

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA QUÍMICA



**“CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y EFECTO
ANTIMICROBIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE MOLLE
(*Schinus molle* L.) OBTENIDO POR EL MÉTODO DE ARRASTRE
CON VAPOR”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO QUÍMICO**

**KARIN ISABEL PACHECO HUAMÁN
MARISA LÁZARO LLACUA**

Callao, Setiembre, 2017

PERÚ

AGRADECIMIENTO

Un agradecimiento especial a nuestros padres por su apoyo incondicional a lo largo de toda nuestra vida profesional, por su paciencia y por estar con nosotras en los buenos y malos momentos.

A mis profesores que durante toda nuestra carrera profesional han aportado con un granito de arena a nuestra formación y en especial al Mg. Blgo. Edgar Zárate Sarapura por impartir sus conocimientos, que sin ellos no se hubiera logrado la culminación de la tesis.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
I. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	13
1.1. Identificación del problema	13
1.2. Formulación del problema	14
1.3. Objetivos de la investigación	15
1.4. Justificación	15
1.5. Importancia	16
II. MARCO TEÓRICO	17
2.1. Antecedentes del estudio	17
2.2. Marco teórico	19
2.2.1. Descripción y características del <i>Schinus molle</i> L.	19
2.2.2. Aceites esenciales	28
2.2.3. Aceite esencial del <i>Schinus molle</i> L.	31
2.2.4. Métodos de obtención de aceite esencial	39
2.2.5. Microorganismos	43
2.3. Definición de términos básicos	49
III. VARIABLES E HIPÓTESIS	51
3.1. Variables de la investigación	51

3.2.	Operacionalización de variables	52
3.3.	Hipótesis general	53
3.4.	Hipótesis específicas	53
IV.	METODOLOGÍA	54
4.1.	Tipo de investigación	54
4.1.1.	Por su finalidad	54
4.1.2.	Por su diseño interpretativo	54
4.1.3.	Por el nivel de estudio	54
4.1.4.	Por el ámbito de desarrollo	55
4.2.	Diseño de la investigación	55
4.3.	Población y muestra	57
4.3.1.	Población	57
4.3.2.	Muestra	57
4.4.	Técnicas e instrumentos de recolección de datos	57
4.5.	Procedimientos de recolección de datos	58
4.5.1.	Métodos y materiales	58
4.5.2.	Diseño experimental	61
4.6.	Procesamiento estadístico y análisis de datos	71
V.	RESULTADOS	74
5.1.	Obtención del aceite esencial de molle	74
5.2.	Caracterización física	77
5.2.1.	Determinación de la humedad	77
5.2.2.	Determinación de la densidad y el Índice	78

	de refracción	
	5.2.3. Determinación de la solubilidad en etanol	79
5.3.	Caracterización química	79
	5.3.1. Determinación del índice de éster	79
	5.3.2. Determinación del índice de acidez	79
	5.3.3. Identificación de los componentes de aceite esencial molle (<i>Schinus molle</i> L.) por Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas	80
5.4.	Determinación del efecto antimicrobiano	82
	5.4.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria	82
5.5.	Análisis estadístico de resultados	91
VI.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	94
	6.1. Contrastación de hipótesis con los resultados	94
	6.2. Contrastación de resultados con otros estudios similares	98
VII.	CONCLUSIONES	101
VIII.	RECOMENDACIONES	103
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
	ANEXOS	110
	Anexo N° 1. Matriz de consistencia completa	110
	Anexo N° 2. Taxonomía de <i>Schinus molle</i> L.	111

Anexo N° 3.	Análisis físicos y químicos del aceite esencial de molle	112
Anexo N° 4.	Normas técnicas peruanas para los aceites esenciales	116
Anexo N° 5.	Pruebas experimentales para la obtención del aceite esencial del molle	118
Anexo N° 6.	Método de diluciones seriadas decimales y recuentos en placa	129
Anexo N° 7.	Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos	134
Anexo N° 8.	Técnicas de recuento de microorganismos	136
Anexo N° 9.	Constancia del laboratorio de Microbiología del IIEA para la determinación del efecto antimicrobiano del aceite esencial de molle	142

ÍNDICE DE CUADROS

		Página
CUADRO N° 2.1	Nombres comunes del <i>Schinus molle</i> L.	21
CUADRO N° 2.2	Usos de molle en medicina tradicional Cuzco (Perú)	26
CUADRO N° 2.3	Otros usos de <i>Schinus molle</i> L.	27
CUADRO N° 2.4	Grupos funcionales de las moléculas constituyentes de los aceites esenciales	29
CUADRO N° 2.5	Factores que influyen en la composición química de los aceites esenciales	30
CUADRO N° 2.6	Contenido porcentual de aceite esencial en <i>Schinus molle</i> L.	32
CUADRO N° 2.7	Componentes más comunes del aceite esencial de <i>Schinus molle</i> L.	34
CUADRO N° 2.8	Composición de aceite esencial de frutos secos y hojas de molle - Perú	35
CUADRO N° 2.9	Propiedades físicas del aceite esencial de <i>Schinus molle</i> L. registradas en varios países	38
CUADRO N° 3.1	Operacionalización de variables	52
CUADRO N° 4.1	Diseño factorial para la obtención de aceite esencial de las hojas de molle	62

CUADRO N° 4.2	Cuadro de ensayos anova	72
CUADRO N° 5.1	Resultados de la obtención de aceite esencial de molle	74
CUADRO N° 5.2	Rendimiento promedio de la obtención de aceite esencial de molle	76
CUADRO N° 5.3	Porcentaje de humedad de las hojas de molle	78
CUADRO N° 5.4	Densidad e índice de refracción	78
CUADRO N° 5.5	Tiempo de retención e identificación de componentes volátiles mayoritarios	81
CUADRO N° 5.6	Efecto del aceite esencial de molle sobre el crecimiento de <i>Escherichia coli</i> en UFC/ml	82
CUADRO N° 5.7	Efecto del aceite esencial de molle sobre el crecimiento de <i>Escherichia coli</i> en Log UFC/ml	82
CUADRO N° 5.8	Muerte total de la bacteria <i>Escherichia coli</i>	83
CUADRO N° 5.9	Fase de muerte o declive de <i>Escherichia Coli</i>	84
CUADRO N° 5.10	Letalidad K (Log (UFC/ml)/h) del aceite esencial de molle sobre <i>Escherichia coli</i>	85
CUADRO N° 5.11	Efecto del aceite esencial de molle sobre el crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i>	86

	en UFC/ml	
CUADRO N° 5.12	Efecto del aceite esencial de molle sobre el crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> en Log UFC/ml	86
CUADRO N° 5.13	Concentración mínima inhibitoria para <i>Staphylococcus aureus</i>	88
CUADRO N° 5.14	Fase de muerte o declive de <i>Staphylococcus aureus</i>	88
CUADRO N° 5.15	Letalidad K (Log (UFC/ml)/h) del aceite esencial de molle sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	90
CUADRO N° 5.16	Información del factor	91
CUADRO N° 5.17	Análisis de varianza de rendimiento vs cantidad de material vegetal, cantidad de agua y tamaño de partícula	91
CUADRO N° 5.18	Resumen del modelo	92

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA N° 2.1	Planta de <i>Schinus molle</i> L. 22
FIGURA N° 2.2	Estructura molecular de los componentes volátiles más comunes del aceite esencial de molle 33
FIGURA N° 2.3	Destilación por arrastre con vapor 40
FIGURA N° 2.4	Equipo tradicional de destilación vapor-agua 41
FIGURA N° 2.5	Esquema de un destilador con sistema de cohobación 42
FIGURA N° 2.6	<i>Escherichia coli</i> 46
FIGURA N° 2.7	<i>Staphylococcus aureus</i> 48
FIGURA N° 3.1	Variables de investigación 51
FIGURA N° 4.1	Diseño de la investigación 56
FIGURA N° 4.2	Pesado de la materia prima 63
FIGURA N° 4.3	Equipo de obtención de arrastre con vapor 64
FIGURA N° 4.4	Almacenamiento de aceite esencial de molle de las 8 pruebas experimentales 65
FIGURA N° 4.5	Metodología para la determinación de la concentración mínima inhibitoria 70

ÍNDICE DE GRÁFICOS

		Página
GRÁFICO N° 5.1	Superposición de gráficas de la obtención de aceite esencial de molle para un tamaño de partícula de 1.5 cm	75
GRÁFICO N° 5.2	Superposición de gráficas de la obtención de aceite esencial de molle para un tamaño de partícula de 3.5 cm	76
GRÁFICO N° 5.3	Superposición de gráficas de la obtención de aceite esencial de molle	77
GRÁFICO N° 5.4	Curva de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> a diferentes concentraciones de aceite esencial de molle	83
GRÁFICO N° 5.5	Curva de letalidad K (velocidad de muerte celular) del aceite esencial de molle sobre <i>Escherichia coli</i>	84
GRÁFICO N° 5.6	Letalidad K (velocidad de muerte celular) del aceite esencial de molle sobre <i>Escherichia coli</i>	85
GRÁFICO N° 5.7	Curva de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> a diferentes concentraciones de aceite esencial de molle	87

GRÁFICO N° 5.8	Curva de letalidad K (velocidad de muerte celular) del aceite esencial de molle sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	89
GRÁFICO N° 5.9	Letalidad K (velocidad de muerte celular) del aceite esencial de molle sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	90
GRÁFICO N° 5.10	Curva de contorno del rendimiento vs cantidad de material vegetal, cantidad de agua	92
GRÁFICO N° 5.11	Curva de contorno del rendimiento vs cantidad de agua, tamaño de partícula	93

RESUMEN

Se utilizó el método de destilación por arrastre con vapor para la obtención del aceite esencial de las hojas de molle (*Schinus molle* L.) provenientes del distrito de Villa El Salvador, región Lima - Perú. Se determinó un mayor rendimiento de 1.20 %, cuando se utilizó una cantidad de material vegetal de hojas de molle de 1.50 kg, con 6 l de agua y un tamaño de partícula de 1.50 cm.

La caracterización física registró una densidad promedio de 0.8943 g/ml, el índice de refracción fue de 1.496 y la solubilidad en etanol al 90 % fue de 0.1 a 1.2 ml. La caracterización química presentó el número de Éster de 10.43 mg KOH/g aceite y el índice de acidez de 2.74 mg KOH/g aceite. El análisis de cromatografía de gases acoplado a Espectroscopía de masas, registró 62 componentes volátiles siendo los mayoritarios alphahellandrene (17.13 %), alphaPinene (15.57%), D-limonene (11.03 %) y Camphene (10.92 %).

En la segunda etapa se estudió el efecto antimicrobiano. Para *Staphylococcus aureus*, se consideró al aceite esencial de molle un antimicrobiano, se determinó una concentración mínima inhibitoria de 0.10 ml AE/ml de inóculo con la muerte del 99.97 % del inóculo inicial, con una letalidad K de 0.0630 Log (UFC/ml)/h. Para el caso de *Escherichia coli* se observó un leve efecto antimicrobiano en las primeras 2.40 horas.

Palabras clave: Aceite esencial, Destilación por arrastre con vapor, Efecto antimicrobiano, Concentración mínima inhibitoria, Letalidad.

ABSTRACT

Steam distillation method was used to obtain the essential oil of leaves of molle (*Schinus molle* L.) from Villa El Salvador, Lima - Peru. A higher yield of 1.20 % was determined when a quantity of 1.50 kg molle leaves vegetable material was used, with 6 l of water and a particle size of 1.50 cm.

The physical characterization recorded an average density of 0.8943 g/ml, the refractive index was 1,496 and the solubility in 90% ethanol was 0.1 to 1.2 ml. The chemical characterization showed an ester number of 10.43 mg KOH/g oil and an acid number of 2.74 mg KOH/g oil. Gas chromatography coupled to mass spectroscopy recorded 62 volatile components the major being alphaphellandrene (17.13 %), alphaPinene (15.57 %), D - limmonene (11.03 %) and Camphene (10.92 %).

In the second stage the antimicrobial effect was studied. *Staphylococcus aureus*, the essential oil of the molle was considered an antimicrobial, with a minimum inhibitory concentration of 0.10 ml AE/ml inoculum in the death of 99.97% of the initial inoculum, with a lethality K of 0.0630 Log (UFC/ml)/h. In the case of *Escherichia coli* mild an antimicrobial effect in the first 2.40 hours it was observed.

Keywords: Essential oil, Steam distillation, Antimicrobial effect, Minimum inhibitory concentration, Lethality.

I. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Identificación del problema

El Perú posee una gran diversidad de plantas medicinales como el *Schinus molle* L. utilizado en forma directa y empírica en zonas rurales. Es una planta con actividad antifúngica y antimicrobiana principalmente en las hojas (Gundidza, 1993). Además, tiene importancia etnobotánica, pues se la ha utilizado en el control de plagas agrícolas en varias localidades del Perú (Rodríguez *et al.*, 1996).

Por lo tanto surge la necesidad de obtener aceite esencial de molle para su comercialización aprovechando su actividad antimicrobiana, esto generaría el desarrollo de productos naturales en nuestro país. Dentro de los componentes químicos del aceite esencial de molle (*Schinus molle* L.) se ha considerado al pineno y terpinen-4-ol debido a su efecto antimicrobiano sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia Coli* (De Mendonça *et al.*, 2012).

En los últimos años se han presentado diversas enfermedades que pueden transmitirse por medio del contacto físico, además existen bacterias que pueden dañar nuestra salud y esto ocurre por falta de higiene, por ejemplo no lavarse las manos continuamente. Unas de las bacterias más comunes en nuestras manos son *Staphylococcus aureus* y *Escherichia Coli*, este último puede producir infección urinaria y gastroenteritis (Rodríguez *et al.*, 2016).

Debido a la creciente demanda de productos naturales, nuestra investigación plantea en formular lo siguiente:

¿Cuál es el efecto antimicrobiano del aceite esencial de hojas de molle (*Schinus molle L.*), considerando su caracterización física y química, obtenido por el método de arrastre con vapor sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia Coli*?

1.2. Formulación del problema

Problema general

¿Cuál es la caracterización física, química y el efecto antimicrobiano del aceite esencial de molle (*Schinus molle L.*) obtenido por el método de arrastre con vapor?

Problemas específicos

- a) ¿Cuáles son las condiciones adecuadas para la obtención del aceite esencial de molle (*Schinus molle L.*)?
- b) ¿Cuáles son los componentes activos del aceite esencial de molle (*Schinus molle L.*) que le confiere efecto antimicrobiano?
- c) ¿Cuál es el efecto antimicrobiano del aceite esencial de molle (*Schinus molle L.*) sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia Coli*?

1.3. Objetivos de la investigación

Objetivo General

Determinar la caracterización física, química y el efecto antimicrobiano del aceite esencial de molle (*Schinus molle* L.) obtenido por el método de arrastre con vapor.

Objetivos Específicos

- a) Determinar las condiciones adecuadas para la obtención del aceite esencial de molle (*Schinus molle* L.).
- b) Determinar los componentes activos del aceite esencial de molle (*Schinus molle* L.) que le confiere efecto antimicrobiano.
- c) Determinar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de molle (*Schinus molle* L.) sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia Coli*.

1.4. Justificación

Los resultados de la investigación que se desarrolló tienen valiosos aportes en los siguientes contextos:

Teórica: La presente investigación nos permitió determinar la caracterización química y efecto antimicrobiano del aceite esencial de molle (*Schinus molle* L.) obtenido por el método de arrastre con vapor.

Económica: El árbol de molle es una especie abundante y de fácil adquisición por ello se determinó el efecto antimicrobiano del aceite esencial del molle y por consecuencia este producto tendría una buena aceptación entre los consumidores debido al incremento de productos naturales en el mercado.

1.5. Importancia

El Perú posee una gran diversidad de plantas medicinales como el molle utilizado en forma empírica en zonas rurales. Además el aceite esencial de hojas de molle presenta diferentes propiedades, entre las cuales resaltamos la actividad antimicrobiana ya que la información sobre esta propiedad de la especie en estudio es reducida.

Este trabajo de investigación permitió la obtención de aceite esencial de hojas de molle a partir del método por arrastre con vapor. Además el trabajo contribuyó al conocimiento de las características físicas y químicas del aceite esencial de molle y dejara abierta la posibilidad de su mejor aprovechamiento a nivel industrial, como fuente para obtener productos naturales como antimicrobianos que cumplan la función de disminuir el efecto patógeno sobre las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* causantes de numerosas enfermedades.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes del estudio

Los estudios que se han realizado a nivel mundial sobre el *Schinus molle* L. se han enfocado en la composición química de su aceite esencial. A continuación se mencionan algunos de los estudios realizados:

- BANDONI, Arnaldo. “Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica: su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores”. 2003. El objetivo de este trabajo es describir las principales características de las plantas, algunas propiedades que le otorgan valor comercial, las aplicaciones industriales que tienen y su control de calidad.
- BELHAMEL, K., ABDERRAHIM, A., LUDWIG, R. “Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Schinus molle* L. grown in Algeria”, 2008. El presente trabajo tuvo como objetivo mostrar los componentes principales y la actividad antibacteriana del aceite esencial de molle utilizando el método de caldo de microdilución contra las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli*.
- DE MENDONÇA ROCHA, Pedro, RODILLA, Jesús, DIEZ, David, ELDER, Heriberto, GUALA, María Silvia, SILVA, Lucia, BALTAZAR

POMBO, Eunice. "Synergistic Antibacterial Activity of the Essential Oil of Aguariabay (*Schinus molle* L.)", 2012.

Este trabajo tiene como objetivo determinar la composición química y la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Schinus molle* L. sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y en *Pseudomonas aeruginosa*.

- ERYIGIT, Tamer, YILDIRIM, Bunyamin, EKICI, Kamil, ÇIRKA, Mustafa. "Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Properties of *Schinus molle* L. Essential Oil from Turkey", 2017. El presente trabajo tiene como objetivo determinar la actividad inhibidora del aceite esencial de molle sobre *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* y *Saccharomyces cerevisiae*.
- LLANOS ARAPA, Karen Shepanie. "Extracción y caracterización del aceite esencial de molle (*Schinus molle* L.)", 2012. El objetivo de este trabajo estuvo orientado a la extracción de aceite esencial del fruto del molle de Tacna, así como a la caracterización físico-química e identificación de sus componentes principales y su actividad antimicótica ante *Penicillium italicum*.
- MEHANI M., SEGNI L. "Antimicrobial Effect of Essential Oil of Plant *Schinus molle* on some bacteria pathogens", 2013. El presente estudio revela que el aceite esencial del molle tiene un efecto antimicrobiano sobre *Pseudomonas aeruginosa strain*, *Escherichia coli* y *Proteus are*.

- VITURRO, Carmen, BANDONI, Arnaldo, DELLACASSA, Eduardo, SERAFINI ATTI, Luciana, ELDER, Heriberto. "Normalización de productos naturales obtenidos de especies de la flora aromática latinoamericana - Problemática Schinus en Latinoamérica", 2010. El presente trabajo tuvo como objetivo la caracterización del aceite esencial de *Schinus molle* L. y *Schinus areira* y de esta manera definir una normativa de calidad.

2.2. Marco teórico

2.2.1. Descripción y características del *Schinus molle* L.

a) Historia, distribución geográfica y hábitat

El molle es un árbol originario del Perú y extendido a toda el área andina durante el período pre-hispánico (Ecuador a Chile y Bolivia). Después de la Conquista, fue llevado por los españoles a Centroamérica y a México, donde recibió, por eso, el nombre de "Perú" o de "Árbol del Perú". Posteriormente, a fines del siglo XVIII, se introdujo en California, a partir de la Misión de San Luis Rey en San Diego. Parece que, simultáneamente, llegó a Europa, ya que varios botánicos de ese siglo lo mencionan en España. En la actualidad, existe en todo el trópico y su uso es mencionado en el Mediterráneo, en África y en la India. 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,

progresan en terrenos secos y rocosos gracias a sus raíces bien desarrolladas, las que pueden llegar hasta 20 a 30 m de profundidad para buscar agua. Requieren suelos arcillosos o arenosos, es exigente en luz, ligeramente resistente a las heladas, resistente a las termitas y a la sequía (Salazar *et al.*, 2001).

b) Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica del *Schinus molle* L. reportada por el Herbario del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Ver Anexo N° 2), es la siguiente:

Reino : *Plantae*
Phyllum : *Spermatophyta*
Subphyllum : *Magnoliophyta*
Clase : *Magnoliopsida*
Subclase : *Rosidae*
Orden : *Sapindales*
Familia : *Anacardiaceae*
Género : *Schinus*
Especie : *Schinus molle* L.

c) Nombre común

Los nombres más comunes del *Schinus molle* L. se presentan en el Cuadro N° 2.1

CUADRO N° 2.1
NOMBRES COMUNES DEL *Schinus molle* L.

País	Nombre común
Argentina	Aguaribay, terebinto, árbol de la pimienta, Gualeguay
Brasil	Pimenteiro, aroeira, amescia, anoeira-periquita
Chile	Pimentero
Colombia	Muelle, falso pimienta, pimienta
Ecuador	Mullí
México	Pirul, pirú, árbol del Perú
Perú	Molle, cuyash, huaribay

Fuente: Salazar *et al.*, 2001

d) Caracterización botánica

Árbol siempre verde con alturas de 3 a 10 m y diámetros de 15 a 35 cm, fuste grueso, corto, tortuoso, ramificado a poca altura; copa abierta, redondeada de hasta 8 m de diámetro; ramas péndulas y flexibles. La corteza es rugosa, de color cenizo, que se desprende en placas pequeñas. El grosor total de la corteza de hasta 10 mm (Salazar *et al.*, 2001).

Hojas compuestas, alternas, de 10 a 30 cm de largo, peciolo de 2 a 5 cm de largo; de 10 a 39 folíolos, opuestos, linear-lanceolados, de 2 a 8 cm de largo y de 0.3 a 1 cm de ancho, dentados, de base cuneada o truncada, ápice agudo a acuminado, de color verde claro cenizo.

Inflorescencias de panículas múltiples, terminales o axilares, pubescentes de 10 a 20 cm de largo; flores amarillo verdosas pequeñas (Salazar *et al.*, 2001).

En la figura N° 2.1 se puede apreciar las hojas y el fruto de *Schinus molle* L.

FIGURA N° 2.1
PLANTA DE *Schinus molle* L.



Fuente: Elaboración propia

El fruto es una drupa semi-carnosa, globosa, de 4 a 6 mm de diámetro, de color rosado a marrón vermejo con exocarpio delgado y resinoso; endocarpio duro, leñoso (Salazar *et al.*, 2001).

e) Composición química del *Schinus molle* L.

Hojas

Contienen flavonoides (quercetina, rutina, quercitrina e isoquercitrina), pigmentos antocianídicos, triterpenos, β -sitosterol, taninos, ácido gálico,

ácido protocatéquico, glucosa, fructosa y aceite esencial (0,5%). Además los ácidos linolénico, linoleico, lignocérico y esteárico (presente también en corteza y semillas) (Cóndor, 2014).

Frutos

Se han aislado aceites esenciales conteniendo: α -bergamontranseno, bourboneno, α y δ - cadineno, α y γ -calacoreno, calameneno, canfeno, carvacrol, β - cariofileno, γ -copaeno, croweacina, γ -cubebeno, p-cimeno, butirato de geraniol, hexanoato de nerol, α y β -felandreno, α y β -pineno, α -terpineol, γ -terpineno, α y γ -muroleno, etc. Además: cianidina-3-galactósido, cianidina-3-rutinósido y peonidina-3- glucósido (Cóndor, 2014).

f) Usos

Reforestación y medio ambiente

Al desarrollarse la planta crea un efecto restaurador en el medio, promueve la conservación de suelo y el control de la erosión. Se trata de uno de los pocos árboles que prosperan en pedregales y lomeríos. Mejora la fertilidad del suelo, ya que las hojas, ramas y frutos caen al suelo abundantemente y así constituyen una buena materia orgánica. Además, juega un rol importante en la recuperación de terrenos degradados, como cerca viva en los agro-hábitats, y como barrera rompe vientos. Se acostumbra su uso ornamental, se planta a orilla de caminos, en calles, parques y jardines; por ejemplo, es una de las plantas de sombra y ornato

más comunes en el sur de Europa, en el sur de California y en el Valle de México. Además, proporciona sombra y refugio para la vida silvestre y para el ganado (Sistema Nacional de Información Forestal de México, 2010).

Uso etnomedicinal

Las propiedades y acciones de las partes del *Schinus molle* L. (Hoja, flor, fruto, corteza, exudado) son conocidos como analgésicos, antibacterial, antidepresivo, antimicrobial, antifúngico, antiviral, antiespasmódico, astringente, balsámico, citotóxico, diurético, expectorante, hipotensivo, purgativo, estomáquico, tónico, uterino, estimulante. En México se recomienda para padecimientos digestivos (cólicos, bilis, dolor de estómago y estreñimiento) y se emplea como purgante y diurético (Sistema Nacional de Información Forestal de México, 2010).

Las hojas (en cocimiento o machacadas) se usan para lavados en casos de enfermedades venéreas (gonorrea), ojos irritados, conjuntivitis y cataratas. La infusión de la corteza disminuye las inflamaciones y favorece la cicatrización de las úlceras (Sistema Nacional de Información Forestal de México, 2010).

La resina es sumamente peligrosa, pero se ha usado en dolor de muelas, dientes picados y para cicatrizar heridas. La planta entera se usa externamente para fracturas y como un antiséptico local. En

inhalación las hojas de pirul (muchas veces mezcladas con hojas de eucalipto) se usan para aliviar resfriados, afecciones bronquiales, hipertensión, depresión y arritmia. Mezclada la corteza con las hojas, sirve para la hinchazón y dolor en enfermedades venéreas y genito-uritarias. Corteza (cocción): remedio en pies hinchados y purgantes para animales domésticos (Sistema Nacional de Información Forestal de México, 2010).

El aceite esencial de las hojas frescas posee actividad antibacterial, antiviral, antifúngica y antimicrobial. Las siguientes bacterias y hongos exhiben una sensibilidad significativa al aceite (Sistema Nacional de Información Forestal de México, 2010):

Bacterias: *Klebsiella pneumoniae*, *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Leuconostoc cremoris*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Clostridium sporogenes*, *Acinetobacter calcoacetica*, *Escherichia coli*, *Beneckea natriegens*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis* y *Brochothrix thermosphacta* (Sistema Nacional de Información Forestal de México, 2010).

Hongos: *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium culmorum* y *Alternaria alternata* (Sistema Nacional de Información Forestal de México, 2010).

En el cuadro N° 2.2 se presenta los usos del molle en medicina tradicional del Cuzco (Perú).

CUADRO N° 2.2
USOS DE MOLLE EN MEDICINA TRADICIONAL DEL CUZCO (PERÚ)

Parte de la planta	Forma de preparar	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
Hojas, frutos	Decocción	Interno	---
Frutos	Decocción	Interno	---

Fuente: Viturro et al., 2010

g) Otros usos

Existen muchas investigaciones donde se mencionan diversos usos que nos proporciona el *Schinus molle* L. En el cuadro N° 2.3 presentamos algunos usos más comunes del molle.

CUADRO N° 2.3
OTROS USOS DE *Schinus molle* L.

USOS	
Aromatizante (toda la planta)	Todo el árbol despiden un intenso olor perfumado debido a la presencia de abundantes aceites esenciales y volátiles.
Base para chicle exudado (resina)	Su resina blanquecina es usada en América del Sur como goma de mascar, se dice que fortalece las encías y sana las úlceras de la boca.
Colorantes (hoja, tallo, corteza, raíz)	El cocimiento de hojas, ramas, corteza y raíz se emplea para el teñido amarillo pálido de tejidos de lana.
Condimento / Especias (fruto)	Los frutos secos se han empleado en algunos países para adulterar la pimienta negra.
Cosmético / Higiene (hoja)	De las hojas se extrae un aceite aromatizante que se usa en enjuagues bucales y como dentífrico.
Forrajero (fruto)	Importante alimento para pájaros. Implementos de trabajo (madera). Mangos de herramientas, estacas y fustes de sillas de montar.
Industrializable exudado (resina), ceniza	La resina se podría utilizar en la fabricación de barnices. Su ceniza rica en potasa se le usa como blanqueador de ropa.
Insecticida / Tóxica, fruto, hoja (aceite)	El aceite esencial de las hojas y frutos ha mostrado ser un efectivo repelente de insectos, particularmente contra la mosca casera.

Fuente: Sistema Nacional de Información Forestal de México, 2010

2.2.2. Aceites esenciales

a) Definición

Son mezclas complejas de componentes volátiles, que resultan del metabolismo secundario de plantas; están compuestos por hidrocarburos del grupo de los terpenos, y por compuestos oxigenados de bajo peso molecular como los son los alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos, éstos son los que le dan a los aceites esenciales el aroma que los caracteriza (Díaz, 2007).

Los aceites esenciales se diferencian de los aceites fijos, por las características de su densidad que es inferior a la del agua, índice de refracción elevado y la mayoría de ellos desvían la luz polarizada; además los aceites esenciales son lipofílicos y miscibles en los disolventes orgánicos habituales (Universidad Nacional del Santa).

b) Ubicación de los aceites esenciales en las plantas

Los aceites esenciales se ubican en las diferentes partes de la planta, tales como raíces, tallos, hojas, flores y frutos, cáscara de frutos, encontrándose confinado en un tejido de la planta al cual se le denomina micela (Universidad Nacional del Santa).

c) Composición química de los aceites esenciales

Los metabolitos secundarios volátiles que componen los aceites esenciales se pueden clasificar en base a los grupos funcionales que contienen sus moléculas (Díaz, 2007).

En el cuadro N° 2.4 se muestra los grupos funcionales de las moléculas que constituyen los aceites esenciales.

CUADRO N° 2.4
GRUPOS FUNCIONALES DE LAS MOLÉCULAS CONSTITUYENTES
DE LOS ACEITES ESENCIALES

Grupo funcional	Naturaleza química	Ejemplo
Hidrocarburos	Terpénicos	Limoneno, α -terpineno
	Aromáticos	Cumeno, p-cimeno
	Sesquiterpénicos	Trans- β -cariofileno
Aldehídos	Monoterpénicos	Citral
	Alifáticos	Nonanal, octadecanal
	Aromáticos	Cinamaldehído
Alcoholes	Monoterpénicos	Geraniol, citronelol
	Alifáticos	3-decanol
	Sesquiterpénicos	Espatulenol, cedrol
	Aromáticos	Alcohol bencílico
Fenoles	Aromáticos	Timol, carvacrol

Fuente: Díaz Fajardo Olga. 2007

Si bien la composición química de los aceites es muy variada, todos ellos poseen varias propiedades físicas en común, por ejemplo: tienen alto índice de refracción y son ópticamente activos (Universidad Nacional del Santa).

d) Factores que influyen sobre la composición química de los aceites esenciales

Existen diversos factores que influyen en la composición química de los aceites esenciales, los cuales se presentan en el cuadro N° 2.5.

**CUADRO N° 2.5
FACTORES QUE INFLUYEN EN LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE
LOS ACEITES ESENCIALES**

Factores	Ejemplos
Condiciones geobotánicas del medio	Clima, altitud, tipo de suelo, cantidad de lluvias, etc.
Método de cultivo	Fertilizantes, abonos y pesticidas
Uso de productos químicos	Fertilizantes, abono, pesticidas, otros químicos, etc.
Época de recolección y parte de la planta	Raíz, tallo, hojas, semillas, etc.
Modo de manejo y almacenamiento del material vegetal	Fresco, seco, fermentado, tratamiento post cosecha; etc.
Método de obtención del aceite	Destilación, maceración, prensado, extracción con solventes, extracción con fluidos supercríticos, etc.

Fuente: Universidad Nacional del Santa

e) Propiedades fisicoquímicas

Dentro de las propiedades fisicoquímicas más destacables de los aceites esenciales se encuentran la volatilidad, inestabilidad ante la luz y el oxígeno, ante la presencia de agentes oxidantes y reductores,

medios con pH extremos, o trazas de metales que pueden catalizar reacciones de descomposición, etc. Los aceites esenciales refractan la luz polarizada, propiedad que es usada para su control de pureza, pues tienen por ello un índice de refracción característico. También presentan un poder rotatorio característico, en razón de que poseen en su composición numerosos productos ópticamente activos. Poseen una densidad normalmente menor que la del agua, excepto algunas esencias como la de clavo, y en general son líquidos traslúcidos y amarillentos o pardo amarillento (Bandoni, 2000).

2.2.3. Aceite esencial del *Schinus molle* L.

La composición química del aceite de molle es compleja y varía en función del órgano o parte de la planta estudiados, múltiples estudios reflejan que la variabilidad se puede atribuir en gran medida a factores intrínsecos de quimiotipo (estado de desarrollo fenológico de la especie, parte de la planta estudiada, etc.) y a factores de naturaleza extrínseca, además de los métodos y condiciones de extracción usados (Llanos, 2012).

Estudios realizados por diferentes autores han evaluado el contenido de aceite esencial en diversas partes del *Schinus molle* L. En el Cuadro N° 2.6 se puede observar el contenido porcentual de aceite esencial en *Schinus molle* L. registrado por diversos autores.

CUADRO N° 2.6
CONTENIDO PORCENTUAL DE ACEITE ESENCIAL EN
***Schinus molle* L. (REGISTRADO POR VARIOS AUTORES)**

Lugar de estudio	Parte de la planta	Contenido de aceite esencial (%)
Kramer (1957) Universidad de Nevada, E.UU	Hojas	Hasta 2%
Dikshit et al. (1986) Instituto Central de Plantas Medicinales y Aromáticas, India.	Hojas frescas	Hasta 0,8%
	Hojas secas	Hasta 2%
Zeng Yueqin (2006) Universidad de Valencia, España.	Frutos	De 3 a 5%
	Hojas	De 0,2 a 1%
Figmay S.R.L. Argentina.	Frutos secos	De 5 a 7%
Sistema Nacional de Información Forestal de México (2010).	Frutos	Hasta 5%
	Hojas	Hasta 2%
Viturro et al. (2010) Proyecto CYTED IV.20, Pontificia Universidad Católica - Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.	Hojas secas	De 1 a 3,04%
	Frutos frescos	De 2,6 a 5,6%
	Frutos secos	De 5,3 a 5,6%

Fuente: Llanos Arapa Karen Shepanie. 2012

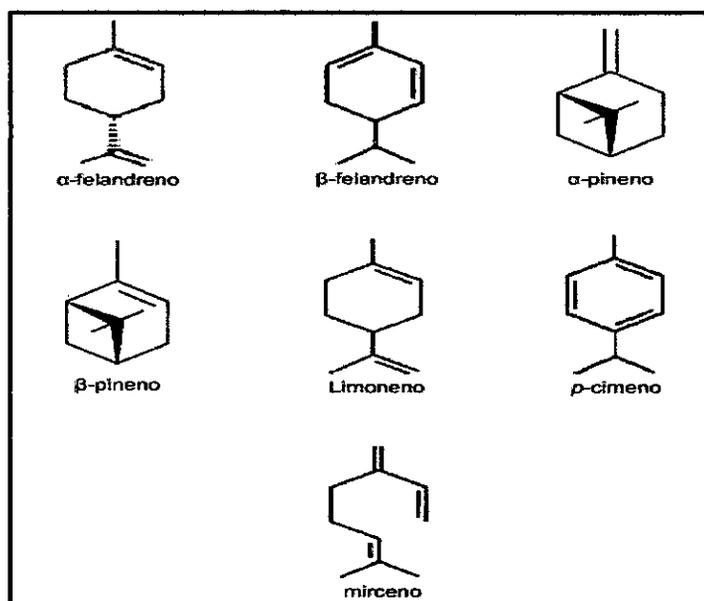
a) Metabolitos secundarios volátiles reconocidos

Los compuestos mayoritarios en los frutos son 11: seis monoterpenos, el octanoato de metilo y cuatro sesquiterpenos. Los que caracterizan al aceite esencial son α -felandreno, β -pineno, limoneno y β -felandreno.

Los compuestos en el aceite esencial de hojas presentan 13 monoterpenos, un alcohol monoterpenico, tres sesquiterpenos y seis alcoholes y un epóxido sesquiterpénicos, El compuesto mayoritario en el aceite esencial de hojas es sabineno (Viturro *et al.*, 2010).

En la figura N° 2.2 se puede apreciar la estructura molecular de algunos de los componentes volátiles más comunes del aceite esencial de *Schinus molle* L.

FIGURA N° 2.2
ESTRUCTURA MOLECULAR DE LOS COMPONENTES VOLÁTILES
MÁS COMUNES DEL ACEITE ESENCIAL DE MOLLE



Fuente: Llanos Arapa Karen Shepanie. 2012

Algunos de los primeros trabajos identificaron al carvacrol como uno de los componentes volátiles principales del aceite esencial, aunque en trabajos modernos sólo se encontraron vestigios (Viturro *et al.*, 2010).

Existen datos variados con respecto a la composición volátil del aceite esencial de molle, por lo cual no se puede llegar a una conclusión definida acerca de su composición, pero si se pueden mencionar los componentes volátiles más comunes.

En el cuadro N° 2.7 se hace una descripción de los componentes más comunes del aceite esencial del molle.

CUADRO N° 2.7
COMPONENTES MÁS COMUNES DEL ACEITE ESENCIAL DE
***Schinus molle* L.**

Componente	Fórmula química	Nombre IUPAC
α-felandreno	C ₁₀ H ₁₆	2-metil-5-(1-metiletil)-1,3-ciclohexadieno
β-felandreno	C ₁₀ H ₁₆	1-isopropil-4-metil-2,4-ciclohexadieno
α-pineno	C ₁₀ H ₁₆	2, 6, 6-trimetilbiciclo [3.1.1] hept-2- en
β-pineno	C ₁₀ H ₁₆	6,6-dimetil-2-metilenebiciclo [3.1.1] heptano
Limoneno	C ₁₀ H ₁₆	4-isopropenil-1-metilciclohexeno
p-cimeno	C ₁₀ H ₁₄	6,6-dimetil-2-metilenebiciclo [3.1.1] heptano
Mirceno	C ₁₀ H ₁₆	7-metil-3-metileno-1,6-octadieno

Fuente: Llanos Arapa Karen Shepanie. 2012

En el cuadro N° 2.8 se presenta la composición de aceite esencial de frutos y hojas del molle en el Perú.

CUADRO N° 2.8
COMPOSICIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE FRUTOS SECOS Y HOJAS
DE MOLLE – PERÚ

Compuesto	Porcentaje	
	Aceite esencial de hojas	Aceite esencial de frutos
triciclono	0.8	-
α -thujeno	0.9	-
α -pineno	4.5	2.8
canfeno	6.1	-
sabineno	19.1	-
β -pineno	2.5	27.5
mirceno	1.0	-
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)-diene	2.9	-
octanoato de metilo	-	1.3
Γ -cariofileno	1.3	1.0
Δ -cadineno	8.2	2.7
oxido de cariofileno	0.9	-
D-germacreno	1.5	0.4
B-germacreno	-	1.7
spathulenol	6.0	-
α -cadinol	1.5	-
1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahidro-a', a',4a,8-tetrametil-2- naftalenometanol	4.8	-
T-cadinol	1.9	-

Fuente: Viturro Carmen, *et al.*, 2010

b) Actividad biológica

Un estudio en 1986, demostró que el aceite esencial de molle, frente a otros aceites ensayados, fue el más efectivo contra los hongos patógenos en animales: *Microsporium gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum*, y mostró actividad moderada frente a los contaminantes *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus* y *Penicillium italicum*, comunes en condiciones de almacenamiento. En otro estudio similar, las especies fúngicas *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium culmorum* y *Alternaria alternata*, exhibieron también una sensibilidad significativa ante este aceite esencial. Incluso en 1996, se patentó un medicamento cuya base es el aceite esencial de molle, este producto se utiliza para el tratamiento de infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* en humanos y animales. También, en 1997, se concedió una patente para un medicamento similar, de tipo antiséptico, de aplicación local en heridas abiertas (Llanos, 2012).

Datos más recientes, informan su actividad insecticida; en Bahía Blanca (Argentina) el aceite esencial de los frutos produjo un efecto antimicrobiano fuerte (62%) y el de hojas leve (40,6%) sobre el gorgojo del arroz (*Sitophilus oryzae*. L.). En Santa Fe (Argentina) el aceite esencial ejerció un mayor efecto mortal sobre el ácaro *Varroa destructor* (que ataca los colmenares de abejas produciendo varroasis) en comparación al efecto producido por dos productos sintéticos. En otro

estudio, el aceite fue micro-encapsulado y suministrado in vitro a abejas melíferas y ácaros del Varroa destructor, la mortalidad de los ácaros alcanzó valores cercanos al 90 % cuando se utilizó la dosis de 1 g (Llanos, 2012).

c) Aplicaciones comerciales

Medicina natural

La empresa Inka Natural S.A. (dedicada a la elaboración y comercio de productos terapéuticos de origen natural), tiene entre sus productos al aceite esencial de molle en presentaciones de 10 ml y 500 ml, recomendándolo como: “efectivo para todas las enfermedades de las vías respiratorias, sirven además como poderosos antibióticos y anti inflamatorios cutáneos y musculares...” (Inka Natural S.A., 2010). Estos productos se venden sin indicación médica previa (Llanos, 2012).

Pomada corporal

La crema corporal humectante “Sumaq” elaborada por Rossana Alberca y Vanessa Jiménez (Universidad del Pacífico de Perú), está compuesta por un 80 % de ingredientes naturales entre ellos el aceite de molle (primordialmente) y un 20 % de preservantes artificiales aprobados por el FDA; y ya se aplicó para el tratamiento del reumatismo (Llanos, 2012).

d) Propiedades físicas

Las propiedades son rendimiento, densidad relativa e índice de refracción, ya que son indicadores que permiten identificar al aceite y fomentar la aplicación de esta especie aromática, además de contribuir al proceso de normalización, el ajuste de la producción y la valorización del aceite (Viturro *et al.*, 2010).

En el cuadro N° 2.9 se presenta las propiedades físicas del aceite esencial de *Schinus molle* L. registradas en varios países.

CUADRO N° 2.9
PROPIEDADES FÍSICAS DEL ACEITE ESENCIAL DE *Schinus molle*
L. REGISTRADAS EN VARIOS PAÍSES

País	Parte de la planta	Rendimiento (%)	Índice de refracción 20°C	Densidad (g/cm³) 20°C
Argentina	Frutos	2,6%	1,4750 a 1,4850	0,8500 a 0,9000
Bolivia	Frutos maduros	5,6%	1,4780	0,8449
	Frutos verdes	1,1%	1,4780	0,8548
	Hojas y ramas	0,5%	1,4900	0,8531
Brasil	Hojas secas	1,0 a 2,0%	-----	-----
Costa Rica	Hojas secas	0,8%	-----	-----
Ecuador	Frutos maduros secos	3,3 a 5,6%	1,4741 a 1,4788	0,8292 a 0,8390
Perú	Hojas	1,8%	1,4951 a 1,5032	-----
	Frutos	5,15%	1,4951 a 1,4980	-----

Fuente: Viturro Carmen, *et al.*, 2010

2.2.4. Métodos de obtención de aceite esencial

Existen varios métodos utilizados para la obtención de aceites esenciales a partir de plantas aromáticas, los que se describen a continuación:

a) Destilación por arrastre con vapor

Es el método más usado a nivel industrial, permite obtener aceite esencial con buenos rendimientos, y además se pueden procesar grandes cantidades de material vegetal. Aquí, la materia prima vegetal es cargada de manera que forme un lecho fijo compactado; su estado puede ser molido, cortado, entero o la combinación de éstos. El vapor de agua es inyectado mediante un distribuidor interno, próximo a su base y con la presión suficiente para vencer la resistencia hidráulica del lecho (Vargas y Bottia, 2008).

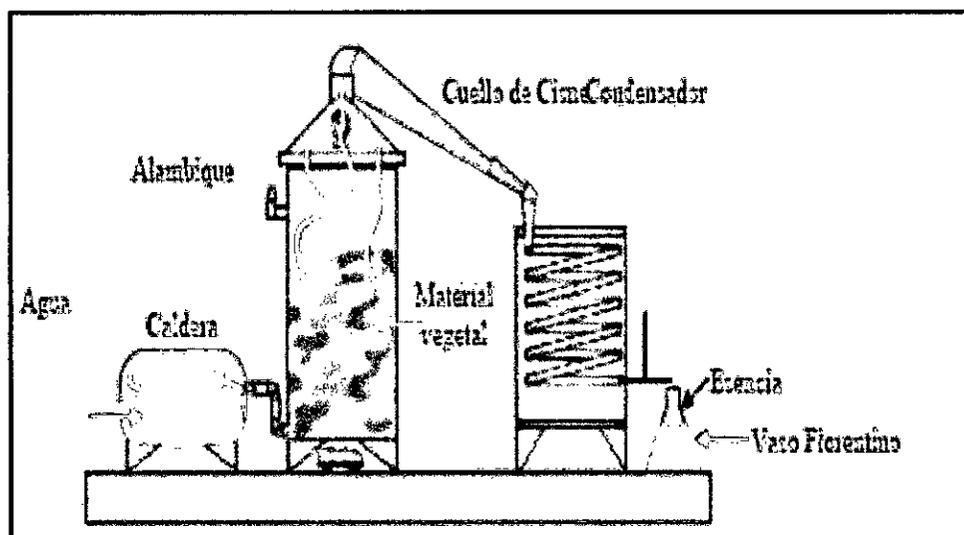
La generación del vapor puede ser local (hervidor), remota (caldera) o interna (base del recipiente). Conforme el vapor entra en contacto con el lecho, la materia prima se calienta y va liberando el aceite esencial, el cual debido a su alta volatilidad se evapora y al ser soluble en el vapor circundante es “arrastrado” corriente arriba hacia el tope del destilador. La mezcla, vapor saturado y aceite esencial, fluye hacia un condensador mediante una prolongación curvada del conducto de salida del destilador (Cerpa, 2007).

En el condensador, la mezcla es enfriada hasta la temperatura ambiental, a su salida, se obtiene una emulsión líquida inestable la cual es separada

en un decantador dinámico o florentino, éste equipo está lleno de agua fría al inicio de la operación y el aceite esencial se va acumulando debido a su casi inmiscibilidad en el agua y a la diferencia de densidad con la misma (Cerpa, 2007).

La destilación por arrastre con vapor se presenta en la figura N° 2.3.

FIGURA N° 2.3
DESTILACIÓN POR ARRASTRE CON VAPOR



Fuente: Márquez. 2011

b) Destilación con agua (Hidrodestilación)

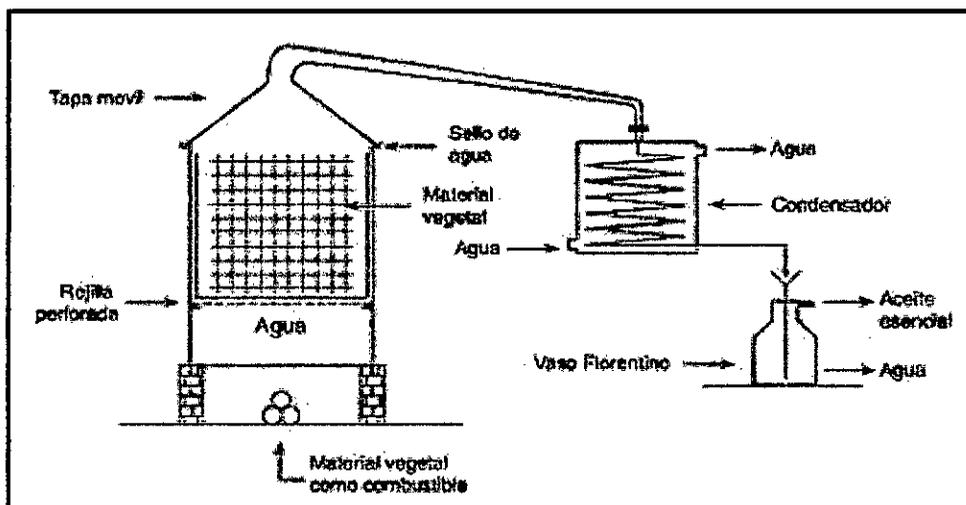
El principio de la destilación en agua es llevar a estado de ebullición una suspensión acuosa de un material vegetal aromático, de tal manera que los vapores generados puedan ser condensados y colectados. El aceite, que es inmisible en agua, es posteriormente separado. En la destilación con agua el material vegetal siempre debe encontrarse en contacto con el agua. El material vegetal en el extractor se aconseja mantenerlo en

constante agitación a fin de evitar aglomeraciones o sedimentación del mismo en el fondo del recipiente, lo cual puede provocar su degradación térmica (Bandoni, 2003).

c) Destilación con agua- vapor

En este caso el vapor puede ser generado mediante una fuente externa o dentro del propio cuerpo del extractor, aunque separado del material vegetal. La diferencia radical existente entre estos sistemas y el anteriormente mencionado es que el material vegetal se encuentra suspendido sobre un tramado (falso fondo) que impide el contacto del material vegetal con el medio líquido en ebullición. Este sistema reduce la capacidad neta de carga de materia prima dentro del extractor pero mejora la calidad del aceite obtenido (Bandoni, 2003). El equipo tradicional de destilación vapor- agua se muestra en la figura N° 2.4

FIGURA N° 2.4
EQUIPO TRADICIONAL DE DESTILACIÓN VAPOR-AGUA



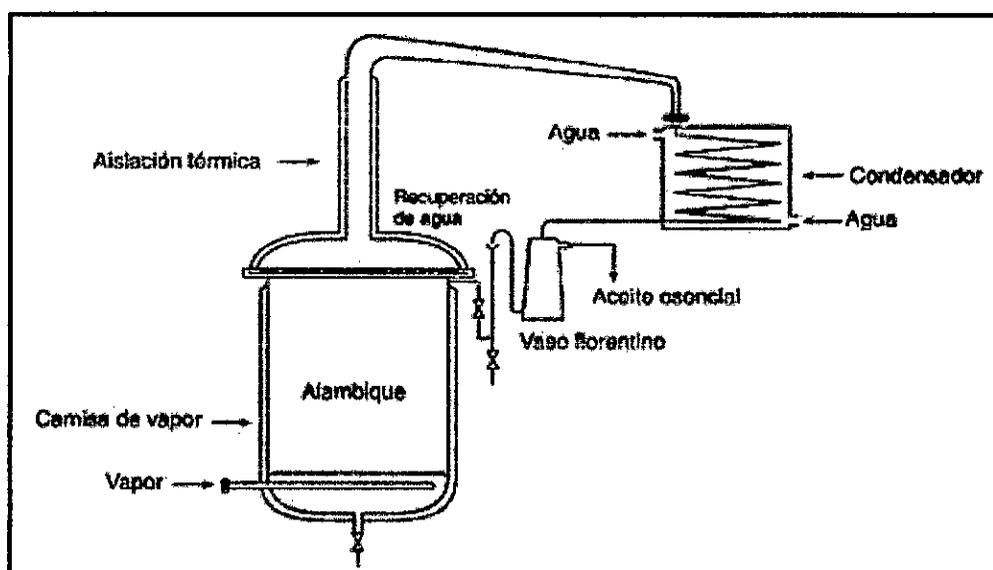
Fuente: Bandoni Arnaldo. 2003

d) Aplicación de la cohobación

La cohobación es un procedimiento que solamente puede ser utilizado para la destilación de vapor y destilación agua-vapor. El sistema de cohobación involucra el retorno del condensado de agua (una vez separado el aceite esencial) al cuerpo del extractor. Este hecho permite minimizar las pérdidas de componentes oxigenados, particularmente los fenoles que presentan una gran solubilidad en agua. El re-uso del agua condensada permitirá que ésta llegue a saturarse con los constituyentes disueltos de tal manera que no será capaz de disolver mayor número de componentes (Bandoni, 2003).

A continuación, se presenta el esquema de un destilador con sistema de cohobación en la figura N° 2.5.

FIGURA N° 2.5
ESQUEMA DE UN DESTILADOR CON SISTEMA DE COHOBACIÓN



Fuente: Bandoni Arnaldo. 2003

e) Destilación previa maceración

En algunos casos las plantas aromáticas requieren ser sometidas a un proceso de maceración en agua caliente para favorecer la separación de su aceite esencial ya que sus componentes volátiles están ligados a otras sustancias, formando componentes glicosidados. El método se aplica para extraer el aceite de semilla de almendras amargas, bulbos de cebolla, bulbos de ajo, semillas de mostaza (Bandoni, 2003).

f) Extracción con fluidos en estado supercrítico

El material vegetal cortado en trozos pequeños, licuado o molido, se empaca en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra un líquido supercrítico (por ejemplo bióxido de carbono líquido), las esencias son así solubilizadas y arrastradas y el líquido supercrítico que actúa como solvente extractor y se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente, y finalmente se obtiene una esencia pura (Universidad Nacional del Santa).

2.2.5. Microorganismos

a) Definición

El término microorganismo no tiene un significado taxonómico preciso restringido a un grupo biológico con propiedades estructurales y funcionales comunes. Por el contrario, cualquier organismo de

dimensiones microscópicas es, por definición, un microorganismo (Méndez, 2008).

b) Clasificación de los microorganismos

Los microorganismos son estudiados y clasificados por una rama de la biología que es la microbiología, de esta manera se clasifican principalmente en tres grupos: virus, hongos y bacterias (Méndez, 2008).

Virus

Son organismos simples, no pueden nutrirse, ni reproducirse por sí solos, lo que casi los convierte en parásitos pues dependen de su actividad intracelular ya sea animal o vegetal para subsistir. Pueden ser icosaedros si presentan una forma esférica, helicoidal o cilíndrica si es que son alargados, y los complejos que están formados por dos partes una cabeza y una cola (Méndez, 2008).

Hongos

Son organismos eucariotas uni o pluricelulares, siendo además heterótrofos y en su mayoría saprofitos. Su reproducción es por gemación, esporulación o fragmentación en el medio extracelular y se clasifican en levaduras o en hongos con hifas (Méndez, 2008).

Bacterias

Son células procariotas que no presentan núcleo y poseen un solo cromosoma, pueden multiplicarse por bipartición, conjugación,

transformación y transducción. Reciben su nombre según su forma, de esta manera si tienen forma alargada y cilíndrica serán denominados como bacilos, si tienen forma redondeada se denominarán cocos, los de aspecto helicoidal serán los espirilos, y los cortos y curvados con forma de coma se denominaran vibrios (Méndez, 2008).

Por su parte las bacterias se subclasifican en Gram (-) y Gram (+); las Gram negativas poseen en su pared celular una sola capa de peptidoglucanos a diferencia de las Gram positivas que presentan varias capas. En cuanto a su nutrición la mayoría de las bacterias son heterótrofas, otras, en menor cantidad, son autótrofas, saprofitas o simbioses (Méndez, 2008).

Existen pocas especies de bacterias que causan enfermedades en relación con la enorme cantidad de bacterias que tienen vida libre. A la mayoría se les conoce y están estudiadas pero sin embargo, continúan apareciendo patógenos nuevos y está claro que la aparición de las infecciones nuevas son siempre importantes (Méndez, 2008).

A continuación se presenta dos de las principales bacterias patógenas:
Escherichia coli ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

➤ ***Escherichia coli* ATCC 25922**

Es un bacilo gram negativo de flagelos peritricos, que no forma esporas tienen una dimensión de 0.5 µm de ancho por 3 µm de largo.

Dentro de su estructura antigénica tiene una constitución polisacárida formada por un antígeno capsular termolábil (Antígeno "K") y un antígeno somático localizado en la pared celular (Antígeno "O") e igualmente posee una constitución proteica la cual posee un antígeno flagelar (Antígeno "H"). Son microorganismos que dan catalasa positiva, oxidasa negativa y reducen los nitratos a nitritos, fermentan la glucosa a lactosa con producción de gas y son anaerobios facultativos (Calderón *et al.*, 2013). En la figura N° 2.6 se puede apreciar la morfología característica de la bacteria *Escherichia coli*.

FIGURA N° 2.6
Escherichia coli



Fuente: Méndez. 2008

Clasificación

Orden : *Eubacteriales*.

Familia : *Enterobacteriaceae*.

Género : *Escherichia*.

Especie : *coli*. (Méndez, 2008).

Morfología

Son bacilos Gramnegativos que poseen un tamaño de alrededor de 1.1-1.5 x 2.0-6.0 μm aerobios y anaerobios facultativos, fermentan la lactosa y son oxidasa negativa; las especies móviles tienen flagelos de localización peritrica (Méndez, 2008).

Principales patologías

Escherichia coli es la especie comensal involucrada con mayor frecuencia de las infecciones oportunistas. Sin embargo algunas cepas de *Escherichia coli* poseen capacidad patógena primaria, pudiendo causar infecciones en personas previamente sanas, sin factores predisponentes. Las principales patologías causadas por *Escherichia coli* de determinados serotipos son: Infecciones urinarias, enteritis, enteritis hemorrágica, diarrea secretora. (Méndez, 2008).

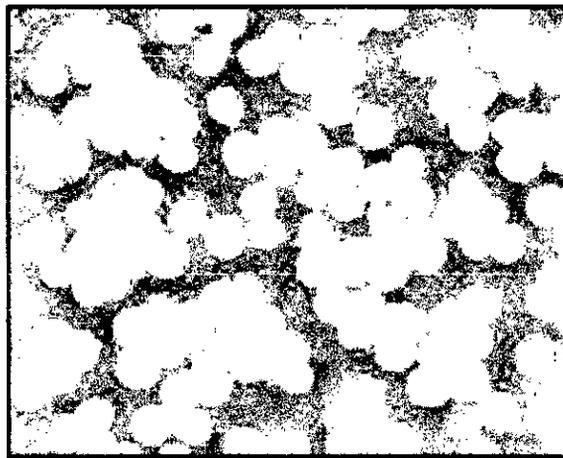
➤ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Es un microorganismo muy resistente a las condiciones ambientales y extremadamente difíciles de erradicar. Pese a que no es esporulado, soporta bien condiciones extremas aunque se inactiva a temperatura de congelación y puede eliminarse con una cocción correcta. Produce toxinas filtrables cuando crece en condiciones adecuadas, especialmente

en una atmósfera de alto contenido en dióxido de carbono (Méndez, 2008).

En la figura N° 2.7 se puede apreciar la morfología característica de la bacteria *Staphylococcus aureus*.

FIGURA N° 2.7
Staphylococcus aureus



Fuente: Méndez. 2008

Clasificación

- Orden : *Eubacteriale*.
Familia : *Micrococaceae*.
Género : *Staphylococcus*.
Especie : *aureus* (Méndez, 2008).

Morfología

Se presentan en forma de cocos de aproximadamente de 0.5-1.5 μm de diámetro agrupados en racimos. Son positivos en la tinción de Gram. Son

microorganismos inmóviles y no forman esporas. (Méndez, 2008).

Principales patologías

La acción patógena de *Staphylococcus aureus* se manifiesta por la capacidad de invasión del microorganismo y las sustancias que puede elaborar, que ayudan en el proceso infeccioso local y pueden causar lesión en lugares más distantes. Generalmente son infecciones con gran supuración y necrosis tisular que tienden a la formación de abscesos. Entre los principales cuadros clínicos tenemos: lesiones en piel y mucosas, infecciones generalizadas, bacteriemia, infecciones localizadas en vísceras, lesiones por acción principalmente exotóxica (Méndez, 2008).

2.3. Definición de términos básicos

Aceite esencial: Son compuestos odorífero que se volatilizan con vapor pero son poco solubles en agua; se evaporan a diferentes velocidades bajo presión atmosférica ordinaria y a una temperatura ambiente promedio de 24 °C.

Destilación por arrastre con vapor: Es un proceso que consiste en calentar un líquido hasta su temperatura de ebullición, el vapor que se retira del seno del líquido atraviesa la cámara que contiene la sustancia a extraer, generalmente se trata de una sustancia volátil e inmiscible, luego llega al refrigerante donde condensa y luego se recolecta como dos fases líquidas ya que la sustancia así extraída es inmiscible en agua.

Efecto antimicrobiano: Define las sustancias químicas que en bajas concentraciones son capaces de inhibir e incluso de destruir microorganismos sin producir efectos tóxicos en el huésped.

La concentración mínima inhibitoria (CMI): Es la menor concentración del antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento de 10^5 bacterias en 1 ml de medio de cultivo, tras 18-24 horas de incubación.

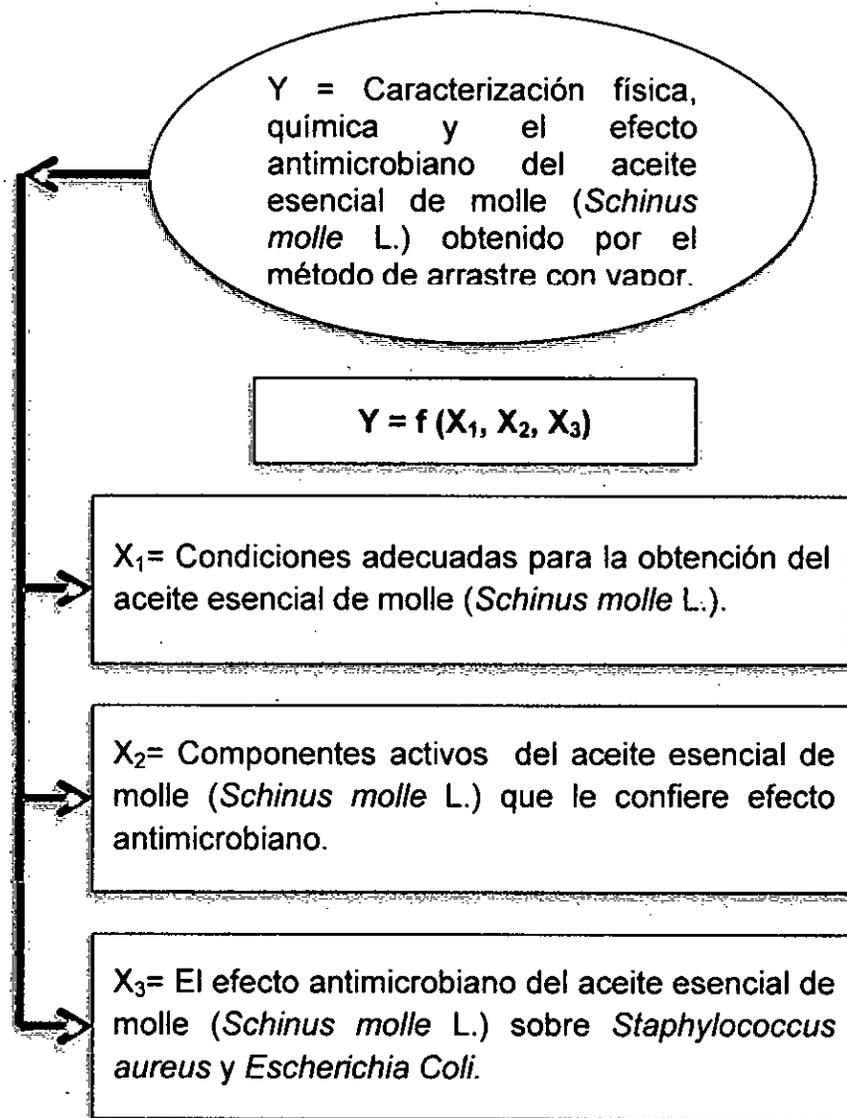
Letalidad: Velocidad de muerte de una bacteria

III. VARIABLES E HIPÓTESIS

3.1. Variables de la investigación

Dado que el trabajo es experimental se obtuvo las siguientes variables de investigación las cuales se representan en la figura N° 3.1.

FIGURA N° 3.1
VARIABLES DE INVESTIGACIÓN



Fuente: Elaboración propia

3.2. Operacionalización de variables

En el cuadro N° 3.1 se puede apreciar la operacionalización de variables.

CUADRO N° 3.1
OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

VARIABLE DEPENDIENTE	DIMENSIONES	INDICADORES	MÉTODO
Y = Caracterización física, química y el efecto antimicrobiano del aceite esencial de molle (<i>Schinus molle</i> L.) obtenido por el método de arrastre con vapor.	- %. - Adimensional - g/ml. - %v/v - mg KOH/g. - mg KOH/g	- Rendimiento. - Índice de refracción. - Densidad y densidad relativa. - Solubilidad en etanol. - Índice de acidez. - Índice de éster.	- N T. P. 319.084:1974 para los aceites esenciales.
VARIABLES INDEPENDIENTES	DIMENSIONES	INDICADORES	MÉTODO
X ₁ = Condiciones adecuadas para la obtención del aceite esencial de molle (<i>Schinus molle</i> L.).	- kg - l - cm	- Cantidad de hojas de molle. - Cantidad de agua. - Tamaño de partícula.	- Experimental
X ₂ = Componentes activos del aceite esencial de molle (<i>Schinus molle</i> L.) que le confiere efecto antimicrobiano.	- %	- Composición química.	- Cromatografía de gases con espectroscopía de masas (CG-EM).
X ₃ = El efecto antimicrobiano del aceite esencial de molle (<i>Schinus molle</i> L.) sobre <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia Coli</i> .	- ml de aceite esencial/ml de inóculo.	- Concentración mínima inhibitoria.	- Diluciones seriadas decimales y recuentos en placa.

Fuente: Elaboración propia

3.3. Hipótesis general

El aceite esencial de molle (*Schinus molle* L.) obtenido por el método de arrastre con vapor reducen la carga microbiana significativamente sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia Coli* debido a sus características físicas y químicas.

3.4. Hipótesis específicas

- a) Las condiciones adecuadas para llevar a cabo un mayor rendimiento en la obtención del aceite esencial de molle (*Schinus molle* L.) están relacionadas con la cantidad de material vegetal, la cantidad de agua y el tamaño de partícula.
- b) El aceite esencial de molle (*Schinus molle* L.) contiene como componentes antimicrobianos al pineno y terpinen-4-ol.
- c) El efecto antimicrobiano del aceite esencial de molle (*Schinus molle* L.) sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia Coli* tiene un efecto significativo.

IV. METODOLOGÍA

4.1. Tipo de investigación

4.1.1. Por su finalidad

Aplicada

Esta investigación es de tipo aplicativo ya que nuestros resultados van a ayudar a futuros estudios sobre obtención de aceite esencial de molle (*Schinus molle* L.)

4.1.2. Por su diseño interpretativo

Experimental

Esta investigación es de tipo experimental, ya que se realizó mediante la observación, anotación, análisis y discusión de los resultados obtenidos durante la caracterización química y efecto antimicrobiano del aceite esencial de molle (*Schinus molle* L.) obtenido por el método de arrastre con vapor.

4.1.3. Por el nivel de estudio

Descriptiva

Esta investigación es de tipo descriptiva ya que se explicó la caracterización química y efecto antimicrobiano del aceite esencial de molle (*Schinus molle* L.) obtenido por el método de arrastre con vapor.

4.1.4. Por el ámbito de desarrollo

De laboratorio

Esta investigación se llevó a cabo a nivel de laboratorio porque se determinó la caracterización química y efecto antimicrobiano del aceite esencial de molle (*Schinus molle* L.) obtenido por el método de arrastre con vapor.

4.2. Diseño de la investigación

Nuestro trabajo con la finalidad de obtener buenos resultados para el diseño de la investigación consideró las siguientes variables:

Y = Caracterización química y efecto antimicrobiano del aceite esencial de molle (*Schinus molle* L.) obtenido por el método de arrastre con vapor.

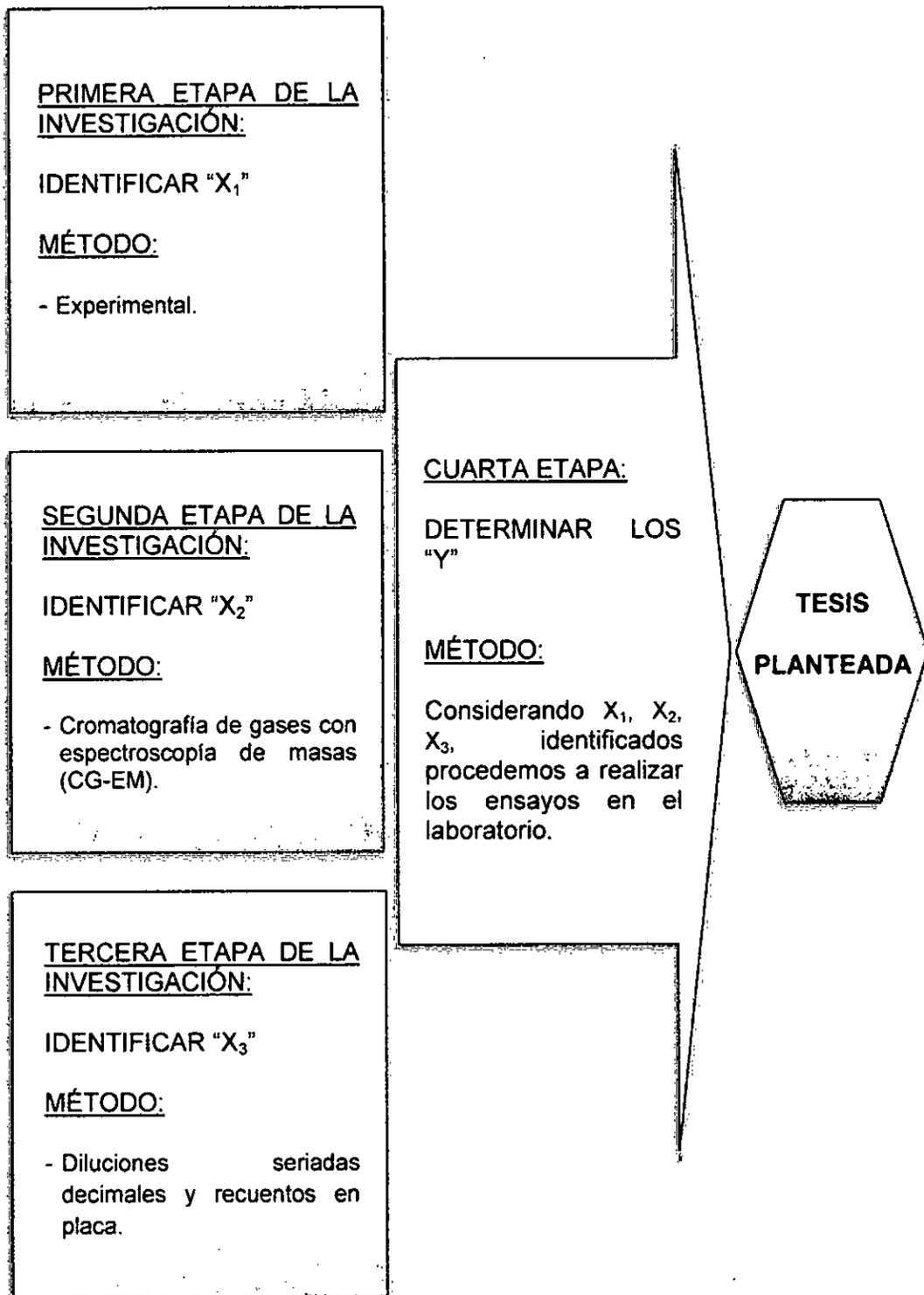
X₁ = Condiciones adecuadas para la obtención del aceite esencial de molle (*Schinus molle* L.)

X₂ = Componentes activos del aceite esencial de molle (*Schinus molle* L.) que le confiere efecto antimicrobiano.

X₃ = El efecto antimicrobiano del aceite esencial de molle (*Schinus molle* L.) sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia Coli*.

En la figura N° 4.1 se presenta el diseño de la investigación en cuatro etapas.

FIGURA N° 4.1
DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN



Fuente: Elaboración propia

4.3. Población y muestra

4.3.1. Población

La población estuvo conformada por las hojas de molle recolectadas del Parque Zonal Huáscar en el distrito de Villa El Salvador, Lima- Perú.

4.3.2. Muestra

Se trabajó con 9.00 kg de hojas de molle recolectados entre los meses de mayo y junio del presente año y se usó muestras de 1.50 kg y 0.75 kg para las ocho corridas experimentales mediante el método de arrastre con vapor de agua para la obtención del aceite esencial de molle.

Se utilizó 9.00 kg de hojas de molle debido a que la mayor capacidad del equipo de destilación fue de 1.50 kg y también se trabajó con 0.75 kg para comparar con la mitad de este peso.

4.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Para la recolección de datos se utilizó diferentes técnicas e instrumentos y dado que el trabajo es experimental se realizó los siguientes ensayos:

- Caracterización física del aceite: humedad, densidad, índice de refracción y solubilidad en etanol.
- Caracterización química del aceite: Índice de éster, índice de acidez e identificación de los componentes del aceite esencial de molle por Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas.

- Obtención de aceite esencial de molle por el método de arrastre con vapor.
- Diluciones seriadas decimales y recuentos en placa para el efecto antimicrobiano del aceite esencial de molle.

4.5. Procedimientos de recolección de datos

Para la recolección de datos se registró los volúmenes de aceite esencial en relación con el tiempo por cada prueba experimental con el fin de obtener como vectores de respuesta el tiempo, el volumen y el rendimiento de obtención; asimismo se determinó la caracterización física, química y el efecto antimicrobiano con las muestras recolectadas.

4.5.1. Métodos y materiales

a) Lugar de ejecución

Nuestro trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio de operaciones unitarias (LOPU) de la facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Callao para la obtención del aceite esencial de las hojas de molle (*Schinus molle* L.) por el método de arrastre con vapor y en el laboratorio de microbiología del Instituto de Investigación de Especialización en Agroindustrias (IIEA) de la Universidad Nacional del Callao para determinar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de molle.

b) Materia prima

Se utilizó las hojas de molle (*Schinus molle* L.) recolectado en el distrito de Villa El Salvador, en el departamento de Lima-Perú, entre los meses de mayo y junio del año 2017. El aceite esencial obtenido se utilizó para las pruebas del efecto antimicrobiano.

c) Equipos, materiales y reactivos

Equipos

- Autoclave Electric, marca Sterilizer, modelo N°25X, Wisconsin.
- Balanza analítica con capacidad de 200 g, marca Kessel, +/- 0.1 mg.
- Balanza con capacidad de 10 kg, marca T. Winer, +/- 0.1 g.
- Balanza de precisión con capacidad de 2100 g, marca Ohaus, +/-0.1 g.
- Baño maría, marca Memmert, modelo XMTD-2301, rango 0-399 °C.
- Congelador, marca INFRISA.
- Contador de colonias, marca Karl Kolb, modelo D-6072.
- Destilador por arrastre con vapor que consta de un generador de vapor de capacidad de 10 l de agua.
- Escala de Mc Farland.
- Estufa, marca Memmert, 250 +/-2 °C.
- Incubadora, marca Memmert, modelo B-40.
- Mechero bunsen.
- Vortex, marca IKA VIBRO FIX, modelo VF10.

Materiales

- Algodón.
- Asa de siembra.
- Florentino de 100 ml.
- Jeringa hipodérmica de 1 ml.
- Papel kraft.
- Pera de decantación de 500 ml.
- Picnómetro de 10 ml.
- Pipetas de 1 ml, 5 ml y 10 ml.
- Placas Petri de 16 cm de diámetro.
- Probeta de 100 ml y 1000 ml.
- Recipientes de vidrio color ámbar.
- Termómetro de 0 - 200° C.
- Tubos de ensayo de 1.1 cm de diámetro y 15 cm de largo.
- Vaso de precipitado de 100 ml, 250 ml y 500 ml.

Reactivos

- Agar Plate Count.
- Agua destilada.
- Alcohol de 70°.
- Alcohol de 96°.
- Caldo diluyente tryptona de soya (0.1g /l de agua destilada).
- Caldo nutritivo tryptona de soya (3 g /100 ml de agua destilada).

- Dimetil sulfóxido.
- *Escherichia Coli* ATCC 25922.
- *Staphylococcus Aureus* ATCC 25923.
- Suero fisiológico al 9%.
- Sulfato de sodio anhidro.

4.5.2. Diseño experimental

a) Obtención del aceite esencial de molle (*Schinus molle* L.)

Se realizó experimentalmente la obtención de aceite esencial de molle por el método de arrastre con vapor cuyas variables independientes a controlar fueron:

- Cantidad de material vegetal: hojas de molle (kg).
- Cantidad de agua (l).
- Tamaño de partícula (cm).

Las pruebas se realizaron a nivel piloto para determinar las condiciones adecuadas de operación y llevar a cabo un mayor rendimiento en la obtención del aceite esencial de las hojas de molle. Para este caso se usó el diseño factorial: $2^3 = 8$ pruebas experimentales, en la cual se utilizó 0.750 kg y 1.500 kg de hojas de molle y 3 variables como la cantidad de material vegetal (kg), cantidad de agua (l) y tamaño de partícula (cm). Esto nos permitió lograr el máximo de información con el mínimo de pruebas experimentales.

En el cuadro N° 4.1 se presenta el diseño factorial para la obtención de aceite esencial de hojas de molle (*Schinus molle* L.).

CUADRO N° 4.1
DISEÑO FACTORIAL PARA LA OBTENCIÓN DE ACEITE
ESENCIAL DE LAS HOJAS DE MOLLE

N° pruebas	Variables independientes			Vector de respuesta		
	Cantidad de material vegetal (kg)	Cantidad de agua (l)	Tamaño de partícula (cm)	Volumen de obtención (ml)	Tiempo de obtención (min)	Rendimiento (%)
1	0.75	6.00	1.50	V ₁	Θ ₁	R ₁
2	0.75	6.00	3.50	V ₂	Θ ₂	R ₂
3	0.75	8.00	1.50	V ₃	Θ ₃	R ₃
4	0.75	8.00	3.50	V ₄	Θ ₄	R ₄
5	1.50	6.00	1.50	V ₅	Θ ₅	R ₅
6	1.50	6.00	3.50	V ₆	Θ ₆	R ₆
7	1.50	8.00	1.50	V ₇	Θ ₇	R ₇
8	1.50	8.00	3.50	V ₈	Θ ₈	R ₈

Fuente: Elaboración propia

Para la obtención de aceite esencial de molle (*Schinus molle* L.) se realizó las siguientes etapas:

Recolección de la materia prima

Las hojas de molle (*Schinus molle* L.) fueron recolectadas del Parque zonal Huáscar ubicado en el distrito de Villa El Salvador, departamento de Lima - Perú, estas se utilizaron para determinar si el aceite esencial de molle tiene efecto antimicrobiano.

Acondicionamiento de la materia prima

En esta etapa se llevó a cabo los siguientes pasos:

- **Selección de las hojas de molle:** En esta etapa se desechó aquellas impurezas presentes, así como también aquellas hojas que se encontraron huecas o infestadas con algunas plagas.
- **Secado de las hojas de molle:** Las hojas de molle recolectadas fueron secadas a condiciones ambientales por un periodo de 14 días.
- **Reducción del tamaño de muestra:** Se trabajó con dos tamaños de hojas, las cuales fueron: 1.5 cm y 3.5 cm.

Pesado de la materia prima

Se realizó ocho pruebas experimentales para la obtención del aceite esencial de molle (*Schinus molle* L.) de las cuales cuatro fueron con un peso de 0.750 kg y cuatro con 1.500 kg de hojas de molle. En la figura N° 4.2 se registra el pesado de la materia prima.

**FIGURA N° 4.2
PESADO DE LA MATERIA PRIMA**



Fuente: Elaboración propia

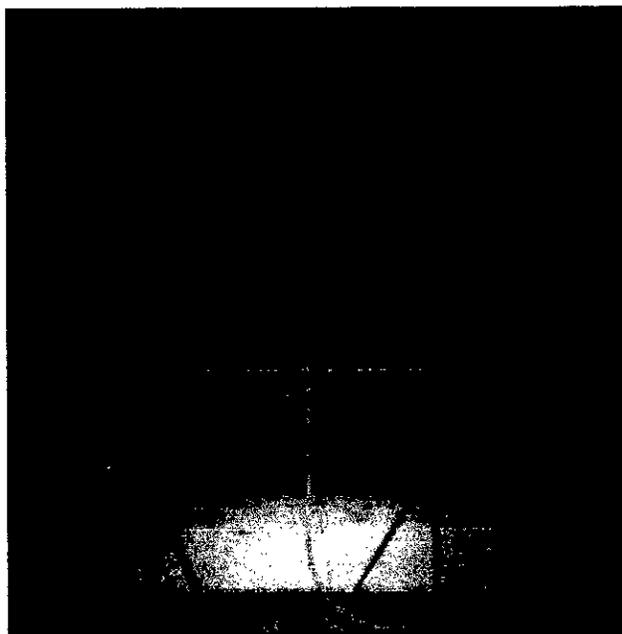
Caracterización de la materia prima

Se determinó el tamaño de las hojas de molle y se empleó materia prima seca y pesada para la determinación del contenido de humedad por el método gravimétrico.

Obtención por arrastre con vapor

Al iniciar el proceso de obtención de aceites esenciales de hojas de molle (*Schinus molle* L.) se verificó que el equipo este armado correctamente, el cual estuvo compuesto por un generador de vapor, un contenedor de materia prima, un condensador de tubo concéntrico y un colector de aceite esencial (florentino). En la figura N° 4.3 se puede apreciar el equipo de obtención por arrastre con vapor.

FIGURA N° 4.3
EQUIPO DE OBTENCION POR ARRASTRE CON VAPOR



Fuente: Elaboración propia

El método de obtención por arrastre con vapor, cuyas condiciones se muestran en el cuadro N° 4.1, se realizó en cada prueba experimental, donde se determinó la influencia de tres variables: cantidad de material vegetal de molle (kg), cantidad de agua (l) y tamaño de partícula (cm).

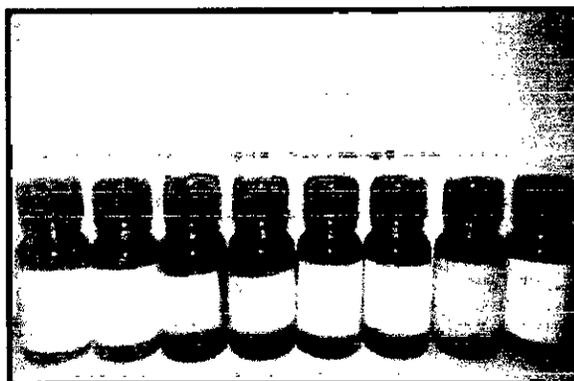
Secado del extracto del aceite esencial húmedo

Una vez obtenido el aceite esencial se separó el aceite del agua por decantación y luego fue secado con sulfato de sodio anhidro para eliminar los residuos de agua.

Almacenamiento del aceite esencial

El aceite esencial fue almacenado en un frasco de vidrio color ámbar y para evitar la descomposición del aceite se guardó en un congelador a 4° C. En la figura N° 4.4 se observa el almacenamiento del aceite esencial de molle de las 8 pruebas experimentales realizadas.

FIGURA N° 4.4
ALMACENAMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL DE MOLLE DE LAS 8
PRUEBAS EXPERIMENTALES



Fuente: Elaboración propia

b) Caracterización física y química del aceite esencial de molle

Los métodos de análisis para la identificación del aceite esencial de molle (*Schinus molle* L.), fueron los siguientes:

Caracterización física del aceite esencial de molle

- **Determinación de la densidad:** La densidad se llevó a cabo empleando la Norma Técnica Peruana para los aceites esenciales: NTP 319.081:1974.
- **Determinación del índice de refracción:** El índice de refracción se determinó empleando la Norma Técnica Peruana para los aceites esenciales: NTP 319.075:1974.
- **Determinación de la solubilidad en etanol:** La solubilidad en etanol se llevó a cabo empleando la Norma Técnica Peruana para los aceites esenciales: NTP 319.084:1974.

Caracterización química del aceite esencial de molle

- **Determinación del índice de éster:** El índice de éster se llevó a cabo empleando la Norma Técnica Peruana para los aceites esenciales: NTP 319 088:1974.
- **Determinación del índice de acidez:** La determinación del índice de acidez se llevó a cabo empleando la Norma Técnica Peruana para los aceites esenciales: NTP 319.085:1974.

- **Identificación de los componentes del aceite esencial de las hojas de molle:** Los componentes del aceite esencial de molle se determinaron por el método de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, el cual permite obtener el espectro de masas de cada componente con el cual se obtiene el peso molecular e información estructural.

c) **Determinación del efecto antimicrobiano**

El efecto antimicrobiano del aceite esencial de molle fue evaluado determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI) usando el método de diluciones seriadas decimales y recuentos en placa para las bacterias *Escherichia Coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, para lo cual se realizó los siguientes pasos:

Obtención de los microorganismos

Las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 fueron adquiridas en el Instituto Nacional de Salud y el hospital Cayetano Heredia respectivamente.

Medio de cultivo adecuado

Para el crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* se utilizó un medio enriquecido como el Agar Plate Count, preparado previamente con 2.35 g por 100 ml de agua destilada esterilizada, una vez escogido el medio de cultivo se procedió a la siembra en el agar, luego se incubaron por un periodo de 18 a 24 horas a 37°C.

Obtención del inóculo bacteriano

Con la ayuda de una asa de siembra se extrajo una colonia del cultivo de la cepa bacteriana la cual fue sumergida en un tubo de ensayo esterilizado con 10 ml de suero fisiológico al 9 %, luego se agitó, alcanzando una turbidez de 1×10^6 UFC/ml en la escala de Mc Farland la cual es establecida por visión directa.

La escala de Mc Farland fue elaborada en el Instituto de Investigación de Especialización en Agroindustria (IIEA) de la Universidad Nacional del Callao).

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria

Para la determinación mínima inhibitoria se empleó el método de diluciones seriadas decimales y recuentos en placas a continuación se procedió a realizar los siguientes pasos para *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923:

➤ *Escherichia coli* ATCC 25922

Se agregó caldo nutritivo tryptona de soya (previamente preparado de 3 g/100 ml de agua destilada) en 3 tres tubos de ensayo. Luego se agregó 1 ml de inóculo de cepa de *Escherichia coli* (previamente preparada con una concentración de 1×10^6 UFC/ml). Posteriormente se agregó 0.1 ml y 1.6 ml de aceite esencial de molle a los dos primeros tubos, el tercer tubo cumple la función de un control (Qc), luego se agregó unas gotas de

dimetil sulfóxido. A cada tubo de concentración de aceite esencial/ml de inóculo se realizó diluciones seriadas decimales.

Finalmente se tomaron alícuotas de 0.1 ml de las diluciones seriadas y se efectuaron siembras en medio solido (agar Plate Count), con intervalos de tiempos determinados, esto con la finalidad de elaborar las curvas de inhibición de aceite esencial de molle a diferentes concentraciones.

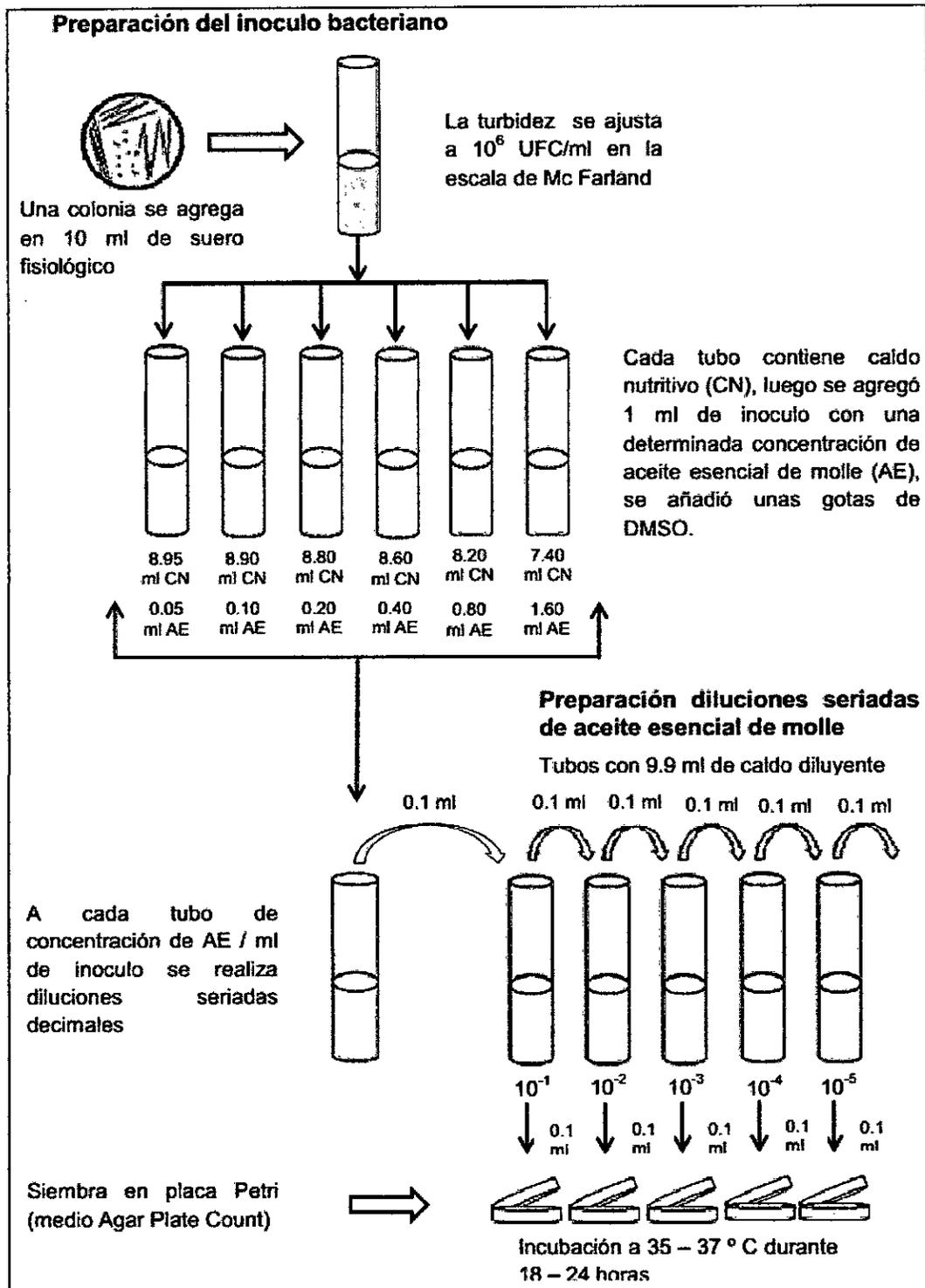
➤ ***Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

Se agregó caldo nutritivo en 7 tubos de ensayos. Luego se agregó 1 ml de inóculo de cepa de *Staphylococcus aureus* (previamente preparada con una concentración de 1×10^6 UFC/ml). Posteriormente se agregó 0.05 ml, 0.1 ml, 0.2 ml, 0.4 ml, 0.8 ml y 1.6 ml de aceite esencial de molle a los seis primeros tubos, el último tubo cumple la función de un control (Qc), luego se agregó unas gotas de dimetil sulfóxido. A cada tubo de concentración de aceite esencial/ml de inóculo se realizó diluciones seriadas decimales.

Finalmente se tomaron alícuotas de 0.1 ml de las diluciones seriadas y se efectuaron siembras en medio solido (agar Plate Count), con intervalos de tiempos determinados, esto con la finalidad de elaborar las curvas de inhibición de aceite esencial de molle a diferentes concentraciones.

En la Figura N° 4.5 se observa la metodología para la determinación de la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de las hojas de molle sobre las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

FIGURA N° 4.5
METODOLOGIA PARA LA DETERMINACION DE LA
CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA



Fuente: Elaboración propia

4.6. Procesamiento estadístico y análisis de datos

Los datos obtenidos del desarrollo de las ocho pruebas experimentales para la obtención del aceite esencial de las hojas del molle (*Schinus molle* L.) aplicando el diseño factorial de dos niveles y tres variables (2^3) fueron evaluados mediante el análisis de varianza (Anova), donde las variables independientes consideradas son la cantidad de material vegetal, cantidad de agua y tamaño de partícula, siendo el vector de respuesta o variable dependiente el rendimiento de obtención.

El análisis estadístico se realizó en base al análisis de la varianza (Anova) empleando para ello software Minitab 18.

Análisis de varianza (Anova)

Es una herramienta estadística de gran utilidad que se aplica en el tratamiento de datos estadísticos. La finalidad del Anova es comparar diversos valores medios para determinar si alguno de ellos difiere significativamente del resto. Se trata de disponer en una tabla ciertos valores que conducen a un valor F_c . Este modelo es apropiado en aquellas situaciones donde se tiene un solo factor o variable independiente con "c" niveles o tratamientos. En este diseño nos interesó probar las siguientes hipótesis:

H_0 : Las medias de las c poblaciones son iguales.

H_1 : No todas las medias de las c poblaciones son iguales.

También se puede plantear la hipótesis en función de los efectos de los tratamientos así:

H_0 : Los tratamientos no producen efecto.

H_1 : Alguno de los tratamientos produce efecto.

Para probar esta hipótesis se toma una muestra aleatoria de cada una de las c poblaciones y se examina la cantidad de variación dentro de cada una de estas muestras en relación con la cantidad de variación entre las muestras. Si no se rechaza H_0 entonces las medias de las c poblaciones son iguales; es decir, no existe ningún efecto de los tratamientos sobre variable respuesta. En el cuadro N° 4.2 se registra los cuadros de ensayos anova.

CUADRO N° 4.2
CUADRO DE ENSAYOS ANOVA

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F_c
Tratamientos	$c-1$	SCTr	$CMT_r = \frac{SCT_r}{c-1}$	$F_c = \frac{CMT_r}{CME}$
Error	$n-c$	SCE	$CME = \frac{SCE}{n-c}$	
Total	$n-1$	SCT		

Fuente: Elaboración propia

Para un análisis de varianza vamos a considerar las pruebas de cola derecha utilizando una distribución F con grados de libertad $c - 1$ y $n - c$. Se toma la decisión contrastando el estadístico de prueba con el valor

crítico, una vez que se ha completado la tabla y se ha calculado el estadístico de prueba, se compara el F_c con el F_t . Si $F_c > F_t$ rechazo H_0 , lo que indica que alguna de las medias difiere o que alguno de los tratamientos está produciendo algún efecto.

V. RESULTADOS

5.1. Obtención del aceite esencial de molle

Con el propósito de obtener las condiciones adecuadas y lograr un mayor rendimiento para la obtención del aceite esencial de las hojas de molle se modificó las variables independientes tales como: cantidad de hojas de molle (kg), cantidad de agua (l) y tamaño de partícula (cm) y se realizó 8 pruebas experimentales registrado en el diseño factorial del cuadro N° 4.1.

Los resultados obtenidos de nuestros ensayos se registran en el cuadro N° 5.1.

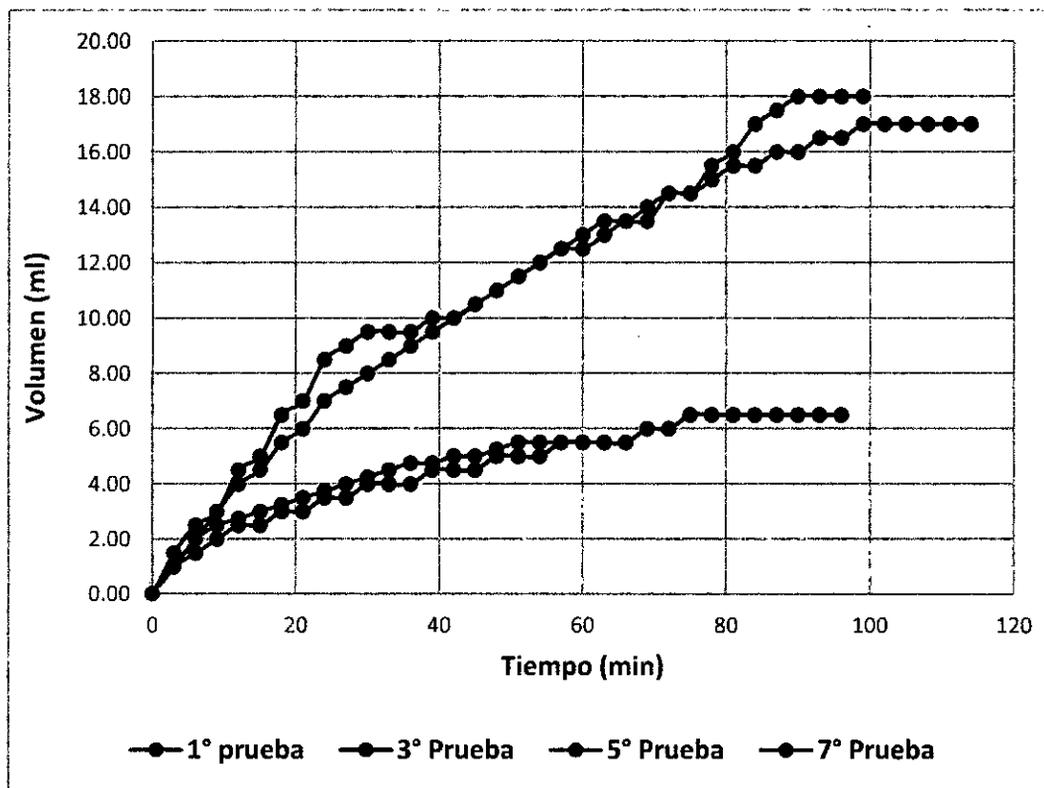
CUADRO N° 5.1
RESULTADOS DE LA OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE MOLLE

N° de pruebas	Variables			Vector de respuesta		
	Cantidad de material vegetal (kg)	Cantidad de agua (l)	Tamaño de partícula (cm)	Volumen de obtención (ml)	Tiempo de obtención (min)	Rendimiento (%)
1	0.75	6.00	1.50	5.50	60.00	0.73
2	0.75	6.00	3.50	5.50	69.00	0.73
3	0.75	8.00	1.50	6.50	96.00	0.87
4	0.75	8.00	3.50	4.50	90.00	0.60
5	1.50	6.00	1.50	18.00	99.00	1.20
6	1.50	6.00	3.50	15.00	194.00	1.00
7	1.50	8.00	1.50	17.00	114.00	1.13
8	1.50	8.00	3.50	15.50	139.00	1.03

Fuente: Elaboración propia

Con los datos de la 1° prueba, 3° prueba, 5° prueba y 7° prueba para la obtención de aceite esencial de molle en el cuadro N° 9 (ver anexo N° 5) se realizó la superposición de gráficas para un tamaño de partícula de 1.5 cm la cual se registra en el gráfico N° 5.1.

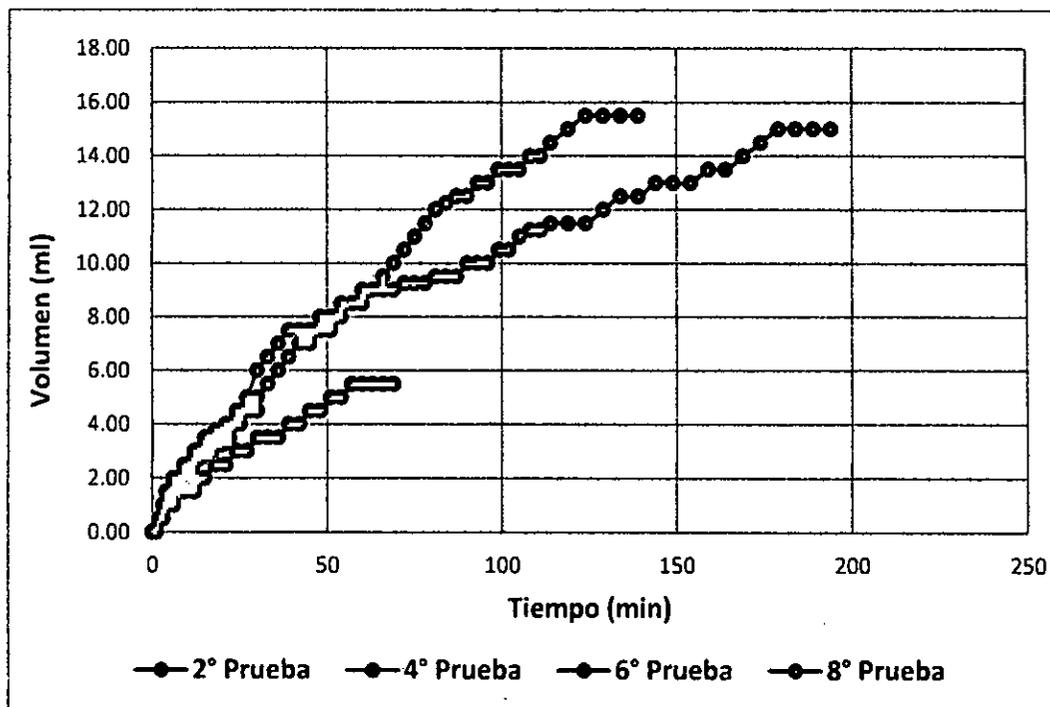
GRÁFICO N° 5.1
SUPERPOSICIÓN DE GRÁFICAS DE LA OBTENCIÓN DE ACEITE
ESENCIAL DE MOLLE PARA UN TAMAÑO DE PARTICULA DE 1.5 cm



Fuente: Elaboración propia

Con los datos de la 2° prueba, 4° prueba, 6° prueba y 8° prueba para la obtención de aceite esencial de molle en el cuadro N° 10 (ver anexo N° 5) se realizó la superposición de gráficas para un tamaño de partícula de 3.5 cm la cual se registra en el gráfico N° 5.2.

GRÁFICO N° 5.2
SUPERPOSICIÓN DE GRÁFICAS DE LA OBTENCIÓN DE ACEITE
ESENCIAL DE MOLLE PARA UN TAMAÑO DE PARTICULA DE 3.5 cm



Fuente: Elaboración propia

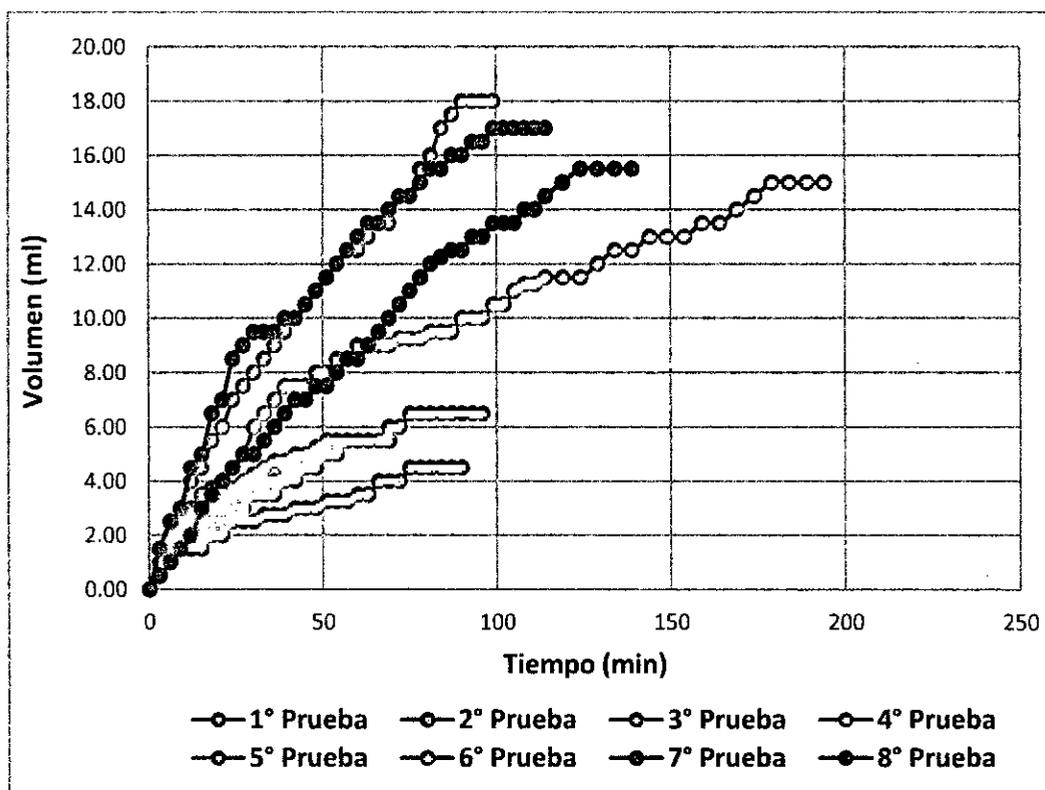
CUADRO N° 5.2
RENDIMIENTO PROMEDIO DE LA OBTENCIÓN DE ACEITE
ESENCIAL DE MOLLE

N° pruebas	Cantidad de material vegetal (kg)	Volumen de obtención (ml)	Tiempo de obtención (min)	Rendimiento (%)
1	0.75	5.50	60.00	0.73
2	0.75	5.50	69.00	0.73
3	0.75	6.50	96.00	0.87
4	0.75	4.50	90.00	0.60
5	1.50	18.00	99.00	1.20
6	1.50	15.00	194.00	1.00
7	1.50	17.00	114.00	1.13
8	1.50	15.50	139.00	1.03
Rendimiento Promedio=0.92%				

Fuente: Elaboración propia

Con los datos de las 8 pruebas experimentales para la obtención de aceite esencial de molle en el cuadro N° 11 (ver anexo N° 5) se realizó la superposición de gráficas la cual se registra en el gráfico N° 5.3.

GRAFICO N° 5.3
SUPERPOSICIÓN DE GRÁFICAS DE LA OBTENCIÓN DE ACEITE
ESENCIAL DE MOLLE



Fuente: Elaboración propia

5.2. Caracterización física

5.2.1. Determinación de la humedad

Se determinó el porcentaje de humedad de las hojas de molle para cada prueba experimental y los resultados se registraron en el cuadro N° 5.3.

CUADRO N° 5.3
PORCENTAJE DE HUMEDAD DE LAS HOJAS DE MOLLE

N° Pruebas	% Humedad
1	29.00
2	31.00
3	28.00
4	32.50
5	29.50
6	34.00
7	25.50
8	28.70
Promedio	29.77

Fuente: Elaboración propia

5.2.2. Determinación de la densidad y el índice de refracción

La densidad (NTP 319.081:1974) y el índice de refracción (NTP 319.075:1974) obtenidos se muestran en el cuadro N° 5.4.

CUADRO N° 5.4
DENSIDAD E ÍNDICE DE REFRACCIÓN

N° pruebas	Densidad (g/ml)	Índice de refracción
1	0.8994	1.50
2	0.8921	1.493
3	0.8914	1.495
Promedio	0.8943	1.496

Fuente: Elaboración propia

5.2.3. Determinación de la solubilidad en etanol

La solubilidad en etanol al 90% se analizó en el laboratorio Labicer de la Universidad Nacional de Ingeniería, empleando la Norma Técnica Peruana para los aceites esenciales: NTP 319.084:1974 (Ver Anexo N° 3), dándonos como resultado el siguiente:

Solubilidad en etanol al 90%: Soluble en 0.1 a 1.2 ml.

5.3. Caracterización química

5.3.1. Determinación del índice de éster

La determinación del índice de éster se analizó en el laboratorio Labicer de la Universidad Nacional de Ingeniería, empleando la Norma Técnica Peruana para los aceites esenciales: NTP 319.088:1974 (Ver Anexo N° 3), dándonos como resultado el siguiente:

Numero de éster (mg KOH / g aceite):10.43

5.3.2. Determinación del índice de acidez

La determinación del Índice de acidez se analizó en el laboratorio Labicer de la Universidad Nacional de Ingeniería, mediante la Norma Técnica Peruana para los aceites esenciales: NTP 319.085:1974 (Ver Anexo N° 3), el resultado es el siguiente:

Índice de acidez (mg KOH / g aceite): 2.74

5.3.3. Identificación de los componentes de aceite esencial de molle (*Schinus molle* L.) por Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas

De acuerdo con el análisis de cromatografía de gases acoplado a Espectroscopía de masas, el cromatograma resultante (Ver Anexo N° 3) registró 62 componentes volátiles en el aceite esencial de molle.

Para identificar tales compuestos fue necesario comparar el tiempo de retención experimental (min), con el tiempo de retención teórico (min); ya que en el ensayo, a la salida de la columna cada componente es registrado por el detector en un determinado tiempo y bajo la forma de picos; estos tiempos fueron comparados con tiempos de retención estándares establecidos para cada tipo de compuesto (estándares pertenecientes al laboratorio Labicer de la Universidad Nacional de Ingeniería de Lima, Perú).

El tiempo de retención experimental, teórico y el % área de cada componente, se registran en el cromatograma (Anexo N° 3).

Los componentes volátiles mayoritarios identificados del aceite esencial de las hojas de molle según su tiempo de retención experimental (TRE) de acuerdo a los cromatogramas (Anexo N° 3), se registran en el cuadro N° 5.5.

CUADRO N° 5.5
TIEMPO DE RETENCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE COMPONENTES
VOLATILES MAYORITARIOS

N°	TRE (min)	% Área	Identificación
1	21.48	17.13	α -felandreno
2	12.51	15.57	α -pineno
3	25.84	11.03	D-Limoneno
4	13.82	10.92	Camphene
5	24.87	6.22	<i>o</i> -Cymene
6	16.94	4.87	Byciclo [3.1.1] heptane, 6,6-dimethyl-2-2 methylene, (1S)
7	19.62	4.01	β -Myrcene
8	11.39	2.25	Tricyclo [2.2.1.0 (2,6)] heptane, 1,7,7-trimethyl
9	58.06	0.23	Caryophyllene
10	66.28	0.19	Byciclo [10.1.0] tridec-1-ene
11	11.95	0.16	Bicyclo [3.1.0] hex-2-ene,2methyl-5-(1-methylethyl)
12	5.20	0.14	Hexane, 2,4-dimethyl
13	57.63	0.11	1H-cyclopropa[a]naphtalene, 1a,2,3a,4,5,6,7b-octahydro-1,1,3a,7
14	62.62	0.10	Naphtalene, 1,2,4A,5,8,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)
15	61.49	0.09	Cyclohexane,1-ethenyl-1-methyl-2-(1-methylethenyl)-4-(1-methylethyl)
16	36.43	0.08	Cyclohexene,1-methyl-4-(1-methylethylidene)
17	59.59	0.05	Humulene
18	4.44	0.04	Toluene
19	23.25	0.04	1,3-Cyclohexadiene,1-methyl-4-(1-methylethyl)
20	30.74	0.04	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-,(Z)
21	32.11	0.04	γ -Terpinene
22	51.56	0.04	Bornyl acetate
23	61.66	0.04	α -Muurolene
24	62.22	0.04	γ - Muurolene
25	38.88	0.03	Nonanal
26	56.84	0.03	Cyclohexane,1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis(1-methylethenyl)
27	26.08	0.02	Eucalyptol
28	50.84	0.02	2,6-Octadienal, 3,7-dimethyl-,(Z)-
29	59.92	0.02	Alloaromadendrene
31	61.84	0.02	Cyclohexane methanol, 4-ethenyl-. Alpha.,.alpha.,4-trimethyl-3-(1-methyl)
32	64.82	0.02	(2E,4S,7E)-4-Isopropyl-1,7dimethylcyclodeca-2,7-dienol
33	44.66	0.01	Terpinen-4-ol

Fuente: Laboratorio Labicer. Universidad Nacional de Ingenieria.2017

5.4. Determinación del efecto antimicrobiano

5.4.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria

a) *Escherichia coli* ATCC 25922

Se empleó 2 concentraciones. El efecto del aceite esencial de molle sobre el crecimiento de *Escherichia coli* en UFC/ ml se registró en el cuadro N° 5.6 y en el cuadro N° 5.7 se registró en Log UFC/ml.

CUADRO N° 5.6
EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE MOLLE SOBRE EL
CRECIMIENTO DE *Escherichia coli* EN UFC/ml

Tiempo (horas)	UFC/ml		
	Control	Concentraciones experimentales en ml de aceite esencial / ml de inculo	
		0.10	1.60
0.00	20000	162181	144544
0.80	104713	19953	44668
1.60	467735	8913	16982
2.40	4466836	6310	10471
4.25	247275000	80235000	78000
23.25	2.8917E+11	25233333	4372666667

Fuente: Elaboración propia

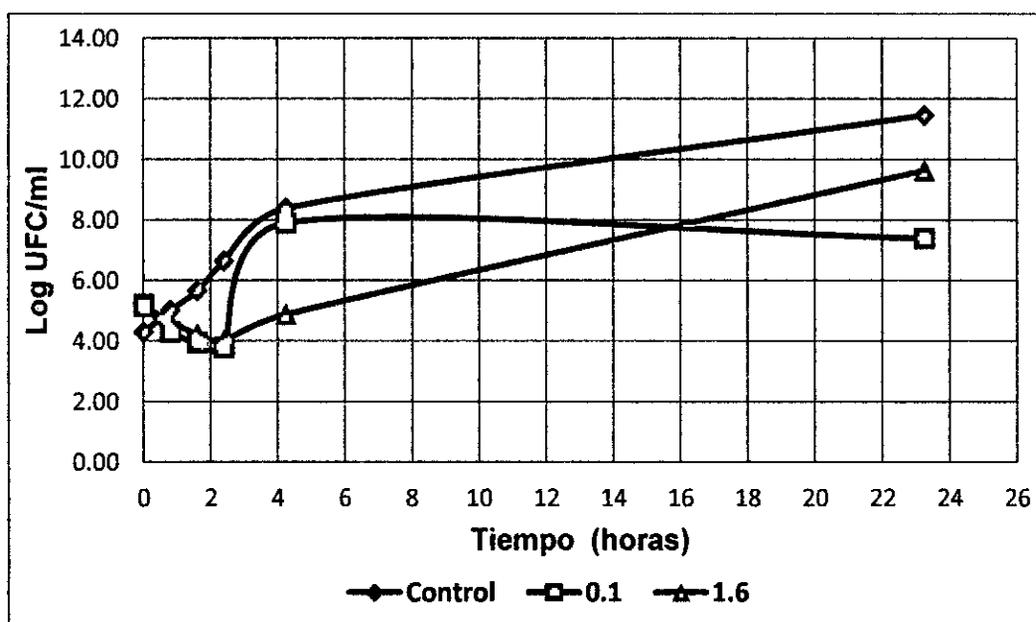
CUADRO N° 5.7
EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE MOLLE SOBRE EL
CRECIMIENTO DE *Escherichia coli* EN Log UFC/ml

Tiempo (horas)	Log UFC/ml		
	Control	Concentraciones experimentales en ml de aceite esencial / ml de inculo	
		0.10	1.60
0.00	4.30	5.21	5.16
0.80	5.02	4.30	4.65
1.60	5.67	3.95	4.23
2.40	6.65	3.80	4.02
4.25	8.39	7.90	4.89
23.25	11.46	7.40	9.64

Fuente: Elaboración propia

En el gráfico N° 5.4 se registra la curva de crecimiento de *Escherichia coli* a diferentes concentraciones de aceite esencial de molle.

GRÁFICO N° 5.4
CURVA DE CRECIMIENTO DE *Escherichia coli* A DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE ACEITE ESENCIAL DE MOLLE



Fuente: Elaboración propia

La fase de muerte o declive de *Escherichia coli* se observa hasta las 2.40 horas (según el cuadro N° 5.6) por lo tanto la concentración mínima inhibitoria (CMI) se registra en el cuadro N° 5.8.

CUADRO N° 5.8
MUERTE TOTAL DE LA BACTERIA *Escherichia coli*

Concentraciones ml AE / ml de inculo	Reducción (%)	Muerte total de bacterias (%)
0.10	3.89	96.11
1.60	7.24	92.76

Fuente: Elaboración propia

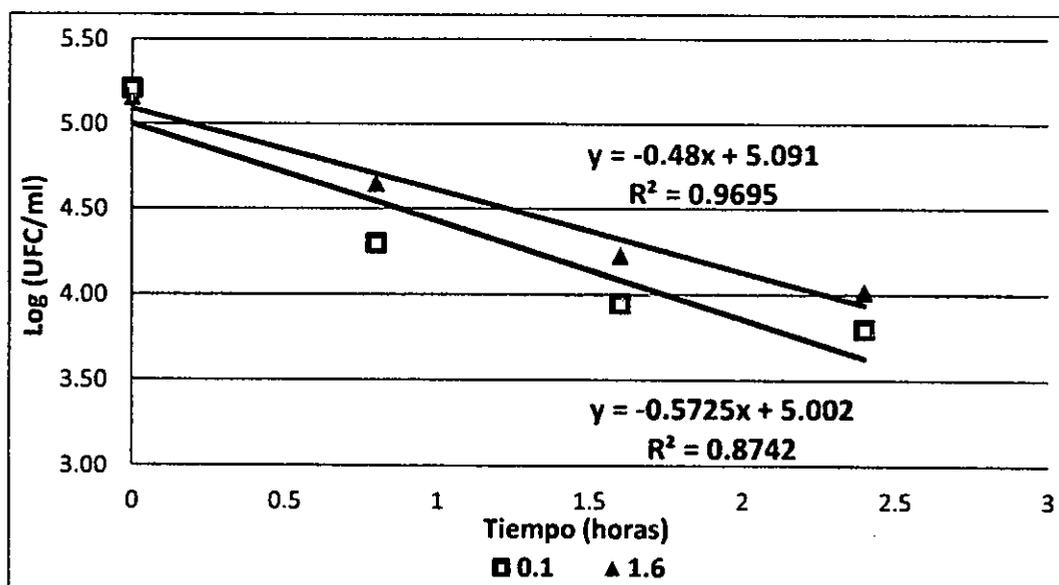
En el cuadro N° 5.9 se observa la fase de muerte o declive bacteriana hasta las 2.40 horas, con estos datos se realiza la curva de letalidad K (Velocidad de muerte celular) del aceite esencial de molle sobre *Escherichia coli* el cual se registra en el gráfico N° 5.5.

CUADRO N° 5.9
FASE DE MUERTE O DECLIVE DE *Escherichia coli*

Tiempo (horas)	Log UFC/ml		
	Control	Concentraciones experimentales en ml de aceite esencial / ml de inculo	
		0.10	1.60
0.00	4.30	5.21	5.16
0.80	5.02	4.30	4.65
1.60	5.67	3.95	4.23
2.40	6.65	3.80	4.02

Fuente: Elaboración propia

GRÁFICO N° 5.5
CURVA DE LETALIDAD K (VELOCIDAD DE MUERTE CELULAR) DEL ACEITE ESENCIAL DE MOLLE SOBRE *Escherichia coli*



Fuente: Elaboración propia

Con los datos del gráfico N° 5.5 y con los datos del cuadro N° 5.8 se realiza el cuadro N° 5.10 en la cual se registra la letalidad K (Log (UFC/ml)/h) del aceite esencial de molle sobre *Escherichia coli*.

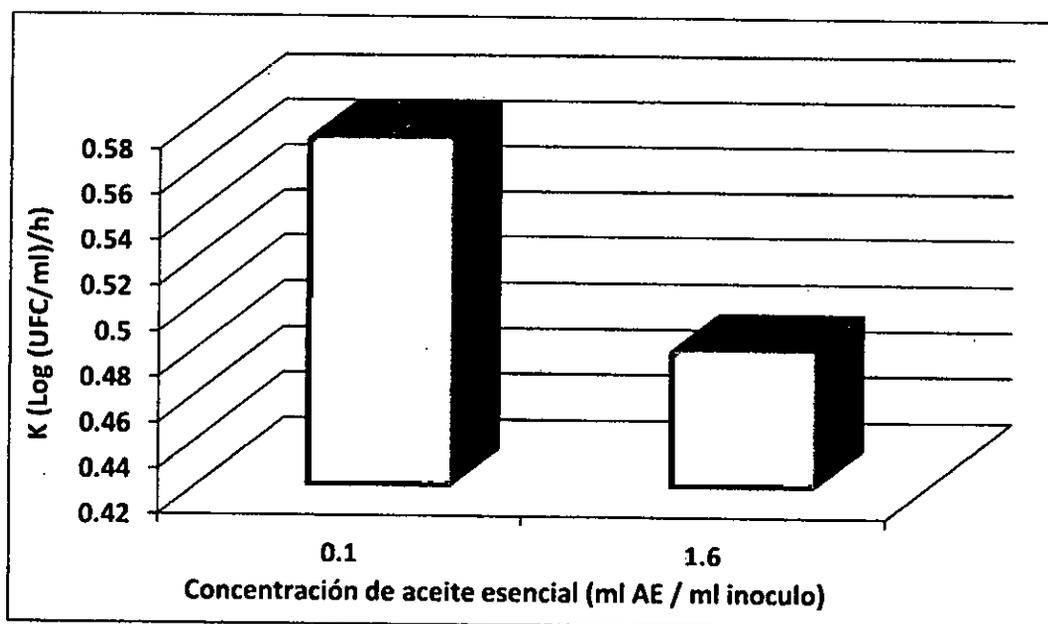
CUADRO N° 5.10
LETALIDAD K (Log (UFC/ml)/h) DEL ACEITE ESENCIAL DE MOLLE
SOBRE *Escherichia coli*

Concentraciones ml.AE / ml de inculo	Reducción (%)	Muerte total de bacterias (%)	(-K) (Log (UFC/ml)/h)	R ²
0.10	3.89	96.11	0.5725	0.8742
1.60	7.24	92.76	0.4800	0.9695

Fuente: Elaboración propia

En el gráfico N° 5.6 se registra la letalidad K (Log (UFC/ml)/h) del aceite esencial de molle sobre *Escherichia coli*.

GRÁFICO N° 5.6
LETALIDAD K (VELOCIDAD DE MUERTE CELULAR) DEL ACEITE
ESENCIAL DE MOLLE SOBRE *Escherichia coli*



Fuente: Elaboración propia

b) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Se empleó 6 concentraciones. El efecto del aceite esencial de molle sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en UFC/ ml se registró en el cuadro N° 5.11 y en el cuadro N° 5.12 se registró en Log UFC/ml.

CUADRO N° 5.11
EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE MOLLE SOBRE EL
CRECIMIENTO DE *Staphylococcus aureus* EN UFC/ml

Horas	Log UFC/ml						
	Control	Concentraciones experimentales en ml de aceite esencial / ml de inculo					
		0.05	0.10	0.20	0.40	0.80	1.60
0	2456667	1776667	3893000	1940000	3590000	2720000	3388442
2.42	13450000	1430000	2511800	1819701	1566667	1862087	35481
5.33	127333333	2299250	794328	584000	1600500	768250	3890
24.17	323333333	3852750	79433	67608	47863	31623	191
28.17	119000000	592500	16982	21733	23833	22833	170
50.00	60250000	698667	1250	4597	850	8975	14

Fuente: Elaboración propia

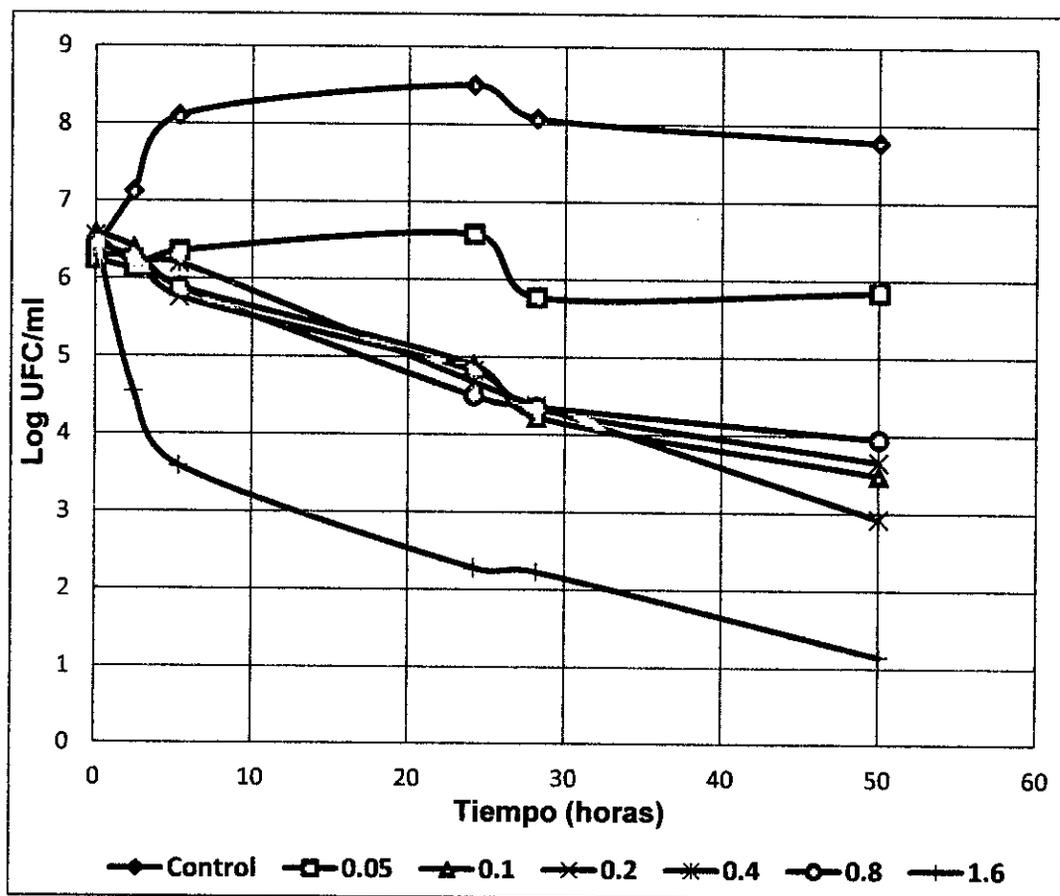
CUADRO N° 5.12
EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE MOLLE SOBRE EL
CRECIMIENTO DE *Staphylococcus aureus* EN Log UFC/ml

Horas	Log UFC/ml						
	Control	Concentraciones experimentales en ml de aceite esencial / ml de inculo					
		0.05	0.10	0.20	0.40	0.80	1.60
0	6.39	6.25	6.59	6.29	6.56	6.43	6.53
2.42	7.13	6.16	6.40	6.26	6.19	6.27	4.55
5.33	8.10	6.36	5.90	5.77	6.20	5.89	3.59
24.17	8.51	6.59	4.90	4.83	4.68	4.50	2.28
28.17	8.08	5.77	4.23	4.34	4.38	4.36	2.23
50.00	7.78	5.84	3.49	3.67	2.93	3.95	1.15

Fuente: Elaboración propia

En el gráfico N° 5.7 se registra la curva de crecimiento de *Staphylococcus aureus* a diferentes concentraciones de aceite esencial de molle.

GRÁFICO N° 5.7
CURVA DE CRECIMIENTO DE *Staphylococcus aureus* A
DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ACEITE ESENCIAL DE
MOLLE



Fuente: Elaboración propia

La fase de muerte o declive de *Staphylococcus aureus* se observa hasta las 50 horas para las concentraciones en ml de aceite esencial/ml de inóculo de 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 y 1.6 (según el cuadro N° 5.11) por lo tanto la concentración mínima inhibitoria (CMI) se registra en el cuadro N° 5.13.

CUADRO N° 5.13
CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA PARA *Staphylococcus aureus*

Concentraciones ml AE / ml de inculo	Reducción (%)	Muerte total de bacterias (%)
0.05	39.32	60.68
0.10	0.03	99.97
0.20	0.24	99.76
0.40	0.02	99.98
0.80	0.33	99.67
1.60	0.00	99.99

Fuente: Elaboración propia

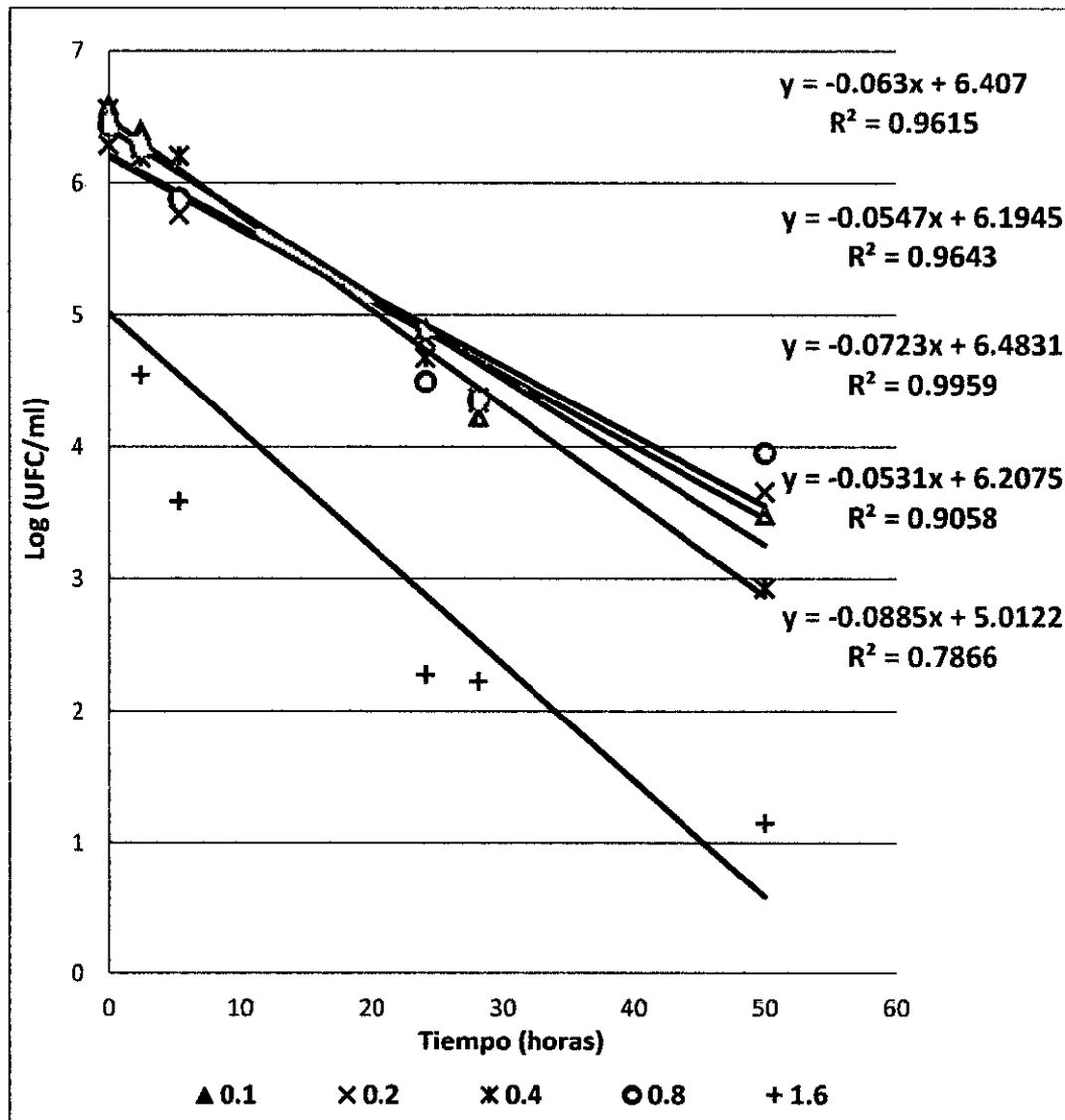
En el cuadro N° 5.14 se observa la fase de muerte o declive bacteriana hasta las 50 horas, con estos datos se realiza la curva de letalidad K (Velocidad de muerte celular) del aceite esencial de molle sobre *Staphylococcus aureus* el cual se registra en el gráfico N° 5.8.

CUADRO N° 5.14
FASE DE MUERTE O DECLIVE DE *Staphylococcus aureus*

Horas	Log UFC/ml					
	Control	Concentraciones experimentales en ml de aceite esencial / ml de inculo				
		0.10	0.20	0.40	0.80	1.60
0	6.39	6.59	6.29	6.56	6.43	6.53
2.42	7.13	6.40	6.26	6.19	6.27	4.55
5.33	8.10	5.90	5.77	6.20	5.89	3.59
24.17	8.51	4.90	4.83	4.68	4.50	2.28
28.17	8.08	4.23	4.34	4.38	4.36	2.23
50.00	7.78	3.49	3.67	2.93	3.95	1.15

Fuente: Elaboración propia

GRÁFICO N° 5.8
CURVA DE LETALIDAD K (VELOCIDAD DE MUERTE CELULAR) DEL
ACEITE ESENCIAL DE MOLLE SOBRE *Staphylococcus aureus*



Fuente: Elaboración propia

Con los datos del gráfico N° 5.8 y con los datos del cuadro N° 5.13 se realiza el cuadro N° 5.15 en la cual se registra la letalidad K (Log (UFC/ml)/h) del aceite esencial de molle sobre *Staphylococcus aureus*.

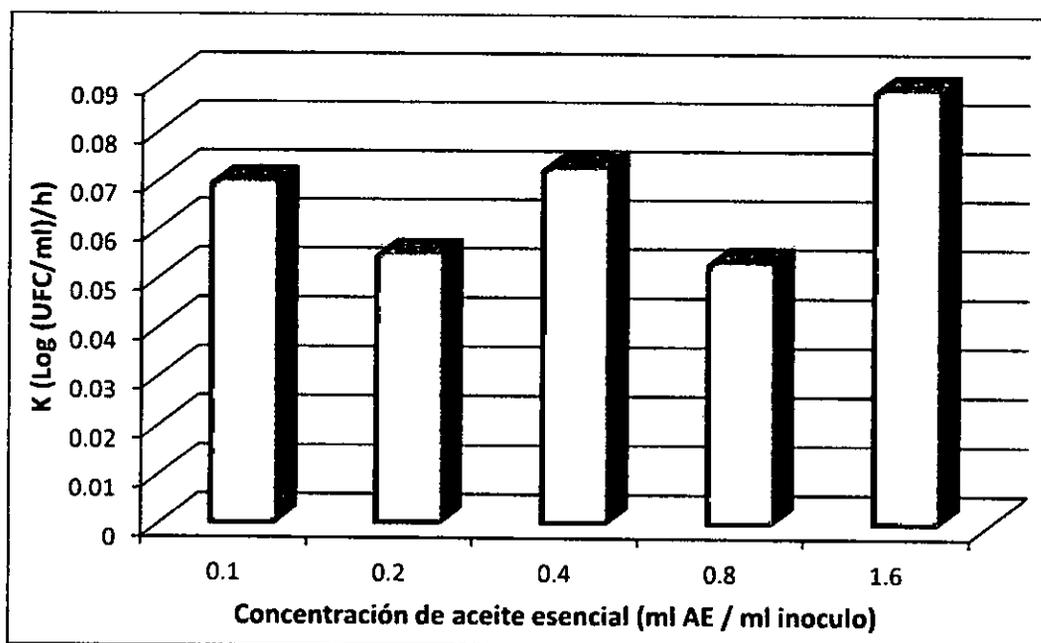
CUADRO N° 5.15
LETALIDAD K (Log (UFC/ml)/h) DEL ACEITE ESENCIAL DE MOLLE
SOBRE *Staphylococcus aureus*

Concentraciones ml AE / ml de inoculo	Reducción (%)	Muerte total de bacterias (%)	(-K) (Log (UFC/ml)/h)	R ²
0.10	0.03	99.97	0.0630	0.9615
0.20	0.24	99.76	0.0547	0.9643
0.40	0.02	99.98	0.0723	0.9959
0.80	0.33	99.67	0.0531	0.9058
1.60	0.00	99.99	0.0885	0.7866

Fuente: Elaboración propia

En el gráfico N° 5.9 se registra la letalidad K (Log (UFC/ml)/h) del aceite esencial de molle sobre *Staphylococcus aureus*.

GRÁFICO N° 5.9
LETALIDAD K (VELOCIDAD DE MUERTE CELULAR) DEL ACEITE
ESENCIAL DE MOLLE SOBRE *Staphylococcus aureus*



Fuente: Elaboración propia

5.5. Análisis estadístico de resultados

Se realizó los análisis de varianza para los rendimientos obtenidos según las variables analizadas en la obtención por arrastre con vapor del aceite esencial de las hojas de molle. En el cuadro N° 5.16 se registra la información del factor y el cuadro N° 5.17 se observa el análisis de varianza de rendimiento vs cantidad de material vegetal, cantidad de agua y tamaño de partícula.

CUADRO N° 5.16
INFORMACIÓN DEL FACTOR

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Cantidad de material vegetal	Fijo	2	0.75, 1.50
Cantidad de agua	Fijo	2	6, 8
Tamaño de partícula	Fijo	2	1.5, 3.5

Fuente: Elaboración propia

CUADRO N° 5.17
ANÁLISIS DE VARIANZA DE RENDIMIENTO VS CANTIDAD DE MATERIAL VEGETAL, CANTIDAD DE AGUA Y TAMAÑO DE PARTICULA

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Cantidad de material vegetal	1	0.231200	0.231200	72.53	0.001
Cantidad de agua	1	0.001250	0.001250	0.39	0.565
Tamaño de partícula	1	0.051200	0.051200	16.06	0.016
Error	4	0.012750	0.003188		
Total	7	0.296400			

Fuente: Elaboración propia

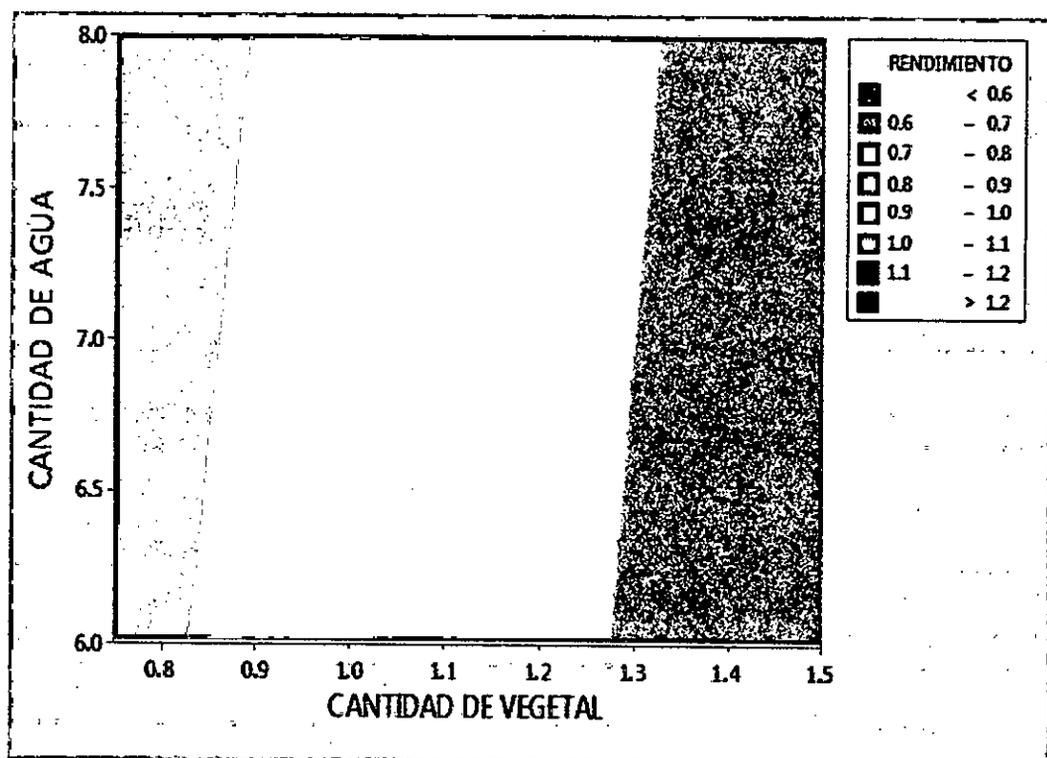
El análisis de regresión realizado con los valores obtenidos generó el siguiente resumen de modelo que se registró en el cuadro N° 5.18 y en el gráfico N° 5.10 se registra la curva de contorno del rendimiento vs cantidad de material vegetal, cantidad de agua.

**CUADRO N° 5.18
RESUMEN DEL MODELO**

S	R- cuad.	R-cuad. (ajustado)
0.0564579	95.70%	92.47%

Fuente: Elaboración propia

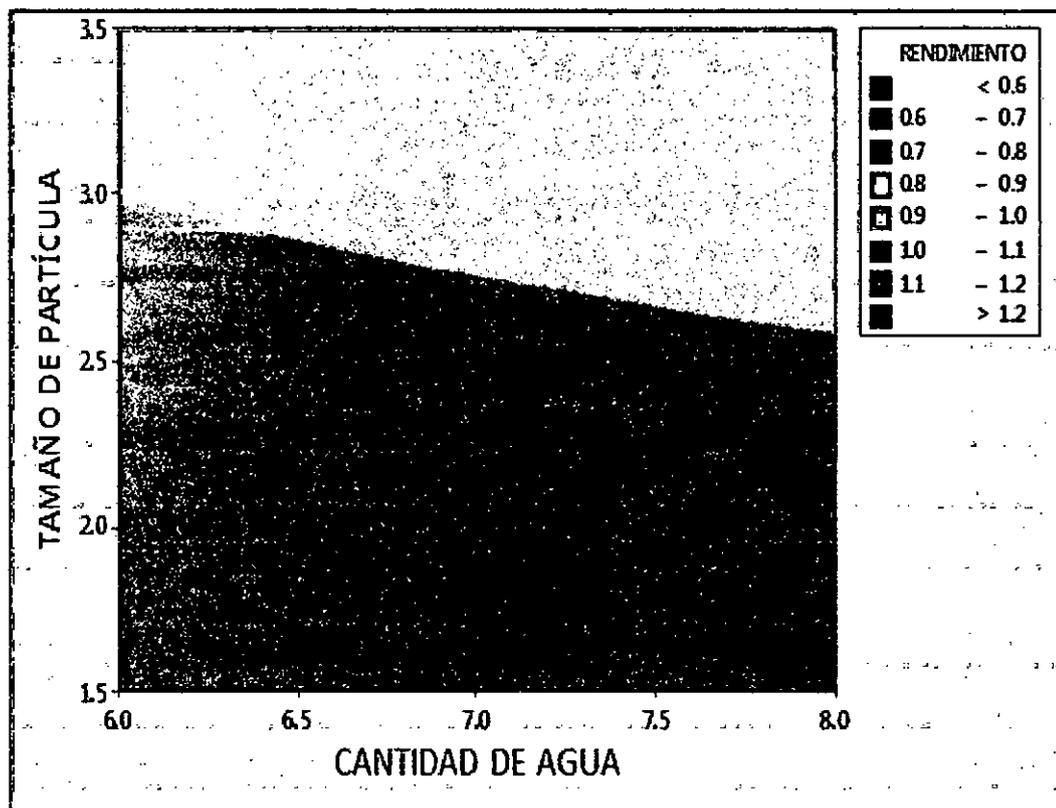
**GRÁFICO N° 5.10
CURVA DE CONTORNO DEL RENDIMIENTO VS CANTIDAD DE MATERIAL VEGETAL, CANTIDAD DE AGUA**



Fuente: Elaboración propia

En el gráfico N° 5.11 se registró la curva de contorno del rendimiento vs cantidad de agua, tamaño de partícula.

GRÁFICO N° 5.11
CURVA DE CONTORNO DEL RENDIMIENTO VS CANTIDAD DE AGUA, TAMAÑO DE PARTÍCULA



Fuente: Elaboración propia

VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1. Contrastación de hipótesis con los resultados

Hipótesis general

El aceite esencial de molle (*Schinus molle* L.) obtenido por el método de arrastre con vapor reducen la carga microbiana significativamente sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia Coli* debido a sus características físicas y químicas.

La obtención del aceite esencial de las hojas de molle fue investigado usando el método de destilación por arrastre con vapor. El aceite es menos denso que el agua, esto permite la separación del aceite esencial del agua después de la obtención.

Las características físicas del aceite esencial de las hojas de molle presentó una densidad promedio de 0.8943 g/ml, el índice de refracción obtenido es de 1.496 y la solubilidad en etanol al 90% fue de 0.1 a 1.2 vol.

La características químicas del aceite esencial de las hojas de molle presentó el número de éster de 10.43 mg KOH / g aceite y el índice de acidez de 2.74 mg KOH / g aceite.

Los análisis de cromatografía de gases acoplado a espectroscopía de masas registró 62 componentes volátiles en el aceite esencial de las hojas de molle, siendo los componentes volátiles mayoritarios

alphaphellandrene (17.13 %), alphaPinene (15.57 %), D-limonene (11.03 %) y Camphene (10.92 %), por lo tanto, se puede decir que estos compuestos químicos son los responsables de las propiedades antimicrobianas que se le atribuyen a esta planta.

Hipótesis específica 1

Las condiciones adecuadas para llevar a cabo un mayor rendimiento en la obtención del aceite esencial de molle (*Schinus molle* L.) están relacionadas con la cantidad de material vegetal, la cantidad de agua y el tamaño de partícula.

Se determinó que para llevar a cabo un mayor rendimiento en la obtención del aceite esencial de hojas de molle se utilizó un tamaño de partícula de 1.50 cm, cantidad de material vegetal de 1.50 kg y cantidad de agua de 6 l, de la cual se obtuvo un rendimiento de 1.20 %, como se puede apreciar en la superposición de graficas N° 5.1.

En el grafico N° 5.2 se registra la superposición de gráficas de la obtención de aceite esencial de molle para un tamaño de partícula de 3.5 cm, donde se obtuvo que el mayor rendimiento es de 1.03 %, con una cantidad de material vegetal de 1.50 kg y cantidad de agua de 8 l.

De estos resultados se concluye que a menor tamaño de partícula y menor cantidad de agua se obtuvo un mayor rendimiento de 1.20 %. También se concluye que la cantidad de agua, para las mismas cantidades de material vegetal, no influye en la velocidad de obtención.

En el cuadro N° 5.17 se registró el análisis de varianza de rendimiento vs cantidad de material vegetal, cantidad de agua y tamaño de partícula donde se observa que el p-valor es > a 0.05 en la variable cantidad de agua, por lo tanto, se acepta la hipótesis nula y se puede concluir que la influencia de la cantidad de agua no tiene efecto significativo sobre el rendimiento de obtención.

Hipótesis específica 2

El aceite esencial de molle (*Schinus molle* L.) contiene como componentes antimicrobianos al pineno y terpinen-4-ol.

El aceite esencial de molle (*Schinus molle* L.) contiene como componentes antimicrobianos al pineno (15.57 %), como componente mayoritario volátil, y al terpinen-4-ol (0.01 %) como componente minoritario.

Hipótesis específica 3

El efecto antimicrobiano del aceite esencial de molle (*Schinus molle* L.) sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia Coli* tiene un efecto significativo.

En el cuadro N° 5.7 se observa las concentraciones del aceite esencial de molle sobre *Escherichia coli*, de la cual se obtiene la gráfica N° 5.4 en la que se registra la curva de crecimiento y se puede concluir que este microorganismo tiende a resistir al antimicrobiano. Según el cuadro N°

5.9 se determinó que la fase de muerte o declive de *Escherichia coli* se registra hasta las 2.40 horas pero no se puede decir que se trata de un antimicrobiano, según el cuadro N° 5.8 para la concentración 0.10 ml AE/ml inoculo se reduce a 96.11 % y para la concentración de 1.60 ml AE/ml inoculo se reduce a 92.76 %, porque las concentraciones empleadas no fueron suficientes para eliminar el 99,9 % del inoculo inicial (esto se establece para CMI de un antibiótico). En el cuadro N° 5.10 se registra la letalidad K (velocidad de muerte celular) del aceite esencial de molle sobre *Escherichia coli* para la concentración de 0.10 ml AE / ml inoculo es 0.5725 Log (UFC/ml) / h y para la concentración de 1.60 ml AE / ml inoculo es 0.4800 Log (UFC/ml) / h.

En el cuadro N° 5.12 se muestran las concentraciones empleadas para *Staphylococcus aureus*, de la cual se obtiene la gráfica N° 5.7 donde se registra el efecto antimicrobiano del aceite esencial de molle sobre *Staphylococcus aureus*. Según el cuadro N° 5.14 se determinó que la fase de muerte o declive de *Staphylococcus aureus* se registra hasta las 50 horas y en el cuadro N° 5.13 se puede determinar que la concentración mínima inhibitoria es de 0.10 ml AE / ml inoculo con la muerte del 99.97 % del inoculo inicial, el cual correspondería a un antimicrobiano porque la concentración es suficiente para eliminar el 99,9 % del inoculo inicial. En el cuadro N° 5.15 se registra la letalidad K (velocidad de muerte celular) del aceite esencial de molle sobre *Staphylococcus aureus*, para la concentración de 0.10 ml AE / ml inoculo es 0.0630 Log (UFC/ml) / h.

6.2. Contrastación de resultados con otros estudios similares

Hipótesis general

La densidad del aceite esencial de las hojas de molle presentó una densidad promedio de 0.8943 g/ml, respecto a los resultados obtenidos estos se encuentran un 3.3 % por encima de los valores reportados en la literatura de Alba *et al.*, 2009, que fue de 0.8658 g/ml. El índice de refracción obtenido es de 1.496 y se encuentra dentro del rango promedio (1.4951-1.5032) obtenido por Viturro, *et al.*, 2010. Según estos resultados se puede concluir que el aceite esencial contiene hidrocarburos aromáticos ya que el aceite tiene una densidad menor de 0.9 y su índice de refracción es mayor a 1.47 según Viturro, *et al.*, 2010.

El análisis de cromatografía de gases acoplado a espectroscopía de masas registró 62 componentes volátiles en el aceite esencial de las hojas de molle, siendo los componentes volátiles mayoritarios alphaphellandrene (17.13 %), alphaPinene (15.57 %), D-limonene (11.03 %) y Camphene (10.92 %). Estos componentes identificados concuerdan con estudios anteriores, no obstante, los compuestos mayoritarios del aceite esencial de las hojas de molle obtenidos por Viturro *et al.*, (2010) fue sabineno (19.1 %), p-cimeno (7.9 %), limoneno (7.3 %), Δ -cadineno (8.2 %), mientras que los componentes alphaphellandrene (4.3 %), alphaPinene (4.5 %) y Camphene (6.1 %) se encontraron en menor proporción, esta diferencia pudiera deberse a múltiples factores ambientales como altura, localización, clima, época de cultivo, etc.

Hipótesis específicas 1

Los rendimientos de las 8 pruebas experimentales realizadas para la obtención de aceite esencial de hojas de molle se registra en el cuadro N° 5.1, donde se observa que para una cantidad de material vegetal de hojas de molle de 1.50 kg, cantidad de agua de 6 l y un tamaño de partícula de 1.50 cm se obtuvo un mayor rendimiento de 1.20 %, este resultado estuvo dentro del rango de rendimiento obtenido por Viturro *et al.*, 2010 pues registraron rendimientos de aceite esencial de hojas de molle de 1-3.04 %.

Hipótesis específicas 2

El aceite esencial de molle (*Schinus molle* L.) contiene como componentes antimicrobianos al pineno (15.57 %), como componente mayoritario, y al terpinen-4-ol (0.01%), como componente minoritario.

Los resultados fueron contrastadas con la literatura obtenida por Viturro *et al.*, 2010 se puede apreciar que el componente mayoritario fue sabineno (19.1%), mientras que el pineno solo se obtuvo un (4.5%) y el terpinen 4-ol no se encontró como componente, en Costa Rica se obtuvo sabineno al (22.7%) y terpinen-4-ol al (0.2 %) y en Brasil se obtuvo sabineno al (32.9 %) y terpinen-4-ol al (1.0 %). Se puede concluir que esta diferencia se debe a múltiples factores ambientales como altura, localización, clima, época de cultivo, etc.

Hipótesis específicas 3

Las concentraciones empleadas del aceite esencial de molle sobre *Escherichia coli* tuvo un leve efecto antimicrobiano en las primeras 2.40 horas, pero no fueron suficientes para eliminar el 99,9 % del inóculo inicial por lo tanto no se consideró al aceite esencial de molle como un antimicrobiano sobre esta bacteria, por otra parte según De Mendonça *et al.*, 2012, la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de molle para *Escherichia coli* fue de 11,25 mg / ml.

Para *Staphylococcus aureus* se registra el efecto antimicrobiano hasta las 50 horas y se puede determinar que la concentración mínima inhibitoria (CMI) es de 0.10 ml AE/ml inóculo con la muerte del 99.97 % del inóculo inicial, el cual correspondería a un antimicrobiano porque la concentración es suficiente para eliminar el 99,9 % del inóculo inicial, si comparamos el resultado con referencia a lo señalado por De Mendonça *et al.*, 2012, quien obtuvo una concentración mínima inhibitoria para *Staphylococcus aureus* de 2,81 mg / ml, se concluye una menor concentración de aceite esencial de molle en nuestros resultados.

VII. CONCLUSIONES

- a) Las características físicas del aceite esencial de las hojas de molle presentó una densidad promedio de 0.8943 g/ml, el índice de refracción obtenido fue de 1.496 y la solubilidad en etanol al 90% fue de 0.1 a 1.2 ml.
- b) La características químicas del aceite esencial de las hojas de molle presentó el número de éster de 10.43 mg KOH / g aceite y el índice de acidez de 2.74 mg KOH / g aceite.
- c) Los análisis de cromatografía de gases acoplado a espectroscopía de masas registró 62 componentes volátiles en el aceite esencial, siendo los componentes mayoritarios alphaphellandrene (17.13 %), alphaPinene (15.57 %), D-limonene (11.03 %) y Camphene (10.92 %).
- d) Mediante esta investigación se ha demostrado que las condiciones adecuadas para obtener el mayor rendimiento (1.20 %) en la obtención del aceite esencial de las hojas de molle (*Schinus molle* L.) son: cantidad de material vegetal de hojas de molle de 1.50 kg, cantidad de agua de 6 l, tamaño de partícula de 1.5 cm a un tiempo de obtención de 99 minutos.
- e) De los resultados se concluye que a menor tamaño de partícula y menor cantidad de agua se obtuvo un mayor rendimiento y también

que la cantidad de agua, para las mismas cantidades de material vegetal, no influye en la velocidad de obtención.

- f) De acuerdo al análisis de CG-EM del aceite esencial de las hojas de molle se registró al pineno como uno de los componentes volátiles mayoritarios con un 15.57 % mientras que al terpinen-4-ol como uno de los componentes minoritarios con un 0.01 %.
- g) El aceite esencial de molle puede ser empleado como antimicrobiano sobre la bacteria *Staphylococcus aureus*, debido a que contiene al componente activo denominado pineno como uno de los componentes volátiles mayoritarios, con una concentración mínima inhibitoria de 0.10 ml AE/ml inoculo con la muerte del 99.97 % del inoculo inicial.
- h) El aceite esencial de molle no puede ser empleado como antimicrobiano sobre la bacteria *Escherichia coli*, ya que el contenido del componente activo terpinen-4-ol es minoritario, para la concentración 0.10 ml AE/ml inoculo se reduce a 96.1095 % y para la concentración de 1.60 ml AE/ml inoculo se reduce a 92.7556 % y que es insuficiente para que se cumpla el efecto antimicrobiano.

VIII. RECOMENDACIONES

- a) Se recomienda continuar con la búsqueda de la concentración mínima inhibitoria para la cepa *Escherichia coli*, con una población menor a 1×10^6 UFC/ml evaluado a diferentes concentraciones de aceite esencial de hojas de molle, debido a que es una cepa muy resistente.
- b) Se recomienda realizar la obtención de aceite esencial de hojas y frutos de molle simultáneamente, para obtener en mayor proporción al componente activo terpinen-4-ol, con la finalidad de ser empleado como antimicrobiano sobre la bacteria *Escherichia coli*.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. BANDONI, Arnaldo. **Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica: su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores.** Buenos Aires. Segunda edición. 2003.
2. BELHAMEL, K., ABDERRAHIM, A., LUDWIG, R. **Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Schinus molle* L. grown in Algeria.** *Revista Internacional Terapéutica de Aceite Esencial*. Vol. 2: 175 a 177. 2008.
3. CALDERÓN CEVALLOS, Daniela Elizabeth, GUERRERO RICAURTE, Ana Isabel. **Análisis del efecto antibacterial de aceites esenciales de *Lepechinia rufocampii* y *Minthostachys tomentosa* sobre cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella thyphimurium*.** Tesis previa a la obtención del título de Bioquímico farmacéutico. Cuenca. Universidad de Cuenca. 2013.
4. CÓNDOR TIERRA, Glenda Paulina. **Evaluación de la actividad expectorante de molle (*Schinus molle* L.), Iso (*Dalea coerulea*), Jacaranda (*Jacaranda mimosifolia*), Jengibre (*Zingiber officinale*), Romero (*Rosmarinus officinalis*), Marrubio (*Marrubium vulgare*), en ratones (*Mus musculus*).** Tesis para

optar título de Bioquímico Farmacéutico. Riobamba. Escuela superior politécnica de Chimborazo. 2014.

5. DE MENDONÇA ROCHA, Pedro, RODILLA, Jesús, DIEZ, David, ELDER, Heriberto, GUALA María Silvia, SILVA, Lucia, BALTAZAR POMBO, Eunice. **Synergistic Antibacterial Activity of the Essential Oil of Aguaribay (*Schinus molle* L.).** *Moléculas*. Vol. 17: 12023 a 12036. 2012.
6. DIAZ FAJARDO, Olga Liliana. **Estudio comparativo de la composición química y evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial de *Aloysia triphylla* (L' Her) Britton, cultivada en tres regiones de Colombia.** Tesis presentada para optar el título de Químico. Bucaramanga. Universidad Industrial de Santander. 2007.
7. ERYIGIT, Tamer, YILDIRIM, Bunyamin, EKICI, Kamil, ÇIRKA, Mustafa. **Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Properties of *Schinus molle* L. Essential Oil from Turkey.** *Diario de las plantas de aceite esencial*. 2017.
8. GRANADOS MONTENEGRO, Ronald, ARIAS JAIMES, Wilmer Alberto. **Diseño de una planta extractora de aceites esenciales por arrastre de vapor.** Trabajo de Grado para optar el título de

Ingeniero Mecánico. Bucaramanga. Universidad Industrial de Santander. 2007.

9. GUNDIDZA, M. **La actividad antimicrobial del aceite esencial de *Schinus molle* L.** Revista Médica Africana. Brasil. Vol. 39 (Nº11): 231 a 234. 1993.
10. J. ARMIJO C., E. VICUÑA G., P. ROMERO, OTINIANO C., CONDORHUAMÁN C., B. HILARIO R. **Modelamiento y simulación del proceso de Extracción de aceites esenciales mediante la Destilación por arrastre con vapor,** en Per. Quím. Ing. Quím. Vol. 15 (Nº 2): 19 a 27. 2012.
11. LOMBARDO Atilio. **Árboles y arbustos**. Montevideo. Nuestra Tierra. 1969.
12. LLANOS ARAPA, Karen Shepanie. **Extracción y caracterización del aceite Esencial de molle (*Schinus molle* L.)**. Tesis para optar el Título de Ingeniero en Industrias Alimentarias. Tacna. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. 2012.
13. MARQUEZ SITLALI, Diego. **Evaluación del rendimiento en la obtención del aceite "*Piper auritum kunth*" mediante la hidrodestilación asistida por microondas**. Tesis para optar el

Título de Ingeniero Químico. Veracruz. Universidad Veracruzana
Facultad de Ciencias Químicas. 2011.

14. MEHANI, M., SEGNI, L. **Antimicrobial Effect of Essential Oil of Plant *Schinus molle* on Some Bacteria Pathogens.** Investigación científica y académica internacional e innovación. Vol. 7 (Nº 12): 1036 a 1038. 2013.

15. MENDEZ LEMA, Elsa Estela. **Elaboración, control de calidad y evaluación “in vivo” de la actividad antibacteriana de un gel obtenido del extracto alcaloidal del chocho.** Tesis de grado para la obtención del Título de Bioquímico Farmacéutico. Riobamba. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. 2008.

16. OSORIO MARUJO, Bilma Elizabeth. **Estudio del *Schinus molle* y el proceso de obtención del aceite esencial.** Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Químico. Lima. Universidad Nacional de Ingeniería. 2002.

17. RIVERA CALLE, Pedro Manuel. **Modelamiento para la simulación y control dinámico del proceso de arrastre con vapor del aceite esencial de limón.** Tesis para optar el título de Ingeniero Químico. Universidad Nacional de Piura. 2007.

18. RODRÍGUEZ, A., R. EGÚSQUIZA. **Efecto del molle (*Schinus molle*) y sus extractos en el control de *Phthorimaea operculella* en almacenes de papa.** Resúmenes y programa de la 38ª Convención Nacional de Entomología, Chincha, Perú. Sociedad Entomológica del Perú. 1996. Pp: 23.
19. RODRÍGUEZ LUGO, Valeria, TORRES CASTILLO, Jocelyn, PÉREZ VARGAS, Salvador. **Gel antibacterial orgánico.** Bachillerato en Ciencias Biológicas, Químicas y de la Salud. 2016.
20. SALAZAR, Rodolfo, SOIHET, Carolina. **Manejo de semillas de 75 especies forestales de América Latina.** Turrialba. Danida Forest Seed Centre. Vol. 2. 2001.
21. UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA. **Extracción del aceite esencial de las hojas y frutos de las especies *Schinus molle* y *Schinus terebinthifolius* mediante extracción discontinua con arrastre de vapor.** Chimbote. Ingeniería Agroindustrial.
22. VITURRO, Carmen, BANDONI, Arnaldo, DELLACASSA, Eduardo, SERAFINI ATTI, Luciana y ELDER, Heriberto. **Normalización de productos naturales obtenidos de especies de la flora aromática latinoamericana - Problemática *Schinus* en Latinoamérica.** Proyecto CYTED IV.20. Edipucrs. Editora

Universitaria de Pontificia Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2010. Pp: 205-280.

23. SISTEMA NACIONAL DE INFORMACIÓN FORESTAL. (2010).

Schinus molle L. Recuperado el 11 de abril del 2016. Disponible en:

http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/documentos/3_anaca4m.pdf

ANEXOS

Anexo N° 1. Matriz de consistencia completa

Caracterización química y efecto antimicrobiano del aceite esencial de molle (*Schinus molle* L.) obtenido por el método de arrastre con vapor

PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPÓTESIS GENERAL	VARIABLE DEPENDIENTE	DIMENSIONES	INDICADORES	MÉTODO
¿Cuál es la caracterización física, química y el efecto antimicrobiano del aceite esencial de molle (<i>Schinus molle</i> L.) obtenido por el método de arrastre con vapor?	Determinar la caracterización física, química y el efecto antimicrobiano del aceite esencial de molle (<i>Schinus molle</i> L.) obtenido por el método de arrastre con vapor.	El aceite esencial de molle (<i>Schinus molle</i> L.) obtenido por el método de arrastre con vapor reducen la carga microbiana significativamente sobre <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia Coli</i> debido a sus características físicas y químicas.	Y= Caracterización física, química y efecto antimicrobiano del aceite esencial de molle (<i>Schinus molle</i> L.) obtenido por el método de arrastre con vapor.	- %. - Adimensional - g/ml. - %v/v. - mg KOH/g. - mg KOH/g.	- Rendimiento. - Índice de refracción. - Densidad y densidad relativa. - Solubilidad en etanol. - Índice de acidez. - Índice de éster.	- Normas técnicas Peruanas 319.084:1974 para los aceites esenciales.
SUB - PROBLEMA	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	HIPÓTESIS ESPECÍFICAS	VARIABLES INDEPENDIENTES	DIMENSIONES	INDICADORES	MÉTODO
a. ¿Cuáles son las condiciones adecuadas para la obtención del aceite esencial de molle (<i>Schinus molle</i> L.)?	a. Determinar las condiciones adecuadas para la obtención del aceite esencial de molle (<i>Schinus molle</i> L.).	a. Las condiciones adecuadas para llevar a cabo un mayor rendimiento en la obtención del aceite esencial de molle (<i>Schinus molle</i> L.) están relacionadas con la cantidad de material vegetal, la cantidad de agua y el tamaño de partícula.	X ₁ = Condiciones adecuadas para la obtención del aceite esencial de molle (<i>Schinus molle</i> L.).	- kg - l - cm	- Cantidad de hojas de molle. - Cantidad de agua. - Tamaño de partícula.	- Experimental.
b. ¿Cuáles son los componentes activos del aceite esencial de molle (<i>Schinus molle</i> L.) que le confiere efecto antimicrobiano?	b. Determinar los componentes activos del aceite esencial de molle (<i>Schinus molle</i> L.) que le confiere efecto antimicrobiano.	b. El aceite esencial de molle (<i>Schinus molle</i> L.) contiene como componentes antimicrobianos al pineno y terpinen-4-ol.	X ₂ = Componentes activos del aceite esencial de molle (<i>Schinus molle</i> L.) que le confiere efecto antimicrobiano.	- %	- Composición química.	- Cromatografía de gases con espectroscopía de masas (CG-EM).
c. ¿Cuál es el efecto antimicrobiano del aceite esencial de molle (<i>Schinus molle</i> L.) sobre <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia Coli</i> ?	c. Determinar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de molle (<i>Schinus molle</i> L.) sobre <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia Coli</i> .	c. El efecto antimicrobiano del aceite esencial de molle (<i>Schinus molle</i> L.) sobre <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia Coli</i> tiene un efecto significativo.	X ₃ = El efecto antimicrobiano del aceite esencial de molle (<i>Schinus molle</i> L.) sobre <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia Coli</i> .	- ml de aceite esencial/ml de inóculo.	- Concentración mínima inhibitoria.	- Diluciones seriadas decimales y recuentos en placa.

Anexo N° 2. Taxonomía de *Schinus molle* L.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año de la Consolidación del Mar de Grau"

CONSTANCIA N° 130-USM-2016

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

La muestra vegetal (planta completa) recibida de **KARIN ISABEL PACHECO HUAMAN**, estudiante de la Universidad Nacional del Callao, ha sido estudiada y clasificada como: *Schinus molle* L., y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: ROSIDAE

ORDEN: SAPINDALES

FAMILIA: ANACARDIACEAE

GENERO: *Schinus*

ESPECIE: *Schinus molle* L.

Nombre vulgar: "molle"

Determinado por: Blgo. Severo Baldeón Malpartida

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Lima, 14 junio de 2016



Haydeé Montoya Terreros
Dra. Haydeé Montoya Terreros
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

DDB

Anexo N° 3. Análisis físicos y químicos del aceite esencial de molle



UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
FACULTAD DE CIENCIAS
LABICER (Laboratorio N° 12)
ANÁLISIS QUÍMICO, CONSULTORÍA E INVESTIGACIÓN

LABICER

INFORME TÉCNICO N° 1006 - 17 - LAB. 12

1. DATOS DEL SOLICITANTE
 - 1.1 NOMBRE DEL SOLICITANTE : KARIN PACHECO HUAMAN
 - 1.2 DNI : 42030580
2. CRONOGRAMA DE FECHAS
 - 2.1 FECHA DE RECEPCIÓN : 07 / 07 / 2017
 - 2.2 FECHA DE ENSAYO : 10 / 07 / 2017
 - 2.3 FECHA DE EMISIÓN : 17 / 07 / 2017
3. ANÁLISIS SOLICITADO : ANÁLISIS DE ACEITE ESENCIAL
4. DATOS REFERENCIALES DE LA MUESTRA
 - 4.1 IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA : 01 MUESTRA DE ACEITES ESENCIAL DE HOJA DE MOLLE
5. LUGAR DE RECEPCIÓN : LABORATORIO LABICER - FACULTAD DE CIENCIAS
6. CONDICIONES AMBIENTALES : Temperatura: 24.5 °C; Humedad relativa: 55%
7. EQUIPOS UTILIZADOS :

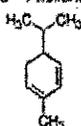
CROMATÓGRAFO DE GASES. SHIMADZU, GC-2010 Plus.
AUTOMUESTREADOR: SHIMADZU, AOC-6000.
Detector de espectrometría de masas: SHIMADZU, GCMS-OP210 Ultra.
COLUMNA GC: RESTEK, RTX-5MS, 30m x 0.25 mm iD x 0.25 µm df. Serial: 1346249

8. RESULTADOS

8.1. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS

ANÁLISIS	RESULTADOS	MÉTODO DE REFERENCIA
Índice de acidez, (mg KOH/g aceite)	2.74	NTP 319.085
Número de ester (mg KOH/g aceite)	10.43	NTP 319.085
Solubilidad en etanol al 90%	Soluble en 0.1 a 1.2 vol.	NTP 319.084

8.2. ANÁLISIS CUALITATIVO (COMPONENTES VOLÁTILES)

MUESTRA	COMPONENTE PRINCIPAL	MÉTODO DE REFERENCIA
	Análisis de Componentes Volátiles - Inyección por Headspace (HS)	
Aceite esencial de hoja de molle	Alpha - Phellandrene  (Área relativa: 29.40%)	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas

*Ver en Anexos (Tabla N°1) la lista de compuestos de la muestra, obtenida por el software del equipo GCMSolution de SHIMADZU utilizando la librería NIST.

9. OBSERVACIONES

Se encontraron 62 componentes volátiles en la muestra de aceite esencial de hoja de molle, siendo los componentes mayoritarios: alpha phellandrena (17.13%), alpha Pinene (15.57%), Camphene (10.92%) y D-limonene (11.03%)

10. VALIDEZ DEL INFORME TÉCNICO

Los resultados de este informe técnico son válido solo para la muestra proporcionada por el solicitante del servicio en las condiciones indicadas del presente informe técnico.


Bach. Jesús Utano Reyes
Analista
LABICER-UNI


Bach. Fiorella Meoño Barfuren
Analista
LABICER-UNI



MSc. Otilia Acha de la Cruz
Responsable de Análisis
Jefa de laboratorio
CQP 202

El Laboratorio no se responsabiliza del muestreo ni de la procedencia de la muestra.

ANEXOS

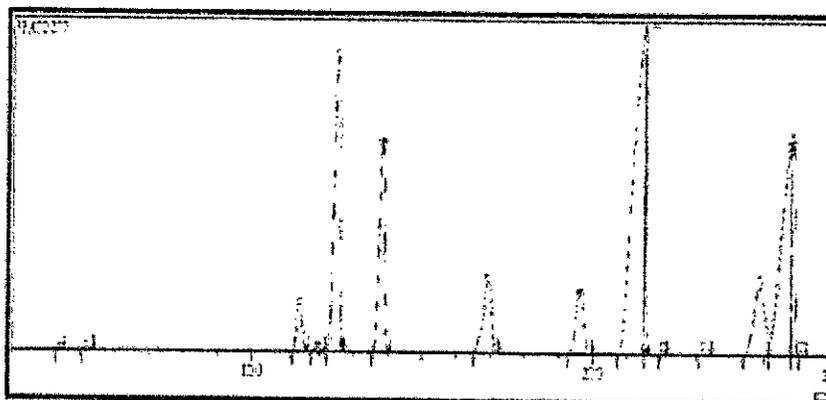


FIGURA N°1: PRIMERA PARTE DEL CROMATOGRAMA DE 3 A 27 MINUTOS

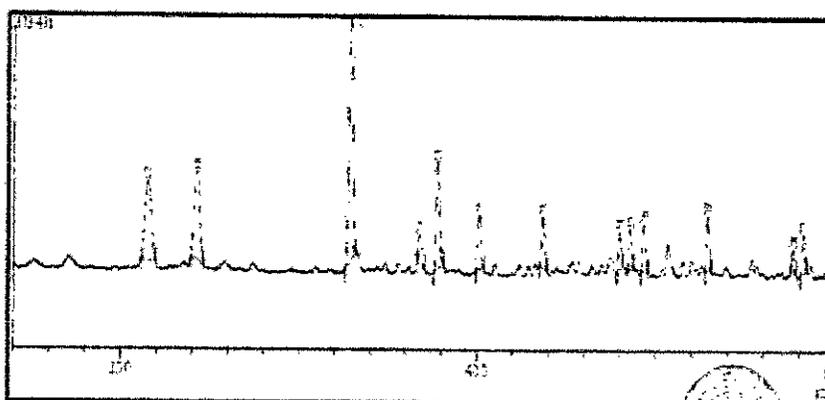


FIGURA N°2: SEGUNDA PARTE DEL CROMATOGRAMA DE 27 A 50 MINUTOS

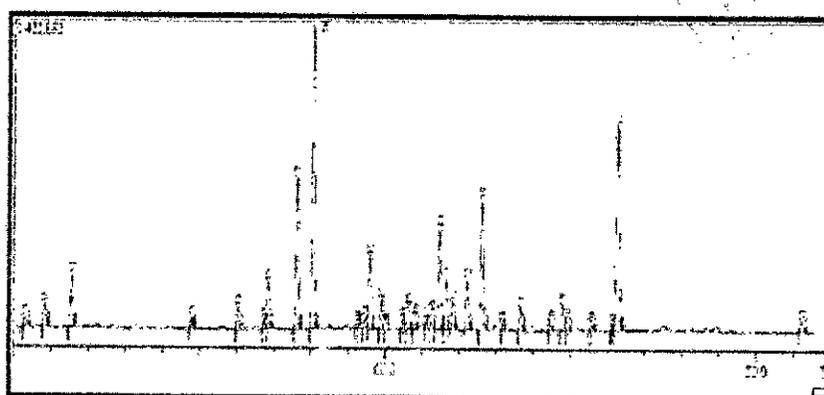


FIGURA N°3: TERCERA PARTE DEL CROMATOGRAMA DE 50 A 72 MINUTOS

TABLA N°1: RESULTADOS DE COMPOSICIÓN DE ACEITE ESENCIAL

Peak	R. Time	Area	Area%	Height	Height%	Name
1	4.441	1052831	0.04	101527	0.05	Toluene
2	5.195	2414719	0.14	379246	0.17	Hexane 2,4-dimethyl
3	11.887	59108273	2.25	4894054	2.51	Tricyclo[2.2.1.0(2,6)]heptane 1,7,7-trimethyl
4	11.945	3950763	0.16	517659	0.17	Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene 2-methyl-5-(1-methylethyl)
5	12.510	350440266	14.32	2978062	15.57	alpha-Pinene
6	13.829	231696281	9.55	30881660	19.92	Camphene
7	16.940	119109180	4.87	7367550	3.85	Bicyclo[3.1.1]heptane 6,6-dimethyl-2-methylene-, (1S)
8	19.618	98301264	4.01	5907600	3.09	beta-Myrcene
9	21.481	719215971	29.46	32799048	17.13	alpha-Phellandrene
10	21.509	107978774	4.38	33298171	17.41	alpha-Phellandrene
11	22.056	312490	0.01	45867	0.02	Tricyclo[2.2.1.0(2,6)]heptane 1,3,3-trimethyl
12	23.245	969015	0.04	87061	0.05	1,3-Cyclohexadiene 1-methyl-4-(1-methylethyl)
13	24.870	153059284	6.22	6674773	3.59	o-Cymene
14	25.764	418012602	16.96	20749041	10.59	alpha-Phellandrene
15	25.846	181539979	6.19	21699171	11.03	D-Limonene
16	26.084	526466	0.02	62217	0.03	Encalyptol
17	26.736	1049991	0.04	80013	0.05	1,3,6-Octatriene 2,7-dimethyl-, (Z)
18	27.111	1054829	0.04	96226	0.05	gamma-Terpinene
19	26.434	3073750	0.06	313721	0.14	Cyclohexene 1-methyl-4-(1-methylethyl)
20	26.364	141112	0.01	25117	0.01	Linalool
21	28.883	749667	0.03	119312	0.06	Nonanal
22	40.049	346781	0.01	69656	0.03	7-Norbornen-2-ol 4,8-dimethyl
23	41.825	329321	0.01	56660	0.03	(-)-2-Bornanone
24	45.990	196959	0.01	40643	0.02	1,2-Dimethyl-1-cyclohexene
25	44.278	217230	0.01	44982	0.02	1,3-Dimethyl-1-cyclohexene
26	44.664	279431	0.01	53499	0.03	Terpinen-4-ol
27	46.425	289344	0.01	62371	0.03	Bicyclo[3.1.0]hexane-5-ol 2-methylene-1-(1-methylethyl)-, (1 alpha,3)
28	48.821	77326	0.00	21617	0.01	Benzaldehyde 4-(1-methylethyl)
29	49.102	220259	0.01	44413	0.02	2,6-Octadienal 3,7-dimethyl-, (Z)
30	50.246	152248	0.01	34328	0.02	2-Decenal (E)
31	50.640	410132	0.02	92475	0.05	2,6-Octadienal 3,7-dimethyl-, (Z)
32	51.557	946897	0.04	233853	0.12	Bornyl acetate
33	54.790	17382	0.01	44763	0.02	alpha-Cubebene
34	56.036	247271	0.01	91609	0.05	alpha-Cubebene
35	56.745	163081	0.01	38591	0.02	Bicyclo[4.4.0]dec-1-ene 2-isopropyl-5-methyl-9-methylene-
36	56.844	606400	0.02	198815	0.10	Cyclohexane 1-ethyl-1-methyl-2,4-bis(1-methylethyl)-, (1S) (1,4)
37	57.628	274240	0.11	650286	0.34	1H-Cyclopropylacetaldehyde 1a,7,3,3a,4,5,6,7b-octahydro-1,1,3a,7a
38	58.063	5234895	0.23	1368666	0.70	Caryophyllene
39	59.289	57583	0.00	18097	0.01	Eucarvone
40	59.468	142966	0.01	37426	0.02	alpha-Cubebene
41	59.590	1304889	0.05	312950	0.16	Humulene
42	59.918	531142	0.02	121423	0.06	Alloxandrene
43	60.020	159849	0.01	41862	0.02	Bicyclo[4.4.0]dec-1-ene 2-isopropyl-5-methyl-9-methylene-
44	60.500	157923	0.01	41842	0.02	Naphthalene 1,2,5,6,8a-bis(hydro-1,7-dimethyl-1,4-methylethyl)
45	60.657	399496	0.02	96717	0.05	gamma-Muurolene
46	60.897	216113	0.01	55114	0.03	Geranylacetone
47	61.127	115294	0.00	31953	0.02	Azulene 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-1,4-dimethyl-7,4-(1-methylethyl)
48	61.171	277573	0.01	65316	0.03	Bicyclo[4.4.0]dec-1-ene 2-isopropyl-5-methyl-9-methylene-
49	61.491	2118199	0.09	422282	0.23	Cyclohexane 1-ethyl-1-methyl-2-(1-methylethyl)-4-(1-methylethyl)
50	61.853	895317	0.04	210271	0.11	alpha-Muurolene
51	61.842	504252	0.02	120765	0.06	Cyclohexane 1-ethyl-1-methyl-2,4-bis(1-methylethyl)-, (1S) (1,4)
52	62.223	945144	0.04	211899	0.11	gamma-Muurolene
53	62.617	232505	0.10	550413	0.29	Naphthalene 1,2,4a,5,8a-bis(hydro-1,7-dimethyl-1,4-methylethyl)
54	63.178	98812	0.00	2812	0.00	Naphthalene 1,2,4a,5,6,8a-bis(hydro-1,7-dimethyl-1,4-methylethyl)
55	63.073	415227	0.02	87852	0.05	Cyclohexanemethanol 4-ethyl-3-(1,4-dimethyl-1,4-methylethyl)
56	64.469	145245	0.01	34295	0.02	1H-Cyclopropylacetaldehyde 1a,7,3,3a,4,5,6,7b-octahydro-1,1,4,7-tetramethyl-, (1aR,4)
57	64.819	471794	0.02	182043	0.09	(2E,4E,7E)-4-Isopropyl-1,7-dimethylcyclohexa-2,7-diene
58	64.823	168615	0.01	40559	0.02	1H-Cyclopropylacetaldehyde 1a,7,3,3a,4,5,6,7b-octahydro-1,1,7-bis(1,4-methylethyl)-
59	65.897	179665	0.01	26579	0.02	Leleol
60	66.135	67157	0.00	17812	0.01	(-)-Globulol
61	66.283	4584180	0.19	87227	0.46	Bicyclo[10.1.0]undec-1-ene
62	71.257	279666	0.01	59458	0.03	2,6,10,14-Tetradecatrien-1-ol 1,7,11,15-tetramethyl-, acetate (E,E,E)
		2446370661	100.00	191789751	100.00	

Handwritten signature: *Otilia Ach...*
Circular stamp: *Otilia Ach...*

Anexo N° 4. Normas técnicas peruanas para los aceites esenciales

Los métodos de análisis para la identificación del aceite esencial de molle (*Schinus molle* L.), fueron los siguientes:

Determinación de la densidad

La densidad se llevó a cabo empleando la Norma Técnica Peruana para los aceites esenciales: NTP 319.081:1974. La densidad relativa es la relación de la densidad del aceite esencial y la del agua destilada.

Determinación del índice de refracción

El índice de refracción se determinó empleando la Norma Técnica Peruana para los aceites esenciales: NTP 319.075:1974. El Índice de Refracción de un aceite esencial es la relación del seno del ángulo de incidencia al del ángulo de refracción, de un rayo luminoso de longitud de onda determinada, que pasa del aire al aceite esencial, manteniendo una temperatura constante.

Determinación de la solubilidad en etanol

La solubilidad en etanol se llevó a cabo empleando la Norma Técnica Peruana para los aceites esenciales: NTP 319.084:1974. Es aquella cuya solución que aclara volúmenes de alcohol de graduación t, y permanece constante después de la adición posterior de alcohol de la misma concentración, hasta completar un total de 20 volúmenes del alcohol empleado.

Determinación del índice de éster

El Índice de Ester se determinó con la Norma Técnica Peruana para los aceites esenciales: NTP 319 088:1974. Es el número de miligramos de hidróxido de potasio para neutralizar los ácidos liberados por hidrólisis de los esteres contenidos en una muestra de aceite esencial.

Determinación del índice de acidez

El Índice de acidez se determinó con la Norma Técnica Peruana para los aceites esenciales: NTP 319.085:1974. Es la cantidad de miligramos de hidróxido de potasio para neutralizar los ácidos libres contenidos en un gramo de aceite esencial.

Identificación de los componentes del Aceite Esencial de *Schinus molle* L. por Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas

Los componentes se determinaron por el método de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, el cual obtuvo el espectro de masas de cada componente del aceite esencial de molle con el cual se obtiene el peso molecular e información estructural. Este método se llevó a cabo en un Cromatógrafo de marca SHIMADZU, GC-2010 Plus; acoplado a un detector de espectrometría de masas marca SHIMADZU, GCMS-QP210 Ultra; un automuestreador de marca SHIMADZU, AOC-6000 y una columna GC RESTEK. RTX-5MS, 30m x 0.25mm ID x 0.25µm df. Serial: 1346249; pertenecientes al laboratorio LABICER de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería.

Anexo N° 5. Pruebas experimentales para la obtención del aceite esencial del molle

CUADRO N° 1

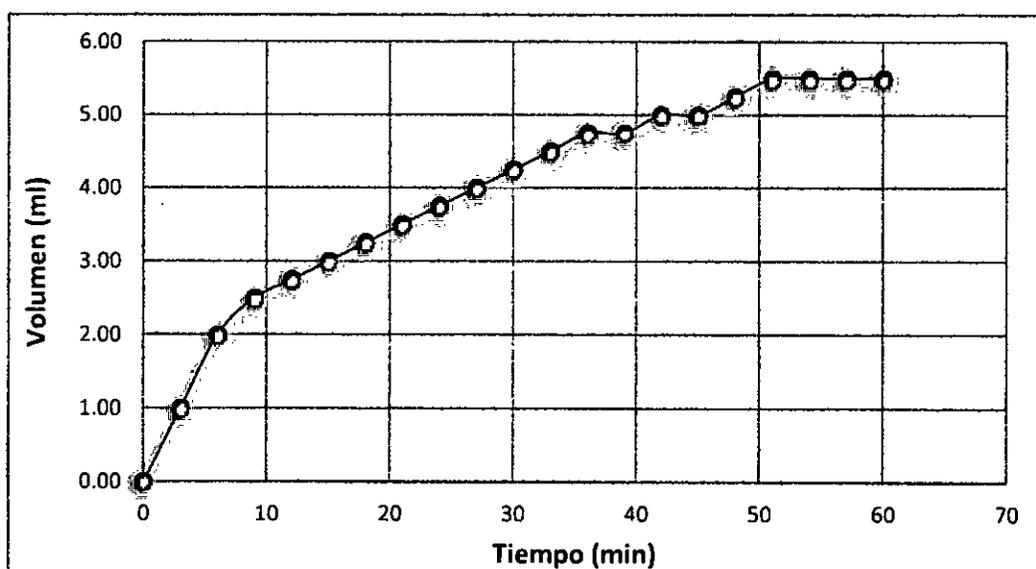
1° PRUEBA PARA LA OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE MOLLE

Tiempo (min)	Volumen (ml)	Tiempo (min)	Volumen (ml)	Tiempo (min)	Volumen (ml)
0	0.00	21	3.50	42	5.00
3	1.00	24	3.75	45	5.00
6	2.00	27	4.00	48	5.25
9	2.50	30	4.25	51	5.50
12	2.75	33	4.50	54	5.50
15	3.00	36	4.75	57	5.50
18	3.25	39	4.75	60	5.50

Fuente: Elaboración propia

GRÁFICO N° 1

CURVA DE LA 1° PRUEBA PARA LA OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE MOLLE



Fuente: Elaboración propia

CUADRO N° 2

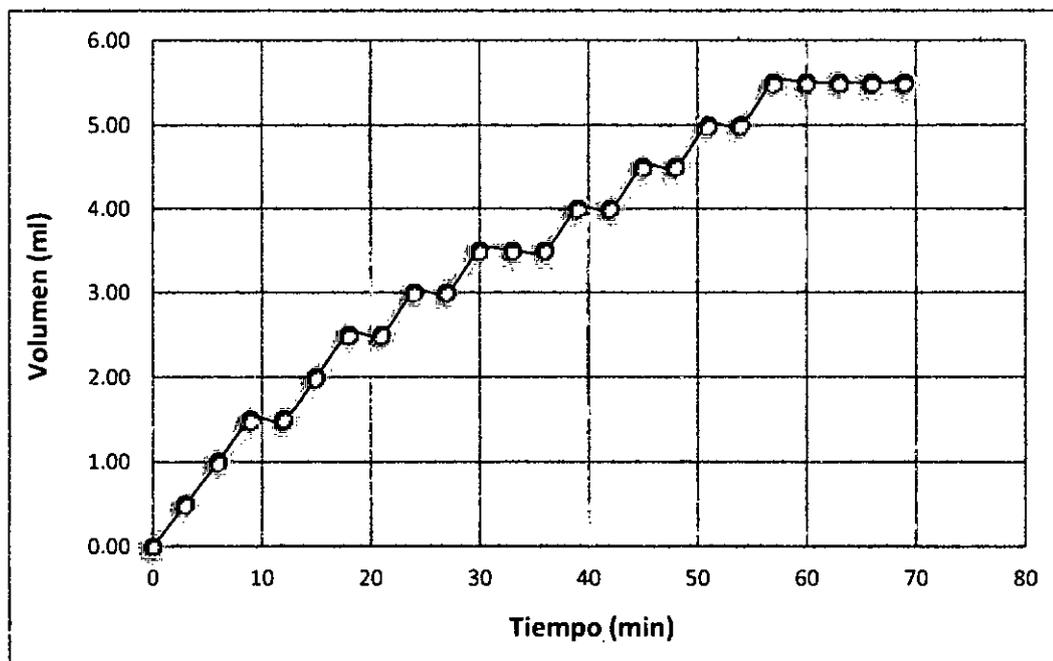
2° PRUEBA PARA LA OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE MOLLE

Tiempo (min)	Volumen (ml)	Tiempo (min)	Volumen (ml)	Tiempo (min)	Volumen (ml)
0	0.00	24	3.00	48	4.50
3	0.50	27	3.00	51	5.00
6	1.00	30	3.50	54	5.00
9	1.50	33	3.50	57	5.50
12	1.50	36	3.50	60	5.50
15	2.00	39	4.00	63	5.50
18	2.50	42	4.00	66	5.50
21	2.50	45	4.50	69	5.50

Fuente: Elaboración propia

GRÁFICO N° 2

CURVA DE LA 2° PRUEBA PARA LA OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE MOLLE



Fuente: Elaboración propia

CUADRO N° 3

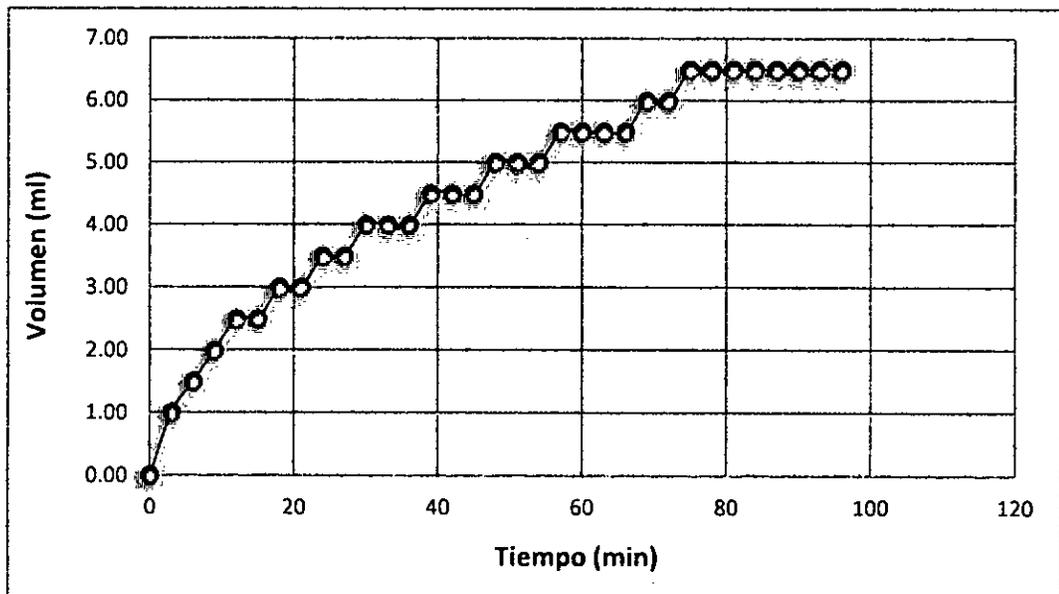
3° PRUEBA PARA LA OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE MOLLE

Tiempo (min)	Volumen (ml)	Tiempo (min)	Volumen (ml)	Tiempo (min)	Volumen (ml)
0	0.00	33	4.00	66	5.50
3	1.00	36	4.00	69	6.00
6	1.50	39	4.50	72	6.00
9	2.00	42	4.50	75	6.50
12	2.50	45	4.50	78	6.50
15	2.50	48	5.00	81	6.50
18	3.00	51	5.00	84	6.50
21	3.00	54	5.00	87	6.50
24	3.50	57	5.50	90	6.50
27	3.50	60	5.50	93	6.50
30	4.00	63	5.50	96	6.50

Fuente: Elaboración propia

GRÁFICO N° 3

CURVA DE LA 3° PRUEBA PARA LA OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE MOLLE



Fuente: Elaboración propia

CUADRO N° 4

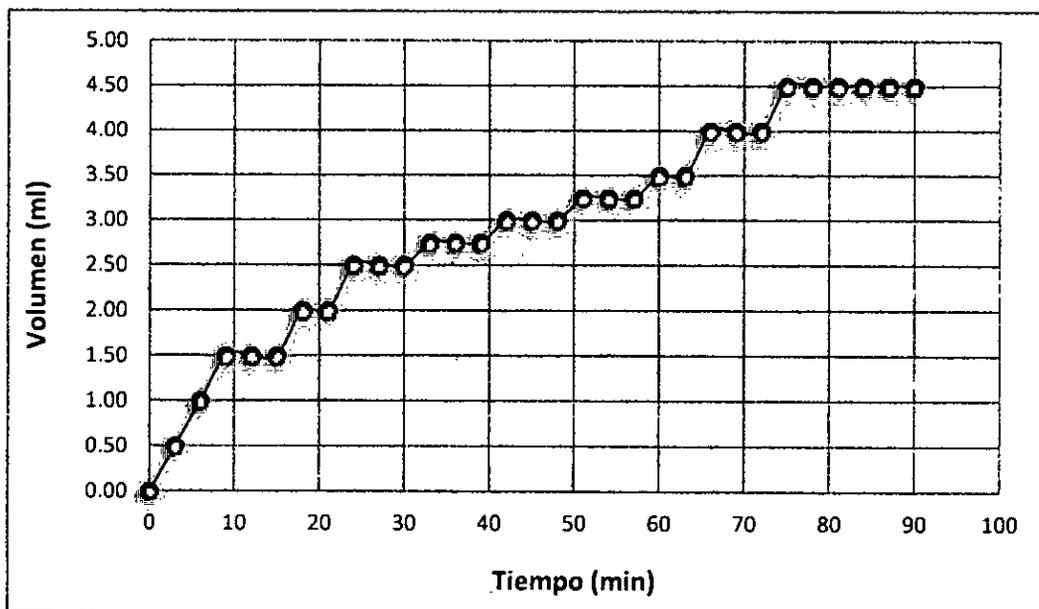
4° PRUEBA PARA LA OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE MOLLE

Tiempo (min)	Volumen (ml)	Tiempo (min)	Volumen (ml)	Tiempo (min)	Volumen (ml)
0	0.00	33	2.75	66	4.00
3	0.50	36	2.75	69	4.00
6	1.00	39	2.75	72	4.00
9	1.50	42	3.00	75	4.50
12	1.50	45	3.00	78	4.50
15	1.50	48	3.00	81	4.50
18	2.00	51	3.25	84	4.50
21	2.00	54	3.25	87	4.50
24	2.50	57	3.25	90	4.50
27	2.50	60	3.50		
30	2.50	63	3.50		

Fuente: Elaboración propia

GRÁFICO N° 4

CURVA DE LA 4° PRUEBA PARA LA OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE MOLLE



Fuente: Elaboración propia

CUADRO N° 5

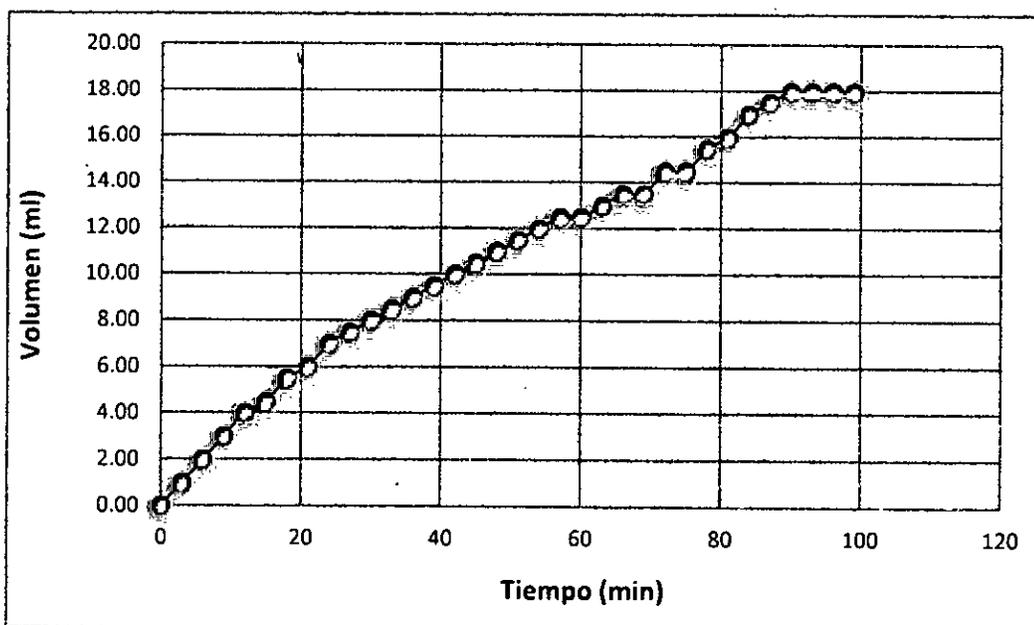
5° PRUEBA PARA LA OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE MOLLE

Tiempo (min)	Volumen (ml)	Tiempo (min)	Volumen (ml)	Tiempo (min)	Volumen (ml)
0	0.00	36	9.00	72	14.50
3	1.00	39	9.50	75	14.50
6	2.00	42	10.00	78	15.50
9	3.00	45	10.50	81	16.00
12	4.00	48	11.00	84	17.00
15	4.50	51	11.50	87	17.50
18	5.50	54	12.00	90	18.00
21	6.00	57	12.50	93	18.00
24	7.00	60	12.50	96	18.00
27	7.50	63	13.00	99	18.00
30	8.00	66	13.50		
33	8.50	69	13.50		

Fuente: Elaboración propia

GRÁFICO N° 5

CURVA DE LA 5° PRUEBA PARA LA OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE MOLLE



Fuente: Elaboración propia

CUADRO N° 6

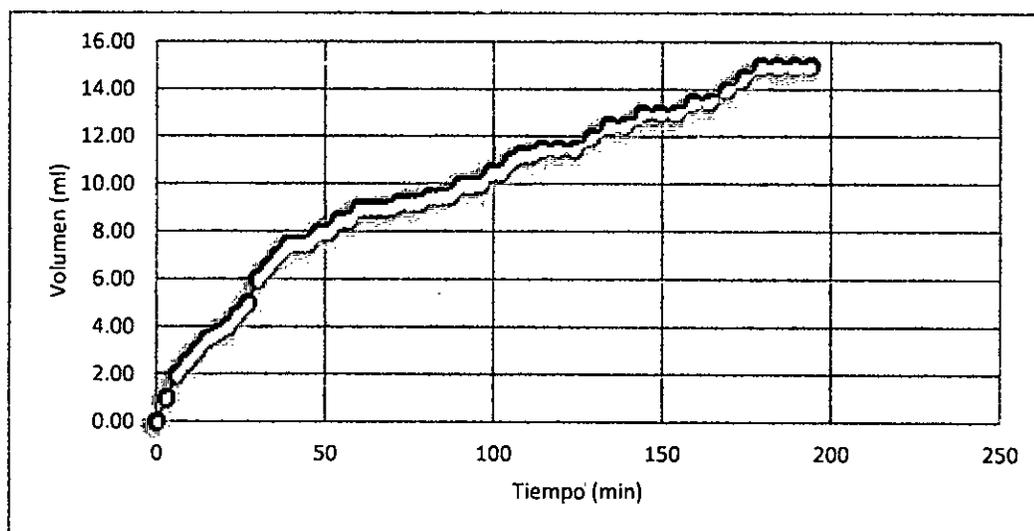
6° PRUEBA PARA LA OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE MOLLE

Tiempo (min)	Volumen (ml)	Tiempo (min)	Volumen (ml)	Tiempo (min)	Volumen (ml)
0	0.00	57	8.50	114	11.50
3	1.00	60	9.00	119	11.50
6	2.00	63	9.00	124	11.50
9	2.50	66	9.00	129	12.00
12	3.00	69	9.00	134	12.50
15	3.50	72	9.25	139	12.50
18	3.75	75	9.25	144	13.00
21	4.00	78	9.25	149	13.00
24	4.50	81	9.50	154	13.00
27	5.00	84	9.50	159	13.50
30	6.00	87	9.50	164	13.50
33	6.50	90	10.00	169	14.00
36	7.00	93	10.00	174	14.50
39	7.50	96	10.00	179	15.00
42	7.50	99	10.50	184	15.00
45	7.50	102	10.50	189	15.00
48	8.00	105	11.00	194	15.00
51	8.00	108	11.25		
54	8.50	111	11.25		

Fuente: Elaboración propia

GRÁFICO N° 6

CURVA DE LA 6° PRUEBA PARA LA OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE MOLLE



Fuente: Elaboración propia

CUADRO N° 7

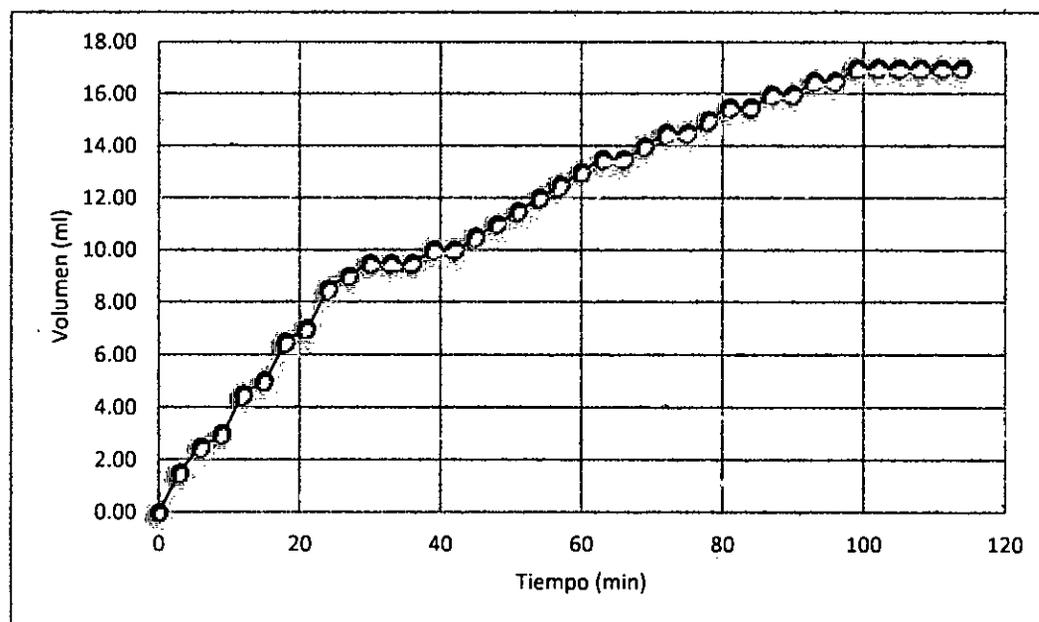
7° PRUEBA PARA LA OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE MOLLE

Tiempo (min)	Volumen (ml)	Tiempo (min)	Volumen (ml)	Tiempo (min)	Volumen (ml)
0	0.00	39	10.00	78	15.00
3	1.50	42	10.00	81	15.50
6	2.50	45	10.50	84	15.50
9	3.00	48	11.00	87	16.00
12	4.50	51	11.50	90	16.00
15	5.00	54	12.00	93	16.50
18	6.50	57	12.50	96	16.50
21	7.00	60	13.00	99	17.00
24	8.50	63	13.50	102	17.00
27	9.00	66	13.50	105	17.00
30	9.50	69	14.00	108	17.00
33	9.50	72	14.50	111	17.00
36	9.50	75	14.50	114	17.00

Fuente: Elaboración propia

GRÁFICO N° 7

CURVA DE LA 7° PRUEBA PARA LA OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE MOLLE



Fuente: Elaboración propia

CUADRO N° 8

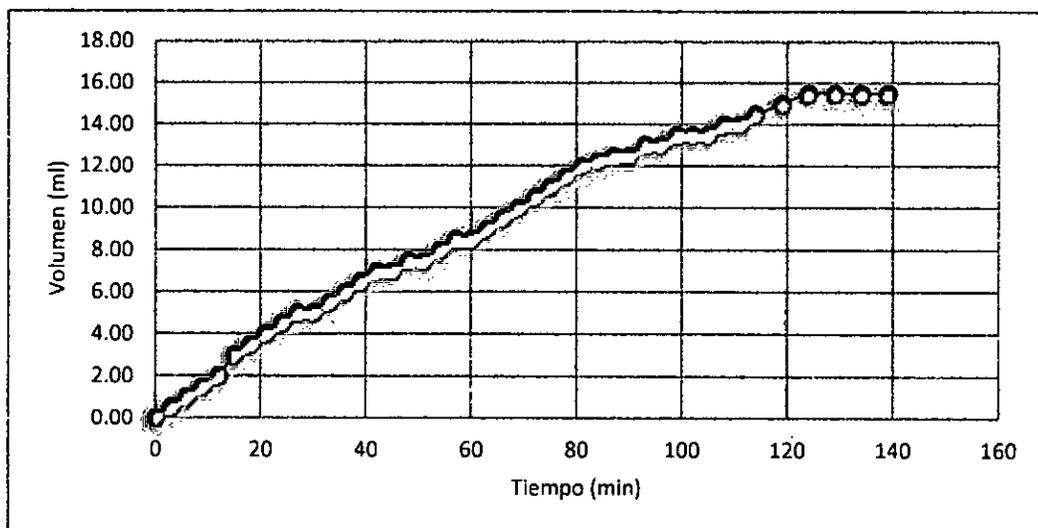
8° PRUEBA PARA LA OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE MOLLE

Tiempo (min)	Volumen (ml)	Tiempo (min)	Volumen (ml)	Tiempo (min)	Volumen (ml)
0	0.00	45	7.00	90	12.50
3	0.50	48	7.50	93	13.00
6	1.00	51	7.50	96	13.00
9	1.50	54	8.00	99	13.50
12	2.00	57	8.50	102	13.50
15	3.00	60	8.50	105	13.50
18	3.50	63	9.00	108	14.00
21	4.00	66	9.50	111	14.00
24	4.50	69	10.00	114	14.50
27	5.00	72	10.50	119	15.00
30	5.00	75	11.00	124	15.50
33	5.50	78	11.50	129	15.50
36	6.00	81	12.00	134	15.50
39	6.50	84	12.25	139	15.50
42	7.00	87	12.50		

Fuente: Elaboración propia

GRÁFICO N° 8

CURVA DE LA 8° PRUEBA PARA LA OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE MOLLE



Fuente: Elaboración propia

CUADRO N° 9

**1° PRUEBA, 2° PRUEBA, 3° PRUEBA Y 4° PRUEBA PARA LA
OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE MOLLE**

	1° Prueba	3° Prueba	5° Prueba	7° Prueba
Tiempo (min)	Volumen (ml)	Volumen (ml)	Volumen (ml)	Volumen (ml)
0	0.00	0.00	0.00	0.00
3	1.00	1.00	1.00	1.50
6	2.00	1.50	2.00	2.50
9	2.50	2.00	3.00	3.00
12	2.75	2.50	4.00	4.50
15	3.00	2.50	4.50	5.00
18	3.25	3.00	5.50	6.50
21	3.50	3.00	6.00	7.00
24	3.75	3.50	7.00	8.50
27	4.00	3.50	7.50	9.00
30	4.25	4.00	8.00	9.50
33	4.50	4.00	8.50	9.50
36	4.75	4.00	9.00	9.50
39	4.75	4.50	9.50	10.00
42	5.00	4.50	10.00	10.00
45	5.00	4.50	10.50	10.50
48	5.25	5.00	11.00	11.00
51	5.50	5.00	11.50	11.50
54	5.50	5.00	12.00	12.00
57	5.50	5.50	12.50	12.50
60	5.50	5.50	12.50	13.00
63		5.50	13.00	13.50
66		5.50	13.50	13.50
69		6.00	13.50	14.00
72		6.00	14.50	14.50
75		6.50	14.50	14.50
78		6.50	15.50	15.00
81		6.50	16.00	15.50
84		6.50	17.00	15.50
87		6.50	17.50	16.00
90		6.50	18.00	16.00
93		6.50	18.00	16.50
96		6.50	18.00	16.50
99			18.00	17.00
102				17.00
105				17.00
108				17.00
111				17.00
114				17.00

Fuente: Elaboración propia

CUADRO N° 10
2° PRUEBA, 4° PRUEBA, 6° PRUEBA Y 8° PRUEBA PARA LA
OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE MOLLE

Columna1	2° Prueba	4° Prueba	6° Prueba	8° Prueba
Tiempo (min)	Volumen (ml)	Volumen (ml)	Volumen (ml)	Volumen (ml)
0	0.00	0.00	0.00	0.00
3	0.50	0.50	1.00	0.50
6	1.00	1.00	2.00	1.00
9	1.50	1.50	2.50	1.50
12	1.50	1.50	3.00	2.00
15	2.00	1.50	3.50	3.00
18	2.50	2.00	3.75	3.50
21	2.50	2.00	4.00	4.00
24	3.00	2.50	4.50	4.50
27	3.00	2.50	5.00	5.00
30	3.50	2.50	6.00	5.00
33	3.50	2.75	6.50	5.50
36	3.50	2.75	7.00	6.00
39	4.00	2.75	7.50	6.50
42	4.00	3.00	7.50	7.00
45	4.50	3.00	7.50	7.00
48	4.50	3.00	8.00	7.50
51	5.00	3.25	8.00	7.50
54	5.00	3.25	8.50	8.00
57	5.50	3.25	8.50	8.50
60	5.50	3.50	9.00	8.50
63	5.50	3.50	9.00	9.00
66	5.50	4.00	9.00	9.50
69	5.50	4.00	9.00	10.00
72		4.00	9.25	10.50
75		4.50	9.25	11.00
78		4.50	9.25	11.50
81		4.50	9.50	12.00
84		4.50	9.50	12.25
87		4.50	9.50	12.50
90		4.50	10.00	12.50
93			10.00	13.00
96			10.00	13.00
99			10.50	13.50
102			10.50	13.50
105			11.00	13.50
108			11.25	14.00
111			11.25	14.00
114			11.50	14.50
119			11.50	15.00
124			11.50	15.50
129			12.00	15.50
134			12.50	15.50
139			12.50	15.50
144			13.00	
149			13.00	
154			13.00	
159			13.50	
164			13.50	
169			14.00	
174			14.50	
179			15.00	
184			15.00	
189			15.00	
194			15.00	

Fuente: Elaboración propia

CUADRO N° 11
8 PRUEBAS EXPERIMENTALES PARA LA OBTENCIÓN DE ACEITE
ESENCIAL DE MOLLE

	1ª Prueba	2ª Prueba	3ª Prueba	4ª Prueba	5ª Prueba	6ª Prueba	7ª Prueba	8ª Prueba
T (min)	V (ml)							
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	1.00	0.50	1.00	0.50	1.00	1.00	1.50	0.50
6	2.00	1.00	1.50	1.00	2.00	2.00	2.50	1.00
9	2.50	1.50	2.00	1.50	3.00	2.50	3.00	1.50
12	2.75	1.50	2.50	1.50	4.00	3.00	4.50	2.00
15	3.00	2.00	2.50	1.50	4.50	3.50	5.00	3.00
18	3.25	2.50	3.00	2.00	5.50	3.75	6.50	3.50
21	3.50	2.50	3.00	2.00	6.00	4.00	7.00	4.00
24	3.75	3.00	3.50	2.50	7.00	4.50	8.50	4.50
27	4.00	3.00	3.50	2.50	7.50	5.00	9.00	5.00
30	4.25	3.50	4.00	2.50	8.00	6.00	9.50	5.00
33	4.50	3.50	4.00	2.75	8.50	6.50	9.50	5.50
36	4.75	3.50	4.00	2.75	9.00	7.00	9.50	6.00
39	4.75	4.00	4.50	2.75	9.50	7.50	10.00	6.50
42	5.00	4.00	4.50	3.00	10.00	7.50	10.00	7.00
45	5.00	4.50	4.50	3.00	10.50	7.50	10.50	7.00
48	5.25	4.50	5.00	3.00	11.00	8.00	11.00	7.50
51	5.50	5.00	5.00	3.25	11.50	8.00	11.50	7.50
54	5.50	5.00	5.00	3.25	12.00	8.50	12.00	8.00
57	5.50	5.50	5.50	3.25	12.50	8.50	12.50	8.50
60	5.50	5.50	5.50	3.50	12.50	9.00	13.00	8.50
63		5.50	5.50	3.50	13.00	9.00	13.50	9.00
66		5.50	5.50	4.00	13.50	9.00	13.50	9.50
69		5.50	6.00	4.00	13.50	9.00	14.00	10.00
72			6.00	4.00	14.50	9.25	14.50	10.50
75			6.50	4.50	14.50	9.25	14.50	11.00
78			6.50	4.50	15.50	9.25	15.00	11.50
81			6.50	4.50	16.00	9.50	15.50	12.00
84			6.50	4.50	17.00	9.50	15.50	12.25
87			6.50	4.50	17.50	9.50	16.00	12.50
90			6.50	4.50	18.00	10.00	16.00	12.50
93			6.50		18.00	10.00	16.50	13.00
96			6.50		18.00	10.00	16.50	13.00
99					18.00	10.50	17.00	13.50
102						10.50	17.00	13.50
105						11.00	17.00	13.50
108						11.25	17.00	14.00
111						11.25	17.00	14.00
114						11.50	17.00	14.50
119						11.50		15.00
124						11.50		15.50
129						12.00		15.50
134						12.50		15.50
139						12.50		15.50
144						13.00		
149						13.00		
154						13.00		
159						13.50		
164						13.50		
169						14.00		
174						14.50		
179						15.00		
184						15.00		
189						15.00		
194						15.00		

Fuente: Elaboración propia

Anexo N° 6. Método de diluciones seriadas decimales y recuentos en placa

MEDICIÓN DIRECTA DEL CRECIMIENTO MICROBIANO

OBJETIVO DE APRENDIZAJE

- Explicar cuatro métodos de medición directa del crecimiento celular.

El crecimiento de las poblaciones microbianas puede medirse de diferentes maneras. Algunos métodos determinan el número de células y otros la masa total de la población, que a menudo es directamente proporcional al número de células. La magnitud de la población normalmente se registra como el número de células que hay en un mililitro de líquido o en un gramo de material sólido. Como las poblaciones bacterianas suelen ser muy grandes la mayoría de los métodos de cuantificación se basan en mediciones directas o indirectas de muestras muy pequeñas; después se determina mediante cálculos el tamaño de la población total. Supongamos, por ejemplo, que una millonésima parte de un mililitro (10^{-6} mL) de leche agria contiene 70 células bacterianas. Entonces debe haber 70 veces 1 millón de células, o sea 70 millones de células por mililitro.

Sin embargo, este método resulta poco práctico para medir una millonésima parte de un mililitro de líquido o de un gramo de alimento. Por consiguiente, el procedimiento se efectúa indirectamente en una serie de diluciones. Por ejemplo, si añadimos un mililitro de leche a 99 mililitros de agua, cada mililitro de esta dilución tendrá una centésima parte de las bacterias que tenía cada mililitro de la muestra inicial. Si mediante una serie de diluciones de este tipo se puede estimar con facilidad el número de bacterias en la muestra original. Para contar las poblaciones microbianas en alimentos sólidos (como en una hamburguesa) se realiza un homogeneizado en una licuadora de alimentos con una parte de alimento y nueve partes de agua. Después pueden tomarse muestras de esta preparación diluida al 10% y realizar más diluciones o efectuar recuentos celulares.

RECIENTOS EN PLACA

El método utilizado con más frecuencia para la medición de poblaciones bacterianas es el recuento en placa. Una ventaja importante de esta técnica es que mide el número de células viables. Una desventaja es que se requiere bastante tiempo, por lo general 24 horas o más, para que se formen colonias visibles. Esto puede plantear un grave problema en algunas aplicaciones, como por ejemplo el control de calidad de la leche, cuando no es posible mantener un lote determinado durante tanto tiempo.

El recuento en placa se basa en la suposición de que cada bacteria crece y se divide para producir una sola colonia. Esto no siempre es cierto porque las bacterias con frecuencia crecen unidas en cadenas o como grumos (véase fig. 4.1). Por consiguiente, a menudo una colonia no se produce como resultado de una única bacteria sino de segmentos cortos de una cadena o de un agregado bacteriano. Para reflejar esta realidad los recuentos en placa suelen informarse como unidades formadoras de colonias (UFC).

Cuando se realiza el recuento en placa es importante que crezca sólo un número limitado de colonias en la placa. Cuando hay demasiadas colonias algunas células se encuentran apiladas y no pueden desarrollarse; esta situación es causa de inexactitudes en el recuento. La convención de la Food and Drug Administration de los Estados Unidos que se cuenten sólo las placas con 25 a 250 colonias, si bien muchos microbiólogos prefieren placas con 30 a 300 colonias. Para asegurar que algunos recuentos estén dentro de estos límites el inóculo original se diluye varias veces en un proceso denominado dilución seriada (fig. 6.15).

Diluciones seriadas. Consideremos, por ejemplo, que una muestra de leche contiene 10 000 bacterias por mililitro. Si se sembrara 1 mL de esta muestra se formarían en teoría 10 000 colonias sobre el medio de la placa de Petri. Obviamente, sería imposible contarlas en la placa. Si se transfiriera 1 mL de la muestra a un tubo que contuviera 9 mL de agua estéril cada mililitro del líquido resultante contendría 1 000 bacterias. Si se inoculara de nuevo 1 mL de este líquido en una placa de Petri el número de colonias potenciales todavía sería excesivo para el recuento. Por lo tanto, podría hacerse otra dilución seriada. Se transferiría 1 mL del líquido que contuviera 1 000 bacterias a un segundo tubo con 9 mL de agua. Cada mililitro de este tubo contendría ahora sólo 100 bacterias y si se siembra 1 mL de ese contenido en una placa se formarían en teoría 100 colonias, un número fácil de contar. Ahora sabemos cómo hacer diluciones seriadas, una parte importante de ciertos experimentos en las clases de laboratorio de microbiología.

Placa vertida y diseminación en placa. El recuento en placa se efectúa con el método de la placa vertida o con el método de diseminación en placa. El método de la placa vertida sigue el procedimiento ilustrado en la figura 6.16a. Se inocula 1,0 mL, o 0,1 mL, de diluciones de la suspensión bacteriana en una placa de Petri. El medio nutritivo, en el que el agar se mantiene líquido en un baño de agua a cerca de 50 °C, se vierte sobre la muestra, que luego se mezcla en el medio con una agitación suave de la placa. Cuando el agar se solidifica la placa se incuba. Con esta técnica las colonias crecerán dentro del agar nutritivo (a partir de las células en suspensión en el medio nutritivo cuando el agar solidifica) así como en la superficie del agar.

Esta técnica tiene algunos inconvenientes porque ciertos microorganismos relativamente sensibles al calor pueden resultar dañados por el agar fundido y por consiguiente ser incapaces de formar colonias. Además, cuando se utilizan algunos medios diferenciales el aspecto característico de las colonias desarrolladas en la superficie es esencial para el diagnóstico. Las colonias que aparecen debajo de la superficie no son adecuadas para estas pruebas. Para evitar estos problemas con frecuencia se utiliza el método de diseminación en placa (fig. 6.16b). Para ello sobre la superficie del medio previamente vertido y solidificado se coloca 0,1 mL del inóculo, el que se extiende uniformemente sobre la superficie del medio utilizando una varilla de vidrio esterilizada de forma especial. Esta técnica permite el crecimiento de todas las colonias sobre la superficie del medio y evita el contacto de las células con el agar fundido.

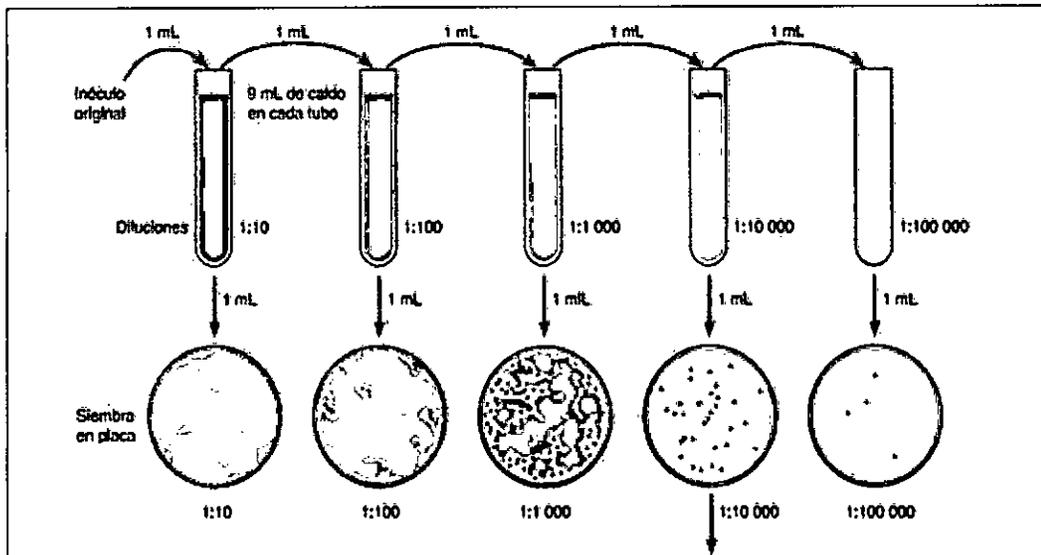


FIGURA 6.15 Recuentos en placa y diluciones seriadas. En las diluciones seriadas el inóculo original se diluye en una serie de tubos. En nuestro ejemplo, cada tubo de dilución tendrá sólo la décima parte del número de células microbianas del tubo que lo precedió. Luego se utilizan muestras de la dilución para inocular placas de Petri, en las cuales crecerán las colonias y podrán ser contadas. Este recuento se utiliza para estimar el número de bacterias presentes en la muestra original.

? (Por qué no se contaron las diluciones 1:1 000 y 1:100 000? En teoría, ¿cuántas colonias deberían aparecer en la placa correspondiente a la dilución 1:1 000?)

FILTRACIÓN

Cuando la cantidad de bacterias es muy baja, como en lagos o en ríos con corrientes relativamente limpias, las bacterias se pueden contar con métodos de filtración (fig. 6.17). En esta técnica se hacen pasar al menos 100 mL de agua a través de un filtro consistente en una membrana delgada cuyos poros son demasiado pequeños como para permitir el paso de las bacterias, que entonces son atrapadas y retenidas en la superficie del filtro. Este filtro se transfiere después a una placa de Petri que contiene una almohadilla embebida en un medio nutritivo líquido, donde las colonias surgen de las bacterias presentes en la superficie del filtro. Este método se aplica con frecuencia para la detección y cuantificación de bacterias coliformes, que son indicadores de la contaminación fecal de los alimentos o el agua (véase cap. 27). Las colonias formadas por estas bacterias son características cuando se utiliza un medio nutritivo diferencial. (Las colonias que se muestran en la figura 6.9h y c son ejemplos de coliformes.)

MÉTODO DEL NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP)

Otro método que se utiliza para la determinación del número de bacterias presentes en una muestra es el método del número

importante de esta técnica es que mide el número de células viables. Una desventaja es que se requiere bastante tiempo, por lo general 24 horas o más, para que se formen colonias visibles. Esto puede plantear un grave problema en algunas aplicaciones, como por ejemplo el control de calidad de la leche, cuando no es posible mantener un lote determinado durante tanto tiempo.

El recuento en placa se basa en la suposición de que cada bacteria crece y se divide para producir una sola colonia. Esto no siempre es cierto porque las bacterias con frecuencia crecen unidas en cadenas o como grumos (véase fig. 4.1). Por consiguiente, a menudo una colonia no se produce como resultado de una única bacteria sino de segmentos cortos de una cadena o de un agregado bacteriano. Para reflejar esta realidad los recuentos en placa suelen informarse como unidades formadoras de colonias (UFC).

ro más probable (NMP), ilustrado en la figura 6.18. Esta estimación estadística se basa en el hecho de que cuanto mayor sea el número de bacterias en una muestra mayor será la dilución necesaria para reducir la densidad hasta el punto en el cual no se desarrolle ninguna bacteria en los tubos de una serie de diluciones. El método del NMP es el más útil cuando los microorganismos por contar no crecen en medios sólidos (como las bacterias quimioautótrofas nitrificantes). También es útil cuando se utiliza el crecimiento en un medio líquido diferencial para identificar el microorganismo (como en el caso de las bacterias coliformes, que fermentan selectivamente la lactosa con producción de ácido en el análisis del agua). El NMP es sólo un informe de que existe un 95% de probabilidad de que la población bacteriana disminuya dentro de ciertos límites y de que el NMP es el número estadísticamente más probable.

RECUESTO MICROSCÓPICO DIRECTO

En el método conocido como recuento microscópico directo un volumen medido de una suspensión bacteriana se coloca dentro de un área definida en un portaobjeto. Por ejemplo, en el método de recuento de Bredt que se usa para contar las bacterias de la leche, se extiende una muestra de 0,01 mL sobre

Esta técnica tiene algunos inconvenientes porque ciertos microorganismos relativamente sensibles al calor pueden resultar dañados por el agar fundido y por consiguiente ser incapaces de formar colonias. Además, cuando se utilizan algunos medios diferenciales el aspecto característico de las colonias desarrolladas en la superficie es esencial para el diagnóstico. Las colonias que aparecen debajo de la superficie no son adecuadas para estas pruebas. Para evitar estos problemas con frecuencia se utiliza el método de diseminación en placa (fig. 6-16b). Para ello sobre la superficie del medio previamente vertido y solidificado se coloca 0,1 mL del inóculo, el que se extiende uniformemente sobre la superficie del medio utilizando una varilla de vidrio esterilizada de forma especial. Esta técnica permite el crecimiento de todas las colonias sobre la superficie del medio y evita el contacto de las células con el agar fundido.

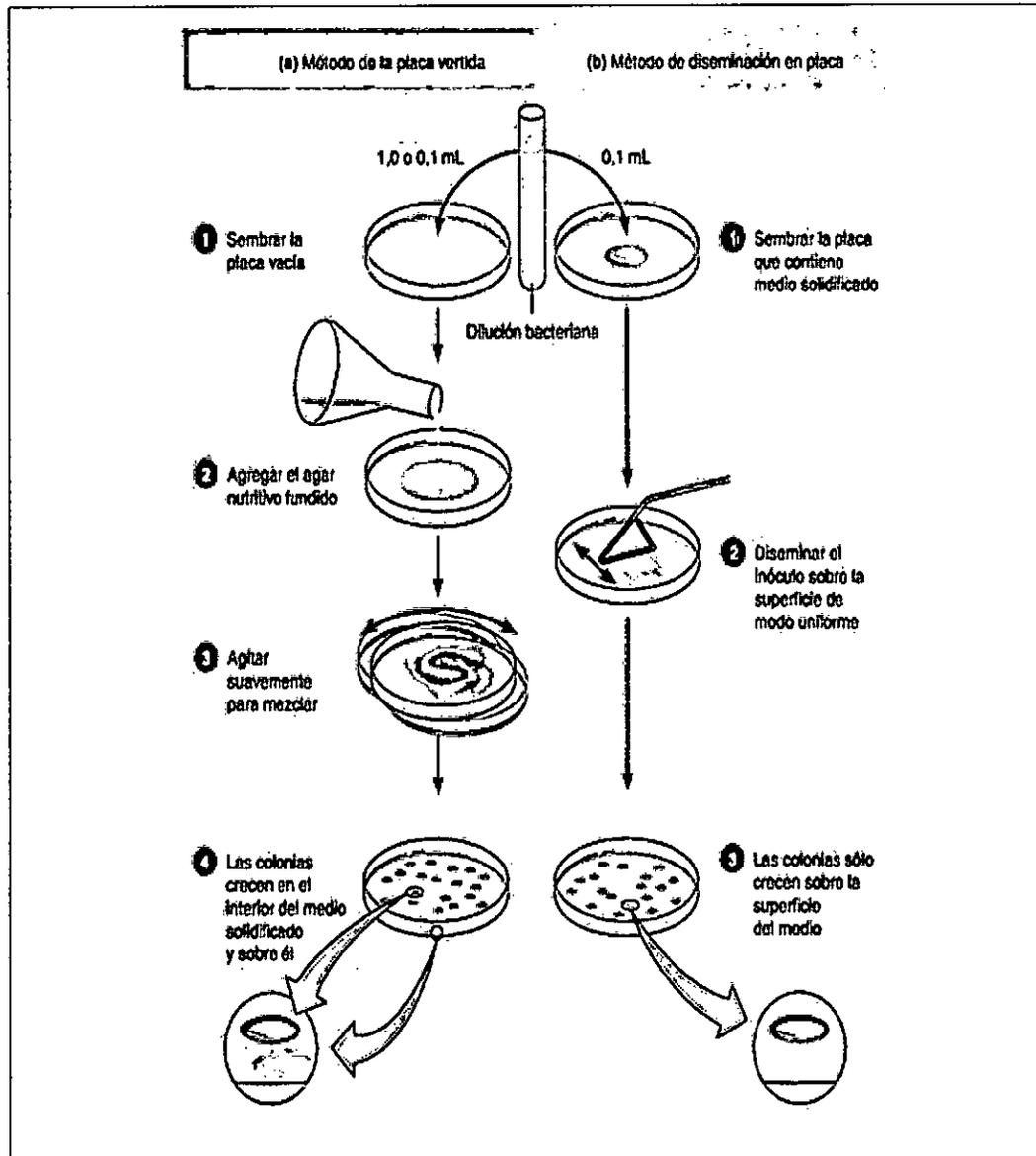


FIGURA 6.16 Métodos para la preparación de placas para el recuento. (a) Método de la placa vertida. (b) Método de disseminación en placa.

? ¿Cuáles son las ventajas de cada método?

un recuadro de un centímetro cuadrado marcado sobre el portaobjetos, se agrega un colorante para que puedan verse las bacterias y la muestra se observa con la lente del objetivo de inmersión. Es posible determinar el campo de visión de este objetivo. Una vez contado el número de bacterias en varios campos se calcula el número promedio de bacterias por campo. Con estos datos también puede calcularse el número de bacterias por centímetro cuadrado a partir del cual la muestra se propagó. Como esta área del portaobjetos contiene 0,01 mL de la muestra, el número de bacterias por mililitro de suspensión es el número de bacterias de la muestra multiplicado por cien.

Para los recuentos microscópicos directos también se usa un portaobjetos diseñado especialmente denominado cámara de Petroff-Hausser (fig. 6.19).

Las bacterias móviles son difíciles de contar con este método y, como sucede con otros métodos microscópicos, las células muertas presentan un aspecto similar al de las vivas que se pretende contar. Además de estas desventajas, se necesita una concentración bastante elevada de células (alrededor de 10 millones de bacterias por mililitro). La ventaja más importante de los recuentos microscópicos es que no se requiere un tiempo de incubación, por lo que su utilización se reserva sobre todo para aplicaciones en las que el tiempo es el factor

FIGURA 6.17 Recuento de bacterias por filtración.

? ¿Podría preparar una placa vertida en la placa de Petri habitual con un inóculo de 10 mL? Si la respuesta es negativa, explique la razón.



(a) Las bacterias contenidas en 100 mL de agua se vierten sobre la superficie de una membrana filtrante.



(b) El filtro, como el que se muestra en la foto (a), con las bacterias mucho más espaciadas, se coloca sobre una almohadilla impregnada con medio de Endo líquido, que es selectivo para las bacterias gramnegativas. Las bacterias individuales crecen en colonias visibles. Se observan 124 colonias, de modo que registramos 124 bacterias por 100 mL de la muestra de agua.

Volumen del inóculo para cada conjunto de cinco tubos	Tubos con medio nutritivo (conjuntos de cinco tubos)	Número de tubos positivos en el conjunto
10 mL		5
1 mL		3
0,1 mL		1

(a) Serie de diluciones para el número más probable (NMP). En este ejemplo hay tres conjuntos de tubos y cinco tubos en cada uno. Cada tubo del primer conjunto de cinco tubos recibe 10 mL del inóculo, como una muestra de agua. Cada tubo del segundo conjunto de cinco tubos recibe 1 mL de la muestra y cada uno del tercer conjunto, 0,1. Había suficientes bacterias en la muestra de modo que los cinco tubos del primer conjunto mostraron crecimiento bacteriano y se registraron como positivos. En el segundo conjunto, en el que los tubos recibieron la décima parte del inóculo, sólo tres tubos fueron positivos. En el tercer conjunto, en el que los tubos recibieron la centésima parte del inóculo, sólo un tubo resultó positivo.

Combinación de positivos	Índice de NMP/100 mL	Límites de confianza del 95%	
		Inferior	Superior
4-2-0	22	9	56
4-2-1	26	12	65
4-3-0	27	12	67
4-3-1	33	15	77
4-4-0	34	16	80
5-0-0	23	9	68
5-0-1	30	10	110
5-0-2	40	20	140
5-1-0	30	10	120
5-1-1	50	20	150
5-1-2	60	30	180
5-2-0	50	20	170
5-2-1	70	30	210
5-2-2	90	40	250
5-3-0	80	30	250
5-3-1	110	40	300
5-3-2	140	60	360

(b) Tabla del NMP. Estas tablas del NMP permiten calcular en una muestra el número de microorganismos que por cálculos estadísticos es probable que conduzca a ese resultado. Se registra en cada conjunto el número de tubos positivos: en el ejemplo, 5, 3 y 1. Si se busca esta combinación en una tabla de MPN se comprueba que el índice de MPN por 100 mL es 110. Desde el punto de vista estadístico esto significa que el 95% de las muestras de agua que dan este resultado contiene 40-300 bacterias y el número más probable es 110.

FIGURA 6.18 Método del número más probable (NMP).

? ¿En qué circunstancias se utiliza el método del NMP para determinar el número de bacterias en una muestra?

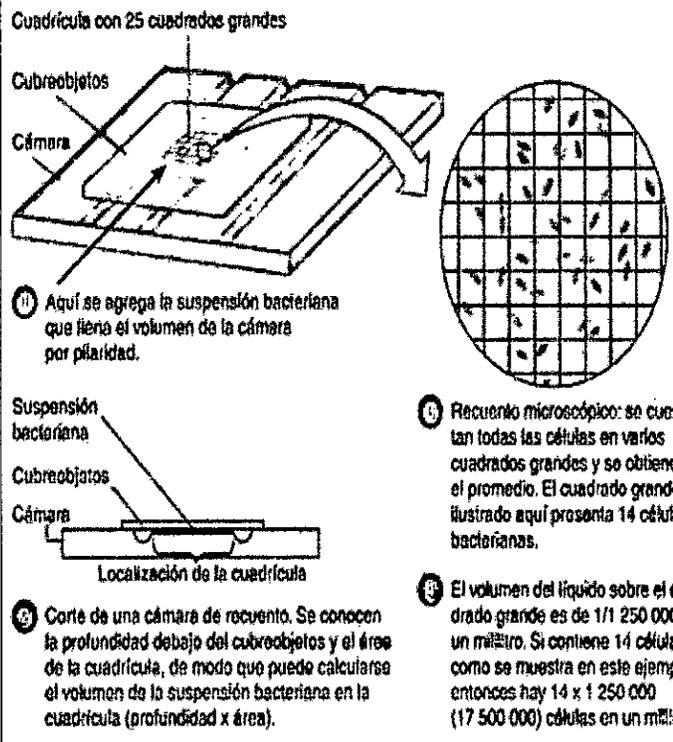


FIGURA 6.19 Recuento microscópico directo de bacterias con una cámara de Petroff-Hausser. El número promedio de bacterias dentro de un cuadrado grande multiplicado por un factor de 1 250 000 da el número de células por mililitro.

? Este tipo de recuento, a pesar de sus desventajas evidentes, se utiliza con frecuencia para estimar la población bacteriana en los productos derivados de la leche. ¿Por qué?

principal. Esta ventaja también es válida para los *contadores electrónicos de células*, a veces denominados *Coulter counters*, que cuentan de forma automática el número de células en un volumen determinado de líquido. Estos instrumentos se utilizan en algunos laboratorios de investigación y hospitalarios.

Anexo N° 7. Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos

12. MÉTODOS ESPECIALES PARA EL ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS. 2001

A. Capacidad bactericida

Para valorar la capacidad bactericida de los antimicrobianos se pueden emplear tres métodos: el cálculo de la concentración mínima bactericida (CMB), la curva de letalidad y la actividad bactericida del suero. Metodológicamente, en las pruebas de poder bactericida recomendamos la utilización de técnicas de macrodilución tal y como recoge el "Manual of Clinical Microbiology" de la Sociedad Americana de Microbiología.

Indicaciones. Se emplean más en investigación que en la práctica clínica de laboratorio, donde sólo deben realizarse en determinadas circunstancias.

En terapéutica: Están indicadas para el estudio de antibióticos considerados bactericidas en:

- Infecciones graves en las que previamente se ha determinado su utilidad, como en las endocarditis estreptocócicas o por otras bacterias. Si el microorganismo no es destruido se debe asociar un aminoglicósido. En las enterocócicas la asociación es obligada. También en meningitis, osteomielitis y artritis.
- Infecciones en inmunocomprometidos, particularmente en la sepsis del neutropénico.
- Infecciones crónicas de prótesis y otras infecciones crónicas.
- Exacerbaciones pulmonares agudas en la fibrosis quística.
- Para determinar fenómenos de tolerancia en infecciones estafilocócicas que no responden a la terapia.

En investigación: Son adecuados para evaluar nuevos antimicrobianos o viejos frente a nuevos patógenos y para determinar la capacidad y poder bactericida y la presencia de efecto paradójico y tolerancia.

Limitaciones. No se dispone de técnicas normalizadas a pesar de las recientes revisiones del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). En general, tiene baja reproducibilidad

debido a razones técnicas. Influyen las variables de los métodos de dilución: medios de cultivo, variaciones del medio elegido (lote, fabricante, etc.), iones, pH, inóculo (fase de crecimiento y tamaño), incubación (atmósfera, temperatura y tiempo, etc.) (tabla 1). Se debe partir de un inóculo en fase logarítmica de crecimiento porque algunos antimicrobianos, como los β -lactámicos, sólo son bactericidas en este periodo. Asimismo, existen dificultades con los anaerobios de crecimiento lento y muy sensibles al oxígeno y con otros microorganismos exigentes.

El valor de la prueba debe determinarse por el éxito de su aplicación en clínica.

A.1 Concentración mínima bactericida (CMB)

A.1.1. Fundamento

Su objetivo es determinar la menor concentración de un antimicrobiano que es capaz de matar una cepa bacteriana, con el fin de compararla con la que alcanza en una determinada localización. Para calcularla se emplean procedimientos en los que bacteria y antimicrobiano se enfrentan en un caldo. Se parte de los mismos métodos utilizados para obtener la CMI por dilución en caldo y sus modificaciones para bacterias exigentes. Se puede obtener empleando el procedimiento de macrodilución en tubo o microdilución en placa. Lo que se pretende es comprobar en los tubos o pocillos sin crecimiento qué concentración de antimicrobianos ha matado, no sólo inhibido, el aislado bacteriano estudiado.

En general la CMI (concentración mínima inhibitoria) y la CMB, en los antibióticos considerados bactericidas, están próximas. Habitualmente difieren en una o dos diluciones. En ocasiones esto no ocurre y estamos ante los fenómenos: paradójico, de tolerancia y de persistencia.

El fenómeno paradójico o de Eagle consiste en la presencia de un mayor número de bacterias supervivientes a concentraciones superiores a la CMB. Parece ser que no tiene trascendencia en los tratamientos antimicrobianos.

La tolerancia es la disminución o desaparición de la capacidad de matar de un antibiótico bactericida en un determinado aislamiento o especie. Su significado clínico es dudoso aunque puede determinar en algunas infecciones la necesidad de asociar este antimicrobiano con otro. Este hecho se ha comprobado en infecciones estafilocócicas que no responden al tratamiento con un antibiótico.

La persistencia refleja el hecho de que una pequeña población resiste a la acción bactericida. Su cuantía suele ser menor del 0,1% y por esto, la definición de CMB se refiere a la muerte del 99,9% del inóculo. Aparece sobre todo con β -lactámicos.

A.1.2. Método de macrodilución en tubo

Es el preferido porque el inóculo es mayor y se controlan mejor las variables técnicas, aunque la NCCLS recomienda la microdilución en placa.

A.1.2.1. Materiales. Para su cálculo se parte de los tubos sin crecimiento de la bacteria empleada para determinar la CMI. Es decir del tubo que determina la CMI y de los posteriores en una escala doble de menor a mayor concentración de antimicrobiano. Aparte del material específico utilizado para el método del cálculo de la CMI por macrodilución en caldo y de sus variaciones para microorganismos exigentes (ver el correspondiente apartado en el Protocolo nº 11 de la SEIMC), es necesario el siguiente material:

- a). Vortex para homogeneizar el contenido de los tubos.
- b). Micropipetas de 100 μ l con puntas estériles desechables.
- c). Placas de agar sangre o del medio que precise el microorganismo.
- d). Sembradores estériles de cristal.
- e). Cámara de seguridad biológica para las bacterias que la requieran (ej. *Brucella* spp.).
- f). Jarras de anaerobios para estas bacterias con generadores e indicadores.
- g). Estufa de 35°C o incubador de CO₂ para capnófilos.

A.1.2.2. Método. Los pasos a realizar son los siguientes:

- a). Determinar la CMI y tomar los tubos sembrados sin crecimiento, no el de control de esterilidad.
- b). Agitar los tubos sin crecimiento con un Vortex u homogeneizarios con la micropipeta aspirando o vaciando de 6 a 10 veces.
- c). Depositar 100 μ l. de cada tubo sobre el medio de cultivo elegido y extender con un sembrador. De esta forma se diluye la concentración del antimicrobiano vehiculado, se neutraliza su efecto y se favorece el recuento.
- d). Incubar a 35°C y leer a las 24, 48 y 72 horas
- e). Hay que recontar las colonias que han crecido, tras 24-48 horas de incubación, en las placas donde se sembró el inóculo original. Calcular qué número de colonias represente el 0,1%.
- f). Recontar las colonias crecidas en los tubos sin crecimiento.

A.1.2.3. Control de calidad. Se emplean las mismas cepas que las referidas en la técnica de cálculo de la CMI por dilución en caldo. En la tabla 2 se incluyen los valores dados por Reimer et al.

A.1.3. Método de microdilución en placa

El material, salvo el Vortex que puede ser sustituido por un agitador de placas, es idéntico al descrito anteriormente, así como el control de calidad. En cuanto al método, una vez leída la CMI se homogeneiza el contenido de los pocillos (con agitador, micropipeta o manualmente) y se siembran 100 μ l. (todo el contenido) de los pocillos donde no hay crecimiento. El resto de la técnica es idéntica a la descrita en el apartado anterior. Dada su baja rentabilidad, cuando se emplee la microdilución se hará la prueba por duplicado y si se necesita un subcultivo de 48 horas, por cuadruplicado. El NCCLS en su último documento ha recomendado agitar las placas de microtitulación a las 20 horas y sembrar 10 μ l.

Anexo N° 8. Técnicas de recuento de microorganismos

Existen diferentes técnicas para determinar el número de microorganismos o el peso seco (biomasa), de las células microbianas presentes en un cultivo. Los métodos en general se agrupan en directos o indirectos.

a) Métodos directos

Los métodos directos, requieren de preparaciones puras sin ningún tipo de partículas que puedan interferir con los resultados y se refieren básicamente a la medida de la masa celular o directamente del número de individuos presentes en una muestra. Estas metodologías incluyen:

Determinación del peso húmedo: En el cual se determina el peso del sedimento (microorganismos). Con esta metodología se pueden presentar errores debido al líquido intercelular retenido, el cual depende de la forma y tipo de agrupaciones de la bacteria y cuán intenso es este agrupamiento.

Determinación de peso seco: Se basa en la misma técnica que el anterior, solo que el sedimento se seca antes de ser pesado. Los inconvenientes incluyen el hecho de ser una metodología compleja en tiempo y equipos; también, se presentan varios errores de cálculo de cantidades de biomasa muy pequeñas. Se calcula que 1mg de peso seco es igual a 5×10^9 bacterias.

Determinación de nitrógeno total: Calculada por la técnica micro-Kjeldahl.

Determinación de componentes característicos de las células: Como peptidoglicano, ácidos nucleicos, proteínas, ATP, etc. Esta metodología es aplicada comúnmente en bacterias, cuando otros métodos evidencian ser poco exactos, debido a la formación de grumos no dispersables por el crecimiento típico del microorganismo y para mediciones de crecimiento en muestras de ambientes naturales.

Recuento en cámara de Petroff-Hauser, Cámara de Neubauer o Hemacitómetro: La metodología se desarrolla sobre un portaobjetos en el cual se deposita la muestra; este portaobjetos tiene impresa una cuadrícula graduada y con medidas exactas: Profundidad de 0.02mm, área 1 mm², dividida en un retículo de 25 cuadrados grandes (cada uno de ellos subdividido en 16 cuadrados más pequeños, en un arreglo de 4x4); entonces, cuando la muestra a cuantificar es depositada entre el portaobjetos calibrado y el cubreobjetos, se distribuye en 400 celdas (16 x 25 = 400) (Figura N° 1). Ya la muestra depositada y reposada, se procede a contar las células en 16 celdas (aunque las áreas contadas son variables), se registra el número contado en estas y se calcula la población de células de la siguiente forma:

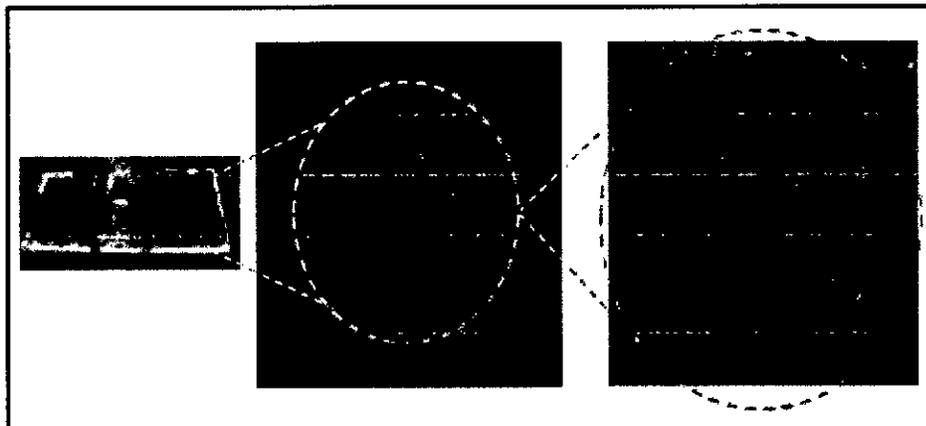
$$\text{Concentración en células/ml} = n \times 25 \times 50 \times 1000$$

Donde n = número de células contadas en las 16 celdas.

La ventaja de este método está dada por la rapidez para el cálculo del número de células, pero solo debe ser utilizado en muestras con poblaciones concentradas de células ($>10 \times 10^6$ células/ml), pues con menores poblaciones, la observación al microscopio es poco significativa estadísticamente. Para obtener resultados más exactos, es recomendable tener un conteo entre 200 y 300 células por muestra.

En la figura N° 1 la imagen de la izquierda muestra la cámara de Neubauer y el portaobjetos para el depósito de la muestra, así como la cuadrícula graduada para el conteo de células (imagen central). El círculo amarillo indica el área de conteo de 25 cuadrados subdivididos a su vez en 16 (imagen de la derecha)

FIGURA N° 1
CONTEO DE CÉLULAS



Fuente: Rojas, A

Contadores electrónicos de partículas Coulter

El fundamento del método, es la interrupción de corriente por el paso de una célula. Con esta metodología se requieren muestras totalmente

puras, pues cada partícula presente que no sea una célula, es registrada por el equipo o puede ser la causante de un daño del mismo.

El registro de los individuos se realiza, haciendo pasar la suspensión microbiana a través de un tubo capilar entre dos polos de una corriente eléctrica; cada vez que por un orificio pasa una partícula (célula), se interrumpe la corriente y esta información es colectada por un dispositivo electrónico que detecta el número y el tamaño de las partículas que van pasando y de esta manera se determina la población de células.

b) Métodos indirectos

Consumo de nutrientes o producción de metabolitos / tiempo. Como por ejemplo la medición del consumo de oxígeno, consumo de gas carbónico, producción de ácidos y otros metabolitos, etc.

Métodos ópticos de turbidimetría: Es la medición de la cantidad de luz dispersada o transmitida a través de un cultivo microbiano (efecto Tyndall). La dispersión es proporcional a la masa del cultivo y solo es válido para concentraciones mayores a 10^7 células/ml; donde, la proporcionalidad de la absorbancia y la masa bacteriana se conservan. Con este fin, puede ser utilizado el espectrofotómetro, que mide la densidad óptica (D.O.), es decir, la absorbancia. El nefelómetro, es un equipo similar al espectrofotómetro, pero la lectura registrada es de la luz dispersada por la muestra.

Escalas o patrones de McFarland: Técnica basada en turbidimetría. La escala se basa en la capacidad de precipitación del Cloruro de Bario en presencia de Ácido Sulfúrico y su utilidad, es la poder elaborar suspensiones bacterianas ajustadas a un patrón y valorando su concentración; para esto, se toma una alícuota de la muestra de bacterias y se inocula en un tubo conteniendo solución salina fisiológica (0,85%). El objetivo es lograr ajustar una concentración de bacterias a uno de los patrones señalados en la Tabla N° 1 ó determinar la concentración de una muestra.

En la tabla N° 1 se registra la escala de McFarland, forma de preparación de cada patrón y su correspondencia en turbidez a una población de bacterias expresada en UFC/ml.

TABLA N° 1
ESCALA DE MC FARLAND

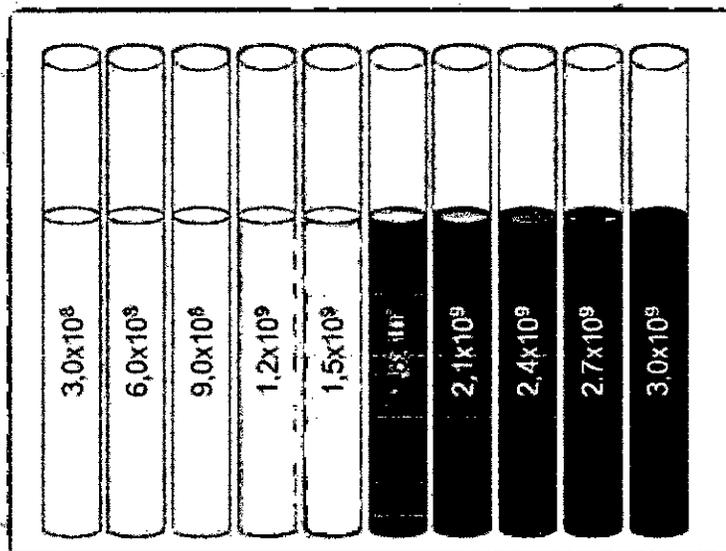
Tubo	Escala de McFarland	BaCl ₂ 1% (mL)	H ₂ SO ₄ 1% (mL)	UFC/mL
1	4,0	0,1	9,9	3,0x10 ⁸
2	3,7	0,2	9,8	6,0x10 ⁸
3	3,5	0,3	9,7	9,0x10 ⁸
4	3,4	0,4	9,6	1,2x10 ⁹
5	3,3	0,5	9,5	1,5x10 ⁹
6	3,2	0,6	9,4	1,8x10 ⁹
7	3,15	0,7	9,3	2,1x10 ⁹
8	3,10	0,8	9,2	2,4x10 ⁹
9	3,04	0,9	9,1	2,7x10 ⁹
10	3,00	1,0	9,0	3,0x10 ⁹

Fuente: Rojas, A

Los patrones de Mc Farland, permiten establecer una relación entre una precipitación química y una suspensión de bacterias (Figura N° 2). Se elaboran 10 estándares (Tabla N° 1), y por espectrofotometría se crea una recta patrón con la cual se va a poder determinar la concentración de las diluciones bacterianas elaboradas. La información arrojada es aproximada, ya que la lectura depende de factores como el tamaño de la bacteria y la formación de agrupaciones.

En la figura N° 2 se registra la esquematización de los patrones de McFarland, donde se observa la turbidez ocasionada por la precipitación del Cloruro de Bario en presencia de Ácido Sulfúrico en diferentes proporciones, así como, su correspondencia a una población bacteriana expresada en UFC/ml.

FIGURA N° 2
ESQUEMATIZACIÓN DE LOS PATRONES DE MCFARLAND



Fuente: Rojas, A

Anexo N° 9. Constancia del laboratorio de Microbiología del IIEA para la determinación del efecto antimicrobiano del aceite esencial de molle

	<p>UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO Vicerrectorado de Investigación Instituto de Investigación de Especialización en Agroindustria</p> <p><i>"Fino del Buen Servicio al Ciudadano"</i></p> <p>CONSTANCIA N° 014-2017-IIEA/VRI</p> <p>Bellavista, 08 de agosto del 2017</p> <p>La Directora del Instituto de Investigación de Especialización en Agroindustria de la Universidad Nacional del Callao, que suscribe hace CONSTAR:</p> <p>Que, los Señoritas:</p> <p><i>Karin Isabel Pacheco Huaman y</i></p> <p><i>Marisa Lázaro Llacua,</i></p> <p>Bachilleres de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Callao, han realizado la parte experimental de la tesis "Caracterización química y efecto antimicrobiano del aceite esencial de molle (<i>Schinus molle</i> L.) obtenido por el método de arrastre con vapor" en el Laboratorio de Microbiología del Instituto de Investigación de Especialización en Agroindustria, en el periodo comprendido entre el 03 de julio 2017 al 04 de agosto del 2017.</p> <p>Se expide la presente Constancia, a solicitud del interesado para los fines que estime conveniente.</p> <p>Atentamente,</p> <p>Cc. Archivo 014-CFP-080817-IIEA/VRI</p> <p> Ing. Carmen Isabel Llacua DIRECTORA (a)</p>	
-----------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------

Av. Juan Pablo II N° 306 - Bellavista
Callao 02 - PERÚ, Tel.: (511) 4652325