



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE
BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA**



TESIS:

**EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ACUOSO, HIDROALCOHÓLICO
Y ETANÓLICO DE *Schinus molle* L. (MOLLE), SOBRE EL CRECIMIENTO *IN*
VITRO DE *Staphylococcus aureus* DE ORIGEN CLÍNICO**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**

PRESENTADO POR:

Bach. KELLY YAHARA TORRES VELIZ

ASESOR:

Dr. MARCO ANTONIO RIVERA JACINTO

CAJAMARCA – PERÚ

2024

CONSTANCIA DE INFORME DE ORIGINALIDAD

1. **Investigador:** Kelly Yahara Torres Veliz
DNI N° 71116129
Escuela Profesional: Biología y Biotecnología
2. **Asesor:** Dr. Mblgo. Marco Antonio Rivera Jacinto
Facultad: Ciencias de la salud
3. **Grado académico o título profesional**
 Bachiller Título profesional Segunda especialidad
 Maestro Doctor
4. **Tipo de investigación:**
 Tesis Trabajo de investigación Trabajo de sustentación profesional
 Trabajo académico
5. **Título de trabajo de investigación:** "EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ACUOSO, HIDROALCOHÓLICO Y ETANÓLICO DE *Schinus molle* L. (MOLLE), SOBRE EL CRECIMIENTO *IN VITRO* DE *Staphylococcus aureus* DE ORIGEN CLÍNICO"
6. **Fecha de evaluación:** 19/09/2024
7. **Software antiplagio:** TURNITIN URKUND (OURIGINAL) (*)
8. **Porcentaje de informe de similitud:** 19 %
9. **Código documento:** Identificación de reporte de similitud: cid:3117:383099443
10. **Resultado de evaluación de similitud:**
 APROBADO PARA LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES O DESAPROBADO

20 de septiembre de 2024



*En caso se realizó la evaluación hasta septiembre de 2023

Copyright©

Kelly Yahara Torres Veliz

Todos los derechos reservados

FICHA CATALOGRÀFICA

Torres V. 2024. **Efecto antibacteriano del extracto acuoso, hidroalcohólico y etanólico de *Schinus molle* L. (molle), sobre el crecimiento *in vitro* de *Staphylococcus aureus* de origen clínico** / Kelly Yahara Torres Veliz.

Escuela Académico Profesional de Biología y Biotecnología

Asesor: Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto

Disertación académica para obtener el título profesional de Biólogo Biotecnólogo –
UNC 2024.

Efecto antibacteriano del extracto acuoso, hidroalcohólico y etanólico de *Schinus molle* L. (molle), sobre el crecimiento *in vitro* de *Staphylococcus aureus* de origen clínico

AUTOR: Bach. Kelly Yahara Torres Veliz

ASESOR: Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto

Tesis evaluada y aprobada para la obtención de Título Profesional de Biólogo Biotecnólogo de la Universidad Nacional de Cajamarca, por los siguientes jurados:

JURADO EVALUADOR



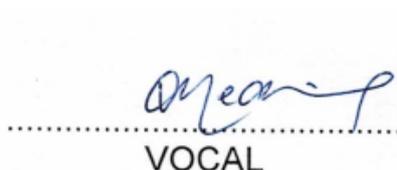
.....
PRESIDENTE

Dr. Rodolfo Raúl Orejuela Chirinos



.....
SECRETARÍA (O)

M. Cs. Arturo Ulises Díaz Aliaga



.....
VOCAL

Dra. Carmen Eddy Medina Rodríguez

Cajamarca, 2024 - Perú



Universidad Nacional de Cajamarca

"Norte de la Universidad Peruana"

Fundada por Ley 14015 del 13 de Febrero de 1962

Facultad de Ciencias de la Salud

Av. Atahualpa 1050

Teléfono/ Fax 36-5845



MODALIDAD "A"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO

En Cajamarca, siendo las ... 8 am ... del 17 de setiembre del 2024 los integrantes del Jurado Evaluador para la revisión y sustentación de la tesis, designados en Consejo de Facultad a propuesta del Departamento Académico, reunidos en el ambiente ... 11-304 ... de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca, dan inicio a la sustentación de tesis denominada: Efecto antibacteriano del extracto acuoso, hidroalcohólico y etanólico de Schinus molle L. (MOLLE) sobre el crecimiento in vitro de Staphylococcus aureus de origen clínico.

del (a) Bachiller en Ciencias Biológicas:

Kelly Yanara Torres Veliz

Siendo las ... 8:50 am ... del mismo día, se da por finalizado el proceso de evaluación, el Jurado Evaluador da su veredicto en los siguientes términos: ... Bueno ..., con el calificativo de: ... 16 ..., con lo cual el (la) Bachiller en Ciencias Biológicas se encuentra ... apta ... para la obtención del Título Profesional de: **BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO.**

Miembros Jurado Evaluador		Firma
Nombres y Apellidos		
Presidente:	Rodolfo Raúl Orejuela Chirinos	<i>[Signature]</i>
Secretario(a):	Arturo Ulises Díaz Alcaza	<i>[Signature]</i>
Vocal:	Carmon Eddy Yedua Rodríguez	<i>[Signature]</i>
Accesitaria:		
Asesor (a):	Mano Antonio Rivera Jacinto	<i>[Signature]</i>
Asesor (a):		

Términos de Calificación:

EXCELENTE (19-20)

REGULAR (12-13)

MUY BUENO (17-18)

REGULAR BAJO (11)

BUENO (14-16)

DESAPROBADO (10 a menos)

A:

Mis padres y hermanos, por su amor incondicional y su confianza. Su apoyo ha sido mi motivación para cumplir mis metas. Gracias por ser mi refugio en los momentos difíciles y por compartir conmigo cada logro y alegría.

Agradecimiento:

Agradezco a Dios por dame la fuerza, sabiduría y perseverancia necesaria para completar este importante capítulo de mi vida. A la Universidad Nacional de Cajamarca por brindarme la oportunidad de formarme académicamente y por proporcionarme las herramientas necesarias para desarrollar mis habilidades.

Al Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto, mi asesor de tesis, le extiendo mi más profunda gratitud por su guía, sus comentarios constructivos, su paciencia durante todo este proceso y su constante apoyo, que han sido fundamentales para la realización y el éxito de este trabajo.

A mis amigos y compañeros de tesis, por su compañía, consejos y apoyo.

Tabla de Contenido

Título	xii
Resumen	xiii
Abstract	xiv
CAPÍTULO I	1
CAPÍTULO II	3
MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes:.....	3
2.2. Bases teóricas.....	8
2.2.1. <i>Schinus molle</i> L. (molle).....	8
2.2.2. Extracto vegetal	15
2.2.3. Efecto antibacteriano	19
2.2.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	21
CAPÍTULO III	25
DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS	25
3.1. Nivel de Investigación	25
3.2. Tipo y diseño de estudio	25
3.3. Material biológico	26
3.4. Área de estudio o lugar de muestreo	26
3.5. Toma de muestra	26
3.6. Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos	26
3.6.1. Reactivación de los aislamientos y la cepa de referencia de <i>S. aureus</i> ATCC® 25923™.	27
3.6.2. Obtención de los extractos de <i>S. molle</i> L.	28
3.6.3. Evaluación del efecto antibacteriano:	31
3.7. Técnicas de Procesamiento y Análisis de Datos	33

CAPÍTULO IV	34
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
4.1. Resultados	34
4.2. Discusión	44
CAPÍTULO V	50
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	50
5.1. Conclusiones	50
5.2. Recomendaciones	50
LISTA DE REFERENCIAS	51
APÉNDICES	57
ANEXOS	66

Lista de abreviaciones

ATCC: American Type Culture Collection

E.A.: Extracto Acuoso

E.E.: Extracto Etanólico

E.H.: Extracto Hidroalcohólico

DEA: Extracto Acuoso en disco

PEA: Extracto Acuoso en pozo

DEE: Extracto Etanólico en disco

PEE: Extracto Etanólico en pozo

DEH75: Extracto Hidroalcohólico 75 % en disco

DEH50: Extracto Hidroalcohólico 50 % en disco

DEH25: Extracto Hidroalcohólico 25 % en disco

PEH75: Extracto Hidroalcohólico 75 % en pozo

PEH50: Extracto Hidroalcohólico 50 % en pozo

PEH25: Extracto Hidroalcohólico 25 % en pozo

OMS: Organización Mundial de la Salud

SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina

Glosario

Cepa de referencia: Microorganismo definido a nivel de género y especie, catalogados y descritos según sus características, preferiblemente de origen conocido y normalmente obtenidos de una colección nacional o internacional reconocida (1).

Concentración: Cantidad de principio activo contenido en un determinado peso o volumen de medicamento; la concentración de la sustancia o principio activo se expresa generalmente de las siguientes formas: peso/peso, peso/volumen y dosis unitaria/volumen (2).

Halos de inhibición: Zona que aparece después de transcurrir de 18 a 24 horas, alrededor del disco de antibiótico en un antibiograma, en el cual no hay crecimiento bacteriano sobre el agar (3).

Inhibición bacteriana: Se manifiesta con la formación del halo de inhibición bacteriano alrededor de pozos o discos que contienen sustancias antibacterianas sobre el agar en placas Petri con cultivos microbiológicos (4).

Principio activo: Es la materia prima, sustancia o mezcla de sustancias dotadas de un efecto farmacológico determinado (2).

**EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ACUOSO,
HIDROALCOHÓLICO Y ETANÓLICO DE *Schinus molle* L. (MOLLE), SOBRE
EL CRECIMIENTO *IN VITRO* DE *Staphylococcus aureus* DE ORIGEN
CLÍNICO**

Resumen

En este trabajo se evaluó el efecto *in vitro* de los extractos acuoso, hidroalcohólico y etanólico de *Schinus molle* L. (molle), sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* de origen clínico. Se trabajó con 26 aislamientos clínicos previamente adquiridos por otros autores de muestras de pacientes del Hospital Regional Docente de Cajamarca y del Hospital Simón Bolívar; el extracto acuoso se obtuvo por infusión, el extracto etanólico por maceración alcohólica y el extracto hidroalcohólico se consiguió de las diluciones del extracto etanólico al 100 %. El efecto inhibitorio de los extractos se evaluó sobre el crecimiento de los aislamientos de origen clínico y de una cepa de referencia de *S. aureus* ATCC® 25923™*, mediante los métodos de difusión en agar con disco y modificado con pozo. Se encontró que el extracto etanólico a la concentración del 100 % posee efecto inhibitorio sobre los aislamientos, observándose halos de inhibición promedio de 9.67 ± 1.33 mm cuando se evaluó por el método con disco, y de 13.67 ± 1.67 mm cuando se evaluó con pozo, esto indica que los aislamientos fueron sensibles (+) frente a este extracto, según la escala de Duraffour; mientras que con el extracto hidroalcohólico a las concentraciones de 75 %, 50 % y 25 % el efecto inhibitorio se reduce, obteniéndose halos promedios de 9.00 ± 1.33 mm, 8.33 ± 1.33 mm, 7.33 ± 1.00 mm, 12.33 ± 1.33 mm, 11.33 ± 1.67 mm y 10.00 ± 2.00 mm respectivamente. En cuanto a los extractos acuosos solo se observó efecto al 100 % con halos promedio de 9.33 ± 0.50 mm con disco y de 11.00 ± 1.00 mm con pozo. Se concluye que los extractos acuoso, hidroalcohólico y etanólico de *Schinus molle* L. (molle), tienen efecto inhibitorio sobre los aislamientos de *S. aureus* tanto de origen clínico como con la cepa de referencia ATCC® 25923™*.

Palabras clave: Extracto acuoso, extracto etanólico, extracto hidroalcohólico, *Staphylococcus aureus*, *Schinus molle* L., efecto antibacteriano.

Abstract

In this work, the *in vitro* effect of the aqueous, hydroalcoholic and ethanolic extracts of *Schinus molle* L. (molle) on the growth of *Staphylococcus aureus* of clinical origin was evaluated. We worked with 26 clinical isolates previously acquired by other authors from patient samples from the Cajamarca Regional Teaching Hospital and the Simón Bolívar Hospital; the aqueous extract was obtained by infusion, the ethanolic extract was obtained alcoholic maceration and the hydroalcoholic extract was obtained from 100% dilutions of the ethanolic extract. The inhibitory effect of the extracts was evaluated on the growth of isolates of clinical origin and of a reference strain of *S. aureus* ATCC® 25923™*, using the disk and well-modified agar diffusion methods. It was found that the ethanolic extract at a 100% concentration has an inhibitory effect on the isolates, observing average inhibition zones of 9.67 ± 1.33 mm when evaluated by the disk method, and 13.67 ± 1.67 mm when evaluated with a well. This indicates that the isolates were sensitive (+) to this extract, according to the Duraffourd scale; while with the hydroalcoholic extract at concentrations of 75%, 50% and 25% the inhibitory effect is reduced, obtaining average halos of 9.00 ± 1.33 mm, 8.33 ± 1.33 mm, 7.33 ± 1.00 mm, 12.33 ± 1.33 mm, 11.33 ± 1.67 mm and 10.00 ± 2.00 mm respectively. Regarding the aqueous extracts, only a 100% effect was observed with average halos of 9.33 ± 0.50 mm with disk and 11.00 ± 1.00 mm with well. It is concluded that the aqueous, hydroalcoholic and ethanolic extracts of *Schinus molle* L. (molle) they have an inhibitory effect on *S. aureus* isolates both of clinical origin and with the reference strain ATCC® 25923™*.

Keywords: Aqueous extract, ethanolic extract, hydroalcoholic extract, *Staphylococcus aureus*, *Schinus molle* L., antibacterial effect.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Staphylococcus aureus es un patógeno grampositivo que plantea un considerable problema de salud, debido a su gran variedad de factores de virulencia (5), los cuales le proporciona las características necesarias para infectar, reproducirse y diseminarse en distintos tejidos, especialmente en personas con su sistema inmunológico deficiente (6); puede causar infecciones de piel, osteomielitis, endocarditis y neumonías adquiridas tanto en la comunidad como en el hospital; sin embargo el principal inconveniente es la resistencia a los antibióticos, ya que según con la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2020, la resistencia antibacteriana se encuentra en la lista de los “Problemas sanitarios urgentes de dimensión mundial” (7), además muestra a *S. aureus* como prioridad elevada en la “Lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos” (8), ya que en los últimos años ha demostrado mayores niveles de resistencia; como es el caso de *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM), el cual presenta un 64 % más de mortalidad que las cepas sensibles a los fármacos (9).

Por eso, es necesario explorar soluciones distintas para el control de las infecciones bacterianas, sobre todo para las resistentes a los antibióticos, empleando específicamente la fitoquímica y fitofarmacología (10), puesto que, las plantas constituyen una fuente valiosa de sustancias activas (11), dado que producen más de 100 000 metabolitos secundarios, los cuales pueden influir en el desarrollo bacteriano (12); es por ello que actualmente se llevan a cabo investigaciones enfocadas en la identificación de moléculas eficaces como agentes antibacterianos (13), con el objetivo de hallar nuevos enfoques terapéuticos para enfrentar bacterias como SARM, utilizando principalmente plantas

medicinales de cada región; tal como en Cajamarca es *Schinus molle* L., el cual en sus hojas presenta principios activos que tienen efecto antibacteriano frente a cepas de referencia gramnegativas y grampositivas (14). Sin embargo, es conveniente señalar que las cepas de referencia utilizadas en las investigaciones, son organismos sin mutaciones ni resistencia a antibióticos, por el contrario, los aislamientos clínicos de *S. aureus* que se utilizan en este estudio son bacterias reales que afectan a la población y que podrían presentar mutaciones y resistencia a los antibióticos.

Por esta razón, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto *in vitro* de las concentraciones de los extractos acuoso, etanólico e hidroalcohólico de *S. molle* L. sobre el crecimiento de *S. aureus* de origen clínico. Los extractos se elaboraron a partir de muestras vegetales recolectadas en Cajamarca, mientras que los 26 aislamientos de origen clínico fueron obtenidos de trabajos de investigación previamente realizados en el Hospital Regional Docente de Cajamarca y Hospital Simón Bolívar. Se determinó el efecto antibacteriano mediante el método de difusión en agar con disco y modificado con pozo, tanto con los aislamientos clínicos como con la cepa de referencia *S. aureus* ATCC® 25923™; además, se midió cualitativamente el efecto inhibitorio utilizando la escala de Duraffourd, seguido de un análisis estadístico de los datos recolectados.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes:

En el año 2010, en Colombia, Cruz, Rodríguez y Rodríguez, evaluaron la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos etanólicos de las hojas de *Silybum marianum*, *Lantana camara*, *Bidens pilosa* y *Schinus molle* L., mediante el método de difusión en pozo y difusión en disco, para establecer su concentración mínima bactericida (CMB) y su concentración mínima inhibitoria (CMI), en respuesta a las cepas de referencia de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*; como resultado obtuvieron que la mejor actividad antibacteriana la exhibió *L. cámara* y *B. pilosa*, mientras que *S. marianum* y *S. molle* L. mostraron actividad moderada. Se concluye que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Schinus molle* L. (molle) presenta actividad antibacteriana en cepas de *P. aeruginosa* y *S. aureus* (15).

Por otro lado, en Italia, Gualtieri y colaboradores (2012), determinaron la actividad antibacteriana del extracto hexanólico de los frutos y del extracto etanólico de las hojas de *S. molle* L.; por medio del método de dilución en agar con el fin de determinar la CMI y la CMB; como resultado obtuvieron que el rendimiento de los extractos de hojas y frutos son de 32.42 % y 5.63 % respectivamente; concluyen que sin importar el tipo de extracto, *S. molle* L. tiene actividad antibacteriana frente a cepas de referencia de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *S. aureus* ATCC 29213, obteniéndose una CMI de 16 µg/mL y una CBM entre 32 y 64 µg/mL (16).

En Egipto, se realizó la investigación de Salem y colaboradores (2016), quienes determinaron la actividad antioxidante, la composición química y la actividad antibacteriana de los aceites esenciales y extractos vegetales de madera de los desechos de poda de *S. molle* L.; para los extractos se utilizó solventes, tales como el metanol, diclorometano y agua; para demostrar la actividad antibacteriana *in vitro* se usó la metodología de difusión con discos; se concluye que los extractos y aceites esenciales de *S. molle* L. poseen actividad antibacteriana frente las cepas de referencia de *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *S. aureus*, *Sarcina lutea*, *Micrococcus luteus* y *P. aeruginosa* y (17).

Por otra parte, en la investigación de Turchetti y colaboradores (2020), realizada en Italia, se evaluaron las propiedades antimicrobianas de los extractos de las hojas de *S. molle* L., los disolventes utilizados fueron el éter de petróleo, éter dietílico y acetona; para demostrar el efecto antibacteriano, se utilizó el método del disco frente a *P. aeruginosa* ATCC 9027, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 6538, *B. subtilis* ATCC 6633, *E. faecalis* ATCC 29212 y *Candida albicans* ATCC 10231; como resultado obtuvieron que los extractos y las fracciones derivadas de las plantas macho y hembra de *S. molle* L. poseen propiedades antimicrobianas frente a las cepas de referencia, debido a los principios activos presentes tales como los sesquiterpenos, sesquiterpenoides y otros terpenos. Finalmente, se concluye que los extractos vegetales de las hojas de *S. molle* (L.) y las fracciones derivadas de plantas masculinas y femeninas de *S. molle* (L.) muestran actividad antimicrobiana (18).

Por otra parte, en Ecuador, Palomeque (2022), comprobó el efecto *in vitro* inhibitorio del extracto etanólico de *S. molle* L. a diferentes concentraciones (100 %, 75 %, 50 % y 25 %) y tiempos de incubación (24, 48, 72 horas) de la cepa de referencia de *S. aureus* ATCC 700669; la actividad antibacteriana se realizó a través del método de difusión de Kirby Bauer y fue valorada por la escala de Duraffourd; como resultado obtuvo que a las 72, 48 y 24 horas los halos de inhibición del extracto de *S. molle* L. al 75 % y 100 % presentan una mayor inhibición a la reportada por la Clorhexidina al 0.12 %; concluye que el extracto etanólico de molle tiene efecto inhibitorio frente a *S. aureus* en los tres tiempos analizados, además que en su composición química tiene α -pineno, β -pineno, isocariofileno, germacreno D, γ -elemeno (19).

De manera similar, en el Perú se han realizado investigaciones, como la de Malca y colaboradores (2017), quienes investigaron la actividad antibacteriana y la composición química del extracto hexanólico y del extracto con cloruro de metileno de la resina de *S. molle* L.; para la actividad antibacteriana utilizaron un método de difusión modificado con pozos frente a cepas de referencia de *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* y *P. aeruginosa*, como resultado encontraron que el terebinteno y el ácido pinicólico presentes en las resinas de *S. molle* L. tienen actividad antibacteriana a concentraciones de 5 y 10 mg/mL contra *B. subtilis* ATCC 6633 y *S. aureus* ATCC 25923, pero no tienen efecto antibacteriano contra *P. aeruginosa* y *E. coli* ATCC 25922. Se concluye que los extractos de la resina de *S. molle* L. tiene actividad antibacteriana frente a *S. aureus* ATCC 25923 y *B. subtilis* ATCC 6633 (20).

En el año 2018 en Trujillo, Alfaro y Ruiz, evaluaron el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto acuoso de *S. molle* L. (molle), frente a la cepa de referencia de *S. aureus* ATCC 25923, utilizando la técnica de microdilución en caldo por medio de 4 microplacas de 96 pocillos con fondo en U, para medir la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración máxima bactericida (CMB), realizaron concentraciones de 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y 100%, como resultado obtuvieron que la CMI de *S. aureus* ATCC 25923 fue del 40 % y la CMB fue del 60 %, concluyendo así, que el extracto acuoso posee actividad antibacteriana frente a *S. aureus* (21).

Por otra parte, en la investigación de Calderón y Cristóbal (2019), realizada en Junín, determinaron la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de las hojas de *S. molle* L. en cepas de referencia de *P. aeruginosa* ATCC 9027 y *S. aureus* ATCC 6538; el extracto se elaboró por medio de la maceración con etanol al 70 % y la actividad antibacteriana se realizó por el método de Kirby-Bauer modificado con pozos; los resultados fueron halos de inhibición de 18.50, 23.80 y 31.60 mm a 60 %, 75 % y 90 % frente a *S. aureus* y de 0.00, 20.80 y 28.80 mm a 20 %, 60 % y 80 % frente a *P. aeruginosa*; también en el tamizaje encontraron la presencia de compuestos fenólicos, taninos, quinonas, triterpenos, flavonoides, saponinas y lactonas α y β -insaturadas. Concluyen que el extracto hidroalcohólico de *Schinus molle* L. tiene actividad antibacteriana en cepas de *P. aeruginosa* y *S. aureus* (22).

De igual manera, en el año 2021, en Huancayo, Guzmán y Rodríguez, determinaron el efecto antibacteriano *in vitro* de los extractos etanólicos de las hojas de *S. molle* L. “molle” y *Chenopodium ambrosioides* “paico” contra la cepa de referencia de *S. aureus* ATCC 25923; utilizando el método de difusión con disco; obtuvieron como resultado que el extracto etanólico al 50 % de *S. molle* L. tiene efecto antibacteriano frente a *S. aureus*, mientras que el extracto de *C. ambrosioides* al 50 % no tiene efecto, sin embargo la mezcla de ambos extractos etanólicos al 50 % si presenta efecto; concluyen que el extracto etanólico de *S. molle* L. posee actividad antibacteriana frente a *S. aureus* (23).

Por último, en la investigación de Vitón y colaboradores (2022), realizada en Lima, determinaron la susceptibilidad de las cepas de *Streptococcus pyogenes* y *S. aureus* frente al extracto etanólico de las hojas de *S. molle* L; trabajaron con cepas de *Streptococcus pyogenes* (BH1, BH2, BH3) y de *S. aureus* (SA1, SA2, SA3) a las concentraciones de 1000, 750, 125, 500, 250 y 0 mg/mL del extracto etanólico; como resultado obtuvieron halos de inhibición de 5.30 a 14.60 mm para *S. aureus* y de 7.30 a 17.00 mm para *S. pyogenes*, también una CMI de 62.50 mg/mL para *S. aureus* y para *S. pyogenes* de 15.62 mg/mL y 7.81 mg/mL, concluyendo que las cepas fueron sensibles al extracto etanólico de *S. molle* L. (24).

2.2. Bases teóricas

2.2.1. *Schinus molle* L. (molle)

Generalidades

Schinus molle L. pertenece a la familia Anacardiaceae, su nombre común es “falso pimentero”; es una planta de importancia etnobotánica de origen tropical, que se ha aclimatado en países tropicales y subtropicales de los cinco continentes, principalmente en Bolivia, Ecuador, Perú, Paraguay, sur de Brasil, norte de Argentina, Chile y Uruguay (25) (26).

S. molle L. posee un crecimiento rápido y florece desde sus primeros años de vida, puede llegar a vivir hasta cerca de un siglo; requiere de riegos y de podas de formación, también necesita de suelos arenosos y bien drenados, pero también crece en suelos compactos, ligeramente alcalinos y salinos; además es una especie resistente que tolera la sequía y el calor, así como las ligeras heladas (27).

Descripción morfológica de *Schinus molle* L.

Es un árbol resinoso, polígamo-dioico, con la copa densa, el follaje delgado y flexible, liso que cuelga de manera elegante y tiene un aspecto “llorón” (27). Es una planta leñosa, de porte arbóreo que llega a medir hasta 15 m de altura, frondosa y perennifolia (28). Las hojas se encuentran sobre los peciolos (2 a 6 cm de largo), tienen láminas regularmente imparipinnadas, oblongo-lanceoladas que miden de 10 a 30 cm de largo, raquis sub-alado, folíolos de 21 a 27 que pueden ser sésiles, opuestos, sub-opuestos o alternos, lineares a lanceolados, de 2 a 6 cm de largo y de 0.3 a 1.0 cm de ancho (28)

y con el ápice recto, curvo o apiculado-curvo (29). El tronco es robusto con ramificación profusa (28). Las flores son unisexuales y están organizadas en panículas alargadas (30), el fruto es una drupa globosa que mide de 5 a 7 mm, y están agrupados en racimos de color rojo o rosa; con un endocarpio leñoso, un exocarpio papiráceo y un mesocarpio dulce (27) (30) y las semillas están contenidas en el fruto, son duras, redondas, picantes, de color negro, rugosas y su tamaño varía entre los 3 y 5 mm (30).

Clasificación taxonómica

La especie *Schinus molle* L. fue descrita por Linneo en el año 1753 y publicado en el libro “*Species Plantarum*” (31). Su clasificación taxonómica, está dada según el sistema Integrado de Clasificación de las angiospermas de Arthur Cronquist 1981 (32).

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Sapindales

Familia: Anacardiaceae

Género: *Schinus*

Especie: *Schinus molle* L.

Nombre vulgar: “Molle”

Análisis Fitoquímico

Los fitoconstituyentes son metabolitos secundarios que son sintetizados por las plantas, entre ellos se encuentran los ácidos fenólicos, terpenos, lignanos, tiólicos y flavonoides (33). El estudio fitoquímico de *S. molle* L. indica que contiene alcaloides, taninos, terpenos, saponinas, flavonoides, esteroides y aceite esencial (34).

En sus hojas y tallos presentan ácido linolénico, erúxico, lignocérico, palmítico, esteárico y behénico, también cyclitol, glucosa, fructosa, galactosa, glucosamina y fitosterina (35). Asimismo, también se encuentra al mirceno, pineno, limoneno, ρ -felandreno, α -copaeno, linalol, ρ -cariofileno, terpinen-4-ol, 6-cadineno, óxido de cariofileno, germacreno y en mayor proporción hidrocarburos sesquiterpenos, tales como δ -cadineno y biciclogermacreno (36).

En la composición química de la madera del molle, el 3.20 % es material inorgánico, el 7.30 % de extractivos, el 67.30 % de holocelulosa y el 22.20 % de lignina (37). En las semillas se encuentra al mirceno, felandreno, limoneno y cadinol (30) y en los frutos al α -felandreno, limoneno, β -felandreno y ρ -cimeno (38).

Las actividades antimicrobianas, insecticidas y fungicidas de los extractos de *S. molle* L. se debe a la presencia de sesquiterpenos, sesquiterpenoides (18) y otros terpenos tales como el α -pineno y β -pineno (39).

- **Terpenos:**

Son compuestos que están contruidos de isopreno, por lo que sus estructuras se pueden dividir en unidades de cinco carbonos (C5), (40).

La actividad antimicrobiana de los terpenos, tienen mecanismos de acción al dañar la estructura y función de la membrana celular, también la alteración de procesos metabólicos fundamentales a través de cambios en la permeabilidad de la membrana, que genera defectos en el transporte de iones y moléculas causando la pérdida de metabolitos y con ello un desequilibrio intracelular, la coagulación de los componentes del citoplasma, la inhibición de la síntesis y función de los ácidos nucleicos, y la interrupción en la comunicación celular normal (41).

- **Ácidos fenólicos y tiólicos:**

Los ácidos fenólicos se clasifican en ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos (42). Los ácidos hidroxibenzoicos son sustancias que contienen un grupo carboxílico (ácido) y uno o más grupos hidroxilo en un anillo aromático (43). Por otro lado, los ácidos hidroxicinámicos se distinguen por tener el grupo $\text{CH} = \text{CH-COOH}$ en lugar del grupo COOH que se encuentra en los ácidos hidroxibenzoicos; además la presencia del doble enlace carbono ($\text{C} = \text{C}$) potencia su resonancia química, lo que a su vez aumenta su capacidad antioxidante (44).

La actividad antibacteriana que tienen los ácidos fenólicos es efectiva contra las especies bacterianas grampositivas (45), esta efectividad está determinada por la posición y el tipo de los sustituyentes del anillo bencénico, así como por la longitud de la cadena lateral de los ácidos fenólicos (46). Además, se ha comprobado que pueden suprimir el crecimiento bacteriano ya que tiene características prooxidativas, que alteran la hidrofobicidad y la carga superficial de las células, provocando lisis celular (47). Asimismo se ha comprobado que los compuestos fenólicos tales como el ácido ferúlico y el ácido gálico son capaces de detener el crecimiento de bacterias como *S. aureus* (48).

- **Lignanos:**

Se originan en la vía biosintética del ácido shikímico, se clasifican en lignanos o neolignanos y se dividen en ocho grupos en función de sus patrones estructurales y estos a su vez se pueden clasificar como lignanos simples y ciclolignanos (13). Tienen propiedades antibacterianas, frente a *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Salmonella typhi*, *E. coli* y en bacterias resistentes como SARM y *P. aeruginosa* resistente a antibióticos (ARPA); al desorganizar y perturbar la membrana citoplasmática bacteriana (49).

- **Flavonoides:**

Se clasifican según el grado de oxidación de su anillo pirano, entre ellos se tiene a las auronas, catequinas, leucoantocianidinas, flavanonas, flavononoles, flavonas, proantocianidinas y isoflavonoides (50). *S. molle* L., contiene flavonoides tales como la quercetina, rutina, quercitrina e isoquercitrina (51).

La actividad antibacteriana de los flavonoides está dada por su toxicidad a través de la acidez del grupo hidroxilo por el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, los protones son conducidos a través de la membrana citoplasmática destruyendo el diferencial de protones producidos en el transporte electrónico requerido para la formación de ATP (52).

- **Taninos:**

Son metabolitos secundarios que pueden presentarse como ésteres de ácido gálico o sus derivados combinados a diversos polioles, catequinas o núcleos triterpenoides (53). Se clasifican en los hidrolizables, condensados, florotaninos y taninos complejos (54).

Además tienen propiedades antioxidantes, quimio-terapéuticas, antiinflamatorias y antimicrobianas (55), por medio de mecanismos de acción como la inhibición de enzimas y las acciones que ocurren sobre la membrana citoplasmática (53).

- **Saponinas:**

Son glucósidos con una aglicona, que tienen la capacidad de formar espuma; además se ha comprobado que tienen actividad antimicrobiana frente a procariotas y eucariotas, sin embargo solo funciona en bajas densidades celulares (52).

S. molle L. presenta saponinas en su composición fitoquímica (34), su actividad antibacteriana se debe a que la saponina forma complejos con los esteroides de las membranas celulares, creando poros que alteran su permeabilidad y causan la lisis celular (56).

Propiedades Terapéuticas

S. molle L. posee propiedades antiinflamatorias, antioxidantes (26), tónicas, antiespasmódicas, cicatrizantes (30) y propiedades citotóxicas contra líneas de células tumorales humanas (57); también presenta actividad repelente e insecticida (58) y actividad antimicrobiana sobre bacterias, hongos y levaduras; dentro de la actividad antibacteriana actúa en cepas grampositivas, como *S. aureus* y en gramnegativas como *Shigella flexneri*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* y *Proteus vulgaris* (34).

Usos tradicionales

Según los órganos de *S. molle* L. tiene diferentes usos, tales como las semillas que se utilizan para falsear la pimienta y hay estudios que mencionan que son ligeramente tóxicas cuando se consume en exceso (27), por otro lado, se utiliza como fungicida natural (30).

La corteza es utilizada en curtiduría (59) y para la obtención de una gomorresina aromática con propiedades medicinales como astringentes, diuréticas, expectorantes y estomatológicas, que se utiliza contra la bronquitis, gingivitis, tuberculosis, caries, llagas e infecciones urinarias (27).

Las hojas sirven como repelente de insectos (27), la infusión se emplea para tratar el reumatismo y como un depurativo sanguíneo; además las hojas hervidas y en decocción, se utilizan como cicatrizantes, analgésicos y antiinflamatorios de aplicación externa; las hojas secas se emplean para aliviar la ciática y el reumatismo; además, al hervir la corteza y las hojas, se obtiene un líquido de color amarillo, que se usa como materia prima para teñir tejidos (30).

2.2.2. Extracto vegetal

Drogas vegetales: Son aquellos órganos de una planta (tallos, flores, hojas, raíces, frutos o semillas) que contienen los principios activos que se extraerán posteriormente (60).

Principios activos:

Son sustancias presentes en la materia prima (plantas medicinales) que tienen acción farmacológica y han sido extraídos a partir de una droga vegetal por medio de procesos de extracción; además se los clasifica en metabolitos primarios y secundarios (60).

- **Metabolitos primarios:**

Son compuestos químicos que están involucrados en la asimilación, respiración, transporte y diferenciación de la planta, que intervienen en los procesos de los aminoácidos que son los encargados de formar proteínas, azúcares, nucleótidos y acilglicéridos (61).

- **Metabolitos secundarios:**

Son conocidos por tener funciones importantes pero no vitales en las plantas; como protección contra parásitos (hongos, insectos y bacterias), características atractivas para polinizadores dispersores de semillas y además para actuar en la competencia planta-planta o en simbiosis planta-microorganismo (62). También son responsables de olores, colores en los vegetales, virtudes culinarias, medicinales o venenosas (60).

Extracto vegetal

Es un compuesto derivado de sustancias biológicamente activas que se encuentran en los tejidos de las plantas; por medio de procesos de extracción adecuados y específicos, utilizando solventes tales como el agua (acuoso), alcohol (etanólico), mezcla de estos (hidroalcohólico) u otros (63).

La elección de los métodos de extracción y del líquido extractivo, para extraer los principios activos vegetales, depende del procedimiento técnico, del tipo de órgano de la planta a utilizar y del principio activo (60).

Ciclo de la extracción de extractos vegetales

En la elaboración de los extractos se da la elección de la droga vegetal, obtención del líquido (extracto) y la concentración del líquido (64). En la etapa de selección de la droga o materia prima, se elige la planta, se identifica la parte u órgano de extracción (fruto, hojas, semillas, raíces) y se define la época de la cosecha.

Después se da el secado y la trituration; finalmente el proceso de la extracción, que viene dado por la adición de un solvente específico, luego la separación, la concentración y el secado del extracto (atomización o liofilizado) (63).

Métodos de extracción de los extractos vegetales

La extracción se clasifica en destilación que puede ser directa, por inyección de vapor, arrastre de vapor o por medio de disolventes; dependiendo del solvente se clasifica en maceración, percolación, infusión y enfleurage (65).

- **Maceración:** La maceración alcohólica o extracción alcohólica, es una extracción por solvente, que es utilizada a nivel de laboratorio, se basa en que la materia prima (droga vegetal) reposa en soluciones de alcohol por periodos de tiempos determinados (66).

En la maceración hidroalcohólica, se obtienen extractos por medio de la adición de alcohol y agua como solvente, con el fin de extraer los metabolitos de las hojas, tallos o frutos (22).

En la maceración acuosa, se realiza con agua como solvente, si es un macerado en frío se coloca la droga vegetal en agua a temperatura ambiente de 8 a 12 horas (67).

- **Infusión:** Es el procedimiento más adecuado para las partes delicadas de las plantas tales como flores, hojas y tallos tiernos, para preparar la infusión se coloca la materia vegetal en agua hirviendo y se deja macerar por 3 a 5 min, luego se filtra el extracto; este procedimiento es ventajoso, ya que se extrae grandes cantidades de principios activos de la droga vegetal y sin alterar su estructura química (68).

Conservación de los extractos

Es considerable controlar la fermentación en el proceso de extracción y evitar una fermentación posterior, de esta manera un extracto puede conservarse sin oxidarse hasta 3 meses; algunas formas para conservarlos en buenas condiciones es almacenarlos en un lugar fresco a 12 °C como máximo, sacar el aire del recipiente y adicionar agentes antioxidantes en el momento del filtrado antes de ser guardados en recipientes ámbar (69) y en refrigeración a 4°C.

Importancia de los extractos vegetales

Los procedimientos de extracción permiten obtener metabolitos y concentrarlos para luego ser utilizados en la alimentación, medicina, perfumería, entre otros (65). Además, estos extractos vegetales, suelen presentar mayor estabilidad, actividad y tolerancia, lo que permite que no haya efectos adversos o generación de residuos (63).

2.2.3. Efecto antibacteriano

Definición: Es el proceso donde se determina la efectividad antibacteriana en solución y la susceptibilidad de un microorganismo en concentraciones de una sustancia antimicrobiana (70).

Métodos de la medición del efecto antibacteriano:

Para evaluar la actividad antibacteriana se utilizan los métodos de difusión, dilución y bioautografía (71). En el método de difusión se encuentra la técnica de Kirby-Bauer y en los métodos de dilución están la dilución en agar, macrodilución y microdilución en caldo y métodos automatizados (72).

- **Método de difusión con discos de sensibilidad (Kirby-Bauer)**

Kirby y Bauer, actualizaron todas las descripciones previas del método de difusión en disco y publicaron sus hallazgos; su resultado fue un procedimiento estandarizado para la difusión del disco o prueba de susceptibilidad, el cual hasta ahora es conocido como prueba de difusión en disco de Kirby-Bauer (73).

Esta metodología se basa en la relación entre la concentración de la sustancia antimicrobiana para inhibir la cepa bacteriana y el halo de inhibición del crecimiento que se forma en la superficie de la placa donde ha sido colocado un disco de 6 mm impregnado con la sustancia antimicrobiana o se siembra un pozo con una cantidad adecuada de la misma. (74).

Descripción del método

Es un método cualitativo que está estandarizado para microorganismos de crecimiento rápido no exigentes; para este método se debe tener un cultivo puro de la cepa de interés, al cual se le debe dar las condiciones ambientales adecuadas y también las sustancias antimicrobianas; también, este método es recomendado para el estudio de la sensibilidad bacteriana (75).

Importancia

La prueba de susceptibilidad de Kirby-Bauer se utiliza con el fin de determinar la sensibilidad o resistencia de patógenos aeróbicos y anaerobios facultativos a varias sustancias antimicrobianas con el fin de seleccionar un tratamiento frente a una infección (76). Las técnicas de difusión han sido normalizadas para microorganismos de crecimiento rápido, tales como *S. aureus* (77).

Escala de Duraffourd (78)

Se utiliza para determinar cualitativamente el efecto inhibitorio *in vitro*, clasificando el diámetro de los halos de inhibición según los siguientes parámetros:

- Sensibilidad nula (-): diámetro inferior a 8 mm.
- Sensible (+): diámetro entre 9 a 14 mm.
- Muy sensible (++) : diámetro entre 14 a 19 mm.
- Sumamente sensible (+++) : diámetro superior a 20 mm.

2.2.4. *Staphylococcus aureus*

Generalidades

Su nombre deriva del griego staphulê (racimo de uvas), debido a la forma de su estructura microscópica y también a la tinción propuesta por el microbiólogo danés Hans Christian Gram en 1884, que dio una coloración grampositiva (color uva) (79). El género *Staphylococcus* está formado por cocos grampositivos, que miden de 0.5 a 1.5 μm , que pueden estar como células, o agrupadas en pares, tétradas, cadenas cortas o en racimos (80). *S. aureus* es un patógeno, ya que promueve la colonización de tejidos y daño tisular (81); además, tiene enzimas llamadas coagulasas ya que le permiten coagular la sangre, y esto es característica de un patógeno virulento(82).

Historia

En 1880, Ogston descubrió y nombró al organismo “estafilococo”; en 1884, Rosenbach aisló estafilococos de pus y propuso el género *Staphylococcus*; observó colonias amarillas y blancas, a el organismo de las colonias amarillas lo llamó *S. aureus* y al de colonias blancas *Staphylococcus albus*; en 1908, Winslow y Winslow propusieron la especie *Staphylococcus epidermidis* y en 1974 la especie *Staphylococcus saprophyticus*; para 1980 había 13 especies, en 1984 hubo 20 y actualmente hay 32 (83).

Patogenia

En la patogenia de *S. aureus* se encuentran los factores de virulencia tales como los polisacáridos capsulares, las biopelículas, las MSCRAMM (componentes de la superficie microbiana que reconocen las moléculas de la matriz adhesiva), entre las cuales se encuentran las toxinas (α y β) y las proteínas de unión a la fibronectina y fibrinógeno (84).

- **Factores de virulencia**

Las infecciones provocadas por *S. aureus* están asociadas con sus factores de virulencia que le facilitan adherirse a las superficies, invadir tejidos, eludir el sistema inmunológico y generar efectos tóxicos nocivos para el hospedador (85).

Algunos factores de virulencia incluyen las proteínas de superficie que facilitan la colonización de los tejidos, las invasinas (como la cinasa, leucocidina y hialuronidasa) que favorecen la expansión bacteriana en el tejido, y los factores de superficie (como la proteína A y la microcápsula) que bloquean la fagocitosis, así como diversas propiedades bioquímicas (como carotenoides y catalasas que favorecen la supervivencia en los fagocitos), factores coagulantes como la estafilocinasa y la coagulasa, así como toxinas que destruyen membranas (leucocidina, hemolisina y leucotoxina,) que lisan las membranas eucarióticas. También incluyen exotoxinas (SE A-G, TSST-1, ET) que dañan los tejidos, y la resistencia intrínseca o adquirida a los antibióticos (79).

Aislamiento e identificación

Medios de cultivo

S. aureus crece tras una incubación de 18 a 24 horas, formando colonias de 0.5 y 1.5 mm; estas colonias son elevadas, lisas, brillantes y con bordes bien definidos, presentan una consistencia cremosa y una coloración que varía de amarillo a dorado, lo que se debe a la producción de carotenoides (80).

La mayoría de las cepas generan β -hemólisis alrededor de las colonias cuando se cultivan en agar sangre; esta bacteria se distingue de otras especies por su capacidad de producir coagulasa, lo que se manifiesta en su habilidad para coagular el plasma; además, es resistente al calor y a la deshidratación, y puede crecer en medios con altas concentraciones de cloruro de sodio (NaCl al 7.5%) (80).

Identificación

S. aureus se identifica mediante la tinción de Gram y pruebas bioquímicas, como la fermentación de la glucosa y la catalasa, con el fin de diferenciarlo del género *Micrococcus*, que también da positivo en catalasa pero no fermenta glucosa; sin embargo, la prueba de la coagulasa es la más comúnmente empleada, ya que se basa en la capacidad de *S. aureus* para producir una enzima extracelular que coagula el plasma, la detección de coagulasa permite distinguir *S. aureus* coagulasa positivo de otras especies de estafilococos (80).

Otras pruebas específicas incluyen la fermentación de manitol y la producción de fosfatasa alcalina, además, se puede identificar utilizando técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)(80).

Para detectar la resistencia a la meticilina en las cepas SARM, se utiliza la metodología de difusión en agar Mueller-Hinton hipersalino (NaCl al 4 %), con un disco de 1µg de oxacilina, incubado a 35 ° C durante 24 a 48 h (halo de inhibición ≤ 10 mm) (86).

CAPÍTULO III

DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS

3.1. Nivel de Investigación

Explicativo

3.2. Tipo y diseño de estudio

Tipo de estudio: Analítico

Diseño de estudio: Experimental

3.3. Material biológico

- 26 aislamientos de *Staphylococcus aureus* de origen clínico.
- Cepa de referencia de *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™.
- Hojas de *Schinus molle* L. (molle)

3.4. Área de estudio o lugar de muestreo

- Las hojas de *S. molle* L. fueron recolectadas en el distrito, provincia y departamento de Cajamarca, de la Av. Atahualpa, carretera a los Baños del Inca, ubicado a una altitud de 2664 m.s.n.m, latitud -7.16530 y longitud -78.48372 (Apéndice 1).
- Los aislamientos de *S. aureus* fueron proporcionados de otros trabajos de investigación, los cuales fueron obtenidos de muestras clínicas de pacientes atendidos en el Hospital Regional Docente de Cajamarca y el Hospital Simón Bolívar, ambos ubicados en el distrito de Cajamarca (Apéndice 2).

3.5. Toma de muestra

3.5.1. Muestra Vegetal

Se colectó aproximadamente 7 kg de *S. molle* L. (molle) (Apéndice 3), el cual fue transportado al Laboratorio de Botánica del Departamento de Ciencias Biológicas para su identificación taxonómica (Apéndice 4), y posteriormente fue utilizado en la elaboración de los extractos vegetales.

3.6. Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos

3.6.1. Reactivación de los aislamientos y la cepa de referencia de *S. aureus* ATCC® 25923™.

Los aislamientos clínicos obtenidos y la cepa de referencia de *S. aureus* fueron reactivados en placas con agar sangre, el cual se preparó pesando 8 g de agar base sangre disuelto en 200 mL de agua destilada, después se colocó en un matraz, se homogeneizó y se llevó a la cocina para activar el agar; cuando llegó al punto de ebullición se retiró el matraz y se colocó una tapa de gasa, papel aluminio y papel kraft sujetado por pabilo, luego se esterilizó en el autoclave a 121 °C. Transcurrido los 25 min de esterilización se sacó y se dejó enfriar hasta los 45 °C aproximadamente, cuando estuvo en la temperatura adecuada se adicionó la sangre estéril previamente extraída; con movimientos rotatorios suaves (para evitar la hemólisis) se homogeneizó y se sirvió en placas Petri, finalmente se esperó a que solidificara.

En las placas Petri con agar sangre se sembró por agotamiento en 4 cuadrantes, luego se incubaron por 24 horas a 37 °C, transcurrido el tiempo se evidenció el crecimiento, donde se observó colonias aisladas de color blanco y amarillo, copuladas de 1 a 3 mm de diámetro; de las colonias aisladas se traspasaron a viales.

Para la preparación de viales se utilizó agar base sangre, se pesó 8 g por 200 mL de agua destilada, se llevó a la cocina para activar el agar y disolver, después con una pipeta y una pera de goma, se tomó 5 mL del medio y se colocó en cada vial, luego se tapó con una torunda de algodón y papel aluminio y se esterilizó en el autoclave; después se dejó enfriar de forma inclinada para que tuviera el pico de flauta; una vez frío se sembró las colonias por estría y se incubó por 24 horas a 37 °C, pasado el tiempo de incubación se realizó las pruebas de corroboración.

A los cultivos puros de 24 horas se realizó tinción Gram (observándose la morfología de los cocos grampositivos en un microscopio óptico), también se llevaron a cabo la prueba de catalasa (catalasa positiva) y la prueba de la coagulasa (coagulasa positiva) (Apéndice N° 5). Los aislamientos seleccionados que presentaron características adecuadas se conservaron en viales con agar base sangre a 4 °C, hasta ser utilizados en las pruebas de sensibilidad antibacteriana con los extractos de *S. molle* L.

3.6.2. Obtención de los extractos de *S. molle* L.

a. Muestra vegetal

Se recolectó la muestra vegetal de la Av. Atahualpa de la ciudad de Cajamarca de manera al azar y se transportó al laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Cajamarca, donde las hojas fueron separadas del tallo y se eliminaron los residuos presentes con agua corriente, después fueron lavadas con agua destilada y secadas a temperatura ambiente por 2 horas, finalmente se colocaron en papel kraft para posteriormente llevarlas a secar por 30 días en la sombra a temperatura ambiente; transcurrido el tiempo, las hojas secas fueron pulverizadas con una licuadora y luego conservadas en bolsas ziploc hasta su uso (Apéndice N° 6).

b. Extracto acuoso

El extracto acuoso (EA), se obtuvo por el método de infusión se prepararon las 4 concentraciones independientemente (25 %, 50 %, 75 % y 100 %) (87) , de la siguiente manera:

Tabla 1: Preparación de las concentraciones del EA

Concentración	25 %	50 %	75 %	100 %
Hojas secas pulverizadas	25 g	50 g	75 g	100 g
Agua destilada estéril recién hervida	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL

Después de pesar las hojas secas pulverizadas se colocaron respectivamente en cada frasco con 100 mL de agua destilada estéril recientemente hervida (en un beacker en la cocina), posteriormente se dejó reposar durante 10 minutos, luego se filtró con gasa estéril, papel filtro Wathman N° 40 y un embudo, el filtrado obtenido se colocó en envases de color ámbar previamente rotulados, para luego ser conservados en refrigeración (4 °C), hasta las 24 horas que se utilizó (Apéndice N° 7).

c. Extracto etanólico

El extracto etanólico se elaboró por maceración alcohólica, de las hojas secas y pulverizadas, se pesó 100 g y se colocó en un recipiente de vidrio color ámbar con la ayuda de un embudo, después se añadió 1 L de alcohol (96 %) y se dejó macerar por 10 días; posteriormente, el macerado, se filtró con gasa estéril y con papel filtro Wathman N° 40; luego el filtrado fue vertido en un frasco ámbar para protegerlo de la luz solar, para ser transportado al laboratorio de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Cajamarca, en donde fue concentrado en el rotavapor, con el fin de separar el alcohol de los compuestos activos del extracto vegetal. Se colocó 400 mL del extracto vegetal en el balón del rotavapor y se programó a 70 RPM (revoluciones por minuto) y 55 °C de temperatura por 90 minutos, pasado el tiempo se retiró el matraz de destilación y se vertió el extracto concentrado en un frasco envuelto con papel aluminio que se dejó enfriar, luego fue vertido a un envase de color ámbar, se rotuló y se conservó en refrigeración a 4°C hasta su posterior uso (Apéndice N° 8).

d. Extracto hidroalcohólico (EH)

A partir del extracto etanólico al 100 % (EE), se obtuvieron las concentraciones de 25 %, 50 % y 75 %; de la siguiente manera:

Tabla 2: Preparación de las concentraciones del EH

Concentración	25 %	50 %	75 %
EE 100%	7.50 mL	15.00 mL	22.50 mL
Agua destilada estéril	22.50 mL	15.00 mL	7.50 mL

EE: Extracto etanólico puro (100 %)

Cada una de las concentraciones se conservaron en frascos de color ámbar, los cuales fueron rotulados y llevados a refrigeración a 4°C, hasta su uso (Apéndice N° 9).

Los extractos acuosos, hidroalcohólicos y etanólico, fueron sembrados en agar sangre para confirmar su esterilidad.

3.6.3. Evaluación del efecto antibacteriano:

a. Método de difusión en agar con Disco

Para la preparación del agar Mueller-Hinton se pesó 19 g de medio de cultivo y se mezcló con 500 mL de agua destilada en un matraz, se activó en la cocina y se esterilizó, se dejó enfriar hasta los 45 °C; luego se sirvió en placas Petri y se dejó solidificar.

Para el inóculo, se reactivó previamente los aislamientos clínicos y la cepa de referencia, de estos cultivos jóvenes de 18-24 horas, se extrajo con el asa bacteriológica colonias que se colocaron en tubos con 2 mL de cloruro de sodio 0.9 %, donde se homogeneizó hasta que se obtuvo la turbidez semejante a la escala de 0.5 de McFarland.

En la suspensión bacteriana se sumergió un hisopo estéril y se rotó 10 veces contra las paredes del tubo, luego se sembró uniformemente sobre la superficie del medio y se dejó secar por 15 minutos (cada aislamiento se sembró por triplicado).

Los discos en blanco Oxoid™ fueron colocados en placas Petri estériles a temperatura ambiente, luego con la micropipeta se tomó 20 µL de cada concentración de los extractos y se colocó sobre cada disco, después los discos empapados fueron colocados sobre la superficie de la placa con unas pinzas estériles; además se colocó un disco de penicilina como control positivo; luego se incubaron las placas por 24 h a 37 C° (Apéndice 10), transcurrido el tiempo se midió el diámetro de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano con una regla milimetrada y se registró en la ficha de recolección de datos (Apéndice 11), para ser clasificados según la escala de Duraffourd.

La disposición del orden de los discos empapados en la placa para los extractos acuoso, hidroalcohólico y etanólico se muestran en el apéndice 12.

b. Difusión en pozo

En el agar Mueller-Hinton ya solidificado, se hizo 6 perforaciones de 6 mm con un sacabocados estéril para los extractos etanólico e hidroalcohólico y 5 perforaciones más en otra placa Petri para el extracto acuoso.

Los aislamientos y la cepa de referencia de *S. aureus* fueron sembrados por triplicado en el medio Mueller-Hinton con los pozos, luego se dejó secar por 15 minutos; transcurrido el tiempo, a cada pozo se añadió 20 µL de los extractos, agua y alcohol como controles respectivamente (apéndice 13 y 14), después se incubó a 37° C por 24 h y posteriormente se midió el diámetro de los halos de inhibición y se anotó en la ficha de recolección de datos (apéndice 11).

Con los valores obtenidos de los diámetros de inhibición en mm, se calculó el porcentaje del efecto inhibitorio relativo al control positivo y aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \left(\frac{\text{Halo extracto} - \text{Halo blanco}}{\text{Halo control positivo} - \text{Halo blanco}} \right)$$

Fig. 1. Fórmula del efecto inhibitorio

Fuente: Cruz A, Rodríguez N y Rodríguez C. Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano de los extractos de *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* y *Silybum marianum*. Rev. Actual Divulgación Científica. 2010; 13 (2):117–24

Donde el efecto inhibitorio (porcentaje de inhibición %), se considera alto cuando su porcentaje de inhibición relativo es mayor a 70 %, intermedio cuando está entre el 50 % a 70 % y bajo cuando es menor a 50 % (88).

3.7. Técnicas de Procesamiento y Análisis de Datos

Los datos se ingresaron y procesaron en una base de datos utilizando el software estadístico IBM SPSS Statistics versión 23. Para determinar el diámetro de los halos de inhibición, se calcularon medidas de tendencia central (media aritmética y mediana) y de dispersión (desviación estándar y rango intercuartil); los diámetros de inhibición según la concentración y el tipo de extracto se transformaron a una escala de valoración basada en Duraffourd.

Para el análisis estadístico descriptivo se tuvo en cuenta el promedio de los halos de inhibición y las frecuencias según la escala mencionada. Para el análisis estadístico diferencial se consideró la conformación de grupos según la concentración y tipo de extracto, comparando los promedios de los halos de inhibición obtenidos mediante la prueba de ANOVA a fin de establecer diferencias estadísticas significativas entre ellos, considerando un nivel de confianza de 95 % y un p-valor < 0.05 .

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

4.1.1. Aislamientos clínicos y cepa de referencia de *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™

De los 26 aislamientos clínicos el 84.60 % fueron resistentes a la penicilina, mientras que la cepa para el control de calidad del experimento *S. aureus* ATCC® 25923™ fue susceptible y estuvo dentro de los parámetros estándar según los datos del NCCLS (**Anexo 1**).

4.1.2. Evaluación del efecto antibacteriano

Se demostró que todos los aislamientos de origen clínico y la cepa de referencia de *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™, fueron sensibles a los extractos etanólico, hidroalcohólico y acuoso de *Schinus molle* L., teniendo como resultados diferentes medidas de halos de inhibición (en mm); dependiendo del tipo de extracto, de las concentraciones (100 %, 75 %, 50 % y 25 %) y del método utilizado (disco y pozo); datos de los cuales se determinó sus principales medidas descriptivas (**Tabla 3**).

Tabla 3. Diámetros de los halos de inhibición (mm) de los extractos acuoso, hidroalcohólico y etanólico de *S. molle* L. sobre *S. aureus* de origen clínico.

Tipo de Extracto	Grupo	Media (mm)	Mediana (mm)	Desviación Estándar	Rango Intercuartil
Extracto Acuoso	DEA	9.39	9.33	0.73	0.50
	PEA	10.95	11.00	1.19	1.00
Extracto Etanólico	DEE	9.84	9.67	1.07	1.33
	PEE	13.37	13.67	1.59	1.67
Extracto Hidroalcohólico	DEH75	9.11	9.00	1.10	1.33
	DEH50	8.32	8.33	0.81	1.33
	DEH25	7.60	7.33	0.70	1.00
	PEH75	12.34	12.33	1.53	1.33
	PEH50	11.22	11.33	1.54	1.67
	PEH25	9.87	10.00	1.44	2.00
	Control Negativo	Agua	6.00	6.00	0.00
Alcohol		6.00	6.00	0.00	0.00
Control Positivo *	PE	23.91	20.00	9.19	14.10

*Valores determinados para aislamientos que presentaron halos de inhibición frente a penicilina.

DEA: Extracto acuoso en disco
PEA: Extracto acuoso en pozo
DEE: Extracto etanólico en disco
PEE: Extracto etanólico en pozo

DEH75: EH 75% en disco
DEH50: EH 50% en disco
DEH25: EH 25% en disco
PEH75: EH 75% en pozo

PEH50: EH 50% en pozo
PEH25: EH 25% en pozo
PE: Penicilina

Las medianas del promedio de los halos de inhibición se clasificaron según la escala de Duraffourd; los resultados obtenidos indican que el extracto acuoso al 100 %, el extracto etanólico al 100 % y todas las concentraciones del extracto hidroalcohólico presentan efecto antibacteriano moderado (sensible +) frente a *S. aureus* (Tabla 4).

Tabla 4. Escala de Duraffourd de los diámetros de inhibición (mm), de los extractos acuoso, etanólico e hidroalcohólico de *S. molle* L. sobre *S. aureus*

Tipo de Extracto	CC	Método (diámetro)		Escala Duraffourd	
		Disco (mm)	Pozo (mm)	Disco	Pozo
Extracto Acuoso	100 %	9.33	11.00	Sensible +	Sensible +
	75 %	6.00	6.00	Nula	Nula
	50 %	6.00	6.00	Nula	Nula
	25 %	6.00	6.00	Nula	Nula
Extracto Etanólico	100 %	9.67	13.67	Sensible +	Sensible +
	75 %	9.11	12.33	Sensible +	Sensible +
Extracto Hidroalcohólico	50 %	8.33	11.33	Sensible +	Sensible +
	25 %	7.33	10.00	Sensible +	Sensible +

CC: Concentración

Igualmente, en la tabla 5, se observa el análisis de tipo cualitativo según la escala de Duraffourd, en la cual se indica el grado de sensibilidad de los 26 aislamientos clínicos y de la cepa de referencia frente a los 3 tipos de extractos de molle y a las diferentes concentraciones, evaluados por triplicado mediante los métodos de difusión en agar con disco y pozo. Se halló que algunos aislamientos de *S. aureus* presentaron sensibilidad nula (-), otros fueron sensibles (+) y otros muy sensibles (++), frente a las concentraciones del extracto acuoso, etanólico e hidroalcohólico; de igual modo, frente a la penicilina (PE) se encontró aislamientos con sensibilidad nula (-), muy sensibles (++) y extremadamente sensibles (+++). Además, con respecto al control positivo, el 33.33 % de *S. aureus* tuvo sensibilidad nula a la penicilina según la escala de Duraffourd, sin embargo, estos aislamientos fueron sensibles (+) a los extractos de molle.

También, en el análisis se observa que existen diferencias significativas entre los grados de sensibilidad de los grupos estudiados ($p < 0.05$).

Tabla 5. Escala de Duraffourd (en porcentaje) de los extractos acuoso, etanólico e hidroalcohólico de *S. molle* L. frente a *S. aureus*.

Tipo de Extracto	Grupo	Escala de Duraffourd				p valor
		Nula	Sensible (+)	Muy Sensible (++)	Extremadamente Sensible (+++)	
Extracto Acuoso	DEA	-	100.00 %	-	-	0.000
	PEA	-	96.30 %	3.70 %	-	
Extracto Etanólico	DEE	3.70 %	96.30 %	-	-	
	PEE	-	63.00 %	37.00%	-	
Extracto Hidroalcohólico	DEH75	14.80 %	85.20 %	-	-	
	DEH50	44.40 %	55.60 %	-	-	
	DEH25	77.80 %	22.20 %	-	-	
	PEH75	-	96.30 %	3.70 %	-	
	PEH50	-	96.30 %	3.70 %	-	
	PEH25	11.10 %	85.20 %	3.70 %	-	
Control Positivo	PE	33.33 %	-	25.93%	40.74%	
Control Negativo	Agua Alcohol	100.00 %	-	-	-	

DEA: Extracto acuoso en disco
 PEA: Extracto acuoso en pozo
 DEE: Extracto etanólico en disco
 PEE: Extracto etanólico en pozo

DEH75: EH 75 % en disco
 DEH50: EH 50 % en disco
 DEH25: EH 25 % en disco
 PEH75: EH 75 % en pozo

PEH50: EH 50 % en pozo
 PEH25: EH 25 % en pozo
 PE: Penicilina

Tabla 6. Pruebas estadísticas de Mann-Whitney por pares entre los extractos acuoso, etanólico e hidroalcohólico de *S. molle* L. frente a *S. aureus* mediante los métodos del disco y pozo.

Tipo de Extracto	Pares	Grupo	Rango promedio (mm)	Suma de rangos	p valor
Extracto Acuoso	Par 1	DEA	17.20	464.50	0.000
		PEA	37.80	1020.50	
Extracto Etanólico	Par 2	DEE	15.17	409.50	
		PEE	39.83	1075.50	
Extracto Hidroalcohólico	Par 3	DEH75	15.09	407.50	
		PEH75	39.91	1077.50	
	Par 4	DEH50	15.24	411.50	
		PEH50	39.76	1073.50	
	Par 5	DEH25	15.80	426.50	
		PEH25	39.20	1058.50	

DEA: Extracto acuoso en disco
 PEA: Extracto acuoso en pozo
 DEE: Extracto etanólico en disco
 PEE: Extracto etanólico en pozo

DEH75: EH 75% en disco
 DEH50: EH 50% en disco
 DEH25: EH 25% en disco
 PEH75: EH 75% en pozo

PEH50: EH 50% en pozo
 PEH25: EH 25% en pozo
 PE: Penicilina

a) Extracto acuoso

De los extractos acuosos de molle, solo el 100 % de concentración tuvo efecto inhibitorio moderado (sensible +), con un halo de inhibición promedio de 9.33 ± 0.50 mm en el método del disco y 11.00 ± 1.00 mm con el método del pozo; mientras que las concentraciones del 75 %, 50 % y 25 % produjeron halos menores a 9.00 mm (**Tabla 4**), lo que indica un efecto nulo según la escala de Duraffourd. Además, el 100 % de *S. aureus* estudiados fueron sensibles (+) al extracto acuoso con el método del disco, mientras que con el método del pozo un 96.30 % fueron sensibles (+) y un 3.70 % muy sensibles (++) (**Tabla 5**).

Por otro lado, al comparar los datos del efecto antibacteriano del extracto acuoso al 100 % de los métodos del pozo (PEA) y del disco (DEA), se encontró diferencias significativas entre ambos grupos según la prueba de Mann-Whitney ($p < 0.05$), la cual muestra como resultado 17.20 de rango promedio para disco y 37.80 para pozo (**Tabla 6**), lo que implicaría que en el método del pozo hay valores superiores a los del disco y, por lo tanto, este método favorece un mayor efecto inhibitorio del extracto.

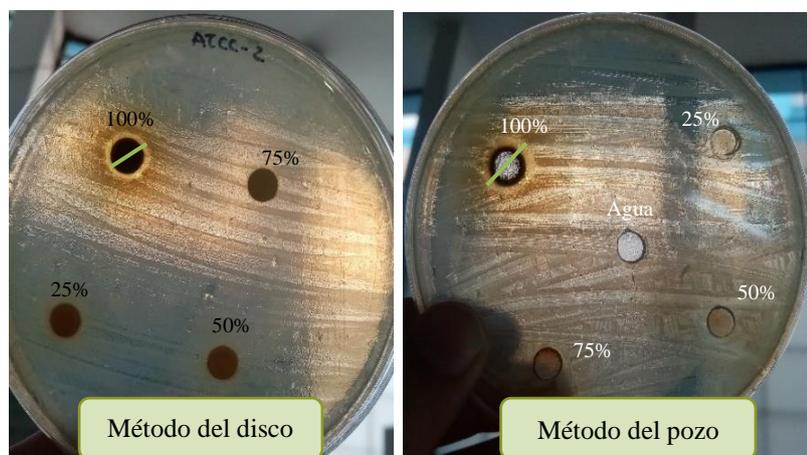


Figura 2. Efecto inhibitorio moderado (sensible +) al 100 % del extracto acuoso de molle y nulo a las concentraciones de 75 %, 50 % y 25 % sobre *S. aureus* ATCC® 25923™.

b) Extracto etanólico

El extracto etanólico (EE) de molle al 100 % exhibió una mediana de diámetros de halos de inhibición de 9.67 ± 1.33 mm para disco y 13.67 ± 1.67 mm para pozo (**Tabla 3**). Este extracto es el que mayor promedio de halos de inhibición tiene, con respecto a las demás concentraciones y tipos de extractos, sin embargo, según la escala de Duraffourd, también presenta un efecto inhibitorio moderado (sensible +) (**Tabla 4**).

Asimismo, con el método del disco los aislamientos de *S. aureus* produjeron un 3.70 % de sensibilidad nula (-) y un 96.30 % de sensibilidad (+) frente al EE, mientras que con el método del pozo un 96.30 % fueron sensibles (+) y un 3.70 % muy sensible (++), estos resultados indican efectividad en la mayoría de los aislamientos estudiados (**Tabla 5**). Además, se evidenció que la mediana de ambos tipos de métodos fue menor a la del control positivo (Penicilina), que fue de 23.91 ± 14.10 mm (**Tabla 3**).

Por otro lado, al comparar el efecto inhibitorio del EE al 100 % con los métodos del pozo (PEE) y del disco (DEE), se encontró diferencias significativas entre ambos grupos, según la prueba de Mann-Whitney, la cual muestra 15.17 de rango promedio para disco y 39.83 para pozo (**Tabla 6**); lo que significa que el método del pozo potencia la actividad del extracto de forma más óptima comparado con el método del disco, con valores promedio de halos de inhibición mayores.

c) **Extracto hidroalcohólico**

Los extractos hidroalcohólicos de molle (EH) a las concentraciones del 75 %, 50 % y 25 %, también tuvieron un efecto moderado (Sensible +), sobre los aislamientos clínicos y la cepa de referencia de *S. aureus* (**Tabla 4**). Además, se demostró que el efecto inhibitorio y la concentración del EH tienen relación directa, puesto que, cuando la concentración disminuye también disminuye el efecto.

De igual manera, en la **Tabla 3** se describe los datos de los halos de inhibición de las concentraciones del 75 %, 50 % y 25 % del EH para ambos métodos, las medianas encontradas fueron 9.00 ± 1.33 mm, 8.33 ± 1.33 mm, 7.33 ± 1.00 mm, 12.33 ± 1.33 mm, 11.33 ± 1.67 mm y 10.00 ± 2.00 mm respectivamente. Para el caso del testigo (alcohol 96°), no se observaron halos de inhibición en ninguno de los ensayos realizados; por lo tanto, se obtuvo halos promedio de 6.00 ± 0.00 mm y de igual manera fue para el control negativo (agua), pero, para el control positivo el diámetro promedio fue de 23.91 ± 14.10 mm.

Por otra parte, en la comparación de los diámetros de los halos de inhibición del EH a las concentraciones de 75%, 50% y 25%, mediante los métodos del pozo y disco, se encontró diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0,05$), entre los 6 grupos (DEH75: EH 75 % en disco, DEH50: EH 50 % en disco, DEH25: EH 25 % en disco, PEH75: EH 75 % en pozo, PEH50: EH 50 % en pozo y PEH25: EH 25% en pozo), según la prueba estadística de Kruskal Wallis.

En la comparación por parejas entre los grupos del EH, las diferencias estadísticas significativas se encontraron entre los métodos del disco y del pozo, en los grupos de DEH 25 y PEH 25, DEH 50 y PEH 50 y DEH 75 y PEH 75; además, con respecto al método del disco no hubo diferencias significativas entre las concentraciones del 75 %, 50 % y 25 %; sin embargo, con el método del pozo si hubo diferencias entre el 25 % y el 75 %.

De los 6 grupos, los que mejores resultados tuvieron, fueron las concentraciones del 75 %, tanto con el método del disco como del pozo; según la Prueba de Mann Whitney ambos grupos presentan diferencias estadísticas significativas, donde la que mejor rango promedio tiene es el método del pozo con 39.91 (**Tabla 6**), lo que indica que este método potencia el efecto de inhibición bacteriana del extracto.

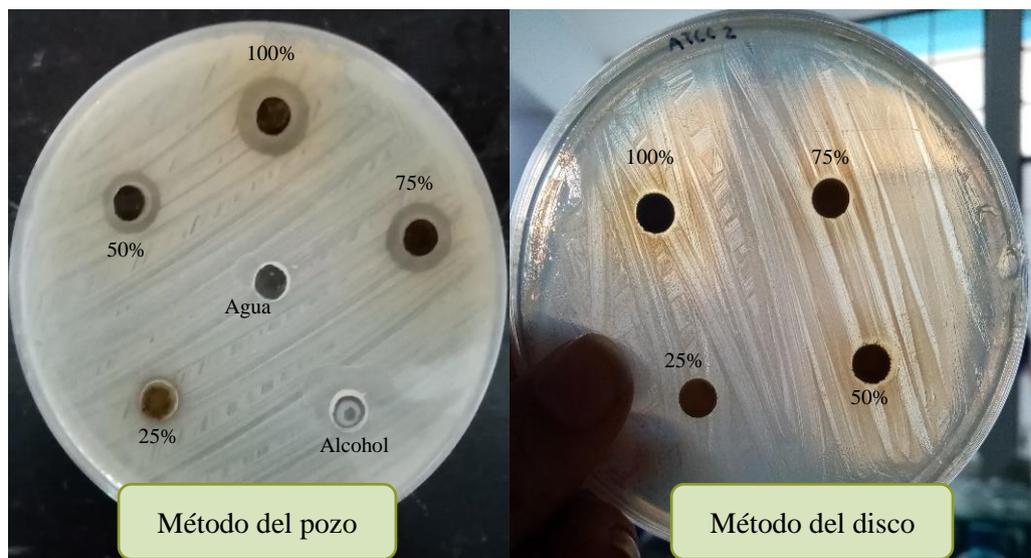


Figura 3. Efecto inhibitorio moderado del extracto etanólico de molle al 100 % y del extracto hidroalcohólico al 75 %, 50 % y 25 % sobre *S. aureus* ATCC® 25923™.

4.1.3. Porcentaje del efecto antibacteriano

De los datos de los halos de inhibición en mm se calculó el porcentaje del efecto antibacteriano de cada uno de los grupos de estudio, de los cuales también se realizó sus principales medidas descriptivas (**Tabla 7**).

Tabla 7. Porcentaje de inhibición (%) de los extractos acuoso, etanólico e hidroalcohólico de *S. molle* L. sobre *S. aureus* de origen clínico.

Tipo de Extracto	Grupo	Media (mm)	Mediana (mm)	Desviación Estándar	Rango Intercuartil	Min.	Max.
Extracto Acuoso	DEA	21.84	23.60	8.91	15.50	7.60	37.10
	PEA	33.37	34.97	13.70	21.23	11.77	59.26
Extracto Etanólico	DEE	25.30	27.56	10.92	21.98	7.60	41.29
	PEE	47.97	47.62	21.88	37.31	14.28	92.59
Extracto Hidroalcohólico	DEH75	19.82	20.05	9.05	21.98	5.71	32.49
	DEH50	15.57	15.03	7.98	15.27	4.76	26.59
	DEH25	10.86	10.00	5.76	11.16	2.94	20.65
	PEH75	41.77	43.30	19.30	33.53	8.57	62.96
	PEH50	34.55	38.88	16.05	25.48	8.57	62.96
	PEH25	24.50	21.95	13.25	21.28	3.81	47.19

DEA: Extracto acuoso en disco

PEA: Extracto acuoso en pozo

DEE: Extracto etanólico en disco

PEE: Extracto etanólico en pozo

DEH75: EH 75 % en disco

DEH50: EH 50 % en disco

DEH25: EH 25 % en disco

PEH75: EH 75 % en pozo

PEH50: EH 50 % en pozo

PEH25: EH 25 % en pozo

El máximo porcentaje del efecto antibacteriano es de 47.97 %, perteneciente al resultado del extracto etanólico con el método del pozo; sin embargo, el porcentaje es menor a 50 % lo que es considerado como bajo.

4.2. Discusión

El objetivo principal de este trabajo fue determinar el efecto antibacteriano del extracto acuoso, hidroalcohólico y etanólico de *Schinus molle* L. sobre el crecimiento *in vitro* de *Staphylococcus aureus* de origen clínico, los resultados obtenidos muestran que independientemente al tipo de extracto que se utilice, las hojas del molle tienen efecto antibacteriano moderado frente a los aislamientos clínicos de *S. aureus*.

De los aislamientos clínicos de este estudio el 84.60 % fueron resistentes a la penicilina, esto concuerda con la información de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), ya que menciona que actualmente, en muchas regiones geográficas la resistencia a la penicilina excede el 90 % debido a la alta producción de penicilinasas (un tipo de beta-lactamasas) por parte de las bacterias, las cuales hidrolizan el anillo beta-lactámico de la penicilina (89).

Con respecto al extracto acuoso de molle al 100 %, se registró la formación de halos de inhibición con un promedio de 9.33 ± 0.50 mm y 11.00 ± 1.00 mm mediante el método del disco y pozo respectivamente, frente a los aislamientos clínicos y la cepa de referencia de *S. aureus*. Esta metodología es similar a la empleada por Alfaro y Ruiz (2018), quienes también trabajaron con la cepa de referencia de *S. aureus* ATCC 25923; en sus resultados muestran que la actividad antibacteriana del extracto acuoso varía del 40 % al 100 % (21), lo cual, son resultados parecidos a los de este trabajo, ya que también se encontró efecto antibacteriano al 100 %.

En cuanto al extracto etanólico al 100 % los resultados semejantes a los reportados por Cruz *et al* (2010), quienes también evaluaron la actividad antibacteriana del extracto etanólico con los métodos del disco y pozo, encontrando como resultado halos promedio de 10.33 y 27.00 mm con porcentajes de inhibición relativa de 54.30% y 63.10% respectivamente, los cuales son valores similares a los encontrados en esta investigación, 9.67 mm y 13.67 mm con un porcentaje de 27.60 % y 47.70 %. Además, en los trabajos de Cruz *et al.* (2010) y de Gualtieri *et al.* (2012), las cepas de referencia de *S. aureus* presentaron sensibilidad (+), en relación al extracto etanólico de *S. molle* L. (15)(16), resultado que es semejante con el obtenido en este trabajo.

En relación al extracto hidroalcohólico de molle, existen investigaciones con resultados similares a los encontrados en esta investigación, tal como el trabajo de Guzmán y Rodríguez (2021), quienes evidenciaron que el extracto hidroalcohólico de molle al 50 % produce un promedio de halo de inhibición de 13.33 ± 0.39 mm (23), dato que es parecido a los de este estudio (8.33 ± 1.33 mm y 11.33 ± 1.67 mm); en cuanto a las otras concentraciones, la cepa de referencia de *S. aureus* fue muy sensible (++) al extracto del 60 % y sumamente sensible (+++) al 75 % y 90 % (23), sin embargo, estos resultados son diferentes a los de este trabajo, ya que todos los aislamientos clínicos y la cepa de referencia de *S. aureus* demostraron tener sensibilidad (+) frente a los extractos hidroalcohólicos al 25 %, 50 % y 75 %.

Los resultados de esta investigación han mostrado diferentes diámetros de halos de inhibición a los reportados por otros autores; esto se puede atribuir a distintos factores, tales como los aislamientos utilizados (*S. aureus*), el método de extracción, la composición fitoquímica del molle y los principios activos presentes en los extractos.

En primer lugar, este estudio se realizó con aislamientos clínicos, de los cuales algunos tuvieron resistencia a la penicilina, esto originada por mutaciones adaptativas en el ambiente del cual fueron aisladas, es decir, a partir de muestras clínicas, mientras que en otras investigaciones se utilizaron cepas de referencia, las cuales son organismos que no tienen resistencia ni mutaciones asociados a ella. Es considerable resaltar, que teóricamente, se sabe que un aislamiento bacteriano tiende a desarrollar en mayor proporción sus factores de virulencia que una cepa de referencia (ATCC)(15); por lo tanto, la mayor virulencia de los aislamientos clínicos podría haber influido en la menor efectividad observada en los halos de inhibición en comparación con estudios previos donde utilizaron cepas de referencia.

También depende del tipo de materia vegetal, ya que las actividades biológicas de los extractos vegetales se atribuyen a sus compuestos conocidos como principios activos; estos componentes pueden variar entre plantas, incluso si son de la misma especie o si provienen de la misma región, los metabolitos secundarios cambian y su porcentaje de disponibilidad de igual manera (17).

La variación en la composición de los fitoconstituyentes depende de la variabilidad genética, ubicación geográfica, factores ecológicos, condiciones climáticas, el efecto de las diferencias intraespecíficas, las condiciones de crecimiento del suelo y el proceso de extracción (90). Por esta razón, los hallazgos obtenidos en este trabajo son distintos a las investigaciones previas, ya que la composición fitoquímica del molle recolectado en Cajamarca es diferente a los previamente utilizados.

La actividad antibacteriana frente a *S. aureus* está relacionada a la composición fitoquímica del molle. Según la literatura citada, los componentes antibacterianos son los flavonoides, triterpenos / esteroides, compuestos fenólicos, quinonas, lactonas α , lactonas β insaturadas, saponinas (22) y taninos (91). Dichos componentes se encuentran presentes en las hojas de *S. molle* L. proveniente de Cajabamba - Cajamarca, hecho que ha sido corroborado por otro estudio (92). Por lo tanto, estos compuestos podrían estar presentes en el molle recolectado en la ciudad de Cajamarca.

El efecto antibacteriano del molle sobre los aislamientos clínicos de *S. aureus*, fue similar a los trabajos de otros autores, quienes observaron la inhibición del crecimiento bacteriano solo en bacterias grampositivas como *S. aureus*, ya que los mecanismos de acción que tienen los fitoconstituyentes presentes en los extractos solo actúan sobre este tipo de bacteria (15)(16). Estos compuestos actúan principalmente sobre la membrana celular bacteriana.

Los ácidos fenólicos son compuestos que alteran la hidrofobicidad y la carga superficial de la membrana, provocando una desestabilización del citoplasma (47); por otro lado, los terpenos, taninos y lignanos desorganizan la membrana citoplasmática bacteriana (49) (53), los flavonoides alteran la fosforilación oxidativa e inhiben la formación de ATP (52) y las saponinas se unen a los esteroides presentes en las membranas celulares formando complejos, alterando su permeabilidad y provocando lisis celular (56).

Finalmente, en la comparación de los extractos acuosos, etanólico e hidroalcohólicos por medio de los métodos del disco y pozo, tanto para los halos de inhibición como para el porcentaje de inhibición relativo, se evidenció que con el método del pozo los extractos exhiben mejor desempeño comparado al método del disco, lo que concuerda con la literatura, que señala que al añadir los extractos en los pozos del agar, se concentra y difunde una mayor cantidad de los mismos, facilitando así la evaluación de su potencial antibacteriano (93).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Schinus molle L., independientemente del tipo de extracto utilizado (acuoso, hidroalcohólico y etanólico), tuvo actividad antibacteriana moderada (sensible +), sobre el crecimiento *in vitro* de los 26 aislamientos de origen clínico y de la cepa de referencia de *Staphylococcus aureus*.

Las concentraciones más altas de los extractos (100 % y 75 %) generaron halos de inhibición de mayor diámetro en ambos métodos empleados para la evaluación.

Los métodos del disco y del pozo fueron efectivos para evaluar el efecto antibacteriano de los extractos; sin embargo, el método del pozo presentó mejor rendimiento al evaluar el efecto de los extractos.

5.2. Recomendaciones

- Se recomienda que para obtener el porcentaje del efecto inhibitorio en aislamientos clínicos se debe usar como control positivo un antibiótico que sea eficiente tanto en cepas sensibles como resistentes.

LISTA DE REFERENCIAS

1. Mastromónaco G. Criterios para asegurar la trazabilidad y calidad de los cultivos microbianos de referencia [Internet]. Universidad Nacional de San Martín; 2015. Available from: <http://www.unsam.edu.ar/institutos/incalin/repositorio/Maestria/GladysMastromonaco.pdf>
2. MINSA (Ministerio de salud). Manual de buenas prácticas de dispensación - Ministerio de salud (DIGEMID), Perú 2009 [Internet]. Lima; 2009. Available from: http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/1022_DIGEMID58.pdf
3. Picazo J. Procedimientos en microbiología clínica: Métodos básicos de la sensibilidad a los antimicrobianos. Soc Española Enfermedades Infecc y Microbiol Clínica. 2000;1(2):1–54.
4. Ramírez Heredia RC, Soto Macetas RW. Efecto antibacteriano del aceite esencial de las hojas de molle (*Schinus molle* L.) frente a cepas de *Escherichia coli* in vitro [Internet]. Universidad Inca Garcilaso de la Vega; 2018. Available from: http://repositorio.uigv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.11818/2891/TESIS_SOTO_MACETAS_RUDY-RAMIREZ_HERESIA_ROSA.pdf?sequence=3&isAllowed=y
5. Savin A, Anderson EE, Dyzenhaus S, Podkowik M, Shopsin B, Pironti A, et al. *Staphylococcus aureus* senses human neutrophils via PerR to coordinate the expression of the toxin LukAB. Am Society Microbiol. 2024;92(2):1–15.
6. Massey R, Horsburgh M, Lina G, Höök M, Recker M. The evolution and maintenance of virulence in *Staphylococcus aureus*: a role for host-to-host transmission? Nat Rev Microbiol [Internet]. 2006;4(12):953–8. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1551>
7. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Patógenos multirresistentes que son prioritarios para la OMS [Internet]. 2021. Available from: <https://www.paho.org/es/noticias/4-3-2021-patogenos-multirresistentes-que-son-prioritarios-para-oms#:~:text=- Staphylococcus aureus resistente a la,y en el hospitaly endocarditis.>
8. Organización Mundial de la Salud (OMS). Lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos [Internet]. 2017. p. 2–5. Available from: <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
9. OMS. Resistencia a los antimicrobianos [Internet]. Vol. 43. 2021. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
10. Ávila L, Baquero E, Viña A, Murillo E. Actividad antibacteriana de *Diplostephium tolimense* Cuatrec. (*Astereaceae*) frente a *Staphylococcus aureus*. Vitae, Rev La Fac Química Farm. 2006;13:5–60.
11. Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. Brazilian J Microbiol. 2000;31(4):247–56.
12. Domingo D, López Brea M. Orthosilicic acid and seaweed extract alleviate the deteriorative effects of high temperature stress in *Brassica juncea* (L.) Czern & Coss. Rev Española Quimioter. 2003;16(11):485–393.
13. Reyes Ortiz DV. Lignanos Biológicamente activos. Univ Córdoba [Internet]. 2020;2017(1):1–9. Available from: <http://190.119.145.154/handle/20.500.12773/11756>
14. Gundidza M. Antimicrobial activity of essential oil from *Schinus molle* Linn. Cent Afr J Med. 1993 Nov;39(11):231–4.

15. Cruz-Carrillo A, Rodríguez N, Rodríguez CE. Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano de los extractos de *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* y *Silybum marianum*. Rev UDCA Actual Divulg Científica. 2010;13(2):117–24.
16. Gualtieri M, Araque M, Carmona J, Garcia M, Di Bernardo M, Rios N, et al. Actividad antibacteriana del *Schinus molle* L. cultivado en Italia. Rev del Inst Nac Hig Rafael Rangel. 2012;43(2):3–10.
17. Salem MZM, Zayed MZ, Ali HM, Abd El-Kareem MSM. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of extracts from *Schinus molle* wood branch growing in Egypt. J Wood Sci. 2016;62(6):548–61.
18. Turchetti G, Garzoli S, Masci VL, Sabia C, Iseppi R, Giacomello P, et al. Antimicrobial testing of *Schinus molle* L. leaf extracts and fractions followed by GC-MS investigation of biological active fractions. Molecules. 2020;25(8):15.
19. Palomeque Camacho JD. Efecto inhibitorio del extracto de *Schinus molle* L. (Molle), a diferentes tiempos y concentraciones sobre cepas de *Staphylococcus aureus*. Universidad Central del Ecuador Instituto; 2022.
20. Malca-García GR, Hennig L, Ganoza-Yupanqui ML, Piña-Iturbe A, Bussmann RW. Constituents from the bark resin of *Schinus molle*. Rev Bras Farmacogn [Internet]. 2017;27(1):67–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2016.07.004>
21. Alfaro-Pérez MY, Ruiz-Barrueto MA. Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto acuoso de *Schinus molle* sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Rev Cient la Fac Ciencias Biol. 2018;38(1):4–16.
22. Calderón Cóndor KR, Cristóbal Reyna ES. Actividad antibacteriana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Schinus molle* L. (molle) sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 [Internet]. Universidad Inca Garcilaso De La Vega; 2019. Available from: www.uigv.edu.pe/posgrado
23. Guzmán Aybar EC, Rodriguez Baldeon ED. Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* L. (Paico) y *Schinus molle* (molle) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* 2021. Universidad de Huancayo “Frankin Roosevelt”; 2021.
24. Vitón L, Iglesias S, Becerra G, Ruiz C, Calderón C. Susceptibilidad antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* β -hemolítico frente al extracto etanólico de *Schinus molle* L. Rev Cuba Med Nat y Tradic [Internet]. 2022;5(1):232. Available from: <https://revmnt.sld.cu/index.php/rmnt/article/view/232>
25. Iannacone J, Alvariano L. Toxicidad de *Schinus molle* L. (*Anacardiaceae*) a cuatro controladores biológicos de plagas agrícolas en el Perú. Acta Zoológica Mex. 2010;26(3).
26. Yueqin Valencia Z. Identificación y actividad farmacológica de principios de especies antiinflamatorias. Universidad de Valencia. Universidad de Valencia; 2006.
27. Sánchez JM, Cáceres L. *Schinus molle* [Internet]. Vol. 1. 2014. p. 1. Available from: <https://www.arbolesornamentales.es/Schinusmolle.htm>
28. Rzedowski J, Calderon de Rzedowski G. *Anarcadiaceae*. In: Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Michoacán: Instituto de Ecología; 1999. p. 1–52.
29. Zapater MA, Aquino V, Flores C, Lozano E. Clarificación nomenclaturales y circunscripción taxonómica de *Schinus areira* (*Anacardiaceae*) en Argentina. Boletín la Soc Argentina Botánica. 2018;53(4):665–71.
30. Stadler-Kaulich N. Árbol de molle (*Schinus molle*) [Internet]. Espacio Compartido En Sistemas Agroforestales (ECOSAF). 2010. p. 1–3. Available from:

- http://www.ecosaf.org/mollesnejta/Bondades del Molle_2010.pdf
31. Linnaei C. Species plantarum [Internet]. Missouri B. Caroli Linnaei : Species plantarum. 1753. 388 p. Available from: <https://www.biodiversitylibrary.org/item/13829#page/400/mode/thumb>
 32. Cronquist A. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, editor. New York; 1981. 1288 p.
 33. Gasaly N, Riveros K, Gotteland M. Phytochemicals: A new class of prebiotics. *Rev Chil Nutr.* 2020;47(2):317–27.
 34. Alba Gonzalez A, Bonilla Rivera P, Arroyo Acevedo J. Actividad cicatrizante de una pomada con aceite esencial de *Schinus molle* L. (molle) en ganado vacuno con heridas infectadas y en ratones. *Cienc Invest.* 2009;12(1):29–36.
 35. Escamilla Pérez BE, Moreno Casasola P. Plantas medicinales de la Matamba y El Piñonal, municipio de Jamapa, Veracruz. Vol. 1, Instituto de Ecología. Veracruz; 2015. 1–108 p.
 36. Rossini C, Menéndez P, Dellacassa E, Moyna P. Essential oils from leaves of *schinus molle* and *S. Lentiscifolius* of uruguayan origin. *J Essent Oil Res.* 1996;8(1):71–3.
 37. Mejía-Díaz LA, Rutiaga-Quñones JG. Chemical Composition of *Schinus molle* L. Wood and Kraft pulping process. *Rev Mex Ing Química.* 2008;7(2):145–9.
 38. Eryigit T, Yildirim B, Ekici K, Çirka M. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant properties of *Schinus molle* L. essential oil from Turkey. *J Essent Oil-Bearing Plants.* 2017;20(2):570–7.
 39. Rivas da Silva AC, Monteiro Lopes P, Barros de Azevedo MM, Machado Costa DC, Sales Alviano C, Sales Alviano D. Biological activities of α -Pinene and β -Pinene enantiomers. *Molecules.* 2012;17(6):6290–304.
 40. Hanson J. Productos naturales: los metabolitos secundarios. Cambridge: Real Sociedad de Química; 2003. 147 p.
 41. Britos M, Chamorro E, Cáceres M, Fernández D, Ortega S. Aceites esenciales con actividad antibacteriana : posible aplicación y administración en odontología. *Rev Odontol Vital.* 2021;2(35):32–43.
 42. Dziedzic SZ, Hudson BJB. Phenolic acids and related compounds as antioxidants for edible oils. *Food Chem.* 1984;14(1):45–51.
 43. Liu CL, Wang JM, Chu CY, Cheng MT, Tseng TH. In vivo protective effect of protocatechuic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatotoxicity. *Food Chem Toxicol.* 2002;40(5):635–41.
 44. Peñarrieta JM, Tejeda L, Mollinedo P, Vila JL, Bravo JA. Compuestos fenólicos en los alimentos. *Rev Boliv Química [Internet].* 2014;31(2):68–81. Available from: <https://www.redalyc.org/pdf/4263/426339682006.pdf>
 45. Cueva C, Moreno-Arribas MV, Martín-Álvarez PJ, Bills G, Vicente MF, Basilio A, et al. Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Res Microbiol.* 2010;161(5):372–82.
 46. Gill AO, Holley RA. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *Int J Food Microbiol.* 2006;111(2):170–4.
 47. Maddox CE, Laur LM, Tian L. Antibacterial activity of phenolic compounds against the phytopathogen *Xylella fastidiosa*. *Curr Microbiol.* 2010;60(1):53–8.
 48. Cheng SY, Wang BJ, Weng YM. Antioxidant and antimicrobial edible zein/chitosan composite films fabricated by incorporation of phenolic compounds and dicarboxylic acids. *Lwt [Internet].* 2015;63(1):115–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.030>

49. Lee H, Ji YR, Ryoo ZY, Choi MS, Woo ER, Lee DG. Antibacterial mechanism of (-) Nortrachelogenin in *Escherichia coli* O157. *Curr Microbiol.* 2016;72(1):48–54.
50. Leyva E, Navarro-Tovar G, Loredó-Carrillo SE, del Socorro Santos Díaz M. Biosíntesis y actividad biológica de fitoestrógenos y fitoesteroides. *Bol Soc Quím Méx.* 2011;5(6):35–43.
51. Guanoluisa O, Alejandra. M. Evaluación de la actividad cicatrizante de un gel elaborado a base de los extractos de molle (*Schinus molle*), Cola de Caballo (*Equisetum arvense* L.), Linaza (*Linum usitatissimum* L.) en Ratonés (*Mus musculus*). In 2013. Available from: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:194474449>
52. Troisi J, Pulvento C, National I, Vega-galvez A. Saponinas. *Lab Chim Merceol.* 2014;317.
53. Olivás-Aguirre FJ, Wall-Medrano A, González-Aguilar GA, López-Díaz JA, Álvarez-Parrilla E, De La Rosa LA, et al. Taninos hidrolizables; bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud. *Nutr Hosp.* 2015;31(1):55–66.
54. Motilva MJ, Serra A, Macià A. Analysis of food polyphenols by ultra high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: An overview. *J Chromatogr A* [Internet]. 2013;1292:66–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.012>
55. Jin L, Wang Y, Iwaasa AD, Xu Z, Schellenberg MP, Zhang YG, et al. Effect of condensed tannin on in vitro ruminal fermentation of purple prairie clover (*Dalea purpurea* Vent). cool -season grass mixture. *Can J Anim Sci.* 2013;93(1):155–8.
56. Puentes D, Nelly L. Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. *RET Rev Estud Transdiscipl* [Internet]. 2009;1(2):32–55. Available from: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=179214945004>
57. Simionatto E, Chagas MO, Peres MTLP, Hess SC, Silva CB d., Ré-Poppi N, et al. Chemical composition and biological activities of leaves essential oil from *schinus molle* (*anacardiaceae*). *J Essent Oil-Bearing Plants.* 2011;14(5):590–9.
58. Abdel-Sattar E, Zaitoun AA, Farag MA, El Gayed SH, Harraz FMH. Chemical composition, insecticidal and insect repellent activity of *Schinus molle* L. leaf and fruit essential oils against *Trogoderma granarium* and *Tribolium castaneum*. *Nat Prod Res.* 2010;24(3):226–35.
59. Núñez Benitez J, Viladevall Sole M, Font Cisteró X. Análisis de la vegetación de *Schinus molle* L. en saber si existe una relación de contaminación de arsénico entre la planta y el suelo de Zimapán, Hidalgo; Mexico. *XV Congr Peru Geol.* 2010;9:175–9.
60. Carrión Jara AV, García Gomez CR. Preparación de extractos vegetales: Determinación de eficiencia de metódica [Internet]. Universidad de Cuenca. Universidad de Cuenca; 2010. Available from: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/2483/1/tq1005.pdf>
61. Taiz L, Zeiger E. Secondary metabolites and plant defense. *Plant Physiol.* 2002 Jan 1;4:283–308.
62. Olivoto T, Nardino M, Carvalho IR, Follmann DN, Szarecki VJ, Ferrari M, et al. Plant secondary metabolites and its dynamical systems of induction in response to environmental factors: A review. *African J Agric Res.* 2017;12(2):71–84.
63. Santamaría C, Martín González A, Astorga F. Extractos vegetales, aplicación para

- la reducción del estrés. Eur Nat Addit [Internet]. 2015;1:75–80. Available from: <https://nutricionanimal.info/download/0315-ena-WEB.pdf>
64. Viveros P. Extractos Medicinales de Plantas. Universidad de Chile. 1923.
 65. López Giral N. Obtención y aplicación de extractos naturales. In: Centro Nacional de Tecnología y Seguridad Alimentaria [Internet]. España; 2011. p. 152. Available from: <http://www.anfaco.es/fotos/biblioteca/docs/congresos/transferencia2011.pdf>
 66. Sierra Sarmiento M, Barros Algarraba R, Gómez Paternina D, Mejía Teran A, Suarez Rivero D. Productos naturales: metabolitos secundarios y aceites esenciales. Fundación. Uniagraria. Bogotá D. C.; 2018. 56 p.
 67. Guerra Corado EA. Obtención, caracterización y evaluación de las propiedades físicoquímicas de los extractos fluidos, blandos y secos así como de las tinturas del rizoma y de la fronda de calahuala (*phlebodium pseudoaureum*) a nivel de laboratorio. Univ San Carlos Guatemala [Internet]. 2005;1(1):162. Available from: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/08/08_0951_Q.pdf
 68. Galvez Muñoz I, Lobos Diaz J, Peranta Muñoz J. Plantas Medicinales: Principios básicos de Fitoterapia. Chile; 2014. 1–103 p.
 69. Petiot E. Los cuidados naturales de los árboles [Internet]. La Fertilidad de la Tierra Ediciones. 2010. 184 p. Available from: <https://lafertilidaddelatierra.com/hojear-libros/book/116.html?page=7>
 70. Newman Dorland WA. Dorland Diccionario enciclopédico ilustrado de medicina: Más de cien años de historia [Internet]. 30th ed. Graw-Hill Interamericana de España 2005, editor. España: McGraw-Hill Interamericana de España; 2005. 2210 p. Available from: https://books.google.com.pe/books?id=E3u7aczu1_cC
 71. Ramirez LS, Marin Castaño D. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Sci Tech. 2009;(42):263–8.
 72. Thornsberry C. Antimicrobial susceptibility testing. Gen considerations. 1991;1.
 73. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol. 1966 Apr;45(4):493–6.
 74. Hacek DM, Dressel DC, Peterson LR. Highly reproducible bactericidal activity test results by using a modified National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution technique. J Clin Microbiol. 1999;37(6):1881–4.
 75. Taroco R, Seija V, Vignoli R. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. In: Temas de Bacterología y Virología Médica. 2008. p. 663–71.
 76. Hudzicki J. Kirby-Bauer Disk diffusion susceptibility test protocol author information. Am Soc Microbiol [Internet]. 2009;1–13. Available from: <https://www.asm.org/Protocols/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Pro>
 77. Bernal R. M, Guzmán U. M. El antibiograma de discos normalización de la técnica de Kirby-Bauer. Biomédica. 1984;4(3–4):112.
 78. Duraffourd C, Hervicourt L, Lapraz J. Cuadernos de fitoterapia clínica. Barcelona: Masson; 1987.
 79. Gómez Gutiérrez A. *Staphylococcus*: las ramificaciones de un racimo. Infect. 2006;10(3):157–9.
 80. Cervantez-García E, García-González R, Salazar-Schenttino M. Características generales de *Staphylococcus aureus*. Rev Latinoam Patol Clínica. 2014;1(61):28–40.
 81. Franklin D, Lowy MD. *Staphylococcus aureus* Infections. N Engl J Med. 1998;339(8):520–32.
 82. Bush L, Vasquez-Pertejo M. Staphylococcal Infections [Internet]. Vol. 1, MSD

- manual professional version. 2019. Available from: <https://www.msdmanuals.com/professional/infectious-diseases/gram-positive-cocci/staphylococcal-infections>
83. Wong AL, Berdoll MS. *Staphylococcus*: Properties and Occurrence. Univ Wisconsin Madison. 2000;1:5547.
 84. Pasachova-Garzón J, Ramirez-Martinez S, Muñoz-Molina L. *Staphylococcus aureus*: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. Nova. 2019;17(32):25–38.
 85. Bien J, Sokolova O, Bozko P. Characterization of virulence factors of *Staphylococcus aureus*: Novel function of known virulence factors that are implicated in activation of airway epithelial proinflammatory response. J Pathog. 2011;1:1–13.
 86. Brown WJ. National Committee for Clinical Laboratory Standards agar dilution susceptibility testing of anaerobic gram-negative bacteria. Antimicrob Agents Chemother. 1988;32(3):385–90.
 87. Alfaro-Pérez MY. Efecto inhibitorio in vitro de la infusión de *Schinus molle* “molle” sobre el crecimiento de *Staphylococcus* [Internet]. Universidad Señor de Sipán; 2015. Available from: <http://weekly.cnbnews.com/news/article.html?no=124000>
 88. Ramírez L, Díaz H. Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del Ruibarbo (*Rumex conglomeratus*). Sci Tech. 2007;(33):397–400.
 89. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Dep Lab Med Microbiol Univ Washingt. 2005;103.
 90. Arnaldo B. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. 2003. 1–43 p.
 91. Engels C, Knödler M, Zhao YY, Carle R, Gänzle MG, Schieber A. Antimicrobial activity of gallotannins isolated from mango (*Mangifera indica* L.) kernels. J Agric Food Chem. 2009;57(17):7712–8.
 92. Cortez Florentino A. Identificación de metabolitos secundarios en hojas de *Schinus molle* (molle), procedente del caserío de Huañimba-Cajabamba [Internet]. Universidad Católica de los Ángeles de Chimbote; 2018. Available from: http://awsassets.wwfz.panda.org/downloads/earth_summit_2012_v3.pdf%0Ahttp://hdl.handle.net/10239/131%0Ahttps://www.uam.es/gruposinv/meva/publicaciones_jesus/capitulos_espanyol_jesus/2005_motivacion_para_el_aprendizaje_Perspectiva_alumnos.pdf%0Ahttps://ww
 93. Vlachos V, Critchley AT, Von Holy A. Antimicrobial activity of extracts from selected southern African marine macroalgae. S Afr J Sci. 1997;93(7):328–32.

APÉNDICES

Apéndice N°1.

Lugar de recolección de la muestra vegetal



Apéndice N°2.

Aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus*

N°	AISLAMIENTO	LUGAR
1	1254B	HRDC
2	1299B	HRDC
3	1308B	HRDC
4	1365B	HRDC
5	1327B	HRDC
6	1327A	HRDC
7	1492B	HRDC
8	1510B	HRDC
9	1571B	HRDC
10	1604A	HRDC
11	1604B	HRDC
12	1659A	HRDC
13	1659B	HRDC
14	1670B	HRDC

N°	AISLAMIENTO	LUGAR
15	3430RB	HSB
16	4037RB	HSB
17	4125RB	HSB
18	4910RA	HSB
19	4910RB	HSB
20	6035SB	HSB
21	6156SB	HSB
22	6809SB	HSB
23	7004SB	HSB
24	7133SB	HSB
25	7679RB	HSB
26	7757RB	HSB
27	ATCC	UNC

HRDC: Hospital Regional Docente.

HSB: Hospital Simon Bolivar.

UNC: Proporcionado por el laboratorio de la Universidad Nacional de Cajamarca.

Apéndice N°3.

Material vegetal: *Schinus molle* L. (molle)



Árbol de molle



Hojas y tallos de molle

Apéndice N°4.

Constancia de identificación de la materia vegetal: *Schinus molle*



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE BOTÁNICA
HERBARIO CPUN "ISIDORO SÁNCHEZ VEGA"
herbariocpuniv@gmail.com Av. Atahualpa N° 1050 - Cajamarca



EL CURADOR DEL HERBARIO CPUN "ISIDORO SÁNCHEZ VEGA", DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA – PERÚ

HACE CONSTAR:

Que, las muestras botánicas colectada en la Av. Atahualpa, carretera a los Baños del Inca, ubicado a una altitud de 2664 m.s.n.m, de latitud -7.16530 y longitud -78.48372, distrito, provincia y departamento de Cajamarca, presentada por la Bachiller: **Kelly Yahara Torres Veliz**, de la Escuela Académico Profesional de Biología y Biotecnología de la Universidad Nacional de Cajamarca. Es parte del Proyecto: denominado "Efecto antibacteriano del extracto acuoso, hidroalcohólico y etanólico de *Schinus molle* L. (molle), sobre el crecimiento in vitro de *Staphylococcus aureus* de origen clínico".

Las cuales fueron analizadas y determinadas científicamente en nuestra institución como:

- División: Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsida
- Orden: Sapindales
- Familia: Anacardiaceae
- Género: Schinus
- Especie: *Schinus molle* L.

Se expide el presente para los fines que sean necesarios.

Cajamarca, 23 de mayo del 2024




Msc. Jpg. Juan F. Montoya Quino
Curador del Herbario "Isidoro Sánchez Vega"
CPUN-UNC

Apéndice N° 5.

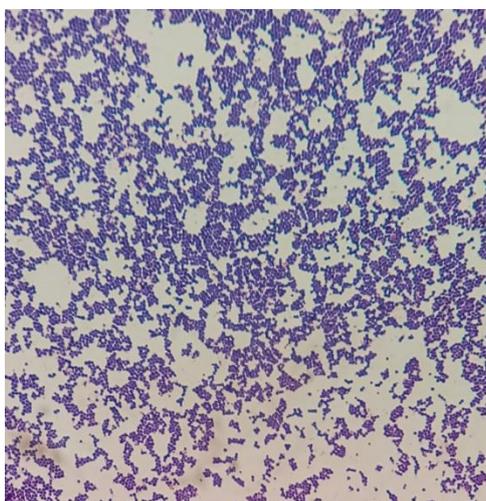
Pruebas de corroboración de *Staphylococcus aureus*



S. aureus en Agar Sangre



S. aureus en Agar Nutritivo



S. aureus cocos Gram + (1000X)



Catalasa positiva



Coagulasa positiva

Apéndice N° 6.

Procesamiento de la materia vegetal (*Schinus molle* L.)



1. Recolección del molle



2. Separación de las hojas



3. Secado en papel kraft



4. Licuado de las hojas



5. Hojas secas trituradas

Apéndice N° 7.

Preparación del extracto acuoso de *Schinus molle* L.



1. Pesado de las hojas secas trituradas (25g, 50g, 75g y 100g)



2. Vaciado de las hojas en el frasco(100mL)



3. Agua destilada estéril hervida 100mL



4. Filtración del extracto acuoso



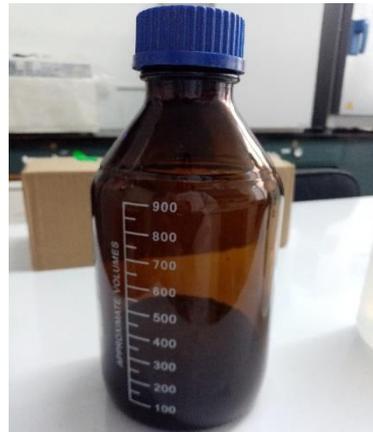
5. Envasado de los extractos acuosos

Apéndice N° 8.

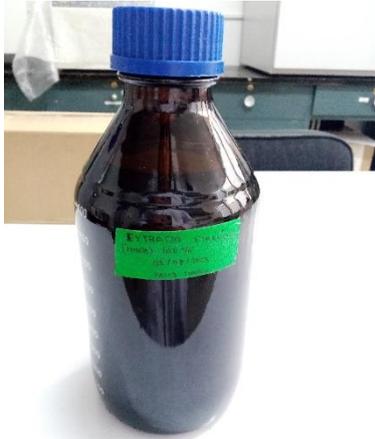
Preparación del extracto etanólico de *Schinus molle* L. (molle)



1. Pesado del molle (100g)



2. Vaciado de las hojas en el frasco



3. Maceración etanólica por 10 días



4. Filtración del macerado



5. Destilación en rotavapor



6. Enfriamiento y envasado del extracto

Apéndice N° 9.

Preparación del extracto hidroalcohólico de *Schinus molle* L. (molle)



1. Agua destilada estéril y EE 100%



2. Preparación de las diluciones



3. Envasado de los extractos

Apéndice N° 10.

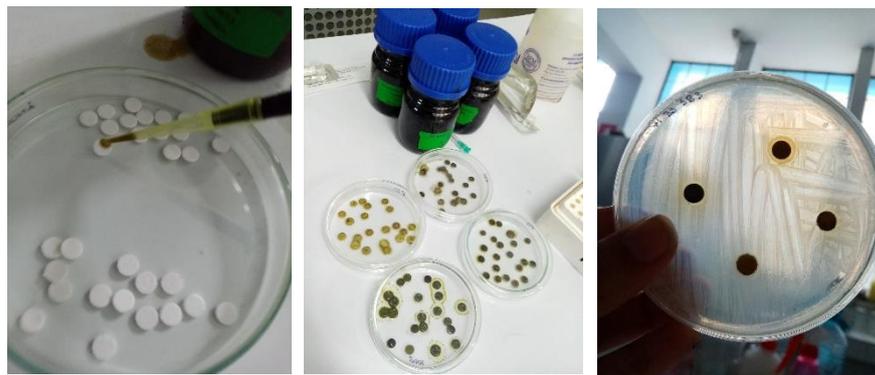
Método de difusión en agar con disco



1. Preparación del inóculo



2. Comparación de la turbidez con el tubo 0.5 de McFarland y siembra en placa.



3. Embebido de los discos en blanco con 20ul de extracto y colocados en cada placa sembrada.

Apéndice N° 11.
Ficha de Recolección de datos

Código del aislamiento:

GRUPO (Tipo de extracto)	Concentración del extracto	DIÁMETRO DEL HALO (mm)						PROMEDIO	ESCALA DE DURAFFOURD
		Control positivo	Control Negativo	Testigo (Alcohol 96°)	Réplica				
					1	2	3		
1	100%								
2	25%								
	50%								
	75%								
3	25%								
	50%								
	75%								
	100%								
PROMEDIO									

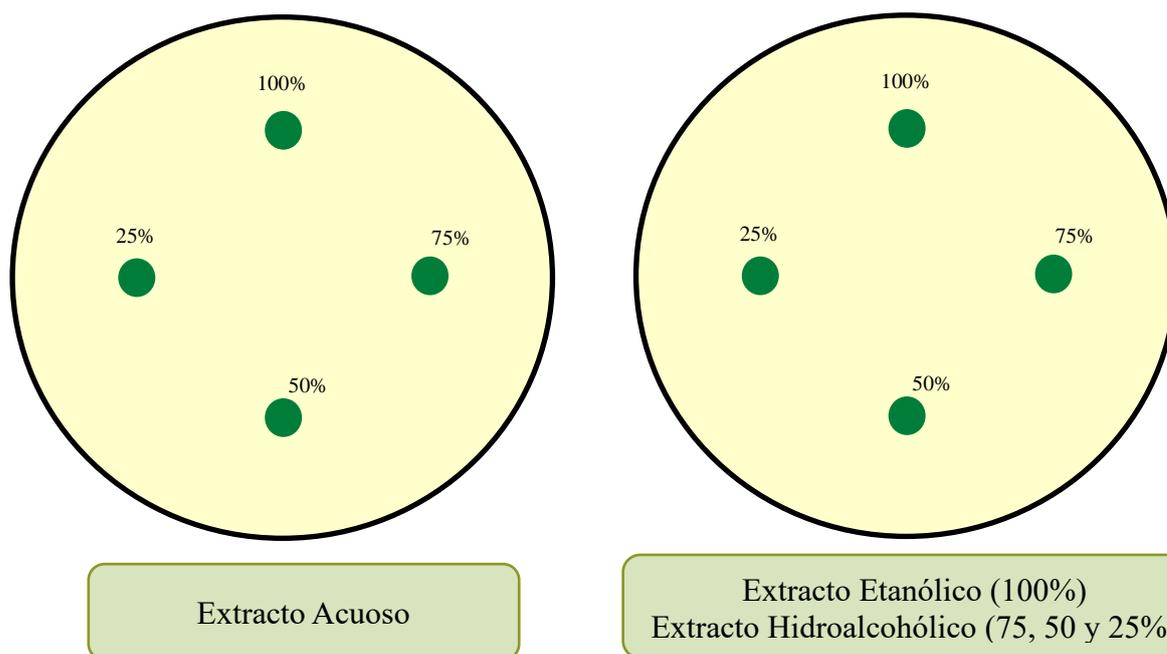
1: Extracto etanólico de *S. molle* 10g /100mL (100%)

2: Extracto hidroalcohólico de *S. molle* (20%, 60%, 80%)

3: Extracto acuoso de *S. molle* (25%, 50%, 75%, 100%)

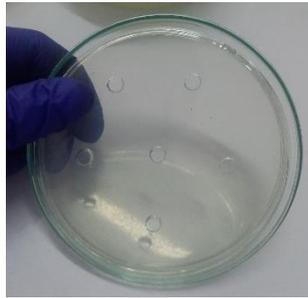
Apéndice N° 12.

Disposición de los discos en la placa Petri

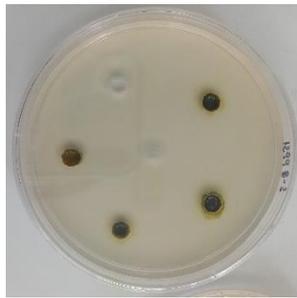


Apéndice N° 13.

Método de difusión en agar con pozo



Pozos en el agar



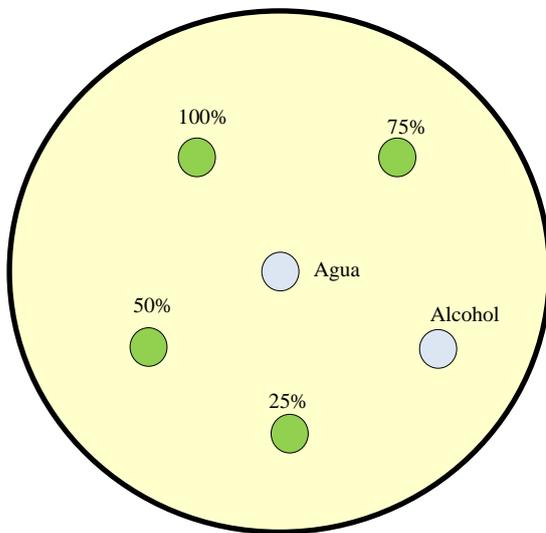
20uL de extracto en cada pozo



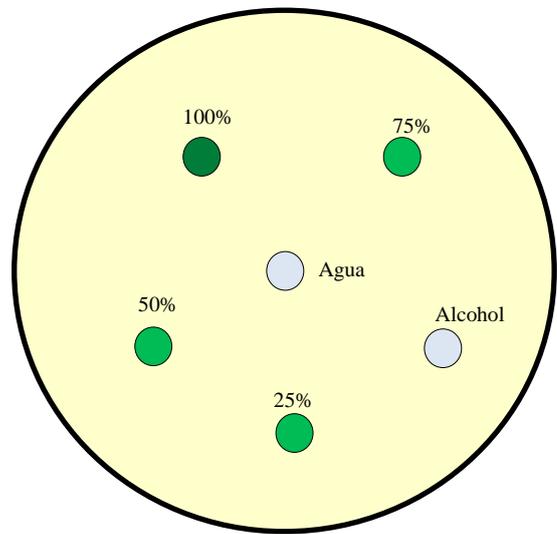
Resultado

Apéndice N° 14.

Disposición de los pozos en la placa Petri



Extracto Acuoso



Extracto Etanólico (100%)
Extracto Hidroalcohólico (75, 50 y 25%)

ANEXOS

ANEXO 1

Tabla de los patrones estándares del halo de inhibición para *Staphylococcus aureus*

Tabla 3. Patrones estándar del halo de inhibición para estafilococos, puntos de corte equivalentes a la CMI y diámetro del halo de inhibición para la cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 empleada como control de calidad.								
GRUPO	Antimicrobiano	Carga del disco (µg)	Diámetro del halo de inhibición (mm)			Punto de corte Equivalente a la CMI (µg/ml)		<i>S. aureus</i> ATCC 25923 intervalo *
			Resistente	Intermedia	Sensible	Resistente	Sensible	
A	Penicilina G ^{b,c}	10 U	≤28	--	≥29	β-lactamasa ^b	≤0.1	26-37
	Oxacilina ^b (<i>S. aureus</i>)	1	≤10	11-12	≥13	≥4	≤2	18-24
	(<i>Estafilococos coagulasa -</i>)	1	≤17	--	≥18	≥0.5	≤0.25	--
B	Vancomicina ^d	30	--	--	≥15	≥32	≤4	17-21
	Telcoplanina	30	≤11	11-13	≥14	≥32	≤8	15-21
	Eritromicina ^e	15	≤13	14-22	≥23	≥8	≤0.5	22-30
	Claritromicina ^e	15	≤13	14-17	≥18	≥8	≤2	26-32
	Azitromicina ^e	15	≤13	14-17	≥18	≥8	≤2	21-26
	Clindamicina ^e	2	≤14	15-20	≥21	≥4	≤0.5	24-30
	Trimetoprim / sulfametoxazol	1,25/23,75	≤10	11-15	≥16	≥8/152	≤2/38	24-32
C	Gentamicina	10	≤12	13-14	≥15	≥8	≤4	19-27
	Ciprofloxacino	5	≤15	16-20	≥21	≥4	≤1	22-30
	Ofloxacino	5	≤12	13-15	≥16	≥8	≤2	24-28
	Levofloxacino	5	≤13	14-16	≥17	≥8	≤2	25-30
	Cloranfenicol ^f	30	≤12	13-17	≥18	≥32	≤8	19-26
	Rifampicina ^g	5	≤16	17-19	≥20	≥4	≤1	26-34
	Tetraciclina ^g	30	≤14	15-18	≥19	≥16	≤4	24-30
D	Norfloxacino	10	≤12	13-16	≥17	≥16	≤4	17-28
	Lomefloxacino	10	≤18	19-21	≥22	≥8	≤2	23-29
	Nitrofurantoina	300	≤14	15-16	≥17	≥128	≤32	18-22
	Sulfisoxazol	250 o 300	≤12	13-16	≥17	≥350	≤100	24-34
	Trimetoprim	5	≤10	11-15	≥16	≥16	≤4	19-26

Elaborado con datos del NCCLS, 2000.

a) Además de *S. aureus* ATCC 25923, ensayar *E. coli* ATCC 35218 con: amoxicilina/clavulánico de 18 a 22 mm.; ampicilina/sulbactam de 13 a 19 mm.

b) Las cepas resistentes de *S. aureus* producen β-lactamasa, y para estas pruebas es preferible el empleo de discos de penicilina G de 10 U. Utilizar penicilina G para estudiar la sensibilidad de todos los estafilococos a todas las penicilinas sensibles a la penicilinas.

c) Estafilococos resistentes a oxacilina son resistentes a todos los β-lactámicos (la sensibilidad a β-lactámicos puede deducir estudiando solo penicilina y oxacilina).

d) Todos los estafilococos con un diámetro del halo de inhibición igual o menor de 14mm deben ser estípidos para determinar la CMI de la vancomicina.

e) No para microorganismos aislados del tracto urinario.

f) No utilizar rifampicina sola para el tratamiento de infecciones estafilocócicas.

g) Tetraciclina es el representante de todas las tetraciclinas.

Fuente: Picazo J. Procedimientos en Microbiología Clínica: Métodos básicos de la sensibilidad a los antimicrobianos. Soc. Española Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2000;1(2):1–54 (3)