



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

**Composición química y actividad antimicrobiana del
aceite esencial de *Schinus areira* L.**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Rubén Robinson HERRERA CCARI

ASESOR

Dra. María Elena SALAZAR SALVATIERRA

Lima, Perú

2025



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Herrera R. Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Schinus molle* L. [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2025.

Metadatos complementarios

Datos de autor 1	
Nombres y apellidos	Rubén Robinson Herrera Ccari
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	75434967
URL de ORCID	No aplica
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	María Elena Salazar Salvatierra
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	08675623
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-5661-4752
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Teresa Celina Gallardo Jugo
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	07727234
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Robert Dante Almonacid Román
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	40493000
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Fritz Fedor Choquesillo Peña
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	06203655
Datos de investigación	
Línea de investigación	Recursos y productos naturales con potencial farmacéutico, alimentario, cosmético y terapéutico.

Grupo de investigación	No aplica
Agencia de financiamiento	Sin financiamiento
Ubicación geográfica de la investigación	Universidad Nacional Mayor de San Marcos Facultad de Farmacia y Bioquímica Jirón Puno N°1002, Lima, Perú. Latitud: -12.055466 Longitud: -77.023514
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2024-2025
URL de disciplinas OCDE	Farmacología, Farmacia https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.05



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Schinus areira* L.

Que presenta el Bachiller en Farmacia y Bioquímica:

RUBÉN ROBINSON HERRERA CCARI

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, ha obtenido la siguiente calificación final:

Dieci y ocho (18). Aprobado con mención honoraria

de conformidad con el Art. 14.º del Reglamento General de Grados y Títulos de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para la obtención del Título Profesional de Químico Farmacéutico (a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica.

Lima, 19 de mayo de 2025.

Q.F. Teresa Celfna Gallardo Jugo
Presidente

Mg. Robert Dante Almonacid Román
Miembro

Q.F. Fritz Fedor Choquesillo Peña
Miembro



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE

SAN MARCOS

Universidad del Perú, Decana de América

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, María Elena Salazar Salvatierra en mi condición de asesor acreditado con la Resolución Decanal N° 000977-2024-D-FFB/UNMSM de la tesis, cuyo título es **Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Schinus molle* L.**, presentado por el bachiller Rubén Robinson Herrera Ccari para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico,

CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante la plataforma PIDS, el documento evaluado cuenta con el 16% de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional**.

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del grado/ título/ especialidad correspondiente.

Lima, 14 de mayo de 2025

Firma del Asesor

Nombres y Apellidos del asesor: María Elena Salazar Salvatierra



DNI 08675623

DEDICATORIA

A mis padres, Gonzalo Herrera Díaz y Elma Ccari Ramos por el esfuerzo que realizaron y la fortaleza que me brindaron durante toda mi carrera para llegar a cumplir mis sueños.

A mis hermanos Edith, Bryan, Isabel, Robert y Yeison, por su apoyo constante e incondicional en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora, Dra. María Elena Salazar Salvatierra, por su apoyo y orientación durante todo este tiempo del desarrollo desde el proyecto hasta los resultados finales.

Agradecer también al Dr. Julio Ruiz Quiroz, por compartir sus conocimientos de la microbiología especialmente con los aceites esenciales y su valioso apoyo en la ejecución de la tesis.

A los miembros del jurado Dra. Teresa Celina Gallardo, Dr. Robert Dante Almonacid Román y al Dr. Fritz Fedor Choquesillo Peña por su valioso tiempo disponible para la revisión y sugerencias realizadas para el presente trabajo.

Agradecer a los docentes de Facultad de Farmacia y Bioquímica que fueron parte de esta trayectoria.

A mis padres y hermanos por su apoyo incondicional y ayudarme a cumplir mis metas.

Finalmente, agradecer a cada persona que de manera directa o indirectamente contribuyeron con sus palabras y conocimientos.

INDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
I.1.	Planteamiento del problema:	1
I.2.	Objetivos	2
I.2.1.	Objetivo general	2
I.2.2.	Objetivos específicos	2
I.3.	Importancia y alcance de la investigación	2
I.4.	Limitaciones de la investigación	3
II.	REVISIÓN DE LA LITERATURA	3
II.1.	Marco teórico	3
II.1.1.	Descripción etnobotánica de la especie en estudio	3
II.1.2.	Actividad antimicrobiana	4
II.1.3.	Metabolitos atribuidos a <i>Schinus areira</i>	6
II.2.	Antecedentes del estudio	7
II.2.1.	Antecedentes internacionales	7
II.2.2.	Antecedentes nacionales	8
II.3.	Bases teóricas	11
II.3.1.	Bacterias gram positivas y gramnegativas	11
II.3.2.	Metabolitos secundarios	12
II.3.3.	Métodos de extracción	15
II.3.4.	Métodos para determinar la actividad antimicrobiana	17
II.4.	Glosario de términos	18
III.	HIPÓTESIS Y VARIABLES	19
III.1.	Hipótesis	19
III.2.	Variables	19

III.3. Operacionalización de variables.....	20
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
IV.1. Materiales, reactivos y equipos	20
IV.1.1. Material vegetal.....	20
IV.1.2. Material biológico	20
IV.1.3. Reactivos	20
IV.1.4. Equipos	21
IV.2. Área de estudio.....	21
IV.3. Diseño de investigación.....	21
IV.4. Población y muestra	21
IV.5. Procedimientos, técnicas e instrumentos de recolección de información	22
IV.5.1. Colección de la muestra	22
IV.5.2. Clasificación Taxonómica.	22
IV.5.3. Extracción del aceite esencial:.....	23
IV.5.4. Análisis organoléptico y rendimiento:	23
IV.5.5. Análisis fisicoquímico.....	23
IV.5.6. Determinación de la composición química del aceite esencial de <i>Schinus areira</i> L. "molle".....	24
IV.5.7. Método de Difusión en Agar	24
IV.5.8. Método de microdilución colorimétrica	26
IV.6. Análisis estadístico	29
V. RESULTADOS.....	30
V.1. Análisis organoléptico del aceite esencial de <i>Schinus areira</i> L. "molle" ...	30
V.2. Análisis fisicoquímico del aceite esencial de <i>Schinus areira</i> L. "molle"	30
V.3. Determinación de la composición química del aceite esencial de <i>Schinus areira</i> L. "molle"	31

V.4.	Actividad antimicrobiana.....	33
V.4.1.	Método difusión en agar	33
V.4.2.	Método microdilución colorimétrica en microplaca.....	38
VI.	DISCUSIÓN	40
VII.	CONCLUSIONES	45
VIII.	RECOMENDACIONES.....	46
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
X.	ANEXOS (*)	61

ABREVIATURAS

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute (Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio)

GC/MS: Gas chromatography–mass spectrometry

CMI: Concentración mínima inhibitoria

CMH: Caldo Mueller Hinton

UFC: Unidad formadora de colonias

AE: Aceite esencial

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Operacionalización de variables.....	20
Tabla 2. Esquema de trabajo para dilución del aceite esencial	27
Tabla 3. Esquema de trabajo para dilución del ciprofloxacino.	28
Tabla 4. Esquema de trabajo de distribución de las muestras.....	29
Tabla 5. Características organolépticas del aceite esencial de <i>Schinus areira</i> L. "molle".	30
Tabla 6. Característica fisicoquímica del aceite esencial de <i>Schinus areira</i> L. "molle"	30
Tabla 7. Lista de los componentes detectados en el aceite esencial <i>Schinus areira</i> L. "molle" mediante GC-MS.	31
Tabla 8. Valores promedio de los halos de inhibición del aceite esencial de <i>Schinus areira</i> L. "molle" frente a bacterias gram+ y gram-	33
Tabla 9. Prueba de normalidad de residuales de Shapiro-Wilk	66
Tabla 10. Prueba de homogeneidad de varianzas de Levene	66
Tabla 11. Comparación de los halos de inhibición a diferentes concentraciones del aceite esencial de <i>Schinus areira</i> L. "molle"	66

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de distribución de <i>Schinus areira</i> L. "molle"	3
Figura 2. Comparación entre las bacterias Gram + y Gram –	11
Figura 3. Estructura química de la cumarina (izquierda) y 7-hidroxycumarina (derecha)	12
Figura 4. Estructura química de flavonoides	13
Figura 5. Estructuras derivadas de las modificaciones en el anillo C	13
Figura 6. Clasificación de terpenos	14
Figura 7. Ejemplo de algunos monoterpenos	14
Figura 8. Estructura química de Quinonas, de izquierda a derecha: Quinona Naftoquinona y Antraquinona	15
Figura 9. Hojas y frutos de <i>Schinus areira</i> L. "molle" (Fuente: propia)	22
Figura 10. Clasificación taxonómica de <i>Schinus areira</i> L. "molle".	23
Figura 11. Conversión de Resazurina a Resorufina	26
Figura 12. Cromatograma de los componentes del aceite esencial de <i>Schinus areira</i> L. "molle"	32
Figura 13. Halos de inhibición en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 frente a distintas concentraciones del aceite esencial de <i>Schinus areira</i> L. "molle": 10%, 50% y 95%. Control positivo: Ciprofloxacino 0,05mg/mL (CIPROF) y diluyente utilizado Dimetilsulfóxido (DMSO).	34
Figura 14. Halos de inhibición en <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 frente a distintas concentraciones del aceite esencial de <i>Schinus areira</i> L. "molle": 10%, 50% y 95%. Control positivo: Ciprofloxacino 0,05mg/mL (CIPROF) y diluyente utilizado Dimetilsulfóxido (DMSO).	35
Figura 15. Halos de inhibición en <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 frente a distintas concentraciones del aceite esencial de <i>Schinus areira</i> L. "molle": 10%, 50% y 95%. Control positivo: Ciprofloxacino 0,05mg/mL (CIPROF) y diluyente utilizado Dimetilsulfóxido (DMSO).	36
Figura 16. Halos de inhibición en <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 frente a distintas concentraciones del aceite esencial de <i>Schinus areira</i> L. "molle": 10%, 50% y 95%. Control positivo: Ciprofloxacino 0,05mg/mL (CIPROF) y diluyente utilizado Dimetilsulfóxido (DMSO).	37

Figura 17. Microplaca de bacterias gramnegativas antes de incubar x 24h a 37°C	38
Figura 18. Microplaca de bacterias gramnegativas después de incubar x 24h a 37°C.	38
Figura 19. Microplaca de bacterias grampositivas antes de incubar por 24h a 37°C.	39
Figura 20. Microplaca de bacterias grampositivas después de incubar por 24h a 37°C	39
Figura 21. Gráfico de barras de difusión en agar (mm) por %AE de <i>Schinus areira</i> L. "molle" y bacteria.	67
Figura 22. Incorporación del aceite esencial de <i>Schinus areira</i> L. "molle" en pocillos de placas para el método de difusión en agar.	67
Figura 23. Materiales para el método de difusión en agar	68

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo determinar la composición química y la actividad antimicrobiana *in vitro* del aceite esencial de *Schinus areira* L. "molle". El aceite esencial fue extraído por el método de arrastre con vapor de agua, posteriormente se realizó los análisis fisicoquímicos y microbiológicos. La composición química fue determinada por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (CG/MS). La actividad antimicrobiana se realizó mediante difusión en agar y microdilución colorimétrica para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI). El rendimiento obtenido fue de 0,6% y la densidad relativa fue de 0,89 g/mL. El análisis por CG/MS evidenció la presencia de Alfa-felandreno (15,94%), D-Limoneno (12,67%), Shyobunona (11,31%) y Shyobunol (6,14%) como componentes mayoritarios. En la prueba de difusión en agar, el aceite esencial a una concentración de 95%, mostró actividad antimicrobiana significativa frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* con halos de inhibición promedio de 19 y 18 mm, respectivamente. En la determinación de CMI por el método de microdilución colorimétrica, el aceite esencial presentó actividad antimicrobiana moderada frente a *Staphylococcus aureus* (CMI=278 µg/mL) y no mostró actividad antimicrobiana frente a *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Los resultados indican que el aceite esencial de *Schinus areira* L. "molle" tiene actividad antimicrobiana moderada contra *Staphylococcus aureus*.

Palabras clave: *Schinus areira* L. "molle", actividad antimicrobiana, composición química, aceite esencial, microdilución colorimétrica, difusión en agar.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the chemical composition and *in vitro* antimicrobial activity of the essential oil of *Schinus areira* L. 'molle'. The essential oil was extracted by the steam extraction method, followed by physicochemical and microbiological analyses. The chemical composition was determined by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS). Antimicrobial activity was performed by agar diffusion and colorimetric microdilution to determine the minimum inhibitory concentration (MIC). The yield obtained was 0.6% and the relative density was 0.89 g/mL. GC/MS analysis showed the presence of Alpha-phellandrene (15.94%), D-Limonene (12.67%), Shyobunone (11.31%) and Shyobunol (6.14%) as major components. In the agar diffusion test, the essential oil at a concentration of 95% showed significant antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* with average inhibition halos of 19 and 18 mm, respectively. In MIC determination by the colorimetric microdilution method, the essential oil showed moderate antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* (MIC=278 µg/mL) and no antimicrobial activity against *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. The results indicate that the essential oil of *Schinus areira* L. 'molle' has moderate antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*.

Key words: *Schinus areira* L. "molle", antimicrobial activity, chemical composition, essential oil, colorimetric microdilution, agar diffusion

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Planteamiento del problema:

La resistencia a los antibióticos es un proceso natural de los microorganismos que generalmente se dan a través de los cambios genéticos. Sin embargo, el uso excesivo e indiscriminado de los antibióticos acelera este proceso de selectividad y posterior resistencia¹.

Esto es un problema de salud pública ya que provoca la ampliación del tiempo de enfermedad, incrementa el riesgo de propagación y el tiempo de las estancias hospitalarias, así como también requieren cada día de terapias más costosas e incrementa la tasa de mortalidad. La mayoría de antibióticos de primera línea presentan mayores casos de resistencia y esto eventualmente conlleva al incremento de la dependencia terapias de segunda y tercera línea que son más caras y requieren de tratamientos más prolongados lo que deriva al agotamiento de los recursos del sistema de salud ².

Con la presencia cada vez mayor de bacterias resistentes, hoy en día se investiga sobre nuevas alternativas terapéuticas de origen vegetal y fitoquímicos con potencial actividad antimicrobiana. Entre las alternativas terapéuticas al uso común de fármacos, se encuentran las de origen vegetal. Las plantas son fuentes invaluable de metabolitos secundarios, estos se encuentran en diversas partes como hojas, frutos o raíces y han sido desarrollados a lo largo del tiempo como mecanismo de defensa de factores externos como los efectos de los radicales libres, bacterias y hongos. Compuestos como los alcaloides, terpenoides carotenoides y polifenoles son los que destacan entre los metabolitos más estudiados ³.

Frente a esta situación, la presente investigación pretende contribuir al estudio de las plantas para que puedan ser consideradas como una alternativa terapéutica o coadyuvante en el tratamiento con antibióticos.

I.2. Objetivos

I.2.1. Objetivo general

Determinar la composición química y la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Schinus areira* L. "molle".

I.2.2. Objetivos específicos

- Determinar características organolépticas y fisicoquímica del aceite esencial.
- Determinar la composición química del aceite esencial mediante GC-MS.
- Evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial mediante difusión en agar.
- Evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial mediante microdilución colorimétrica.

I.3. Importancia y alcance de la investigación

Los productos de origen vegetal son considerados fuentes ricas en metabolitos cuyas propiedades son de importancia medicinal. Aunque en la actualidad los fármacos se obtienen casi en su totalidad mediante síntesis química, muchos de ellos tienen sus orígenes en la naturaleza como lo son las plantas ⁴.

Los fitoquímicos detectados en los aceites esenciales están demostrando tener actividad antimicrobiana y ser efectivos como coadyuvantes en la terapia contra la resistencia antimicrobiana, por mencionar algunos como el resveratrol, catecol, pineno y gingerol que actúan como inhibidores de la bomba de eflujo bacteriano ⁵.

El desarrollo de nuevas terapias antimicrobianas provenientes de aceites esenciales requiere de investigaciones exhaustivas ya que depende de las condiciones de cada país como por ejemplo las condiciones edafoclimáticas, la susceptibilidad de las cepas de la misma especie y el contenido y porcentaje de los metabolitos presentes en las plantas. Esta búsqueda de nuevas terapias de origen natural además de contribuir con el conocimiento científico y la salud pública, también realzan el valor de las propiedades medicinales de las plantas y con ello de la importancia y cuidado de las mismas ⁶.

I.4. Limitaciones de la investigación

Existe poca información sobre la especie *Schinus areira* L. "molle".

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

II.1. Marco teórico

II.1.1. Descripción etnobotánica de la especie en estudio

- **Nombre vulgar:** molle, falso pimentero, molli, aguaribay, huaribay⁷
- **Sinónimos:** *Schinus molle* L. var. *areira* (L.) D.C.⁸.
- **Descripción morfológica:** *Schinus areira* L. "molle" es un árbol leñoso y resinoso llegando a tener una altura de entre 15 a 20 m con hojas perennes glabras formadas por 15 a 35 folíolos, sésiles lanceolados-lineares a menudo serrulados⁹.
- **Hábitat y distribución:** Es un árbol propio de la región andina de América, sobretudo de Perú y ampliamente distribuido y naturalizado en Bolivia, Chile y Argentina. Resistente a diversos tipos de climas (suelos pedregosos y salinos) creciendo hasta los 3500 msnm^{7,10}.



Figura 1. Mapa de distribución de *Schinus areira* L. "molle"¹¹

- **Uso en la medicina tradicional:** En Perú se ha evidenciado que la planta puede ser usada como hipotensivo, infecciones e insecticida y repelente al igual que otros lugares. En Argentina, las hojas pueden usarse como emenagogo y antiinflamatorio, la resina como purgante y la corteza para aliviar problemas respiratorios como la bronquitis. En Chile, las hojas y la corteza son usados para la bronquitis y en algunos casos para el asma, así como también para tratar el reumatismo y heridas ^{7,8}.

II.1.2. Actividad antimicrobiana

II.1.2.1. Mecanismo de acción de los aceites esenciales

Las plantas contienen diversos componentes químicos con propiedades antimicrobianas los cuales son producidos como mecanismo de defensa contra patógenos. Cada compuesto puede presentar diferentes mecanismos de acción contra diferentes bacterias, y a su vez este mecanismo está mediado por procesos bioquímicos propios de la bacteria y por el tipo de componentes químicos del aceite esencial. A lo largo del tiempo se han propuesto diferentes mecanismos de acción antimicrobiana los cuales sostienen principalmente la desestabilización de la estructura celular provocando la ruptura de la integridad de la membrana y el aumento de la permeabilidad, esto afecta distintas actividades celulares como el transporte de membrana o la regulación metabólica. Debido a la naturaleza lipófila del aceite esencial se ha propuesto que estos incrementan la permeabilidad de la membrana celular bacteriana, lo que provocaría la fuga de componentes celulares y la pérdida de iones. Esta pérdida de iones a su vez está relacionada con la reducción del potencial de membrana, interrupción de bombas de protones y disminución de ATP ¹².

Se ha relacionado indirectamente los aceites esenciales con la inhibición de toxinas en bacterias, por ejemplo, en la exposición de *B. cereus* al carvacrol, este último induce a la inhibición de toxina diarreica, al igual como lo hace el uso de aceite esencial de orégano (0,3 µL/mL y 15 µL/mL), el cual suprime la producción de enterotoxinas estafilocócicas. Esto se debe posiblemente a los efectos de los componentes del aceite esencial en la bicapa fosfolipídica comprometiendo los procesos de transporte transmembrana ¹³. Respecto a la producción del ATP,

debido a la afectación que produce el aceite esencial sobre la membrana celular se han reportado alteración sobre el equilibrio de ATP de las bacterias. Tal es el caso del aceite esencial de orégano, que produce una disminución de ATP intracelular sobre *S. aureus* (0,010 % y 0,013 %) y *L. monocytogenes* (aceite esencial de 0,020 % y 0,025 %) ¹⁴.

En cuanto a la síntesis de proteínas de las bacterias también se ven afectados por acción del aceite esencial, a través de la sobreproducción de proteínas de choque térmico (chaperonas) las cuales se evidencia cuando las bacterias están en condiciones de estrés o en contacto con sustancias tóxicas. Esto se observó cuando se expuso *E. coli* O157:H7 a carvacrol 1mM e indujo la producción de (HSP60) e inhibió la síntesis de flagelina ^{15,17}.

Así mismo, se ha propuesto como mecanismo de acción antimicrobiana de los aceites esenciales su sinergia con los antibióticos, debido a que algunos de ellos tienen una actividad muy baja al ser usados solos. Ciertos compuestos tienen la capacidad de debilitar la resistencia a los antibióticos de algunas bacterias. Por ejemplo, del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. se ha demostrado que tiene sinergia con el ciprofloxacino contra bacterias como *Streptococcus pneumoniae* a través del mecanismo de inhibición de la bomba de eflujo. Otro ejemplo es el aceite esencial de Kaempferol que es un flavonoide cuyo sinergismo se asocia al uso con la penicilina contra la bacteria *S. epidermidis* multirresistente a través del mecanismo de acción de Inhibición de la síntesis de peptidoglicano y la actividad de la betalactamasa ¹⁶.

II.1.2.2. Factores químicos que influyen en la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales

La presencia de un anillo bencénico en la estructura química de los componentes de algunos aceites esenciales, así como también de un grupo hidroxilo, demuestran tener mayor actividad frente a otros compuestos en cuya estructura no los contienen. Se estudió la actividad antimicrobiana del carvacrol frente a *Bacillus cereus*. El carvacrol no protonado ingresa hacia la membrana citoplasmática liberando en su interior un ion H⁺, posteriormente se puede unir a un ion K⁺ (u otro catión monovalente) y volver a salir hacia el exterior facilitando así la fuga de iones.

Este mecanismo ha sido propuesto basándose en el eflujo de K^+ y entrada de H^+ vistos en un estudio hecho por Ultee y colaboradores ¹⁸.

Este hecho no ocurre con la presencia de mentol y el éster metílico de carvacrol ya que no contienen grupo hidroxilo (éster metílico de carvacrol) o un sistema de electrones deslocalizados (mentol), pero si se observó actividad inhibitoria con el timol ¹⁹. Por otro lado, la presencia de un grupo acetato en acetato de geraniol y acetato de bornilol aumentan la actividad antimicrobiana comparados con sus parientes geraniol y borneol posiblemente por su naturaleza hidrofóbica. Así mismo, un doble enlace y/o un sustituyente alqueno aumenta la actividad del limoneno comparado con el p-cimeno en presencia de las bacterias gramnegativas, esto sugiere también que la alquilación del compuesto influye en la sensibilidad de la reacción gram. Otro aspecto relevante en la actividad de los componentes de los aceites esenciales es su estereoquímica. Los isómeros alfa son relativamente inactivos comparado con los isómeros beta (alfa pineno), así como los isómeros cis son inactivos en comparación con los isómeros trans (geraniol y nerol), por otro lado, la presencia de dobles enlaces en el anillo ciclohexano aumenta su actividad antimicrobiana (ejemplo terpinoleno y terpineol) ²¹.

Respecto a los aldehídos (formaldehído y glutaraldehído), estos confieren al aceite esencial de actividad antimicrobiana, en especial si el grupo aldehído se encuentra conjugado con un doble enlace de carbono-carbono el cual se caracteriza por poseer alta electronegatividad. Estos compuestos electronegativos son capaces de interferir en procesos biológicos que implican transferencia de electrones y reaccionan con compuestos nitrogenados importantes como proteínas y ácidos nucleicos, por ello se proponen que un incremento de la electronegatividad aumenta la actividad antimicrobiana ^{20,21}.

II.1.3. Metabolitos atribuidos a *Schinus areira*

El género *Schinus* está extendido por diversos países y muchos de ellos han sido utilizados por la medicina tradicional. Químicamente las especies de *Schinus* evidencian diferentes metabolitos secundarios bioactivos entre los que destacan monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenos, ácidos grasos y flavonoides. Así mismo se han atribuido diferentes actividades como antifúngicos, analgésicos, insecticidas

y entre otros. Algunos autores atribuyen a la especie *areira* componentes principales como limoneno, alfa-felandreno, beta-felandreno, sabineno y canfeno. Siendo muchas veces los de mayor porcentaje limoneno y alfa-felandreno ²².

II.2. Antecedentes del estudio

II.2.1. Antecedentes internacionales.

En el 2023, Cutro A. y colaboradores realizaron un estudio para determinar el mecanismo de acción del aceite esencial de *Schinus areira* L. frente a células planctónicas y biopelículas de *S. aureus*. Se observó que la permeabilidad de las células dependía de la concentración del aceite esencial y el tiempo de incubación. También se evaluó el efecto del aceite sobre la fluidez de la membrana en liposomas DMPC (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina) y DMPG (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfo-1'-rac-glicerol). Los resultados evidenciaron que el AE provoca cambios en el empaquetamiento de la membrana lipídica reduciendo la cohesión entre los fosfolípidos y aumentando el acceso de agua y componentes del aceite esencial al interior. Así mismo, también se observó que el aceite esencial provocó incremento de la producción de ROS y degradación del ADN. Por otro lado, respecto al biofilm de *S. aureus*, se observó que el aceite esencial fue capaz de inhibir su crecimiento e incluso la erradicación de los ya formados ²³.

En el año 2020, Rebolledo V. y colaboradores realizaron un estudio sobre el perfil fitoquímico y actividad oxidante de extractos de frutos de *Schinus areira* L. en Chile. Las extracciones se realizaron por maceración y Soxhlet a través de diferentes solventes y la actividad antioxidante mediante el método DPPH. Los resultados para la extracción tanto Soxhlet como maceración, mostraron mayor rendimiento para extractos acuosos (11,9 % y 12,4 %). Respecto a los polifenoles totales no se observaron diferencias significativas, sin embargo, se observó que el contenido de polifenoles fue mayor en extractos metanólicos (Soxhlet: 195,787 ± 3,292 mg GAE/g; maceración: 197,023 ± 3,353 mg GAE/g)²⁴.

En 2019, Cutro A. y colaboradores, realizaron un estudio sobre la actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas de *S. areira* de Santiago del Estero-Argentina. El método para la extracción del aceite esencial fue mediante

hidrodestilación y el análisis químico se desarrolló por GC-MS. Se identificaron veintiocho compuestos y entre los principales de mayor porcentaje fueron 1-epi-cadinol como el compuesto más representativo (34,6 %), seguido del δ -cadineno (15,52 %) y aloaromadendreno (6,99 %). El aceite esencial obtenido mostró actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* a 64 $\mu\text{g/mL}$ y bactericida a 256 $\mu\text{g/mL}$; sin embargo, no mostró efecto antibacteriano en *Escherichia coli*. Su actividad antibacteriana también mostro cambios importantes en el potencial Zeta de la superficie de *S. aureus* ²⁵.

En 2018 Do Prado A. y colaboradores evaluaron la actividad antifúngica y antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de *Schinus molle*. Para ello se obtuvo el aceite esencial mediante destilación a vapor de las hojas y su análisis químico se realizó mediante GC-MS. Los resultados mostraron como principales componentes a β -pineno (25,23 %), epi-alfa-cadinol (21,29 %) y alfa-pineno (18,22 %). También se mostró una actividad antifúngica contra *C. neoformans* y *T. quinckeanum* con un mismo valor de 625 $\mu\text{g/mL}$ para la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima fungicida (CMF) pero buena actividad contra *P. brasiliensis* con CMI y CMF de 39,06 $\mu\text{g/mL}$. Para la actividad antibacteriana, no se mostró sensibilidad por parte de los microorganismos (*P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *S. aureus* resistente a metilicina) por parte del aceite esencial ²⁶.

II.2.2. Antecedentes nacionales

En 2022 Ruiz J. y Salazar M. determinaron la composición química y el efecto antibacteriano de los aceites esenciales de 4 especies de plantas dentro de las cuales se encontraba *Schinus molle* L. (recolectado en Lima) contra bacterias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 1228 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Los resultados de la composición química del aceite esencial de *Schinus molle* L. mostraron como principales componentes alfa-felandreno (19,59 %), canfeno (19,10%) y alfa-pineno (16,56 %). La evaluación del efecto antibacteriano se realizó mediante el método de microdilución en placa y se evidencio buena actividad antibacteriana del aceite esencial de *Schinus molle* L.

con una CMI de 0,312 $\mu\text{L}/\text{mL}$ frente a *Staphylococcus epidermidis* y una CMI de 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ frente a *Staphylococcus aureus*, sin embargo, no tuvo buena actividad contra *Pseudomonas aeruginosa* ($>40 \mu\text{L}/\text{mL}$)²⁷.

En 2022, Aparicio M. evaluó el efecto antimicrobiano *in vitro* de 3 aceites esenciales, donde uno de ellos fue el aceite esencial de *Schinus molle*, sobre patógenos aislados de *Aeromonas* spp. provenientes de truchas. Los resultados del análisis químico del aceite esencial de *Schinus molle* evidenció como componentes mayoritarios a β -mirceno (28,3 %) y alfa-felandreno (19,77 %). Por otro lado, en cuanto a la susceptibilidad de las bacterias por el método de difusión en pozo de agar se determinó que en diferentes concentraciones (5,10 y 15 %), el aceite esencial de molle tuvo actividad moderada antimicrobiana con halos de inhibición de 8 a 15 mm²⁸.

En el 2021, Velásquez M. determinó el efecto antimicrobiano del aceite esencial de los frutos de *Schinus molle* L. contra *Streptococcus mutans* y *Candida albicans*. Por medio del método de arrastre de vapor de agua se obtuvo el aceite esencial de los frutos de *Schinus molle* L., para la evaluación del efecto antimicrobiano se determinó la CMI y la CMB/CMF, así como también se evaluó la sensibilidad de cada bacteria contra el aceite esencial del fruto. Los resultados mostraron para *Streptococcus mutans* un CMI de 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de aceite y para *Candida albicans* fue de 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$, mientras que la CMB para *Streptococcus mutans* fue de 200 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y la CMF para *Candida albicans* fue de 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Por otro lado, se observó la sensibilidad de *Streptococcus mutans* a diferentes concentraciones del aceite esencial (10, 20, 30, 50, 75 y 100 μL) con halos de inhibición que van desde los 15,67 mm (10 μL) hasta los 30,00 mm (100 μL), considerándose como alta sensibilidad en el rango desde los 20 a 100 μL . En cuanto a *Candida albicans*, se obtuvo halos de inhibición que van desde los 11,67 mm (10 μL) hasta los 32,67 mm (100 μL) bajo las mismas concentraciones y se consideró como alta sensibilidad en el rango desde los 75 a 100 μL ²⁹.

En 2018, Ramírez R., y Soto R. determinaron la actividad antibacteriana de manera *in vitro* del aceite esencial de la *Schinus molle* frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 a diferentes concentraciones (25, 50 y 100 %). Los resultados

mostraron que la concentración con mayor efecto antibacteriano fue del aceite al 100 % durante las pruebas a las 24, 48 y 72h, obteniéndose halos de inhibición de 29,4; 14,7 y 9,9 mm para las concentraciones de 100, 50 y 25 % respectivamente a las 72 horas, comparado con el ciprofloxacino con un halo de inhibición de 34,8 mm ³⁰.

En 2018, Requejo E. determinó la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Schinus molle* frente a *Staphylococcus aureus*. El aceite fue extraído por el método de hidrodestilación y para la actividad antibacteriana se usó método de difusión de discos. Los resultados mostraron halos de inhibición de 31,0 mm para el aceite esencial de *Schinus molle* al 75 % y 25,1 mm para una concentración del mismo al 50 % comparado con un estándar farmacológico que fue la doxiciclina cuyo halo de inhibición fue de 28,3 mm ³¹.

En 2017 Pacheco K. y Lázaro M. caracterizaron químicamente el aceite esencial de *Schinus molle* L. y evaluaron su actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. La obtención del aceite esencial se realizó mediante el método de destilación por arrastre de vapor de agua y para la actividad antimicrobiana se determinó la CMI con el método de diluciones seriadas decimales y recuento en placa. Los resultados de la caracterización química fueron el número de éster (mg KOH/g aceite): 10,43 e índice de acidez (mg KOH/g aceite): 2,74. Los componentes de mayor porcentaje fueron alfa-felandreno (17,13 %) y alfa-pineno (15,57 %). Para la actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* se determinó una CMI de 0,1 mL AE/mL de inóculo con una muerte de 99,67 % del inóculo inicial y una fase de declive de hasta 50 horas comparado con el 96,11 % que se obtuvo para *Escherichia coli* y una fase de declive de hasta 2,4 horas ³².

En 2015, Solis-Quispe L. y colaboradores determinaron la composición química y actividad antioxidante y antiproliferativa de *Schinus areira* L. cultivado en Cuzco. La composición química se determinó mediante GC-FID y GC-MS, la actividad antioxidante mediante el método DPPH y la actividad antiproliferativa frente a células de cáncer de mama 4T1 en un medio Eagle modificado de Dulbecco. Los resultados del análisis químico por GC-MS evidenciaron 56 compuestos entre los que se destacan alfa-felandreno, limoneno, canfeno y β -felandreno como componentes mayoritarios³³.

II.3. Bases teóricas

II.3.1. Bacterias gram positivas y gramnegativas.

Las bacterias pueden clasificarse por distintos criterios ya sea por su forma, tinción, su capacidad para crecer con o sin oxígeno o contenido de ADN. La tinción gram es un método que permite clasificar bacterias según su morfología. Las bacterias gram positivas (coloración positiva a la tinción gram) al tener grandes cantidades de peptidoglicano retienen con mayor fuerza el complejo violeta-yodo, y en las bacterias gram negativas sucede lo contrario al tener pocas cantidades de peptidoglicano. Sin embargo, hay que mencionar que no todas las bacterias pueden ser identificados por este método debido a que algunas no poseen pared celular (micoplasma). Entre las bacterias gram positivas podemos mencionar a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium*, etc., y por el lado de las bacterias Gram negativas se tienen a *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Yersinia*, *Shigella*, etc. ^{34,35}.

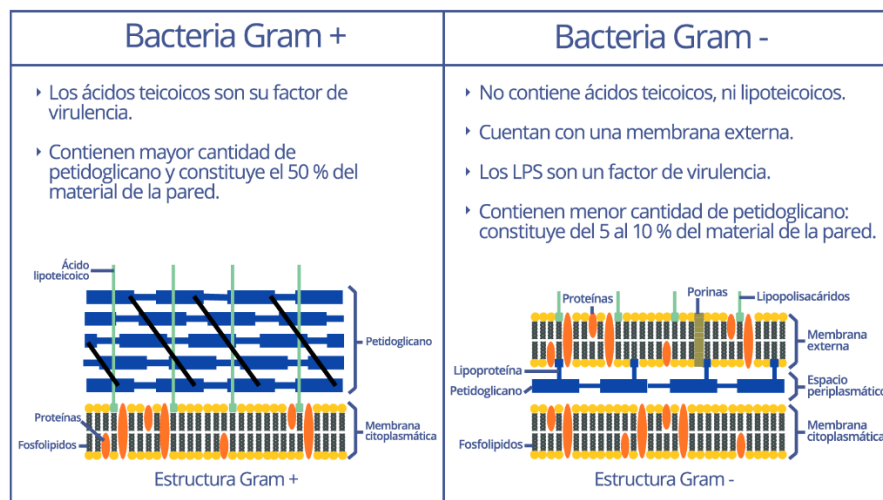


Figura 2. Comparación entre las bacterias Gram + y Gram – ³⁴.

II.3.2. Metabolitos secundarios

Las plantas son una fuente rica de varios compuestos químicos con potencial antimicrobiano entre los que se encuentran por ejemplo el ácido cinámico (derivado de la planta *Avena sativa*) y el ácido selvianólico (derivado de las plantas cuya familia pertenecen a las Lamiaceae). No solo las plantas han sido objeto de investigación para el descubrimiento de nuevos agentes antimicrobianos, por ejemplo, el primer metabolito secundario que fue usado como agente antimicrobiano fue la penicilina (derivado del hongo *Penicillium chrysogenum*); sin embargo, a pesar de su eficacia, no pasaron muchos años hasta que se presenten casos de resistencia debido al excesivo uso que se le dió. Posteriormente se descubrió otros agentes secundarios como la colistina, gentamicina y mupirocina^{36,37,38}.

II.3.2.1. Compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos son diversos, constituyen alrededor de 10 mil compuestos y se caracterizan por la presencia de por lo menos un anillo aromático hidroxilado, así mismo, una manera de clasificarlos es mediante el número de carbonos presentes³⁹. Los compuestos fenólicos provienen de la vía del ácido shikímico o malonato/acetato⁴⁰ y pueden clasificarse en fenoles simples, ácidos fenólicos y taninos

II.3.2.2. Cumarinas

Compuestos fenólicos formados por anillos de benceno. Estimulan los macrófagos y por ello, indirectamente, tiene su efecto contra infecciones. No solamente actúan contra bacterias sino contra virus y hongos (*Candida albicans*). Así mismo se le atribuye otras actividades como antitrombóticos, antiinflamatorios y vasodilatadores. Entre los compuestos representativos están umbeliferona (7-hidroxicumarina) y la escopoletina (7-hidroxi-6-metoxicumarina)⁴¹.

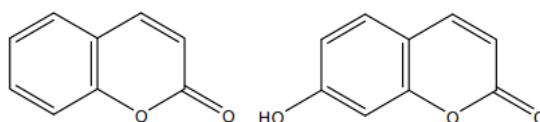


Figura 3. Estructura química de la cumarina (izquierda) y 7-hidroxicumarina (derecha)⁴².

II.3.2.3. Flavonoides

Derivados de los compuestos fenólicos, poseen propiedades antioxidantes, antimicrobiano y antiinflamatorios. Los flavonoides son capaces de alterar la membrana microbiana, por ejemplo, las catequinas provenientes del té verde, son flavonoides cuya actividad antimicrobiana se ha demostrado contra *Vibrio cholerae*, *Streptococcus mutans* y *Shigella*, así como también contra los virus ⁴³. Los flavonoides pueden clasificarse en (flavonoles, flavononas, flavonas, isoflavonoides, antocianidinas.

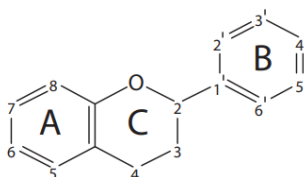


Figura 4. Estructura química de flavonoides ⁴⁴.

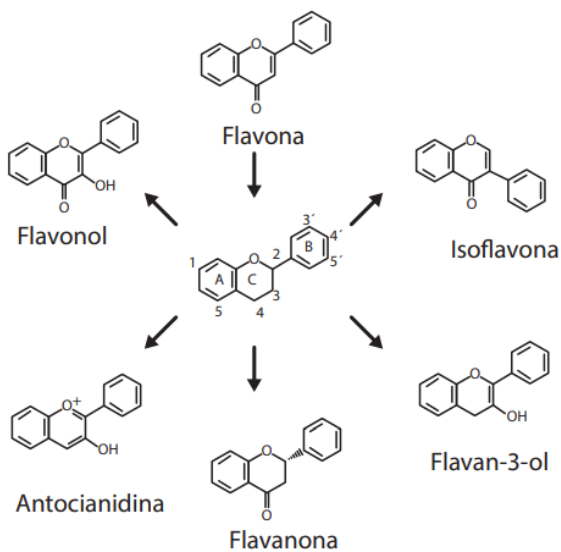


Figura 5. Estructuras derivadas de las modificaciones en el anillo C ⁴⁴.

II.3.2.4. Terpenos

Los terpenos provienen de la vía biosintética del ácido mevalónico y se considera las unidades de isopreno (C_5H_8) como los constituyentes básicos. Los precursores de la mayoría de terpenos son los ésteres pirofosfóricos de alcoholes en $(C_5)_n$, entre los que se encuentran por ejemplo el geranilpirofosfato (precursor de los monoterpenos en C_{10}) y farnesilpirofosfato (precursor de los sesquiterpenos en C_{15}). Pueden clasificarse en monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenos, etc.

Número de unidades de isoprenos	Número de carbonos	Nombre del terpeno
2	10	Monoterpeno
3	15	Sesquiterpeno
4	20	Diterpeno
6	30	Triterpeno
8	40	Tetraterpeno
>8	>40	Politerpeno

Figura 6. Clasificación de terpenos ⁴⁵

Los monoterpenos son los constituyentes que se encuentran con mayor frecuencia en los aceites esenciales y entre los más comunes se encuentran el limoneno (usado comúnmente como antibacteriano y fungicida; mentol, proveniente de plantas del género *Mentha* y comúnmente usado para aliviar la comezón y para problemas gastrointestinales y pineno, se produce como α -pineno y β -pineno. Los sesquiterpenos, están constituidos por 3 unidades de isopreno cuyas características pueden ser cíclicos o alifáticos y al igual que los monoterpenos, son constituyentes habituales en los aceites esenciales. Entre los sesquiterpenos más comunes se tienen al farnesol, nerolidol, bisabolol, cadineno y selineno. Los triterpenos contienen 6 unidades de isopreno y se derivan del escualeno, los mas representativos son esteroides, saponinas y glucósidos.⁴⁴.

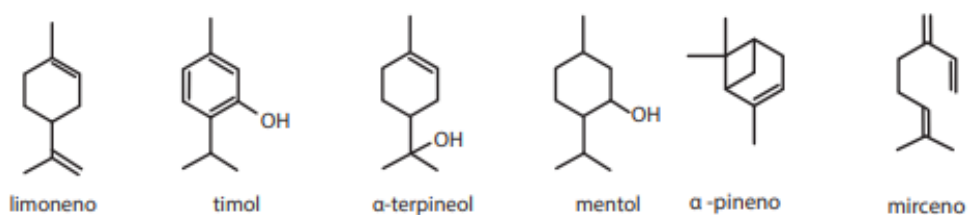


Figura 7. Ejemplo de algunos monoterpenos ⁴⁴.

II.3.2.5. Quinonas

Compuestos aromáticos cuya estructura contienen 2 cetonas las cuales se caracterizan por ser muy reactivas. Así mismo, se sabe que las quinonas forman complejos con los aminoácidos en las proteínas, lo que conlleva a la inactivación de la proteína y la pérdida de la función. Es por ello su importancia como potencial agente antimicrobiano. Kazmi y col. denominaron a *Cassia itálica* (antraquinona) como bacteriostático contra *Bacillus anthracis* y bactericida contra *Pseudomonas pseudomalliae* ⁴⁶.

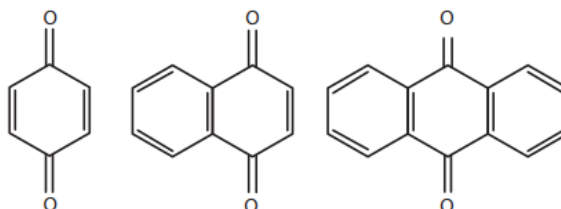


Figura 8. Estructura química de Quinonas, de izquierda a derecha: Quinona Naftoquinona y Antraquinona ⁴⁴.

II.3.3. Métodos de extracción

II.3.3.1 Hidrodestilación

En este método, el material vegetal se sumerge en agua el cual hierve por contacto directo con el fuego. El agua se evapora y fluye directo hacia el condensador (serpentín de vapor cerrado). El aceite obtenido se separa y recupera del producto final. Es importante señalar que, si el calentamiento se produce por contacto directo, el agua dentro del extractor debe permanecer constante y debe ser suficiente de tal manera que se evite la carbonización del material vegetal. Este método tiene la desventaja de que requiere grandes cantidades de energía y las altas temperaturas pueden alterar los compuestos presentes en el aceite hasta una posible degradación ^{47,48}.

II.3.3.2. Destilación por arrastre de vapor

En este método el material vegetal se encuentra separada del agua, para ello se requiere del uso de una rejilla donde se coloca el material vegetal y por donde va a pasar el vapor de agua, el cual fluye también hacia un condensador para obtener finalmente el producto. A diferencia del método de hidrodestilación, en la destilación por arrastre de vapor hay menos probabilidad de hidrólisis por parte de los componentes volátiles ^{47,48}.

II.3.3.3. Extracción con solventes

Usado para la extracción de aceites esenciales termolábiles (por ejemplo: flores), en este método se utiliza un baño de disolventes que luego serán filtraciones llevados a destilación. Los disolventes comúnmente usados con alcohol, hexano, éter de petróleo y etanol. El hexano es un excelente disolvente a la hora de la extracción del aceite esencial, sin embargo, su elevada toxicidad ha hecho que se opten por diferentes opciones como el uso de isopropanol y etanol ^{47,49}.

II.3.3.4. Extracción por ultrasonido.

Algunos beneficios de este método son el reducido tiempo de extracción y evitar el uso de disolventes orgánicos). Este método se basa en la cavitación (producción y descomposición de burbujas microscópicas). El colapso de las burbujas produce daño en las membranas celulares de las plantas. Una desventaja es su elevado costo ⁴⁹.

II.3.3.5. Extracción con fluido supercrítico

El material vegetal se encuentra en contacto constante con el fluido en estado supercrítico, los componentes son arrastrados por hacia un sistema de colección donde se obtiene el aceite esencial. Asimismo, el fluido es descomprimido a temperatura y presión ambiente, lo cual lo hace ideal en este método ya que no requiere del uso de solventes para la separación del aceite.

Algunas ventajas de este método la fácil eliminación del solvente, alto rendimiento de la extracción y la pureza del aceite esencial. El fluido supercrítico comúnmente usado el CO₂ ya que es un compuesto barato, inerte, no tóxico y su estado

supercrítico no requiere de altas temperaturas (31°C). La desventaja del método es su costo y la capacidad de requerir bombas de alta presión ⁵⁰.

II.3.4. Métodos para determinar la actividad antimicrobiana

II.3.4.1. Método dilución en caldo

El método dilución en caldo se puede trabajar de 2 formas, ya sea mediante macrodilución (diluciones en tubo) o microdilución (microdiluciones en placas de 96 pocillos). La dilución en caldo por macrodilución utiliza volúmenes de hasta 10 mL, sin embargo, esto requiere la disponibilidad de una mayor cantidad de aceite esencial y del medio así como también ya no se tendría la facilidad del uso de pipetas multicanales. Por otro lado, el método por microdilución tiene la ventaja de que se requieren normalmente volúmenes menores a 0,5 mL. Este segundo método es el más utilizado por su economía y mejor reproducibilidad. El medio utilizado y recomendado por CLSI y EUCAST para bacterias no exigentes es Caldo Mueller Hinton. Para la dilución de los aceites esenciales se considera el DMSO y como estabilizantes Tween 80 o Tween 20. Por último, para evaluar el punto final del CMI se utiliza un indicador redox (Resazurina) el cual se reduce a resorufina por la presencia de enzimas mitocondriales activas de las bacterias ^{51,52}.

II.3.4.2. Método dilución en agar

Se trata de un ensayo el cual se mezcla el aceite esencial con agar difundido a diferentes concentraciones. Posteriormente, se inocula cierta cantidad de bacterias. En este caso el CMI también se considera como la concentración más baja a la cual se inhibe el crecimiento bacteriano en su totalidad. Usando la escala McFarland se utiliza una cantidad de bacterias 10^8 cel/mL. Utilizan Agar Mueller Hinton y al igual que la dilución en caldo también se utilizar solventes (DMSO, 1-2 %) y emulsificantes (Tween, 0,5 %). Una de las ventajas que tiene el método de dilución en agar es la utilización de inoculador de múltiples puntos en una sola placa de 90 mm para diferentes cepas lo que los hace idóneos para trabajar en condiciones de pruebas idénticas cuando se analiza un solo aceite. Por otro lado, entre las desventajas se encuentra la cantidad elevada de aceite esencial y medio que se

utiliza. Así mismo la temperatura del agar debe permanecer entre 45 y 50 °C para mantenerse líquido lo que se considera un inconveniente ya que puede influir en las características fisicoquímicas del aceite esencial o de sus componentes volátiles⁵².

II.3.4.3. Difusión en agar

El método de difusión en agar se utiliza como ensayos previos para analizar si los aceites esenciales tienen actividad antimicrobiana. Se consideran métodos semicuantitativos y se recomienda seguir la investigación con la determinación de CMI. El principio de este ensayo se trata de la difusión de los activos antimicrobianos del aceite esencial en placas de agar inoculadas con el microorganismo de estudio. Así mismo, es necesario el uso de controles positivos y negativos para evaluar que estos no interfieran en la dilución del aceite esencial. La metodología de difusión en agar se puede dividir en 2: difusión en disco y difusión en pozo. El método de difusión en disco es muy utilizado debido a su fácil acceso así como también es un método de referencia para CLSI y EUCAST. Se utiliza como medio Agar Mueller Hinton y el aceite esencial puede ser usado tanto puro como diluido en solventes como DMSO, metanol, etanol o DMSO con Tween 80. Por otro lado, el método de difusión en pozo es el menos utilizado debido a su complejidad para trabajarlo. Se trata de perforar pocillos o agujeros en el agar los cuales serán llenados con el aceite esencial. Las principales variables de este método son el volumen del aceite, el medio y el diámetro del pocillo^{52,53}.

II.4. Glosario de términos

- CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute (Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio), es una organización que desarrollan normas estandarizadas y consensuadas a nivel global⁵⁴.
- GC/MS: Gas chromatography–mass spectrometry: Técnica de separación de moléculas orgánicas volátiles, en combinación con espectrometría de masas se usan para separar mezclas complejas y cuantificar el analito⁵⁵.

- Escala McFarland: Se refiere a un estándar de turbidez el cual se traduce en un número aproximado de bacterias en una suspensión líquida, el estándar comúnmente utilizado es 0,5 el cual representa a $1,5 \times 10^8$ bacterias/mL ⁵⁶.
- *In vitro*: refiere a ensayos realizados fuera del organismo vivo, pueden ser en tejidos, órganos o células aisladas ⁵⁷.
- CMI: Concentración mínima inhibitoria. Se trata de la concentración más baja el cual puede inhibir el crecimiento bacteriano, se expresa en mg/L o ug/mL ⁵⁸.

III. HIPÓTESIS Y VARIABLES

III.1. Hipótesis

El aceite esencial de *Schinus areira* L. "molle" tiene actividad antimicrobiana frente a las bacterias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*.

III.2. Variables

- Variable independiente: Composición química del aceite esencial de *Schinus areira* L. "molle".
- Variable dependiente: Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Schinus areira* L. "molle".

III.3. Operacionalización de variables

Tabla 1. Operacionalización de variables

VARIABLE(S)	TIPO DE VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADOR	UNIDAD DE MEDIDA	OBSERVACIONES
Composición química del aceite esencial de <i>Schinus areira</i> L. "molle"	Variable independiente	Mezcla compleja de compuestos volátiles obtenido mediante arrastre con vapor de agua	La composición química del aceite esencial se evaluará mediante GC-MS	Análisis preliminar del AE	Densidad relativa	g/mL	$Densidad\ relativa = \frac{M1 - M}{M2 - M}$
					Rendimiento	%	$\% RAE = \frac{VolAE\ (mL)}{P\ muestra\ (g)} \times 100\ \%$
				GC-MS	Compuestos volátiles aromáticos	%	Se tomará en cuenta los componentes con mayor porcentaje.
Actividad antimicrobiana del aceite esencial de <i>Schinus areira</i> L. "molle"	Variable dependiente	Inhibición del crecimiento de bacterias, virus u hongos	Inhibición del crecimiento de <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Bacillus subtilis</i> usando AE de <i>Schinus areira</i> L. "molle"	Difusión en agar	Halo de inhibición	mm	Actividad antimicrobiana mayor a 18 mm
				Microdilución colorimétrica	Concentración mínima inhibitoria	Cambio de coloración	Inactivo > 1000µg/mL, actividad débil 500 a 1000µg/mL, actividad moderada 100 a < 500µg/mL, buena actividad < 100 µg/mL

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Materiales, reactivos y equipos

IV.1.1. Material vegetal

- Hojas de *Schinus areira* L. "molle".

IV.1.2. Material biológico

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

IV.1.3. Reactivos

- Resazurina (Sigma-Aldrich)

- Estándar de Ciprofloxacino (Sigma-Aldrich)
- Dimetilsulfóxido (Merck)
- Polisorbato (Biolab)
- Agua destilada
- Agar Mueller Hinton (BD DIFCO)
- Caldo Mueller Hinton (Merck)

IV.1.4. Equipos

- Incubadora Incucell)
- GC-MS (Shimadzu)
- Equipo de destilación por arrastre de vapor (acero inoxidable)
- Balanza analítica (Sartorius)
- Refrigeradora (Coldex)
- Autoclave (ALP)
- Estufa (Memmert)
- Densitómetro (Biosan)
- Vortex (Wizard)
- Tubos de ensayo (Pyrex)
- Matraz Erlenmeyer (Pyrex)
- Asa de Kohl

IV.2. Área de estudio

La muestra fue colectada en las pendientes aledañas al río Huari de la provincia de Huari, departamento de Ancash – Perú (agosto).

Coordenadas: 9°22'08.1"S 77°09'09.5"W (-9.368906, -77.152644).

IV.3. Diseño de investigación

Descriptiva y prospectiva

IV.4. Población y muestra

- Población: Árbol de *Schinus areira* L. "molle" proveniente del departamento de Ancash
- Muestra: Hojas de *Schinus areira* L. "molle".

IV.5. Procedimientos, técnicas e instrumentos de recolección de información

IV.5.1. Colección de la muestra

Las plantas maduras fueron recolectadas en el departamento de Ancash, durante el mes de agosto. Se escogió el sitio cercano al río Huari y sus alrededores donde abunda esta especie *Schinus areira* L. "molle" y también por el uso y conocimiento de sus pobladores. Se colectó 12 Kg de *Schinus areira* L. "molle" a 2,800 msnm, se rotuló y se transportó por medio terrestre protegiéndose de la humedad.



Figura 9. Hojas y frutos de *Schinus areira* L. "molle" (Fuente: propia)

IV.5.2. Clasificación Taxonómica.

La especie *Schinus areira* L. "molle" fue identificada por el curador Julio Torres en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. (ANEXO 1)

ORDEN: Sapindales Juss. ex Bercht. & J. Presl
FAMILIA: Anacardiaceae R. Br.
GÉNERO: *Schinus* L.
ESPECIE: *Schinus areira* L.
Nombre común: "Molle"

Figura 10. Clasificación taxonómica de *Schinus areira* L. "molle".

IV.5.3. Extracción del aceite esencial:

Se utilizó el método de destilación por arrastre de vapor en un equipo de acero inoxidable semiindustrial a partir de 3,25 kg de hojas (entre frescas y secas). Se obtuvo 18 mL de aceite esencial, el cual se rotuló y se conservó a una temperatura entre 2°C y 8°C hasta su apertura para el desarrollo experimental.

IV.5.4. Análisis organoléptico y rendimiento:

Se realizó el análisis organoléptico (aspecto, color, olor y sabor) y se calculó el rendimiento del aceite esencial por el método gravimétrico-volumétrico ⁵⁹.

$$\% \text{ RAE} = \frac{\text{Vol.AE (mL)}}{\text{P muestra (g)}} \times 100 \%$$

Donde:

% RAE: Rendimiento del aceite esencial

Vol. AE: Volumen del aceite esencial obtenido (mL)

P muestra: Peso de la muestra a destilar (g)

IV.5.5. Análisis fisicoquímico

Se realizó el cálculo de la densidad relativa mediante la siguiente fórmula:

El cálculo de la densidad relativa se realizó de acuerdo al método 1 del capítulo <841> de USP 40 ⁶⁰.

$$\text{Densidad relativa} = \frac{M1 - M}{M2 - M}$$

Donde:

M: Peso del picnómetro vacío (g)

M1: Peso del picnómetro con la muestra (g)

M2: Peso del picnómetro con agua (g)

IV.5.6. Determinación de la composición química del aceite esencial de *Schinus areira* L. "molle".

El aceite esencial obtenido a partir de las hojas de *Schinus areira* L. "molle" fue analizado en laboratorio LABICER en la Universidad Nacional de Ingeniería. El análisis químico se realizó en un Cromatógrafo de Gas/ Espectrómetro de Masa (CGEM) modelo CG: SHIMADZU, GC-2010 Plus, provisto de una columna capilar "RESTEK. RTX-5MS, 30m x 0,25 mm ID x 0,25 µm df. Serial: 1346249". El aceite esencial fue secado previamente con sulfato de sodio anhidro y se filtró con jeringa de 0,45 µm. posteriormente se diluyó 0,2 mL de la muestra con n-hexano en un fiola de 10mL, del cual se trasladó a un vial y se colocó en el muestreador de GC-MS. Las condiciones utilizadas fueron: Temperatura inicial 50 °C, aumentando a 3°C/min hasta 250 °C, manteniendo esta temperatura durante 10 minutos, temperatura del inyector 220 °C modo Split. El gas transportador utilizado fue helio con un flujo de 0,80 mL/min, Interfase 290 °C y temperatura de fuente a 250 °C.

IV.5.7. Método de Difusión en Agar

IV.5.7.1 Fundamento

La difusión en agar es un método que consiste en incorporar concentraciones de una muestra (extracto y/o aceite esencial) sobre una superficie de agar previamente inoculado con bacterias. Se realiza pozos en el agar donde posteriormente se colocan una cantidad de aceite esencial. Si la muestra tiene actividad, desarrollará zonas de inhibición o halos de inhibición. Cuanto más susceptible sea el microorganismo al agente antimicrobiano, mayor será el halo de inhibición y menor será su CMI. ^{61,62,63}.

IV.5.7.2 Microorganismos de estudio

Se utilizaron las siguientes bacterias *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 del laboratorio de Microbiología del Instituto de Química Biológica, Microbiología y Biotecnología "Marco Antonio Garrido Malo" de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM.

IV.5.7.3 Preparación de muestras

El aceite esencial de *Schinus areira* L. "molle" se trabajó a las siguientes concentraciones: 10, 50 y 95 % utilizando como medio diluyente DMSO.

IV.5.7.4 Preparación del control positivo

Se utilizó el Ciprofloxacino como control positivo, se disolvió en agua, se preparó a una concentración de 0,05 mg/mL, y se diluyó en DMSO. Como control negativo se utilizó DMSO. Las pruebas se realizaron por triplicado.

IV.5.7.5 Preparación del inóculo

Las bacterias fueron sembradas en placas de Agar Tripticasa Soya (TSA) y se incubaron a 37 °C por 24h antes de la prueba de determinación de la CMI. Con ayuda del asa de siembra se tomaron 1 a 3 colonias de los microorganismos y se colocaron en solución salina estéril 0,9 %, ajustando hasta que se obtuvo un grado de turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland ($1-2 \times 10^8$ UFC/mL para bacterias).

IV.5.7.6 Procedimiento

Las placas se inocularon con 0,4 mL de suspensión de inóculo por cada 100 mL de medio de cultivo de agar Mueller Hinton, se homogeneizó y distribuyó en placas Petri de vidrio estériles de 90mm de diámetro (25 mL por placa). Se dejó solidificar y se realizó pocillos utilizando sacabocados estéril. Posteriormente a cada pocillo se incorporó 100uL de las diferentes concentraciones del aceite esencial (10, 50 y 95 %), se llevó a refrigeración por 30 minutos y se incubó en estufa a 37°C por 24 h. Las pruebas se realizaron por triplicado.

IV.5.7.7 Interpretación

Tras la incubación, se evaluó la presencia de zonas de inhibición del crecimiento y se midieron los diámetros en mm. Se consideró una actividad antimicrobiana significativa a una zona con un diámetro superior a 18 mm⁶⁴.

IV.5.8. Método de microdilución colorimétrica

IV.5.8.1 Fundamento

El método de Microdilución colorimétrica se basa en que se adiciona un indicador redox como el colorante resazurina. La resazurina en cuyo estado natural presenta una coloración azul, es reducida a resorufina (color rosa) en presencia de bacterias y con el cambio de coloración es posible hallar la concentración mínima inhibitoria de un aceite esencial ^{65,66}.

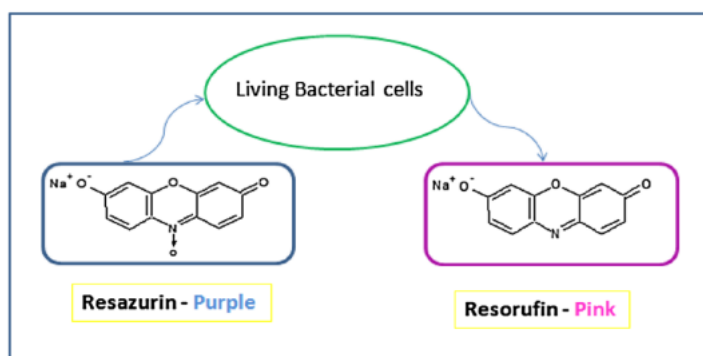


Figura 11. Conversión de Resazurina a Resorufina ⁶⁶.

IV.5.8.2 Microorganismos de estudio

Se utilizaron las siguientes bacterias *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, del laboratorio de Microbiología del Instituto de Química Biológica, Microbiología y Biotecnología “Marco Antonio Garrido Malo” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM.

IV.5.8.3 Preparación de muestras

Se diluyó mililitros del aceite esencial en DMSO, posteriormente los aceites esenciales se prepararon a una proporción de 1 en 50 [aceite esencial (30 μ L): Tween 80 (30 μ L): caldo Müeller Hinton (1440 μ L)] obteniendo 10 diluciones doblemente concentradas finales, que están en el rango de 0.020 - 10 μ L/mL del aceite esencial de *Schinus areira* L. “molle”.

Tabla 2. Esquema de trabajo para dilución del aceite esencial

DILUCION DEL ACEITE ESENCIAL					
Pasos	Conc. (m/mL)	Fuente (mL)	DMSO (mL)	Concentración intermedia (uL/mL)	Concentración final 2X: 1:50 en CMH
1	1000,000	0,1	0,1	500,000	10,000
2	1000,000	0,1	0,3	250,000	5,000
3	1000,000	0,1	0,7	125,000	2,500
4	125,000	0,1	0,1	62,500	1,250
5	125,000	0,1	0,3	31,250	0,625
6	125,000	0,1	0,7	15,625	0,313
7	15,625	0,1	0,1	7,813	0,156
8	15,625	0,1	0,3	3,906	0,078
9	15,625	0,1	0,7	1,953	0,039
10	1,953	0,1	0,1	0,977	0,020

IV.5.8.4 Preparación del control positivo

Se utilizó el Ciprofloxacino como control positivo, se disolvió en agua y se preparó a 640 µg/mL siguiendo las siguiendo las normas del CLSI ⁶⁷. La concentración final de Ciprofloxacino fue desde 0,125 a 64 µg/mL. Se utilizó como control de esterilidad el caldo Mueller Hinton con resazurina.

Tabla 3. Esquema de trabajo para dilución del ciprofloxacino.

DILUCION DEL CIPROFLOXACINO				
Pasos	Conc. (µg/mL)	Fuente (mL)	DMSO (mL)	Concentración 2X (µg/mL)
1	640	1	4	128
2	128	0,8	0,8	64
3	128	0,5	1,5	32
4	128	0,5	3,5	16
5	16	0,8	0,8	8
6	16	0,5	1,5	4
7	16	0,5	3,5	2
8	2	0,8	0,8	1
9	2	0,5	1,5	0,5
10	2	0,5	3,5	0,25

IV.5.8.5 Preparación del inóculo

Las bacterias fueron sembradas en placas de Agar Tripticasa Soya (ATS) y se incubaron a 37 °C por 24 h antes de la prueba de determinación de la CMI. Con ayuda del asa de siembra se tomaron 1 a 3 colonias de los microorganismos y se colocaron en solución salina estéril 0,9%, se ajustó hasta obtener un grado de turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland ($1-2 \times 10^8$ UFC/mL para bacterias.). Asimismo, se realizaron diluciones con caldo Müeller Hinton hasta que se obtuvo un inóculo de $6,6-13,3 \times 10^5$ UFC/mL (2X inóculo).

IV.5.8.6 Procedimiento

La prueba se realizó en placas de microdilución de 96 pocillos de fondo en U y estériles. Por cada 20 mL de las suspensiones del inóculo 2X se adicionó 0,1 mL de solución de resazurina 20 mg/mL, el cual fue previamente preparada en condiciones asépticas utilizando un filtro de 0,22µm.

La distribución de las muestras se realizó en base al diseño de la bandeja de microdilución (tabla 4). En este método se incluyeron pozos de control de crecimiento (bacterias más caldo Mueller-Hinton), de control de esterilidad (caldo

Mueller-Hinton), y los de ensayo (bacterias más caldo Mueller-Hinton más antibiótico o aceite esencial). Todas las pruebas fueron hechas por duplicado. Posteriormente las microplacas fueron llevados a incubación de 37°C por 24h.

Tabla 4. Esquema de trabajo de distribución de las muestras.

		Distribución de las muestras												
		C.E.	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	C.C.	
ACEITE ESENCIAL	ACEITE													BACTERIA 1
	ESENCIAL													
	CIPROFLOX.													
ACEITE ESENCIAL	ACEITE													BACTERIA 2
	ESENCIAL													
	CIPROFLOX.													

	C.E.: Control de esterilidad
	C.C.: Control cultivo

IV.5.8.7 Interpretación

El cambio de color de púrpura (resazurina) a rosa resorufina es indicativo de que las bacterias se encuentran metabólicamente activas. Por el contrario, la conservación de la coloración púrpura (resazurina), donde no hubo cambio de coloración, es indicativo que hubo actividad antimicrobiana por parte del aceite esencial. Para la interpretación de los resultados se utilizaron los parámetros de Holetz et al ⁶⁸, los cuales fueron considerados de la siguiente manera: Inactivo > 1000 µg/mL, actividad débil 500 a 1000 µg/mL, actividad moderada 100 a < 500 µg/mL, buena actividad < 100 µg/mL.

IV.6. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se usó el modelo de Análisis de Varianza (ANOVA) con un 95% de confianza, las pruebas de la metodología por difusión en agar se

realizaron por triplicado y las pruebas de la metodología de microdilución se realizó por duplicado, cada resultado se reportó como el valor promedio \pm la desviación estándar.

V. RESULTADOS

V.1. Análisis organoléptico del aceite esencial de *Schinus areira* L. "molle"

La tabla 5. muestra las características organolépticas y rendimiento del aceite esencial de *Schinus areira* L. "molle".

Tabla 5. Características organolépticas del aceite esencial de *Schinus areira* L. "molle".

	<i>Schinus areira</i> L. "molle".
Aspecto	Oleoso translucido
Color	Amarillo claro
Sabor	Sui generis
Olor	Fuerte aromático
Rendimiento	0,6 %

V.2. Análisis fisicoquímico del aceite esencial de *Schinus areira* L. "molle"

La tabla 6. muestra la característica fisicoquímica del aceite esencial de *Schinus areira* L. "molle".

Tabla 6. Característica fisicoquímica del aceite esencial de *Schinus areira* L. "molle"

	<i>Schinus areira</i> L. "molle"
Densidad relativa	0,89 g/mL

$$\text{Densidad relativa} = \frac{17,8418 - 13,4320}{18,3877 - 13,4320}$$

$$\text{Densidad relativa} = 0,89 \text{ g/mL}$$

V.3. Determinación de la composición química del aceite esencial de *Schinus areira* L. "molle"

Se determinó como principales componentes alfa-felandreno (15,94%), D-Limoneno (12,67%), shyobunona (11,31%) y shyobunol (6,14%).

Tabla 7. Lista de los componentes detectados en el aceite esencial *Schinus areira* L. "molle" mediante GC-MS.

Peak#	R.Time	Area%	Name
1	6.968	0.40	Tricyclo[2.2.1.0(2,6)]heptane, 1,7,7-trimethyl-
2	7.630	2.78	(1R)-2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene
3	8.439	2.21	Camphene
4	10.244	0.45	Bicyclo[3.1.0]hexane, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-
5	10.365	1.13	Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene-, (1S)-
6	12.010	1.16	.beta.-Myrcene
7	13.136	15.94	.alpha.-Phellandrene
8	15.207	2.66	o-Cymene
9	15.822	12.67	D-Limonene
10	45.323	0.13	5-Isopropyl-6-methyl-hepta-3,5-dien-2-ol
11	47.218	0.15	Bornyl acetate
12	48.995	0.13	2-Oxabicyclo[2.2.2]octan-6-ol, 1,3,3-trimethyl-
13	51.871	0.09	Copaene
14	52.773	0.42	.beta.-Elemene, (-)-
15	53.492	0.46	.alpha.-Gurjunene
16	53.925	2.53	Caryophyllene
17	54.790	0.08	Aromandendrene
18	55.365	0.12	Cadina-3,5-diene
19	55.463	0.67	Humulene
20	55.789	0.19	(1R,9R,E)-4,11,11-Trimethyl-8-methylenebicyclo[7.2.0]undec-4-ene
21	55.911	0.21	(1R,2S,6S,7S,8S)-8-Isopropyl-1-methyl-3-methylenetricyclo[4.4.0.02,7]decane-rel-
22	56.463	0.15	1-Isopropyl-4,7-dimethyl-1,2,3,4,5,6-hexahydronaphthalene
23	56.622	0.49	.gamma.-Muurolene
24	56.728	0.69	Germacrene D
25	57.168	0.38	(1R,2S,6S,7S,8S)-8-Isopropyl-1-methyl-3-methylenetricyclo[4.4.0.02,7]decane-rel-
26	57.478	5.12	.beta.-Cyclogermacrane
27	57.688	1.49	.alpha.-Muurolene
28	57.765	0.39	.beta.-Elemene, (-)-
29	58.220	1.93	Epicubebol
30	58.417	0.06	6-epi-shyobunol
31	58.700	4.42	Cadina-3,9-diene
32	58.966	0.11	Cubenene
33	59.175	0.29	Naphthalene, 1,2,4a,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, [1S-

			(1.alpha.,
34	59.737	2.42	Elemol
35	59.868	0.11	Longifolenaldehyde
36	60.310	0.46	Palustrol
37	60.727	2.31	(2E,4S,7E)-4-Isopropyl-1,7-dimethylcyclodeca-2,7-dienol
38	60.793	1.03	Spathulenol
39	61.010	0.23	(-)-Globulol
40	61.323	0.89	Viridiflorol
41	61.750	0.43	Ledol
42	61.994	11.31	Shyobunone
43	62.251	0.09	Epicubanol
44	62.764	0.88	Dehydroxy-isocalamendiol
45	62.902	1.15	.gamma.-Eudesmol
46	63.086	0.23	6,11-Undecadiene, 1-acetoxy-3,7-dimethyl-
47	63.358	3.48	.alpha.-Cadinol
48	63.594	2.41	Eudesm-4(14)-en-11-ol
49	63.714	1.41	.alpha.-Eudesmol
50	63.845	2.85	.alpha.-Cadinol
51	63.984	0.26	Diepicedrene-1-oxide
52	64.294	0.78	Bulnesol
53	65.331	6.14	Shyobunol
54	67.763	0.73	Isocalamenediol
55	69.810	0.29	.gamma.-Gurjunene
		100.00	

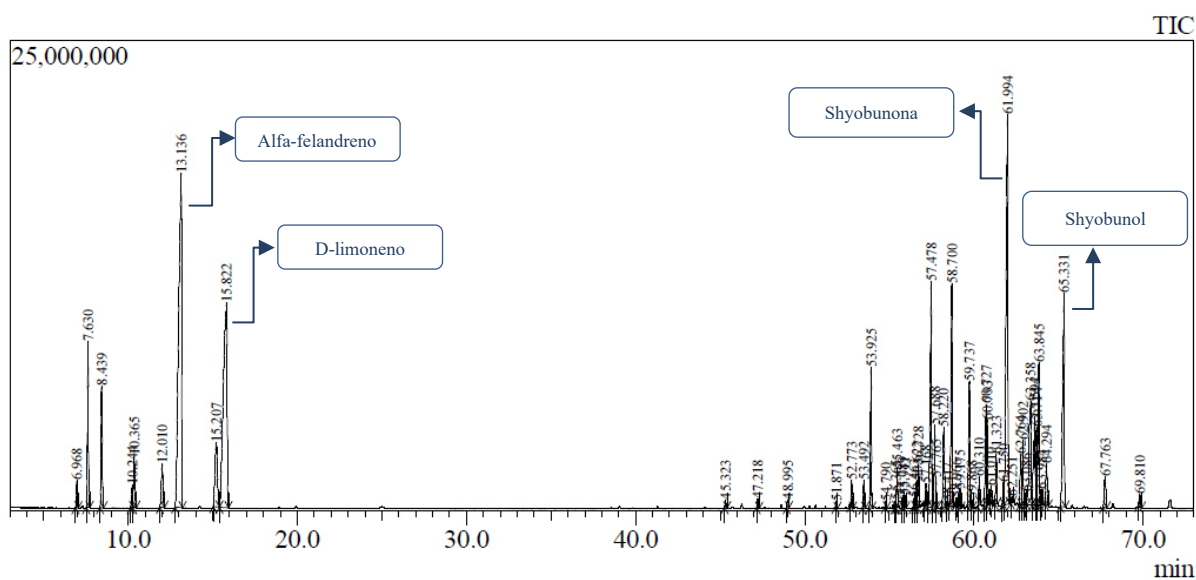


Figura 12. Cromatograma de los componentes del aceite esencial de *Schinus areira* L. "molle".

V.4. Actividad antimicrobiana

V.4.1. Método difusión en agar

Los resultados mediante el método de difusión en agar se muestran en la Tabla 8 y las figuras 13-16

Tabla 8. Valores promedio de los halos de inhibición del aceite esencial de *Schinus areira* L. "molle" frente a bacterias gram+ y gram-

MICROORGANISMOS	HALOS DE INHIBICIÓN (mm)*				
	<i>Schinus areira</i> L. "molle"				
	Aceite esencial 10 %	Aceite esencial 50 %	Aceite esencial 95 %	Ciprofloxacino	DMSO
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	10,00 ± 0	16,33 ± 1,15	18,00 ± 0	52,00 ± 0	10,00 ± 0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	10,00 ± 0	10,00 ± 0	10,00 ± 0	39,00 ± 0	10,00 ± 0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	16,33 ± 0,58	16,67 ± 0,58	19,00 ± 1,00	32,00 ± 0	10,00 ± 0
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	13,00 ± 0	14,33 ± 0,58	14,67 ± 0,58	42,00 ± 0	10,00 ± 0

*Los resultados se expresan en Promedio ± Desviación estándar.

*El diámetro de los pocillos en agar miden 10 mm y los halos de inhibición fueron medidos con vernier

- Bacterias gramnegativas: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

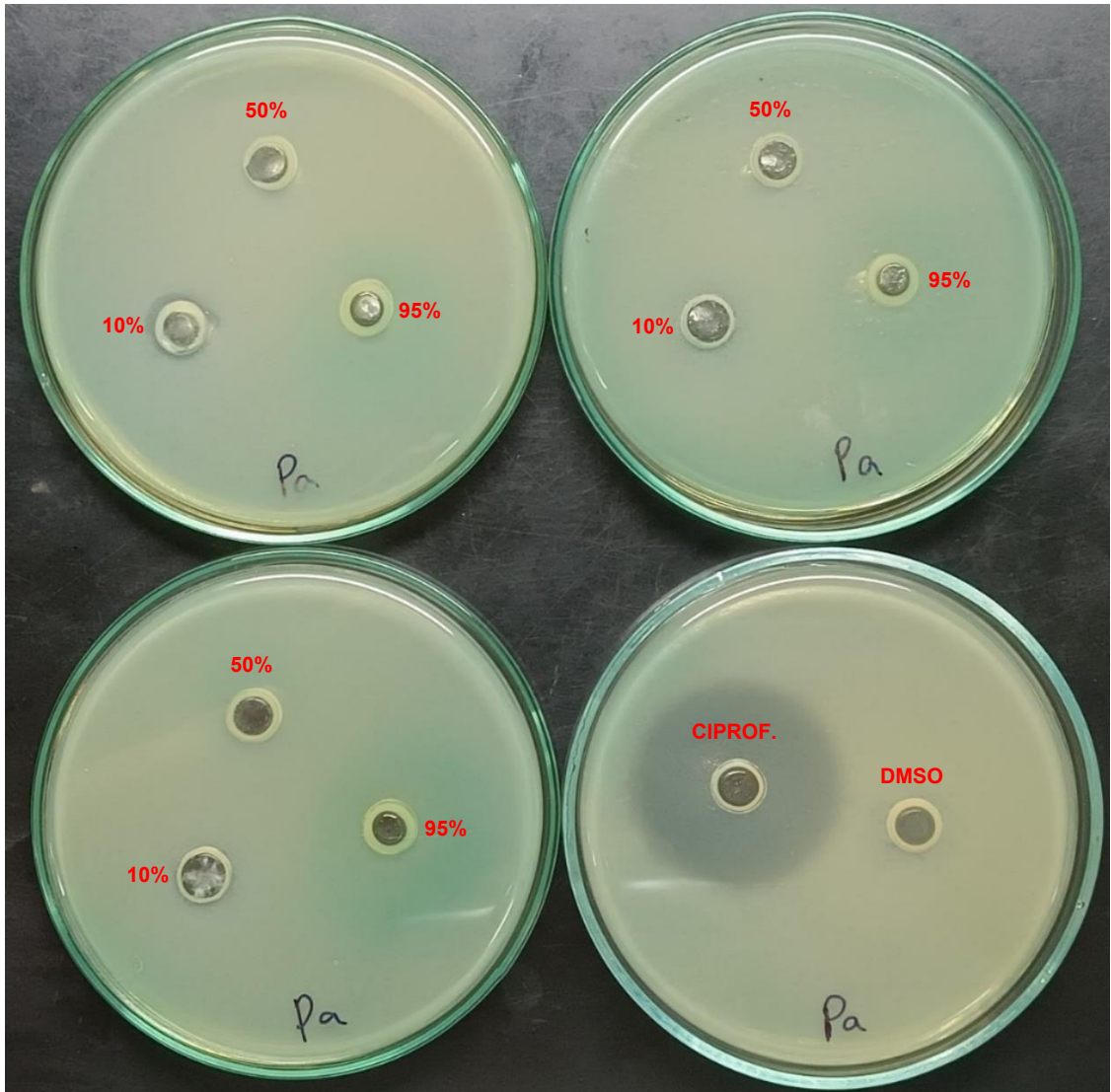


Figura 13. Halos de inhibición en *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 frente a distintas concentraciones del aceite esencial de *Schinus areira* L. "molle": 10%, 50% y 95%. Control positivo: Ciprofloxacino 0,05mg/mL (CIPROF) y diluyente utilizado Dimetilsulfóxido (DMSO).

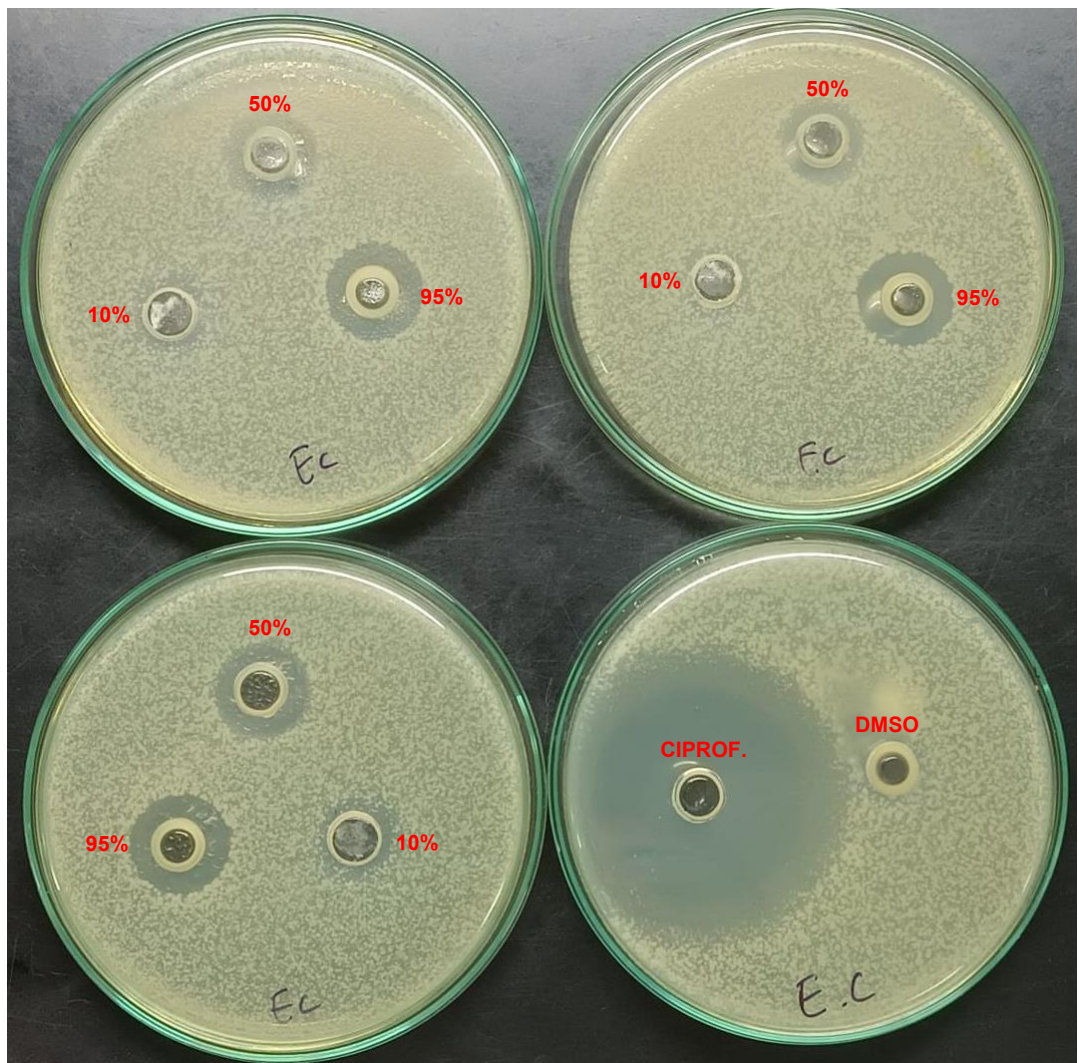


Figura 14. Halos de inhibición en *Escherichia coli* ATCC 25922 frente a distintas concentraciones del aceite esencial de *Schinus areira* L. "molle": 10%, 50% y 95%. Control positivo: Ciprofloxacino 0,05mg/mL (CIPROF) y diluyente utilizado Dimetilsulfóxido (DMSO).

- Bacterias grampositivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633

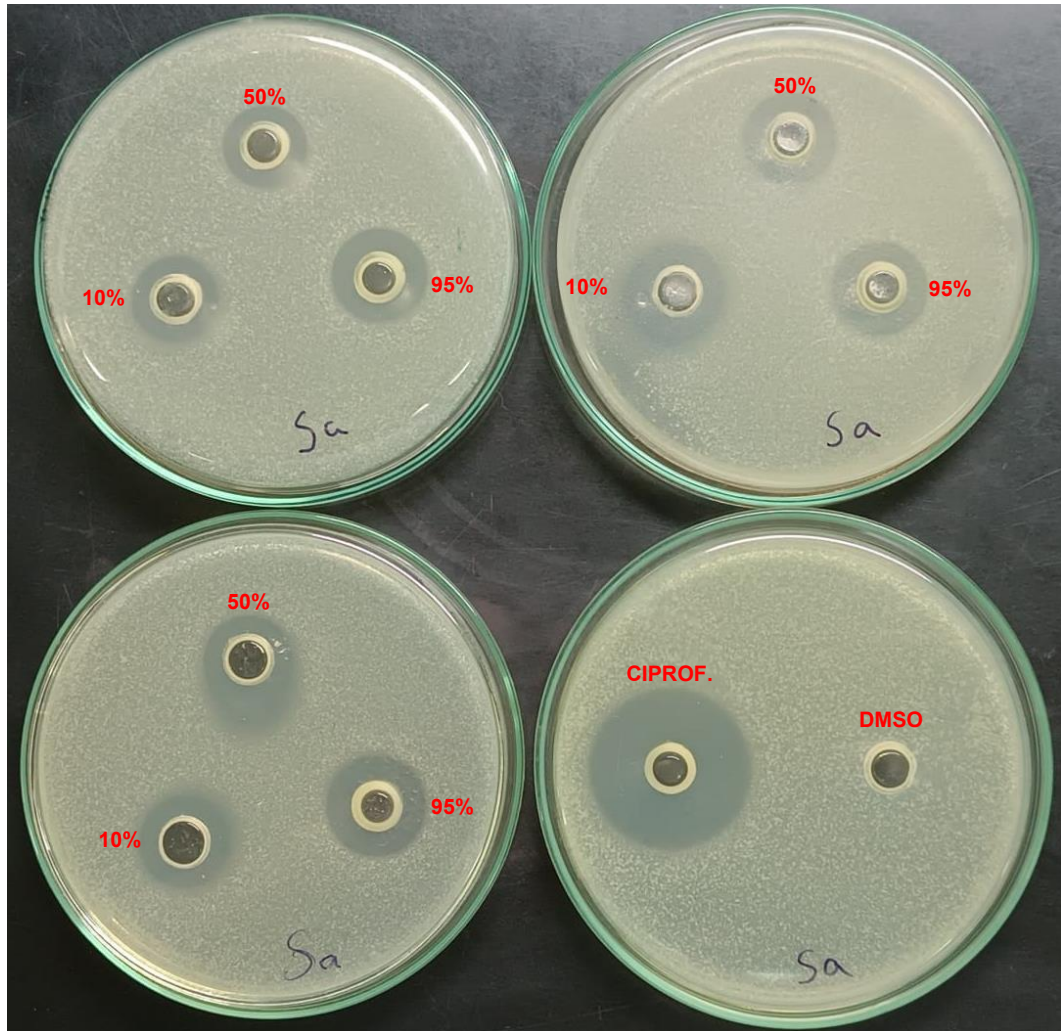


Figura 15. Halos de inhibición en *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 frente a distintas concentraciones del aceite esencial de *Schinus areira* L. “molle”: 10%, 50% y 95%. Control positivo: Ciprofloxacino 0,05mg/mL (CIPROF) y diluyente utilizado Dimetilsulfóxido (DMSO).

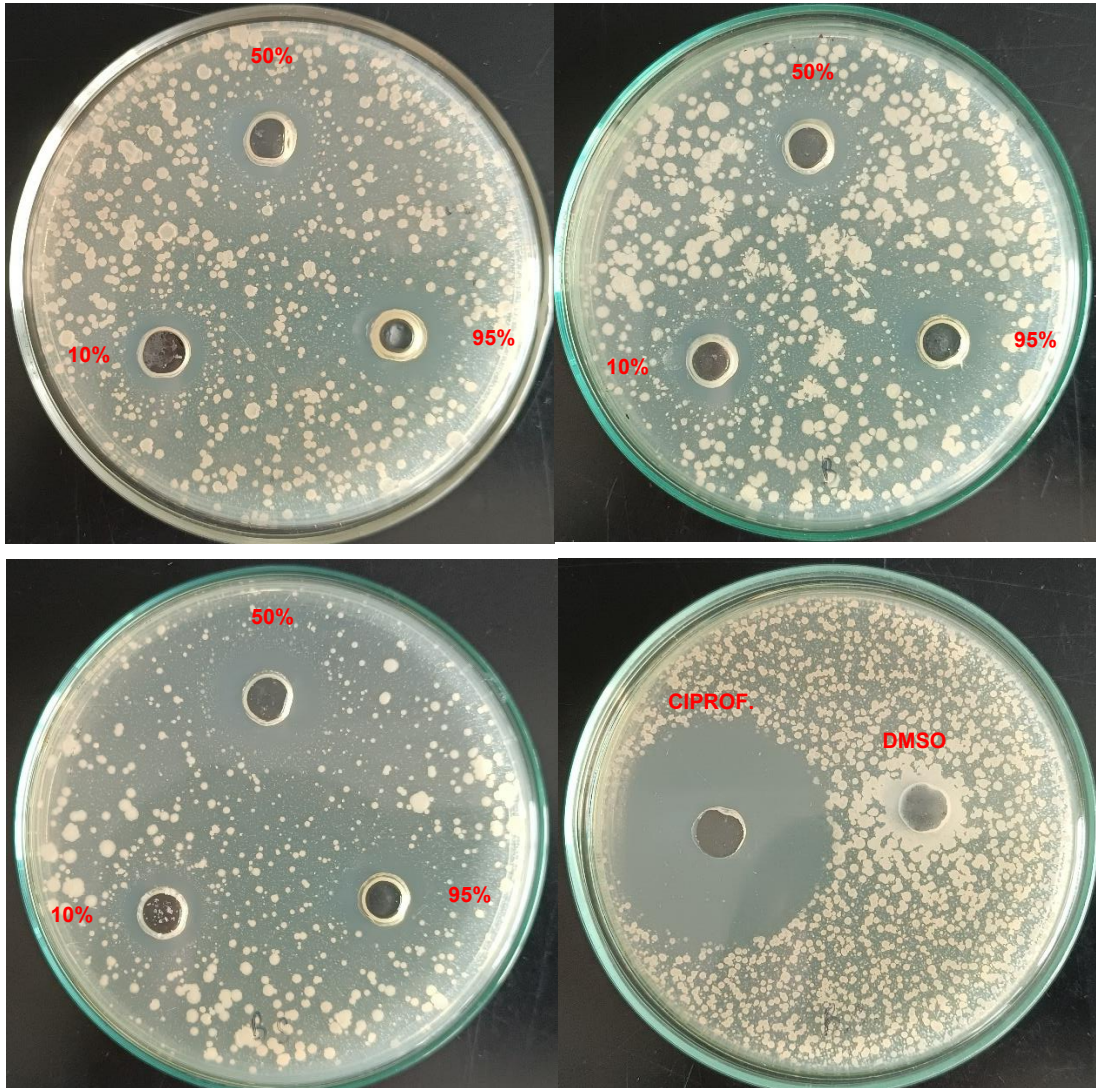


Figura 16. Halos de inhibición en *Bacillus subtilis* ATCC 6633 frente a distintas concentraciones del aceite esencial de *Schinus areira* L. "molle": 10%, 50% y 95%. Control positivo: Ciprofloxacino 0,05mg/mL (CIPROF) y diluyente utilizado Dimetilsulfóxido (DMSO).

V.4.2. Método microdilución colorimétrica en microplaca

- Microdilución en bacterias gramnegativas: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853: en la Figura 17 se muestra la microplaca de las bacterias gramnegativas con el indicador resazurina (coloración azul) antes de su incubación, posteriormente en la Figura 18 se observa el cambio de coloración indicando que el aceite esencial de *Schinus areira* L. “molle” no tiene actividad antimicrobiana para *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

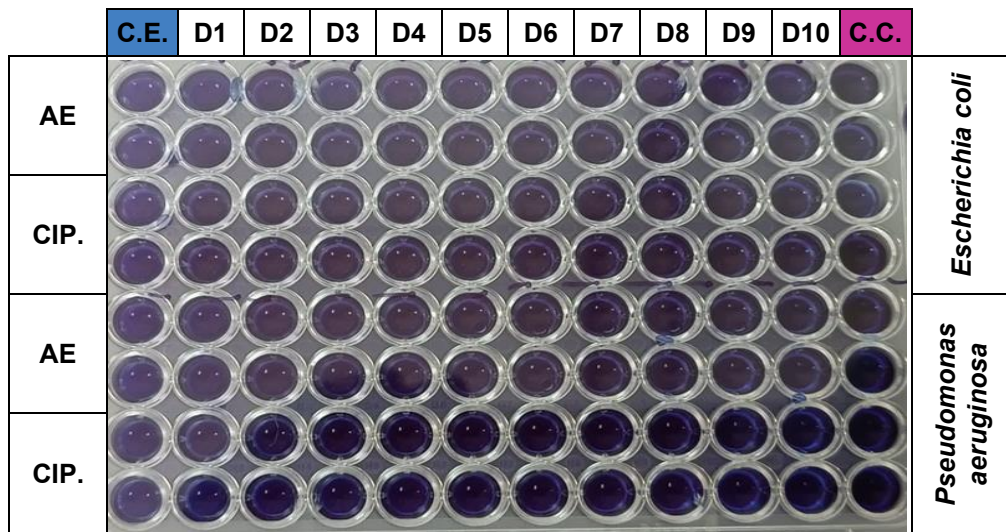


Figura 17. Microplaca de bacterias gramnegativas antes de incubar x 24h a 37°C

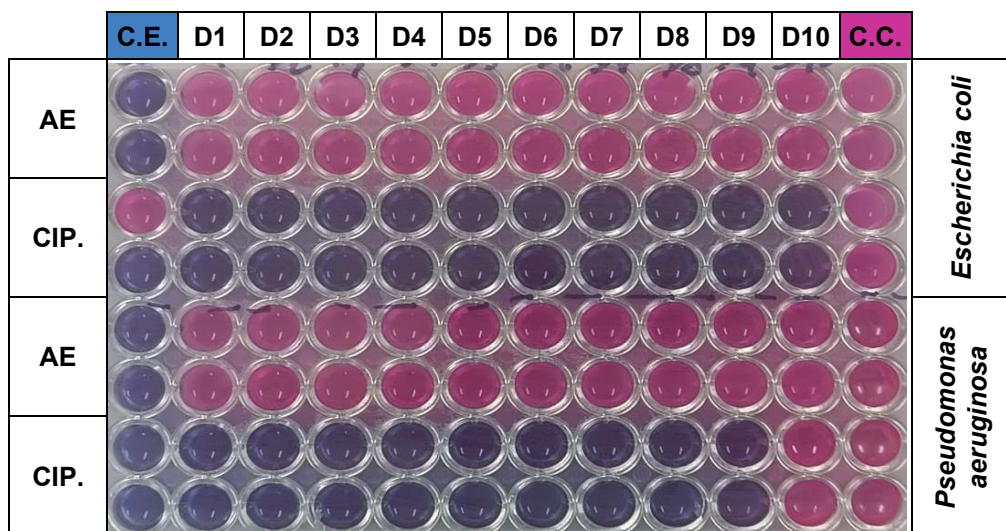


Figura 18. Microplaca de bacterias gramnegativas después de incubar x 24h a 37°C.

- Microdilución en bacterias grampositivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633: en la Figura 19 se muestra la microplaca de las bacterias grampositivas con el indicador resazurina (coloración azul) antes de su incubación, posteriormente en la Figura 20 se detectó actividad antimicrobiana por parte del aceite esencial de *Schinus areira* L. “molle” contra *Staphylococcus aureus* hasta la Dilución 5 (D5) indicando un CMI = $278,13 \pm 0 \mu\text{g/mL}$. Sin embargo, no se observó actividad antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*.

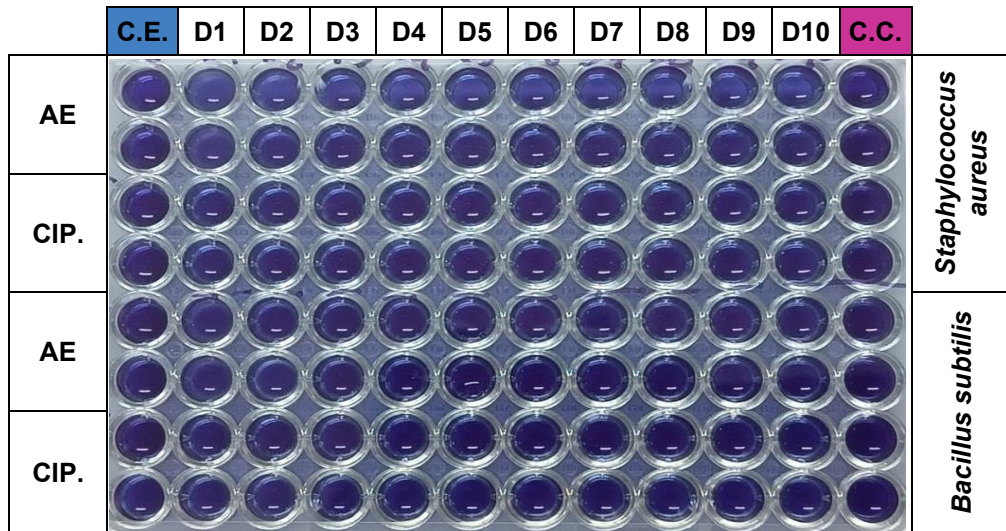


Figura 19. Microplaca de bacterias grampositivas antes de incubar por 24h a 37°C.

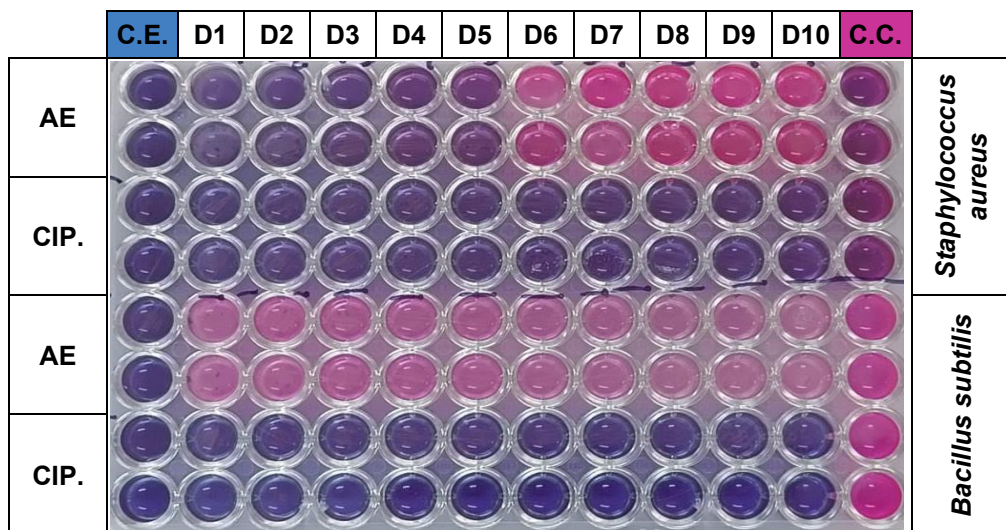


Figura 20. Microplaca de bacterias grampositivas después de incubar por 24h a 37°C

VI. DISCUSIÓN

Schinus areira L. "molle" es una especie perteneciente al género *Schinus*, de la Familia Anacardiaceae. Es nativa de Perú, Chile y Bolivia, y se encuentra distribuido en países como Colombia, Uruguay, Paraguay y el norte de Argentina ^{69,70}. Distintas poblaciones han hecho uso medicinal de este árbol, y sus partes (hojas, frutos, tallos) utilizadas para distintos problemas de salud como reumatismo, infecciones bronquiales, hipertensión y entre otros a través de infusiones, bebidas o tópicos. Se ha reportado pocos estudios sobre la actividad antimicrobiana de *Schinus areira* L. "molle" en Perú ⁷³ y gran parte de ellos provienen de Argentina ^{71,72,74,75,76,77}. Por ello el presente trabajo pretende contribuir con el conocimiento sobre esta especie y sus posibles efectos antimicrobianos.

La muestra fue colectada en agosto en la provincia Huari del departamento de Ancash, y su aceite esencial fue extraído por el método extracción por arrastre de vapor. La cantidad obtenida del aceite esencial fue de 18,5 mL para 3,25 kg de hojas, su rendimiento de 0,6 %, el cual es semejante a lo obtenido en Jujuy-Argentina por Celaya *et al.* ⁷² quienes obtuvieron rendimientos de 0,49 % y 0,52 % de muestras en diferentes regiones, sin embargo, se debe mencionar que la extracción del aceite esencial se desarrolló mediante destilación con equipo clevenger. Así mismo, Solis *et al.* ⁷³ usando el método de hidrodestilación con equipo Clevenger (Cuzco-Perú) obtuvieron un rendimiento de 0,15 %, un valor muy bajo comparado con los demás estudios de la misma especie. Otros autores obtuvieron rendimientos mayores, por ejemplo, Cutro *et al.* ⁷⁴ y Murray *et al.* ⁷⁵ reportaron rendimientos de 1,08 y 2,22 % respectivamente. Este último rendimiento es el mayor valor que se encontró en la literatura respecto a esta especie, sin embargo, esto es debido a que la extracción se realizó con hojas, ramas y frutos. Estas diferencias de rendimiento están influidas por diversos factores como la humedad, el proceso de secado, el periodo de recolección⁷⁹.

El análisis de la composición química del aceite esencial se realizó por GC-MS mostró como componentes principales alfa-felandreno (15,94 %), D-limoneno (12,67 %), shyobunona (11,31 %) y shyobunol (6,14 %). Los mismos componentes de mayor porcentaje fueron encontrados en otros trabajos tal como lo detalla Solis

*et al.*⁷³ y Rodríguez *et al.*⁷⁶, quienes obtuvieron como componente mayoritario a alfa-felandreno (18,2 %) seguido de limoneno (9,4 %) y alfa-felandreno (16,18 %), respectivamente. Al igual que Murray *et al.*⁷⁵ quienes identificaron como componentes mayoritarios 2 monoterpenos hidrocarbonados los cuales fueron Limoneno (28,61 %) y alfa-felandreno (10,11 %).

Por otro lado, Celaya *et al.*⁷² determinaron la composición química de 2 árboles en Jujuy y cuyos componentes mayoritarios fueron limoneno (15,5 %) y biciclogermacreno (12,3 %) para el espécimen en Chilcayoc, y alfa-felandreno (24,7 %) y β -felandreno (13 %) para el espécimen en Tilcara. Así mismo, Bigliani *et al.*⁷⁷ identificaron como componentes mayoritarios alfa-pineno (13,80 %) y limoneno (12,81 %). También se reportaron otros componentes mayoritarios tal como lo menciona Cutro *et al.*⁷⁴ quienes identificaron 1-epi-cadinol como el compuesto más representativo (34,6 %), seguido del δ -cadineno (15,52 %) y aloaromadendreno (6,99 %) en Santiago de Estero - Argentina.

La variabilidad de componentes y sus respectivos porcentajes, son producto de la exposición a diversos factores como el método de extracción y la temperatura, así mismo, estos determinan la calidad del aceite esencial, ya que al manejarlo de manera errónea es posible que también se altere el tipo componentes químicos y por consiguiente su actividad. Por último, existen otros factores externos al obtener el aceite esencial que se deben tener en consideración como el periodo de recolección dependiendo de la estación, tipo de solventes, órgano de la planta, etc.^{79,80}

Entre los métodos más usados para cuantificar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, se encuentran la difusión en disco y/o excavaciones en placa, y las de diluciones cuantitativas (microdilución).

Respecto al método por difusión en agar, se trabajó el aceite esencial de *Schinus molle* L. "molle" a 3 concentraciones (10, 50 y 95 %). El aceite esencial al 10 % no mostró actividad antimicrobiana significativa contra *Staphylococcus aureus* (16,33 \pm 0,58 mm), *Bacillus subtilis* (13,33 \pm 0,58 mm), *E. coli* (10,00 \pm 0 mm) y *P. aeruginosa* (10,00 \pm 0 mm). Respecto a la concentración de 50 %, no mostró actividad antimicrobiana significativa contra *Staphylococcus aureus* (16,67 \pm 0,58 mm), *Bacillus subtilis* (14,33 \pm 0,58 mm), *Escherichia coli* (16,33 \pm 1,15 mm) y

Pseudomonas aeruginosa (10,00 ± 0 mm). Por último, el aceite esencial 95% mostró actividad antimicrobiana significativa contra *Staphylococcus aureus* (19,00 ± 1,00 mm) y *Escherichia coli* (18,00 ± 0 mm).

Rouibi *et al.* ⁸¹ determinaron la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Schinus molle* a distintas concentraciones (100, 50, 25, 12,5 y 6,25 %), por el método de difusión en agar y basándose en los parámetros de la farmacopea europea para determinar su actividad con los halos de inhibición. El aceite esencial de las hojas de *Schinus molle* mostró actividad moderada contra *Bacillus subtilis* a partir de la concentración de 12,5 % (18 mm), *Staphylococcus aureus* a partir de 25 % (16 mm) y *Candida albicans* a partir de 12,5 % (16 mm). Los autores sugieren esta actividad posiblemente atribuida a sus componentes mayoritarios alfa-felandreno (24,32 %), limoneno (21,62 %).

Respecto al tamaño del halo de inhibición, Pauli ⁸² menciona que estos se encuentran influenciados por diversos factores como el contenido del agar, volumen del agar, las cepas utilizadas y pH. Por ejemplo, en cuanto a este último factor, Juven *et al.* ⁸³ informaron que el efecto inhibitorio del timol es mayor a un pH de 5,5 que 6,5 y esto es debido a que la molécula no se disocia en valores bajos de pH y por consiguiente se une a moléculas hidrófobas. Asimismo, es importante mencionar que los valores de los halos de inhibición tienen cierta importancia relativa debido a que es imposible determinar la cantidad exacta de aceite esencial que ha difundido en el agar. Es por ello que el método de difusión en agar, aunque no sea exacto, debe considerarse como un ensayo previo y complementarlo con ensayos como microdilución por colorimetría ya que son más confiables y puede ser cuantificable ⁸⁴.

En cuanto al método Microdilución colorimétrica, el aceite esencial de *Schinus areira* L. "molle" se trabajó frente a 4 bacterias: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*. Luego de la incubación por 24 h a 37°C, el aceite esencial de *Schinus areira* L. "molle" mostro actividad antimicrobiana moderada contra *Staphylococcus aureus* (278 µg/mL), por otro lado, no se observó actividad antimicrobiana frente a *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Otros estudios también reportaron actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, tal como lo menciona Celaya *et al.* ⁷² quienes analizaron 2 especímenes de *S. aureus*, en Chilcaya y Tilcara tanto de frutos como de hojas. El aceite esencial de hojas del espécimen en Chilcaya obtuvo un CMI de 10 µL/mL, y de Tilcara se obtuvo un CMI de 6 µL/mL. Este último valor también se obtuvo para el aceite esencial de los frutos de cada espécimen. Los autores sugieren que su actividad pueda deberse a la presencia de componentes mayoritarios como el limoneno y alfa-felandreno. De igual manera, Cutro *et al.* ⁷⁴ determinaron el CMI del aceite esencial de *S. aureus* contra *Staphylococcus aureus* donde se obtuvo un valor de CMI igual a 64 µg/mL y que posiblemente esta actividad se sea a la presencia del componente mayoritario 1 epi-cadinol (34,6 %).

Por otro lado, Cutro *et al.* ⁸⁵ trabajaron en la formulación de nanopartículas con plata (AgNPs) en base al aceite esencial de *Schinus molle* y su actividad contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Se trabajó tanto con aceite esencial puro como con AgNPs. El aceite esencial puro no mostró actividad contra *E. coli*, sin embargo, se obtuvo un CMI de 0,3 mg/mL para *Staphylococcus aureus*. Respecto a los AgNPs de aceite esencial de *Schinus molle*, se obtuvo un CMI de 6,68 µg/mL para *E. coli* y 3,4 µg/mL contra *Staphylococcus aureus*. Si bien es cierto, se pudo observar mayor actividad con las formulaciones de nanopartículas de plata a base del aceite esencial; los autores mencionan que esto podría deberse a que los componentes del recubrimiento incrementan la actividad antimicrobiana del aceite esencial y sugieren este método como una alternativa para reducir las dosis del aceite esencial e incrementar su estabilidad a largo plazo.

Asimismo, se ha observado que el método de extracción puede influir en la actividad antimicrobiana tal como lo ha demostrado un estudio realizado en Sudáfrica por Okoh *et al.* ⁷⁸, en este caso la extracción por microondas sin disolvente obtuvo mejores resultados de CMI en bacterias grampositivas, *Staphylococcus aureus* (0,47 mg/mL) y *Bacillus subtilis* (1,88 mg/mL), comparado con el método de hidrodestilación con el cual se obtuvo valores de 3,75 mg/mL y 1,88 mg/mL, respectivamente. Los autores atribuyen que este impacto posiblemente tenga que ver con la producción de mayores compuestos oxigenados en la extracción.

Hay que agregar que existen diversos métodos para determinar la actividad antimicrobiana y su mecanismo de acción. Es posible verificar el mecanismo de acción del aceite esencial evidenciando la permeabilización de la membrana bacteriana tal como lo hicieron Lambert *et al.*⁸⁴, quienes mediante la tinción nuclear con fluorescente de bromuro de etidio, el cual identifica bacterias muertas o con la membrana afectada con fluorescencia. Los autores documentaron el daño de la membrana (90 % de las bacterias fluorescentes) que provocó el aceite esencial de orégano 0,1 % cuyos componentes principales fueron el timol y carvacrol.

Otra forma de medir el impacto del aceite esencial sobre las bacterias y su posible mecanismo de acción, es midiendo el pH del medio o también su potencial Z⁸⁶. Como lo realizó Cutro *et al*⁷⁴, quienes identificaron cambios en el potencial Z sobre las bacterias *Staphylococcus aureus*, lo cual puede atribuirse a distintos componentes encontrados en el aceite esencial, entre ellos el que destaca es el 1-epi-cadinol con 34,6 %.

A pesar de que se ha informado que la actividad antimicrobiana de un aceite esencial se debe a sus componentes mayoritarios, otros autores sostienen que esta actividad no depende de la proporción de los componentes de un aceite esencial sino también de la sinergia que existe entre ellos y los componentes de menor cantidad. García- García *et al.*⁸⁷ identificaron la combinación binaria sinérgica con mayor actividad contra *L. innocua*. el cual fue carvacrol y timol, sin embargo, la combinación ternaria más efectiva fue carvacrol, timol y eugenol. Por otro lado también es importante mencionar la existencia de un efecto antagónico de los componentes de menor proporción ya que el aceite esencial en sí puede ser menos efectivo que usar solamente el compuesto principal del mismo⁸⁸.

VII. CONCLUSIONES

- El aceite esencial de *Schinus areira* L. "molle" presenta una densidad relativa de 0,89 y un rendimiento de 0,6 %.
- Se determinó la composición química del aceite esencial de *Schinus areira* L. "molle" mediante GC-MS y sus componentes mayoritarios fueron Alfa-felandreno (15,94 %), D-Limoneno (12,67 %), Shyobunona (11,31 %) y Shyobunol (6,14 %).
- En el método de difusión en agar, el aceite esencial de *Schinus areira* L. "molle" al 10 % y 50 % no presentó actividad antimicrobiana significativa contra las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli* y *P. aeruginosa*. Sin embargo, al 95 % se observó actividad antimicrobiana significativa contra *Staphylococcus aureus* ($19,00 \pm 1,00$ mm) y *Escherichia coli* ($18,00 \pm 0$ mm).
- En el método de microdilución colorimétrica, el aceite esencial de *Schinus areira* L. "molle" presentó actividad antimicrobiana moderada contra *Staphylococcus aureus* (CMI=278 µg/mL). Por otro lado, no se encontró actividad antimicrobiana frente a *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*.

VIII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda evaluar otras alternativas de extracción para obtener aceite esencial ya que existen factores intrínsecos del equipo y del método de extracción que influyen en el rendimiento y los tipos de componentes que se obtienen.
- Realizar ensayos para la determinación del mecanismo de acción del aceite esencial de *Schinus molle* L. “molle”.
- Continuar la investigación del presente trabajo y estudiar la misma especie pero proveniente de distintos lugares del Perú debido a la escasa información disponible.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Resistencia a los antimicrobianos [Internet]. Paho.org. [citado el 25 de junio de 2024]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/temas/resistencia-antimicrobianos>
2. Ahmed SK, Hussein S, Qurbani K, Ibrahim RH, Fareeq A, Mahmood KA, et al. Antimicrobial resistance: Impacts, challenges, and future prospects. *Journal of Medicine, Surgery, and Public Health* [Internet]. 2024;2(100081):100081. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.glmedi.2024.100081>
3. Barbieri R, Coppo E, Marchese A, Daglia M, Sobarzo-Sánchez E, Nabavi SF, et al. Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. *Microbiol Res* [Internet]. 2017;196:44–68. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2016.12.003>
4. Diaz L, Suarez Y, Rubio A, Travieso M. Actualidad y perspectivas de los antimicrobianos naturales News and perspectives of natural antimicrobials. *Revista Cubana de Farmacia* [Internet]. 2021. [Citado 01 de julio de 2024]; vol. 54(3),1-22. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revcubfar/rcf-2021/rcf213i.pdf>
5. Yadav H, Mahalvar A, Pradhan M, Yadav K, Kumar Sahu K, Yadav R. Exploring the potential of phytochemicals and nanomaterial: A boon to antimicrobial treatment. *Med Drug Discov* [Internet]. 2023;17(100151):100151. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.medidd.2023.100151>
6. Rubio-Ortega A, Travieso-Novelles M, Riverón-Alemán Y, Martínez-Vasallo A, Peña-Rodríguez J, Espinosa-Castaño I, et al. Actividad antibacteriana de aceites esenciales de plantas cultivadas en Cuba sobre cepas de *Salmonella enterica*. *Rev Salud Anim* [Internet]. 2018 [citado el 1 de julio de 2024];40(3). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2018000300004&lng=es
7. Diaz MR, Rebolledo V. Descubriendo la nobleza del molle, un árbol de nuestra América. *Cuad Méd Soc* [Internet]. 2021. [citado 03 de noviembre de

- 2024];61(2):111–4. Disponible en:
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=9510073>
8. Ruiz A, Inés, Mercado, Guantay, Ponessa G. Lilloa. Morfoanatomía y arquitectura foliar de *Schinus areira* (Anacardiaceae) [Internet]. 2009 [citado 01 de noviembre de 2024];46(1-2):137–46. Disponible en:
https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/76629/CONICET_Digital_Nro.7e22c163-6335-4d8b-a0fe-b59caf91604b_A.pdf?sequence=2
 9. Murray AP, Murray MG. Phytochemistry, Traditional Uses and Bioactivity of the Medicinal Plant *Schinus areira* L. (Anacardiaceae): A Review. The Natural Products Journal [Internet]. 2017 [citado 29 de octubre de 2024];7:1–7. Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/316359218_Phytochemistry_Traditional_Uses_and_Bioactivity_of_the_Medicinal_Plant_Schinus_areira_L_Anacardiaceae_A_Review
 10. ZAPATER MA, AQUINO VH, FLORES CB, LOZANO EC. Clarificaciones nomenclaturales y circunscripción taxonómica de *Schinus areira* (anacardiaceae) en Argentina. Bol Soc Argent Bot [Internet]. 2018 [Citado 22 de octubre de 2024];53(4):665–71. Disponible en:
<https://revistas.psi.unc.edu.ar/index.php/BSAB/article/view/21987/21616>
 11. *Schinus areira* L. [Internet]. Worldfloraonline.org. 2024 [citado 22 de diciembre de 2024]. Disponible en:
<https://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0001051003#B>
 12. Oussalah M, Caillet S, Lacroix M. Mechanism of Action of Spanish Oregano, Chinese Cinnamon, and Savory Essential Oils against Cell Membranes and Walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection. 2006 [citado 15 de noviembre de 2024];69(5):1046–55. Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/7065556_Mechanism_of_Action_of_Spanish_Oregano_Chinese_Cinnamon_and_Savory_Essential_Oils_against_Cell_Membranes_and_Walls_of_Escherichia_coli_O157H7_and_Listeria_monocytogenes

13. Leite E, Carneiro J, Vasconcelos C, y Lúcia M. Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*. *Revista Internacional de Microbiología de Alimentos* [internet]. 2010 [citado 10 de febrero de 2025]; 137:308–311. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160509006199>
14. Caillet S, Ursachi L, Shareck F, Lacroix M. Effect of gamma radiation and oregano essential oil on murein and ATP concentration of *Staphylococcus aureus*. *Journal of food science* [Internet]. 2009 [citado 10 de febrero de 2025];74(9):M499-508. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20492121/>
15. Burt SA, van der Zee R, Koets AP, de Graaff AM, van Knapen F, Gaastra W, et al. Carvacrol Induces Heat Shock Protein 60 and Inhibits Synthesis of Flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology* [internet]. 2007 [citado 10 de febrero de 2025];73(14):4484–90. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17526792/>
16. Álvarez-Martínez FJ, Barrajon-Catalán E, Herranz-López M, Micol V. Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action. *Phytomedicine* [Internet]. 2021[Citado 3 de noviembre de 2024]; 90(153626):1-16. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711321001690>
17. Faleiro M. The mode of antibacterial action of essential oils [Internet]. Disponible en: <https://dsagrow.com/wp-content/uploads/2020/05/The-mode-of-antibacterial-action-of-essential-oils.pdf>
18. Ultee A, Kets EPW, Smid EJ. Mechanisms of Action of Carvacrol on the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* [internet]. 1999 [citado 11 de febrero de 2025];65(10):4606–10. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10508096/>
19. Ultee A, Bennik MHJ, Moezelaar R. The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* [internet]. 2002 [citado 11

- de febrero de 2025];68(4):1561–8. Disponible en <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.68.4.1561-1568.2002>
20. Saad NY, Muller CD, Lobstein A. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal* [Internet]. 2013 [cited 11 de febrero de 2025];28(5):269–79. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ffj.3165>
21. Dorman HJ, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* [Internet]. 2000 [11 de febrero de 2025];88(2):308–16. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10736000/>
22. Murray AP, Rodriguez S, Alza N. Chemical Constituents and Biological Activities of Plants from the Genus *Schinus*. *Ethnomedicine and Therapeutic Validation* [Internet]. 2012 [citado 13 de noviembre de 2024]. 32: 261–87. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/249335721_Chemical_Constituents_and_Biological_Activities_of_Plants_from_the_Genus_Schinus
23. Cutro A, Coria S, Bordon A, Rodriguez S, Hollmann A. Antimicrobial properties of the essential oil of *Schinus areira* (Aguaribay) against planktonic cells and biofilms of *S. aureus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*[internet]. 2023; 744. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003986123001698>
24. Rebolledo V, Otero M, Delgado J, Torres F, Herrera M, Ríos M, et al. Phytochemical profile and antioxidant activity of extracts of the peruvian peppertree *Schinus areira* L. from Chile. *Saudi Journal of Biological Sciences* [Internet]. 2021; 28(1):1052–62. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X20305295>
25. Cutro AC, Castelli MV, López SN, Rosales MA, Hollmann A, Rodriguez SA. Chemical composition of *Schinus areira* essential oil and antimicrobial action against *Staphylococcus aureus*. *Natural Product Research* [Internet]. 2019. [citado 22 de enero de 2025];35(17):2931–6. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14786419.2019.1675065>

26. Do Prado AC, Garces HG, Bagagli E, Rall VLM, Furlanetto A, Fernandes Junior A, et al. *Schinus molle* essential oil as a potential source of bioactive compounds: antifungal and antibacterial properties. J Appl Microbiol [Internet]. 2019;126(2):516–22. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/jam.14157>
27. Ruiz J, Salazar M. Composición química y actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *Citrus paradisi*, *Juglans neotropica* DIEELS, *Schinus molle* Y *Tagetes elliptica* SMITH. Rev Soc Quím Perú [Internet]. 2021. [Citado 23 de junio de 2024]; 87(3), 228-241. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v87n3/2309-8740-rsqp-87-03-228.pdf>
28. Aparicio M. Evaluación del efecto antimicrobiano *in vitro* de los aceites esenciales de muña (*Minthostachys mollis*), molle (*Shinus molle*) y limón sutil (*Citrus aurantifolia*) frente a aislados patogénicos de *Aeromonas spp.* procedentes de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) cultivadas en el Perú. [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2022. Disponible en: <https://repositorio.upch.edu.pe/handle/20.500.12866/12961>
29. Velásquez M. Efecto antimicrobiano *in vitro* del AE de frutos de *Schinus molle* L. (Molle) frente a *Streptococcus mutans* y *Candida albicans*. [Tesis de Grado]. Arequipa: Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa; 2021. Disponible en: <https://repositorio.unsa.edu.pe/server/api/core/bitstreams/e91c5e13-f001-4da5-a4d4-403707d20159/content>
30. Ramírez R, Soto R. Determinación de la actividad antibacteriana de manera *in vitro* del AE de la *Schinus molle* frente a cepas de *Escherichia coli*. [Tesis de Grado]. Lima: Universidad Inca Garcilazo de la Vega; 2018. Disponible en: <http://repositorio.uigv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.11818/2891/TESIS%20SOTO%20MACETAS%20RUDYRAMIREZ%20HERESIA%20ROSA.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
31. Requejo E. Actividad antibacteriana *in vitro* del AE de las hojas de *Schinus molle* L. (Molle) frente a cultivos de *Staphylococcus aureus*. [Tesis de Grado].

- Trujillo: Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote; 2018. Disponible en: https://repositorio.uladech.edu.pe/bitstream/handle/20.500.13032/9012/AC EITE_ANTIBACTERIANO_REQUEJO_QUISPE_ENRIQUE_EMANUEL.pdf?sequence=1&isAllowed=y
32. Pacheco K, Lázaro M. Caracterización química y efecto antimicrobiano del AE de molle (*Schinus molle* L.) obtenido por el método de arrastre con vapor. [Tesis de Grado]. Callao: Universidad Nacional del Callao; 2017. Disponible en: https://repositorio.unac.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12952/3613/Pacheco%20Huaman%20y%20Lazaro%20Llacua_titulo%20quimica_2017.pdf?sequence=1
33. Solis-Quispe L, Tomaylla-Cruz C, Callo-Choquelvica Y, Solís-Quispe A, Rodeiro I, Hernández I, et al. Chemical composition, antioxidant and antiproliferative activities of essential oil from *Schinus areira* L. And *Minthostachys spicata* (Benth.) Epl. grown in Cuzco, Perú. Journal of Essential Oil Research [internet]. 2015;28(3):234–40. Disponible en: <https://sci-hub.st/https://doi.org/10.1080/10412905.2015.1120691>
34. Morales N. Diferenciando Bacterias Gram Positivo (+) y Gram Negativo (-) Mediante Tinción de Gram [Internet]. Unidades de Apoyo para el Aprendizaje – CUAED/FES Iztacala - UNAM. 2015 [11 de febrero de 2025]. Disponible en: <https://uapa.cuaed.unam.mx/sites/default/files/minisite/static/35e41b8a-429d-4a41-a6e9-2e2c6a4e58b7/contenido/index.html>
35. Brooks GF, Al E. Jawetz, Melnick and Adelberg's Microbiología médica. New York, N.Y. Etc.: Mcgraw-Hill Medical; 2010. Pag 45
36. Laiju Kuzhuppillymyal-Prabhakarankutty, Adrián Martínez-Meléndez, Cruz-López F. Los metabolitos secundarios como agentes antimicrobianos. Biología y Sociedad [Internet]. 2023. [citado 22 de diciembre de 2024];6(12):33–40. Disponible en: <https://www.semanticscholar.org/paper/Los-metabolitos-secundarios-como-agentes-Kuzhuppillymyal-Prabhakarankutty-Mart%C3%ADnez-Mel%C3%A9ndez/6558d2bc32c52a185e1d18e198e6ef94643d1074>

37. AlSheikh HMA, Sultan I, Kumar V, Rather IA, Al-Sheikh H, Tasleem Jan A, et al. Plant-Based Phytochemicals as Possible Alternative to Antibiotics in Combating Bacterial Drug Resistance. *Antibiotics* [Internet]. 2020 [citado 22 de diciembre de 2024];9(8):480. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32759771/>
38. Haines RR, Putsathit P, Tai AS, Hammer KA. Antimicrobial effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil against biofilm-forming multidrug-resistant cystic fibrosis-associated *Pseudomonas aeruginosa* as a single agent and in combination with commonly nebulized antibiotics. *Letters in Applied Microbiology*[Internet]. 2021 [citado 22 de diciembre de 2024];75(3):578-587. doi: [10.1111/lam.13589](https://doi.org/10.1111/lam.13589)
39. Chomel M et al. Plant secondary metabolites: a key driver of litter decomposition and soil nutrient cycling. Aerts R, editor. *Journal of Ecology* [internet]. 2016 [citado 22 de diciembre de 2024];104(6):1527–41. Disponible en: <https://besjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1365-2745.12644>
40. González Mera IF, González Falconí DE, Morera Córdova V. Secondary metabolites in plants: main classes, phytochemical analysis and pharmacological activities. *Bionatura* [internet]. 2019 [citado 08 de febrero de 2025];4(4):1000–9. Disponible en: <https://revistabionatura.org/files/2019.04.04.11.pdf>
41. Cowan MM. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews* [internet]. 1999. [Citado 25 de diciembre de 2024];12(4):564–82. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC88925/>
42. Viña S. CAPÍTULO 4 COMPUESTOS FENÓLICOS [Internet]. Disponible en: https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/112803/CONICET_Digital_Nro.e259c68c-8b9e-472f-a1d4-0281856594ea_Q.pdf
43. Cowan MM. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews* [internet]. 1999. [Citado 25 de diciembre de 2024];12(4):564–82. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC88925/>

44. Leonora Sánchez F, Figueroa G. Fitoquímica [Internet]. Disponible en: <https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/2022/Publicaciones/libros/cbiologia/Fitoquimica.pdf>
45. Gonzalez-Lopez A.M, Esmeralda E, Rincon-Enriquez G. 2016. Gonzalez et al., (terpenos) [Internet]. 2016. [citado 27 de diciembre de 2024];p. 33–49. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/328262044_2016_Gonzalez_et_al_terpenos
46. Cowan MM. Plant Products as Antimicrobial Agents. Clinical Microbiology Reviews [internet]. 1999. [Citado 25 de diciembre de 2024];12(4):564–82. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC88925/>
47. ALMEIDA-COUTO JMFD, RESSUTTE JB, CARDOZO-FILHO L, CABRAL VF. Current extraction methods and potential use of essential oils for quality and safety assurance of foods. Anais da Academia Brasileira de Ciências [Internet]. 2022 [revisado 03 de febrero de 2025];94(2). Disponible en: <https://www.scielo.br/j/aabc/a/x9Y74GcRLJkLpyGTqppqdNQN/>
48. Cerutti M, Neumayer F. INTRODUCCIÓN A LA OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN [Internet].2004 [citado 03 de febrero de 2025]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/3331453.pdf>
49. Stratakos AC, Koidis A. Chapter 4 - Methods for Extracting Essential Oils [Internet]. Preedy VR, editor. ScienceDirect. San Diego: Academic Press; 2016. p. 31–8. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780124166417000043>
50. Meléndez L, Manuel S, Cosío R. Procedimientos para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas. Proyecto Sagarpa Conacyt [Internet]. Disponible en: https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/540/1/rodriguez_m.pdf
51. Vanegas D, Abril-Novillo A, Khachatryan A, Jerves-Andrade L, Peña herrera E, Cuzco N, et al. Correction to: Validation of a method of broth microdilution for the determination of antibacterial activity of essential oils. BMC Research

- Notes [internet]. 2022 [citado 13 de febrero de 2025];15(1). Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8845352/>
52. Radka Hulankova. Methods for Determination of Antimicrobial Activity of Essential Oils In Vitro—A Review. Plants [Internet]. 2024 [citado 13 de febrero del 2025];13(19):2784–4. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2223-7747/13/19/2784>
53. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International Journal of Food Microbiology [Internet]. 2004 [citado 13 de febrero de 2025];94(3):223–53. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160504001680>
54. About CLSI: What CLSI Does for Clinical Laboratories [Internet]. Clinical & Laboratory Standards Institute. Disponible en: <https://clsi.org/about/>
55. Lovestead T, Urness K. Gas Chromatography -Mass Spectrometry (GC–MS) [Internet]. Disponible en: https://tsapps.nist.gov/publication/get_pdf.cfm?pub_id=926655
56. Leber A. Preparation of Routine Media and Reagents Used in Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical Microbiology Procedures Handbook [Internet]. 2016 [Citado 08 de febrero de 2025] ;1-3(4). Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1128/9781555818814.ch5.20.1>
57. Métodos in vitro - ECHA [Internet]. echa.europa.eu. Disponible en: <https://echa.europa.eu/es/support/registration/how-to-avoid-unnecessary-testing-on-animals/in-vitro-methods>
58. Kowalska-Krochmal B, Dudek-Wicher R. The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. Pathogens [Internet]. 2021 [citado 08 de febrero de 2025];10(2):165. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7913839/>
59. Vista de Composición química, actividad antibacteriana del aceite esencial de *Citrus sinensis* L. (Naranja dulce) y formulación de una forma farmacéutica. Ciencia e Investigación [Internet]. 2025 [citado 08 de febrero de 2025]. 13(1): 9-13. Disponible en: <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/3157/2643>

60. (841) Peso Especifico [Internet]. Usp.org. 2024 [citado 10 de febrero de 2025]. Disponible en: https://doi.usp.org/USPNF/USPNF_M99630_02_02.html
61. Hudzicki J. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol [Internet]. American Society for Microbiology; 2009. Disponible en: <https://asm.org/getattachment/2594ce26-bd44-47f6-8287-0657aa9185ad/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Protocol-pdf.pdf>
62. Pauli A. Anticandidal low molecular compounds from higher plants with special reference to compounds from essential oils. Medicinal Research Reviews [internet]. 2006 [Revisado 26 de enero de 2025]; 26(2): 223–68. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/med.20050>
63. Scorzoni L, Sangalli-Leite F, de Lacorte Singulani J, de Paula e Silva ACA, Costa-Orlandi CB, Fusco-Almeida AM, et al. Searching new antifungals: The use of in vitro and in vivo methods for evaluation of natural compounds. Journal of Microbiological Methods [internet]. 2016 [revisado 03 de febrero de 2025];123:68–78. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167701216300227>
64. Rojas R, Bustamante B, Bauer J, Fernández I, Albán J, Lock O. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. J Ethnopharmacol [Internet]. 2003;88(2–3):199–204. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-8741\(03\)00212-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-8741(03)00212-5)
65. Kowalska-Krochmal B, Dudek-Wicher R. The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. Pathogens [internet]. 2021 [revisado 24 de enero de 2025]; 10(2): 165. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7913839/>
66. Elshikh M, Ahmed S, Funston S, Dunlop P, McGaw M, Marchant R, et al. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. Biotechnol Lett. 2016; 38(6):1015-1019.
67. Liu M, Seidel V, Katerere DR, Gray AI. Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeasts. Methods

- [Internet]. 2007 [citado el 7 de julio de 2024];42(4):325–9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17560320/>
68. Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DA, Nakamura CV, Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 2002 [citado el 7 de julio de 2024];97(7):1027–31. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12471432/>
69. *Schinus areira* L. Plants of the World Online Kew Science [Internet]. Plants of the World Online. 2015 [Citado 24 de enero de 2025]. Disponible en: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:71006-1>
70. Zapater MA, Aquino VH, Flores CB, Lozano EC. Clarificaciones nomenclaturales y circunscripción taxonómica de *Schinus areira* (Anacardiaceae) en Argentina. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica [internet]. 2018 [citado 25 de enero de 2024];53(4):653–64. Disponible en: <https://doi.org/10.31055/1851.2372.v53.n4.21987>
71. Murray AP, Murray MG. Phytochemistry, Traditional Uses and Bioactivity of the Medicinal Plant *Schinus areira* L. (Anacardiaceae): A Review. The Natural Products Journal [Internet]. 2017 [citado 29 de octubre de 2024];7:1–7. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/316359218_Phytochemistry_Traditional_Uses_and_Bioactivity_of_the_Medicinal_Plant_Schinus_areira_L_Anacardiaceae_A_Review
72. Celaya LS, Alabrudzińska MH, Molina AC, Viturro CI, Moreno S. The inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by essential oils isolated from leaves and fruits of *Schinus areira* depending on their chemical compositions. Acta biochimica Polonica [Internet]. 2014 [citado 24 de enero de 2025];61(1):41–6. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24644552/>
73. Solís-Quispe L, Tomaylla-Cruz C, Callo-Choquelvica Y, Solís-Quispe A, Rodeiro I, Hernández I, et al. Chemical composition, antioxidant and antiproliferative activities of essential oil from *Schinus areira* L. And *Minthostachys spicata* (Benth.) Epl. grown in Cuzco, Perú. Journal of

- Essential Oil Research [internet]. 2015 [Citado 20 de enero de 2025];28(3):234–40. Disponible en: <https://scihub.st/https://doi.org/10.1080/10412905.2015.1120691>
74. Cutro AC, Castelli MV, López SN, Rosales MA, Hollmann A, Rodriguez SA. Chemical composition of *Schinus areira* essential oil and antimicrobial action against *Staphylococcus aureus*. Natural Product Research [internet]. 2019 [citado 25 de enero de 2025];35(17):2931–6. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31607170/>
75. Murray A, Frontera M, Tomas MA, Mulet M. Gas Chromatography-Mass Spectrometry Study of the Essential Oils of *Schinus longifolia* (Lindl.) Speg., *Schinus fasciculata* (Griseb.) I. M. Johnst., and *Schinus areira* L. Zeitschrift für Naturforschung C [internet]. 2005 [citado 24 de enero de 2025];60(1-2):25–9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15787239/>
76. Rodriguez S, Sueiro RA, Murray AP, Leiro JM. Bioactive Sesquiterpene Obtained from *Schinus areira* L. (Anacardiaceae) Essential Oil. The 23rd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry [Internet]. 2019 [06 de febrero de 2025];85: 1-12. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2504-3900/41/1/85>
77. Bigliani MC, Rossetti V, Grondona E, Silvina Lo Presti, Paglini PM, Rivero V, et al. Chemical compositions and properties of *Schinus areira* L. essential oil on airway inflammation and cardiovascular system of mice and rabbits. Food and Chemical Toxicology [internet]. 2012 [revisado 25 de enero de 2025];50(7):2282–8. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0278691512003092>
78. Okoh OO, Sadimenko AP, Afolayan AJ. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. Food Chemistry [internet]. 2010 [citado 04 de febrero de 2025];120(1):308–12. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814609011443>
79. Souiy Z. Essential Oil Extraction Process. Biochemistry. IntechOpen; 2024. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.113311>

80. Edris AE. Pharmaceutical and therapeutic Potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Research* [internet]. 2007 [Citado 24 de enero de 2025];21(4):308–23. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17199238/>
81. Rouibi A, Saidi F, Boutoumi H. IDENTIFICATION PAR CG/MS ET DETERMINATION DES EFFETS ANTIMICROBIENS DES HUILES ESSENTIELLES DU FAUX POIVRIER (*SCHINUS MOLLE* L.). *Acta Horticulturae* [internet]. 2010 [citado 25 de enero de 2025];853: 219–228. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/279621818_Identification_by_gas_chromatographymass_spectrometry_GCMS_and_determination_of_antimicrobial_effects_of_essential_oils_from_peppertree_Schinus_molle_L_Identifier_fication_par_CGMS_et_determination_des_eff/link/5a689afeaca272de02f5819b/download?tp=eyJjb250ZXh0Ijp7ImZpcnN0UGFnZSI6InB1YmxpY2F0aW9uIiwicGFnZSI6InB1YmxpY2F0aW9uIn19
82. Pauli A. Anticandidal low molecular compounds from higher plants with special reference to compounds from essential oils. *Medicinal Research Reviews* [internet]. 2006 [Revisado 26 de enero de 2025]; 26(2): 223–68. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/med.20050>
83. Juven BJ, Kanner J, Schved F, Weisslowicz H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology* [Internet]. 1994 [citado 5 de febrero de 2025];76(6):626–31. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.1994.tb01661.x/full>
84. Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJ .E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology* [internet]. 2001 [citado 05 de febrero de 2025];91(3):453–62. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11556910/>
85. Cutro AC, Maillard AF, Dalmaso PR, Rodriguez SA, Hollmann A. Antimicrobial Nanoformulations Based on *Schinus areira* Essential Oil. *Drugs*

- and Drug Candidates [Internet]. 2023 [citado 04 de febrero de 2025];2(2):498–515. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2813-2998/2/2/26>
86. Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL. Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2012 [citado 05 de febrero de 2025];3. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3265747/>
87. García-García R, López-Malo A, Palou E. Bactericidal Action of Binary and Ternary Mixtures of Carvacrol, Thymol, and Eugenol against *Listeria innocua*. *Journal of Food Science* [internet]. 2011 [citado 05 de febrero de 2025];76(2):95–100. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21535780/>
88. Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL. Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2012 [citado 05 de febrero de 2025];3:12. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3265747/>

X. ANEXOS (*)

ANEXO 1. Identificación taxonómica de *Schinus areira* L. "molle"



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



"Año del Bicentenario, de la consolidación de nuestra Independencia, y de la conmemoración de las heroicas batallas de Junín y Ayacucho"

CONSTANCIA N° 211-USM-MHN-2024

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 (fértil) recibida de **Rubén Robinson Herrera Ccari**, bachiller de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ha sido estudiada y clasificada como: *Schinus areira* L. y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación APG IV (2016).

ORDEN : Sapindales Juss. ex Bercht. & J. Presl

FAMILIA : Anacardiaceae R. Br.

GÉNERO : *Schinus* L.

ESPECIE : *Schinus areira* L.

Nombre vulgar: "Molle"

Procedencia: Huari, Ancash

Determinado por: Bach. Julio Torres.

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

Lima, 09 de agosto de 2024

Dra. Joaquina Albán Castillo

JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

ANEXO 2. Informe del análisis cromatográfico del aceite esencial de *Schinus areira* L. "molle".



UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
FACULTAD DE CIENCIAS
LABORATORIO LABICER
ANÁLISIS QUÍMICO, CONSULTORÍA E INVESTIGACIÓN



INFORME DE ENSAYO N° 0968 – 24 – LABICER

1. DATOS DEL CUENTE
 - 1.1. NOMBRE / RAZÓN SOCIAL : RUBEN ROBINSON HERRERA CCARI
 - 1.2. D.N.I / R.U.C. : 75434967
 - 1.3. DIRECCIÓN : -
2. CRONOGRAMA DE FECHAS
 - 2.1. FECHA DE RECEPCIÓN DE LA MUESTRA : 04 / 10 / 2024
 - 2.2. FECHA DE EJECUCIÓN DEL ENSAYO : 15 / 10 / 2024
 - 2.3. FECHA DE EMISIÓN DEL INFORME : 21 / 10 / 2024
3. ANÁLISIS SOLICITADO : ANÁLISIS CUALITATIVO Y SEMICUANTITATIVO DE ACEITE ESENCIAL
4. DATOS DE LA MUESTRA
 - 4.1. TIPO DE MUESTRA : ACEITE ESENCIAL
 - 4.2. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA TESIS : 01 MUESTRA DE ACEITE ESENCIAL DE SCHINUS AREIRA L.
"COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE SCHINUS AREIRA L."
 - 4.3. OBSERVACIONES (SI APLICA) : ENVASE DE VIDRIO AMBAR
5. LUGAR DE RECEPCIÓN Y ANÁLISIS : LABORATORIO LABICER-UNI
6. CONDICIONES AMBIENTALES : Temperatura: 22.3 °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.

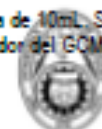
8. REACTIVOS
 - Helio UHP (5.0), ≥99.999%
 - n-hexano, P.A. Merck Millipore, EMSURE.
 - Sulfato de sodio anhidro, P.A. Merck Millipore, EMSURE.

9. PROCEDIMIENTO

9.1. TRATAMIENTO DE MUESTRA

Se recibió 01 muestra de aceite esencial (descrita en el ítem 4). Se realizó el secado de la muestra con sulfato de sodio anhidro y se filtró usando filtros de jeringa de 0.45µm.

Así, se diluyó 0.20 mL de la muestra filtrada con n-hexano (filtrado), envasándolo en una fiola de 10mL. Se lavó la muestra diluida en un vial, el cual se colocó inmediatamente en el automuestreador del GCMS para su lectura.



9.2. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Análisis por Inyección Líquida

TABLA Nº1. Condiciones de Operación		
Equipo GC/MS	GCMS-QP210 Ultra	
Inyección Líquida (AOC-6000)		
Jeringa	LS1-10 µL	
Ciclo de Pre-Enjuague	3	
Ciclos de Enjuague con Muestra	1	
Razón de Flujo de Aspiración	1 µL/s	
Injector	SPL1	
Razón de Flujo de Inyección	100 µL/min	
Ciclos Post-Enjuague	3	
Volumen de Inyección	1.0 µL	
Puerto de Inyección		
Tipo	Split	
Razón de Split	20.0	
Temperatura	220 °C	
Tipo	Helio	
Modo de Control de flujo	Velocidad Lineal (32.4 cm/sec)	
Flujo de columna	0.80 mL/min	
Flujo de purga	3 mL/min	
Programa de Temperatura de Columna		
Razón	Temperatura	Hold time
-	50 °C	30 min
3 °C/min	150 °C	20 min
3 °C/min	250 °C	10 min

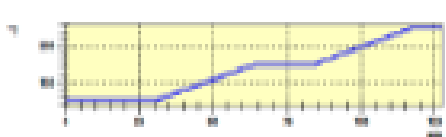
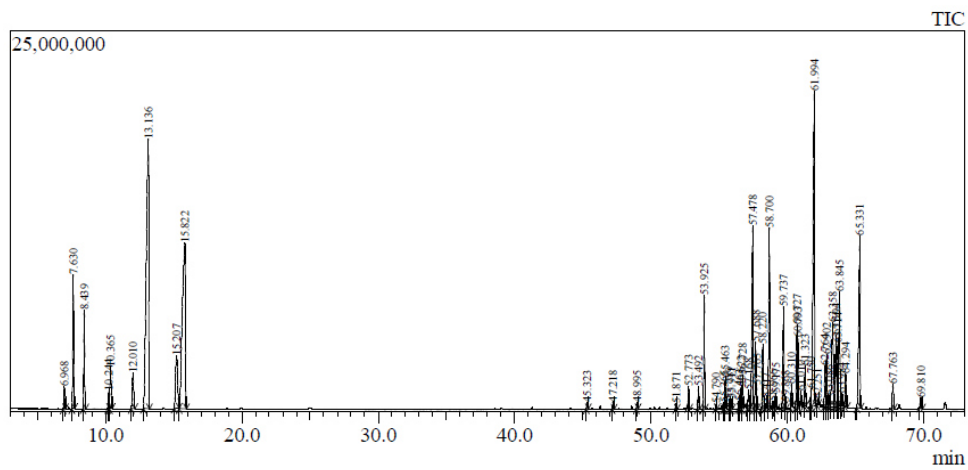


Gráfico de temperatura de columna programada. El eje horizontal representa el tiempo en minutos (0 a 120) y el eje vertical representa la temperatura en grados Celsius (50 a 250). La curva muestra un calentamiento de 50°C a 150°C a una velocidad de 3°C/min, un mantenimiento de 20 minutos a 150°C, un calentamiento de 150°C a 250°C a una velocidad de 3°C/min, y un mantenimiento final de 10 minutos a 250°C.

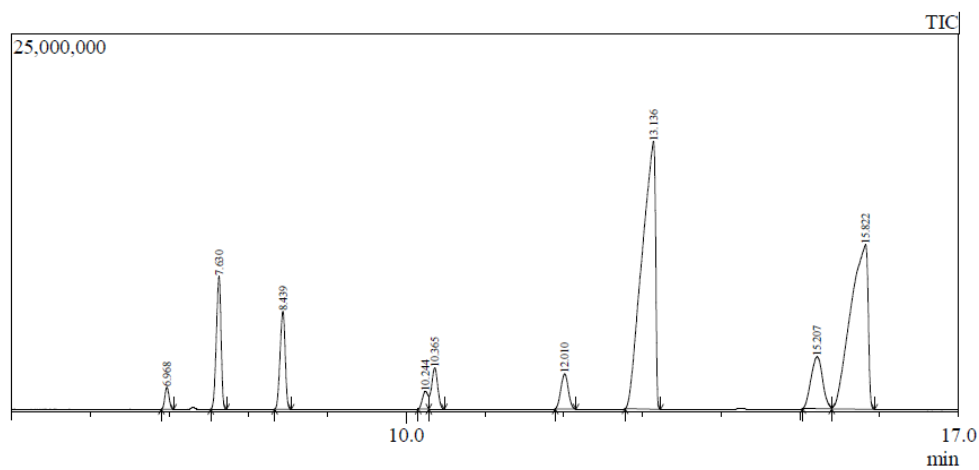
Tiempo total programado: 126.67 min

Detector	
Tipo	Masa
Temperatura de Fuente de iones	250°C
Temperatura de Interface	290°C
Tiempo de corte	2 min
Tiempo de inicio MS	3 min
Energía de ionización	70eV
Modo de adquisición	Scan
Rango SCAN	20-500 m/z
Columna Cromatográfica	
Tipo	Rb ⁺ -5 MS
Dimensiones	30 m x 0.25 mm x 0.25 µm

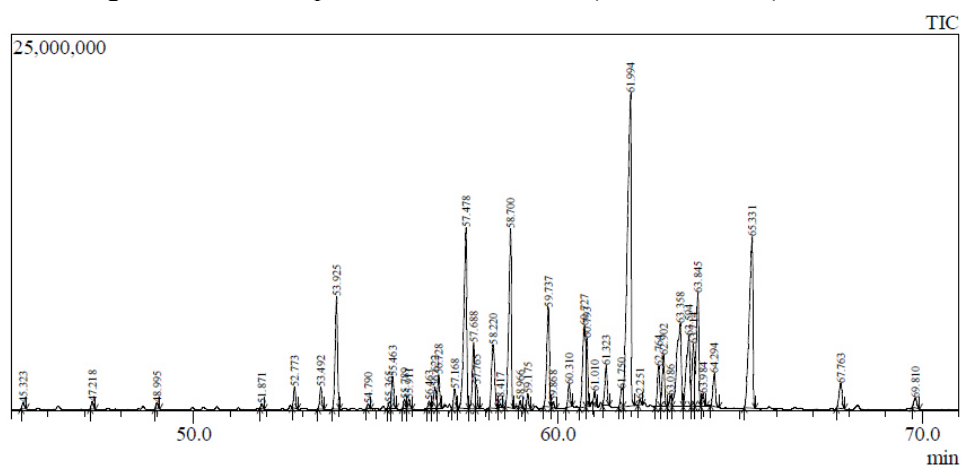




Cromatograma de los componentes de la muestra (3 a 73 minutos)



Cromatograma de los componentes de la muestra (4 a 17 minutos)



Cromatograma de los componentes de la muestra (45 a 71 minutos)

ANEXO 3. Análisis estadístico de la prueba difusión en agar

Tabla 9. Prueba de normalidad de residuales de Shapiro-Wilk

Variable	Estadístico	p-valor
<i>E. coli</i>	0.728	0.003
<i>P. aeruginosa</i>	-	-
<i>S. aureus</i>	0.978	0.951
<i>B. subtilis</i>	0.963	0.830

Tabla 10. Prueba de homogeneidad de varianzas de Levene

Variable	Estadístico	p-valor
<i>E. coli</i>	1.00	0.422
<i>P. aeruginosa</i>	-	-
<i>S. aureus</i>	0.333	0.729
<i>B. subtilis</i>	0.5	0.630

Tabla 11. Comparación de los halos de inhibición a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Schinus areira* L. "molle"

	AE10% N = 3 ¹	AE50% N = 3 ¹	AE95% N = 3 ¹	p-valor ²
<i>E. coli</i>	10 ± 0 ^a	16.33 ± 1.15 ^{ab}	18 ± 0 ^b	0.0204
<i>P. aeruginosa</i>	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0	-
<i>S. aureus</i>	16.33 ± 0.58 ^a	16.67 ± 0.58 ^a	19 ± 1 ^b	0.009
<i>B. subtilis</i>	13 ± 0 ^a	14.33 ± 0.58 ^b	14.67 ± 0.58 ^b	0.011

¹ Media ± SD; ² ANOVA de una vía; ² Suma de Rangos de Kruskal-Wallis. ^{a, b, c} Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos por la prueba post-hoc de Tukey o Dunn.

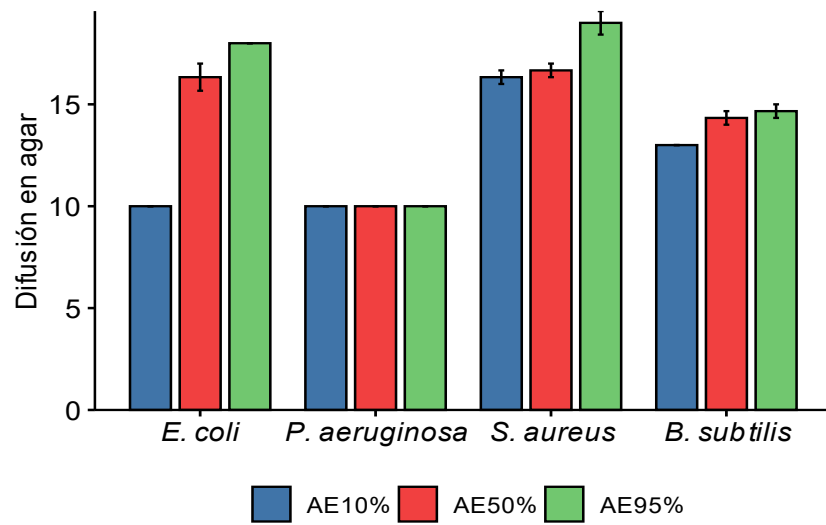


Figura 21. Gráfico de barras de difusión en agar (mm) por %AE de *Schinus areira* L. "molle" y bacteria.



Figura 22. Incorporación del aceite esencial de *Schinus areira* L. "molle" en pocillos de placas para el método de difusión en agar.



Figura 23. Materiales para el método de difusión en agar