muestra N° 01 AELP (Informe Técnico N° 1562-11-LAB12). Lima: Facultad de Ciencias.
42. Ruffinengo, S., Maggi, N., Damiani, N., Faverin, C. y Eguaras, M. (2007). Eficacia del aceite esencial micro encapsulado de *Schinus molle* sobre Varroa Destructor. Dirección Nacional de Alimentos de Buenos Aires. Recuperado: el 18 octubre de 2011, de [http://www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/apicola/01\\_info/a\\_sintesis/lista/122.pdf](http://www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/apicola/01_info/a_sintesis/lista/122.pdf).
43. Brooks G, Butel J, Ornston N. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick
44. Adelberg. 15<sup>o</sup> edición. México: Editorial Manual Moderno; 1996.
45. biológicos de plagas agrícolas en el Perú. Artículo Scielo 2010 versión Online ISSN2448-8445 <http://www.scielo.org.mx/scielo.php>
46. Llanos Arapa S. Extracción y caracterización del aceite esencial de molle (*Schinus molle* L.) Escuela Académica Profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias (2012) Facultad de Ciencias Agropecuarias UNJBG, Tacna-Perú.
47. Alba, A., (2009). Actividad cicatrizante de una pomada con aceite esencial de *Schinus molle* L. (molle) en ganado vacuno con heridas infectadas y en ratones. Ciencia e Investigación.
48. Annacone J. et al (2010). Toxicidad de *Schinus molle* L. (Anacardiaceae) a cuatro controladores biológicos de plagas agrícolas en el Perú.

49. Méndez K. “Estudio comparativo in vitro del efecto antibacteriano del *Schinus molle* y el paramonoclorofenol alcanforado en bacterias anaerobias facultativas y estrictas de necrosis pulpar” [Tesis para optar el título de cirujano-dentista]. Universidad Nacional Federico Villarreal. Lima. 2004.
50. Daysi Rivadeneira-Cajas, Patricia Álvarez-Velasco “aceite esencial de *Schinus molle* L. (molle) como potencial antimicrobiano sobre *Streptococcus mutans*. estudio in vitro.
51. Cruz-Carrillo Anastasia, et al , evaluación in vitro del efecto antibacteriano de los extractos de *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* y *Silybum marianum*.
52. Guerra L. 2011, evaluación de la actividad antimicrobiana y antioxidante de aceites esenciales de plantas usadas n medicina tradicional.  
[Tesis Doctoral facultad de ciencias Biologicas]. Universidad nacional del sur.Argentina.URI:  
<http://repositoriodigital.uns.edu.ar/handle/123456789/2100>.
53. Clemente Sotteccani Claudia. Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. “molle. [Tesis para optar el Título profesional de Químico Farmacéutico]. Universidad Alas Peruanas. Lima 2017.
54. Gonzalez, A. (2009). Actividad cicatrizante de una pomada con aceite esencial de *Schinus molle* L. “molle” en ganado vacuno con heridas infectadas y en ratones. Tesis de grado,Farmacia y Bioquímica ,Ibarra, Ecuador. Baroni, E.et al “Actividad antibacteriana in vitro de ciprofloxacina sobre *Escherichia coli*: efecto del suero bovino y tamaño del inóculo (2014).
55. Herrera Ascoy, Nereyda Pamela. Efecto del extracto hidroalcohólico de hojas de *Schinus molle* L. “molle” sobre la viabilidad de *Streptococcus β*-

*hemolítico* “in vitro”. [Tesis Doctoral facultad de ciencias Biologicas]. Universidad Nacional de Trujillo.Peru 2013. URI: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/3467>.

56. Trejo R. Efecto antidiarreico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Schinus molle* L.(molle). [Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico]. Universidad Nacional San Cristobal de Huamanga. Ayacucho – Peru 2014.
57. Molinari E. Estudio fitoquímica y potencial biosida de los aceites extraídos de *Schinus molle*. [Tesis de grado]. Perú: Universidad Nacional Agraria la Molina; 2013.
58. Dikshit, A., Naqvi, A. y Husain, A. (1986). *Schinus molle*: a New Source of Natural Fungitoxicant. Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants of India. Recuperado el 08 de octubre de 2010. <http://aem.asm.org/cgi/reprint/51/5/1085.pdf>.
59. Diaz C. et al. Composición química del aceite esencial de *Schinus molle* y su actividad citotóxica en líneas celulares tumorales. Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Ric Nat Prod Res. 2008; 22 (17): 1521-34. doi: 10.1080 / 14786410701848154.
60. Alonso MJ, Allue J. Fitoterapia para los trastornos urinarios: retención hídrica, infecciones urinarias, litiasis renal. En: Castillo E, Martínez I. Manual de Fitoterapia. Elsevier Masson, Barcelona, 2007, pp 315-327.
61. Sánchez Merino J. et al Sensibilidad microbiana de *Escherichia coli* en infecciones urinarias extrahospitalarias. Rev. Scielo, Actas Urol Esp vol.27 no.10 nov./dic. 2003. ISSN 0210-4806.
62. Jiménez M, Fernández e. Infecciones urinarias en la mujer y en el paciente geriátrico. En: Navío S, editor. Patología urológica infecciosa. Madrid. Aula Médica, Ediciones 1999: 87-102.

63. NCCLS: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically - fourth edition; approved standard. NCCLS document M7-A4 (ISBN 1-56238-309-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400; Wayne, Pennsylvania 19087, USA 1997.
64. Fernández a, Lantero m, Gastañares MJ et al. *Escherichia coli* resistente a quinolonas en el área sanitaria de un hospital de 650 camas. Actas Urol Esp 1994; 18 (6): 634-638.
65. Albarracín, G. y Gallo, S. (2003). Comparación de dos métodos de extracción de aceite esencial de Piper aduncum (cordoncillo) procedente de la zona cafetera. Universidad Nacional de Colombia. mayode2010 de <http://www.digital.unal.edu.co/dspace/bitstream/10245/1574/1/gloriacristinaalbarracinmontoya.2003.pdf>.
66. Pigrau Serrallach C. Servicio de Enfermedades Infecciosas Hospital Vall d'Hebron Universitat Autònoma. Barcelona. REV. 2013 Ergon C/ Arboleda, 1. 28221 Majadahonda (Madrid).
67. Naber KG. Which fluoroquinolones are suitable for the treatment of urinary tract infections? Int J Antimicrob Agents. 2001;17(4):331-341.
68. Matthew A. Croxen et al. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. October 2013 26(4): 822-880.
69. Morales R. Estudio de la extracción del aceite esencial de la semilla del *Schinus molle* Linneo a escala banco. [Tesis, para optar el título de ingeniero químico]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2000.
70. Toledo E. Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) sobre distintas cepas aisladas de alimentos. Lima: Universidad Nacional del Callao; 2006.

71. Diaz P, Torres R. Actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de *Schinus molle*. [Tesis, para optar el título de ingeniero químico farmacéutico]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 1998.
72. Bandoni, A., Retta, D., Di Leo Lira, P. y Van Baren, C. (2009). ¿Son realmente útiles los aceites esenciales? Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica. Recuperado el 21 de junio de 2010. En: <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/856/85611977001.pdf>.
73. Abasto K, Avilés E, Céspedes G, Claros E, Guillén V, Luna N, Morales M. Plantas medicinales y sus usos. Revista científica Burbuja universitaria. [Revista en Internet]. Citado el 24 mayo de 2010. En: <http://www.univalle.edu/publicaciones/brujula/brujula17/pagina10.htm>.
74. Milojević S. Z., T. D. Stojanović, R. Palić, M. L. Lazić, V. B. Veljković. "Kinetics of distillation of essential oil from comminuted ripe juniper (*Juniperus communis* L.) berries". *Biochemical Engineering Journal* 39: 547-553, 2008.
75. Lagos E. Determinación de la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial *Thymus vulgaris* L. "tomillo" frente a *Porphyromonas gingivalis* atcc 33277 causante de gingivitis. [Tesis de grado]. Perú: Unidad Nacional Jorge Basadre Groh; 2012.
76. Vargas, A. y Bottia, E. (2008). Estudio de la composición química de los aceites esenciales de seis especies vegetales cultivadas en los Municipios de Bolívar y el Peñón. Universidad Industrial de Santander. Ruperado. <http://cromatografia.uis.edu.co/cromatografia/investigacion/cibimol/tesis%20cibimol/Edwin%20Bottia%20y%20Adriana%20Vargas.pdf>.
77. Durafford, C. y Lapraz, J. 1983. Cuadernos de Fitoterapia Clínica. Editorial Masson S.A. Barcelona.
78. García J. y Picasso J. 2000. "Compendio de Microbiología Médica". Ediciones Harcourt, S.A. Madrid España.

79. Huguet, J. 2002. Determinación de factores de virulencia asociados a *Escherichia coli* Entero hemorrágica en cepas peruanas aisladas entre 1999-2001. Revista Peruana Medicina Experimental (Perú). vol.19(2).
80. Viturro, C., Bandoni, A., Dellacassa, E., Serafini, L. y Elder, H. (2010). Normalización de productos naturales obtenidos de especies de la flora aromática latinoamericana- Problemática *Schinus* en Latinoamérica. Proyecto CYTED IV.20. Recuperado el 09 de agosto de 2011, de <http://www.pucrs.br/edipucrs>.
81. Lock de ugaz, O. 1994. Investigación Fitoquímica, Métodos en el Estudio de Productos Naturales. 2da Edición. Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima.
82. National committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M7-A5. Wayne.
83. Vargas, A. y Bottia, E. 2008. Estudio de la composición química de los aceites esenciales de seis especies vegetales cultivadas en los Municipios de Bolívar y el Peñón. Tesis de la Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga – Colombia.
84. Universidad Nacional de Ingeniería – UNI. (2012). Determinación de la composición química del aceite esencial de molle, muestra N° 01 AELP (Informe Técnico N° 1562-11-LAB12). Lima: Facultad de Ciencias.
85. Ruffinengo, S., Maggi, N., Damiani, N., Faverin, C. y Eguaras, M. (2007). Eficacia del aceite esencial micro encapsulado de *Schinus molle* sobre Varroa Destructor. Dirección Nacional de Alimentos de Buenos Aires. Recuperado: el 18 octubre de 2011, de [http://www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/apicola/01\\_info/a\\_sintesis/lista/122.pdf](http://www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/apicola/01_info/a_sintesis/lista/122.pdf).
86. Brooks G, Butel J, Ornston N. Microbiología Médica de Jawetz, Melnicky

87. Adelberg. 15<sup>o</sup> edición. México: Editorial Manual Moderno; 1996.

# **ANEXOS**



*ANEXO 1*

"EFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE MOLLE ( <i>Schinus molle</i> L.) FRENTE A CEPAS DE <i>Escherichia coli</i> " IN VITRO						
PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPÓTESIS GENERAL			METODOLOGIA	
			VARIABLE INDEPENDIENTE	Dimensiones	Indicadores	
¿El aceite esencial de las hojas de molle ( <i>Schinus molle</i> L.) tendrá efecto antibacteriano en cepas de <i>Escherichia coli</i> in vitro?	Comprobar que aceite esencial de las hojas de molle ( <i>Schinus molle</i> L.) tiene actividad antibacteriano en cepas de <i>Escherichia coli</i> in vitro.	El aceite esencial de las hojas de molle ( <i>Schinus molle</i> L.) tiene actividad antibacteriano en cepas de <i>Escherichia coli</i> in vitro	Aceite esencial de las hojas de molle ( <i>Schinus molle</i> L.).	Organoléptico Cromatografía (GC-FID)	Identificación de Metabolitos secundarios  Concentración: 50%, 75%, 100% Ciprofloxacino	<b>DISEÑO:</b> Experimental <b>TIPO:</b> Aplicativo <b>NIVEL:</b> Explicativo <b>POBLACION Y MUESTRA</b>  <b>POBLACION:</b> Planta de <i>Schinus molle</i> L. <b>MUESTRA:</b> 8 kilos de Hojas de <i>Schinus molle</i> L.  <b>TECNICA:</b> Disco Difusión en placas.  25 placa (80 Mediciones)  <b>INSTRUMENTO</b> Ficha de observación  <b>PROCESAMIENTO Y ANALISIS DE DATOS</b>  Prueba de Normalidad Descriptivo no paramétrico
PROBLEMAS ESPECIFICOS	OBJETIVOS ESPECIFICOS	HIPOTESIS ESPECIFICAS	VARIABLE DEPENDIENTE			
¿Qué tipos de metabolitos secundarios presenta en mayor concentración el aceite esencial de las hojas de molle ( <i>Schinus molle</i> L.) que posea actividad antibacteriana en cepas de <i>Escherichia coli</i> in vitro?	Identificar qué tipos de metabolitos secundarios presenta en mayor concentración el aceite esencial de las hojas de molle ( <i>Schinus molle</i> L.) que posea actividad antibacteriana en cepas de <i>Escherichia coli</i> in vitro.	Existen algunos metabolitos secundarios en mayor concentración en el aceite esencial de las hojas de molle ( <i>Schinus molle</i> L.) que posee actividad antibacteriana en cepas de <i>Escherichia coli</i> in Vitro.	Actividad antibacteriano	Microbiológica	<i>Escherichia coli</i> (ATCC® 25922™),  Halos de inhibición	
¿En qué concentración el aceite esencial de las hojas de molle ( <i>Schinus molle</i> L.) posee actividad antibacteriana en cepas de <i>Escherichia coli</i> in vitro?	Precisar la concentración del aceite esencial de las hojas de molle ( <i>Schinus molle</i> L.) con actividad antibacteriano en cepas de <i>Escherichia coli</i> in vitro.	Existe una concentración del aceite esencial de las hojas de molle ( <i>Schinus molle</i> L.) con actividad antibacteriano en cepas de <i>Escherichia coli</i> in vitro.				
¿Cuál será la actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de molle ( <i>Schinus molle</i> L.) comparado con ciprofloxacino frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> in vitro?	Comparar la actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de molle ( <i>Schinus molle</i> L.) con ciprofloxacino frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> in vitro.	Presenta actividad antibacteriano el aceite esencial de las hojas de molle ( <i>Schinus molle</i> L.) comparado con ciprofloxacino frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> in vitro.	VIN: Periodo de incubación	Observacional	24, 48 y 72 horas.	



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO  
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

## CONSTANCIA N° 33-USM-2018

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (tallo con hojas y botones florales), recibida de **Rudy Wider SOTO MACETAS**; Bachiller de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Particular Inca Garcilaso De La Vega; ha sido estudiada y clasificada como: **Schinus molle** L.; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

**DIVISION: MAGNOLIOPHYTA**

**CLASE: MAGNOLIOPSIDA**

**SUB CLASE: ROSIDAE**

**ORDEN: SAPINDALES**

**FAMILIA: ANACARDIACEAE**

**GENERO: Schinus**

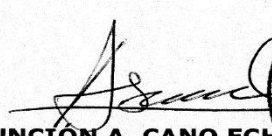
**ESPECIE: Schinus molle L.**

Nombre vulgar: "molle".

Determinado por: Mag. Asunción A. Cano Echevarría

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 30 de enero de 2018

  
Mag. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRÍA  
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)




ACE/yhr.



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<b>Specifications</b> Microorganism Name: Escherichia coli Catalog Number: 0335 Lot Number: 335-184** Reference Number: ATCC® 25922™* Purity: Pure Passage from Reference: 4	<b>Expiration Date:</b> 2018/3/31 <b>Release Information:</b> <b>Quality Control Technologist:</b> Tanner E. Rothstein <b>Release Date:</b> 2016/5/2
--	---

Performance	
<b>Macroscopic Features:</b> 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	<b>Medium:</b> SBAP
<b>Microscopic Features:</b> Gram negative straight rod	<b>Method:</b> Gram Stain (1)
<b>ID System:</b> MALDI-TOF See attached ID System results document.	<b>Other Features/ Challenges: Results</b> (1) Oxidase (Kovacs): negative Beta-glucuronidase (E. coli Broth w/MUG): positive (1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 16 - 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 Quality Control Manager 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.

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(\*) 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.



(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.

TESTING CERT #2655.01

*ANEXO 3: Certificado de calidad de las Cepas Escherichia Coli. (ATCC 29522)*

## Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



### Meaning of Score Values

Range	Description	Symbols	Color
2.300 ... 3.000	highly probable species identification	(+++)	green
2.000 ... 2.299	secure genus identification, probable species identification	(++)	green
1.700 ... 1.999	probable genus identification	(+)	yellow
0.000 ... 1.699	not reliable identification	(-)	red


### Meaning of Consistency Categories (A – C)

Category	Description
A	<b>Species Consistency:</b> The best match was classified as 'green' (see above). Further 'green' matches are of the same species as the first one. Further 'yellow' matches are at least of the same genus as the first one.
B	<b>Genus Consistency:</b> The best match was classified as 'green' or 'yellow' (see above). Further 'green' or 'yellow' matches have at least the same genus as the first one. The conditions of species consistency are not fulfilled.
C	<b>No Consistency:</b> Neither species nor genus consistency (Please check for synonyms of names or microbial mixture).

Analyte Name: Escherichia coli  
 Analyte Description: 0335  
 Analyte ID: 335-184  
 Analyte Creation Date/Time: 2016-04-27T15:02:21.540 TR  
 Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library 1.0, IVD, Listeria  
 Applied Taxonomy Tree:

Rank(Quality)	Matched Pattern	ScoreValue	NCBIIdentifier
1(+++)	<a href="#">Escherichia coli ATCC 25922 THL</a>	2.468	<a href="#">562</a>
2(+++)	<a href="#">Escherichia coli ATCC 25922 CHB</a>	2.376	<a href="#">562</a>
3(+++)	<a href="#">Escherichia coli DSM 682 DSM</a>	2.329	<a href="#">562</a>
4(++)	<a href="#">Escherichia coli DSM 1103_QC.DSM</a>	2.292	<a href="#">562</a>
5(++)	<a href="#">Escherichia coli MB11464_1 CHB</a>	2.234	<a href="#">562</a>
6(++)	<a href="#">Escherichia coli DH5alpha BRL</a>	2.217	<a href="#">562</a>
7(++)	<a href="#">Escherichia coli RV412_A1_2010_06a.LBK</a>	2.216	<a href="#">562</a>
8(++)	<a href="#">Escherichia coli Nissl.VML</a>	2.215	<a href="#">562</a>
9(++)	<a href="#">Escherichia coli ESBL_EA_RSS_1528T.CHB</a>	2.187	<a href="#">562</a>
10(++)	<a href="#">Escherichia coli DSM 1576.DSM</a>	2.158	<a href="#">562</a>

ANEXO 4: Certificado de calidad de los medios de cultivo Agar

	<b>Certificado de Análisis</b>	Fecha de Emisión 17/02/2018
---	--------------------------------	--------------------------------

Código Producto: PA901004

## Descripción: Agar Mueller Hinton Placa 90x15 mm

**Lote: MH0198**

Fecha Elaboración: 15/02/2018

Fecha Vencimiento: 15/04/2018

El agar se preparó a partir del medio deshidratado BD Mueller Hinton Agar, siguiendo las instrucciones del fabricante y se adicionó 5% de sangre estéril de carnero.

### Ensayos

Apariencia	Medio de cultivo ámbar claro	Conforme
Esterilidad	Incubación a 35°C x 24 horas	Conforme
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Incubación a 35°C x 24 horas	Crecimiento.
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Incubación a 35°C x 24 horas	Crecimiento.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Incubación a 35°C x 24 horas	Crecimiento.

Lic. Luis Alvarado Rios  
CTMP 6765

ANEXO 5: Materia Prima



Figura 22:Árbol, hojas y flores de *Schinus molle* L. (Molle).



Fig. N° 23: Recolección y limpieza





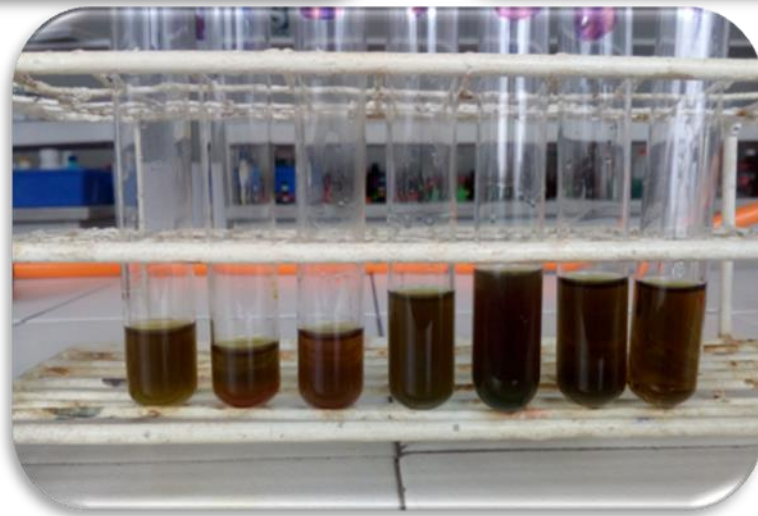
**Fig. N°24:** Secado y maceración del *Schinus molle L.* (molle).

ANEXO 6: Tamizaje fitoquímico del extracto de hojas *Shinus molle* L. (molle)

↗ **Alcaloides**



**Figura N° 23:** *Figura 23: Metabolitos secundarios, Alcaloides.*



*Figura 24: Metabolitos secundarios, flavonoides.*

ANEXO 7: Prueba de Solubilidad del extracto de las hojas del "molle"



*Figura 25: Ensayo de solubilidad.*

*ANEXO 8: Cromatografía en capa fina del extracto de la hoja de *Shinus molle* (molle).  
Alcaloides y Flavonoides*



*Figura 26: Sembrado en cromatografía de capa fina.*



Figura 27:

preparación del solvente, corrida de las muestras

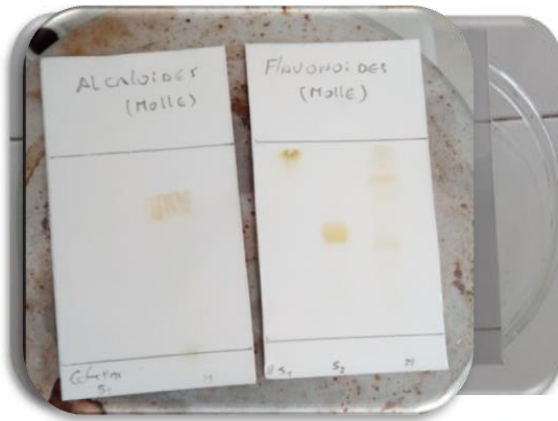
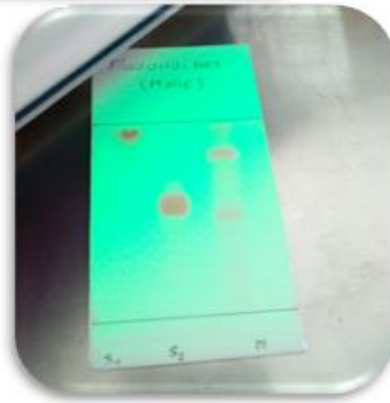


Figura 28: manchas de desplazamiento en la luz UV 254 nm.

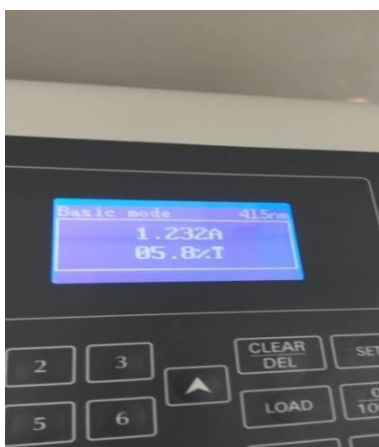


Figura

29:

resultados de Cromatografía capa fina

ANEXO 9: Cuantificación de Flavonoides totales por espectrofotometría UV-VIS



Lectura de las diluciones en espectrofotómetro UV-VIS a 415 nm

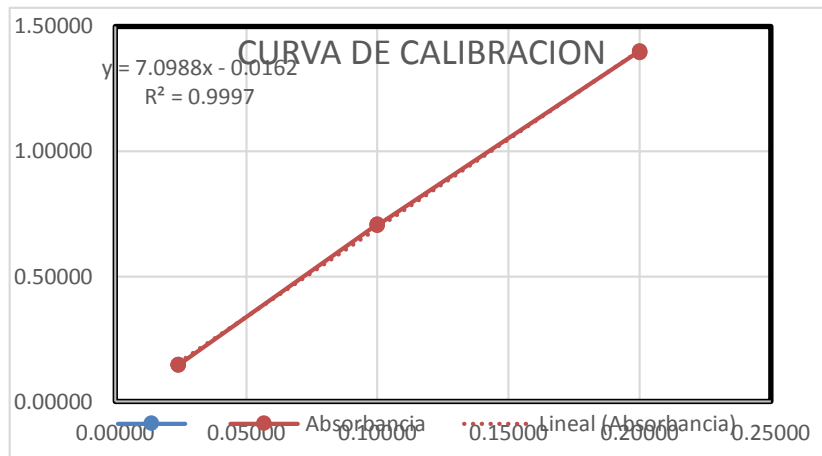


Figura 30: Obtención del aceite esencial de las hojas de molle (*Schinus molle* L.)



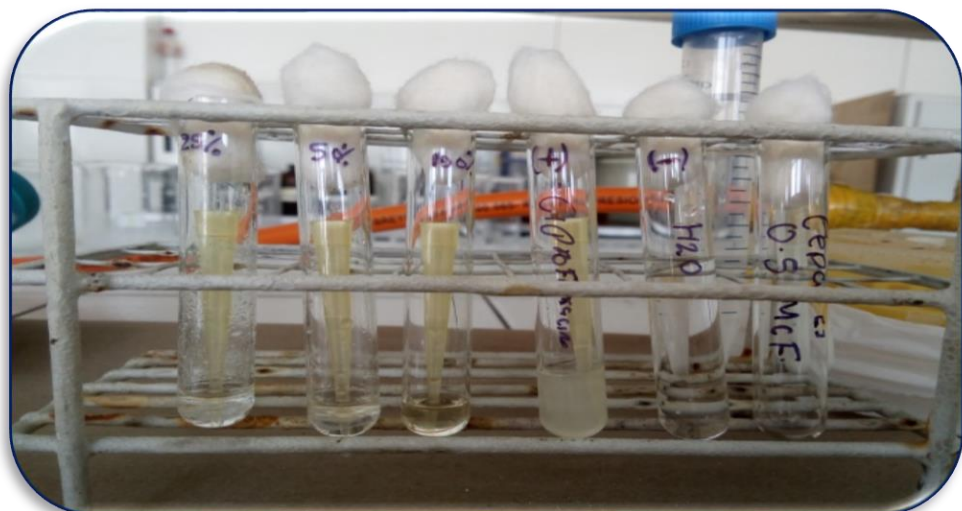
Armando el equipo de trabajo



Controlando siempre la temperatura

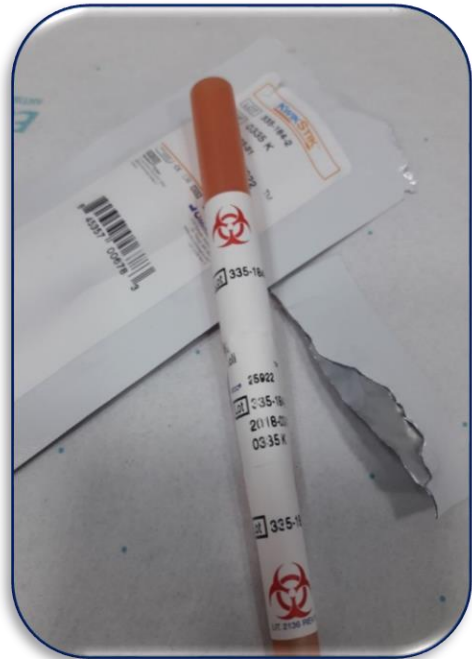
Figura 31: equipo de extracción

ANEXO 10: Preparación de los grupos experimentales



Se realizó las diluciones utilizando solvente Dimetilsulfoxido (DMSO)

Figura 32: dilución de las concentraciones  
ANEXO 11: Evaluación del Efecto Antibacteriano del Aceite Esencial de *Schinus molle* L. (molle).



Obtenidas del laboratorio Gen Lab.

Figura 33: bacteria *Escherichia coli* ATCC 25922.



Figura 34: Activación de las cepas bacteriana.



Patrón de Mc Farland adquirido de una casa comercial



Comparando la homogenización de la turbidez con el estándar de Mc Farland

Figura 35: Estandarización del inóculo bacteriano según la escala de 0.5 Mc Farland.





*Figura 36: Cepas puras de Escherichia coli ATCC 25922.*



Figura 37: Sembrado del inoculo bacteriano en agar Müeller Hinton:



Se procedió a la colocación de los discos de sensibilidad a las placas

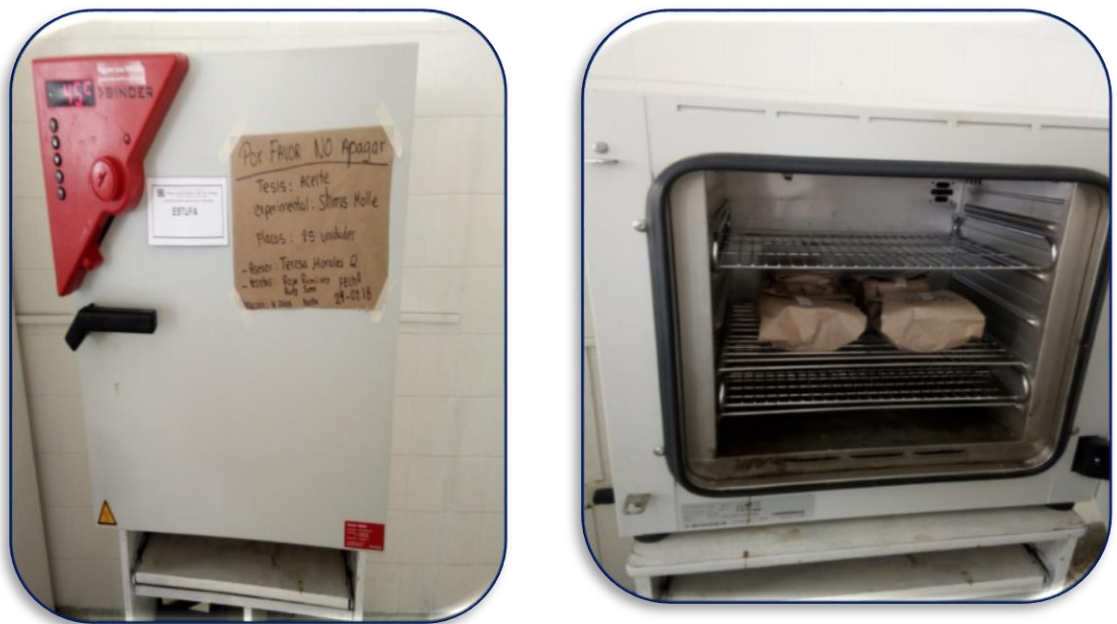
Se utilizaron 5 grupos: control positivo, control negativo, aceite esencial al 100%, 50% y 25%.

Figura 38: Aplicación de los discos de sensibilidad en las placas sembradas.



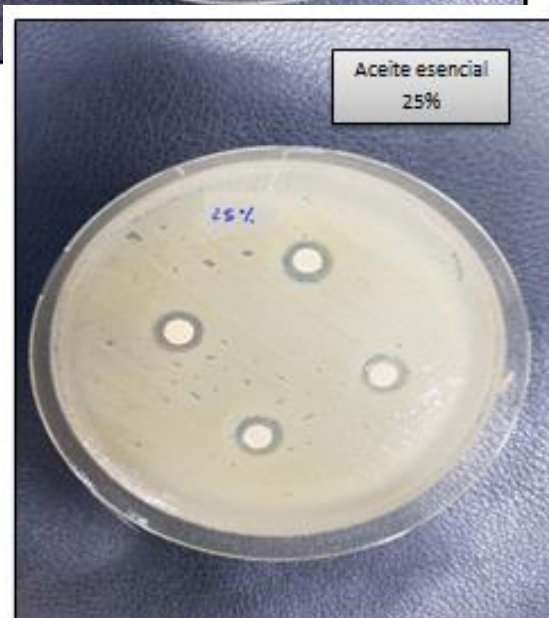
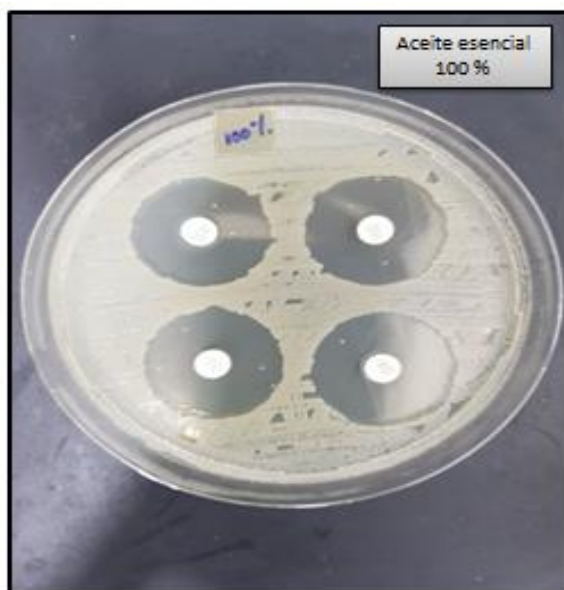
Procedemos a envolver con papel crack para llevar a la estufa a incubación

*Figura 39: Incubación a 37 °C por un periodo de 24, 48 y 72 horas.*

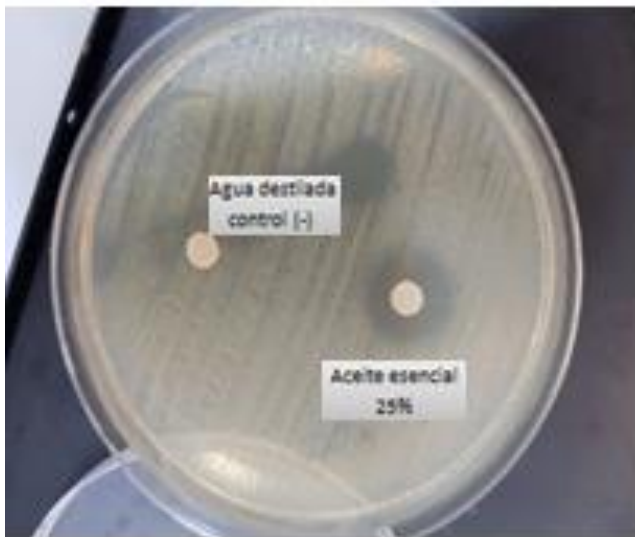


*Figura 40: Estufa conteniendo las placas Petri sembradas.*

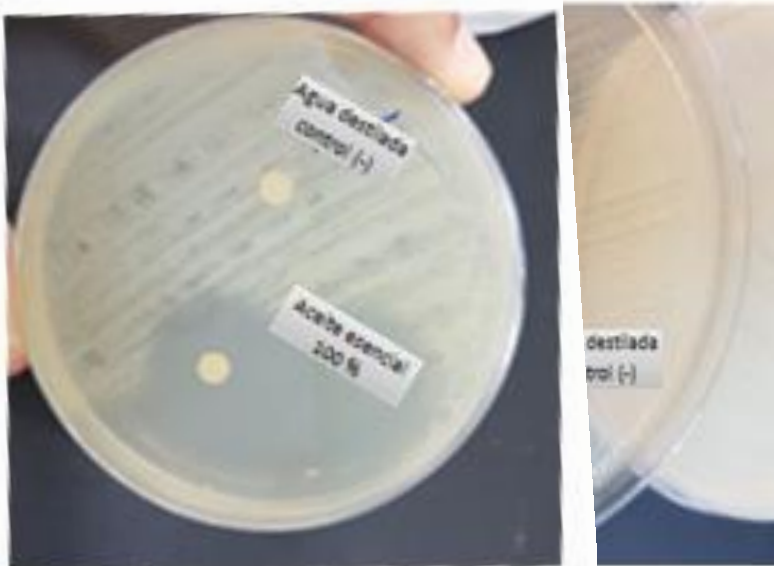
ANEXO 12: Resultado en placas de los halos de inhibición



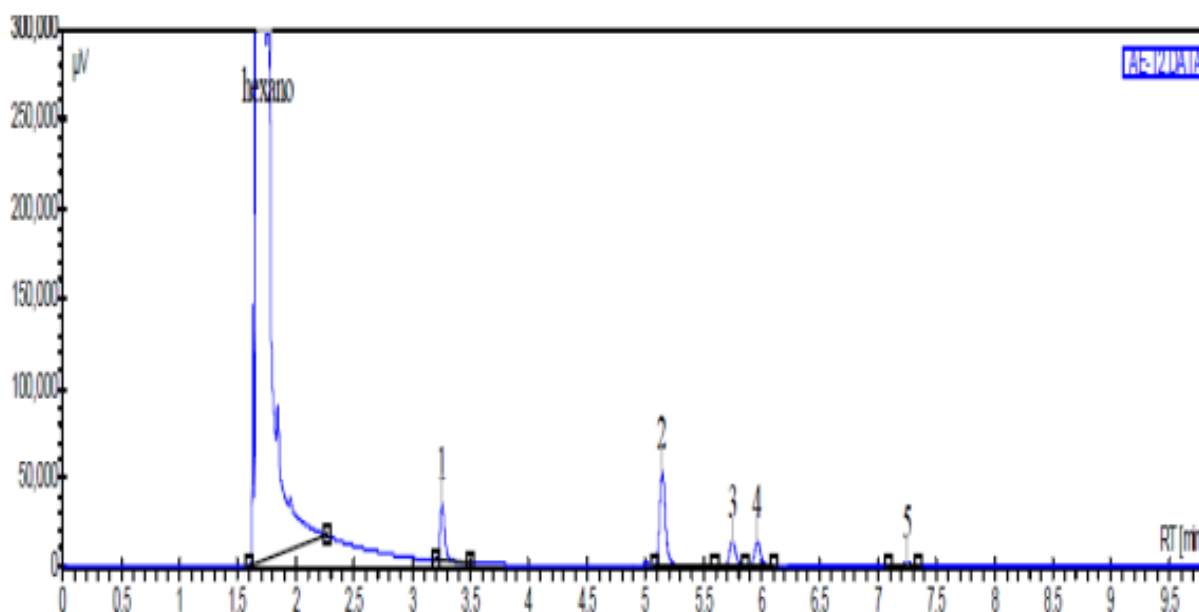
**Figura N° 40:** Susceptibilidad antibacteriana de *Escherichia coli* ATCC 25922 frente al aceite esencial de las hojas de *Shinus molle* (Molle) por el Método de disco difusión a las 72 h. (Halo de inhibición).



**Figura N°41:** Halos de inhibición en concentraciones al 25% con el control negativo. Resultados obtenidos a las 72 h.



*Figura 41: Halos de inhibición del aceite esencial al 50 y 100% en cultivos bacteriano de E. coli a las 72 horas con el control negativo.*



Fuente: Universidad Nacional de Ingeniería (UNI)

**Figura N° 43:** Cromatograma de picos para la muestra de aceite esencial de las hojas de molle (*Shinus molle L.*)

AE-T2.DATA [Middle (FID)]

Index	Name	Time [Min]	Quantity [% Area]	Height [µV]	Area [µV.Min]	Area % [%]
1	hexano	1.67	99.79	174898250.8	3000358.5	99.787
2	1	3.26	0.05	31569.3	1458.8	0.049
3	2	5.15	0.10	52522.1	3099.2	0.103
4	3	5.75	0.03	14472.1	876.3	0.029
5	4	5.96	0.03	13626.7	852.3	0.028
6	5	7.25	0.00	2029.5	129.1	0.004
Total			100.00	175012470.4	3006774.2	100.000

Fuente: Universidad Nacional de Ingeniería (UNI)

**Figura N°44:** Lectura de la cromatografía de los 5 picos de la muestra de aceite esencial de las hojas de molle (*Shinus molle L.*)