

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS,
BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS
PROGRAMA PROFESIONAL DE INGENIERÍA
BIOTECNOLÓGICA



**DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN Y ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Schinus
molle L.* (MOLLE) DE AREQUIPA Y MOQUEGUA CONTRA
Klebsiella pneumoniae, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus
aureus***

Presentado por el Bachiller:
Moncada Valerio Francisco Manuel
Para optar el Título Profesional de:
Ingeniero Biotecnólogo

Asesor:
Ing. Cinthia Córdova Barrios

AREQUIPA - PERU

2013

DEDICATORIA

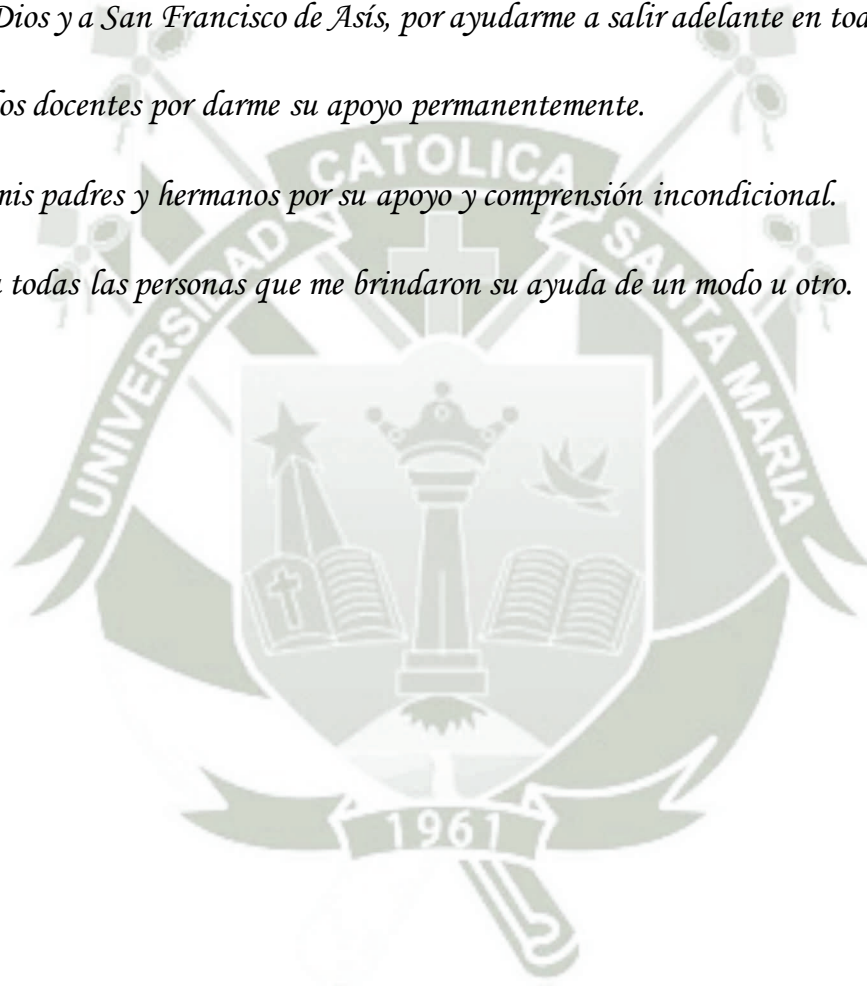
Mi tesis la dedico con mucho cariño:

A Dios y a San Francisco de Asís, por ayudarme a salir adelante en todo momento.

A los docentes por darme su apoyo permanentemente.

A mis padres y hermanos por su apoyo y comprensión incondicional.

Y a todas las personas que me brindaron su ayuda de un modo u otro.



ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	11
ABSTRACT	12
INTRODUCCIÓN	13
HIPÓTESIS	15
OBJETIVOS	16
OBJETIVO GENERAL	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
CAPÍTULO I	17
MARCO TEÓRICO	17
1.1 ACEITES ESENCIALES	17
1.1.1 Técnicas de extracción de aceites esenciales	18
1.1.2 Técnicas de identificación de compuestos presentes en aceite esenciales	21
1.2 <i>Schinus molle</i> L. (molle)	24
1.2.1 Antecedentes históricos del molle	24
1.2.2 Nombre comunes	24
1.2.3 Características morfológicas.....	24
1.2.4 Distribución y habitad.....	25
1.2.5 Floración y fructificación.....	26
1.2.6 Recolección y rendimientos	26
1.2.7 Cultivo	26
1.2.8 Usos	27
1.3 ACEITE ESENCIAL DE <i>Schinus molle</i> L. (MOLLE)	27

1.4	DESCRIPCION DE BACTERIAS PATOGENAS EN ESTUDIO34
1.4.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	34
1.4.1.1	Características generales.....	34
1.4.1.2	Bacteriología.....	34
1.4.1.3	Cuadros clínicos	34
1.4.1.4	Diagnostico	35
1.4.1.5	Tratamiento.....	35
1.4.2	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	35
1.4.2.1	Características generales.....	35
1.4.2.2	Diagnostico	36
1.4.2.3	Manifestaciones clínicas.....	36
1.4.2.4	Resistencia.....	37
1.4.2.5	Tratamiento.....	37
1.4.3	<i>Staphylococcus aureus</i>	37
1.4.3.1	Características generales.....	37
1.4.3.2	Estructura.....	37
1.4.3.3	Diagnóstico microbiológico	38
1.4.3.4	Patogénia de las infecciones producidas por <i>Staphylococcus aureus</i>	40
CAPÍTULO II.....		41
MATERIALES Y MÉTODOS.....		41
2.1 MATERIALES		41
2.1.1	Material biológico.....	41
2.1.2	Material de laboratorio.....	41
2.2 LUGAR DE INVESTIGACIÓN		43
2.3 MÉTODOS DE LABORATORIO		43

2.3.1	Área de Estudio.....	43
2.3.2	Recolección de las especies de <i>Schinus molle</i> L. (molle) de las localidades de Moquegua y Arequipa.	43
2.3.3	Extracción de aceites esenciales de <i>Schinus molle</i> L. (molle).....	44
2.3.3.1	Destilación por arrastre de vapor.....	44
2.3.3.2	Evaluación del rendimiento	45
2.3.4	Caracterización física del aceite esencial de <i>Schinus molle</i> L.	45
2.3.4.1	Determinación de la densidad:	45
2.3.4.2	Determinación del Índice de refracción:	46
2.3.5	Determinación de la composición química del aceite esencial de <i>Schinus molle</i> L.	46
2.3.5.1	Cromatografía de Gases.....	46
2.3.6	Evaluación y comparación de la actividad antimicrobiana	48
2.3.6.1	Recolección de cepas clínicas.....	48
2.3.6.2	Aislamiento e identificación de <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomona aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	48
2.3.6.3	Prueba de sensibilidad antimicrobiana	49
2.3.6.3.2	Determinación de la concentración bactericida mínima por microdilución.....	50
CAPÍTULO III.....		52
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		52
3.1	RECOLECCIÓN DE LAS ESPECIES DE <i>Schinus molle</i> L. (MOLLE) DE LAS LOCALIDADES DE MOQUEGUA Y AREQUIPA.	52
3.2	EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE <i>Schinus molle</i> L. (MOLLE).....	54
3.2.1	Destilación por arrastre de vapor	54

3.2.2	Evaluación del rendimiento.....	56
3.3	CARACTERIZACIÓN FÍSICA	61
3.3.1	Características organolépticas	61
3.3.2	Determinación de la densidad:	62
3.3.3	Determinación del Índice de refracción:	63
3.4	DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL ACEITE ESENCIAL POR CROMATOGRAFÍA DE GASES	66
3.4.1	Cromatografía de Gases (CG) para el aceite esencial de molle de Arequipa.....	66
3.4.2	Cromatografía de Gases (CG) para el aceite esencial de molle de Moquegua	67
3.5	EVALUACIÓN Y COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	71
3.5.1	Recolección de cepas clínicas	71
3.5.2	Aislamiento e identificación de <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomona aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	71
3.5.3	Prueba de sensibilidad antimicrobiana	77
CAPITULO IV	93
CONCLUSIONES	93
REFERENCIAS	96
APÉNDICES	103

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Árbol de <i>Schinus molle</i> L (molle).....	24
Figura 1.2 Rendimiento de AE (% v/p) en función del tiempo de extracción.	51
Figura 2.1 Flujograma del diseño experimental.....	51
Figura 3.1 Etiquetas de registro de la recolección de <i>Schinus molle</i> L. de la localidad de Arequipa	52
Figura 3.2 Etiquetas de registro de la recolección de <i>Schinus molle</i> L. de la localidad de Moquegua	53
Figura 3.3 Frutos de molle de Arequipa (Izquierda) y Moquegua (Derecha).....	54
Figura 3.4 Destilador por arrastre de vapor a escala piloto.....	54
Figura 3.5 Destilados obtenidos por el equipo de arrastre de vapor de <i>Schinus molle</i> L.....	55
Figura 3.6 Decantación de los destilados obtenidos de <i>Schinus molle</i> L.	56
Figura 3.7 Diagrama de caja y bigotes para rendimiento (%) de extracción de aceites esenciales de <i>Schinus molle</i> L.....	58
Figura 3.8 Aceite esencial purificado de <i>Schinus molle</i> L.	62
Figura 3.9 Cromatograma GC-MS del aceite esencial de <i>Schinus molle</i> L. (molle) de Arequipa.	66
Figura 3.10 Cromatograma GC-MS del aceite esencial de <i>Schinus molle</i> L. (molle) de Moquegua.	68
Figura 3.11 <i>Klebsiella</i> sp. en medio de cultivo Mac Conkey.	71
Figura 3.12 Pruebas de identificación bioquímicas para <i>Klebsiella pneumoniae</i> ..	72
Figura 3.13 <i>Pseudomona aeruginosa</i> en medio de cultivo Mac Conkey.....	74
Figura 3.14 Pruebas de identificación bioquímicas para <i>Pseudomona aeruginosa</i> ..	75
Figura 3.14-A Prueba de la oxidasa para <i>Pseudomona aeruginosa</i>	75
Figura 3.15 <i>Staphylococcus aureus</i> en medio de cultivo manitol salado.....	76
Figura 3.16 Prueba de catalasa (izquierda) y prueba de coagulasa (derecha).....	77
Figura 3.17 Halo de inhibición del aceite esencial <i>Schinus molle</i> L. (molle) de Arequipa en medio de cultivo Agar Müller-Hinton.	78

Figura 3.18 Gráfica de caja y bigotes para el halo de inhibición en <i>Klebsiella sp.</i> , <i>Pseudomona sp.</i> y <i>S. aureus</i> con el aceite esencial <i>Schinus molle L.</i> (molle) de Arequipa	79
Figura 3.19 Respuesta de los microorganismos <i>Klebsiella sp.</i> , <i>Pseudomona sp.</i> y <i>S. aureus</i> frente al aceite esencial de <i>Schinus molle L.</i> (molle) de Arequipa.	81
Figura 3.20 Halo de inhibición del aceite esencial <i>Schinus molle L.</i> (molle) de Moquegua en medio de cultivo Agar Müeller-Hinton.	82
Figura 3.21 Gráfica de caja y bigotes para el halo de inhibición en <i>Klebsiella sp.</i> , <i>Pseudomona sp.</i> y <i>S. aureus</i> con el aceite esencial <i>Schinus molle L.</i> (molle) de Moquegua.....	84
Figura 3.22 Gráfico de barras para la respuesta de cada microorganismo estudiado frente al aceite esencial de <i>Schinus molle L.</i> (molle) de la localidad de Arequipa y Moquegua.....	86
Figura 3.23 Placa de microdilución preparada antes de la incubación con 8 diluciones (50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.12%, 1.56%, 0.78% y 0.39%).	89
Figura 3.24 Placas Petri con medios de cultivo Manitol salado para muestras de <i>Staphylococcus aureus</i> . Los números mostrados corresponden a cada cepa de <i>S. aureus</i>	90
Figura 3.25 Placas Petri con medios de cultivo Manitol salado para controles positivos y negativos.	90
Figura 3.26 Gráfica del modelo ajustado del porcentaje de inhibición para <i>S. aureus</i> , frente a diferentes diluciones del aceite esencial de <i>Schinus molle L.</i> de la localidad de Arequipa.	92

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Usos de molle en medicina tradicional del Cuzco (Perú)	28
Tabla 1.2. Actividades biológicas de extractos de <i>Schinus</i>	29
Tabla 1.3 Componentes del aceite esencial de <i>Schinus molle</i>	30
Tabla 1.4 Datos bibliográficos de propiedades fisicoquímicas de <i>Schinus molle L.</i>	32
Tabla 1.5 Composición del aceite esencial de frutos secos y hojas de molle de Perú.	33
Tabla 1.6 Características principales del genero <i>Staphylococcus</i>	38
Tabla 1.7 Características bioquímicas que permiten diferenciar <i>S. aureus</i> de las principales especies patógenas de estafilococos coagulasa negativas	39
Tabla 1.8 Fases de La patogenia de las infecciones por <i>Staphylococcus aureus</i> y factores de virulencia involucrados.....	40
Tabla 3.1 Porcentaje de rendimiento del aceite esencial de <i>Schinus molle L.</i> (molle) de Arequipa.	56
Tabla 3.2 Porcentaje de rendimiento del aceite esencial de <i>Schinus molle L.</i> (molle) de Moquegua.	57
Tabla 3.3 Porcentaje de aceite esencial obtenido de <i>Schinus molle L.</i> de las localidades de Arequipa y Moquegua	57
Tabla 3.4 Pruebas estadísticas para comparar rendimientos de la extracción del aceite esencial de <i>Schinus molle L.</i> de las localidades de Arequipa y Moquegua. 59	
Tabla 3.5 Rendimiento y precios para algunos aceites esenciales	60
Tabla 3.6 Características organolépticas de los aceites esenciales de <i>Schinus molle L.</i> (molle).....	62
Tabla 3.7 Características físicas determinadas para los aceites esenciales de <i>Schinus molle L.</i> (molle).....	64
Tabla 3.8 Datos bibliográficos de propiedades físicas de <i>Schinus molle L.</i>	65
Tabla 3.9 Especificaciones de los metabolitos secundarios aislados por GC-MS de aceite esencial de <i>Schinus molle L.</i> (molle) de Arequipa.....	67
Tabla 3.10 Especificaciones de los metabolitos secundarios aislados por GC-MS de aceite esencial de <i>Schinus molle L.</i> (molle) de Moquegua.....	68

Tabla 3.11 Composición del aceite esencial de <i>Schinus molle L.</i> en función de la parte extraída de la planta.....	69
Tabla 3.12 Componentes mayoritarios del aceite esencial de <i>Schinus molle L.</i> en seis países de Latinoamérica.	70
Tabla 3.13 Halos de inhibición para <i>Klebsiella sp.</i> , <i>Pseudomona sp.</i> y <i>S. aureus</i> , en presencia del aceite esencial de <i>Schinus molle L.</i> (molle) de la localidad de Arequipa.....	78
Tabla 3.14 ANOVA para halos de inhibición de aceite esencial de <i>Schinus molle L.</i> (molle) de la localidad de Arequipa frente a <i>Klebsiella sp.</i> , <i>Pseudomona sp.</i> y <i>S. aureus</i>	80
Tabla 3.15 Respuesta del aceite esencial de <i>Schinus molle L.</i> (molle) de la localidad de Arequipa sobre los microorganismos estudiados.	80
Tabla 3.16 Chi-cuadrado de homogeneidad para la respuesta del aceite esencial de <i>Schinus molle L.</i> (molle) de la localidad de Arequipa sobre los microorganismos estudiados.	82
Tabla 3.17 Halos de inhibición para <i>Klebsiella sp.</i> , <i>Pseudomona sp.</i> y <i>S. aureus</i> , en presencia del aceite esencial de <i>Schinus molle L.</i> (molle) de la localidad de Moquegua.....	83
Tabla 3.18 ANOVA para halos de inhibición de aceite esencial de <i>Schinus molle L.</i> (molle) de la localidad de Moquegua frente a <i>Klebsiella</i> , <i>Pseudomona</i> y <i>S. aureus</i>	84
Tabla 3.19 Respuesta del aceite esencial de <i>Schinus molle L.</i> (molle) de la localidad de Moquegua sobre los microorganismos estudiados.	85
Tabla 3.20 Chi-cuadrado de independencia para la respuesta de los microorganismos estudiados frente al aceite esencial de <i>Schinus molle L.</i> (molle) de la localidad de Arequipa y Moquegua.....	87
Tabla 3.21 Respuesta de las cepas de <i>S. aureus</i> . en presencia de distintas diluciones del aceite esencial de <i>Schinus molle L.</i> (molle) de la localidad de Arequipa.....	89
Tabla 3.22 Recuento del crecimiento de cepas de <i>S. aureus</i> . en presencia de distintas diluciones del aceite esencial de <i>Schinus molle L.</i> (molle) de la localidad de Arequipa.....	91

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar la composición y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Schinus molle* L. (molle) de Arequipa y Moquegua contra *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Se procedió a realizar la extracción del aceite esencial de *Schinus molle* L, procedente de localidades de Arequipa y Moquegua, por el método de destilación por arrastre de vapor, teniendo en cuenta la presión y temperatura a la cual se iba a realizar el proceso.

Las características organolépticas y físicas fueron empleadas para determinar si es que el aceite esencial obtenido, se encontraba dentro de los límites establecidos, de índice de refracción (1.4761 a 1.4790) y densidad (0.8320 a 0.9037 g/cm³) según Viturro et. al (2011). La determinación de la composición química del aceite esencial de *Schinus molle* L. se realizó empleando un cromatógrafo de gases acoplado a espectro de masas (GC-MS), encontrándose como componentes mayoritarios, para ambos aceites esenciales, a α -pineno, β -pineno, β -mirceno, α -felandreno y Silvestreno; siendo β -mirceno predominante para la localidad de Arequipa y α -felandreno en la localidad de Moquegua, en base a los porcentajes de área registrados.

Los resultados obtenidos mostraron que el aceite esencial de *Schinus molle* L. de la localidad de Arequipa genera un efecto resistente contra *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomona aeruginosa*, y un efecto intermedio frente a *Staphylococcus aureus*. Mientras que el aceite esencial de *Schinus molle* L. de la localidad de Moquegua, genera un efecto resistente en los tres microorganismos estudiados. Así mismo, se identificó para *S. aureus* una CBM a una solución del 6.25% del aceite esencial obtenido de la localidad de Arequipa. Se concluye, por tanto, que el aceite esencial de *Schinus molle* L tiene un efecto intermedio contra bacterias gram-positivas y un efecto resistente frente a bacterias gram-negativas.

Palabras Claves: *Aceite esencial de Schinus molle* L. (molle), *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

The present research project had as objective to determine the composition and antimicrobial activity of the *Schinus molle* L. (molle) oil from the cities of Arequipa and Moquegua against the *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Schinus molle* L., samples from Arequipa and Moquegua were extracted using Steam distillation; taking into account pressure and temperature.

In order to identify the type of essential oil extract, organoleptic and physical characteristics were used, specifically the Refract index (1.4761 to 1.4790) and Density (0.8320 to 0.9037 g.cm³) should be between the ones reported by Viturro et. al (2011). To determine the chemical composition of the *Schinus molle* L. essential oil, a coupled gas chromatograph (GC- MS) was used; finding as main components, for both essential oils, α -pineno, β -pineno, β -mirceno, α -felandreno y Silvestreno; being β -mirceno the predominant for Arequipa and α -felandreno for Moquegua, according to the registered areas percentages.

The obtained results showed that the *Schinus molle* L. essential oil from Arequipa, generates a resistant effect against *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomona aeruginosa* and an intermediate effect against *Staphylococcus aureus*. While the *Schinus molle* L. essential oil from Moquegua, generates a resistant effect against the three studied microorganisms. As well, it was identified for *S. aureus* a MBC at a 6.25% from the Arequipa essential oil. Therefore, it is concluded that molle essential oils has an intermediate effect against gram-positive bacteria and a resistant effect against gram-negative bacteria.

Key words: *Schinus molle* L. (molle) essential oil, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*

INTRODUCCIÓN

Las infecciones intrahospitalarias (IIH), actualmente denominadas infecciones asociadas a la atención de la salud, son un problema de salud pública importante, debido a la frecuencia con que se produce, la morbilidad y mortalidad que provocan.

En el Perú, según el Boletín Epidemiológico, los datos registrados en 210 establecimientos con internamiento, al primer semestre del año 2013, reportaron un total de infecciones de 2628 (100 %), de los cuales el 18% correspondió al área de neumonías teniendo a *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* como principales agentes infecciosos. (Ministerio de salud)

Los aceites esenciales definidos como mezclas de sustancias obtenidas de plantas que presentan como características principales su compleja composición química y su carácter fuertemente aromático, son conocidos y utilizados desde la antigüedad en gran número de aplicaciones: perfume, ambientadores, cosméticos, medicinas, etc. La utilización de aceites esenciales como sustancias medicinales es una aplicación que actualmente vive un nuevo impulso, al quedar englobada dentro del gran auge que experimentan los productos naturales desde algunas décadas en los países más desarrollados. (Ortuño, 2006)

Actualmente, la aplicación clínico/médica de los aceites esenciales es una alternativa al empleo de las drogas químicas sintéticas, no sólo por ser antimicrobianos sino por ser agentes que mejoran el estado de ánimo, útiles en psicología y psiquiatría. (Damian, 2005)

Debido a que el Perú tiene una biodiversidad de sus especies vegetales, las cuales pueden ser aprovechadas, una clara alternativa es el *Schinus molle L.*, un árbol nativo cuyo aceite esencial presenta propiedades insecticidas, antibacterianas y antifúngicas, demostradas en un amplio espectro. (Chirino M & A., 2001) (Yueqin, 2006)

El objetivo del presente trabajo de investigación fue extraer, caracterizar físicamente y determinar la composición química del aceite esencial de *Schinus molle* L. (molle) de especies de Moquegua y Arequipa por Cromatografía de Gases con Espectrometría de Masas (GC-MS) y comparar su actividad antimicrobiana contra *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.



HIPÓTESIS

Dado que, el aceite esencial de *Schinus molle L.* (molle) contiene terpenos de los cuales el α -pineno, β -pineno y β -mirceno tienen la capacidad de atacar la membrana celular de los microorganismos; es probable que éste aceite, obtenido de Arequipa y Moquegua tenga efecto antimicrobiano frente a *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la composición y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Schinus molle* L. (molle) de especies de Moquegua y Arequipa contra *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Extraer aceite esencial de *Schinus molle* L. (molle) de las especies de Moquegua y Arequipa y evaluar su rendimiento.
2. Caracterizar físicamente el aceite esencial de *Schinus molle* L. (molle) de las especies de Moquegua y Arequipa.
3. Determinar la composición química del aceite esencial de *Schinus molle* L. (molle) de las especies de Moquegua y Arequipa por Cromatografía de gases con Espectrometría de masas.
4. Evaluar y comparar su actividad antimicrobiana contra *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.
5. Determinar la Concentración Bactericida Mínima (CBM) del aceite esencial de *Schinus molle* L. (molle) de las especies de Moquegua y Arequipa frente a los microorganismos sensibles.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales, resinas, extractos y especias son conocidos y utilizados desde la antigüedad en gran número de aplicaciones: perfumes, ambientadores, cosméticos, medicinas. Existen referencias en manuscritos egipcios, chinos y alrededor de 200 citas en la Biblia relacionadas con estas sustancias. (Matsuo, y otros, 2012)

Aceite esencial, fue en término utilizado por primera vez en el siglo XVI por Paracelso (famoso médico y farmacéutico) quien utilizó aceites esenciales como medicamentos y los considero como la “quinta esencia”, o elementos inmaterial presente en todo ser, propuesta por Aristóteles dos mil años antes y que junto a la tierra, el aire, el fuego y el agua constituyen elementos fundamentales que conforman todo ser vivo o inanimado, según la teoría aristotélica. (Matsuo, et al., 2012)

Entre los siglos XVI y XVII se prepararon por primera vez en las farmacias de todo el mundo la mayor parte de los aceites esenciales de que se dispone en la actualidad. (Matsuo, et al., 2012)

Con la llegada de la medicina moderna, la utilización de vacunas y antibióticos sustituyó a los antiguos remedios basados en aceites esenciales, aunque desde el siglo XIX su demanda creció hasta hacer necesaria la industrialización de la producción debido a su empleo masivo en perfumes y sabores para alimentación. Sobre el 1850 el fuerte impulso de la química orgánica sintética y el análisis de componentes de algunos aceites llevo a la producción de aceites aromáticos sintéticos que imitaba a los naturales de “*wintergreen*”, vainilla o almendras amargas (Matsuo, et al., 2012)

En la actualidad, los modernos métodos de análisis permiten una identificación exhaustiva de los componentes presentes en los aceites esenciales, particularmente

los que lo están en cantidades traza, responsables del perfil aromático, sutileza y finura de los productos naturales, lo que abre nuevas posibilidades en la obtención de productos interesantes. Por otra parte, la utilización de aceites esenciales como sustancias medicinales es una aplicación que actualmente vive un nuevo impulso, al quedar englobada dentro del gran auge que experimentan los productos naturales desde hace algunas décadas en los países más desarrollados. Así, cada vez ven la luz un mayor número de estudios y trabajos de investigación relacionados con interesantes características y propiedades de los aceites esenciales. (Ortuño, 2006)

Los aceites esenciales no son compuestos puros sino mezclas de multitud de sustancias (es fácil que un aceite esencial sea una mezcla de más de 100 sustancias químicas distintas) que se encuentran en distintas proporciones que en conjunto proporcionan al aceite esencial sus características propias (Matsuo, et al., 2012)

Las plantas aromáticas son las que concentran mayor una mayor cantidad de esencias y por tanto constituyen la materia prima para su obtención, bien sea empleando toda la planta, solo sus hojas, flores, frutos o raíces dependiendo de la planta concreta de que se trate. 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)

1.1.1 Técnicas de extracción de aceites esenciales

Los AE 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 AE, 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:

a) 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)

Un factor de especial importancia a considerar es que, si el calentamiento del alambique es con fuego directo, el agua presente en el alambique deberá ser suficiente y permanente para llevar a cabo toda la destilación a fin de evitar el sobrecalentamiento y la carbonización del material vegetal, dado que este hecho provoca la formación de olores desagradables en el producto final (Bandoni, 2000).

b) 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 (Güenther, 1955) (Schreier, 1984) (Denny, 1989)

c) **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)

d) **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)

e) **Expresión.** Estos procesos generalmente se aplican para extraer los volátiles presentes en la cáscara de los frutos cítricos, los cuales, al ser sometidos a elevadas temperaturas, pueden alterarse por degradación térmica (Güenther, 1955) (Jennings & Rapp, 1983). La extracción del aceite se realiza sobre la fruta entera o sobre la cáscara, y se puede

realizar con un proceso mecánico o manualmente (Bandoni, 2000). Durante este proceso, las cáscaras de los frutos se someten a compresión o raspado, se produce de esta manera una mezcla acuosa, a partir de la cual la fase aceitosa se separa por centrifugación. Este proceso se lleva a cabo a bajas temperaturas (Güenther, 1955) (Jennings & Rapp, 1983)

f) **Extracción con solventes.** Existen varios tipos de aparatos con los cuales se puede llevar a cabo la extracción con solventes. Uno de los más utilizados es el extractor Soxhlet. Sin embargo, el material vegetal puede ser simplemente macerado con un solvente orgánico; los más usados son éter de petróleo, etanol, pentano, hexano, tolueno, benceno, iso-propanol, acetona, acetato de etilo, acetato de metilo o éter dietílico. Este método requiere de la concentración posterior del aceite, seguido de la evaporación del solvente. Esta es, por supuesto, una parte delicada de la operación y deben tomarse precauciones para evitar pérdidas por evaporación de los demás compuestos volátiles (Sandra & Bichhi, 1987)

g) **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 estado. El poder disolvente del CO₂ supercrítico es mayor para compuestos menos polares y con masa molecular pequeña. De esta manera, son muy solubles en fluido supercrítico CO₂ 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)

1.1.2 Técnicas de identificación de compuestos presentes en aceite esenciales

a) **Cromatografía.** Según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), se define cromatografía como un método físico de separación en el cual los componentes, para ser separados, se distribuyen

entre dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras que la otra, fase móvil, se mueve en una dirección definida. Según el estado físico de la fase móvil, se puede hacer una clasificación de la cromatografía así: cromatografía líquida (LC) y cromatografía de gases (GC). Es posible encontrar una subclasificación de acuerdo con el estado físico de la fase estacionaria (McNair & Miller, 1998)

- b) Cromatografía de gases.** En esta técnica los analitos se eluyen por el flujo de una fase móvil de gas inerte. Los analitos para cromatografía de gases, deben tener puntos de ebullición menores que 350°C y no descomponerse por debajo de esta temperatura; estas muestras pueden ser gases, líquidos o sólidos (estos últimos deben ser vaporizados). Las muestras de compuestos volátiles extraídos de las plantas que pueden ser ciertamente complejas, requieren métodos de separación de alta resolución; considerando esto, cromatografía de gases es la técnica de separación más apropiada [McNair, 1998; Schreier, 1984].

Con el propósito de realizar una identificación de los diferentes compuestos, se emplean los índices de retención de Kovats, los cuales se utilizan para determinar la retención de un compuesto, comparándolo con los tiempos de retención de n-alcános, analizados bajo las mismas condiciones operacionales (Rubinson & Rubinson, 2000).

- c) Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.** Para la plena identificación de los compuestos presentes en una mezcla compleja de sustancias volátiles, es conveniente acoplar la cromatografía de gases con una técnica espectroscópica, como la espectrometría de masas, que es considerada uno de los instrumentos de análisis químico más funcional e importante. La eficiencia de esta técnica en la identificación de los compuestos químicos de los AE, se manifiesta a través de los múltiples estudios realizados (Stashenko, Jaramillo, & Martínez, 2004). Así pues, los analitos se separan en el cromatógrafo e ingresan al detector de masas que proporciona el espectro, conjunto de las señales producidas por las especies generadas durante la ionización y

la fragmentación de cada sustancia.

- d) Cromatografía líquida.** En LC, la fase móvil es un líquido; el poder de esta técnica, reside en la combinación de un amplio intervalo de posibles propiedades para la fase móvil, junto con la elección de numerosos tipos de fases estacionarias, físico-químicamente diferentes, así como una amplia variedad de detectores. Los diferentes tipos de LC, se clasifican según las interacciones que se producen entre la fase estacionaria y el soluto. Según ello, se denominan, cromatografías de fase normal, de fase reversa, de intercambio iónico o de filtración en gel (Rubinson & Rubinson, 2000).

Un tipo de LC, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), es una de las técnicas cromatográficas más empleadas en la actualidad, la cual permite trabajar en régimen de alta presión. Las razones de la popularidad de esta técnica son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles, y, sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ingeniería y para la sociedad en general, como, por ejemplo, proteínas, oligosacáridos, triglicéridos, vitaminas, fármacos, muestras medioambientales, entre otras (Dean, 1998)

Antes de iniciar el desarrollo de un método en HPLC, es necesario examinar lo que se conoce sobre la muestra. En este aspecto es importante conocer el número de compuestos presentes en la muestra, su estructura química y peso molecular, los valores de pKa, los espectros ultravioleta (UV), así como la solubilidad de la muestra y el rango de concentración de los compuestos (Snyder, Kirland, & Glajch, 1997)

1.2 *Schinus molle* L. (molle)

1.2.1 Antecedentes históricos del molle

El árbol de molle es originario de Sudamérica. (molle) deriva de la voz quechua “*mulli*”. Éste árbol fue citado por muchos naturalistas y viajeros de la época de la conquista de América. Existen referencias de árboles de molle en las zonas altas de Los Andes y también hay registros de molle o aguaribay en la zona de Las Misiones (Noroeste de Argentina, Sur de Brasil y Norte de Uruguay).(Viturro, 2011)

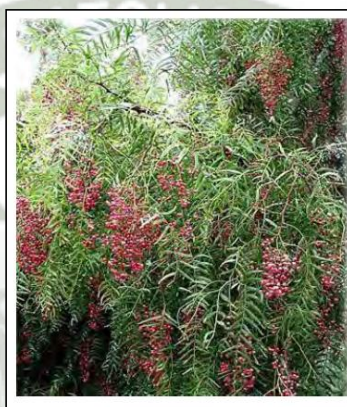


Figura 1.1 Árbol de *Schinus molle* L (molle). Fuente: (Viturro, 2011)

1.2.2 Nombre comunes

Pirul, piru, árbol del Perú (México); molle, cuyash, huaribay (Perú); aymara (Bolivia); muella falso pimiento, pimiento (Colombia); mulli (Ecuador); pimenteiro, aroeira; amescla, aroeira-periquita, bálsamo, gfruto-de sabia (Brasil); aguaribay terebino, árbol de la pimienta, Gualeguay (Argentina); pimentero (Chile).(Salazar, 2001)

1.2.3 Características morfológicas

El (molle) *Schinus molle* L. es una planta de la familia *Anacardiaceae*. Esta familia se caracteriza por estar conformada por plantas arbóreas o

arbustivas, rara vez liana; con hojas de filotaxis alterna, compuestas imparipinnadas. En algunos géneros, la hoja se simplifica hasta ser trifoliolada o simple. Los folíolos son opuestos, sub opuestos o alternos; enteros o aserrados.(Linnaeus, 1953)

Sus flores son normalmente bisexuales, aunque existen especies con flores imperfectas, actinomorfas, incospicuas, dispuestas en panículas o inflorescencias racemosas paniculoides, que pueden alcanzar longitudes muy largas, con respecto al tamaño de la flor, que es siempre pentámera.(Linnaeus, 1953)

La especie *Schinus molle* L. (molle) se caracteriza por tener un porte arbóreo, con copa redondeada, de hojas compuestas, con folíolos alternos, fino y levemente aserrados. Presenta ritidoma en la corteza. Esta especie es sumamente versátil, lo que lo ha llevado a convertirse en una plaga en otro lugar del mundo (elfers). Es rico en resinas, que le confieren un olor característico, que es usado como repelente de insectos (Conabio, 1999).

Estas características poseen como reemplazo a otros compuestos funcionalmente afines, como las piretrina, con la ventaja de una menor persistencia. Además, ya se usan tradicionalmente para esos fines, como otras anacardiáceas.(Casida, 1980)(CONABIO, Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad, 1999)

1.2.4 Distribución y habitat

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) Vive en las laderas occidentales de la región interandina, vertientes occidentales de los andes peruanos, en la costa y en los valles. Su límite superior se encuentra en el centro y sur del Perú, alrededor de 3500 msnm.(Alba, Bonilla, & Arroyo, 2009). 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.

Requiere suelos ligeramente alcalinos con tendencia a la neutralidad. Es exigente en luz, ligeramente resistente a las heladas, resistente a las termitas y a la sequía. (Salazar, 2001)

1.2.5 Floración y fructificación

- a) **Floración:** La especie florece de agosto a diciembre y de setiembre a noviembre en varias localidades de Brasil. En Bolivia florece de octubre a noviembre y en Perú de noviembre a abril. (Salazar Rodolfo, 2001)
- b) **Fructificación:** Los frutos se producen de diciembre a febrero y de noviembre a abril en varias localidades de Brasil. En Bolivia fructifica de abril a mayo. La dispersión de las semillas es zoocórica, principalmente por aves. (Salazar, 2001)
- c) **Semilla:** Se encuentra rodeada por el endocarpo del fruto. La semilla presenta una forma oblonga, comprimida, de 2 a 2.5 mm de largo. La testa es de color castaño claro, lisa, lustrosa, membranosa, muy delgada. El embrión es recto o ligeramente curvo, comprimido o globoso, de color amarillo crema y ocupa toda la cavidad de la semilla. Tiene dos cotiledones grandes, carnosos, oblongos. La radícula es corta, inferior. Carece de endospermo. (Salazar, 2001)

1.2.6 Recolección y rendimientos

Los frutos son colectados directamente del árbol cuando tienen un color rosado a rojo-grosella. En Perú se recolectan de enero a abril. (Salazar, 2001)

1.2.7 Cultivo

Aspectos del cultivo. Se aconseja practicar poda de formación en arboles jóvenes y poda sanitaria en adultos. Conviene cortar la corteza en primavera para promover su crecimiento. El riego es importante en las primeras etapas. No requiere fertilización. La siembra debe hacerse en sustratos permeables para que las sustancias inhibitorias de la germinación se lixivien. Las semillas remojadas por varios días, se siembran en almácigos y luego se

trasplantan a envases. Se planta a una distancia mínima de 8 m entre cada árbol, en lugares con suficiente espacio, lejos de construcciones e instalaciones subterráneas. La producción de vivero es aproximadamente de 17,000 plantas por kg de semilla. Se siembran en hileras a 2 cm de distancia, empleando 120 g de semilla por m². Trasplantar con cepellón. El árbol tolera bien la poda. (Sistema nacional de información forestal de México, 2010)

1.2.8 Usos

Los usos de las distintas partes de la planta son muy variados: como purgante, enjuague bucal, diurético desinfectante y sedante en distintas preparaciones. Se utiliza la corteza de los árboles para aplicaciones dermatológicas (Bernhard & R., 1963)

De la destilación por arrastre con vapor se obtiene un aceite volátil empleado en productos farmacéuticos.(Ottolino, 1948)

En una comunidad indígena del Cuzco, Perú (Velasco-Negueruela & Pérez-Alonso, 1995)registraron diversos empleos tradicionales de distintas partes de la planta de *S. molle* L; principalmente hojas y frutas, para uso externo e interno que se registran en la Tabla 1.1.(Viturro, 2011)

Se recomienda para padecimientos digestivos (cólicos, bilis, dolor de estómago y estreñimiento) .La infusión de la corteza disminuye las inflamaciones y favorece la cicatrización de las úlceras. La planta entera se usa externamente para fracturas y como un antiséptico local. En inhalación las hojas de molle se usan para aliviar resfriados, afecciones bronquiales, hipertensión, depresión y arritmia. (Sistema Nacional de información forestal de México, 2010)

1.3 ACEITE ESENCIAL DE *Schinus molle* L. (MOLLE)

Los aceites esenciales del molle han sido objeto de diversas investigaciones, muchas de ellas para determinar su composición: abundancia de compuestos

terpénicos, como el limoneno, sobre todo triterpenos; pero ausencia de taninos o Flavonoides (Zahed, Hosni, & Ben, 2011), (Rossini, Menéndez, Dellacassa, & Moyna, 1996). Además, existe evidencia de su efecto citotóxico sobre células tumorales (Díaz, Quesada, Brenes, Aguilar, & Ciccio, 2008)

Tabla 1.1 Usos de molle en medicina tradicional del Cuzco (Perú)

Parte de la planta	Forma de preparación	Uso	Descripción terapéutica
Planta entera	Decocción	Externo	Antipirético (Hervido en baños)
Hojas	Decocción	Externo	Aplicado en fracturas
Ramas jóvenes	Emplastos	Externo	Antiséptico veterinario
Hojas	Decocción	Interno	Antiséptico de la cavidad oral
Hojas	Decocción	Interno	Hipotensiva para gonorrea
Hojas	Infusión	Interno	Antirreumático condimento culinario (picantes)
Hojas, frutos	Decocción	Interno	
Frutos	Decocción		

Fuente: (Viturro, 2011)

Estudios anteriores confirman la efectividad del extracto para inhibir el crecimiento de Gram-positivas (Deveci, Sukan, Tuzun, & Hames, 2010). Además, se ha encontrado propiedades neurotóxicas y antidepresivas (Machado, y otros, 2008) (Machado, y otros, 2007). Amani (1999) señala que las partes aéreas de *S. molle* presentan cierta actividad positiva contra gérmenes Gram positivo. También se ha evaluado al molle en su efectividad contra *Staphylococcus aureus* (Cruz-Carrillo, 2010). Algunas aplicaciones del aceite esencial de molle y sus componentes se muestran en las tablas 1.2 y 1.3 respectivamente. Las constantes físicas del aceite esencial de *Schinus molle* son tan numerosas y variadas como las investigaciones realizadas del aceite. En la Tabla 1.4 (Villa, Molina., Molina, & Viturro, 2005) resumen las propiedades citadas en la bibliografía. Se observa que lo informado en algunas publicaciones no es completo, ya que por ejemplo, no figuran las condiciones de trabajo para la determinación de una propiedad física, ni los lugares de colecta o el tipo de material empleado para la extracción del aceite esencial.

Tabla 1.2. Actividades biológicas de extractos de *Schinus* (material extraído PARTE AEREA).

País	Especie	Extracto	Actividad	Comentarios
-	<i>S. molle</i>	Etanólico (95%)	Antiinflamatorio	Activo en ensayos con ratas hembras
Argentina	<i>S. molle</i>	Acuoso	Estimulante uterino	Activo
-	<i>S. molle</i>	Metanólico	Aldosa reductasa	Débil actividad
Argentina	<i>S. molle</i>	Etanólico 100% de la planta entera seca	Antifúngica	Inactivo con 8 mg/mL frente a <i>Leizitis elegans</i> , <i>Ganaderma applanatum commune</i> ,
-	<i>S. molle</i>	Etanólico (95%)	Antiinflamatorio	Activo en ensayos con ratas hembras
Argentina	<i>S. molle</i>	Acuoso	Estimulante uterino	Activo
-	<i>S. molle</i>	Metanólico	Aldosa reductasa	Débil actividad
				Debil actividad frente a <i>Aspergillus niger</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Penicillium notatum</i> , <i>Trichoderma sp.</i>
Bolivia	<i>S. molle</i>	Etanólico 100%	Antilevadura	Activo frente a <i>Sacharomyces carbergensis</i> Inactivo frente a <i>Rhodotorula sp</i>
Egipto	<i>S. molle</i>	Aceite esencial	Insecticida	Activo (1mg/insecto) frente a <i>Thialoma infectans</i>
			Antibacteriano	Activo frente a <i>Pseudomona aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
			Antifúngica	Inactivo frente a <i>Bacillus cereus</i>
				Inactivo frente <i>Aspergillus aegyptiacus</i> , <i>Trichoderma viridis</i>

Fuente: (Viturro, 2011)

Tabla 1.3 Componentes del aceite esencial de *Schinus molle*.

Componentes	Especie	<i>S. Molle</i>		<i>S. Molle</i>		<i>S. molle</i>		<i>S. molle</i>		<i>S. molle</i>	
		California	Buenos Aires/Argentina	California	California	California	Florida	Liguria/Italia	Uruguay		
	Lugar de colecta	California	Buenos Aires/Argentina	California	California	California	Florida	Liguria/Italia	Uruguay		
	Material vegetal	h+t fru	h+t fru	fru	fru	fru	h+t fru	h fru	h fru		
α -pineno		+	+	2.7	3.1	1	11.7	1.5	-		
β -pineno				0.2	0.1	0.2	10.8	0.1	13.9		
sabineno				NI-	NI	NI	NI	0.7	12.9		
mirceneno		+	+	20.4	11.6	19	NI	t	5.5		
α -felandreno		+	+	17.3	12.7	9.1	10.4	30.2	-		
limoneno				7.2	9	8.3	6.3	9.3	0.9		
β -felandreno				6.2	7.2	6.3	NI	9.6	0.3		
p-cimeno				2.9	10.5	6.2	NI	0.6	-		
eminen-4-d				-	NI	NI	NI	t	10.6		
β -cariofileno				2	1.5	1.2	NI	0.5	7.7		
germacreno D				-	T	0.2	NI	5.2	12.1		
biciclogermacreno				-	NI	NI	NI	-	29.2		
cadineno				9.1	4.7	5	NI	1.7	1.3		
elemol				1.3	NI	NI	NI	13.2	-		
epi- α -cadinol				-	-	-	NI	-	-		
α -cadinol				6.6	0.2	0.3	NI	t	0.1		

Fuente: (Viturro, 2011)

Es probable que las diferencias en los valores de las propiedades se deban, al menos en parte, a la amplia variedad de AE examinados de fuentes diversas: Argelia, Francia, México y Sudáfrica; y al hecho que muchos AE se extrajeron tanto de hojas como de frutos (algunos de ellos estaban verdes). A partir de lo expuesto, es razonable pensar que los investigadores no han examinado aceites comparables. Además, la mayoría de los estudios se realizaron antes del advenimiento de la cromatografía y es concebible que muchos constituyentes presentes en pequeñas cantidades no fueron detectados.

Un trabajo publicado sobre el aceite esencial de molle en Perú (Landa), señala que usando hojas y frutos molle recolectados de la ciudad de Ayacucho, el aceite esencial obtenido presenta un rendimiento del 5.1% como se observa en la Figura1.2.

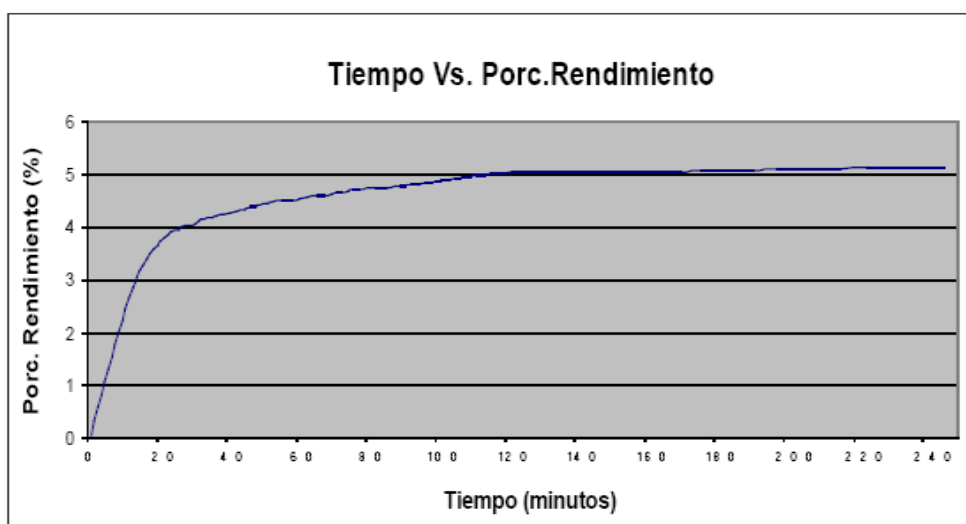


Figura1.2 Rendimiento de AE (% v/p) en función del tiempo de extracción.
Fuente: (Landa & Pastor de Abraham, 2005)

La composición de los AE obtenidos de la ciudad de Ayacucho se determinó por cromatografía de gases (Tabla 1.5). La naturaleza de los compuestos mayoritarios no coincide en ambos AE. En los frutos se identificaron 11 compuestos: seis monoterpenos, el octanoato de metilo y cuatro sesquiterpenos. Los que caracterizan al AE son α -felandreno, β -pineno, limoneno y β -felandreno. En el AE de hojas se

Tabla 1.4 Datos bibliográficos de propiedades fisicoquímicas de *Schinus molle* L..

Localización	Material extraído	Componentes principales	Rendimiento	Densidad (t° C)	Índice de refracción (t° C)	Rotación óptica
México/ América sur	Hojas, tallas y frutos	felandreno, pineno y carvacrol	5.20%	0.8490 a 0.8696 (20° C)	1.4761 a 1.4790 (20° C)	N/I
California	Frutos	α -pineno, mirceno, α -felandreno y d-limoneno, β -felandreno	6.03%	0.8830 (29° C)	1.4732 (24.5° C)	24.7 (27° C)
No indicado	Hojas secas	α -felandreno, β -felandreno y carvacrol	3.00%	0.9037 (20° C)	1.4945 (14° C)	2.8 (20° C)
No indicado	Frutos	N/I	3.35 a 5.2%	0.850 (15° C)	N/I	46.4'(17° C)
México	Frutos	N/I	N/I	0.8600 (15° C)	N/I	42.30'(N/I)
México	Frutos	α -felandreno	N/I	0.8320 (15° C)	N/I	60.40'(N/I)
España	Frutos	α -felandreno	N/I	0.8561 (15° C)	1.47877 (20° C)	62.42'(N/I)
No indicado	Hojas	N/I	7.20%	0.856 (15° C)	1.4790 (20° C)	41.17'(N/I)
México	Hojas	α -felandreno	N/I	0.8583 (15° C)	1.47665 (20° C)	44.50'(N/I)
Algeria	Hojas			0.8658 (15° C)	N/I	65.20'(N/I)
Algeria	Hojas y tallos			0.8634 (15° C)	N/I	50.54'(N/I)
Grasse	Hojas y tallos			0.8696 (15° C)	N/I	46.13'(N/I)
África del Sur	Hojas+frutos	α -felandreno y carvacrol	0.49%	0.8486 (No indicado)	1.4732 (20° C)	68.24'(N/I)
América central	hojas+frutos	N/I	NI	0.83 a 0.86 (15° C)	1.4720 (20° C)	40.30'(N/I)

Fuente: Elaboración propia.

identificaron trece monoterpenos, un alcohol monoter-pénico, tres sesquiterpenos y seis alcoholes y un epóxido sesquiterpénicos. El compuesto mayoritario.en AE de hojas es sabineno. (Landa & Pastor de Abraham, 2005)

Tabla 1.5 Composición del aceite esencial de frutos secos y hojas de molle de Perú.

Compuesto	Porcentaje	
	AE de hojas	AE de frutos
Triciclono	0.8	-
α -thujeno	0.9	-
α -pineno	4.5	2.8
Canteno	6.1	-
Sabineno	19.1	-
β -pineno	2.5	27.5
Mirceno	1	-
α -felandreno	4.3	30.9
α -terpineno	1.6	-
p-cimeno	7.9	3.9
Limoneno	7.2	15.3
β -felandreno	3.2	12.5
p-menta-1,4(8)-dieno	2.9	-
octanoato de metilo		1.3
Cariofileno	1.3	1
Cadineno	8.2	2.7
oxido de cariofileno	0.9	-
D-germacreno	1.5	0.4
B-germacreno	-	1.7
Spathulenol	6	-
α -cadinol	1.5	-
1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahidro-a',a',4a	4.8	-
T-cadinol	1.9	-

Fuente: (Landa & Pastor de Abraham, 2005)

Los rangos de índices de refracción determinados en AE de hojas fueron 1,4951-1,5032, y en AE de frutos 1,4951-1,4980. (Landa & Pastor de Abraham, 2005)

1.4 DESCRIPCION DE BACTERIAS PATOGENAS EN ESTUDIO

1.4.1 *Klebsiella pneumoniae*

1.4.1.1 Características generales.

Son bacilos rectos, de 0.3-1.0 μm de diámetro y 0.6-6.0 μm de longitud. Las células se disponen individualmente, en parejas o en cadenas cortas (10). Son inmóviles, Gram negativo y la mayor parte capsuladas. En los cultivos en medios sólidos, las cepas que producen cápsula permiten observar colonias mucosas de una consistencia viscosa. Estructuralmente al ser Gram negativas, presentan el citoplasma envuelto por una membrana citoplasmática o interna, el peptidoglicano, el espacio periplásmico, y una membrana externa. Adicionalmente, algunas cepas poseen fimbrias (pilis). (Yueqin, 2006)

1.4.1.2 Bacteriología

En la tinción de gram son negativos; en el agar citrato de Simmons presentan un crecimiento de color azul (positivo), en el agar urea de Christensen presenta un pico de flauta rosa (positivo parcial), en la prueba de la ornitina presenta un color amarillo (negativo), en el agar eosina-azul de metileno presentar un crecimiento adecuado, colonias violetas, sin brillo, para la prueba del indol sin color rojo (negativo), en la prueba de voges-Proskauer presentan un color rojo (al adicionar el reactivo) (Skoog, 2008)

1.4.1.3 Cuadros clínicos

Si bien clásicamente se ha asociado a este género, en particular, a la especie *K. pneumoniae* con cuadros de neumonía adquirida en la comunidad, caracterizada por una presentación radiológica típica (Neumonía de Friedlander), lo cierto es que gran parte de las infecciones por *Klebsiella* son de adquisición nosocomial y afecta, sobre todo, a pacientes con algún tipo de inmunodepresión o enfermedad subyacente (Bague, 2012) Cuando produce enfermedad, se asocia con infecciones urinarias, infecciones de quemaduras, diarreas en neonatos y llega a producir abscesos pulmonares. (Romero, 2007) Además, *Klebsiella pneumoniae* es una causa muy frecuente de absceso piógeno hepático en Taiwan. Se desconoce el motivo de esta asociación,

algunas atribuyen a la diseminación de algún clon con especial virulencia y tropismo hepática. Además una complicación terrible y de forma característica asociado a la bacterinemia por *Klebsiella* es la endofalmitis, que afecta especialmente a pacientes con diabetes mellitus. Es precisamente la diabetes mellitus la principal condición de riesgo para la bacteriemia adquirida en la comunidad por *Klebsiella*. (Bague, 2012)

1.4.1.4 Diagnostico

El diagnostico comienza a partir de la clínica; en los casos de neumonía, es especialmente útil el estudio radiográfico. El diagnóstico definitivo lo obtenemos a partir del cultivo de muestras de las mucosas del tracto respiratorio superior. (CODEINEP., 2009)

1.4.1.5 Tratamiento

El tratamiento de elección consiste en la asociación de una cefalosporina de tercera generación (cefotaxina, ceftriaxona) y un aminoglucósido (gentamicina) (CODEINEP., 2009)

1.4.2 *Pseudomona aeruginosa*

1.4.2.1 Características generales

Esta especie se ha encontrado frecuentemente en infecciones hospitalarias. Las infecciones por *Pseudomona aeruginosa* se observan más frecuente en personas con inmunidad deprimida, en los que sufren quemaduras, en enfermos con alteraciones metabólicas como la diabetes, en pacientes con neoplasias malignas y en convalecientes que han sido sometidos a instrumentación o caterismo. Con frecuencias se manifiestan infecciones urinarias en personas de edad avanzada y debe cuidarse de las infecciones por este agente a los pacientes sometidos a drogas inmunosupresoras. (Romero, 2007)

Pseudomona aeruginosa puede instalarse en cualquier órgano o tejido y colonizar las vías urinarias, los pulmones, el endocardio, la córnea y los huesos. (Romero, 2007)

1.4.2.2 Diagnostico

Es de sumo interés identificar este agente etiológico en cualquier órganos donde se encuentre, debido a que forma natural *Pseudomona aeruginosa* es resistente a muchos antimicrobianos que se utilizan en la práctica diaria. Solo la identificación permite hacer el diagnostico etiológico. (Romero, 2007)

Se puede hacer la siembra en casi cualquier medio de cultivo, es adaptable a diferentes nutrientes y tolera con facilidad los medios alcalinos. En medios especiales como agar, *Pseudomonas* incrementa la producción de pigmento. Se puede cultivar en los medios de cultivo de las enterobacterias y en todos los medios se puede percibir un aroma que se asemeja al de las uvas fermentadas. (Romero, 2007)

Una vez que tenemos las cepas puras, hacemos un sistema bioquímico que se manifiesta solamente por la utilización de citrato de sodio como única fuente de carbono. La gran mayoría de las otras pruebas de este sistema son negativas. Como características morfológicas pueden ser lisas, rugosas, mucoides, gelatinoides y son oxidasa positivas. (Romero, 2007)

1.4.2.3 Manifestaciones clínicas

Pseudomona aeruginosa produce infecciones nosocomiales y adquiridas en la comunidad. Puede manifestarse como infección de vías urinarias nosocomiales (en pacientes con sondas), meningitis, septicemia, bacteriemia, ectimangangrenoso, enterocolitis, infecciones de quemaduras y heridas, neumonía primaria, neumonía necrotizante, infecciones pulmonares crónicas, osteomielitis, infecciones de piel y tejidos blandos, otitis crónica externa, otitis media crónica y otitis externa maligna, endocarditis, infecciones ocular, queratitis y paroniquia. (Romero, 2007)

En algunas cepas de *Pseudomona aeruginosa* se ha encontrado una enterotoxina, que podría explicar la diarrea que se encuentra en pacientes en quienes se aísla esta cepa, predominantemente en las evacuaciones líquidas. (Romero, 2007)

1.4.2.4 Resistencia

Pseudomona aeruginosa, no solo presenta resistencias a los antibióticos, sino también a los efectos de algunos antisépticos, ya que se ha aislado de compuestos cuaternarios de amonio y de algunos jabones que contienen hexaclorofeno. Esta resistencia, que es mayor que la de otras especies en sus formas vegetativas, le permite tener vida libre y puede sobrevivir en amplios nichos ecológicos. (Romero, 2007)

1.4.2.5 Tratamiento

La gran mayoría de cepas aisladas son susceptibles a: amikacina, gentamicina, tobramicina y colistina, muchas de ellas también son sensibles a carbenicilina y ticarcilina. Otros antimicrobianos que se puede utilizar también son: cefotaxina, cefoperazona, ceftazidima, ticarcilina-ácido clavulanico, piperacilina y piperacilina-tazobactam, y las carboxiquinolonas fluorinadas, como ciprofloxacina, aztreonam e imipenem. (Romero, 2007)

1.4.3 *Staphylococcus aureus*

1.4.3.1 Características generales

Las características generales de *Staphylococcus aureus* son las descritas para el género (véase la Tabla 1.6.). Son bacterias muy resistentes al calor y la desecación que pueden crecer en medios con elevada salinidad (7,5 de ClNa). Estas propiedades son importantes para explicar algunos aspectos epidemiológicos de esta bacteria. (Pahissa, 2009)

1.4.3.2 Estructura

a) **Pared celular:** Como la mayoría de las bacterias grampositivas, los componentes fundamentales de la pared celular son el peptidoglicano y los ácidos teicoicos. El peptidoglicano representa la mitad del peso de la pared celular y proporciona forma y estabilidad al microorganismo; además, tiene actividad endotoxina, por lo que interviene de forma importante en la patogenia de la infección. (Pahissa, 2009).

Tabla 1.6 Características principales del genero *Staphylococcus*.

Staphylococcus.

Orden : *Bacillales*

Familia : *Staphylococceae*

Genero : *Staphylococcus*

- | | |
|---|--------------------------------|
| -Bacterias esféricas (cocos) | -Inmóviles |
| -Grampositivas | -No esporulados |
| -Agrupación típica en racimos | -Anaerobios facultativos |
| -Catalasa positivos | -Crecimiento rápido (18-24 h)* |
| -Resistentes a condiciones ambientales adversas | |
-

*Las variantes de colonias pequeñas de *S. aureus* requieren 48 h para desarrollarse en cultivo

Fuente: (Pahissa, 2009)

- b) **Membrana citoplasmática:** La membrana citoplasmática está formada por un complejo de proteínas, lípidos e hidratos de carbono y sirve de barrera osmótica para la célula. (Pahissa, 2009)
- c) **Cápsula:** Algunas cepas de *Staphylococcus aureus* están recubiertas por una capa de polisacáridos externos, denominada slime o capsula mucóide, que confiere, en ciertas condiciones, una mayor capacidad de adherencia, así como un aumento del efecto antifagocítico. (Pahissa, 2009)

1.4.3.3 Diagnóstico microbiológico

Los datos clínicos y epidemiológicos son fundamentales para orientar el diagnóstico microbiológico. Para el diagnóstico etiológico de la infección se requiere la identificación de *Staphylococcus aureus* a partir de muestras clínicas (Pahissa, 2009).

- a) **Obtención de muestras clínicas para diagnóstico microbiológico:** Deben seguir los principios generales de obtención, transporte y conservación de muestras clínicas. *Staphylococcus aureus* es relativamente resistente a la desecación y a los cambios de temperatura, por lo que se recupera con facilidad de muestras clínicas y no requiere condiciones o métodos especiales de obtención, transporte o conservación de las mismas (Pahissa, 2009).

- b) Examen directo:** La tinción de Gram de muestras de sangre, tejidos, líquidos normalmente estériles, aspirados de abscesos y otras colecciones purulentas, permite la observación de cocos grampositivos agrupados en parejas, tétradas o racimos, habitualmente con abundante respuesta inflamatoria de leucocitos polimorfonucleares. Sin embargo, las características microscopias no hacen posible distinguir *Staphylococcus aureus* de otras especies de estafilococos (Pahissa, 2009).
- c) Cultivo y aislamiento:** El medio más empleado en los laboratorios clínicos para aislar *Staphylococcus aureus* es el medio agar sal manitol (medio de Chapman), que por su elevado contenido en sal inhibe el crecimiento de la mayoría de las bacterias gramnegativas. Además, este medio permite realizar una identificación presuntiva basándose en la coloración amarilla característica que adquieren las colonias, *Staphylococcus aureus* fermenta manitol con producción de ácido, La acidificación produce un cambio en el color del medio que vira de rosa pálido a amarillo (Pahissa, 2009).
- d) Identificación:** La detección de catalasa permite diferenciar el género *Staphylococcus* (catalasa positivo) de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* (catalasa negativos). La fermentación de glucosa permite diferenciar el género *Staphylococcus* del genero *Micrococcus*, que es también catalasa positivo pero no fermenta glucosa en anaerobiosis (Pahissa, 2009).

Tabla 1.7 Características bioquímicas que permiten diferenciar *S. aureus* de las principales especies patógenas de estafilococos coagulasa negativas

Propiedad	<i>S. aureus</i>	<i>S. Epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>
Colonias pigmentadas	+	-	-
Producción de coagulasa	+	-	-
Proteína A	+	-	-
Producción de ADNsa	+	-	-
Fermentación de manitol	+	-	-
Sensibilidad a novobiocina	-	-	+

* v = variable. Raras cepas de *S. epidermidis* presentar una debil actividad ADNasa y pueden fermentar manitol

Fuente: (Pahissa, 2009).

La prueba de la coagulasa sigue siendo la más utilizada para la identificación de *Staphylococcus aureus*. Se basa en la capacidad de las cepas de *Staphylococcus aureus* para producir esta enzima extracelular que coagula el plasma. La detección de coagulasa permite diferenciar *Staphylococcus aureus* (coagulasa positivo) de todas las demás especies de estafilococos (coagulasa negativos) tal y como se observa en la Tabla 1.7 (Pahissa, 2009).

1.4.3.4 Patogénia de las infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*

Aproximadamente un 20% de la población es portadora permanente de *Staphylococcus aureus* en las fosas nasales y un 30% lo es de manera intermitente. *Staphylococcus aureus* puede además colonizar otras áreas tales como la piel y el tracto gastrointestinal. (Pahissa, 2009)

Tabla 1.8 Fases de La patogenia de las infecciones por *Staphylococcus aureus* y factores de virulencia involucrados

Fase	Factores de virulencia más relevantes	Infecciones asociadas
Adherencia bacteriana	Factor de agregación (Clumping factor), proteínas de unión a fibrinógeno, fibronectina y sialoproteína osea.	Endocarditis, infecciones asociadas a prótesis y catéteres intravasculares, osteomielitis, artritis.
Persistencia bacteriana	Formación de biocapas (polisacárido de adhesión intracelular), variantes de colonias pequeñas y persistencia intracelular	Infecciones recurrentes, fibrosis quística y todas las anteriores.
Evasión de los mecanismos de defensa del huésped	Capsula polisacárido, proteína A, proteína inhibidora de la quimiotaxis (CHIP), proteína de adherencia extracelular (Eap), citotoxinas (leucocidina de Pantón Valentine y α -toxina	Infecciones cutáneas invasivas, neumonía necrotizante, abscesos.
Penetración e invasión tisular	Proteasas, lipasas, nucleasas, hialuronidasas, fosfolipasa C y elastasas.	Destrucción tisular e infecciones metastásicas
Shock séptico y cuadros tóxicos	Enterotoxinas, toxina del síndrome del shock tóxico 1, toxinas exfoliativas A y B, α -toxina, peptidoglicano y ácidos teicoicos	Toxiinfecciones alimentarias, síndrome del shock tóxico, síndrome de la piel escaldada, impetigo bulloso y sepsis.

Fuente: (Pahissa, 2009)

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIALES

2.1.1 Material biológico

- Cepas clínicas de *Klebsiella pneumoniae* (Hospital Essalud y Goyeneche)(N=6)
- Cepas clínicas de *Pseudomona aeruginosa* (Hospital Essalud y Goyeneche) (N=6)
- Cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* (Hospital Essalud y Goyeneche) (N=6)
- Frutos de *Schinus molle* L. (molle) de Arequipa y Moquegua (3 Kg C/U)

2.1.2 Material de laboratorio

Material de vidrio

- Asas de Khole
- Fiolas de 10 mL Pirex
- Frasco ámbar de 250 mL
- Matraz de 250 y 500 mL Pirex
- Peras de decantación de 250 mL
- Pipetas de 1 y 5 mL
- Placas Petri de 100 x 15 mm
- Probetas Pirex
- Tubos de ensayo de 10 mL
- Vasos de precipitado 500 mL Pirex
- Viales ámbar 2mL

Equipos y aparatos

- Autoclave (Tuttnauer 3870m)
- Balanza (Scout, SP-2001)
- Balanza analítica (OHAUS Pionner, Serie N° PA 214)
- Cromatógrafo de gases (Shimadzu, GC-MS-QP2010 plus)

- Destilador por arrastre de vapor
- Estufa (Incubat 20002005)
- Refractómetro digital (Abbe BGD-252)
- Vortex (Kessel, geniee 2)

Otros

- Columna capilar RTX-5MS (30 m x 0.25 mm ID x 0.25 μ m espesor del film)
- Micropipetas de 0.5-10, 10-100 y 100-1000 μ L Transfepette Brand
- Placas de sílice gel
- Tubos capilares

Reactivos

- Aceite de Inmersión (Q.P.Merck)
- Acetato de etilo (Q.P.Merck)
- Ácido sulfúrico (Q.P.Merck)
- Alcohol-Acetona (Q.P.Merck)
- Agar Citrato Simmons (Q.P.Merck)
- Agar Lisina Hierro (LIA) (Q.P.Merck)
- Agar Manitol salado(Q.P.Merck)
- Agar Mac Conkey(Q.P.Merck)
- Agar Müeller-Hinton (Q.P Fisher Scientific)
- Agar Triple Azucar Hierro (TSI) (Q.P.Merck)
- Caldo BHI (Fisher Scientific)
- Cristal Violeta (Q.P.Merck)
- Etanol grado reactivo (Q.P.Merck)
- Medio agar Urea (Q.P.Merck)
- Medio Sim (Q.P.Merck)
- N-Hexano (GC Merck)
- Lugol (Q.P.Merck)
- Safranina (Q.P.Merck)

- Sulfato de sodio anhidro (Q.P.Merck)
- Tolueno (Q.P.Merck)
- Vainillina (Sigma Aldrich)

2.2 LUGAR DE INVESTIGACIÓN

- Laboratorio de Química Orgánica (F-303) de la Universidad Católica de Santa María.
- Laboratorio de Control de calidad (H-204) de la Universidad Católica de Santa María.
- Laboratorio de Microbiología (H-403) de la Universidad Católica de Santa María

2.3 MÉTODOS DE LABORATORIO

2.3.1 Área de Estudio

Se tomaron muestras del fruto de *Schinus molle* L. (molle) en Bellavista, Distrito de Hunter, Departamento de Arequipa y en el Distrito del Algarrobal, Provincia de Ilo, Departamento de Moquegua en el periodo comprendido entre Enero y Febrero del 2013.

2.3.2 Recolección de las especies de *Schinus molle* L. (molle) de las localidades de Moquegua y Arequipa.

La recolección óptima es la que se realiza en el momento en que la planta tiene el máximo contenido en principios activos, tomando como recomendación para hojas; la recolección en el momento vegetativo anterior a la floración de la planta; para flores, en la época de floración; en cuanto frutos, de aspecto carnoso, al momento de madurez o un poco antes en los casos en los que la pulpa se altera con facilidad; en cuanto a raíces, rizomas, tubérculos y bulbos, en otoño o a principios de invierno.

El objetivo del secado es el de extraer el contenido acuoso del material vegetal para poder conservar la planta en estado óptimo. Este debe empezar a continuación de la

recolección. El almacenaje requiere un sitio seco, bien ventilado y sin luz directa. (Royyo, 2013)

El momento óptimo para la recolección será por la mañana, procurando que la planta no esté mojada por el rocío o la lluvia, pues en los momentos de máxima insolación la esencia de la planta sufre una evaporación intensa.

Por ello la recolección del material biológico se realizó tomando tres puntos de muestreo identificados con un Navegador Satelital (GPS) GPS Garmin e Trex® H. Las muestras fueron recolectadas, separadas y seleccionadas. Para su conservación se almacenaron bajo sombra y a temperatura ambiente hasta su uso en la extracción.

2.3.3 Extracción de aceites esenciales de *Schinus molle* L. (molle)

2.3.3.1 Destilación por arrastre de vapor

La destilación por arrastre de vapor es una técnica utilizada para separar sustancias insolubles en agua y ligeramente volátiles de otros productos no volátiles mezclados con ella. El arrastre en corriente de vapor hace posible la purificación de muchas sustancias de punto de ebullición elevado mediante una destilación a baja temperatura, Es muy útil para sustancias que hierven por encima de 100° a la presión atmosférica y se descomponen en su punto de ebullición o por debajo de este. (Jimenez, 2006)

Para la destilación por arrastre de vapor se pesaron 750 g de los frutos de *Schinus molle* L. (molle), los cuales pasaron por un molino, fueron pesados y luego colocados en el recipiente del equipo destilador por arrastre de vapor manteniendo una presión de 12 bar por un tiempo aproximado de 40 minutos, recibiendo el destilado en un recipiente de vidrio. Seguidamente, se procedió a la extracción del aceite esencial en una pera se decantación, separando primero el aceite del agua. A continuación se añadió sulfato de sodio anhidro al aceite obtenido y se dejó reposar durante 30 minutos, para finalmente almacenarlo en frascos ámbar a una temperatura de -4 °C. (Fuente: Elaboración propia).

2.3.3.2 Evaluación del rendimiento

El rendimiento fue evaluado como porcentaje, tal como se indica en la Ecuación 2.1:

$$\%R = \frac{\text{Peso del Aceite Esencial Obtenido}}{\text{Peso del Material de Partida}}$$

(Ecuación 2.1)

2.3.4 Caracterización física del aceite esencial de *Schinus molle L.*

2.3.4.1 Determinación de la densidad:

La densidad, ρ , de una sustancia se define como su masa por unidad de volumen. La densidad es una propiedad característica de cualquier sustancia pura. Los objetos hechos de una sustancia particular pura, como el oro puro, pueden tener tamaños o masas diferentes, pero la densidad será la misma para cada uno. (Güenther, 1955)

Para su determinación, se llenó una pipeta de 1.0 mL con agua destilada, previamente. Se pesó el agua contenida en la pipeta. Ésta operación se repitió 20 veces, con el fin de determinar el volumen real que aloja la pipeta en dicha temperatura.

Luego, se tomó la muestra de aceite esencial, a la misma temperatura del agua al momento de la prueba, y se realizó el mismo procedimiento. Ésta operación se repitió 3 veces.

$$V_{IR} = \frac{\text{Peso de agua contenida en la pipeta}}{\text{Densidad del agua (20°C)}}$$

(Ecuación 2.2)

$$\rho_{\text{aceite esencial}} = \frac{\text{Peso del aceite esencial contenido en la pipeta}}{V_{IR}}$$

(Ecuación 2.3)

2.3.4.2 Determinación del Índice de refracción:

Consiste en la medición del ángulo de refracción del aceite esencial manteniendo condiciones de transparencia e isotropismo, siendo la longitud de la luz de 589,4 mm, que corresponde a la línea D del sodio, siendo la temperatura de 20°C.

El índice de refracción mide la velocidad a la cual la luz pasa a través de un aceite esencial refractado. Cada aceite esencial esta hecho de componentes únicos, los cuales influye en la velocidad y numero de grados a los cuales ellos refractan la luz. (Güenther, 1955)

Se limpió cuidadosamente los prismas del refractómetro con alcohol. Luego, se colocó una gota del aceite esencial y se cerraron los prismas. Después, se ajustaron las perillas de dispersión y de control para alinear la frontera (la división entre las regiones clara y oscura) con el centro de la equis. Finalmente, se leyó directamente el índice de refracción de la muestra tomando en cuenta la temperatura.

El índice de refracción a 20°C (n_d^t) se calculó según Ecuación 2.4:

$$n_d^t = n_d^{20} + a + (t - 20^\circ C)$$

(Ecuación 2.4)

Dónde:

n_d^t → Índice de refracción a la temperatura del ensayo.

a → Factor de corrección. En general, y salvo indicaciones contrarias, se menciona $a= 0.0004$.

t → Temperatura del ensayo

2.3.5 Determinación de la composición química del aceite esencial de *Schinus molle L.*

2.3.5.1 Cromatografía de Gases

Es un método físico de separación basado en la distribución de la muestra en dos fases: una fase es el lecho estacionario de extensa superficie empacada apretadamente dentro de una columna. Ésta es la fase estacionaria y puede ser un sólido o una delgada película líquida que recubre al sólido. La otra fase, consiste

en un gas o un líquido que percola sobre la fase estacionaria y alrededor de la misma. Esta fase se denomina fase móvil. (Skoog, 2008)

Se utilizó un Cromatógrafo de Gases acoplado a Espectrómetro de Masas, el cual tiene la mayor sensibilidad de cualquier sistema GC-MS proporcionando velocidades de adquisición mayores a otras técnicas analíticas. Tiene un inyector automático que es más efectivo el análisis, ya que la incertidumbre con la que inyecta la cantidad solicitada es muy baja. Su puerto de inyección hace que las muestras líquidas se evaporen inmediatamente, ya que la temperatura máxima del puerto es de 300 °C, la temperatura del horno se puede elevar hasta que la columna lo permita, luego en el detector de masas, el alto vacío llega casi a cero, haciendo que el trayecto de las especies químicas detectables sea mucho más rápido, ayudado por el cuadrupolo que lo hace más selectivo.

Se utilizó una columna capilar Rtx-5ms® (30 m x 0.25 mm ID x 0.25 µm espesor del film). Además se empleó Helio (min 99.99 %) como gas acarreador. El cromatógrafo de gases se conectó a un espectrómetro de masa de triple cuadrupolo operado con impacto electrónico o ionización electrónica (EI, 70 eV) como fuente de Iones. Se contó con una biblioteca para pesticidas (PESTEI 3) y NIST.

2.3.5.1.1 Condiciones en el equipo GC-MS

Para determinar la composición del aceite esencial del *Schinus Molle* L. (molle) se realizaron corridas SCAN tanto de Arequipa como de Moquegua, utilizando una librería NIST (National Institute of Standards and Technology, EEUU) (NIST/EPA/NIH MASS SPECTRAL LIBRARY, 2011).

En cuanto a las condiciones establecidas en el espectrómetro de masa, éste se trabajó en el modo de Impacto Electrónico (EI).

Para realizar los análisis en el equipo GC-MS, se probaron diferentes condiciones para establecer aquellas que dieran los mejores resultados, es decir, que permitieran obtener una mejor separación y un tiempo de análisis corto.

Uno de los primeros pasos, consistió en probar diferentes temperaturas en el horno del cromatógrafo con una programación en la temperatura, la combinación apropiada nos permitió una mejor separación y picos definidos. Las muestras fueron solubilizadas en hexano a una concentración de 0.2 ppm y analizadas en el cromatógrafo de gases acoplado a masas a las siguientes condiciones:

Columna capilar Rtx-5ms® (30 m x 0.25 mm ID x 0.25 µm espesor del film), temperatura del inyector: 250°C, temperatura del detector: 300 °C, temperatura de la columna 40°C (10 min)/3°C/min/140 °C/2°C/min/240 °C (10 min), detector MS, gas transportador He, flujo 1 mL, *splitless*, volumen inyectado 1 µL.

Los porcentajes de área y los tiempos de retención de cada uno de los componentes de los aceites esenciales estudiados, fueron obtenidos directamente del análisis. (Elaboración propia)

2.3.6 Evaluación y comparación de la actividad antimicrobiana

2.3.6.1 Recolección de cepas clínicas

Para un adecuado transporte y conservación de muestras clínicas se debe tomar en consideración, la procedencia de la muestra, es decir si proviene de orina, sangre, secreción nasofaríngea, frotis nasal, etc. El envase a utilizar debe ser tubos, frascos, torunda con medio de transporte Amies, botellas de hemocultivos, etc. El tiempo y la temperatura (la mayoría de muestras en tiempo ≤ 24 h pueden ser recolectadas a temperatura ambiente) (Laboratorio de microbiología del C.H.U.A., 2005)

Las cepas clínicas fueron recolectadas del Hospital Goyeneche y del Hospital de Essalud (Arequipa) y depositadas en tubos de cultivo con tapa roscada conteniendo medios: Manitol salado y Mac Conkey.

2.3.6.2 Aislamiento e identificación de *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*

Los procedimientos de cultivo y aislamiento deben ser considerados de acuerdo con la naturaleza de cada muestra, de los microorganismos que se investigan y de la flora saprofita o patógena que se puede encontrar. El uso de medios de cultivo adecuados

debe brindar como resultado, el rápido crecimiento de microorganismos viables que, directamente o mediante posteriores resiembra, formaran colonias aisladas disponibles para su estudio. (García, 2009)

Para el aislamiento de *Staphylococcus aureus* se utilizó el medio de cultivo manitol salado, dado que este medio es selectivo para el aislamiento de *Staphylococcus* gram positivos, observando un crecimiento de color amarillo característico de *Staphylococcus aureus*.

Para el aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomona aeruginosa* se utilizó el medio de cultivo Mac Conkey dado que es selectivo para microorganismos gram negativos.

Para la identificación de *Staphylococcus aureus* se realizó la prueba de la catalasa y coagulasa. Para la identificación de *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomona aeruginosa* se utilizó la batería de pruebas de identificación bioquímicas (TSI, LIA, Urea, SIM y Citrato).

2.3.6.3 Prueba de sensibilidad antimicrobiana

2.3.6.3.1 Prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de excavación placa cultivo

El método de difusión por excavación en agar es usado para determinar el efecto antimicrobiano de una sustancia frente a un microorganismo. Éste método comprende lo que se denomina un antibiograma o prueba de susceptibilidad bacteriana frente a drogas específicas.

El principio del método involucra la siembra del inóculo sobre toda la superficie del agar, luego se realiza pozos de 5 mm de diámetro. Se formara así por difusión un gradiente de concentración del antimicrobiano y la sensibilidad del microorganismo estará indicada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento alrededor del reservorio. (De Mendonça Rocha, 2012)

Con un asa de Khole estéril, se recogieron de 2 a 3 colonias de *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*. Luego, se disolvieron en 5 mL de suero fisiológico. Como resultado, la turbidez debió ser similar a la del estándar 0.5 de la escala de Mc Farland. Se sumergió un hisopo de algodón estéril, dentro de la suspensión bacteriana y se hizo presión en las paredes del tubo para eliminar el exceso de líquido. A continuación, se sembró en agar Müeller-Hinton con el hisopo, toda la placa de manera uniforme. Seguidamente, se abrieron pozos de 5 mm de diámetro (1 en cada placa) y se añadió 100 µL de aceite esencial de *Schinus molle* puro. Las placas se incubaron a 37°C durante un tiempo de 24 horas y se midieron los halos de inhibición de desarrollo. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Los resultados se expresan como: Sensible (S) cuando presentan halos de inhibición ≥ 20 , Intermedio (I) cuando presentan halos de inhibición $>12 - 19$ y Resistente (R) cuando presenta halos de inhibición ≤ 12 . (CLSI, Clinical and Laboratory Standars Institute., 2009)

2.3.6.3.2 Determinación de la concentración bactericida mínima por microdilución.

Se llama concentración mínima inhibitoria a la cantidad mínima del antibiótico capaz de inhibir el crecimiento bacteriano (García, 2009). La técnica de microdilución en caldo es de gran utilidad práctica para el estudio de las CBM. No es más que la técnica de macrodilución pero realizada en placas de poliestierno, con micropocillos en lugar de tubos (Prats, 2005)

En el método de microdilución, cada una de los pocillos de la placa de microtitulación con pocillos representa uno de los tubos del método de macrodilución.

De la misma manera que se realizó en el método de difusión por excavación con un asa de Khole estéril, se recogieron de 2 a 3 colonias de *Staphylococcus aureus*. Se disolvieron en 5 mL de suero fisiológico. Como resultado, la turbidez debió ser similar a la del estándar 0.5 de la escala de Mc Farland. Seguidamente a los

inóculos obtenidos se les hicieron diluciones 1/100 en tubos eppendorf teniendo en cuenta que el volumen final es 1000 μ L. Luego en 3 tubos eppendorf se prepararon emulsiones en las cuales se mezclaron 1000 μ L de aceite esencial con 50 μ L de Tween 80. Posteriormente en la placa de microdilución se agregó 100 μ L de caldo BHI por pozo. A continuación se agregan 100 μ L del aceite esencial de *Schinus molle* al primer pozo de cada muestra. Seguidamente se mezcló el caldo con el aceite esencial, se tomaron 100 μ L y se depositaron en el pozo siguiente, hasta que se llegó a la octava dilución (0.39%) por muestra; se agregaron 10 μ L de los inóculos por pozo. Se prepararon controles positivos y negativos en las dos últimas filas. La placa de microdilución se incubó durante un tiempo de 24 horas a una temperatura de 37°C, al día siguiente se observó si hay presencia de turbidez y como confirmación se sembraron todos los pozos en medios de cultivo selectivos, observando el crecimiento o no de las bacterias. Como resultado final, se calculó la concentración bactericida mínima del aceite esencial de *Schinus molle* para *Staphylococcus aureus*. (França, Costa, Wanderley, Alidianne, & Leite, 2012)

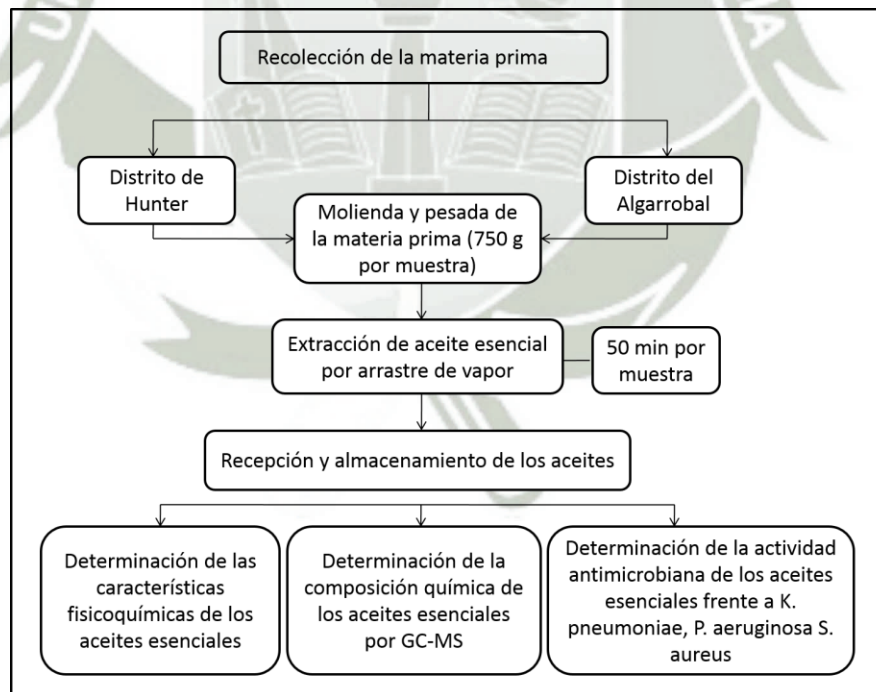


Figura 2.1 Flujograma del diseño experimental

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 RECOLECCIÓN DE LAS ESPECIES DE *Schinus molle* L. (MOLLE) DE LAS LOCALIDADES DE MOQUEGUA Y AREQUIPA.

La recolección del fruto de *Schinus molle* L. (molle) se realizó en las localidades de Arequipa y Moquegua, identificando los puntos de muestreo con un Navegador Satelital (GPS) GPS Garmin e Trex® H. y registrando la respectiva ubicación en fichas de recolección tal y como se muestra en la Figura 3.1 y 3.2.

La recolecciones realizadas fueron tomadas de día, puesto que según Rodríguez (2012), es recomendable realizar el corte o poda del material vegetal por la mañana evitando contaminantes, residuos de otras especies de plantas, polvo, tierra, etc, siendo importante también tomar en cuenta la época de la recolección, el estado fisiológico de la planta y el lugar geográfico de la recolección. (Margarito, 2012)

HERBARIUM AREQUIPENSIS – HUSA	
Universidad Nacional de San Agustín – Arequipa	
ANACARDIACEAE	
<i>Schinus molle</i>	
PERU;Dpto. Arequipa; Prov. Arequipa; Dist.Jacobo Dickson Hunter; Bellavista al costado del Restaurante Chobita. Laderas húmedas.	
S 16°26' 14.5" O 71° 33' 00.2"	2265m
Hierba de 3m de alto. Frutos color morado	
N.v: "Molle"	
	8 - Enero-2013
	No. 001
F. Moncada V, V. Quipuscoa S.	
4 dupl.	
Universidad Nacional de San Agustín(UNSA)	

Figura 3.1 Etiquetas de registro de la recolección de *Schinus molle* L. de la localidad de Arequipa

HERBARIUM AREQUIPENSIS – HUSA	
Universidad Nacional de San Agustín – Arequipa	
ANACARDIACEAE	
<i>Schinus molle</i>	
PERU;Dpto. Moquegua; Prov. Ilo, Distrito San Jerónimo ; Cerca a la plaza del pueblo de San jerónimo a la altura del cementerio. Laderas húmedas.	
S 17°37' 27.1" O 71° 37' 27.5"	8m
Hierba de 3m de alto. Frutos color morado	
N.v: "Molle"	
	20 - Enero-2013
	No. 004
F. Moncada V, V. Quipuscoa S.	
2 dupl.	
Universidad Nacional de San Agustín(UNSA)	

Figura 3.2 Etiquetas de registro de la recolección de *Schinus molle* L. de la localidad de Moquegua

Para la adecuada conservación, se separó las semillas del material vegetal completo, para luego extenderlas sobre papel, bajo sombra y con aireación, facilitando así su adecuado secado (Figura 3.3), éste procedimiento es acorde a lo mencionado por Rodríguez (2012), el cual menciona que la finalidad de dichas condiciones es evitar la contaminación por hongos, por el contrario de realizarse un secado en hornos, sugiere hacerlo inmediatamente o en el menor tiempo posible después del corte.

En lo que respecta a la identificación taxonómica, una muestra del ejemplar completo y fresco de cada localidad, fue caracterizada por el Herbarium Arequipense (HUSA) determinándose que el material biológico recolectado, efectivamente, correspondía a *Schinus molle* L. en ambos casos (Anexo 13 y 14).

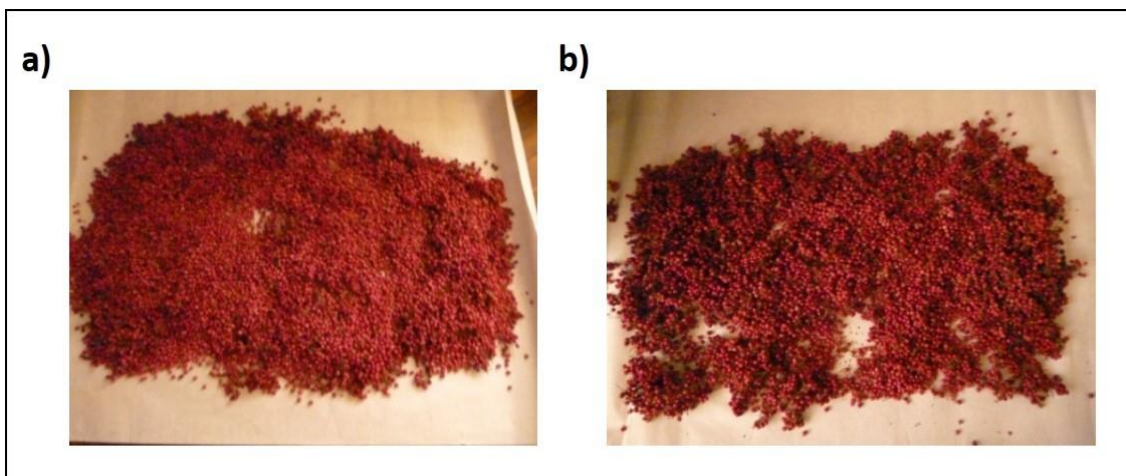


Figura 3.3 Frutos de molle de Arequipa (Izquierda) y Moquegua (Derecha).

3.2 EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE *Schinus molle* L. (MOLLE)

3.2.1 Destilación por arrastre de vapor

La extracción de aceites esenciales se realizó según el procedimiento detallado en el apartado 2.3.3.1. Como se observa en la Figura 3.4, se utilizó un equipo de destilación por arrastre de vapor a escala piloto, puesto que su método es muy económico en comparación con el costo de los solventes orgánicos, y además posee la ventaja de no requerir el uso de equipos sofisticados según Bague (2012).



Figura 3.4 Destilador por arrastre de vapor a escala piloto

Las condiciones operacionales a las cuales se realizó la extracción correspondieron a 750 g de los frutos de *Schinus molle L.* (molle), presión de 12 bar y un tiempo aproximado de 40 minutos. Finalizado el proceso el destilado se recibió en un recipiente de vidrio, tal y como se muestra en la Figura 3.5, en donde sólo la parte superior corresponde a los aceites esenciales obtenidos y todo el volumen restante corresponde a agua, debiéndose ésta particularidad a que el aceite esencial de molle presenta una densidad menor a la del agua., según Decallacsá (2012). Cabe resaltar que la mayoría de los aceites esenciales son menos densos que el agua a excepción de algunos, como el aceite esencial de Canela, Clavo, etc. los cuales son reportados por Remington (2002).

Una vez obtenidos los aceites esenciales, fueron separados del agua por decantación desde un embudo de separación (Figura 3.6), para luego adicionarles sulfato de sodio anhidro como así lo señala Guarnizo (2007), para eliminar los residuos de agua, de tal forma que los aceites esenciales obtenidos quedaran translucidos y brillantes. Finalmente los aceites esenciales obtenidos fueron colectados en botellas ámbar de 250 mL.

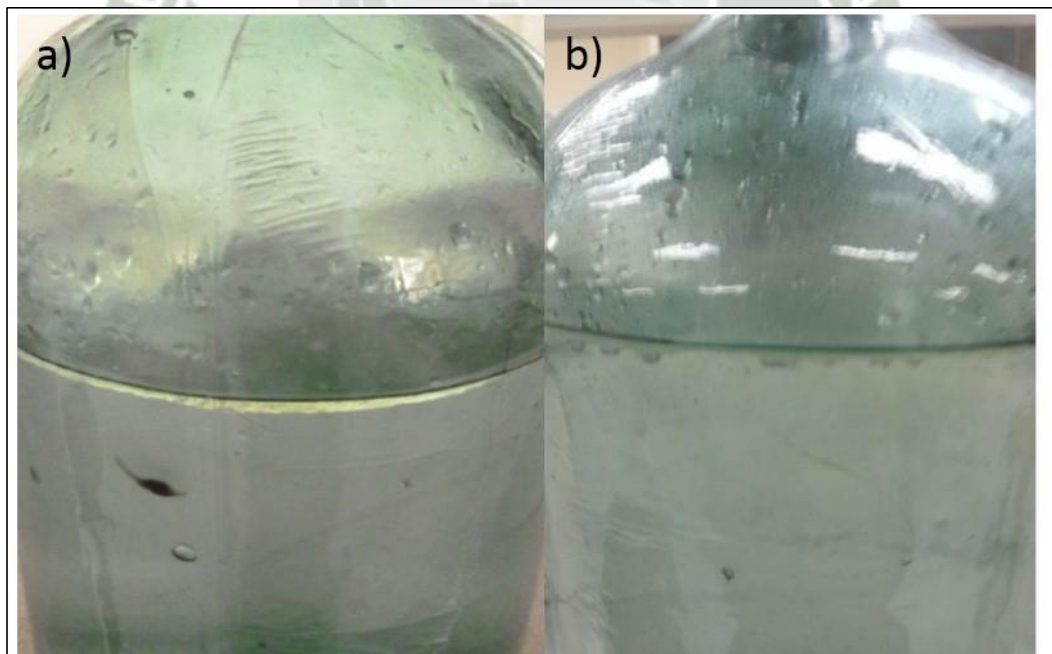


Figura 3.5 Destilados obtenidos por el equipo de arrastre de vapor de *Schinus molle L.* a) Localidad de Arequipa, b) Localidad de Moquegua.

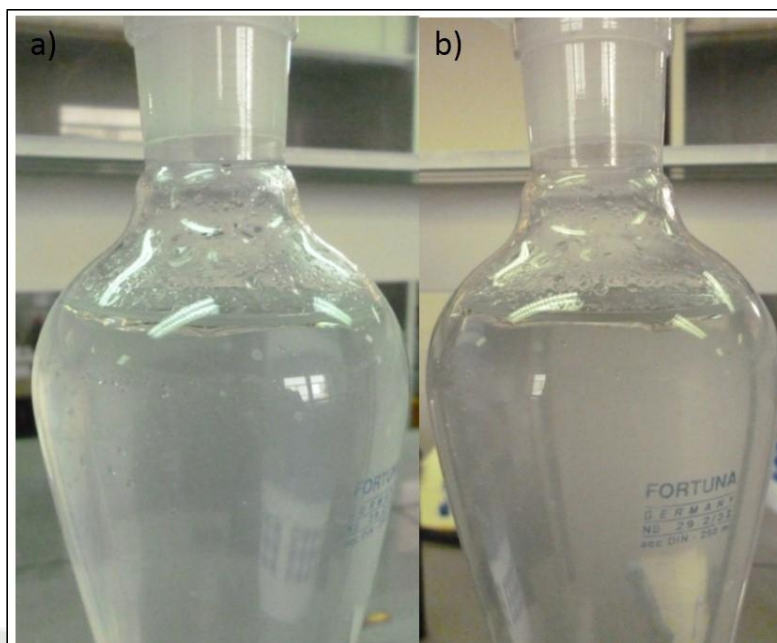


Figura 3.6 Decantación de los destilados obtenidos de *Schinus molle L.* a) Localidad de Arequipa, b) Localidad de Moquegua.

3.2.2 Evaluación del rendimiento

La extracción de los aceites esenciales de *Schinus molle L.* recolectados de Arequipa y Moquegua, fue realizado en batch, en cuatro repeticiones, para cada localidad, expresando los resultados en términos de porcentaje de rendimiento, para lo cual se utilizó la ecuación 2.1, construyendo de este modo las tablas 3.1 y 3.2:

Tabla 3.1 Porcentaje de rendimiento del aceite esencial de *Schinus molle L.* (molle) de Arequipa.

Día	Materia prima seca (g)	Aceite Esencial (g)	Rendimiento %
1	750	15.75	2.10
2	750	14.91	1.98
3	750	15.21	2.02
4	750	15.41	2.05

Tabla 3.2 Porcentaje de rendimiento del aceite esencial de *Schinus molle L.* (molle) de Moquegua.

Día	Materia prima seca (g)	Aceite Esencial (g)	Rendimiento %
1	750	8.94	1.17
2	750	8.91	1.18
3	750	8.95	1.19
4	750	8.94	1.19

Así mismo, para la localidad de Arequipa se identificó un rendimiento promedio de 2.04 %, con una desviación estándar de 0.0506 y un coeficiente de variación de 2.48%, a diferencia del aceite esencial extraído de *Schinus molle L.* de la localidad de Moquegua, que presentó un rendimiento promedio de 1.18%, una desviación estándar de 0.0096 y un coeficiente de variación de 0.81%. Estos datos son mostrados en la Tabla 3.3, reflejando que existe poca variabilidad en las repeticiones correspondientes a cada localidad, y que además presentan una distribución normal.

A diferencia de lo reportado en la presente investigación, Viturro (2011) señala que los frutos de molle triturados, provenientes de muestras de la sierra central de Perú,

Tabla 3.3 Porcentaje de aceite esencial obtenido de *Schinus molle L.* de las localidades de Arequipa y Moquegua

EXTRACCIÓN	Rendimiento (%)	
	Arequipa	Moquegua
1	2.10	1.17
2	1.98	1.18
3	2.02	1.19
4	2.05	1.19
Promedio	2.04 +/- 0.0805	1.18 +/- 0.0152
Desviación Estándar	0.0506	0.0096
Coeficiente de Variación	2.48%	0.81%
Sesgo Estandarizado	0.212957	-0.697748
Curtosis Estandarizada	-0.0414274	-0.526337

Fuente: Statgraphics Centurion XVI

contienen un 5.15 % de aceite esencial colectados, esto puede deberse a las condiciones experimentales trabajadas y a los diferentes equipos empleados. Según Novoa Antonio Eduardo et al 2013 señala que si bien el equipo de destilación por arrastre de vapor es económico, se obtiene un mayor rendimiento usando el equipo clevenger.

Así mismo, en la Figura 3.7 se puede observar diferencia entre el rendimiento promedio de las extracciones de los aceites esenciales de la localidad de Arequipa y Moquegua, identificando además que no existen valores atípicos y que existió una buena repetibilidad entre cada extracción en batch.

Estadísticamente se buscó comparar el promedio del rendimiento entre ambas localidades, para ello se realizó la prueba C de Cochran identificando un valor-P de 0.0216, menor a 0.05, lo cual indica que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas, con un nivel de confianza del 95.0%. Por ello los

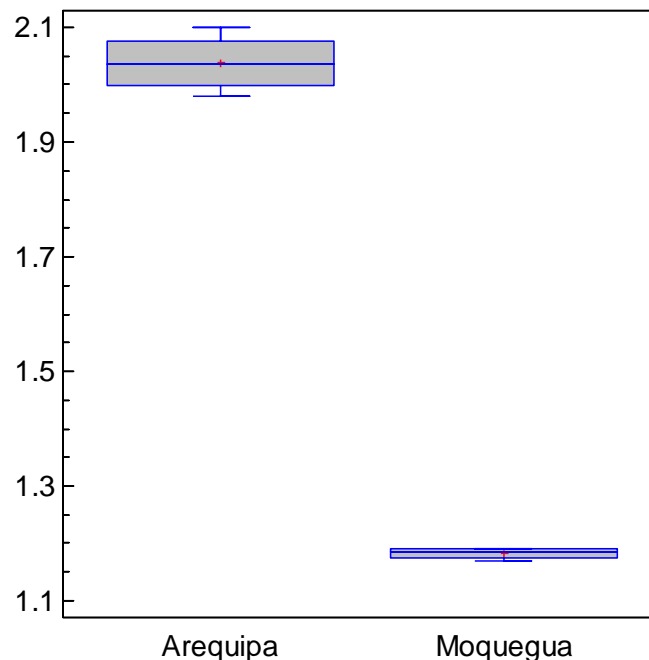


Figura 3.7 Diagrama de caja y bigotes para rendimiento (%) de extracción de aceites esenciales de *Schinus molle L.* a) Localidad de Arequipa, b) Localidad de Moquegua.

promedios de rendimiento (%) fueron comparados sin suponer varianzas iguales, aplicando la prueba t, teniendo como hipótesis nula la igualdad de promedios entre las localidades de Arequipa y Moquegua, es decir diferencia igual a 0, versus la hipótesis alterna de que ambos promedios no son iguales, es decir, de que la diferencia no es igual a 0.0. Puesto que se obtuvo un valor-P calculado menor a 0.05, se puede afirmar que estadísticamente, existe diferencia significativa entre los promedios del rendimiento de ambas localidades. Los valores-P calculados se detallan en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4 Pruebas estadísticas para comparar rendimientos de la extracción del aceite esencial de *Schinus molle* L. de las localidades de Arequipa y Moquegua.

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
C de Cochran	0.965409	0.021616
Prueba t sin suponer varianzas iguales	33.218	0.000034

Fuente: Statgraphics Centurion XVI

La diferencia observada entre el rendimiento del aceite esencial de Arequipa con el rendimiento del aceite esencial de Moquegua, se debió posiblemente a las condiciones extrínsecas del medio ecológico (coordenadas geográficas, clima, suelo, exposición solar, etc.) a las cuales se vio expuesta el *Schinus molle* L. (molle), como así lo sugiere Bandoni (2000); dentro de las cuales Moquegua registró unas altitudes, de los 3 puntos recolectados, de 8, 10 y 12 msnm a comparación de Arequipa con unas altitudes de 2265, 2266 y 2272 msnm.

Por lo tanto, con los resultados expuestos, podemos afirmar que el aceite esencial de molle puede presentar variaciones en el rendimiento debido a sus condiciones extrínsecas a las cuales se encuentra expuesto durante su desarrollo. Así mismo, Loayza (2004) señala que dichas variaciones en rendimiento de la extracción de aceite esencial de *Schinus molle* L. dependen también del estado del material vegetal, obteniéndose un rendimiento de 5.6 % y 0.6% de frutos maduros molidos y sin moler, y un 1.1% y 0% de frutos verdes molidos y sin moler respectivamente.

Es importante señalar, que a medida que se incrementa el rendimiento de los aceites esenciales, el precio se vuelve más económico, en cuanto a su comercialización, tal y como se observa en la Tabla 3.5, la cual resume los precios de exportación de diversos aceites esenciales. Así mismo, la de la empresa Inka natural reporta un precio bajo de exportación correspondiente a 6.74 euros, debido a que su rendimiento, al menos si es extraído de frutos, es de un 5%.

Un estudio de mercado realizado por Novoa (2013) señala que podría haber una factibilidad de formar plantaciones que sirvan como fuente de materia prima (hojas). Dado que la fenología del árbol de molle permite la extracción de hojas durante todo el año, y la tasa de regeneración foliar es de aproximadamente 1 mes, se puede realizar una colecta cada 15 días. Según (CONABIO, 1997) señala que el rendimiento aproximado del aceite esencial de molle es de 100 mL por cada 6.5 kg de hojas secas, lo que se traduce en casi 15 kg

Tabla 3.5 Rendimiento y precios para algunos aceites esenciales

Aceite esencial	Precio suministrador 2	Rendimiento típico
	(Euros/10 mL)	(% en peso sobre el material vegetal utilizado)
Melisa	150	0.017
Rosa	200	0.025
Neroli	110	0.075
Hiberba Luisa	55	0.136
Oregano	10	0.200
Tomillo vulgar	7.2	0.250
Petitgrain	4.4	0.300

Fuente: (Ortuño, 2006)

de hojas frescas. Se indicó también que un árbol alcanza la madurez para ser transplantado a los 30 cm, lo que representa 5 meses desde la siembra en vivero (CONABIO, 1999). A eso, hay que sumar 3 años de crecimiento hasta la altura funcional de 2 m, tamaño en el que el follaje alcanza su volumen final.

Según Novoa (2003), señalan que se podrían obtener más de 15 kg de hojas frescas por árbol aunque por motivos de ajuste financiero se tomarían en cuenta que cada árbol produce, durante cada mes, 30 kg, lo que se traduce en 200 mL de aceite. Esto, aplicado a toda la plantación, que representa 20 L de aceite mensual.

Tomando como ejemplo que aceite de ricino tiene un precio aproximado de 400 € por tonelada, según consultas a un proveedor turco. Considerando que la densidad del aceite de ricino es de 0,9619 kg/L (Wassner, s/d), se tiene que por el precio indicado se compra, aproximadamente, 1040 L a 400 €, sin incluir fletes ni transporte. Esto es 1 L a 2,6 €. Según el Banco de la Nación, con un tipo de cambio de 3,43 PEN/EUR; tenemos que cada litro puede llegar a costar hasta S/. 8,90. Con cien árboles correctamente manejados, se puede obtener hasta 2140 soles anuales; considerando el precio de un producto a todas luces inferior. Si a eso, se le agrega un valor adicional, proveniente de la producción orgánica y la Marca País; el precio aumentará según Weinberger (2009). Si establecemos este a un valor de 30 soles el litro, la ganancia anual llega hasta los 7200 soles, con un costo de mantenimiento anual de, aproximadamente, 760 soles; y un costo de introducción de 1610 soles, aproximadamente.

3.3 CARACTERIZACIÓN FÍSICA

3.3.1 Características organolépticas

Los aceites esenciales extraídos presentaron colores transparentes ligeramente amarillentos y sin ninguna partícula, ni rastro de agua, como se observa en la Figura 3.8. y como se detalla en la Tabla 3.6; con un aroma herbáceo penetrante y levemente mentolado. Sabor herbáceo persistente y un poco amargo.

Los datos mostrados, presentan similitud con lo reportado por Viturro et al. (2011), el cual señala que el aceite esencial de molle obtenido de frutos presenta un color amarillo pálido.

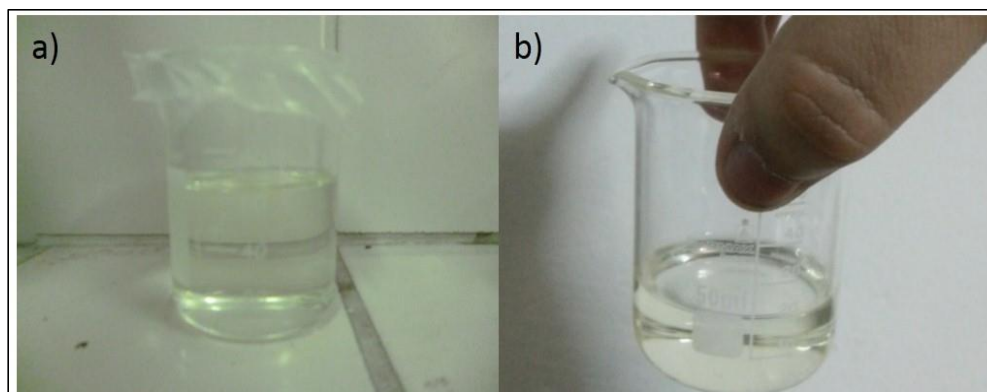


Figura 3.8 Aceite esencial purificado de *Schinus molle L.* a) Localidad de Arequipa, b) Localidad de Moquegua

Tabla 3.6 Características organolépticas de los aceites esenciales de *Schinus molle L.* (molle).

Características organolépticas	Aceite esencial de (molle) de Arequipa	Aceite esencial de (molle) de Moquegua
Color	Transparente amarillento	Transparente amarillento
Olor	Herbáceo penetrante y ligeramente mentolado	Herbáceo penetrante y ligeramente mentolado
Sabor	Herbáceo persistente y amargo	Herbáceo persistente y amargo

Fuente: Elaboración propia

Finalmente los aceites esenciales obtenidos fueron inmediatamente almacenados en frascos ámbar herméticamente cerrados, a una temperatura de -4°C , durante el tiempo que duró la parte experimental del presente trabajo de investigación. En los días posteriores al almacenamiento, no se observó ninguna turbidez o formación de algún contaminante. En general, se obtuvieron aceites esenciales puros, debido a las buenas prácticas experimentales tanto antes como después de la extracción.

3.3.2 Determinación de la densidad:

Una vez obtenidos los aceites esenciales, se procedió determinar sus principales características físicas. En cuanto a la densidad, esta fue determinada según se detalla en el apartado 2.3.4.2, empleando las ecuaciones 2.2 y 2.3, y tomando un valor de la densidad del agua, a 20°C , de 0.998203 según se indica en la tabla mostrada en el Anexo 1, calculando por tanto:

$$Vl_R = \frac{1.0563 \text{ g}}{0.9982 \text{ g/mL}} = 1.0582 \text{ mL} \dots \dots \dots (1)$$

$$\rho_{A.E.(Arequipa)} = \frac{0.9001 \text{ g}}{1.0582 \text{ mL}} = 0.8506 \text{ g/mL} \dots \dots \dots (2)$$

$$\rho_{A.E.(Moquegua)} = \frac{0.8803 \text{ g}}{1.0582 \text{ mL}} = 0.8318 \text{ g/mL} \dots \dots \dots (3)$$

Según Ortuño (2006), la densidad es un parámetro que permite distinguir un aceite esencial autentico de un aceite esencial sintético, dado que la mayoría de los aceites esenciales están formados por terpenos derivados, compuestos orgánicos con átomos ligeros (C, H, O) formando cadenas y anillos, presentando una densidad menor a la del agua (1 g/cm³), como es en el caso del aceite esencial de molle, que está formado por algunos monoterpenos como : α -pineno, β -mirceño, α -felandreno, p-cimeno y silvestreno, como detalla Zegarra (2006) en su investigación.

Las densidades obtenidas para los aceites esenciales de molle (0.8506 para aceite esencial de Arequipa y 0.8318 para el aceite esencial de Moquegua) se encuentran dentro del rango, tal y como reporta Viturro et al. (2011), el cual señala que el aceite esencial de frutos maduros en Latinoamérica puede ir aproximadamente desde 0,8490 g/cm³ a 0,8696 g/cm³. Sin embargo, Ortuño (2006) menciona que hay algunos aceites esenciales que presentan densidades mayores que las del agua como es el caso de almendras amargas, mostaza, canela, perejil o clavo.

Por tanto, la determinación de la densidad de un aceite esencial es de importancia, ya que para su control de calidad se manejan estrechos rangos de densidades, siendo cualquier variación en el rango, un indicador de la presencia de alguna impureza o adulteración. Finalmente se pudo verificar que las densidades obtenidas se encuentran dentro de los valores aceptados, mencionados por Guenther (1955).

3.3.3 Determinación del Índice de refracción:

La determinación del índice de refracción se realizó según se indica en el apartado 2.3.4.3. Las lecturas directas tomadas del refractómetro para las muestras de los aceites esenciales, se encontraron dentro del rango de 1.476 a 1.479, común para los

aceites esenciales de molle; siendo las lecturas de 1.4744 y 1.4745 para las localidades de Arequipa y Moquegua, respectivamente. Dichos valores fueron corregidos utilizando la Ecuación 2.4, considerando una temperatura de 19.4°C, registrada al momento de realizar la lectura. Utilizando estos datos se calcularon los índices de refracción como se detalla a continuación:

$$n_d^t(Arequipa) = 1.4744 + 0.0004 + (19.4^\circ C - 20^\circ C) \dots\dots\dots(4)$$

$$n_d^t(Arequipa) = 1.4746 \dots\dots\dots(5)$$

$$n_d^t(Moquegua) = 1.4745 + 0.0004 + (19.4^\circ C - 20^\circ C) \dots\dots\dots(6)$$

$$n_d^t(Moquegua) = 1.4747 \dots\dots\dots(7)$$

Los índices de refracción calculados se resumen en la Tabla 3.7. Según Guenther (1955), cada aceite esencial, al estar formado por distintos componentes, tiene un índice de refracción particular, ya que estos componentes influyen en la velocidad y en el número a los cuales la luz es refractada, así mismo, Ortuño (2006) señala que la determinación del índice de refracción para aceites esenciales es una magnitud exclusiva para cada aceite esencial, que cambia si este se diluye o se mezcla con otras sustancias. Así mismo, Viturro et al. (2011), reporta diversas propiedades de los aceites esenciales de diversos países, las cuales se muestran en la Tabla 3.8, con ella se puede identificar que los índices refracción calculados en la presente investigación son acordes a dichos datos bibliográficos.

Tabla 3.7 Características físicas determinadas para los aceites esenciales de *Schinus molle L.* (molle).

Característica Física	Aceite esencial "Arequipa"	Aceite esencial "Moquegua"
Densidad	0.84	0.83
Índice de refracción	1.47	1.47

Fuente: Elaboración propia

Tabla 3.8 Datos bibliográficos de propiedades físicas de *Schinus molle* L.

Localización	Material extraído	Componentes principales	Rendimiento	Densidad (t° C)	Índice de refracción (t° C)	Rotación óptica
México/ América del sur	Hojas, tallas y frutos	felandreno, pineno y carvacrol	5.20%	0.8490 a 0.8696 (20° C)	1.4761 a 1.4790 (20° C)	N/I
California	Frutos	α-pineno, mirceno, α-felandreno y d-β-limoneno, β-felandreno	6.03%	0.8830 (29° C)	1.4732 (24.5° C)	24.7 (27° C)
No indicado	Hojas secas	α-felandreno, β-felandreno y carvacrol	3.00%	0.9037 (20° C)	1.4945 (14° C)	2.8 (20° C)
No indicado	Frutos	N/I	3.35 a 5.2%	0.850 (15° C)	N/I	46 4'(17° C)
México	Frutos	N/I	N/I	0.8600 (15° C)	N/I	42 30'(N/I)
México	Frutos	α-felandreno	N/I	0.8320 (15° C)	N/I	60 40'(N/I)
España	Frutos	α-felandreno	N/I	0.8561 (15° C)	1.47877 (20° C)	62 42'(N/I)
No indicado	Hojas	N/I	7.20%	0.856 (15° C)	1.4790 (20° C)	41 17'(N/I)
México	Hojas	α-felandreno	N/I	0.8583 (15° C)	1.47665 (20° C)	44 50'(N/I)
Algeria	Hojas	N/I	N/I	0.8658 (15° C)	N/I	65 20'(N/I)
Algeria	Hojas y tallos	N/I	N/I	0.8634 (15° C)	N/I	50 54'(N/I)
Grasse	Hojas y tallos	N/I	N/I	0.8696 (15° C)	N/I	46 13'(N/I)
Africa del Sur	Hojas+frutos	α-felandreno y carvacrol	0.49%	0.8486 (No indicado)	1.4732 (20° C)	68 24'(N/I)
América central	hojas+frutos	N/I	N/I	0.83 a 0.86 (15° C)	1.4720 (20° C)	40 30'(N/I)

N/I: no identificados. **Fuente:** (Viturro, 2011). Elaboración propia.

3.4 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL ACEITE ESENCIAL POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

3.4.1 Cromatografía de Gases (CG) para el aceite esencial de molle de Arequipa

De acuerdo con los datos obtenidos usando un cromatógrafo de gases con espectro de masas, se registraron 5 picos para el aceite esencial de Arequipa, tal y como se observa en la Figura 3.9, los cuales representan los componentes mayoritarios

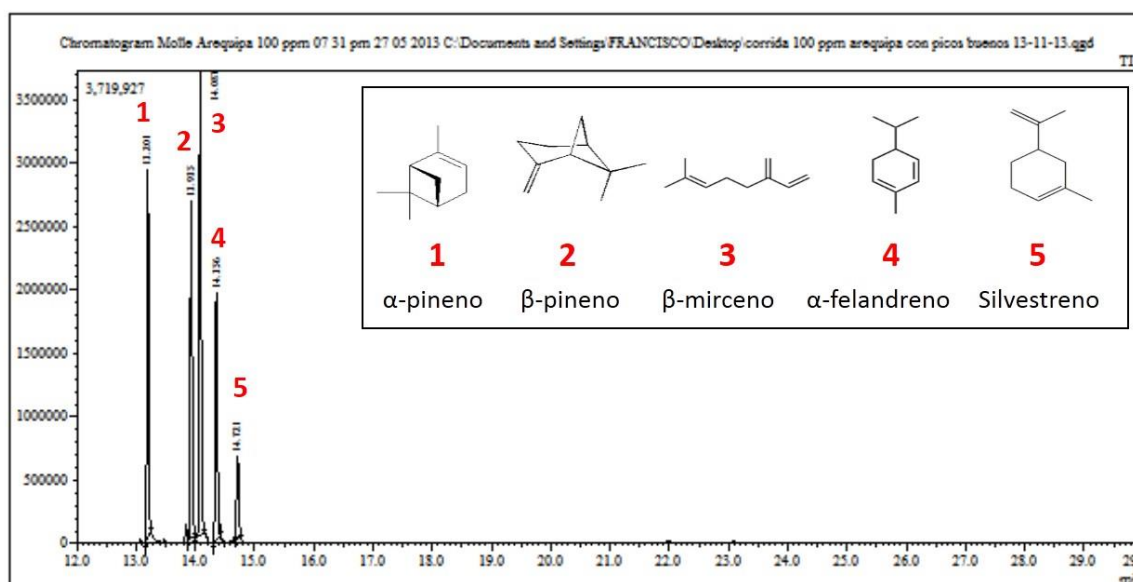


Figura 3.9 Cromatograma GC-MS del aceite esencial de *Schinus molle* L. (molle) de Arequipa.

La identificación de los componentes mayoritarios del aceite esencial de *Schinus molle* L. (molle) se realizó comparando el tiempo de retención en minutos, con la librería NIST del software GCMS Postrun Analysis. Así mismo, los componentes identificados, el tiempo de retención experimental, el tiempo de retención teórico y el área de cada pico del aceite esencial de molle de Arequipa se registran en la Tabla 3.9.

Tabla 3.9 Especificaciones de los metabolitos secundarios aislados por GC-MS de aceite esencial de *Schinus molle L.* (molle) de Arequipa

N°	Metabolito secundario	TRE(min)	TRT(min)	%Area
1	α -pineno	13.201	13.155	21.41
2	β -pineno	13.935	13.885	23.13
3	β -mirceno	14.087	14	31.59
4	α -felandreno	14.356	14.305	16.85
5	silvestreno	14.721	14.665	7.03

Donde TRE (min): Tiempo de retención experimental en minutos; TRT (min): Tiempo de retención teórico en minutos.

Según estudios como los registrados por Viturro et al. (2011), el aceite esencial de molle presenta como componentes mayoritarios α -pineno, β -pineno, α -felandreno, limoneno y β -felandreno usando como materia prima frutos secos. Como se puede observar los resultados son similares, siendo el único componente que difiere, el limoneno, esto debido probablemente a que en el presente trabajo de investigación, se empleó frutos maduros y no con frutos secos como reporta el autor.

3.4.2 Cromatografía de Gases (CG) para el aceite esencial de molle de Moquegua

El análisis usando un cromatógrafo de gases con espectro de masa para la identificación de los componentes mayoritarios del aceite esencial de *Schinus molle L.* (molle) de Moquegua, produjo también un cromatograma con 5 picos, tal y como se observa en la Figura 3.10. La identificación se realizó comparando el tiempo de retención en minutos con la librería NIST del software GCMS Postrun Analysis.

Según la empresa Sigma Aldrich, alfa pineno tiene un punto de ebullición de 155-156 °C, beta pineno de 165-167 °C, beta mirceno de 167 °C, alfa felandreno de 171-174 °C y cómo podemos observar en las figuras 3.9 y 3.10 los picos mayoritarios fueron detectados por el cromatógrafo de gases en ese orden, de tal manera que se puede afirmar que se realizó un buen análisis.

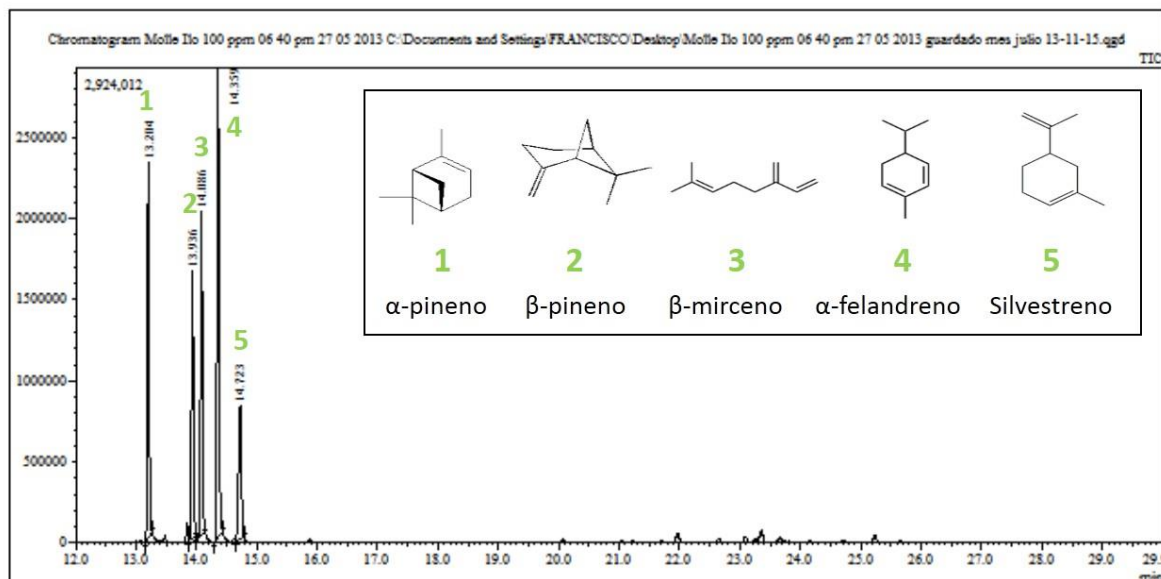


Figura 3.10 Cromatograma GC-MS del aceite esencial de *Schinus molle L.* (molle) de Moquegua.

Tabla 3.10 Especificaciones de los metabolitos secundarios aislados por GC-MS de aceite esencial de *Schinus molle L.* (molle) de Moquegua.

N°	Metabolito secundario	TRE(min)	TRT(min)	%Area
1	α-pineno	13.204	13.155	20.64
2	β-pineno	13.936	13.885	17.12
3	β-mirceno	14.086	14.000	19.56
4	α-felandreno	14.359	14.305	31.00
5	silvestreno	14.723	14.665	11.68

Donde TRE (min): Tiempo de retención experimental en minutos; TRT (min): Tiempo de retención teórico en minutos.

Los componentes identificados, el tiempo de retención experimental, el tiempo de retención teórico y el área de cada pico del aceite esencial de molle de Moquegua se registran en la Tabla 3.10.

De la misma manera a lo que sucedió con el aceite esencial de Arequipa, los componentes identificados presentan también una similaridad con los estudios realizados por Viturro et al. (2011), a excepción del limoneno. Realizando una

comparación entre la Tabla 3.9 (aceite esencial de Arequipa) y 3.10 (aceite esencial de Moquegua) se pudo observar que los componentes mayoritarios son los mismos, con la única diferencia presente en los porcentajes de área, ello, según Bandoni (2000), probablemente se debió a las condiciones extrínsecas (coordinadas geográficas, clima, suelo, exposición solar, etc), permitiendo concluir que las condiciones extrínsecas influyen en la concentración de los componentes identificados para los aceites esenciales de *Schinus molle L.* (molle) tal y como lo menciona Wildwood (2009)

Así mismo, Bertolazzi M. (2005) señala que dependiendo del método de extracción a utilizar puede haber variación en los componentes, reportando que para la hidrodestilación los componentes extraídos del aceite esencial de molle principalmente son monoterpenos, como el mirceno; en tanto que en la extracción con CO₂ supercrítico, se observa un aumento en la concentración de sesquiterpenos como cariofileno y germacreno.

Tabla 3.11 Composición del aceite esencial de *Schinus molle L.* en función de la parte extraída de la planta.

COMPUESTO	PORCENTAJE		
	Frutos maduros	Frutos verdes	Hojas y ramas
α -pineno	0	2.7	11.4
canfeno	0	0	4.8
β -pineno	0	0.3	16.9
sabineno	0	0	1.5
mirceno	33	26.9	13.7
α -felandreno	27.5	35.4	0
limoneno	10.5	8.1	8.2
β -felandreno	10.7	14.4	0
ρ -cimeno	2.6	0	0
β -cariofileno	2.5	1.7	6.3
α -humuleno	2.3	0.74	4
germacreno D	2.3	1.2	21.7
biciclogermacreno	0.5	0.9	1.6
NI 1	0	2.2	0.6
NI 2	0	0.2	1.8
NI 3	0	2	3.4

Donde: **NI**: no identificado. **Fuente:** (Loayza & Ríos del Prado, 2004)

Tabla 3.12 Componentes mayoritarios del aceite esencial de *Schinus molle* L. en seis países de Latinoamérica.

País	Provincia	Parte de la Planta	Componentes mayoritarios (%)
Costa Rica	Alajuela	Hojas frescas	α -pineno (22.7%), β -pineno (31.1%), γ -cadineno (6%), epi- α cadino (5.6%)
Ecuador	Cotopaxi	Frutos maduros secos	α -felandreno (23.8%), sabineno + β -pineno (23.5%), β -felandreno (21.8%), α -pineno (5.0%)
	Azuay	Frutos maduros secos	α -felandreno (16.4%), β -felandreno (16.2%), β -mirreno (13.9), p-cimeno (6.7%)
	Loja	Frutos maduros secos	α -felandreno (24.5%), β -felandreno (23.8%), mirreno (20.5%), α -pinno (5.4%)
Perú	Ayacucho	Frutos secos	α -felandreno (30.9%), β -pineno (27.5%), limoneno (15.3), β -felandreno (12.5%)
		Hojas frescas	Sabineno (19.1%), Δ -cadineno (8.2%), p-cimeno (7.9%), β -felandreno (7.2%)
Brasil	Cacapava do Sul 1	Hojas secas	α -pineno (32.9%), β -pineno (14.4%), δ -cadineno (9.4%), α -cadinol (13.3%)
	Cacapava do Sul 2	Hojas secas	Limoneno (36.2), α -pineno (12.9), β -cariofileno (8.7%), biciclogermacreno (8.4%)
	Sao Laourenco	Hojas secas	β -pineno (26.4%), biciclogermacreno (17.6%), α -pineno (17.2), limoneno (16.9%)
Bolivia	Cochabamba	Frutos maduros	Mirreno (33.0%), α -felandreno (27.5%), β -felandreno (10.7%), limoneno (10.5%)
		Frutos verdes	α -felandreno (35.4%), mirreno (26.9%), β -felandreno (14.4%), limoneno (8.1%)
		Hojas y ramas	germacreno D (21.7%), β -pineno (16.9%), mirreno (13.7%), α -pineno (11.4%)
Argentina	Santa Fe	Frutos verdes	Sabineno (31.4%), terpinen-4-ol (13.3), β -cariofileno (5.3%), germacreno D (3.7)
		Frutos maduros	Sabineno (43.1%), α -pineno (14.3%), β -pineno (12.9%), limoneno (10.8%)
		Hojas y tallos	Sabineno (63.0%), β -pineno (5.6%), α -pineno (5.1%), limoneno (4.1%)

Fuente: Viturro et al (2010)

Por su parte Loayza (2004), señala que dependiendo de la parte extraída de la planta puede existir variaciones en la composición del aceite esencial de molle como se señala en la Tabla 3.11. De igual manera Viturro et al. (2011), reporta variaciones en los componentes de los diferentes países de Latinoamérica mostrados en la Tabla 3.12, esto debido probablemente a los siguientes motivos: la parte de la planta que seleccionada para extraer el aceite esencial, el estado de la muestra (fresca o seca), la ubicación geográfica, etc. Por lo que podemos decir que los componentes mayoritarios del aceite esencial de molle pueden variar debido a sus condiciones extrínsecas.

3.5 EVALUACIÓN Y COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

3.5.1 Recolección de cepas clínicas

Las cepas clínicas fueron recolectadas del Hospital Goyeneche y del Hospital de Essalud (Arequipa), y depositadas en tubos de cultivo con tapa roscada conteniendo medios: Manitol salado y Mac Conkey.

3.5.2 Aislamiento e identificación de *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*

a) Aislamiento e identificación de *Klebsiella pneumoniae*

Para el aislamiento e identificación de cepas clínicas de *Klebsiella pneumoniae*, se empleó el medio de Mac Conkey y las pruebas de identificación bioquímicas TSI, LIA, medio agar Urea, agar Citrato Simmons y medio SIM como se muestra a en las figuras 3.11 y 3.12.

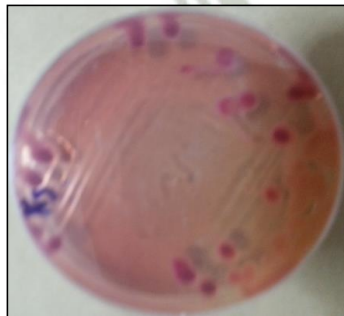


Figura 3.11 *Klebsiella sp.* en medio de cultivo Mac Conkey.

Como menciona Koneman (2000), el medio de cultivo Mac Conkey es un medio selectivo para el crecimiento de enterobacterias, inhibe el crecimiento de cocos gram-positivos, al contener lactosa nos permite diferenciar a los microorganismos fermentadores (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, de los microorganismos no fermentadores (*Pseudomona aeruginosa*). Como se observa en la figura 3.11 *Klebsiella pneumoniae* en medio de cultivo Mac Conkey presenta colonias de color morado rojizo y una consistencia mucóide.

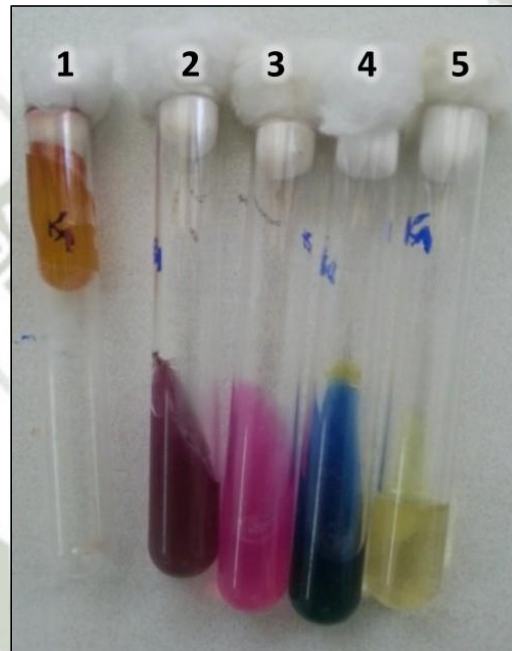


Figura 3.12 Pruebas de identificación bioquímicas para *Klebsiella pneumoniae*. 1) TSI, 2) LIA, 3) Medio agar Urea, 4) Agar Citrato Simmons y 5) Medio SIM.

Para la confirmación de las cepas de *Klebsiella pneumoniae* se realizaron pruebas de identificación bioquímicas mostradas en la Figura 3.12. Se observa que en el tubo uno, correspondiente a TSI, el medio de cultivo viró de color rojo a amarillo, lo cual indica que se fermentaron todos los azúcares, así mismo, el medio de

cultivo se levantó, indicando abundante formación de CO₂; por tanto el tubo uno, fue reportado como A/A (fermentador) con presencia de gas y no produce H₂S.

El tubo de LIA (segundo tubo), se registró como K/K, puesto que se mantuvo el color morado, indicando la descarboxilación de la lisina. En el tercer tubo para medio agar úrea, se observó el viraje de color de amarillo a color rosado indicando que existió la degradación de la úrea. Para el tubo de agar citrato Simmons (cuarto tubo) hubo un viraje de color verde a un color azul indicando que el citrato fue utilizado como fuente de carbono. Finalmente para el tubo de medio SIM (quinto tubo) la movilidad fue negativa y el indol fue negativo. Todos estos resultados fueron comparados con las tablas para identificación de enterobacterias mostradas en los Anexos 8 y 9, lográndose confirmar de esta manera, que la cepa aislada correspondió a *Klebsiella pneumoniae*.

b) Aislamiento e identificación de *Pseudomona aeruginosa*

Para el aislamiento e identificación de cepas clínicas de *Pseudomona aeruginosa*, se empleó el medio de cultivo Mac Conkey, y las pruebas de identificación bioquímicas TSI, LIA, medio agar Urea, agar Citrato Simmons, medio SIM y Oxidasa, como se muestra en las figuras 3.13 y 3.14.

Según Romero (2007) *Pseudomona aeruginosa* en medio de cultivo Mac Conkey presenta pigmentos como la pioverdina (colonias amarillo verdosas) y la piorubina (rojo), similar a lo obtenido en el cultivo realizado en la presente investigación, en la cual se muestra en la Figura 3.13 una coloración media verdosa de las colonias.



Figura 3.13 *Pseudomona aeruginosa* en medio de cultivo Mac Conkey.

Para la confirmación de las cepas de *Pseudomona aeruginosa* se realizaron pruebas de identificación bioquímicas mostradas en la Figura 3.14. Se muestra que en el tubo correspondiente a TSI no hubo un viraje del color rojo a amarillo, registrándose como K/K, no fermentador, así mismo no se evidencia la formación de gas. Para el tubo de LIA (segundo tubo) no hubo variación en el color morado, indicando por ello la descarboxilación de la lisina, registrándose como K/K no fermentador. En el ensayo de medio agar úrea fue positivo, observándose un cambio de color de amarillo a rosado, indicando la degradación úrea. El tubo de agar citrato Simmons (cuarto tubo), mostró un viraje de color verde a un color azul, indicando que el citrato presente fue empleado como fuente de carbono por el microorganismo. Finalmente en el tubo de medio SIM (quinto tubo), la movilidad fue positiva y el indol fue negativo.

Adicionalmente se realizó la prueba de la oxidasa, resultando positivo debido a la formación de una coloración azul morada, tal y como se observa en la Figura 3.14-A. Todos estos resultados antes mencionados fueron comparados con las tablas mostradas en el Anexo 8 y 9, para la identificación de enterobacterias, lográndose confirmar de esta manera que la cepa aislada correspondió efectivamente a *Pseudomona sp.* La identificación y confirmación de la especie *aeruginosa* requiere una prueba molecular adicional, no realizada en el presente trabajo de investigación por motivos económicos.

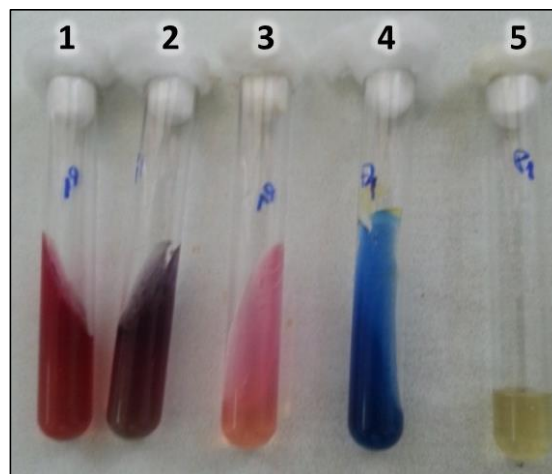


Figura 3.14 Pruebas de identificación bioquímicas para *Pseudomona aeruginosa*. 1) TSI, 2) LIA, 3) Medio agar Urea, 4) Agar Citrato Simmons y 5) Medio SIM.



Figura 3.14-A Prueba de la oxidasa para *Pseudomona aeruginosa*.

Adicionalmente se realizó la prueba de la oxidasa, resultando positivo debido a la formación de una coloración azul morada, tal y como se observa en la Figura 3.14-A. Todos estos resultados antes mencionados fueron comparados con las tablas mostradas en el Anexo 8 y 9, para la identificación de enterobacterias, lográndose confirmar de esta manera que la cepa aislada correspondió efectivamente a *Pseudomona sp.* La identificación y confirmación de la especie *aeruginosa* requiere una prueba molecular adicional, no realizada en el presente trabajo de investigación por motivos económicos.

c) **Aislamiento e identificación de *Staphylococcus aureus***

Para el aislamiento e identificación de las cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*, se empleó el medio de cultivo Manitol salado (Figura 3.15) y las pruebas de identificación bioquímicas Catalasa y Coagulasa (Figura 3.16), como se muestra a continuación:



Figura 3.15 *Staphylococcus aureus* en medio de cultivo manitol salado.

Como se observa en la Figura 3.15, *Staphylococcus aureus* presenta colonias de color dorado característico de *Staphylococcus*, tal y como señala Macfadin (2007) para las pruebas de identificación bioquímicas usadas en la identificación de bacterias de importancia clínica, así mismo, en la Figura 3.16, se muestra la prueba

de la catalasa, positiva, por la formación de burbujas y a la derecha la prueba de la coagulasa, también positiva, por la formación de coágulos.

Tal y como lo señala Pahissa (2009), las bacterias del género *Staphylococcus*, son positivas a la catalasa, y permite diferenciar de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus*; y son coagulasa positivos, ya que un *Staphylococcus* negativo a la coagulasa producen colonias de color rojo (por ejemplo, *Staphylococcus epidermidis*) y no producen cambios de color en el indicador rojo fenol.

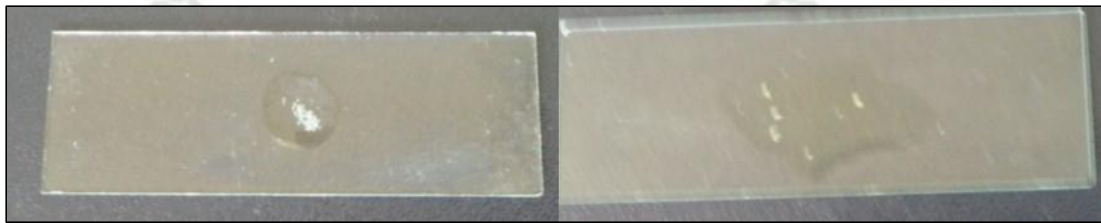


Figura 3.16 Prueba de catalasa (izquierda) y prueba de coagulasa (derecha).

3.5.3 Prueba de sensibilidad antimicrobiana

Para evaluar actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *Schinus molle L.* (molle), se utilizó el método de difusión por excavación placa cultivo como se indica en el método 2.3.6.3.1, usando los aceites esenciales a una concentración del 100%, con la finalidad de verificar si se cumple el diámetro mínimo para que dichas bacterias se consideren como sensibles.

3.5.3.1 Prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de difusión por excavación placa cultivo

3.5.3.1.1 Método difusión por excavación placa cultivo usando aceite esencial de *Schinus molle L.* Arequipa

La prueba de sensibilidad por difusión por excavación placa cultivo se realizó tal y como se señala en el apartado 2.3.6.3.1, registrando el diámetro, en milímetros, de los halos de inhibición mostrados (Figura 3.17) para *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas sp.* y *S. aureus*.

En la Tabla 3.13 se registran los tamaños, en milímetros del halo de inhibición, para cada microorganismo, registrándose para *Klebsiella* un promedio de 11.33 ± 1.0839 , una desviación estándar de 1.0328, y un sesgo estandarizado de -0.968246; en lo concerniente a *Pseudomona aeruginosa* se registró un promedio de 5.00 y una desviación estándar de 0.00; finalmente para *Staphylococcus aureus* el promedio, la desviación estándar y el sesgo estandarizado fueron 16.5 ± 0.88 , 0.8366 y -1.53672 respectivamente.

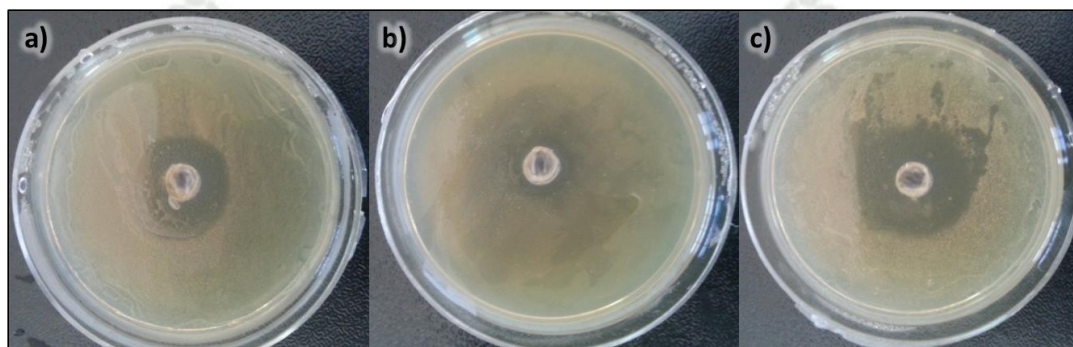


Figura 3.17 Halo de inhibición del aceite esencial *Schinus molle L.* (molle) de Arequipa en medio de cultivo Agar Müller-Hinton. a) *Klebsiella Pneumoniae*, b) *Pseudomona aeruginosa* y c) *Staphylococcus aureus*

Tabla 3.13 Halos de inhibición para *Klebsiella sp.*, *Pseudomona sp.* y *S. aureus*, en presencia del aceite esencial de *Schinus molle L.* (molle) de la localidad de Arequipa.

Cepa	TAMANO DE HALO DE INHIBICIÓN (mm)		
	<i>Klebsiella sp</i>	<i>Pseudomona sp</i>	<i>S. aureus</i>
1	12	5	17
2	12	5	17
3	12	5	15
4	12	5	17
5	10	5	16
6	10	5	17
Promedio	11.33 ± 1.0839^a	5.00^b	16.5 ± 0.88^c
Desviación estándar	1.0328	0.00	0.8366
Sesgo estandarizado	-0.968246	-	-1.53672

Fuente: Statgraphics Centurión XVI

Adicionalmente se puede observar que los valores de sesgo estandarizado se encuentran dentro de los límites de -2 y 2 correspondientes a una distribución normal, por lo cual las subsiguientes pruebas corresponderán a estadística paramétrica.

Gráficamente se pudo observar que los halos de inhibición encontrados para los tres microorganismos fueron diferentes entre sí, (Figura 3.18) siendo por ello necesario realizar pruebas estadísticas adicionales.

La prueba de Levene's reportó un valor-P de 0.321137 indicando la igualdad de varianzas entre los halos encontrados para *Klebsiella sp.*, *Pseudomona sp* y *Staphylococcus aureus*. Con dicha afirmación se procedió a realizar el análisis de varianza (ANOVA), identificando que la respuesta entre los halos para cada microorganismo fue diferente ($p < 0.05$) tal y como se señala en la Tabla 3.14.

Adicionalmente la prueba de múltiples rangos de Tukey, reportó que los tres grupos fueron diferentes, tal y como se señala en la Tabla 3.13.

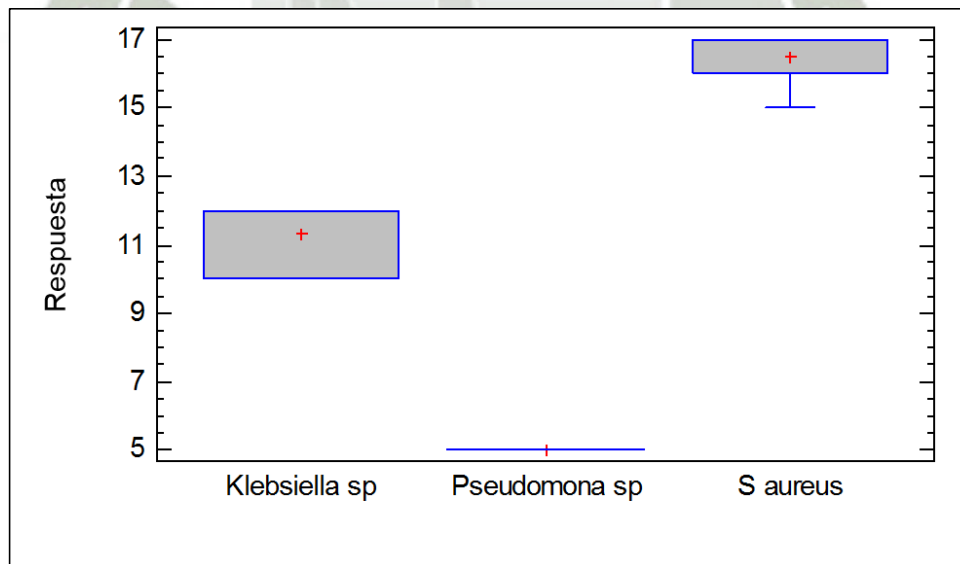


Figura 3.18 Gráfica de caja y bigotes para el halo de inhibición en *Klebsiella sp.*, *Pseudomona sp.* y *S. aureus* con el aceite esencial *Schinus molle L.* (molle) de Arequipa

Tabla 3.14 ANOVA para halos de inhibición de aceite esencial de *Schinus molle* L. (molle) de la localidad de Arequipa frente a *Klebsiella* sp, *Pseudomona* sp. y *S. aureus*.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	398.111	2	199.056	338.02	0.0000
Intra grupos	8.83333	15	0.588889		
Total (Corr.)	406.944	17			

Fuente: Statgraphics Centurión XVI

Por otro lado, tomando los criterios del *Clinical and Laboratory Standards Institue*, se transformó los datos de tamaño de halo de inhibición en función de la respuesta al aceite esencial, registrando como Sensible (S) cuando presentan halos de inhibición ≥ 20 , Intermedio (I) cuando presentan halos de inhibición entre $> 12 - 19$ y Resistente (R) cuando presenta halos de inhibición ≤ 12 . En la Tabla 3.15 se puede observar como para *Klebsiella* sp y *Pseudomona* sp. la totalidad de las cepas son resistentes (100.0%), a diferencia de *S. aureus* que fue un 100.0% de respuesta intermedia frente al aceite esencial de *Schinus molle* L. (molle) de la localidad de Arequipa. (Shaffer, 1995)

Tabla 3.15 Respuesta del aceite esencial de *Schinus molle* L. (molle) de la localidad de Arequipa sobre los microorganismos estudiados.

RESPUESTA	Microorganismo			Total
	<i>Klebsiella</i> sp	<i>Pseudomona</i> sp.	<i>S. aureus</i>	
Recuento	0	0	6	6
Intermedio % dentro de Microorganismo	0.0%	0.0%	100,0%	33.3%
Recuento	6	6	0	12
Resistente % dentro de Microorganismo	100.0%	100.0%	0.0%	66.7%
Recuento	6	6	6	18
Total % dentro de Microorganismo	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Fuente: Software SPSS Statistics 21.

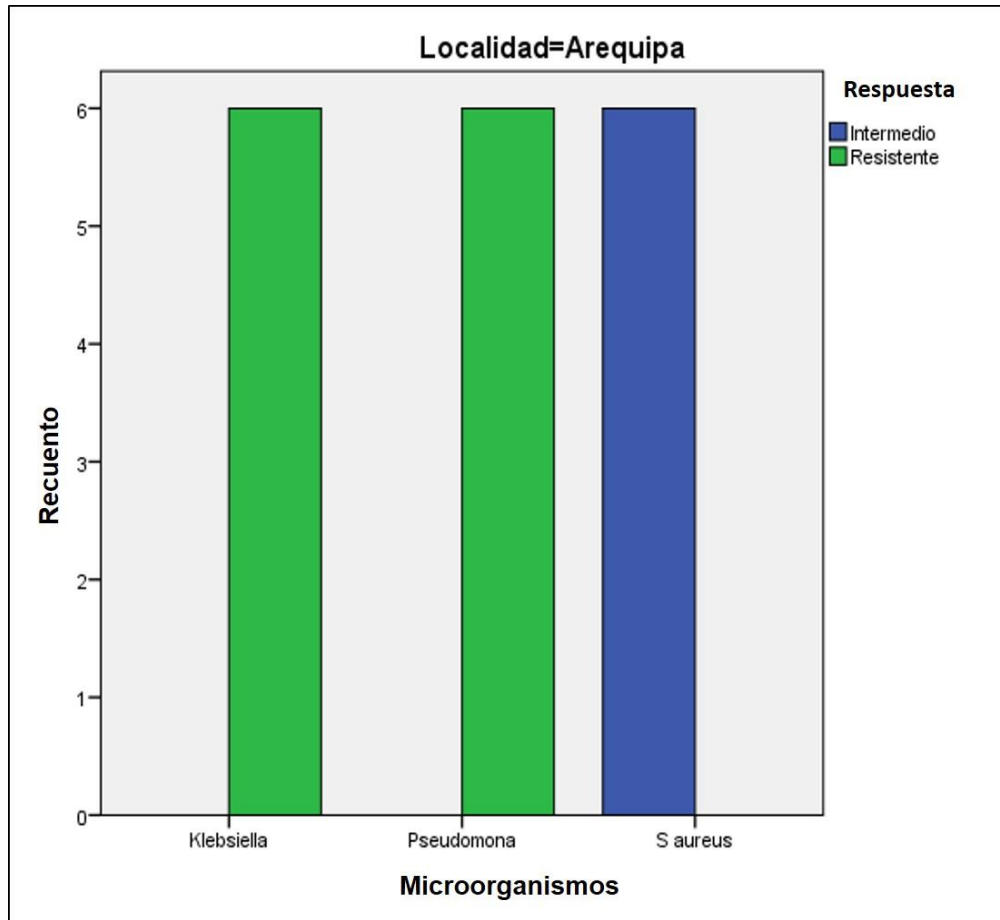


Figura 3.19 Respuesta de los microorganismos *Klebsiella sp*, *Pseudomona sp* y *S. aureus* frente al aceite esencial de *Schinus molle L.* (molle) de Arequipa.

Fuente: Software SPSS Statistics 21

Se puede decir por tanto que *Klebsiella sp.* y *Pseudomona sp.* son resistentes frente al aceite esencial de *Schinus molle L.* (molle) de la localidad de Arequipa, y que *S. aureus* presenta una respuesta intermedia, tal y como se observa en la Figura 3.19. Así mismo, el estadístico chi-cuadrado, reportó un valor-P menor a 0.05, confirmando la no homogeneidad de respuestas entre los tres microorganismos evaluados: *Klebsiella sp*, *Pseudomona sp* y *S. aureus*.

Los resultados aquí mostrados, son acordes a lo reportado por De Mendoza-Rocha (2012), el cual afirma que el aceite esencial de molle tiene un efecto potente contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y moderado a débil contra *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853.

Tabla 3.16 Chi-cuadrado de homogeneidad para la respuesta del aceite esencial de *Schinus molle* L. (molle) de la localidad de Arequipa sobre los microorganismos estudiados.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	18,000 ^c	2	,000
Razón de verosimilitudes	22,915	2	,000
N de casos válidos	18		

a. 0 casillas (0,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 6,33.

Fuente: Software SPSS Statistics 21.

3.5.3.1.2 Método difusión por excavación placa cultivo usando aceite esencial de *Schinus molle* L. de Moquegua

Para verificar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Schinus molle* L. (molle) de la localidad de Moquegua, se siguió la metodología detallada en el apartado 2.3.6.3.1, registrando el diámetro en milímetros (Tabla 3.17), de los halos de inhibición mostrados (Figura 3.20) para *Klebsiella* sp., *Pseudomona* sp y *S. aureus*.

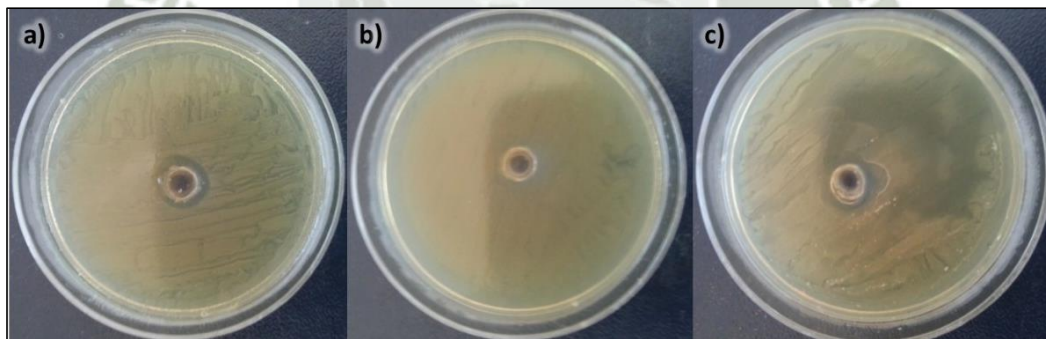


Figura 3.20 Halo de inhibición del aceite esencial *Schinus molle* L. (molle) de Moquegua en medio de cultivo Agar Müller-Hinton. a) *Klebsiella pneumoniae*, b) *Pseudomona aeruginosa* y c) *Staphylococcus aureus*

Tabla 3.17 Halos de inhibición para *Klebsiella sp.*, *Pseudomona sp.* y *S. aureus*, en presencia del aceite esencial de *Schinus molle L.* (molle) de la localidad de Moquegua.

TAMANO DE HALO DE INHIBICIÓN (mm)			
Repeticón	<i>Klebsiella sp</i>	<i>Pseudomona sp</i>	<i>S. aureus</i>
1	7	5	7
2	7	5	9
3	7	5	9
4	7	5	7
5	7	5	7
6	7	5	7
Promedio	7.00 ^b	5.00 ^a	7.67+/- 1.0836 ^b
Desviación estándar	0.00	0.00	1.0328
Sesgo estandarizado	-	-	0.968246

Fuente: Statgraphics Centurión XVI

En la tabla 3.17 se registran los tamaños, en milímetros del halo de inhibición, para cada microorganismo, observándose para *Klebsiella pneumoniae* un promedio de 7.00, una desviación estándar de 0.00.

En lo concerniente a *Pseudomona aeruginosa* se registró un promedio de 0.00 y una desviación estándar de 0.000; finalmente para *Staphylococcus aureus* el promedio, la desviación estándar y el sesgo estandarizado fueron 7.333+/- 0.856863, 0.816497 y 2.44949 respectivamente. Se puede ver además que los promedios son similares entre *Klebsiella sp.* y *Staphylococcus aureus*, siendo necesario por ello, realizar un análisis de varianza con el fin de confirmar la existencia de diferencia estadísticamente significativa entre dichas cepas.

Teniendo en cuenta dicha aseveración, se realizó el análisis de varianza respectivo (Tabla 3.18), el cual mostró un valor-P menor a 0.05, indicando que existe diferencia entre los halos obtenidos para cada microorganismo. Por ello, la prueba de múltiples rangos de Tukey HSD, permitió identificar que, los halos encontrados en *Klebsiella sp.* y *S. aureus*, son similares, y que difieren de los halos encontrado en *Pseudomona sp.* (Tabla 3.17)

Tabla 3.18 ANOVA para halos de inhibición de aceite esencial de *Schinus molle* L. (molle) de la localidad de Moquegua frente a *Klebsiella*, *Pseudomona* y *S. aureus*.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	23.1111	2	11.5556	32.50	0.0000
Intra grupos	5.33333	15	0.355556		
Total (Corr.)	28.4444	17			

Fuente: Statgraphics Centurión XVI

De igual manera al procedimiento realizado para el análisis estadístico para el aceite esencial de *Schinus molle* L. (molle), en la localidad de Arequipa, se tomaron los criterios del *Clinical and Laboratory Standards Institute*, para transformar los datos de tamaño de halo de inhibición en función de la respuesta al aceite esencial, registrando como Sensible (S) cuando presentan halos de inhibición ≥ 20 , Intermedio (I) cuando presentan halos de inhibición entre $>12 - 19$ y Resistente (R) cuando presenta halos de inhibición ≤ 12 , resumidos en la Tabla 3.19.

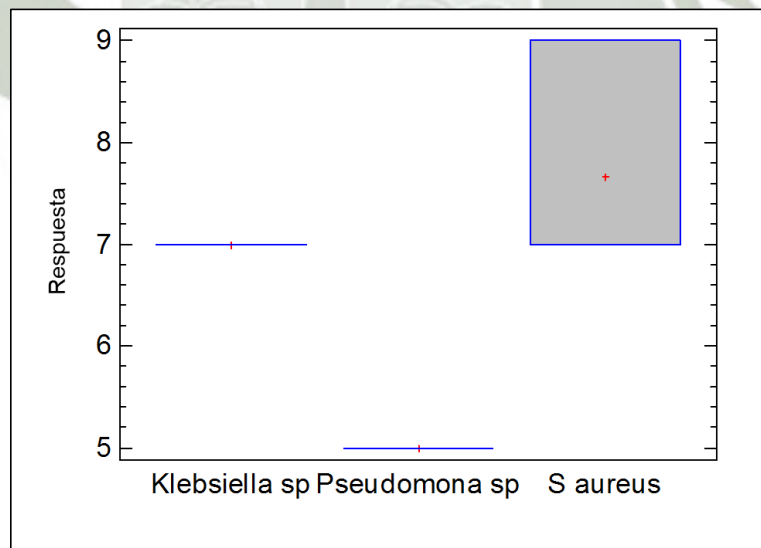


Figura 3.21 Gráfica de caja y bigotes para el halo de inhibición en *Klebsiella sp.*, *Pseudomona sp.* y *S. aureus* con el aceite esencial *Schinus molle* L. (molle) de Moquegua

Tabla 3.19 Respuesta del aceite esencial de *Schinus molle L.* (molle) de la localidad de Moquegua sobre los microorganismos estudiados.

RESPUESTA	Microorganismo			Total	
	<i>Klebsiella sp</i>	<i>Pseudomona sp.</i>	<i>S. aureus</i>		
Resistente	Recuento	6	6	6	18
	% dentro de Microorganismo	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
Total	Recuento	6	6	6	18
	% dentro de Microorganismo	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Fuente: Software SPSS Statistics 21.

Gráficamente se pudo observar que los halos de inhibición encontrados para los tres microorganismos fueron diferentes entre sí, (Figura 3.21) siendo por ello necesario realizar pruebas estadísticas adicionales.

Se puede observar, que para los tres microorganismos, *Klebsiella sp.*, *Pseudomona sp.* y *S. aureus*, la totalidad de los casos presenta una respuesta resistente correspondiente al 100% del total estudiado para el aceite esencial de *Schinus molle L.* (molle) de la localidad de Moquegua. Debido a que solo se registró una respuesta (resistencia) no se procedió con el test Chi-cuadrado.

Por lo tanto se puede afirmar que el aceite esencial de *Schinus molle L.* (molle), de la localidad de Moquegua, no presenta actividad antimicrobiana frente a los microorganismos *Klebsiella sp.*, *Pseudomona sp.* y *S. aureus*; esto es debido probablemente al bajo contenido de beta mirceno, ya que su porcentaje de área registrado fue de 19.56 a comparación de la localidad de Arequipa, cuyo porcentaje registrado fue de 31.59, y como afirma Guerra M. (2004) el beta mirceno ayuda a potenciar el efecto de los demás componentes antimicrobianos.

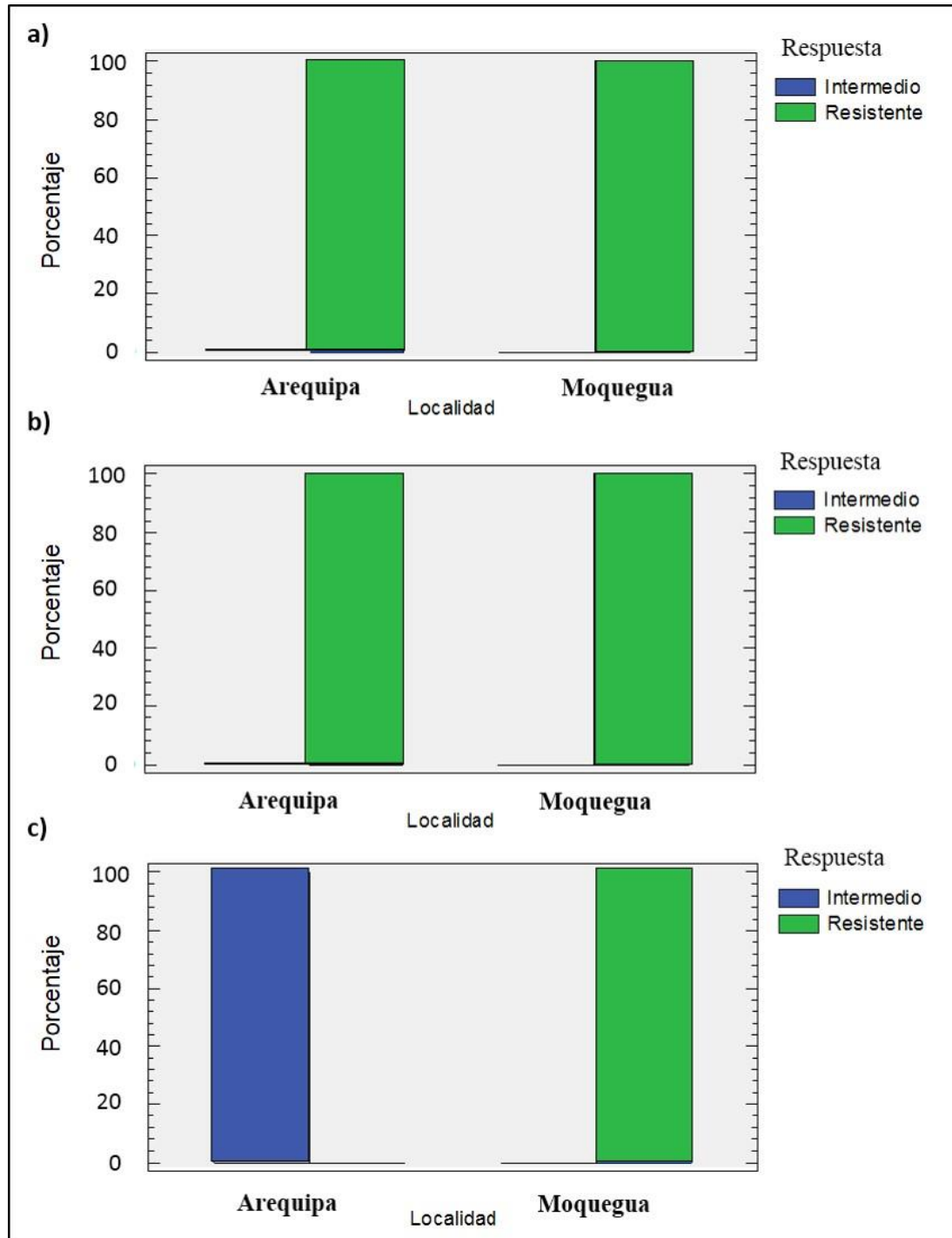


Figura 3.22 Gráfico de barras para la respuesta de cada microorganismo estudiado frente al aceite esencial de *Schinus molle L.* (molle) de la localidad de Arequipa y Moquegua. a) *Klebsiella Pneumoniae*, b) *Pseudomona aeruginosa* y c) *Staphylococcus aureus*

Finalmente se buscó identificar si, la localidad de la cual fue extraída el material vegetal *Schinus molle* L. (molle), afectaba a su respuesta sobre cada microorganismo (Figura 3.22), realizando para ello una prueba chi-cuadrado de independencia, mostrando los valores-P obtenidos en la Tabla 3.20. Con dicha prueba se pudo concluir que en el caso de *S. aureus* se puede afirmar que la localidad de la cual fue extraído el material vegetal tiene relación con la respuesta obtenida, observándose que cuando se emplea aceite esencia de *Schinus molle* L. (molle) de la localidad de Arequipa se obtiene una respuesta intermedia por parte del microorganismo, pero si se emplea el aceite esencia de *Schinus molle* L. (molle) de la localidad de Moquegua, el microorganismo será resistente.

Tabla 3.20 Chi-cuadrado de independencia para la respuesta de los microorganismos estudiados frente al aceite esencial de *Schinus molle* L. (molle) de la localidad de Arequipa y Moquegua.

Microorganismo	Prueba Chi-cuadrado
<i>Klebsiella</i> sp.	*
<i>Pseudomonas</i> sp.	*
<i>S. aureus</i>	0.0000

Fuente: Statgraphics Centurión XVI

Es importante señalar además, que no se realizó la prueba de chi-cuadrado de independencia para *Klebsiella* y *Pseudomonas* sp., puesto que para ambas localidades el microorganismo fue resistente.

Al igual que lo aquí reportado, Martínez J. (2003) señala que el aceite esencial de mandarina presenta un buen efecto antimicrobiano contra bacterias gram positivas como *S. aureus* ATCC 259923 y *B. subtilis*, *L. monocytogenes* para concentraciones mayores al 1%, mientras que *P. aeruginosa*, *E. coli*, *P. mirabilis* y *K. pneumoniae*, todas estas gram negativas, no resultaron inhibidas por el aceite esencial de mandarina. Según De Mendonça-Rocha (2012), el aceite esencial de *Schinus molle*, presenta un potente efecto antimicrobiano contra bacterias gram positivas.

Así mismo, Sánchez (2012) afirma que el aceite esencial de *Aloysia tripilla* tiende a formar mayores halos de inhibición para microorganismos gram positivos como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* para volúmenes de aceite esencial mayores a 30 μ l, mientras que *Salmonella thypimurium* y *Pseudomona aeruginosa* no resultan inhibidas por el aceite esencial de *Aloysia tripilla*, por lo cual podemos decir que la mayoría aceites esenciales presentan mayor actividad antimicrobiana contra bacterias gram positivas que contra las bacterias gram negativas. Esta resistencia probablemente se deba, según Ingraham (1988), a que a que las membranas externas de las bacterias gram negativas son impermeables a muchas drogas incluidas la mayoría de penicilinas.

Adicionalmente, estudios realizados por Molinari (2013) señalan que el aceite esencial de (molle) obtenidos de hojas secas, tiene actividad antibiótica, incluida actividad antimicrobiana contra *E. coli*, con lo cual se puede decir que el aceite esencial de molle también tiene actividad antimicrobiana frente algunos microorganismos Gram negativos.

3.5.3.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria por microdilución.

Debido a que sólo *S. aureus*, presentó una respuesta de inhibición intermedia, cuando se empleó aceite esencia de *Schinus molle L.* (molle) de la localidad de Arequipa, es que fue seleccionado para el ensayo de determinación mínima inhibitoria por microdilución, realizado según la metodología descrita en el apartado 2.3.6.3.2, con una placa para microdiluciones empleado seis cepas de *S. aureus* en presencia de diluciones de 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.12%, 1.56%, 0.78% y 0.39% del aceite esencial mencionado, tal y como se muestra en la Figura 3.23, en la cual, las 6 primeras filas corresponden a muestras de *Staphylococcus aureus*(filas inferiores) y las dos últimas(filas superiores) corresponde a los controles positivos y negativos, identificando que los pozos en los cuales se realizó la mezcla aceite esencial con caldo BHI se forma una solución media lechosa, sin embargo esto no afectó la determinación de la concentración mínima inhibitoria.



Figura 3.23 Placa de microdilución preparada antes de la incubación con 8 diluciones (50%,25%, 12.5%, 6.25%, 3.12%, 1.56%, 0.78% y 0.39%).

Tabla 3.21 Respuesta de las cepas de *S. aureus*. en presencia de distintas diluciones del aceite esencial de *Schinus molle L.* (molle) de la localidad de Arequipa

Muestra	Microdiluciones							
	50.00%	25.00%	12.50%	6.25%	3.12%	1.56%	0.78%	0.39%
A1	-	-	-	-	-	+	+	+
A2	-	-	-	-	-	+	+	+
A3	-	-	-	-	-	-	-	+
A4	-	-	-	-	-	+	+	+
A5	-	-	-	-	+	+	+	+
A6	-	-	-	-	+	+	+	+

Dónde: - : ausencia de crecimiento, +: presencia de crecimiento

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 3.21, se puede identificar la respuesta de cada cepa de *S. aureus*, frente a las diluciones empleadas, registrándose como signo negativo en aquellos pozos en los cuales no se evidencio crecimiento, y con signo positivo aquellas en las que si hubo crecimiento.

Así mismo, los resultados obtenidos fueron confirmados mediante la siembra en placas, observándose que el crecimiento positivo de *Staphylococcus* presenta un color dorado según Macnair.(1998).En la Figura 3.24, se observa que en la cepa 1, la concentración mínima inhibitoria correspondió a la dilución 5 es decir hasta el 3.12%, en la cepa 2 fue igualmente la dilución de 3.12%, en la cepa 3 fue hasta la dilución 0.78% , en la cepa 4 fue hasta la dilución 3.12 %, en la cepa 5 la concentración

mínima inhibitoria fue hasta la cuarta dilución 4 es decir hasta el 6.25% y finalmente en la cepa 6 la concentración mínima inhibitoria fue hasta la dilución 6.25%. Los controles positivo y negativo son mostrados en la Figura 3.25.

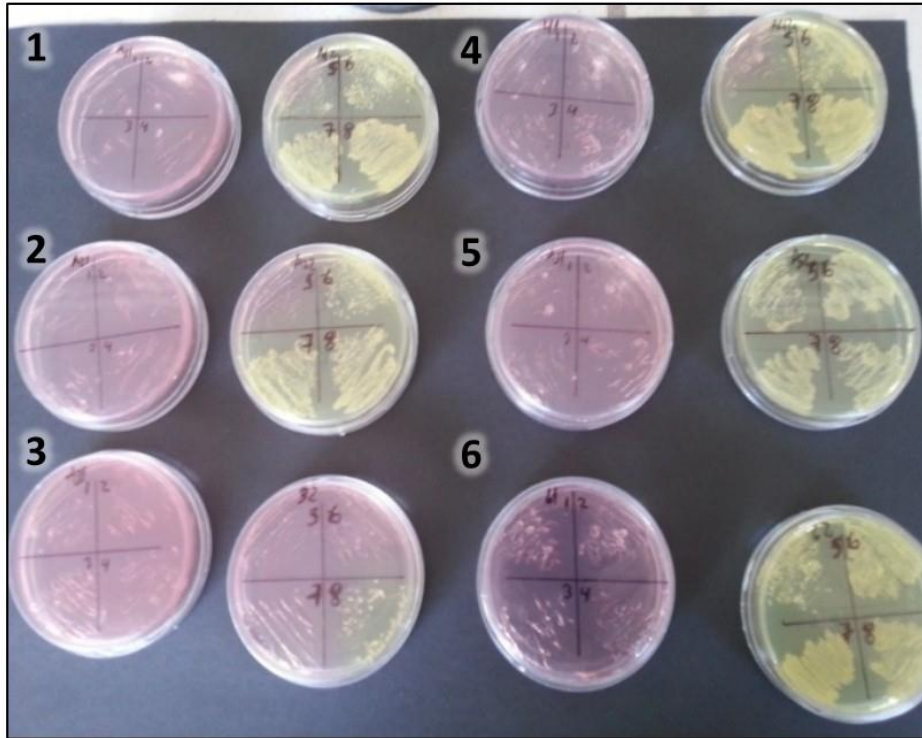


Figura 3.24 Placas Petri con medios de cultivo Manitol salado para muestras de *Staphylococcus aureus*. Los números mostrados corresponden a cada cepa de *S. aureus*

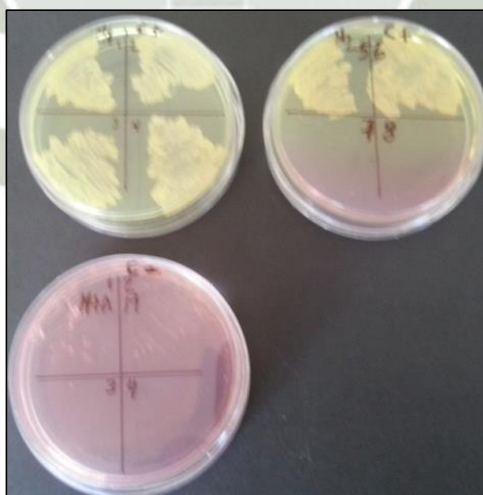


Figura 3.25 Placas Petri con medios de cultivo Manitol salado para controles positivos y negativos.

En la Tabla 3.22, se muestra el número de cepas que presentaron un crecimiento negativo o positivo según cada porcentaje de dilución, observándose que para la dilución correspondiente al 0.39% del aceite esencial de la localidad de Arequipa, el

Tabla 3.22 Recuento del crecimiento de cepas de *S. aureus*. en presencia de distintas diluciones del aceite esencial de *Schinus molle* L. (molle) de la localidad de Arequipa

CONCENTRACIÓN	CRECIMIENTO		TOTAL
	Negativo	Positivo	
0.39% Recuento	0	6	6
% dentro de Concentración	0,0%	100,0%	100,0%
0.78% Recuento	1	5	6
% dentro de Concentración	16,7%	83,3%	100,0%
1.56% Recuento	1	5	6
% dentro de Concentración	16,7%	83,3%	100,0%
3.12% Recuento	4	2	6
% dentro de Concentración	66,7%	33,3%	100,0%
6.25% Recuento	6	0	6
% dentro de Concentración	100,0%	0,0%	100,0%
12.50% Recuento	6	0	6
% dentro de Concentración	100,0%	0,0%	100,0%
25.00% Recuento	6	0	6
% dentro de Concentración	100,0%	0,0%	100,0%
50.00% Recuento	6	0	6
% dentro de Concentración	100,0%	0,0%	100,0%
Total Recuento	30	18	48
% dentro de Concentración	62,5%	37,5%	100,0%

Fuente: Software SPSS Statistics 21.

100% presentó crecimiento, disminuyendo conforme se incrementaba el porcentaje de dilución, hasta que al alcanzar un 100% de inhibición a partir de la dilución correspondiente a 6.25% en adelante.

A partir de los porcentajes mostrados para crecimiento negativo, interpretado como porcentaje de inhibición, se buscó identificar la concentración inhibitoria mínima del 50% de las cepas (CBM₅₀), (Marcelo, Claudia, & Valeria, 2004), realizando para ello una regresión con un modelo de logarítmico de la dilución del aceite esencial empleado (como una solución expresada en porcentaje) versus el % de inhibición; encontrándose el siguiente modelo matemático mostrado en la ecuación 3.1, con un coeficiente de correlación de 0.9211.

$$\% \text{ de inhibición} = 26.8041 + 24.0351 * \ln (\% \text{ Dilución}) \quad (\text{Ecuación 3.1})$$

Con dicha ecuación se puede calcular la dilución, en porcentaje, del aceite esencial que permitía obtener un porcentaje de inhibición del 50%, es decir evitar el crecimiento de la mitad de las cepas evaluadas, tal y como se muestra en la Figura 3.26, encontrándose para tal objetivo que la CBM₅₀ fue de 2.7 %.

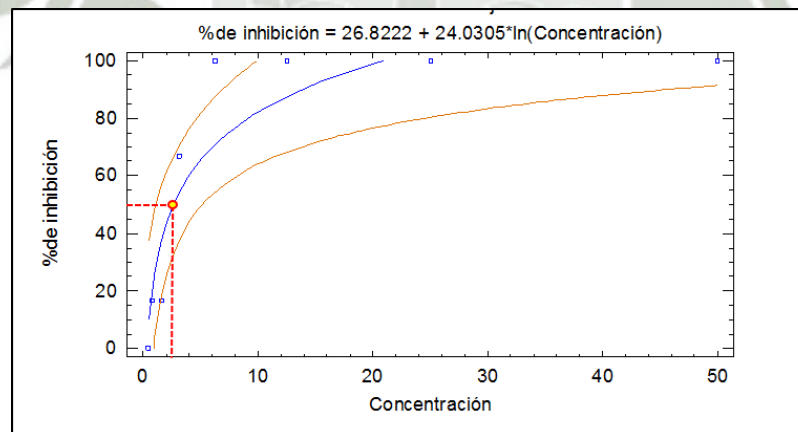


Figura 3.26 Grafica del modelo ajustado del porcentaje de inhibición para *S. aureus*, frente a diferentes diluciones del aceite esencial de *Schinus molle L.* de la localidad de Arequipa. Fuente: Statgraphics Centurión XVI

CAPITULO IV

CONCLUSIONES

PRIMERA

Se obtuvieron aceites esenciales de Arequipa y Moquegua, con un rendimiento de 2.04% y 1.18% respectivamente.

SEGUNDA

El aceite esencial de Arequipa presentó una densidad de 0.84 y un índice de refracción de 1.47 usando frutos frescos de molle. Por su parte el aceite esencial de Moquegua, presentó una densidad de 0.83 y un índice de refracción de 1.47.

TERCERA

Al realizar el análisis usando un cromatógrafo de gases acoplado a un espectro de masas, comparando las corridas con la librería NIST, muestran que ambos aceites presentan como componentes mayoritarios α -Pineno, β -Pineno, β -Mirceno, α -Felandreno y Silvestreno, solamente que la diferencia radica en los porcentajes de área, es decir el aceite esencial de Arequipa presenta α -Pineno (21.41%), β -Pineno (23.13%), β -Mirceno (31.59%), α -Felandreno (16.85%) y Silvestreno (7.03%) , mientras que el aceite esencial de Moquegua presenta α -Pineno (20.64%), β -Pineno (17.12%), β -Mirceno (19.56%), α -Felandreno (31.00%) y Silvestreno (11.68%). Estas variaciones probablemente se debieron a las condiciones climatológicas a las cuáles estuvieron sometidas los arboles de molle.

CUARTA

Al evaluar la actividad antimicrobiana usando el método de difusión por excavación placa cultivo, se identificó que el aceite esencial de molle de Arequipa presentó efecto antimicrobiano, esto probablemente se deba a la mayor concentración de β -Mirceno. El aceite esencial de molle Arequipa demostró que tiene un efecto contra *Staphylococcus aureus* y sin actividad antimicrobiana frente *Pseudomona aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*. Con estos resultados se concluye que el aceite

esencial de molle de Arequipa presenta un mejor efecto antimicrobiano con bacterias gram positivas.

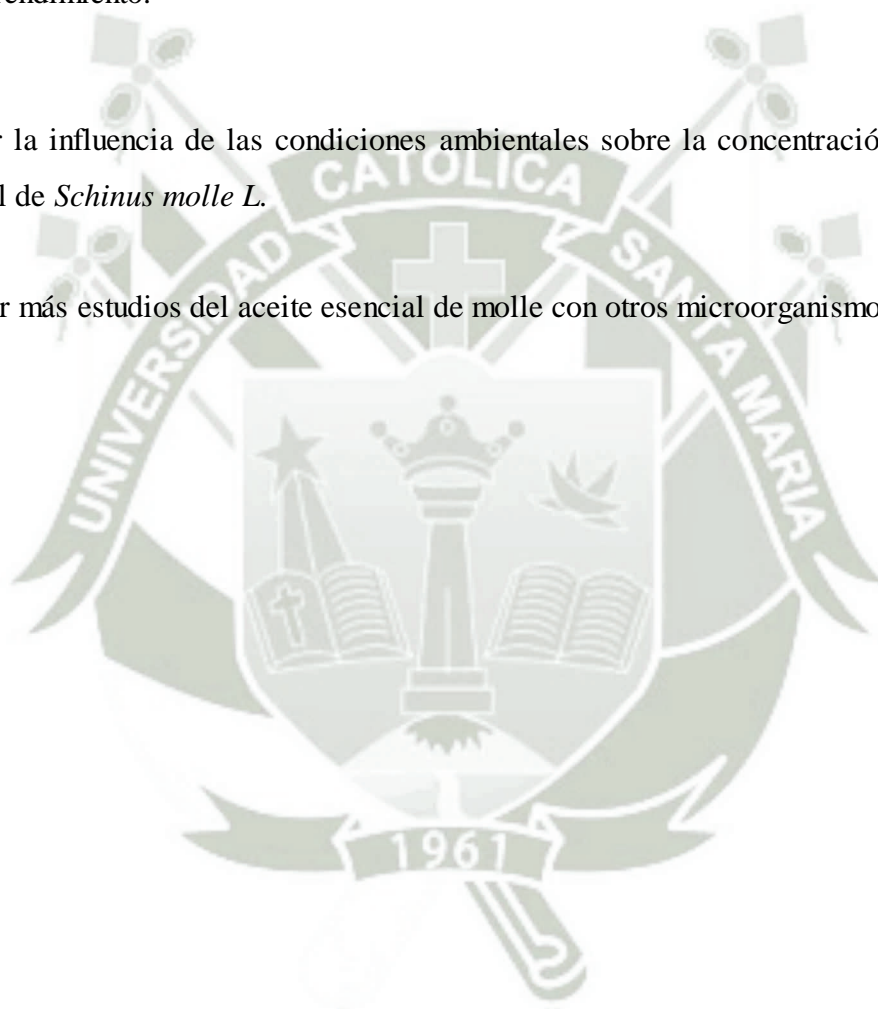
QUINTA

La Concentración Bactericida Mínima (CBM) para el aceite esencial de *Schinus molle* L. (*molle*) de la localidad de Arequipa frente a *Staphylococcus* fue de 6 25%.



RECOMENDACIONES

- 1) Realizar estudios de mercado y prefactibilidad para la producción industrial de aceite esencial de *Schinus molle* L.
- 2) Comparar diferentes métodos de extracción de aceites esenciales para la obtención de un mayor rendimiento.
- 3) Evaluar la influencia de las condiciones ambientales sobre la concentración del aceite esencial de *Schinus molle* L.
- 4) Realizar más estudios del aceite esencial de molle con otros microorganismos.



REFERENCIAS

- Alba, A., Bonilla, P., & Arroyo, J. (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*, 12(1), 29-36.
- Amani, S. (1999). *Antimicrobial activities in some Argentine medicinal plants*. Acta Hort.
- Anderson., G. (2007). *Experimentos de Química Orgánica con enfoque en ciencias de la vida*. Ediciones Elizcom.
- Bague, A. T. (2012). *Tecnología Farmaceutica*. Editorial Club Universitario.
- Bandoni, A. (2000). *Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores*. La Plata: Red de Editoriales Universitarias.
- Bernhard, B., & R., W. (1963). The essential Oil of *Schinus molle*: The terpenhidrocarbon fraction. . *Journal of Food science.*, 28(1), 59-63.
- Bertolazzi, M., Rossato, M., Atti, S. L., & Atti dos Santos, A. (2005). *Presentado en XVII Salão de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande*.
- Casida, J. (1980). Pyrethrum Flowers and Pyrethroid Insecticides. *Enviromental Health Perspectives*, 189-202.
- Chirino M, C., & A., F. (2001). *Actividad insecticida de extractos crudos de drupas de Schinus molle L. (Anacardiaceae) sobre larvas neonatas de Cydia Pomonella L.* Tesis, Universidad Nacional del Sur de Bahía Blanca.
- CLSI, Clinical and Laboratory Standars Institute. (2009). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Nineteenth Informational Supplement, and CLSI document M100-S19*. Wayne, PA, USA.
- CODEINEP., C. d. (2009). *Klebsiella pneumoniae*.

- CONABIO, Comisión nacional para el reconocimiento y uso de la biodiversidad. (1999). Paquetes tecnológicos *Schinus molle*.
- Cruz-Carrillo, A. R. (2010). Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de los extractos de *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* y *Silybum marianum*. *Rev. U.D.CA Act. & Div. Cient.* , 117-124.
- Damian, P. (2005). *Aromaterapia: El olor y la psique: Utilización de los aceites esenciales para el bienestar físico y emocional*.
- De Mendonça Rocha, P. M. (2012). Synergistic Antibacterial Activity of the Essential oil of Aguaribay (*Schinus molle* L.). En *Molecules* (págs. 12023-12036).
- Dean, R. J. (1998). *Extraction Methods for Environmental Analysis*. London: John Wiley & Sons Ltd.
- Dellacasa, E. (2010). *Normalización de Productos Naturales Obtenidos de Especies de la flora Aromática Latinoamérica. Proyecto CYTED*. Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Denny, E. P. (1989). Hidrodistillation of oils from aromatic herbs. *Perfumer & Flavorist*, 57.
- Deveci, O., Sukan, A., Tuzun, N., & Hames, K. E. (2010). Chemical composition, repellent and antimicrobial activity of *Schinus molle* L. . *Journal of Medicinal Plants Research*, 2211-2216.
- Díaz, C., Quesada, S., Brenes, Ó., Aguilar, G., & Cicció, J. (2008). Chemical composition of *Schinus molle* essential oil and its cytotoxic activity on tumor cell lines. . *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, 1521-1534 .
- Eduardo, D. (2010). *Normalización de Productos Naturales Obtenidos de Especies de la flora Aromática Latinoamérica*. Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Brasil, Porto Alegre.

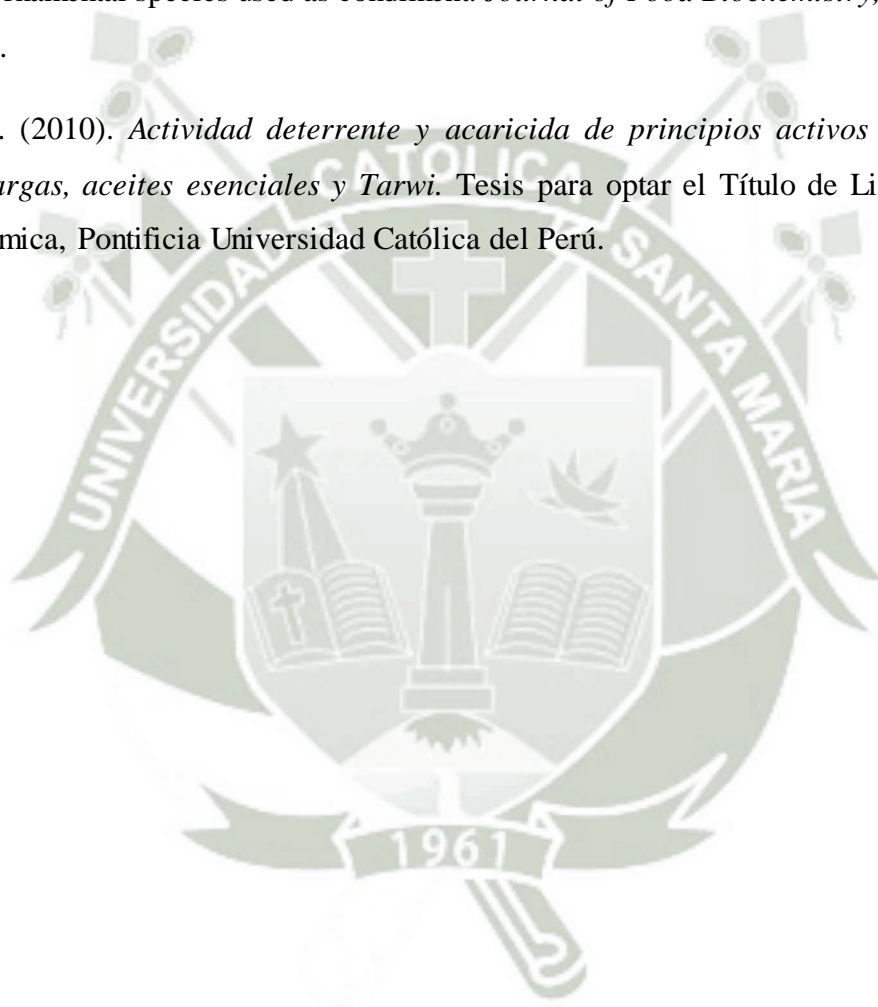
- França, M., Costa, M., Wanderley, Y., Alidianne, X., & Leite, A. (2012). Efeito antimicrobiano do óleo essencial do *Cymbopogon citratus* sobre bactérias formadoras do biofilme dentário. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde* , 553-558.
- García, P. (2009). *Microbiologia Clinica practica* (Segunda ed.). Servicio de Publicaciones de La Universidad de Cadiz España.
- Gende, L. (2008). Antimicrobial activity of *cinnamon* (*Cinnamon zeylanicum*) essential oil and its main components against *Paeni bacillus* larvae from Argentine. *Bulletin of Insectology*, 1-4.
- Güenther, E. (1955). *The essential oils* (Vols. I-IV). New York: Ed. Van Nostrand.
- Guerra, M. (2004). Actividad antimicrobiana del aceite esencial y crema de *Cymbopogon citratus*. *Revista cubana Plant Med* v.9 n.2.
- Ingraham, J. L. (1998). *Introducción a la Microbiología*. (Vol. 2). Barcelona España: Editorial Reverte S.A.
- Jennings, W., & Rapp, A. (1983). *Sample preparation for gas chromatographic analysis*. Heidelberg: Ed. HuethigVerlag.
- Jimenez, C. (2006). *Química, Física para Ingeniero Químicos*. Editorial Universidad politécnica de Valencia.
- Kingston, H., & Jassie, L. (1988). *Introduction to microwave sample preparation, theory and practice*. Washington: ACS.
- Koneman. (2000). *Diagnostico microbiológico* (Sexta ed.). Editorial medica Panamericana.
- Laboratorio de microbiología del C.H.U.A. (2005). *Instrucciones para el correcto transporte y conservación de muestras para diagnostico microbiológico*. Complejo hospitalario Universitario de Albacete.
- Landa, V., & Pastor de Abraham, A. (2005). *Presentación por Perú: III Reunión de Coordinación del Proyecto CYTEDIV.20*. Lisboa, Portugal.

- Linnaeus, C. .. (1953). *Species Plantarum – Tomus I*.
- Loayza, I., & Ríos del Prado, J. (2004). Producción piloto de aceites esenciales de *Eupatorium buniifolium* y *Schinus molle*. *II Reunión de Coordinación del Proyecto CYTEd IV.20*. Bariloche.
- Macfaddin. (2000). *Pruebas Bioquímicas para la identificación de Bacterias de importancias Clínica*. (Tercera ed.). Editorial medica Panamericana.
- Machado, D. G., Bettio, L. E., Cunha, M. P., Santos, A. R., Pizzolatti, M., & Brighente, I. M. (2008). Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from *Schinus molle* L. in mice: Evidence for the involvement of the serotonergic and noranadrenergic systems. *European Journal of Pharmacology*, 163–168.
- Machado, D. G., Kaster, M. P., Binfaré, R. W., Dias, M., Santos, A. R., & Pizzolatti, M. G. (2007). Antidepressant-like effect of the extract from leaves of *Schinus molle* L. in mice: Evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 421–428.
- Marcelo, R. S., Claudia, D. T., & Valeria, P. J. (2004). Programa de Microbiología y Micología, Instituto de Ciencias Biomédicas y Micología, Instituto de Ciencias Biomédicas. *Rev Méd Chile*, 132, 1211-1216.
- Margarito, R. (2012). Procedimiento para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas. En *Proyecto Sagarpa-CONACYT*. (Primera ed.).
- Martinez, J. (2003). Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina. (U. d. Zulia, Ed.) *Revista de la Facultad de Agronomía*, 20(4).
- Matsuo, A., C. F., Arruda D., P. F., Borin J., M. M., L., T., P., S., & J., L. (29 de Julio de 2012). α -Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius Raddi* (Anacardiceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 411(2), 449-454.
- McNair, H., & Miller, J. (1998). *Basic Gas Chromatography*. New York: A Wiley Interscience Publication.

- MINSA. (2013). Boletín Epidemiológico (Lima)- semana epidemiológica N°35, del 25 al 31 de Agosto de 2013. En M. D. SALUD.
- Molinari, N. E. (2013). *Potencial biocida de los aceites esenciales extraídos de las hojas de Schinus molle L. 1753 (Anacardiaceae)*. Trabajo final del curso de Fotoquímica., Universidad nacional Agraria la Molina.
- Muñoz, F. (1987). *Plantas medicinales y aromáticas. Estudio, cultivo y procesado*. Madrid: Ed. Mundi Prensa.
- Ortuño, M. (2006). *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes*. (Primera edición ed.).
- Ottolino, G. (1948). Schinus molle's essential oil. *Accad. Pugiese sci*, 49-51.
- Pahissa, A. (2009). *Infecciones producidas por Staphylococcus aureus*. Editorial Marge.
- Paré, J. (1992). *Europa Patente n° 0485668A1*.
- Prats, G. (2005). *Microbiología Clínica*. Editorial medica Panamericana.
- Remington. (2000). *Farmacología* (Segunda ed.). Editorial Medica Panamericana.
- Romero, C. R. (2007). *Microbiología y Parasitología Humana* (Tercera ed.). Editorial medica Panamericana.
- Rossini, C., Menéndez, P., Dellacassa, E., & Moyna, P. (1996). Essential oils from leaves of *Schinus molle* and *S. lentisci folius* of Uruguayan Origin. *J. Essent. Oil Res.*, 8, 71-73.
- Royyo, A. (1 de 12 de 2013). *Ecoagricultor*. Obtenido de Fitoterapia: cómo recolectar, secar, almacenar y usar plantas medicinales.: <http://www.ecoagricultor.com/>
- Rubinson, K., & Rubinson, J. (2000). *Análisis instrumental*. Madrid: Prentice Hall.
- Salazar, R. (2001). Manejo de semillas de 75 especies forestales de América Latina.

- Sanchez, J. C. (2012). *Estudio del efecto antimicrobiano del aceite esencial de Aloysia tripylla sobre Cepas S. aureus y B. cereus, E. Coli, Salmonella sp, Listeria monocytogenes y Pseudomona aeruginosa*. Colombia.
- Sandra, P., & Bichhi, c. (1987). *Capillary gas chromatographic in essential oil analysis*. Heidelberg: Ed. Huethig Verlag.
- Schreier, P. (1984). *Chromatographic studies of biogenesis of plant volatiles*. Heidelberg: Ed. Hüthig-Verlag.
- Shaffer, J. (1995). Multiple hypothesis testing. *Annual Review of Psychology*, 46, 561-584.
- Sistema Nacional de información forestal de México (2010). *Schinus molle L*
- Skoog, H. C. (2008). *Principios de análisis instrumental*. Mexico: CENGAGE.
- Snyder, L., Kirland, J., & Glajch, J. (1997). *Practical HPLC Method Development*. New York: Ed. Wiley.
- Stashenko, E. E., Jaramillo, B. E., & Martínez, J. R.-v. (2004). *Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of Lippiaalba (Mill) N. E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in-vitro antioxidant activity*. J. Chromato gr. A.
- Velasco-Negueruela, A., & Pérez-Alonso, M. (1995). *Fitoterapia*, 66(5), 447-462.
- Villa, W., M. S., Molina, A., & Viturro, C. (2005). *Propiedades Físicas de Aceites Esenciales de Poblaciones de Schinus Areirade Jujuy. Actas de la I Jornadas de Ciencia y Tecnología de las Facultades de Ingeniería del NOA*. Jujuy.
- Viturro, C. B. (9 de Agosto de 2011). *Normalización de productos naturales obtenidos de especies de la fibra aromática latinoamericana. Problemática Schinus en Latinoamérica. Proyecto CYTED IV.20*.
- Weinberger, V. (2009). *Plan de Negocios*. . Lima: Editorial PUCP.

- Wildwood, C. (2009). Las técnicas y las aplicaciones de la terapia con aceites esenciales para la salud y bienestar. En *Guía fácil de Aromaterapia*. Barcelona: Ediciones Robin Book.
- Yueqin, Z. (2006). *Identificación y actividad farmacológica de principios de especies*. Universidad de Valencia.
- Zahed, N., Hosni, K., & Ben, N. (2011). Essential oil composition of *Schinus molle L.* Fruits: an ornamental species used as condiment. *Journal of Food Biochemistry*, 35(2), 400-408.
- Zegarra, G. (2010). *Actividad deterrente y acaricida de principios activos de quinuas amargas, aceites esenciales y Tarwi*. Tesis para optar el Título de Licenciado en Química, Pontificia Universidad Católica del Perú.



APÉNDICES

APÉNDICE N° 1

ETIQUETAS DE REGISTRO DE LA RECOLECCIÓN DE *SCHINUS MOLLE L.* DE LAS LOCALIDADES DE AREQUIPA Y MOQUEGUA

HERBARIUM AREQUIPENSIS – HUSA
Universidad Nacional de San Agustín – Arequipa

ANACARDIACEAE
Schinus molle

PERU; Dpto. Arequipa; Prov. Arequipa; Dist. Jacobo Dickson
Hunter; Bellavista al costado del Restaurante Chobita. Laderas
húmedas.
S 16°26' 14.5" O 71° 33' 00.2" 2265m
Hierba de 3m de alto. Frutos color morado
N.v: "Molle"
8 - Enero-2013
No. 001

F. Moncada V, V. Quipuscoa S.
4 dupl.
Universidad Nacional de San Agustín (UNSA)

Figura 1. Etiqueta de registro No. 001 de la recolección de *Schinus molle L.* de la localidad de Arequipa.

HERBARIUM AREQUIPENSIS – HUSA
Universidad Nacional de San Agustín – Arequipa

ANACARDIACEAE
Schinus molle

PERU;Dpto. Arequipa; Prov. Arequipa; Dist.Jacobo Dickson
Hunter Bellavista al costado del Restaurante Chobita. Laderas
húmedas.
S 16°26' 15.6" O 71° 32' 58.9" 2272m
Hierba de 3m de alto. Frutos color morado
N.v: "Molle"
8 - Enero-2013
No. 002

F. Moncada V, V. Quipuscoa S.
4 dupl.
Universidad Nacional de San Agustín (UNSA)

Figura 2. Etiqueta de registro No. 002 de la recolección de *Schinus molle* L. de la localidad de Arequipa.

HERBARIUM AREQUIPENSIS – HUSA
Universidad Nacional de San Agustín – Arequipa

ANACARDIACEAE
Schinus molle

PERU;Dpto. Arequipa; Prov. Arequipa; Dist.Jacobo Dickson
Hunter; Bellavista al costado del Restaurante Chobita. Laderas
húmedas.
S 16°26' 15.7" O 71° 32' 56.9" 2266m
Hierba de 3m de alto. Frutos color morado
N.v: "Molle"
8 - Enero-2013
No. 003

F. Moncada V, V. Quipuscoa S.
4 dupl.
Universidad Nacional de San Agustín (UNSA)

Figura 3. Etiqueta de registro No. 003 de la recolección de *Schinus molle* L. de la localidad de Arequipa.

HERBARIUM AREQUIPENSIS – HUSA
Universidad Nacional de San Agustín – Arequipa

ANACARDIACEAE
Schinus molle

PERU;Dpto. Moquegua; Prov. Ilo, Distrito San Jerónimo ; Cerca a la plaza del pueblo de San jerónimo a la altura del cementerio. Laderas húmedas.
S 17°37' 27.1" O 71° 37' 27.5" 8m
Hierba de 3m de alto. Frutos color morado
N.v: "Molle"

20 - Enero-2013
No. 004

F. Moncada V, V. Quipuscoa S.
2 dupl.
Universidad Nacional de San Agustín (UNSA)

Figura 4. Etiqueta de registro No. 004 de la recolección de *Schinus molle* L. de la localidad de Moquegua.

HERBARIUM AREQUIPENSIS – HUSA
Universidad Nacional de San Agustín – Arequipa

ANACARDIACEAE
Schinus molle

PERU;Dpto. Moquegua; Prov. Ilo, Distrito San Jerónimo ; Cerca a la plaza del pueblo de San jerónimo a la altura del cementerio. Laderas húmedas..
S 17°37' 27.0" O 71° 20' 14.4" 10m
Hierba de 3m de alto. Frutos color morado.
N.v: "Molle"

20 - Enero-2013
No. 005

F. Moncada V, V. Quipuscoa S.
2 dupl.
Universidad Nacional de San Agustín (UNSA)

Figura 5. Etiqueta de registro No. 005 de la recolección de *Schinus molle* L. de la localidad de Moquegua

HERBARIUM AREQUIPENSIS – HUSA
Universidad Nacional de San Agustín – Arequipa

ANACARDIACEAE
Schinus molle

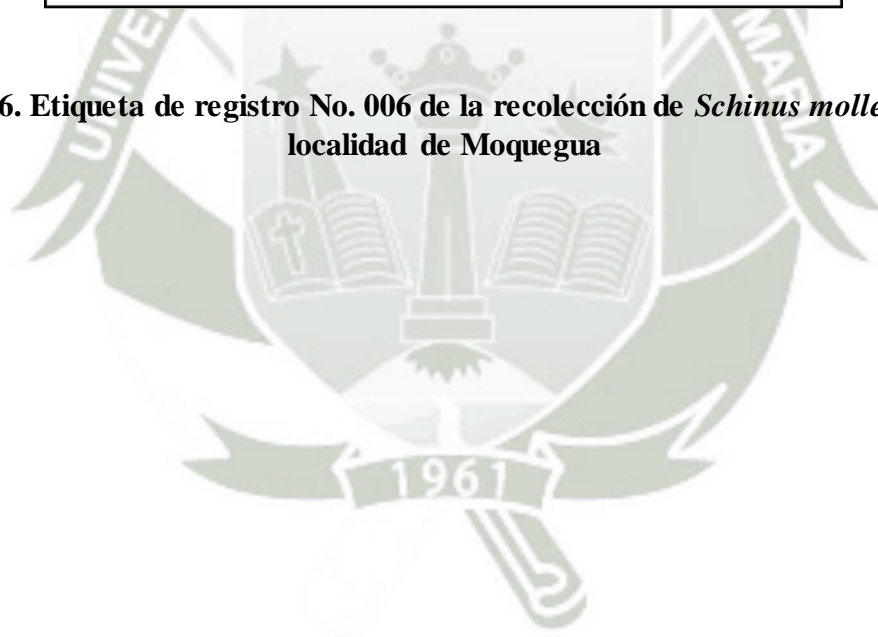
PERU; Dpto. Moquegua; Prov. Ilo, Distrito San Jerónimo ; Cerca a la plaza del pueblo de San Jerónimo a la altura del cementerio. Laderas húmedas.
S 17°37' 27.5" O 71° 20' 15.0" 12m
Hierba de 3m de alto. Frutos color morado
N.v: "Molle"

20 - Enero-2013
No. 006

F. Moncada V, V. Quipuscoa S.
2 dupl.

Universidad Nacional de San Agustín (UNSA)

Figura 6. Etiqueta de registro No. 006 de la recolección de *Schinus molle* L. de la localidad de Moquegua



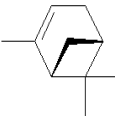
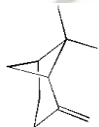
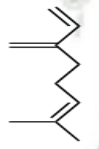


APÉNDICE N° 2

TABLA DE DENSIDAD DEL AGUA (g/mL) vs TEMPERATURA (°C)

	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
0	0.999841	0.999847	0.999854	0.999860	0.999866	0.999872	0.999878	0.999884	0.999889	0.999895
1	0.999900	0.999905	0.999909	0.999914	0.999918	0.999923	0.999927	0.999930	0.999934	0.999938
2	0.999941	0.999944	0.999947	0.999950	0.999953	0.999955	0.999958	0.999960	0.999962	0.999964
3	0.999965	0.999967	0.999968	0.999969	0.999970	0.999971	0.999972	0.999972	0.999973	0.999973
4	0.999973	0.999973	0.999973	0.999972	0.999972	0.999972	0.999970	0.999969	0.999968	0.999966
5	0.999965	0.999963	0.999961	0.999959	0.999957	0.999955	0.999952	0.999950	0.999947	0.999944
6	0.999941	0.999938	0.999935	0.999931	0.999927	0.999924	0.999920	0.999916	0.999911	0.999907
7	0.999902	0.999898	0.999893	0.999888	0.999883	0.999877	0.999872	0.999866	0.999861	0.999855
8	0.999849	0.999843	0.999837	0.999830	0.999824	0.999817	0.999810	0.999803	0.999796	0.999789
9	0.999781	0.999774	0.999766	0.999758	0.999751	0.999742	0.999734	0.999726	0.999717	0.999709
10	0.999700	0.999691	0.999682	0.999673	0.999664	0.999654	0.999645	0.999635	0.999625	0.999615
11	0.999605	0.999595	0.999585	0.999574	0.999564	0.999553	0.999542	0.999531	0.999520	0.999509
12	0.999498	0.999486	0.999475	0.999463	0.999451	0.999439	0.999427	0.999415	0.999402	0.999390
13	0.999377	0.999364	0.999352	0.999339	0.999326	0.999312	0.999299	0.999285	0.999272	0.999258
14	0.999244	0.999230	0.999216	0.999202	0.999188	0.999173	0.999159	0.999144	0.999129	0.999114
15	0.999099	0.999084	0.999069	0.999054	0.999038	0.999023	0.999007	0.998991	0.998975	0.998959
16	0.998943	0.998926	0.998910	0.998893	0.998877	0.998860	0.998843	0.998826	0.998809	0.998792
17	0.998774	0.998757	0.998739	0.998722	0.998704	0.998686	0.998668	0.998650	0.998632	0.998613
18	0.998595	0.998576	0.998558	0.998539	0.998520	0.998501	0.998482	0.998463	0.998444	0.998424
19	0.998405	0.998385	0.998365	0.998345	0.998325	0.998305	0.998285	0.998265	0.998244	0.998224
20	0.998203	0.998183	0.998162	0.998141	0.998120	0.998099	0.998078	0.998056	0.998035	0.998013
21	0.997992	0.997970	0.997948	0.997926	0.997904	0.997882	0.997860	0.997837	0.997815	0.997792
22	0.997770	0.997747	0.997724	0.997701	0.997678	0.997655	0.997632	0.997608	0.997585	0.997561
23	0.997538	0.997514	0.997490	0.997466	0.997442	0.997418	0.997394	0.997369	0.997345	0.997320
24	0.997296	0.997271	0.997246	0.997221	0.997196	0.997171	0.997146	0.997120	0.997095	0.997069
25	0.997044	0.997018	0.996992	0.996967	0.996941	0.996914	0.996888	0.996862	0.996836	0.996809
26	0.996783	0.996756	0.996729	0.996703	0.996676	0.996649	0.996621	0.996594	0.996567	0.996540
27	0.996512	0.996485	0.996457	0.996429	0.996401	0.996373	0.996345	0.996317	0.996289	0.996261
28	0.996232	0.996204	0.996175	0.996147	0.996118	0.996089	0.996060	0.996031	0.996002	0.995973
29	0.995944	0.995914	0.995885	0.995855	0.995826	0.995796	0.995766	0.995736	0.995706	0.995676
30	0.995646	0.995616	0.995586	0.995555	0.995525	0.995494	0.995464	0.995433	0.995402	0.995371

Fuente: Handbook of Chemistry and Physics, Edición 53.

APÉNDICE N° 3: COMPONENTES MAYORITARIOS DEL ACEITE ESENCIAL DE MOLLE

	α-Pinenos	β-Pinenos	Mircenos	α-Felandrenos	Silvestrenos
Estructura					
Nombre común	alfa-Pineno	beta-Pineno	beta-Mirceno	alfa-felandreno	Silvestreno
Sinónimos	2-Pineno; dextradieno cíclico	2(10)-pineno, nopineno, pseudopineno	Mirceno	1,5-P-Mentadieno, Pivarose	m-menta-1(6),8-dien; dipren
Nombre químico	(1S, 5S)-2, 6,6-Trimethylbicyclo [3.1.1] hept-2-ene ((-)- α -Pinene)	6,6-dimethyl- 2-methylenebicyclo [3.1.1] heptane	6,6-dimethyl- 2-methylenebicyclo [3.1.1] heptane	α : 2-Methyl-5-(1-methylethyl)-1,3-cyclohexadiene β : 3-Methylene-6-(1-methylethyl)cyclohexene	1-metil-5-(1-metiletenil)-ciclohexeno
Fórmula química	$C_{10}H_{16}$	$C_{10}H_{16}$	$C_{10}H_{16}$	$C_{10}H_{16}$	$C_{10}H_{16}$
Descripción	El alfa-pineno es un líquido incoloro y oleoso con un olor similar al aguarras. Se utiliza en la fabricación de alcanton, insecticidas, disolvente, plastificadoras, perfumes y aceite sintético de pino. Es uno de los principales componentes del aguarras.	Líquido incoloro y soluble en alcohol, con ligero aroma a pino. Presente naturalmente en el romero, perejil, eneldo, albahaca, milenrama. Es utilizado como solvente en formulaciones para recubrimientos, pinturas y ceras, intermediario para resinas, camfeno, metol, aldehído camfolénico y terpineol; es usado como aditivo para aceites lubricantes..	Es un carbohidrato monoterpénico lineal que resulta como el principal componente del aceite esencial de tomillo silvestre, siendo el 40% de su composición. Se encuentra en altas concentraciones en el lúpulo, el mango y el limoncillo, entre otras. Actúa como anti-inflamatorio interfiriendo en la vía de señalización inflamatoria de las prostaglandinas.	Presente en especies del género <i>Eucalyptus</i> y <i>Satureja</i> , <i>Angelica archangelica</i> , <i>Bidens pilosa</i> o <i>Rosmarinus officinalis</i> ; el alfa felandreno es usado como aromatizante.	Está presente en la resina, los aceites y los extractos de algunas coníferas así como en los preparados aromatizantes obtenidos a partir de ellos. El silvestreno fue sintetizado por primera vez en 1912 por el químico británico y posterior

APÉNDICE N° 4

COLORACIÓN DE GRAM

FUNDAMENTO:

El cristal violeta (violeta de genciana) sirve como colorante primario, que se une a la pared celular bacteriana con una solución débil de yodo que sirve como mordiente para la unión del colorante. Algunas bacterias debido a la naturaleza química de sus paredes celulares, tienen la capacidad de retener el cristal violeta, incluso luego de un tratamiento con un decolorante orgánico, como una mezcla de alcohol etílico y acetona.

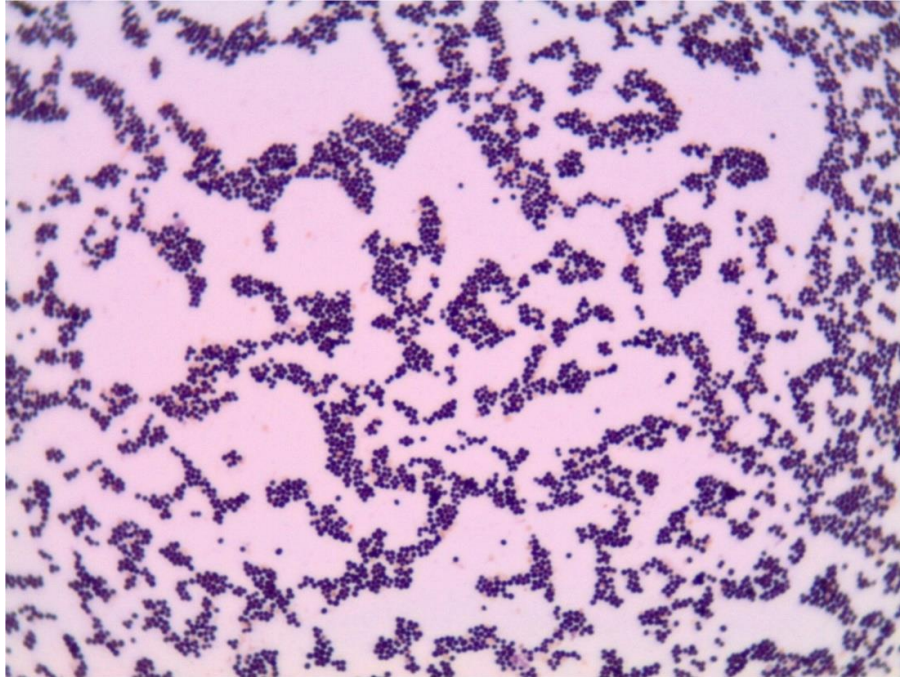
Las bacterias que retienen el colorante, se ven negroazuladas y se denominan grampositivas. Algunas bacterias pierden la coloración primaria cuando son tratadas con el decolorante, debido al alto contenido de lípidos de su pared celular. Estas bacterias decoloradas toman el colorante de contraste, la safranina y se ven rojas cuando se observan al microscopio denominándose gramnegativas.

PREPARACIÓN:

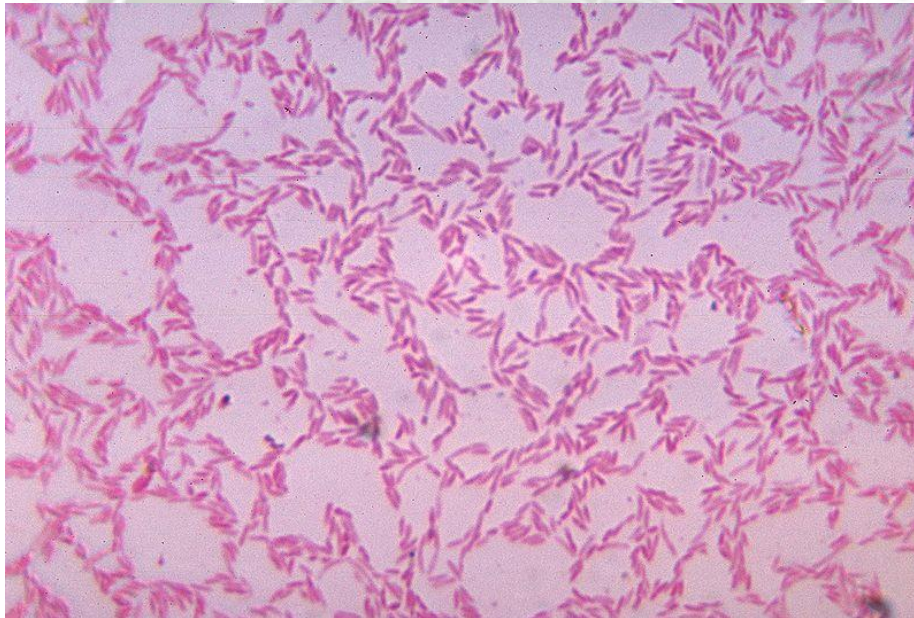
- 1) Fije el frotis y déjelo secar. Vierta sobre el portaobjetos colorante cristal violeta, dejar reposar un minuto. Enjuagar con agua abundante.
- 2) Bañar con solución de Yodo, dejar reposar un minuto, enjuagar con agua abundante.
- 3) Bañar completamente con solución con Alcohol-Acetona y dejar reposar 30 segundos.
- 4) Enjuagar con agua abundante.
- 5) Bañar con solución de Safranina, dejar 45 segundos, lavar con agua abundante.
- 6) Dejar secar el portaobjetos en el ambiente para luego observar al microscopio con aceite de inmersión.

INTERPRETACIÓN:

Las bacterias grampositivas se observan de color violeta o azul y las gramnegativas de color rojo.



Bacterias grampositivas



Bacterias gramnegativas

APÉNDICE N° 5

PRUEBAS DE IDENTIFICACION DE BACTERIAS

AGAR MÜELLER HINTON

FUNDAMENTO:

Es un medio recomendado para la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos. Además es útil con el agregado de sangre para el cultivo y aislamiento de microorganismo exigentes.

COMPOSICIÓN (g/L):

- Infusión de Carne 2.0g.
- Hidrolizado de Caseína 17.5g.
- Almidón 1.5g.
- Agar-agar 13.0g.
- pH: 7.4 ± 0.2 a 25°C .

PREPARACIÓN:

Utilizable hasta la fecha de caducidad cuando se almacena en lugar seco y perfectamente cerrado entre $+15$ y $+25^{\circ} \text{C}$. Disolver 34 g/L, autoclavar (15 minutos por 121°C). Enfriar ligeramente el medio y proceder a colocar en placas aprox. 16-20ml. Sembrar el microorganismo en estudio e incubar a 37°C por 24 horas.

INTERPRETACIÓN:

Se emplea este medio sólido para el crecimiento de muchos microorganismos.

CALDO BHI (Infusión Cerebro Corazón)

FUNDAMENTO:

Es un medio rico en nutrientes que proporciona un adecuado desarrollo microbiano. La infusión de cerebro de ternera, la infusión de corazón vacuno y la peptona son la fuente de carbono, nitrógeno y vitaminas. La glucosa es el hidrato de carbono fermentable, el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el fosfato disódico otorga capacidad buffer.

Los nutrientes de este caldo son apropiados para los hemocultivos, ya que en esta infusión desarrollan especies de estreptococos, los estafilococos que crecen suelen dar mejores reacciones en prueba de coagulasa.

COMPOSICIÓN (g/L):

- Infusión de Cerebro de Ternera 10g.
- Infusión de Corazón de res 12g.
- Peptona 5g.
- Cloruro de Sodio 5g.
- Fosfato Disódico 2.5g.
- Glucosa 2.0g.
- pH: 7.4 ± 0.2 a 25°C .

PREPARACIÓN:

Utilizable hasta fecha de caducidad y se almacena en lugar seco, protegido de la luz; disolver 37g/L de agua destilada, calentar a ebullición hasta disolver completamente. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos. Inocular el microorganismo en estudio e incubar a 37°C por 24 horas.

INTERPRETACIÓN:

El caldo BHI (Infusión cerebro corazón) es un medio líquido que sirve para determinar la Concentración Inhibitoria Mínima al apreciar la turbidez de los tubos de ensayo incubados 24 horas a 37°C . Los Tubos con turbidez muestran la proliferación del microorganismo en estudio mientras que los tubos que no presentan turbidez, no hay crecimiento de bacterias.

AGAR MAC CONKEY

FUNDAMENTO:

El agar Mac Conkey es un medio diferencial para la selección y recuperación de enterobacterias y bacilos gramnegativos entéricos relacionados. La presencia de sales biliares y el cristal violeta inhiben el crecimiento de bacterias grampositivas. La lactosa es el único hidrato de carbono. Las bacterias fermentadoras de lactosa forman colonias de diferentes tonos rojos debido al viraje del indicador rojo neutro (pH menor de 6.8) por la producción de ácidos mixtos. Las colonias no fermentadoras de lactosa aparecen incoloras o transparentes.

COMPOSICIÓN (g/L):

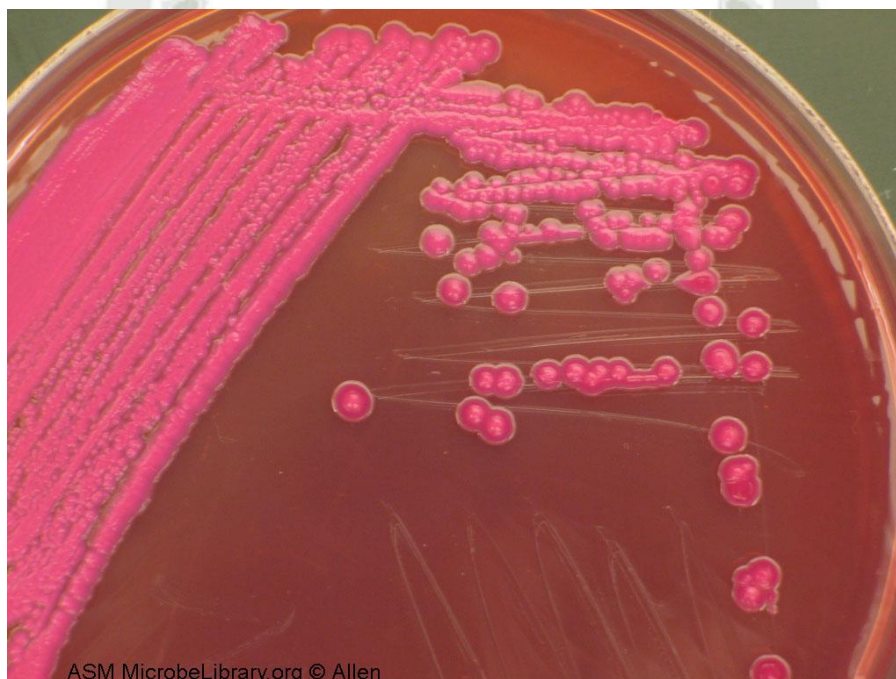
- Peptona de Caseína 17g.
- Sales Biliares 1.5g.
- Lactosa 10g.
- Cloruro de Sodio 5g.
- Peptona de carne 3g.
- Rojo Neutro 0.03g.
- Agar-agar 12.5.
- Cristal Violeta 0.001g.
- pH: 7.1 ± 0.2 a 25°C .

PREPARACIÓN:

Utilizable hasta la fecha de caducidad cuando se almacena en lugar seco y perfectamente cerrado entre 15 y 25°C . Disolver 48 g/L , autoclavar (15 minutos por 121°C). Enfriar ligeramente el medio y proceder a colocar en placas aprox. $16 - 20\text{ml}$. Sembrar el microorganismo en estudio por el método de agotamiento e incubar a 37°C por 24 horas.

INTERPRETACIÓN:

Colonias lactosa positivas producen coloraciones rojizas, la bacteria degrada lactosa y produce ácido virando el indicador del medio (rojo neutro) a rojizo, *Escherichia coli*. El género *Enterobacter* son colonias rojas, *Klebsiella* da colonias rosadas, acidificando el medio. Las colonias lactosa negativo dan colonias incoloras o crema blanco y hasta producen un olor fuerte y fétido.



Klebsiella pneumoniae

AGAR MANTOL SALADO

FUNDAMENTO:

Este medio contiene manitol 1%, ClNa al 7.5%, rojo de fenol y peptonas. La alta concentración de sales inhibe el desarrollo de otros microorganismos y recupera selectivamente estafilococos. La degradación de manitol hasta ácido hace virar el indicador rojo de fenol a un color amarillo, siendo sinónimo de patogenicidad. El *Staphylococcus aureus* en contraste con el *Staphylococcus albus* tiene la capacidad de fermentar el manitol con producción de ácido.

COMPOSICIÓN:

- Extracto de Carne 1g.
- Peptona 10g.
- D-Manitol 10g.
- Rojo de Fenol 0.025g.
- Cloruro de sodio 75g.
- Agar-agar 12.5g.
- Agua destilada 1 L.
- pH 7.4 ± 0.2 a 25°C

PREPARACIÓN:

Disolver 108g/L, autoclavar (15 minutos por 121°C). Enfriar ligeramente el medio y proceder a colocar en placas aproximadamente 16-20ml, sembrar la colonia con un asa de Kolle e incubar a 37°C por 24 horas.

INTERPRETACIÓN:

Color amarillo: *Staphylococcus aureus*



Staphylococcus aureus.

Color rojo: *Staphylococcus albus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*.



Staphylococcus epidermidis

PRUEBA DE LA CATALASA

FUNDAMENTO:

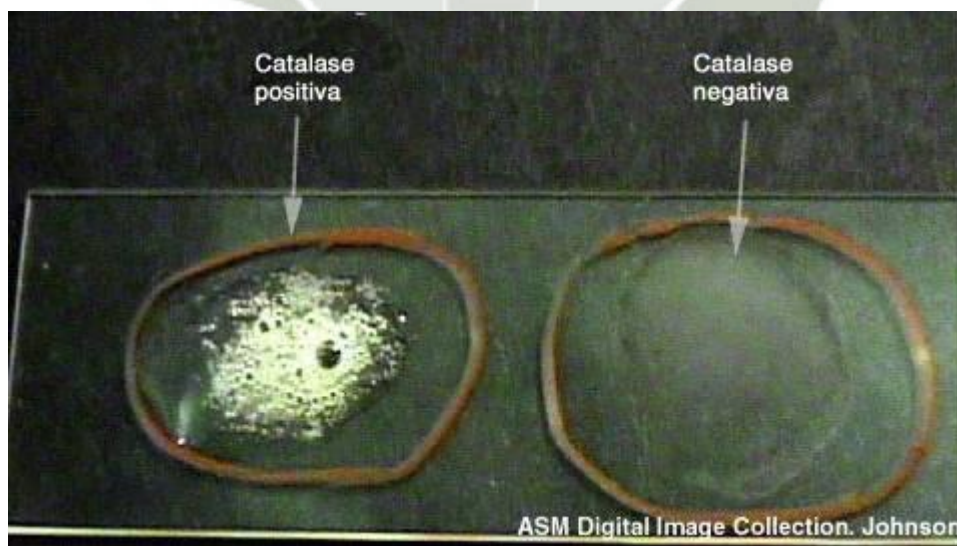
La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno. Es una hemoproteína de estructura similar a la hemoglobina, excepto porque los cuatro átomos de hierro de su molécula están en el estado oxidado (Fe_{3+}), en lugar del estado reducido (Fe_{2+}). Excepto los estreptococos, la mayor parte de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas poseen actividad catalasa. El peróxido de hidrógeno se forma como uno de los productos finales de oxidación del metabolismo aerobio de los hidratos de carbono. Si se permite que se acumule, resulta letal para las células bacterianas. La catalasa convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno según la siguiente reacción: $2H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalasa}} 2H_2O + O_2$ (burbujas de gas)

PREPARACIÓN:

1. Con una aguja de inoculación, transferir parte del centro de una colonia a la superficie de un portaobjetos.
2. Agregar una gota de peróxido de hidrógeno al 3% y observar la formación de burbujas.

INTERPRETACIÓN:

La aparición rápida y sostenida de burbujas o efervescencia constituye una reacción positiva.



PRUEBA DE LA COAGULASA

FUNDAMENTO:

La coagulasa es una proteína de composición desconocida, que tiene actividad similar a la protrombina, capaz de convertir el fibrinógeno en fibrina, que da como resultado la formación de un coágulo visible en los sistemas apropiados. La coagulasa se presenta en dos formas, libre y unida; y cada una posee diferentes propiedades que requieren el uso de otras especies de estafilococos.

Coagulasa unida (prueba en portaobjetos): Factor de aglomeración, se encuentra unida a la pared celular bacteriana y no se encuentra en los filtrados de cultivos. Entre las células bacterianas se forma bandas de fibrina cuando se suspenden en plasma (fibrinógeno), las que hacen que se agrumen en grumos visibles.

Coagulasa libre (prueba en tubo): La coagulasa libre es una sustancia similar a la trombina presente en filtrados de cultivos. Cuando en un tubo de ensayo se prepara una suspensión en plasma de microorganismos productores de coagulasa, se forma un coágulo visible como resultado de la reacción de la coagulasa con una sustancia del suero (factor de reacción con la coagulasa), para formar un complejo que a su vez reacciona con el fibrinógeno para producir el coágulo de fibrina.

PREPARACIÓN:

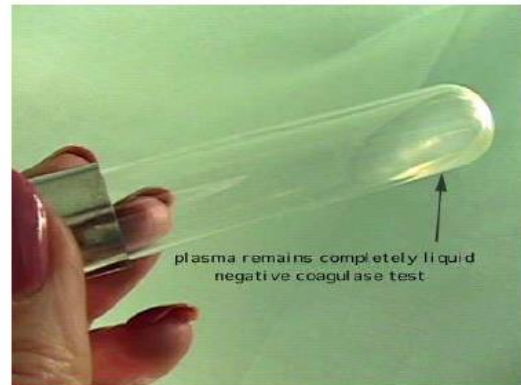
- 1) Prueba en portaobjetos (coagulasa unida): colocar dos gotas de agua o solución fisiológica estéril en un portaobjetos de vidrio. Emulsificar material de colonias del microorganismo a identificar. Colocar una gota de plasma, mezclar, colocar otra gota adelante y atrás, buscando aglutinación en la suspensión de prueba.
- 2) Prueba en tubo (coagulasa libre): emulsificar una pequeña cantidad de la colonia el microorganismo en un tubo que contenga 0.5ml de plasma para prueba de coagulasa. Incubar el tubo a 35°C durante 4 horas y observar si se forma un coágulo inclinando ligeramente el tubo.

INTERPRETACIÓN:

- 1) Prueba en portaobjetos: una reacción positiva debe detectarse dentro de los 10 a 15 segundos de mezclar el plasma con la suspensión por la visualización de un precipitado blanco y la aglutinación de los microorganismos de la suspensión. La prueba se considera negativa si no se observa aglutinación en el término de 2 minutos.
- 2) Prueba en tubo: la prueba de coagulasa en tubo se considera positiva si se detecta cualquier grado de formación de coágulos. El tubo se inclina con suavidad y no se agita, debido a que puede deshacer los coágulos parcialmente formados. La fibrinólisis producida por los microorganismos puede disolver los coágulos poco después de su formación. Los tubos que son negativos después de 4 horas se incuban a temperatura ambiente durante la noche y se leen después de horas.



Coagulasa positiva



Coagulasa negativa

APÉNDICE N° 6

PRUEBAS DE DIFERENCIACIÓN BIOQUÍMICA

TSI (Triple Sugar Iron Agar)

FUNDAMENTO:

Al ocurrir la degradación de cualquiera de los tres azúcares presentes, se forman ácidos que hacen virar el indicador rojo fenol a un color amarillo (inicialmente el color del medio es rojo). La degradación de la lactosa ocurre en la parte superior (pico de flauta), la sacarosa en la parte intermedia y la glucosa es fermentada en la parte profunda (fondo) y en condiciones anaeróbicas. El tiosulfato es reducido a sulfuro de hidrógeno quien reacciona con la sal de hierro (citrato férrico amoniacal) para dar formación de sulfuro de hierro que es de color negro. La presencia de cavidades en el medio es debido a la formación de gas (CO₂) producto de la fermentación.

La lactosa, glucosa y sacarosa son hidratos de carbono fermentables. Tiosulfato de sodio es el sustrato necesario para la producción de ácido sulfhídrico, este se reduce hasta sulfuro de hidrógeno que reacciona luego con una sal de hierro proporcionando el típico color negro. El rojo de fenol es indicador de pH y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico.

COMPOSICIÓN (g/L):

- Extracto de carne 3g.
- Citrato Férrico Amoniacal 0.5g.
- Extracto de Levadura 3g.
- Cloruro de Sodio 5g.
- Peptona de Caseína 15g.
- Tiosulfato de Sodio 0.5g.
- Peptona de carne 5g.
- Rojo fenol 0.024g.
- Lactosa 10g.
- Agar agar 12g.
- Sacarosa 10g.
- Glucosa 1 g.
- pH 7.4 ± 0.2 a 25° C.

PREPARACIÓN:

Disolver 65 g/L, autoclavar (15 minutos por 121° C). Enfriar ligeramente el medio y proceder a colocar en tubos de ensayo en forma pico de flauta (pico y fondo) tomar una colonia de cultivo puro, inocularla por punción y estría e incubar a 37°C por 24 horas.

INTERPRETACIÓN:

La acidez se pone de manifiesto por su cambio al color amarillo y se simboliza con A. La alcalinidad se manifiesta por su cambio al grosella y se simboliza con K.

K/A: “No fermentador de lactosa”. El microorganismo es capaz de utilizar la glucosa pero no la lactosa, por lo cual produce una pequeña cantidad de ácido y en el pico se produce la degradación de proteínas con liberación de aminas lo que da un color grosella en el pico.

A/A: “Fermenta glucosa y lactosa”. La degradación de glucosa, lactosa y sacarosa se manifiesta por el cambio total del medio a amarillo.

K/K: “No fermentadores de azúcares”. Son incapaces de producir ácido por no fermentar glucosa o lactosa y no hay cambio en el medio.

Producción de gas. La presencia de gas se manifiesta por el resquebrajamiento del medio.

Producción de ácido sulfúrico de hierro. El hierro es indicador para poner en evidencia la producción de H₂S que se manifiesta por el color negro, según la cantidad se simboliza con uno, dos o tres signos positivos (+), y si no hay sulfuro de hierro se simboliza con el signo menos (-).



AGAR LIA (Lisina Iron Agar)

FUNDAMENTO:

La descarboxilasa es una enzima que es capaz de actuar sobre la porción carboxilo (COOH) de los aminoácidos (lisina) con formación de aminas de reacción alcalina, ésta reacción conocida como descarboxilación produce CO₂ como producto secundario. La lisina al descarboxilarse origina la cadaverina. La peptona y el extracto de levadura aportan los nutrientes para el desarrollo bacteriano. La glucosa es el hidrato de carbono fermentable, la lisina es el sustrato utilizado para detectar la presencia de enzimas descarboxilasa y desaminasa. El purpura de bromocresol es el indicador de pH, el cual es de color amarillo a pH igual o menor a 5.2 y de color violeta a pH mayor a 6.8, por descarboxilación de la lisina se produce la amina cadaverina que alcaliniza al medio y este produce el viraje del indicador al color violeta. La descarboxilación de la lisina tiene lugar en medio ácido por lo que es necesario que la glucosa sea previa fermentada.

COMPOSICIÓN (g/L):

- Peptona 5g.
- Extracto de levadura 3g.
- Glucosa 1 g.
- Tiosulfato de Sodio 0.04g.
- L-Lisina 10g.
- Purpura de Bromocresol 0.02g.
- Agar agar 15g.
- Citrato de Amonio Férrico 0.5g.
- pH 6.7 ± 0.2 a 25° C.

PREPARACIÓN:

Disolver 32 g/L, autoclavar (15 minutos por 121° C). Enfriar ligeramente el medio y proceder a colocar en tubos de ensayo en forma pico de flauta, tomar una colonia pura e inocular 3 punciones y una estria, incubar a 37°C por 24 horas.

INTERPRETACIÓN:

El desarrollo de un color amarillo en el fondo del tubo indica que el organismo es viable y que el pH del medio ha descendido lo suficiente para activar la enzima descarboxilasa. El retorno del tubo que contiene el aminoácido a un color azul púrpura indica una reacción

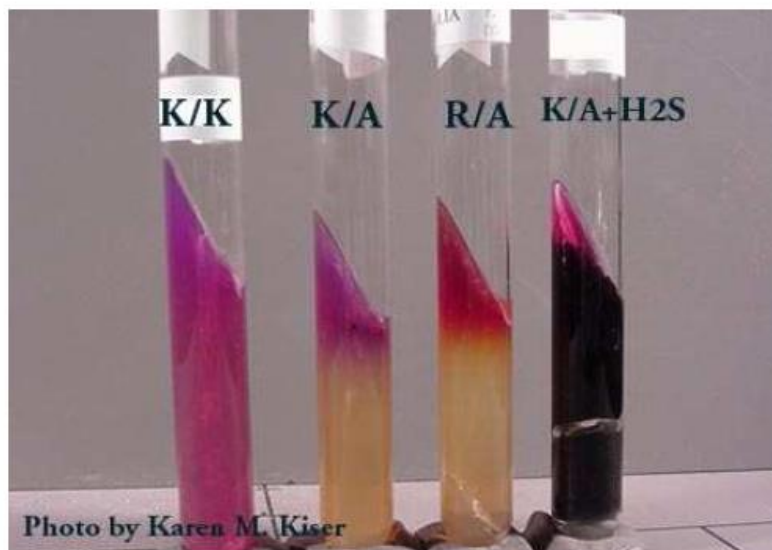
positiva debido a la formación aminas a partir de la reacción de descarboxilación (se ha formado la cadaverina).

K/K: Lisina positiva. El retorno de un color azul púrpura del tubo indica que contiene el aminoácido y es una reacción positiva por descarboxilación, formándose cadaverina.

K/A: Lisina negativa. Los microorganismos que no producen lisina descarboxilasa, pero que son fermentadores de glucosa, producen un viraje en la totalidad del medio al color amarillo, pero a las 24 horas de incubación se observa el pico de color violeta debido al consumo de peptonas y el fondo es amarillo.

R/A: Desaminación de lisina. La desaminación es ocasionada por los microorganismos que poseen la enzima lisina desaminasa, produciéndose una desaminación oxidativa, consecuentemente la pérdida del grupo α -amino, para convertirse en un cetoácido. Este cetoácido da un color naranja en presencia de sales férricas y un color rojo al combinarse en el indicador Púrpura de Bromocresol. Se observa Pico rojizo/fondo amarillo y se simboliza R/A, se interpreta desaminación positiva.

Producción de ácido sulfhídrico: Prueba positiva con ennegrecimiento del medio especialmente en el límite del pico y fondo.



AGAR CITRATO DE SIMMONS

FUNDAMENTO

El citrato de sodio es una sal del ácido cítrico compuesto orgánico simple que se encuentra como uno de los metabolitos del ciclo de Krebs. Algunas bacterias pueden obtener energía por vía distinta de la fermentación de hidratos de carbono, utilizando citrato como única fuente de carbono. La utilización del citrato por la bacteria en prueba se detecta en el medio de citrato por la producción de subproductos alcalinos. El medio incluye citrato de sodio que es un anión como única fuente de carbono y fosfato de amonio como única fuente de nitrógeno. El indicador azul de bromotimol que es amarillo por debajo de pH 6.0 y azul por encima de pH 7.6. El magnesio es cofactor enzimático. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico

COMPOSICIÓN (g/L):

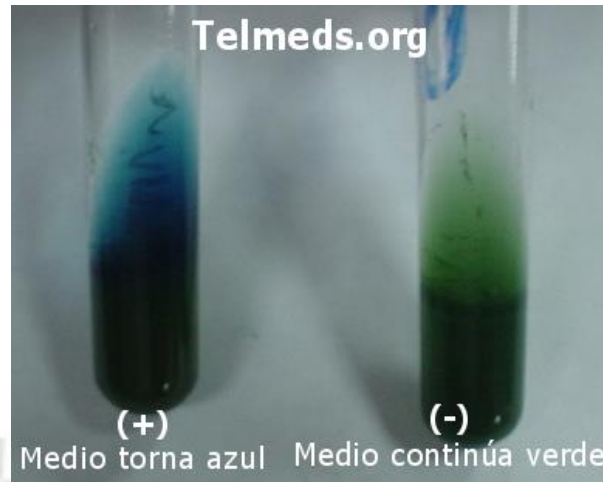
- Fosfato de amonio 1g
- Citrato de Sodio 2g
- Fosfato dipotásico 1g
- Azul de Bromotimol 0.08g
- Cloruro de Sodio 5g
- Agar agar 12g
- Sulfato de Magnesio 0.2g
- pH 6.6 ± 0.2 a 25°C .

PREPARACIÓN:

Disolver 22 g/L, autoclavar (15 minutos por 121°C). Enfriar ligeramente el medio y proceder a colocar en tubos de ensayo en forma de pico inclinado, tomar una colonia bien aislada de la superficie de un medio e inocular en una sola estría en el pico del agar citrato e incubar a 37°C por 24 horas.

INTERPRETACIÓN:

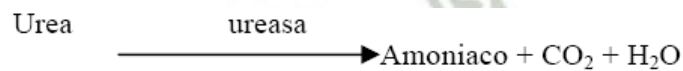
La prueba positiva está representada por la producción de un color azul intenso en 24 a 48 horas, que indica que el microorganismo en prueba ha sido capaz de utilizar el citrato contenido en el medio, con formación de productos alcalinos.



CALDO UREA

FUNDAMENTO:

Es un medio de diferenciación bioquímica esta prueba detecta la presencia de la enzima ureasa en los microorganismos donde se observa la alcalinización del medio. La ureasa cataliza la hidrólisis de la urea dando lugar a carbonato amónico con lo que el medio se alcaliniza. El extracto de levadura es la única fuente de nitrógeno y vitaminas, aporta nutrientes esenciales para el desarrollo bacteriano. Las sales de fosfatos constituyen el sistema buffer, el rojo de fenol es el indicador de pH y la urea es el sustrato de la enzima ureasa. Aquellas bacterias que poseen enzima ureasa, pueden utilizar el nitrógeno proveniente de la urea, la hidrolizan liberando amoníaco y dióxido de carbono. Estos productos metabólicos alcalinizan el medio haciendo virar el indicador rojo fenol del amarillo al rojo.



Fenoltaleína
Incolora
pH



Fenoltaleína
Rojo grosella
pH > 8.1

COMPOSICIÓN (g/L):

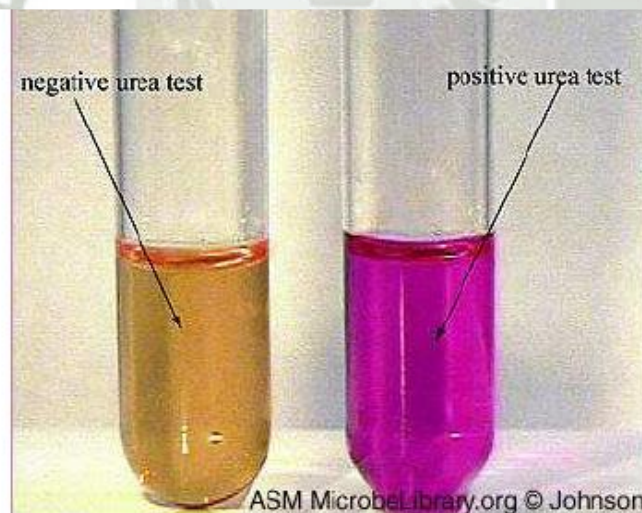
- Extracto de levadura 0.1g.
- Rojo de fenol 0.01g.
- Fosfato monobásico 9.1g.
- Urea 20.0g.
- Fosfato disódico 9.5g.
- pH 6.8 ± 0.2 a 25°C

PREPARACIÓN:

Disolver 38.71 g/L en agua destilada llevar a ebullición, autoclavar (15 minutos por 121°C). Enfriar ligeramente el medio y proceder a colocar en tubos de ensayo. Con el asa de Kolle se toma una muestra de cultivo puro, sembrar el microorganismo en un tubo de ensayo incubar a 37°C hasta detectar cambio de color del indicador

INTERPRETACIÓN:

Los microorganismos que tienen la enzima ureasa desdoblan la urea en amoníaco y en CO_2 , los que hacen virar el rojo de fenol a un color cereza.



MEDIO SIM (Sulfuro Indol Movilidad)

FUNDAMENTO:

Medio de cultivo que permite comprobar la formación de sulfuro, la producción de indol y la movilidad. El indol, un bencinpirrol, es uno de los productos de degradación metabólica del aminoácido triptófano. Las bacterias que poseen la enzima triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano con producción de indol, ácido pirúvico y amoníaco. La producción de indol está basada en la formación de un complejo rojo cuando el indol reacciona con el grupo aldehído del *p*-dimetilaminobenzaldehído que es el principio activo del reactivo de Kovac. La formación de ácido sulfhídrico se evidencia por la aparición de un precipitado negro, esto se logra mediante las siguientes etapas: liberación de sulfuro a partir del tiosulfato por acción enzimática de la bacteria. Acoplamiento del sulfuro (S⁻²) con el ion hidrogeno (H⁺) para formar H₂S y la detección del gas H₂S mediante sales de metales pesados como hierro logrando la aparición de sulfuro de hierro que es un precipitado negro.

COMPOSICIÓN (g/L):

- Peptona de caseína 20g.
- Amonio y Hierro III
- Peptona de carne 6.6g.
- Citrato 0.2g
- Tiosulfato de Sodio 0.2g.
- Agar agar 3g.
- pH7.3 ± 0.2 a 25°C.

Reactivo de Kovac:

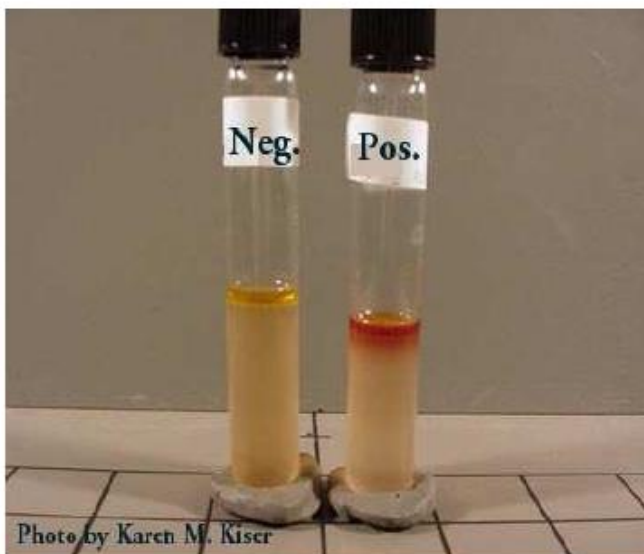
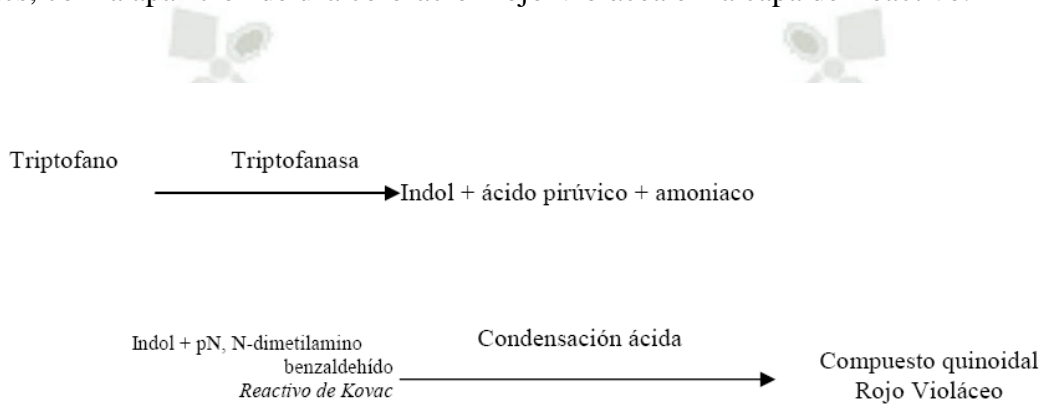
- Alcohol amílico o isoamílico puro 150ml.
- *p*-dimetilaminobenzaldehído 10g.
- HCL concentrado 50ml.

PREPARACIÓN:

Disolver 30 g/L, autoclavar (15 minutos por 121° C). Enfriar ligeramente el medio y proceder a colocar en tubos de ensayo, el microorganismo se siembra con una asa en punta por picadura en la columna del medio del cultivo. Incubar a 37° C por 24 horas.

INTERPRETACIÓN:

La motilidad se pone de manifiesto por la turbidez difusa del medio de cultivo alrededor del canal de la picadura. La no motilidad se caracteriza por el crecimiento producido exclusivamente a lo largo de dicho canal. La producción de H₂S se da por la formación de un precipitado negro de sulfuro de hierro a partir del tiosulfato siempre que el pH sea mayor a 7.2. Para la demostración del Indol se agrega posteriormente a los tubos el Reactivo de Kovacs, con la aparición de una coloración rojo-violácea en la capa del reactivo.



Prueba de Indol

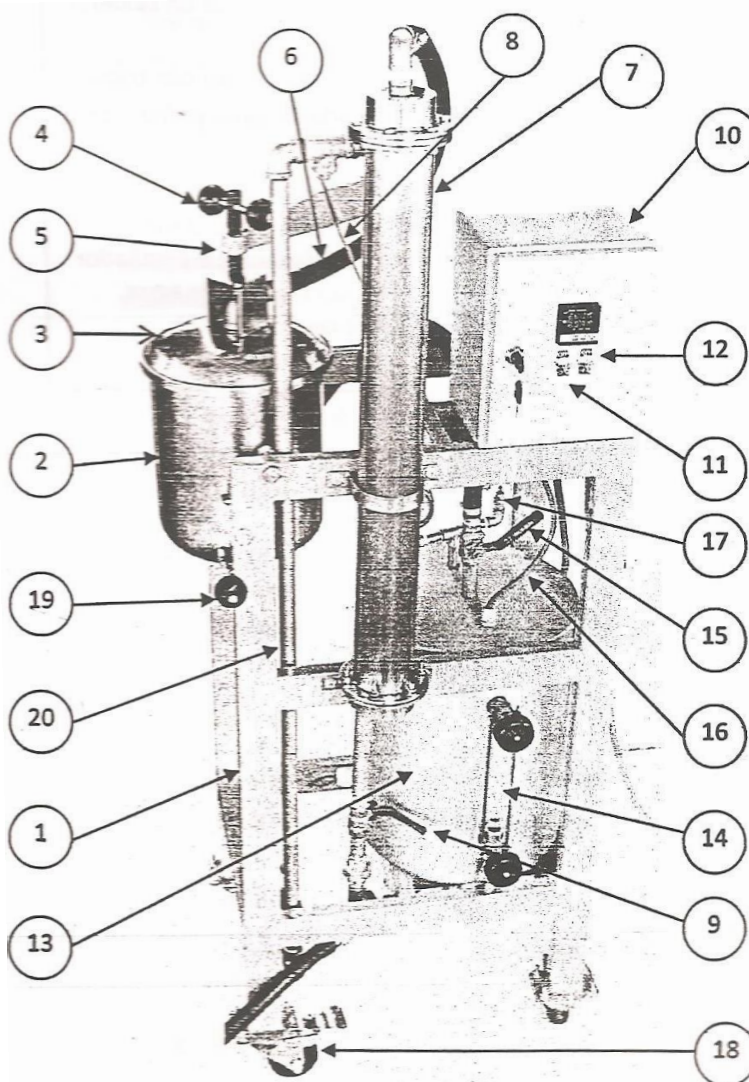


Prueba de Movilidad y Sulfuro

APÉNDICE N° 7

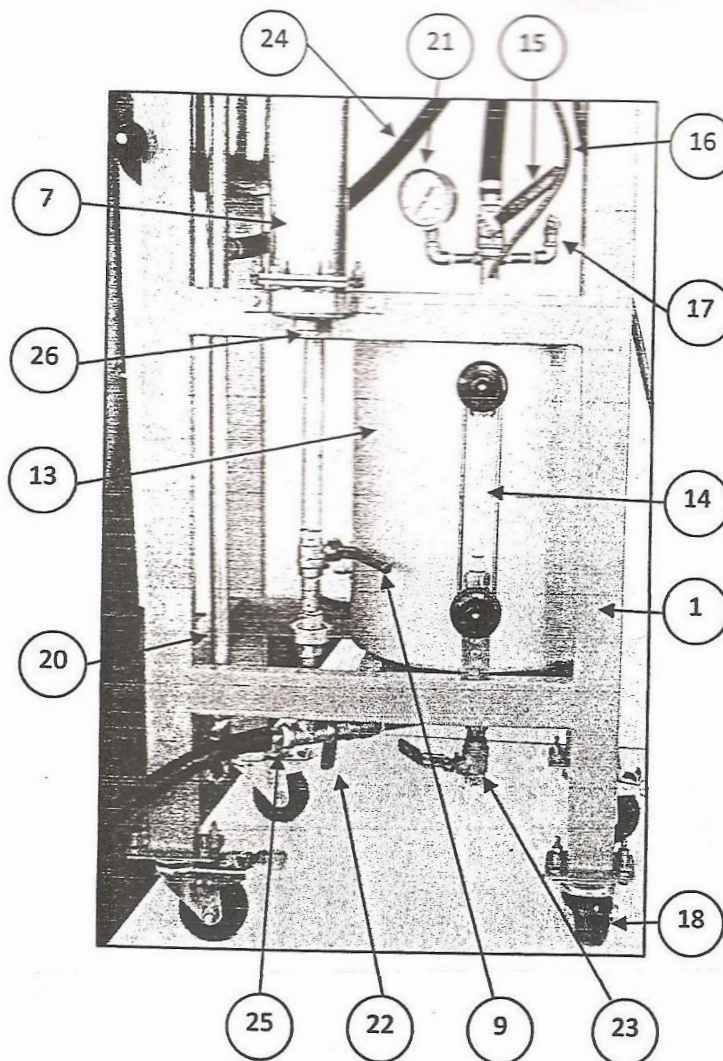
DESCRIPCION DE LAS PARTES DEL EQUIPO DE DESTILACION

POR ARRASTRE DE VAPOR



DESCRIPCIÓN DE PARTES

- 1: Estructura
- 2: Tanque destilador
- 3: Tapa tanque destilador
- 4: Manija de apertura y cierre de tapa
- 5: Soporte móvil de tapa
- 6: Manguera de salida de vapor a cond.
- 7: Condensador IC
- 8: Indicador de T° de salida agua cond.
- 9: Llave ingreso agua enfriamien. cond.
- 10: Caja de control
- 11: Palanquilla de encendido y apagado
- 12: Palanquilla activ. de resist. calderín
- 13: Calderín
- 14: Visor de nivel de agua en calderín
- 15: Llave de salida de vapor calderín
- 16: Sensor de nivel de agua en calderín
- 17: Válvula de seguridad
- 18: Ruedas de desplazamiento con traba
- 19: Seguro volteo de tanque
- 20: Tubo de salida de agua enfria. cond.



DESCRIPCIÓN DE PARTES

- 1: Estructura
- 7: Condensador IC
- 9: Llave ingreso agua enfria. cond.
- 13: Calderín
- 14: Visor de nivel de agua en calderín
- 15: Llave salida vapor de calderín
- 16: Sensor de nivel de agua en calderín
- 17: Válvula de seguridad
- 18: Ruedas desplazamiento con traba
- 20: Tubo de salida de agua enfria. cond.
- 21: Manómetro
- 22: Llave entrada agua calderín
- 23: Llave de descarga de calderín
- 24: Manguera salida vapor a destilador
- 25: Conexión para ingreso de agua
- 26: Salida de aguas floridas

APÉNDICE N° 8

EQUIPOS USADOS PARA EL ESTUDIO



Figura 1. Destilador por arrastre de vapor.



Figura 2. Cromatógrafo de gases GC-MS-QP2010 plus. Shimadzu

APÉNDICE N° 10

PRUEBAS BIOQUIMICAS DE IDENTIFICACION DE LAS ESPECIES DE
ENTEROBACTERIAS MÁS FRECUENTES AISLADAS EN CLINICA

GRUPO I HIDROGENO SULFURADO (H ₂ S) POSITIVOS						GRUPO II HIDROGENO SULFURADO (-H ₂ S) NEGATIVOS					
ANAEROGENICOS (GAS NEGATIVO)						ANAEROGENICOS (GAS NEGATIVO)					
TSI	GAS	H ₂ S	LIA	INDOL	ENTEROBACTERIA	TSI	GAS	H ₂ S	LIA	INDOL	ENTEROBACTERIA
K/A	-	± ó +	K/K	-	Salmonella Typhi	K/A	-	-	K/A	- ó +	Shigella
AEROGENICOS (GAS POSITIVO)						AEROGENICOS (GAS POSITIVO)					
TSI	GAS	H ₂ S	LIA	INDOL	ENTEROBACTERIA	A/A ó K/A	-	-	K/K ó K/N	+	Escherichia
K/A	2 +	- 4 +	K/K	-	Salmonella	A/A ó K/A	-	-	K/A	- ó +	Enterobacter (*)
K/A ó A/A	2 +	- 4 +	K/K	-	Arizona	K/A	-	-	R/A	+	Serratia
K/A ó A/A	2 +	- 4 +	K/K	-	Citrobacter	K/A	-	-	R/A	+	Providencia
K/A ó A/A	2 +	4 +	R/A	- ó +	Proteus	A/A	-	-	A/A ó K/A	- ó +	Yersinia
K/A	2 +	4 +	K/K	+	Edwardsiella	AEROGENICOS (GAS POSITIVO)					
						TSI	GAS	H ₂ S	LIA	INDOL	ENTEROBACTERIA
						A/A ó K/A	2 +	-	K/K ó K/A	+	Escherichia
						A/A	4 +	-	K/K	- ó +	Klebsiella
						A/A ó K/A	3 +	-	K/K ó K/A	-	Enterobacter
						K/A ó A/A	2 +	-	K/K	-	Serratia
						K/A	[+]	-	K/A ó R/A	+	Proteus (*)
						K/A	+	-	K/A ó A/A	-	Paratyphi A (*)

K = alcalino
A = ácido
R = rojo
N = neutro
(*) enteropatógenos importantes.
(*) Ver texto



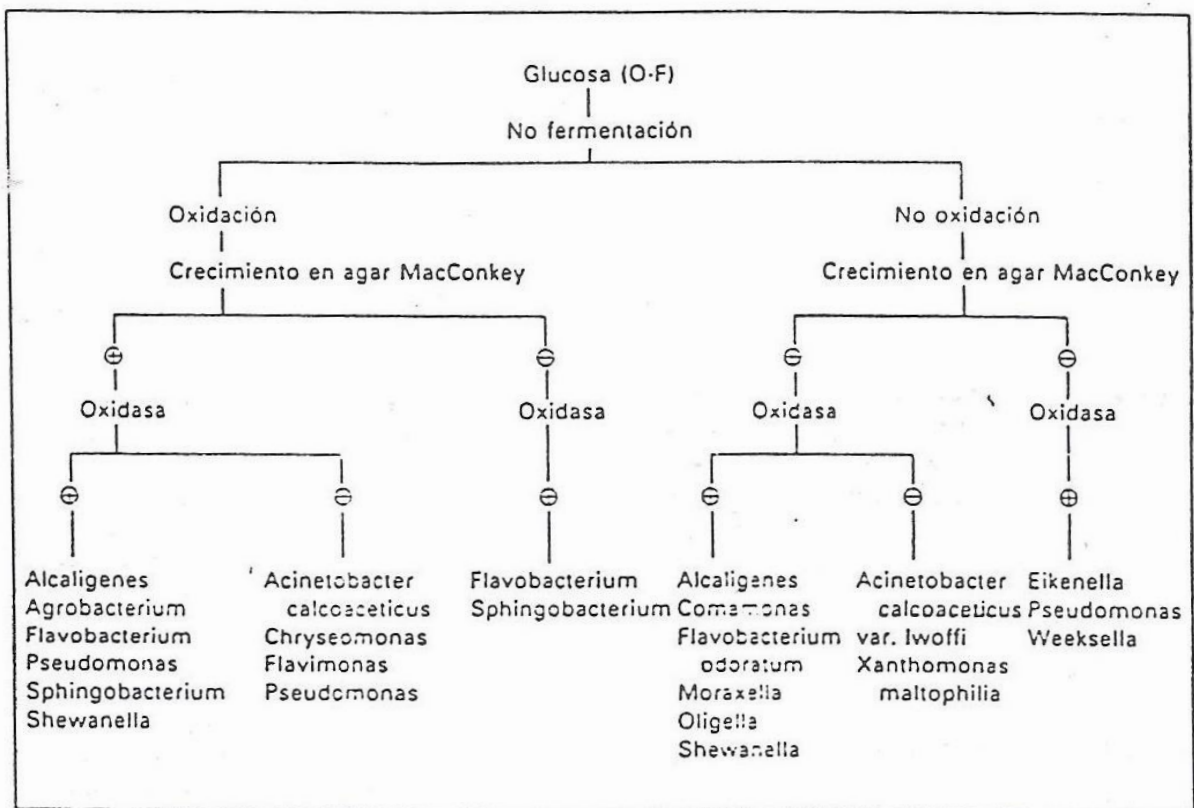
APÉNDICE N° 12

CARACTERÍSTICAS DE IDENTIFICACION DE SIETE GENEROS DE BACILOS NO FERMENTADORES

Género	Metabolismo	Movilidad	Oxidasa	Desarrollo en MacConkey	Características adicionales
<i>Pseudomonas</i>	Oxidativo	Positiva. Flagelos polares	+	Positivo	Flagelos polares monotricos y multitricos. No requiere factores de desarrollo especiales. Algunas especies producen piocianina y fluoresceína. La mayoría de las especies desnitrifica nitratos a gas nitrógeno
<i>Acinetobacter</i> (Herellea y Mima)	Oxidativo o no sacarolítico	Negativa	-	Positivo	No requiere factores de desarrollo especiales. Producción de ácido a partir de glucosa débil (var. <i>calcoaceticus</i>) o ausente (var. <i>lwoffii</i>). Las células aparecen como diplococos en la tinción de Gram. Todas las cepas son resistentes a la penicilina
<i>Flavobacterium</i>	Oxidativo (algunas cepas fermentadoras cuestionables)	Variable. Algunas especies tienen flagelos peritricos	+	Pobre o negativo	Muchas cepas requieren para su desarrollo nitrógeno suplementario y vitaminas del complejo B. Frecuente producción de pigmentos amarillos. No desnitrifican nitratos. Desarrollo óptimo a 30° C. Todas las especies son resistentes a la polimixina B. Algunas especies son débilmente indol positivas
<i>Bordetella</i>	Oxidativo	Variable: Algunas cepas tienen flagelos laterales politricos	+	Variable; pobre o negativo	Algunas cepas requieren para su desarrollo ácido nicotínico, cistina y metionina. La <i>B. pertussis</i> requiere agar sangre glicerol papa (Bordet-Gengou). La <i>B. bronchiseptica</i> degrada rápidamente la urea
<i>Moraxella</i>	Oxidativo y no sacarolítico	Negativa	+	Escaso o negativo	La mayoría de las cepas son exigentes y algunas requieren para su desarrollo un suplemento de suero. Aerobios estrictos. En la tinción de Gram pueden aparecer como cocobacilos. Altamente sensibles a la penicilina
<i>Xanthomonas</i>	Oxidativo	Positiva. Un solo flagelo polar	-/+ débil	Negativo	Algunas cepas requieren para su desarrollo metionina, ácido glutámico y ácido nicotínico. Producción de pigmento amarillo. Catalasa positivos. No reducen nitratos a nitritos. Principalmente fitopatógenos
<i>Alcaligenes</i>	Oxidativo y no sacarolítico	Positiva.	+	Negativo	Aerobios estrictos, si bien algunas cepas utilizan nitrato en lugar de oxígeno como aceptor final de electrones. Requieren para su desarrollo sustancias nitrogenadas simples

APÉNDICE N° 13

**DIFERENCIACION DE LOS BACILOS GRAMNEGATIVOS NO
FERMENTADORES BASADA EN LA PRUEBA DE O-F, CRECIMIENTO EN
AGAR MAC CONKEY Y OXIDASA**



APÉNDICE N° 14

IDENTIFICACION TAXONOMICA DE LOS ARBOLES DE MOLLE DE ILO



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



“AÑO DE LA INVERSIÓN PARA EL DESARROLLO RURAL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA”

CONSTANCIA N° 004-2013-HUSA

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

HACE CONSTAR:

Que la muestra presentada por el Señor Francisco Manuel Moncada Valerio identificado con DNI 45327145, egresado del Programa de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Católica de Santa María, para la Ejecución de su Tesis Profesional Titulada: “Determinación del contenido de afa-pineno del aceite esencial de “molle” y su actividad antimicrobiana contra *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*, obtenida de la localidad de San Jerónimo Pueblo, Distrito de Ilo, Departamento de Moquegua, ha sido determinada en el *Herbarium Arequipense* (HUSA) y corresponde a la especie:

Schinus molle L.

Según el Sistema de Clasificación de Armen Takhtajan, (1987)

División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Subclase: Magnolidae
Superorden: Rutanae
Orden: Rutales
Suborden: Rutaneae
Familia: Anacardiaceae
Genero: *Schinus* L.
Especie: *Schinus molle* L.

Se expide la presente solicitud del interesado para los fines que se estimen convenientes.

Arequipa 17 de Mayo del 2013

Blgo. Leoncio Mariño Herrera
DIRECTOR
Herbarium Arequipense (HUSA)



Avenida Daniel Alcides Carrión s/n cercado
Teléfono: (054) 237755 / 631987
Apartado Postal: 0028
AREQUIPA – PERÚ

APÉNDICE N° 15

IDENTIFICACION TAXONOMICA DE LOS ARBOLES DE MOLLE DE
AREQUIPA



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



CONSTANCIA No. 009-2013-HUSA

El que suscribe, Director del Herbarium Arequipense HUSA, emite la presente haciendo constar que el espécimen fresco presentado por el señor Francisco Manuel Moncada Valerio para el trabajo de Tesis "Determinación del contenido de α -pineno del aceite esencial de *Schinus molle* L. molle y su actividad antimicrobiana contra *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*" colectado en la localidad Hunter, distrito de Jacobo Dickson Hunter, Provincia y Región Arequipa corresponde a la especie:

***Schinus molle* L. "Molle"**
(Familia Anacardiaceae)

Así mismo se indica la Ubicación Taxonómica de la Especie de Acuerdo al sistema de Clasificación de Armen Takhtajan (2009)

Reino: Plantae
 Division: Magnoliophyta
 Clase: Magnoliopsida
 Subclase: Rosidae
 Superorden: Rutanae
 Orden: Rutales
 Familia: Anacardiaceae
 Genero: Schinus
 Especie: *Schinus molle* L.

Se expide la presente a solicitud del interesado.

Arequipa 9 de mayo de 2013

Blgo. Leoncio Marino Herrera
 Director Herbarium Arequipense-HUSA



Avenida Daniel Alcides Carrión s/n cercado
 Teléfono: (054) 237755 / 631987
 Apartado Postal: 0028
 AREQUIPA – PERÚ

APÉNDICE N° 16

CORRIDAS COMATOGRAFICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES DE
AREQUIPA E ILO

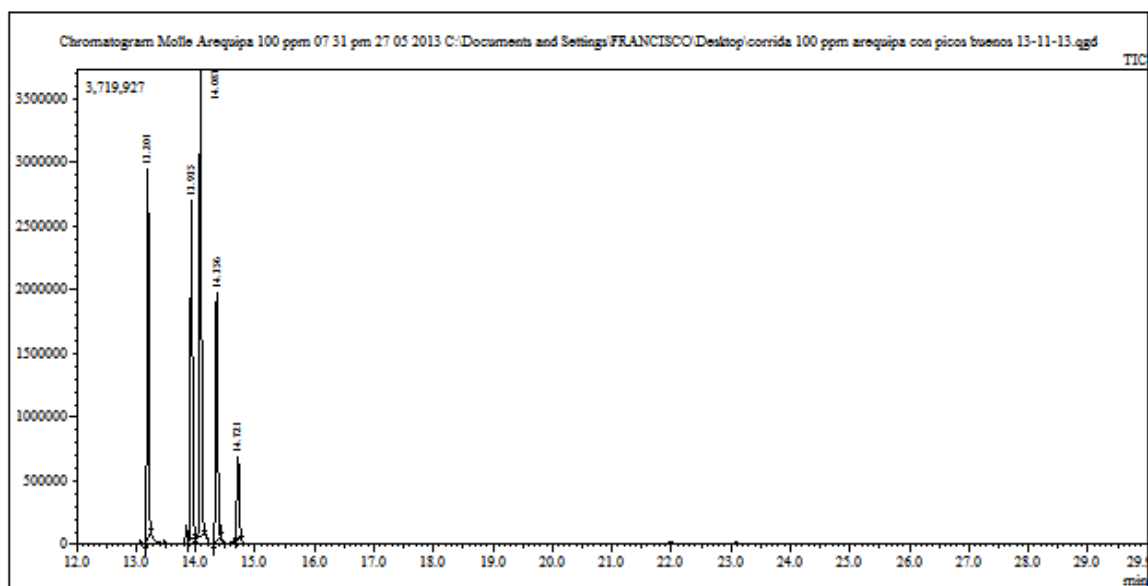


Figura 1 .Cromatograma GC-MS del aceite esencial de molle de Arequipa.

Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	13.201	13.155	13.260	5856287	21.41	2897595	24.56	2.02		.alpha.-Pinene
2	13.935	13.885	14.000	6325357	23.13	2667767	22.61	2.37		.beta.-Pinene
3	14.087	14.000	14.165	8640535	31.59	3653519	30.97	2.36	V	.beta.-Myrcene
4	14.356	14.305	14.420	4607823	16.83	1944426	16.48	2.37		.alpha.-Phellandrene
5	14.721	14.665	14.780	1921748	7.03	634735	5.38	3.03		Sylvestrene
				27351750	100.00	11798042	100.00			

Figura 2 .Leyenda descriptiva del cromatograma de picos del aceite esencial de molle de Arequipa.

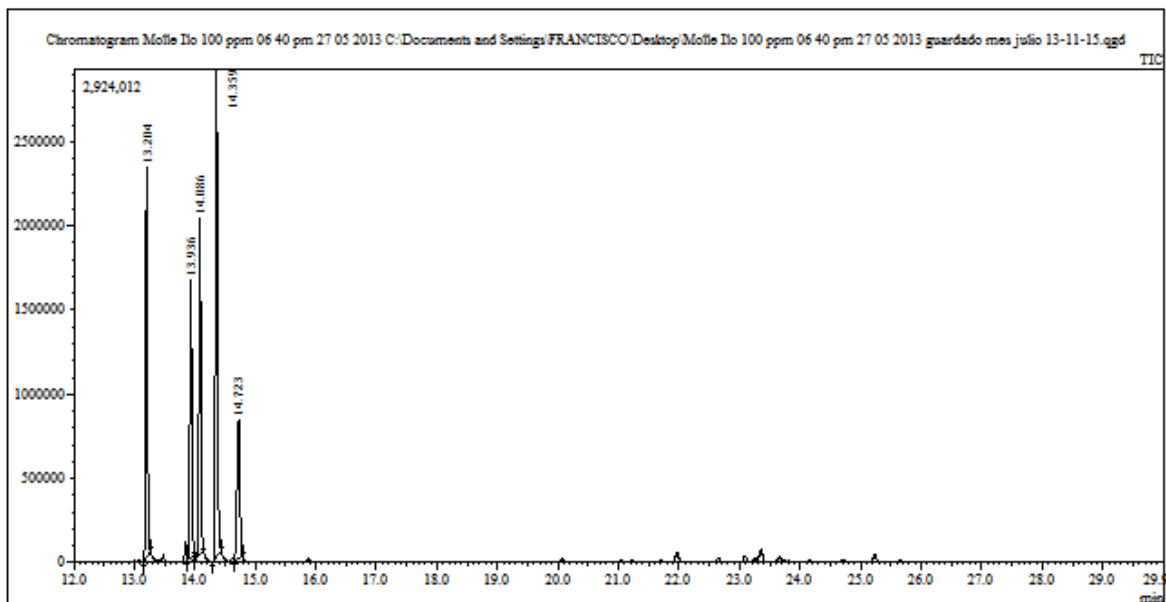


Figura 3 .Cromatograma GC-MS del aceite esencial de molle de Ilo.

Peak Report TIC										
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	13.204	13.155	13.260	4699474	20.64	2314847	23.94	2.03		alpha-Pinene
2	13.936	13.885	14.000	3896650	17.12	1653743	17.10	2.36		beta-Pinene
3	14.086	14.000	14.155	4454050	19.56	1996347	20.64	2.23	V	beta-Myrcene
4	14.339	14.305	14.440	7056821	31.00	2893142	29.91	2.44		alpha-Phellandrene
5	14.723	14.655	14.785	2658829	11.68	813143	8.41	3.27		Sylvestrene
				22765824	100.00	9671222	100.00			

Figura 4 .Leyenda descriptiva del cromatograma de picos del aceite esencial de molle de Ilo.