

# **UNIVERSIDAD PERUANA UNIÓN**

**FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA**

**Escuela Profesional de Ingeniería de Alimentos**



*Una Institución Adventista*

**Evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro de los aceites  
esenciales de eucalipto (*Eucalyptus globulus labill*); muña  
(*Minthostachys mollis*) frente a *Staphylococcus aureus* y  
Coliformes fecales**

Por:

Jhon Laura Ticona

Asesor:

Ing. Alex Danny Chambi Rodriguez

**Juliaca, marzo de 2019**

## DECLARACION JURADA DE AUTORIA DEL INFORME DE TESIS

Ing. Alex Danny Chambi Rodríguez, de la Facultad de Ingeniería y Arquitectura, Escuela Profesional de Ingeniería de Alimentos, de la Universidad Peruana Unión.

DECLARO:

Que el presente informe de investigación titulado: "Evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus globulus* labill); muña (*Minthostachys mollis*) frente a *Staphylococcus aureus* y Coliformes fecales, constituye la memoria que presenta la bachiller Jhon Laura Ticona para aspirar al título Profesional de Ingeniero de Alimentos ha sido realizada en la Universidad Peruana Unión bajo mi dirección.

Las opiniones y declaraciones en este informe son de entera responsabilidad del autor, sin comprometer a la institución.

Y estando de acuerdo, firmo la presente declaración en Juliaca a los veinte y dos días del mes de marzo del año dos mil diecinueve.



Ing. Alex Danny Chambi Rodríguez

Evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus globulus labill*); muña (*Minthostachys mollis*) frente a *Staphylococcus aureus* y Coliformes fecales

# TESIS

Presentada para optar el título profesional de Ingeniero de Alimentos

## JURADO CALIFICADOR

  
Ing. MSc. Carmen Rosa Apaza  
Humerez  
Presidenta

  
Ing. Enrique Mamani Cuela  
Secretario

  
Ing. Ana Mónica Torres Jiménez  
Vocal

  
Ing. Alex Danny Chambi Rodríguez  
Asesor

Juliaca, 05 de marzo de 2019

## **DEDICATORIA**

*Este trabajo está dedicado en primer lugar a Dios, por haberme permitido llegar hasta este momento tan importante en mi formación profesional, también suma a esta dedicatoria a los docentes por su apoyo incondicional durante los 5 años de mi carrera universitaria. Finalmente dedico este trabajo a mi familia por ser el pilar más importante y por demostrarme siempre su cariño y apoyo sin importar nuestras diferencias de opiniones.*

**“Jhon Laura Ticona”**

## AGRADECIMIENTO

*Quiero expresar mi gratitud a Dios, quien colma mi vida con su bendición, a cada integrante de mi familia por estar siempre presentes a la Universidad Peruana Unión, a la Facultad de Ingeniería y Arquitectura y a la carrera Profesional de Ingeniería de Alimentos.*

*Quiero expresar mi sincero agradecimiento a mi asesor, el Ing. Alex Danny Chambi Rodriguez por brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y a su experiencia, por su tiempo y confianza para realizar este trabajo, finalmente quiero expresar mi sincero agradecimiento a mis Docentes: Ing. Enrique Mamani Cuela, Ing. Ana. M. Torres Jiménez, Ing. Joel Jerson Coaquira Quispe, Ing. Cesar A. Condori Mamani y Ing. Carmen R. Apaza Humerez.*

*No podría dejar de agradecer de manera especial al Programa Nacional de Becas y Créditos Educativos (PRONABEC), quienes me brindaron la educación ya que el programa ayuda a jóvenes con talento académico.*

*Estén siempre alegres, oren sin cesar, den gracias a Dios en toda situación, porque esta es su voluntad para ustedes en Cristo Jesús (1 Tesalonicenses 5:16-18)*

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
RESUMEN.....	XII
ABSTRACT .....	XIII
CAPÍTULO I.....	14
EL PROBLEMA .....	14
CAPITULO II.....	15
REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	15
2.1. Eucalipto.....	15
2.1.1. Origen de eucalipto.....	15
2.1.2. Taxonomía de eucalipto.....	15
2.1.3. Descripción del eucalipto .....	16
2.1.4. Contenido del aceite esencial .....	16
2.1.5. Información de principios activos del eucalipto.....	17
2.1.6. Comercialización de eucalipto.....	18
2.2. Muña.....	18
2.2.1. Origen de Muña.....	18
2.2.2. Taxonomía de muña .....	19
2.2.3. Descripción de muña .....	19
2.2.4. Información de principios activos de muña.....	20
2.2.5. Comercialización de muña .....	20
2.3. Aceite esencial.....	20
2.3.1. Funciones de los aceites esenciales en la planta.....	21
2.3.2. Aceite esencial y sus beneficios .....	21
3.3.3. Análisis en aceites esenciales .....	21
3.3.3.1.Propiedades físicas .....	21
3.4. Tipos de extracciones de aceites.....	22
3.4.1. Arrastre por vapor.....	22
3.4.2. Procedimiento de la metodología .....	22
3.5. Método directo.....	23
3.5.1. Procedimiento de la metodología .....	24
3.6. Método hidrodestilación .....	24
3.6.1. Procedimiento:.....	24
3.7. Método microondas .....	25

3.7.1. Procedimiento de la metodología .....	26
3.8. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales .....	26
3.9. Tipo de cultivos y diseños de estudios .....	28
3.9.1. Determinación de la sensibilidad de una bacteria a agente microbiano: antibiograma (Difusión de agar).....	28
3.9.2. Determinación de la concentración mínima inhibidora.....	28
3.9.3. Agares.....	29
3.9.3.1. Agar Müller Hinton (difco) .....	29
3.9.3.2. Agar Baird Parker (difco).....	29
3.9.3.3. Peptona .....	29
3.9.3.4. Agar hierro triple azúcar.....	29
3.9.3.5. Agar hierro lisina .....	29
3.9.3.6. Agar caldo Urea.....	29
3.9.3.7. Agar citrato de Simmons .....	30
3.10. Cepas microbianas .....	30
3.10.1. Staphylococcus aureus.....	30
3.10.1.1. Clasificación taxonómica .....	30
3.10.1.2. Condiciones para su crecimiento in vitro .....	31
3.10.1.3. Características microscópicas .....	31
3.10.1.4. Características macroscópicas.....	32
3.10.2. Coliformes fecales .....	33
3.10.2.1. Clasificación taxonómica .....	33
3.10.2.2. Condiciones para su crecimiento in vitro .....	34
3.10.2.3. Características macroscópicas y microscópicas.....	34
CAPÍTULO III .....	36
MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
3.1. Lugar de ejecución.....	36
3.2. Materia prima .....	36
3.2.1. Muña y eucalipto .....	36
3.3. Cepas microbianas .....	36
3.4. Materiales e instrumentos de laboratorio.....	36
3.4.1. Materiales de laboratorio .....	36
3.4.2. Equipos de laboratorio.....	37
3.4.3. Reactivos .....	37

3.4.4. Medios Cultivos.....	37
3.5. Metodología experimental.....	38
3.5.1. Flujograma de extracción de aceite esencial por arrastre de vapor .....	38
3.5.2. Descripción del flujograma .....	38
3.5.2.1. Selección.....	38
3.5.2.2. Pesado.....	38
3.5.2.3. Extracción.....	39
3.5.2.4. Separación .....	39
3.6. Determinación del rendimiento del aceite esencial .....	39
3.7. Análisis fisicoquímico del aceite esencial .....	39
3.8. Determinación de la capacidad mínima inhibitoria.....	40
3.9. Pruebas bioquímicas de Coliformes fecales y Staphylococcus aureus.....	41
3.10. Análisis estadístico de Diseño de bloques completamente al azar “DBCA” .....	42
CAPÍTULO IV .....	43
RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	43
4.1. Rendimiento en la extracción de aceite .....	43
4.2. Determinación de análisis fisicoquímico de aceite esencial.....	44
4.3. Identificación bioquímica .....	45
4.4. Determinación de la capacidad mínima inhibidora del aceite esencial extraído.....	46
4.4.1. Coliformes Fecales .....	46
4.4.2. Staphylococcus aureus.....	48
4.5. El efecto inhibitorio en diluciones 25, 50 y 75% de aceite esencial .....	51
4.5.1. Análisis de varianza en coliformes fecales.....	51
CAPÍTULO V .....	54
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	54
5.1. Conclusiones.....	54
5.2. Recomendaciones .....	54
REFERENCIAS .....	56
ANEXOS .....	64

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Principios activos del eucalipto ( <i>Eucalyptus globulus labill</i> ) .....	18
Tabla 2. Principios activos de la muña ( <i>Minthostachys mollis</i> ).....	20
Tabla 3. Clasificación taxonómica de <i>Staphilococcus aureus</i> .....	31
Tabla 4. Condiciones de las toxinas de <i>Staphilococcus aureus</i> .....	31
Tabla 5. Clasificación taxonómica de <i>Coliformes fecales</i> .....	34
Tabla 6. Métodos aplicados para la determinación del análisis fisicoquímico del aceite extraído .....	39
Tabla 7. Diseño de bloques completas al azar .....	42
Tabla 8. Rendimiento de la extracción de aceite esencial de muña y eucalipto.....	43
Tabla 9. Resultados de la caracterización Fisicoquímica del aceite esencial de muña y eucalipto .....	44
Tabla 10. Pruebas Bioquímicas para <i>Coliformes fecales</i> y <i>Staphilococcus aureus</i> .....	45
Tabla 11. Determinación de los halos de crecimiento en (mm) en Coliformes fecales .....	46
Tabla 12. Determinación de halos de Crecimiento en (mm) en <i>Staphilococcus aureus</i> .....	48

## ÍNDICE DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Espacios esquizogenas que contiene aceites esenciales de eucalipto .....	17
Figura 2. Imagen por micrografía de electrones de la cavidad secretora de la hoja de eucalipto .....	17
Figura 3. Extracción de aceite esencial por método arrastre por vapor.....	23
Figura 4. Extracción de aceite esencial por método hidrodestilacion .....	25
Figura 5. Extracción de aceite por método microondas .....	26
Figura 6. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	30
Figura 7. Coliformes fecales.....	33
Figura 8. Flujograma de extracción de aceite esencial de eucalipto ( <i>Eucaliptus globulus</i> labill); muña ( <i>Minthostachys mollis</i> ) .....	38
Figura 9. Esquema de las pruebas bioquímicas de <i>Coliformes fecales</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .....	41
Figura 10. Halos de inhibición en aceite de eucalipto en diluciones 25, 50 y 75% frente a Coliformes fecales .....	46
Figura 11. Halos de inhibición en aceite de muña en diluciones de 25, 50 y 75% frente a <i>Coliformes fecales</i> .....	47
Figura 12. Grafica de probabilidad normal en " <i>Coliformes fecales</i> " .....	48
Figura 13. Halos de inhibición en aceite de muña en diluciones de 25, 50 y 75% frente a <i>Staphylococcus aureus</i> .....	49
Figura 14. Halos de inhibición con aceite de eucalipto en diluciones de 25, 50 y 75% frente a <i>Staphylococcus aureus</i> .....	49
Figura 15. Grafica de probabilidad normal en " <i>Staphylococcus aureus</i> " .....	51
Figura 16. Halos de inhibición en diluciones de 25, 50, 75% frente a coliformes Fecales y <i>Staphylococcus aureus</i> .....	52
Figura 17. Prueba de medias en tipos de aceite (Eucalipto, muña).....	52

## ÍNDICE DE ANEXOS

Pág.

Anexo A. Utilización de las hojas de eucalipto para la extracción del aceite esencial .....	65
Anexo B. Utilización de las hojas y tallos triturados de muña para la extracción de aceite esencial .....	65
Anexo C. Extractor (Inducontrol) de aceites esenciales.....	65
Anexo D. Recepción de aceite esencial en la pera de decantación .....	66
Anexo E. Realización de las pruebas bioquímicas " <i>Coliformes fecales</i> " y <i>Staphylococcus aureus</i> " .....	66
Anexo F. Determinación del análisis fisicoquímica de los aceites de "eucalipto" y "muña" .....	67
Anexo G. Realización de las diluciones de aceites esenciales más Alcohol.....	68
Anexo H. Sembrado en placas.....	68
Anexo I. Medición con "Pie de rey" los halos de crecimiento 1 .....	68
Anexo J. Medición con "Pie de rey" los halos de crecimiento 2.....	69
Anexo K. Halos de inhibición con aceites esenciales de "muña", frente a " <i>Coliformes fecales</i> " al 25, 50 y 75% .....	69
Anexo L. Halos de inhibición con aceite esencial de "eucalipto" frente a " <i>Coliformes fecales</i> " al 25, 50 y 75% .....	70
Anexo M. Halos de Inhibición con Aceite esencial de "Muña" frente a " <i>Staphylococcus Aureus</i> " al 25, 50 y 75% .....	71
Anexo N. Halos de Inhibición con aceite esencial de "eucalipto" frente a " <i>Staphylococcus aureus</i> " al 25, 50 y 75% .....	71
Anexo O. Análisis de varianza frente a " <i>Coliformes fecales</i> " Utilizando SC ajustada.....	72
Anexo P. Análisis de varianza frente a " <i>Staphylococcus aureus</i> ", utilizando SC ajustada.	72
Anexo Q. Tabla e medias por mínimos cuadrados para inhibición " <i>Coliformes fecales</i> " en mm con Intervalo de Confianza del 95.0% .....	73
Anexo R. Tabla de medias por mínimos cuadrados para inhibición en <i>Staphylococcus aureus</i> con intervalos de confianza del 95.0% .....	73
Anexo S. Comparación de halos de inhibición en (mm) con aceite de muña y eucalipto ..	73
Anexo T. Matriz de comparación de aplicaciones de otros autores .....	74

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo de investigación fue evaluar el efecto antimicrobiano de dos fuentes de aceite frente a *Staphylococcus aureus* y *Coliformes fecales*. Para la extracción del aceite se aplicó el método arrastre de vapor en donde se utilizó 5000g de muestra (muña, eucalipto), en lo cual el rendimiento presentó: muña 50ml = 0.9268%, eucalipto 52ml = 0.9717%, se le realizó una caracterización fisicoquímica cuyo resultado fue: en aceite de muña: índice de peróxido: 0.75 (Meq/Kg), índice de iodo: 6.87 (IV), índice de acidez: 1.78 (%AGL), Índice de refracción: 1.486, densidad: 0.898 (g/ml). En aceite de eucalipto: índice de peróxido: 0.68 (Meq/Kg), índice de iodo: 8.08 (IV), índice de acidez: 1.82 (%AGL), índice de refracción: 1.495, densidad: 0.845 (g/ml). Se determinó los halos de inhibición en milímetros (mm) con aceite de muña, en donde presento en las diluciones a 25, 50 y 75% frente a *Coliformes fecales*, al; 25%: 9.79mm, 50%: 10.74mm, 75%: 13.27mm, frente a *Staphylococcus aureus*, al 25%: 9.96mm, 50%: 10.74mm, 75%: 13.15mm; con dilución de aceite esencial de Eucalipto frente a *Coliformes fecales* al 25%: 12.09mm, 50%: 13.29mm, 75%: 14.58mm; después frente a *Staphylococcus aureus* en 25%: 11.72mm, 50%: 13.56mm, 75%: 14.37. Se consiguió establecer el efecto inhibitorio con dos fuentes de aceites, por lo cual se concluye que a mayor dilución del aceite mayor inhibición microbiana, el aceite de eucalipto presento mayor inhibición que el aceite de muña, ya que cada especie cuentan con sus respectivos principios activos como monoterpenos, alcoholes, cetonas y óxidos terpenicos que impiden el crecimiento microbiano.

**Palabras clave:** Arrastre de vapor, Inhibición microbiana, principios activos, mentona y eucaliptol

## ABSTRACT

The objective of this research work was to evaluate the effect of microbial two sources of oil against *Staphylococcus aureus* and fecal coliforms. For the extraction of the oil the method was applied drag of steam where it was used 5000g of sample (muña, eucalyptus), in which the yield presented: Muña 50ml = 0.9268%, eucalyptus 52ml = 0.9717%, it was performed a physicochemical characterization whose result was: In Muña Oil: Peroxide index: 0.75 (MEQ/Kg), iodine index: 6.87 (IV), acidity index: 1.78 (% AGL), refractive Index: 1,486, Density: 0898 (g/ml). It was determined the inhibition halos in millimeters (mm) with oil of muña, where I am presenting in the dilutions at 25, 50 and 75 per cent compared to fecal coliforms, al; 25%: 9.79mm, 50%: 10.74mm, 75%: 13.27mm, against *Staphylococcus aureus*, 25%: 9.96mm, 50%: 10.74mm, 75%: 13.15mm; with dilution of essential oil of Eucalyptus in front of Fecal Coliforms to 25%: 12.09mm, 50%: 13.29mm, 75%: 14.58mm; then in front of *Staphylococcus aureus* in 25%: 11.72mm, 50%: 13.56mm, 75%: 14.37. It was able to establish the inhibitory effect with two sources of oils, by which it is concluded that the greater the oil dilution Stronger inhibition microbial, eucalyptus oil presented Stronger inhibition that oil of muña, since each species have their respective active principles as monoterpenos, alcohols, ketones and oxides terpenicos that prevent microbial growth.

**Key Words:** Vapor Trawling, microbial Inhibition, active principles, menta and eucalyptus

## CAPÍTULO I

### EL PROBLEMA

En la actualidad según el Instituto de conservación forestal (ICF) la región de Puno cuenta con 4,030 hectáreas de plantaciones de eucalipto, queñuas y árboles, al igual que otras regiones como: Apurímac, Ayacucho, Cusco y Huancavelica, por ende el eucalipto es transformado en madera o leña y sus hojas son desaprovechadas al ser incineradas. Por otro lado la región Puno es abundante en plantas medicinales como: (muña), de la cual existe gran desaprovechamiento, de estas plantas son capaces de satisfacer la necesidad y contribuir la seguridad alimentaria (Vira, Wildburger, & Mansourian, 2015).

La gran problemática presenciada en la cadena alimentaria es en el almacenamiento, manejo inadecuados y en transporte de alimentos ya que estos traen consigo pérdidas significativas afectando la composición nutricional. Estos alimentos contaminados pueden ocasionar enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) como: dolores de cabeza, intoxicaciones e incluso la muerte Vega et al. (2017) & (Alzamora, Morales, Armas, & Fernandez. Gilma, 2001).

Según la Organización de Naciones Unidas (ONU) a nivel nacional la pérdida de los alimentos contaminados presentadas son por toneladas por año, esta gran problemática es por la presencia de cepas microbianas como: *Staphylococcus aureus*, *coliformes fecales*, *Escherichia coli*, *salmonella*, *shigella*, *yersinia* y otros que están propensos en la naturaleza que son identificados como el principal etiológico.

Existen muchas necesidades de generar medidas de control eficaz que garanticen la inactivación microbiana, dentro de ello están los aceites esenciales que son sustancias volátiles que ayudan a proteger e inactivar y conservar alimentos, gracias a su contenidos de “principios activos” como: terpenos oxigenados, alcoholes, fenólicos, sesquiterpenos, óxidos terpenicos, flavonoides, resina, pulegona, mentona, linalol, cariofileno, limoneno, isopoligon. (Pitarch, 2000)

En el libro del relato bíblico menciona que toda planta que da semilla que hay en la superficie de toda la tierra y la semilla servirá de alimento a los inicios de la creación donde vivían Adán y Eva los jardines presentaban una aroma amargo y místico (Génesis 1:29-30).

El objetivo de este trabajo de investigación fue evaluar el efecto antimicrobiano de dos especies de aceites esenciales extraído por arrastre de vapor y establecer el efecto inhibitorio en diluciones de 25, 50, 75% sobre *Staphylococcus aureus* y *coliformes fecales*.

## CAPÍTULO II

### REVISIÓN DE LA LITERATURA

#### 2.1. Eucalipto

##### 2.1.1. Origen de eucalipto

Según el Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) el Eucalipto es un árbol perteneciente a los géneros Eucalyptus y Pinus perteneciente de Australia y puede alcanzar los 40 metros de altura, con un diámetro de 50 centímetros. La forestación da inicios en suelos arenosos que alcanzan un crecimiento anual, el 75% forestal es la plantación de eucaliptos y pinos, la presencia máxima de su contenido de aceite esencial es en las hojas verdes a inicios de su florecimiento.

Según Chilon (2017) las zonas estudiadas de la región de Puno desde el año 1999 hasta la actualidad tiene una extensión superficial de 350,00 hectáreas donde se determinó que 4,030 son hectáreas de Eucalipto ya que estas tierras son aptas para producir madera y emplear en diversos usos. Según Mastrangelo (2009) en la industria maderera las hojas son desechadas o incineradas ya que el eucalipto cuenta con glándulas que segregan aceites esenciales de sus hojas, las cuales producen olor. Según Vega et al. (2017) los aceites poseen propiedades antibacterianas antisépticas y de control de plagas.

Según Brousett, Torres , Chambi, Mamani, & Gutiérrez (2015) el eucalipto crece en las zonas más frías, desarrollándose entre los 37° y los 39° de altitud, también crecen en la zona sur de la región puno en las orillas del lago Titicaca, para lograr un desarrollo óptimo requiere de una altitud de 500-1500 m.s.n.m, en un régimen de lluvias: invierno o verano, en una estación seca 3 meses no rigurosa, a una temperatura media máxima del mes cálido es de 18-23°C, media mínima del mes de frio: 4-12°C ya que se desarrolla en un suelo areno-arcillosos.

##### 2.1.2. Taxonomía de eucalipto

Clasificación taxonómica del eucalipto (*Eucalyptus globulus labill*) según (Mamani, 2013).

<b>Reino</b>	: Vegetal
<b>División</b>	: Angiospermae
<b>Clase</b>	: Dycotyledoneae

<b>Sub-clase</b>	: Archyclamidae
<b>Orden</b>	: Myrtales
<b>Familia</b>	: Myrtaceae
<b>Genero</b>	: Eucalyptus
<b>Especie</b>	: <i>Eucalyptus globulus</i>
<b>Nombre científico</b>	: <i>Eucalyptus globulus Labill</i>
<b>Nombre común</b>	: Eucalipto blanco, eucalipto azul

### **2.1.3. Descripción del eucalipto**

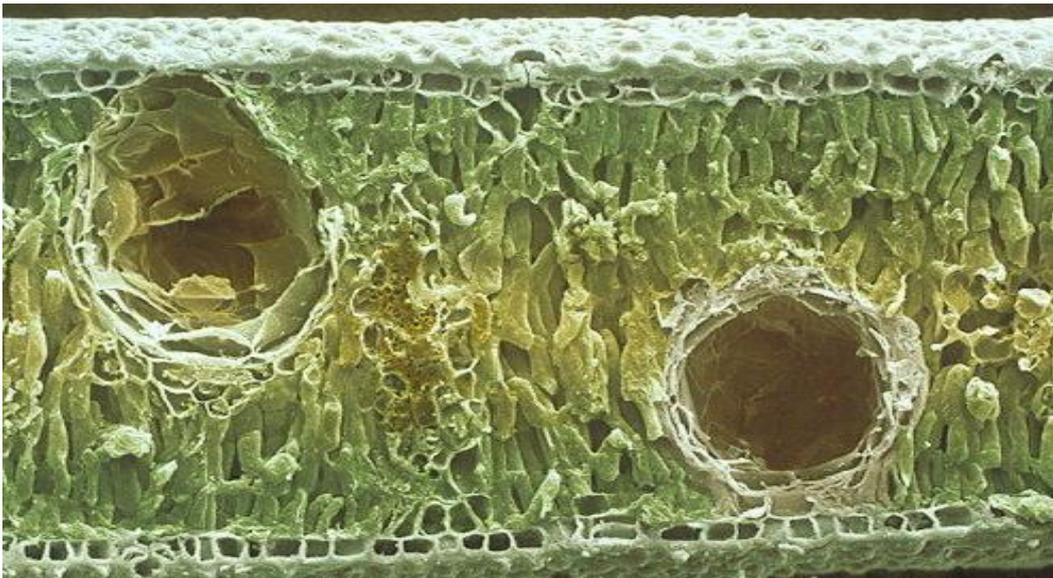
Según Mastrangelo (2009) el eucalipto consta de un Tronco que forma redondo y grueso, que mide 2 m de diámetro y con tendencias a experimentar una torsión espiral, con una corteza de color blanquecina, plateado azulado-pruinosa, lisa de color gris que se desprende en grandes tiras, que se mantienen colgados en periodo de tiempo en los árboles, con una radical que está constituido por una raíz pivotante, en terrenos sueltos que alcanza hasta los 50 cm de profundidad. Las raíces laterales son pocos desarrolladas, después se extienden superficialmente, las hojas juveniles son opuestas, sensibles de base cordada de 8-15 cm de longitud y 4-8 cm de anchura, las flores son auxiliares y en grupos de 2-3 de hasta 3 cm de diámetro, con numerosas estambres de color blanco que florecen los meses de septiembre y octubre y el fruto es una cápsula campaniforme de color glauco y cubierta de un blanquecino de 1.4 – 2.4 de diámetro.

### **2.1.4. Contenido del aceite esencial**

El aceite se encuentra distribuido en toda la planta Mamani (2013) especifica que lo aceites se encuentran en los espacios esquizogenas como se aprecia en la figura 1 y 2.



*Figura 1.* Espacios esquizogenas que contiene aceites esenciales de eucalipto  
*Nota:* Jesús Mamani Borda



*Figura 2.* Imagen por micrografía de electrones de la cavidad secretora de la hoja de eucalipto  
*Nota:* Jesús Mamani Borda

### **2.1.5. Información de principios activos del eucalipto**

Según Khouri, Libano, Prendes, Varela, & Obregos (2010) informa los principios activos de Eucalipto en la tabla 1 con el contenido de ácidos cloro genético, gálico y no tóxico para la naturaleza.

Tabla 1.  
*Principios activos del eucalipto (Eucalyptus globulus labill)*

PRINCIPIOS ACTIVOS DE EUCALIPTO ( <i>EUCALYPTUS</i> )	
Aceite esencial	0.5 – 3.5%
Monoterpenos	
Sesquiterpenos	
Alcoholes enfáticos y monoterpenicos	
Sesquiterpenoles	
Óxidos terpenicos:	Eucaliptol (70-80%)
Aldehídos	
Ácidos polifenoncos:	Cafeíco, galico, ferulico y gentsico.
Flavonoides	
Taninos y elagitaninos	
Resina	
Triterpenos:	Ácidos ursolico y derivados.

*Nota:* Khouri, Libano, Prendes, Varela, & Obregos (2010).

### 2.1.6. Comercialización de eucalipto

Según la Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación (FAO) en el 2004 el Perú posee 78.8 millones de bosques naturales de eucalipto, de los cuales 74.2 millones se encuentran en la región de la selva, 3.6 millones en la costa y un millón en la sierra sur del Perú; sin embargo, Egusquiza (2008) menciona que debido a la actividad desarrollada en la utilización y comercialización de madera y no la adquisición de la hojas de eucalipto.

El potencial de las áreas susceptibles de reforestación hasta el momento Egusquiza (2008) afirma que se ha perdido más 8 millones de hectáreas de bosques debido a la actividad agropecuaria, la pérdida de especies de perjuicio a la integridad de los ecosistemas de la flora y fauna.

## 2.2. Muña

### 2.2.1. Origen de Muña

Según el Instituto de Conservación Forestal (ICF) la región de Puno cuenta con mayor presencia de plantas aromáticas como: muña, salvia y otros al igual que: Apurímac, Ayacucho, Cusco y Huancavelica, las localidades que abunda esta plantas es: Juli, Ilave, Huancané, Lampa, Ayaviri, Moho, Putina, Juliaca, Sandia, Yunguyo, Azángaro y Macusani. La denominación de la planta en la lengua Quechua es “muña” y en aymara lleva el nombre “coa” debido a sus características semejantes al orégano, antiguamente los españoles la

denominaban como poleo silvestre, la mayor concentración se aceite esencial, las hojas son verdes y en épocas de florecimiento (Monteoliva, 2018).

La muña crece entre los 2500 – 3500 m.s.n.m, que habita entre las diferentes sitios ecológicos de nuestra serranía, alcanza una altura de 0.80 a 1.50 m, desarrollándose en forma difusa y muy ramificada, en suelos arenosos, ricos en materia orgánica (Salcedo, 2009).

### 2.2.2. Taxonomía de Muña

Clasificación taxonómica de Muña según (Huari, 2014).

<b>Reino</b>	: Vegetal
<b>Sub reino</b>	: Embryophyta
<b>División</b>	: Magnoliophyta
<b>Clases</b>	: Magnoliopsida
<b>Subclase</b>	: Methachamydeae
<b>Orden</b>	: Tubiflorae
<b>Familia</b>	: lamiaceae (labiatae)
<b>Género</b>	: Minthostachys
<b>Nombre científico</b>	: Minthostachys mollis
<b>Especie</b>	: Minthostachys
<b>Nombre vulgar</b>	: Muña

### 2.2.3. Descripción de Muña

La planta tiene una presentación leñosa, frondosa con forma general de glauco, su tallo es ramificado desde la base. Su peciolo mide entre 4 y 6 mm de largo en la parte superior y convexo en la parte inferior, es aquí donde se deposita la mayor cantidad de aceite que deja sentir su aroma característico (Pascacio & Quinteros, 2016).

El cáliz soldado con 13 venaciones terminadas en 5 lóbulos dentados casi iguales entre sí con pelos cerellosos en la base, la corola raramente es de 6mm de largo, dividida en 2 labios: 2 lóbulos a labio superior y 3 lóbulos a labio inferior. Los pelos de las partes aéreas, las hojas y tallos parecen que forman una especie de manto protector contra los cambios bruscos de temperatura y al mismo tiempo son los lugares en donde se deposita el aceite esencial (Coy & Acosta, 2013).

#### 2.2.4. Información de principios activos de muña

Según Cano (2014) desde la antigüedad los hombres utilizaban la muña como conservantes de los alimentos por más días, esta planta posee más calcio que la maca y un alto contenido de fosforo, clave favorecer el crecimiento y mantenimiento de los huesos y dientes. Según la medicina moderna afirma un buen funcionamiento del sistema nervioso del ser humano gracias a sus principios activos que contiene la planta tal como se menciona en la tabla 2.

Tabla 2.  
*Principios activos de la muña (Menthastachys mollis)*

PRINCIPIOS ACTIVOS DE MUÑA	
Pulegona	46.70%
Mentona (monoterpenonas)	15.89%
Isomentona (monoterpenonas)	
Linalol	2.94%
Cariofileno	2.03%
Carvacrol acetato	1.85%
Espatulenol	1.65%
Limoneno	1.43%
Isopulegon	1.18%
Componentes menores	12.99%

*Nota:* obtenido de Cano (2014).

#### 2.2.5. Comercialización de muña

En el Perú se tiene estimado que existen 30.000 especies de plantas de las cuales la Institución Nacional Indígenas mencionó que 3.000 son usos medicinales, esto es el 10% del total de la florística del país. Según Salcedo (2009) la muña es denominado la menta de los andes es la tradición campesina ya que su nombre es evocado en toda actividad cotidiana. En la actualidad las empresas de laboratorios “Natusol”, es el principal matriz del grupo empresarial que tiene como función de producir productos medicinales. Ya que la competitividad del producto es de carácter natural.

### 2.3. Aceite Esencial

Los aceites esenciales son líquidos aceitosos aromáticos que se obtienen de diferentes métodos de extracción a partir de material vegetal como: flores, tallos, raíces, hojas, frutos

y semillas, algunos de ellos precisan la actividad antimicrobiana y anti fúngica, evaluadas con una fuente potencial de nuevos compuestos antimicrobianos y una alternativa para la preservación de alimentos (Guiñez & Parra, 2016).

### **2.3.1. Funciones de los aceites esenciales en la planta**

Según Alzamora, Morales, Armas, & Fernandez. Gilma (2001) informan que se conoce exactamente la importancia bioquímica que desempeña los aceites esenciales, probablemente deben considerarse como productos accesorios del metabolismo, también han demostrado que los aceites esenciales regulan la traspiración que manifiesta que los aceites esenciales son secreciones patológicos como la resina, el bálsamo que sirve como sustancias protectoras contra las enfermedades de los órganos dañados.

### **2.3.2. Aceite esencial y sus beneficios**

Los aceites esenciales tienen numerosas propiedades medicinales, son muy eficaces que tienen su propia propiedad terapéutica frente a los hongos, ya que cada aceite esencial tiene sus propiedades. Estos aceites permiten alejar las enfermedades y los parásitos, también cumple permitiendo atraer a los insectos polinizadores (Coy & Acosta, 2013).

### **3.3.3. Análisis en aceites esenciales**

#### **3.3.3.1. *Propiedades físicas***

Según Heredia & Montenegro (2015) la densidad se puede identificar fácilmente, Según Lawson (1999) las características físicas de un aceite son dependientes de los factores tales como: hojas o semillas estas cadenas de carbono son formas isomericas de los ácidos grasos.

#### **a. Índice de peróxido**

El índice de peróxido señal del estado de oxidación inicial de un aceite en donde la expresión es meliequivalente de oxígeno activo por kilo de grasa, que es el compuesto de oxidación inicia en donde son originados que los aceites son maltratados ya que no se protege de la luz solar (Pascacio & Quinteros, 2016).

b. Índice de Iodo

El índice de Iodo (IV) es una medida total de los dobles enlaces presentes en las grasas y aceites, en donde se representa número de grasas o aceites (Paucar, Reyes, Sánchez, & Rojo, 2015).

c. Índice de acidez

El índice de acidez son los ácidos libres en donde menciona la calidad del aceite, la suma de los ácidos grasos no combinados, resultado de la hidrólisis o la descomposición lipolítica de algunos triglicéridos (Lafont, Páez, & Lans, 2011).

d. Índice de refracción

Según Nielsen (2009) el índice de refracción es la medida del cambio y dirección de la onda de luz particular al moverse a través de una sustancia específica y de un aceite se define como la relación con el grado de saturación. Según Finkenzeller (2009) es la que permite detectar adulteraciones y envejecimientos y sus principales ventajas son la rapidez y sencillez con que puedan obtenerse.

e. Densidad

La densidad no representa un parámetro directo de calidad, aunque puede variar con la polimerización o la oxidación. Según NTC ICONTEC 336 (2002) afirma que la densidad depende de la temperatura y la presión. La temperatura debe especificarse junto a la densidad

### **3.4. Tipos de extracciones de aceites**

#### **3.4.1. Arrastre por vapor**

Según Cerpa (2011) en la destilación por arrastre por vapor de agua se lleva a cabo la vaporización selectiva del componente volátil de una mezcla formada por este y otros “no volátiles”, lo anterior se logra por medio de la inyección de vapor de agua directamente, también denominada este “vapor de arrastre”, ya que este método son métodos sencillo y bajo costo, pero su inconveniente es que requiere largos periodos de tiempo y tiene rendimientos bajos en comparaciones con otros métodos.

#### **3.4.2. Procedimiento de la metodología**

Colocar el agua destilada en el matraz N° 1 el generador de vapor y agregue cuerpos porosos. En el matraz N° 2 coloque la muestra cortado en trozos pequeños y al cerrar la tapa

del matraz, cuide que la conexión de vidrio no se obstruya con los trozos de la muestra, pues de ser así no habrá paso de la corriente de vapor.

Caliente con el mechero en matraz N° 1 hasta ebullición, con el fin de generar el vapor que pasara al matraz N° 2, extrayéndose de esta manera el aceite esencial, el cual es inmediatamente arrastrado por el vapor de agua en un proceso de destilación.

Nota: suspenda el calentamiento cuando el volumen del destilado sea de 100 a 150 ml aproximadamente. De este destilado extraiga totalmente el aceite esencial, colocando en el embudo de separación el destilado y separando la mayor parte de la fracción acuosa, al aceite sobrenadante (unas cuantas gotas) agregue 5 ml acetato de etilo para facilitar su separación. La fase acuosa se desecha y el extracto orgánico se colecta en un matraz Erlenmeyer o un vaso de precipitado, agregar entonces la cantidad necesaria de sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua remanente. Filtre o decante e extracto seco y colocar en un vial. Finalmente realice una c.c.f. para comprobar el grado de pureza de aceite obtenido.

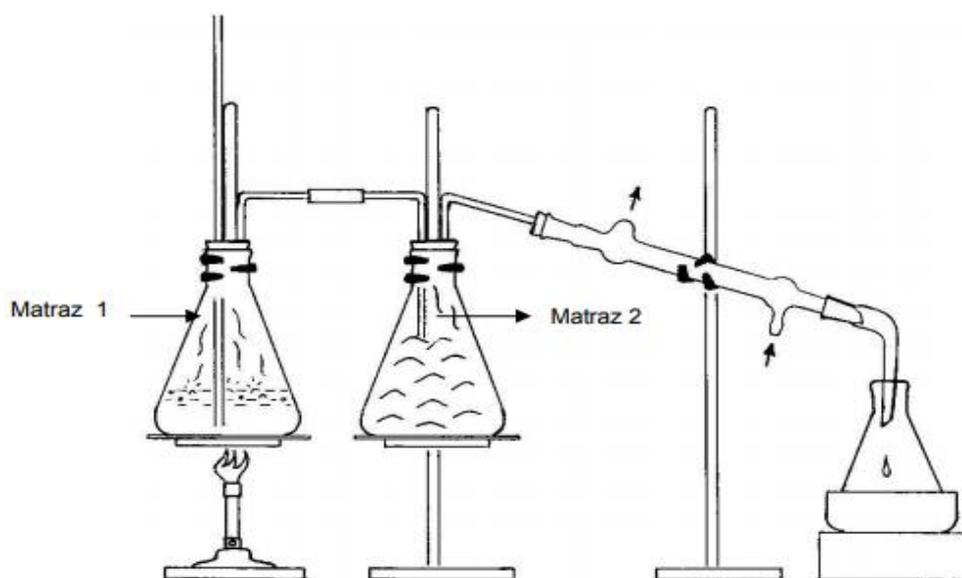


Figura 3. Extracción de aceite esencial por método arrastre por vapor  
Nota: Cerpa (2011)

### 3.5. Método directo

Según Luna, Garcia, & Lopez (2009) el método directo se aplica principalmente a los cítricos, porque sus aceites están presentes en la corteza de la fruta y el calor de los métodos de destilación puede alterar su composición. El aceite de los cítricos está contenido en numerosas celdas del epicarpio; al exprimir la corteza tales celdas se rompen y liberan el

aceite, gel cual se recoge inmediatamente para evitar que sea absorbido por la corteza esponjosa después del proceso.

### **3.5.1. Procedimiento de la metodología**

Colocar en un matraz redondo de 500 ml. agua destilada y 65 g. de muestra cortado en trozos pequeños, agregar una barra magnética de tamaño apropiado, montar un equipo de destilación simple con las piezas necesarias de boca 24/40 y calentar con una parrilla con agitación, hasta reducir unos 150-200 ml de destilado.

De este destilado extraiga totalmente el aceite esencial, colocando en el embudo de separación el destilado y separando la mayor parte de la fracción acuosa. El aceite sobrenadante (unas cuantas gotas) agregar 5 ml de acetato de etilo para facilitar su separación.

La fase acuosa se desecha y el extracto orgánico se colecta en un matraz Erlenmeyer de 50 ml agregar entonces la cantidad necesaria de sulfato de sodio anhídrido para eliminar el agua remanente. Filtrar o decantar el extracto seco y coloque en un vial. Finalmente realice una c.c.f. para comprobar el grado de pureza del aceite obtenido.

### **3.6. Método Hidrodestilacion**

Según Luna, Garcia, & Lopez (2009) consiste en poner a hervir agua, bien sea por fuego directo, camisa de vapor o camisa de aceite, en la cual se ha sumergido previamente el material vegetal preferible en polvo ya que este sistema de extracción tiene inconveniente de que la temperatura que se emplea provoca que algunos compuestos presentes en la plantas se degraden y se pierdan. Generalmente no es posible colocar suficiente agua para sostener todo el ciclo de destilación, se han diseñado equipos que presentan un tubo de cohobación. Involucran un bajo costo de fabricación del equipo y su operación no requiere de servicios de energías eléctricas instalaciones auxiliares para la generación de vapor aire u otros.

#### **3.6.1. Procedimiento:**

Colocar en el matraz un aproximadamente de 1/4 y 1/3 de su volumen, el material que va a extraer, cortado en trozos pequeños (molido o triturado si se trata de semillas). Agregar agua destilada hasta la mitad del matraz y colocar cuerpos de ebullición; monte el matraz en su canastilla de calentamiento.

Nota: ajustado con fibra de vidrio si es necesario y sosténgalo con unas pinzas y colocar con cuidado la trampa de Clevenger, engrasando ligeramente las juntas esmeriladas y sostenga con otras pinzas la boca que lleva el refrigerante coloque las mangueras al refrigerante. Colocar las mangueras al refrigerante y colocar engrasando ligeramente la unión y ayude a sostenerlo con otras pinzas, conecte la canastilla al reóstato. Comience a calentar cuidadosamente hasta ebullición asegurarse que el reflujo es el adecuado.

El aceite se va separando en la bureta de la trampa. Suspnda el reflujo cuando considere que ha sido suficiente deje enfriar un poco el aparato y recoja el aceite en un matraz Erlenmeyer de 50 ml, séquelo con sulfato de sodio anhidrido y viértalo a un vial. Finalmente realice una c.c.f. para comprobar el grado de pureza del aceite obtenido.

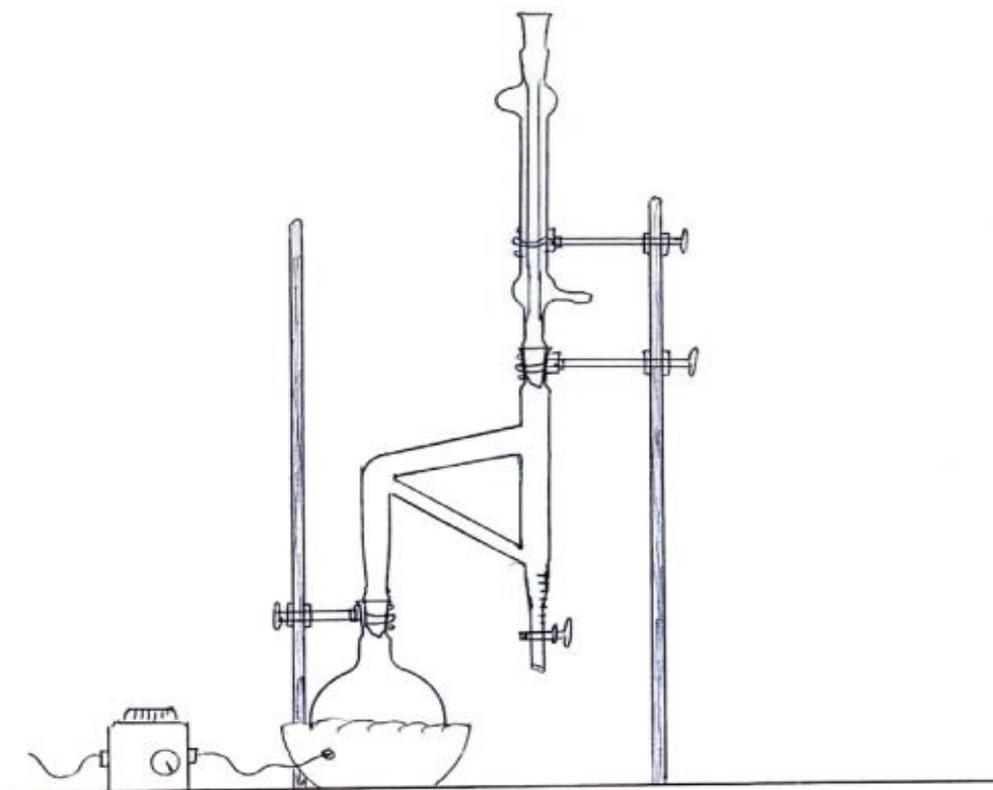


Figura 4. Extracción de aceite esencial por método Hidroddestilacion  
Nota: Luna, Garcia, & Lopez (2009)

### 3.7. Método microondas

Según Kimbaris et al. (2006) el uso de microondas es otra alternativa para la extracción de aceites esenciales, esta técnica puede utilizarse como un método convencional como la hidroddestilación o adaptando un equipo para establecerlo como un método independiente, como la extracción por microondas sin disolvente.

### 3.7.1. Procedimiento de la metodología

El calentamiento por microondas y la destilación seca. Para ello no se necesita agregar ningún disolvente o agua si se emplea material fresco. En caso de que el material este seco, este se rehidrata remojándolo en agua y drenando el exceso antes de la extracción. Los equipos para llevar a cabo esta técnica. Conecte un matraz de fondo plano con un aparato de refrigeración y un tubo de separación por gravedad, por el que pasa una corriente de agua fría, sellado la conexión con el horno para evitar la fuga de microondas que adapta un aparato de destilación.

La extracción por microondas ofrece beneficios como una reducción considerable del tiempo y del consumo de energía, esta método puede realizar se de gran escala con reactores de microondas pero se requiere altos niveles de seguridad.

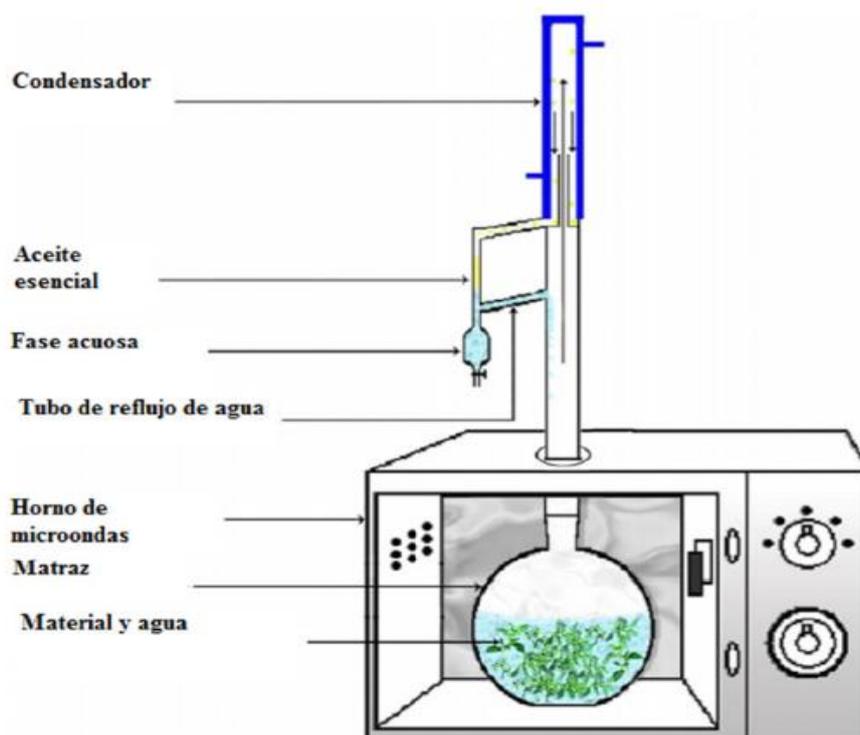


Figura 5. Extracción de aceite por método microondas  
Nota: Kimbaris et al. (2006)

### 3.8. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales

Los aceites esenciales son compuestos extraídos de varias plantas y es usado para preservar alimentos y bebidas tienen un efecto inhibitorio. Según la Administración de Medicamentos y Alimentos o Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) la clasificación de seguridad de los aceites esenciales y los suplementos alimentarios tienen un grado terapéutico sobre los microorganismos. Algunas de las aplicaciones en cuanto a

inhibición microbiana es a partir de aceites esenciales que ha demostrado la eficacia frente a varios patógenos comunes en la industria alimentaria, dentro de los cuales se encuentran como: *E. coli*, *salmonella typhimurium*, *S. aureus*.

Según Sierra & Solis (2017) quien realizó la “Efectividad del aceite esencial de *Minthostachys Mollis* en concentraciones de 25, 50, 100% frente a *Porphyromonas Gingivalis* estudio In vitro, tuvo como propósito fue determinar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys Mollis* frente a *Porphyromonas Gingivalis* que es el principal periodonto patógeno, la extracción de aceite se realizó por método de arrastre por vapor, luego se siguió el procedimiento que fue presentado en 25%, 50%, 100% concentraciones, la efectividad antibacteriana en la en la concentración al 25% obtuvo un halo promedio de 11,2 mm al 50%, la efectividad alcanzo un halo de 9,6 mm y al 100% se logró un halo promedio de 13,6 mm siendo una concentración más efectiva ya que los controles estuvieron un rango muy sensible y el control negativo no obtuvo efectividad.

Según Castañeda (2013) quien realizó el trabajo titulado “Efecto inhibitorio in vitro del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys Mollis* (muña) sobre colonias de *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212”, los objetivos fueron determinar y comprar el efecto inhibitorio in vitro del KI al 2% y el aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Muña) frente a cepas de *Enterococcus faecalis*, dentro de ello se evaluó la susceptibilidad utilizando el método de difusión de discos “Kiby-Bauer”, que se utilizaron 7 placas Petri con agar Muller-Hinton donde se sembraron las cepas del E. faecalis y se colocaron los discos etanolica al 50% y el aceite esencial al 100% donde se incubaron a 37°C en una estufa durante 24 horas, luego se midió los halos de crecimiento con una regla milimétrica, los resultados obtenidos fueron al 100% del aceite esencial y el de menor promedio fue del Ki al 2% los halos disminuyeron de tamaño en la lectura a las 72 horas por lo cual concluyo que el aceite esencial de *Minthostachys Mollis* (muña) al 100% posee mayor actividad Inhibitoria in vitro sobre el crecimiento del *Enterococcus Faecalis* que el Ki al 2% y la dilución etanolica de aceite esencial al 50%.

### 3.9. Tipo de cultivos y diseños de estudios

#### 3.9.1. Determinación de la sensibilidad de una bacteria a agente microbiano: Antibiograma (Difusión de agar)

Este método de difusión en agares, es una prueba en que la bacteria actúa sobre la superficie de un medio de agar a una solución antibiótica en discos de papel filtro, ya que este método fue estandarizado por Solano, Escobar, & Reyes (2004). Por tanto los factores afectan el halo de inhibición: la carga de antibióticos en los discos. La velocidad del crecimiento bacteriano es el tiempo de inoculación. Según Quispe & Mamani (2016) los discos pueden ser comprados u obtenidos y deben contener la cantidad establecida de antibiótico y ser conservada a 4°C de la humedad. La lectura se debe realizar dentro de las 24 horas con temperatura de 37 ° C, este método únicamente para bacterias patógenas de crecimiento rápido para dar lugar las interpretaciones erróneas del halo de inhibición.

- **Experimental:** se presentó por los discos de papel filtro embebidos con alcohol al 96°
- **In vitro:** porque el estudio se realizó en unos medios cultivos que sirven para el desarrollo de los microorganismos y su manejo en campo de laboratorio.
- **Prospectivo:** a la recolección de datos se realizó conforme a la ocurrencia de los hechos.

#### 3.9.2. Determinación de la concentración mínima inhibidora

Los métodos más aplicados para la siguiente determinación son los métodos de dilución

- **E-TEST:** es un método que presenta con las ventajas de ser una técnica semicuantitativa. La zona inhibitoria alrededor de ella forma una elipse y el extremo indica el crecimiento con la CMI.
- **Dilución de Agar:** se inoculan placas con dobles concentraciones con cepas microbianas, tras la inoculación se determina la CMI de acuerdo al criterio ya expuesto.
- **Dilución en caldo:** se puede realizar en forma de macro dilución o micro dilución, se emplea un inóculo bacteriano estandarizado con diluciones dobles, tras la incubación se realizan subcultivos en placas, de esta forma se calculan la CMI y CMB.

### **3.9.3. Agares**

#### **3.9.3.1. Agar Müller Hinton (difco)**

Es un medio cultivo, tiene como uso principal realizar ensayos de sensibilidad y susceptibilidad de los microorganismos frente a los antibióticos ya que el crecimiento crecerá exitosamente debido a su superficie (Cona, 2002).

#### **3.9.3.2. Agar baird Parker (difco)**

Este agar se utiliza para la detección y enumeración de *Staphylococcus aureus* en alimentos en un entorno de laboratorio ya que esta utilizado para el diagnóstico de enfermedades u otras condiciones en humanos (Herrera, 2015).

#### **3.9.3.3. Peptona**

El agua Peptonada es un medio de crecimiento mínimo, que permite el cultivo de organismos no fastidioso, este medio cultivo también se utiliza para las pruebas bioquímicas (Palacios, Pérez, & Acosta, 2013).

#### **3.9.3.4. Agar hierro triple azúcar**

Este agar es un medio cultivo, más empleado para la diferenciación de enterobacterias según su fermentación de la glucosa haciendo virar a color amarillo (Rodríguez & Muñoz, 2017).

#### **3.9.3.5. Agar hierro lisina**

El agar hierro se utiliza para la diferenciación de microorganismos sobre la base de producción de lisina descarboxilasa y ácido sulfhídrico ya que este medio es utilizado para los diagnósticos de enfermedades u otras condiciones en humanos (Castilleja, Barrera, Medrano, Tapia, & Peniche, 2015).

#### **3.9.3.6. Agar caldo Urea**

Este agar se utiliza para la valoración de la producción de ureasa por algún enterobacterias, es un medio glucosa, urea rojo fenol ya que las bacterias que producen ureasa dan lugar al carbonato de amonio como indicador rojo purpura (Ildefonso et al.,2017).

### 3.9.3.7. *Agar citrato de Simmons*

El agar se utiliza para diferenciar las bacterias Gram- negativas en función de la utilización de citrato es útil para la selección de organismo que utilizan citrato como el principal fuente de carbono que sirve para ciertos crecimientos (Alemán, Hernández, & Diaz, 2004).

## 3.10. Cepas microbianas

### 3.10.1. *Staphylococcus aureus*

Es un coco inmóvil de 0.8 a 1 micrómetro que se divide en tres planos para formar racimos de uvas de gran tinción, que crece tanto en una atmosfera con o sin oxígeno, que es capaz de crecer hasta 10% de sal común, por eso puede crecer en el agua del mar (Elika, 2013).

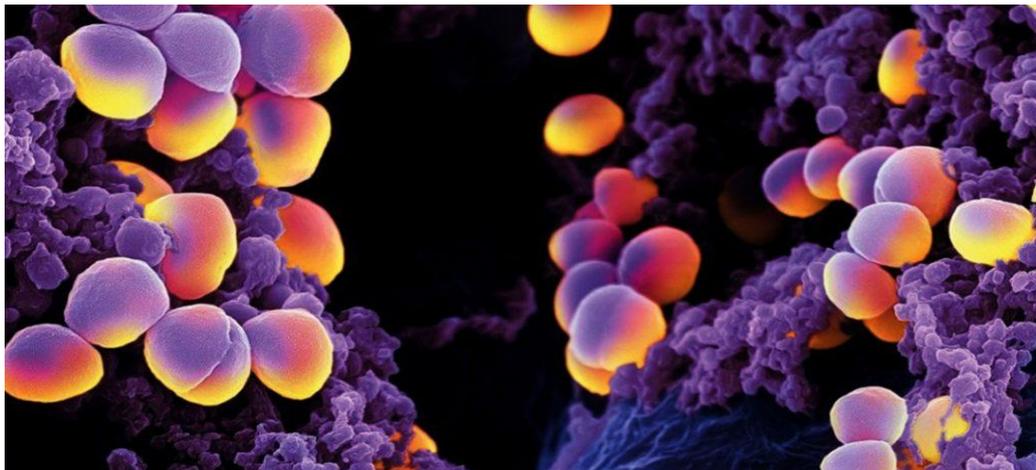


Figura 6. *Staphylococcus aureus*

#### 3.10.1.1. *Clasificación taxonómica*

En la tabla 3 de presenta la clasificación taxonómica de *Staphylococcus aureus* según (Elika, 2013).

Tabla 3.  
*Clasificación taxonómica de Staphylococcus aureus*

CATEGORÍA TAXONÓMICA	CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA
Dominio	Bacteria
Reino	Prokaryotae
División o PHYLLUM	Firmicutes
Clase	Bacili
Orden	Bacillales
Familia	Micrococcaceae
Genero	Staphylococcus
Especie	S. aureus

Nota: Según Elika (2013)

### 3.10.1.2. Condiciones para su crecimiento *in vitro*

Según Elika (2013) esta bacteria patógena está formada por toxinas más resistentes y puede sobrevivir durante largos periodos de tiempo en un ambiente seco y muy persistente en alimentos, sus toxinas son altamente estables y resistentes al calor, congelación e irradiación por lo que es formada en el alimentos y las condiciones de las toxinas se presenta en la siguiente tabla 4 en donde presenta las condiciones de crecimiento.

Tabla 4.  
*Condiciones de las toxinas de Staphylococcus aureus*

	Mínimo	Optimo	Máximo
Temperatura	10	40 - 45	48
pH	4	07-ago	9.6
Actividad de agua	0.85	0.98	0.99

Nota: según Sheagren (2016).

### 3.10.1.3. Características microscópicas

Estos microorganismo *Staphylococcus aureus* trata de cocos Gram positivos que poseen de tendencias a agruparse en racimos que presentan de una forma esférica y un diámetro de alrededor de una micra (Sheagren, 2016).

#### 3.10.1.4. *Características macroscópicas*

Para las mejores presentaciones de las cepas se debe de estudiar en una placa Petri ya que permitirá observar las características de las colonias que presentaran colonias de 1 a 3 mm de diámetro. La producción de pigmentos se ve favorecida si se incuban los cultivos por 24 a 48 horas adicionales a temperatura ambiente (Sheagren, 2016).

Según Salamanca et al. (2010) quienes realizaron el estudio con el propósito determinar las condiciones bajo las cuales *Staphylococcus aureus*, en alimentos preparados no industriales, generando riesgos para la salud del consumidor, para ello se definió como alimento preparado de tipo no industrial como: manipulados, mezclados, cocidos en restaurantes, colegios, establecimientos penitenciarios, casinos hogares, clubes sociales entre otros, las inspecciones se concluyó que de un total de 6.113 alimentos contaminados con *Staphylococcus* coagulada positiva, 2.779 (45,46%) corresponde a alimentos preparados no industriales, de estos últimos 2.672 (96.15%) reportaron recuento menor de 100 UFC/g y 107 (3,85%) mayor de 100 UFC/g, la gran cantidad de problemas presentados en los alimentos preparados no industriales son la implementación adecuada de programas de limpieza, desinfección y capacitación de los manipuladores con estrategias de prevención de la contaminación cruzada.

Según Rodríguez (2016) realizó el trabajo de la calidad de la carne y contaminación microbiológica por *Staphylococcus aureus* meticilicas resistentes en canales de conejo (*Oryctolagus cuniculus*) procedentes de unidades de producción familiar del valle de Toluca, que en la actualidad la carne de conejo es muy valorado por sus propiedades nutricionales y dietéticas, ya que la carne es un buen sustrato para la contaminación cruzada, en los conejos puede causar mastitis, dermatitis, exudativa, abscesos subcutáneos y septicemias, por lo cual en el trabajo se estudió 210 canales de conejos distribuidos en 30 granjas y los resultados de la bromatología fueron: materia seca  $26.21 \pm 1.25\%$ , humedad  $73.79 \pm 1.25$ , proteína  $22.17 \pm 1.11$ , grasa  $3.09 \pm 0.83$  y ceniza  $1.12 \pm 0.47$ , la identificación fenotípica y genotípica la infección por estafilococo resistentes a la meticilina (MRSA) fue de 0.95% en canales de conejo, en conclusión se determinó el valor nutricional y la identificación del MRSA.

Según estudios hechos por PNVIH (2011) El programa Nacional de Vigilancia de Infecciones Hospitalarias de Argentina, quienes hallaron bacterias de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (SARM) en carnes de supermercados, al parecer el germen

está siendo introducido por la personas que lo manipulan, el equipo de “Zhang” comprobó con 156 carnes de res, 76 de pollo y 57 de pavo en un total de 289 muestras de carne cruda en treinta supermercados con presencia de microorganismos, que estos pueden ocasionar hasta la muerte de las personas.

### 3.10.2. Coliformes fecales

Según la revista Aire Libre los *coliformes fecales* son encontrados en el intestino de los seres humanos y animales de sangre caliente que pueden multiplicarse en temperaturas de 44°C. Ya que el crecimiento se lleva en los criterios de medios cultivos principalmente de *Escherichia coli*.



Figura 7. Coliformes fecales

#### 3.10.2.1. Clasificación taxonómica

En la tabla 5 se presenta la clasificación taxonómica y la clasificación científica de *coliformes fecales* según (Vásquez, Gerardo Salhuana, Jiménez, & Abanto, 2018).

Tabla 5.  
*Clasificación taxonómica de Coliformes Fecales*

CATEGORÍA TAXONÓMICA	CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA
Reino	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Gamma Proteobacteria
Orden	Enterobacteriales
Familia	Enterobacteriaceae
	Escherichia
	Klebsiella
Genero	Enterobacter
	Citrobacter

*Nota:* Vásquez, Gerardo Salhuana, Jiménez, & Abanto (2018).

### **3.10.2.2. Condiciones para su crecimiento *in vitro***

Los coliformes representan por géneros que se trata de un grupo de bacterias de Gram negativas, aerobias y anaerobias facultativas no formadoras de esporas, fermentadoras de la lactosa a 37°C, que poseen enzimas  $\beta$ -galactosidasa, son oxidasas negativas que forman parte de la flora intestinal de los seres humanos y de los animales de sangre caliente y fría (Vásquez, Gerardo Salhuana, Jiménez, & Abanto 2018).

### **3.10.2.3. Características macroscópicas y microscópicas**

En la higiene de los alimentos los fecales tiene un rol importante de ver la calidad del alimento, según Garzón, Prieto, Betin, & Cubillos (2014) los coliformes son muy importantes para asegurar la inocuidad alimentaria, especialmente dentro del programa HACCP.

Según Delgado (2012) realizó el trabajo de análisis microbiológico para control cualitativo de carne de ovina y caprina seca y salada, con la finalidad de analizar los parámetros de calidad microbiológica de un producto transformado derivado de carnes de carcasas de ovino y caprinos, que fue sometido a un proceso industrial de salado al 20% por 72h y secarlo por 72h, se analizó 15 ejemplares escogidos al azar, 8 muestras de ovinos y 7 de caprinos, los cuales son sometidos a recuento en placa para microorganismos psicófilos, mesófilos, levaduras y mohos, *Staphylococcus aureus* y el tés de conteo de coliformes totales

y fecales a través de kit simplate. La presencia de coliformes fecales y clostridios sulfito-reductores en algunos lotes analizando evidencias posibles. En cuando a los parámetros higiénicos sanitarios se presentó ausencia de salmonella así como *Staphylococcus aureus* y coliformes fecales y clostridios sulfito, están dentro de los valores encontrados en la literatura, asegurando que estos productos poseen un riesgo mínimo de provocar intoxicaciones alimentarias debido a estos microorganismos.

Según Chavarri, Rojas, Rumbos, & Narcise (2014) quienes realizaron el trabajo Detección de microorganismos en maíz tierno molido comercializado en Maracay estado Aragua, Venezuela, quien realizó la evaluación la microbiana asociada al maíz molido, que analizaron 20 muestras provenientes de varios centros de distribución, cada muestra se le analizo la medición de pH y acidez, para la estimación de coliformes totales y fecales se usó el método NMP (Norma Covenin 1104:1996), los valores encontrados de pH entre 6.1-6.4, acidez 2.6-2.8, los contajes de mohos fueron:  $8.6 \times 10^6$  y  $1.2 \times 10^7$  UFC/g, levaduras es:  $9.3 \times 10^6$ , y de mesófilos fue de:  $3.6 \times 10^6$ - $4.7 \times 10^6$ , de coliformes totales es:  $1.5 \times 10^8$  -  $8.4 \times 10^7$  y coliformes fecales es:  $2.1 \times 10^8$  –  $9.8 \times 10^7$ , las respuestas presentadas de coliformes totales y fecales sobrepasaron el límite máximo de  $2 \times 10^3$ , según la norma mexicana NOM-147-SSA1-1996, por lo cual se menciona que una contaminación elevada crecimiento de coliformes que representa un riesgo para la salud humana.

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo se realizó en el Centro de Investigación de Tecnología de Alimentos (CITAL) de la Universidad Peruana Unión, por otro lado la extracción del aceite esencial de Muña, Eucalipto se llevó en las instalaciones de Ingeniería Química (UNAP).

#### 3.2. Materia Prima

##### 3.2.1. Muña y Eucalipto

Las materias primas que se utilizó para la extracción del aceite fueron: muña variedad *Satureja montana ajedrea*, a inicios de florecimiento de color blanco y eucalipto variedad *Gunni*, estas muestras fueron recolectadas a las 14 horas en la Comunidad Huaquina a 2 km de la Provincia de Chucuito Juli, departamento de Puno.

#### 3.3. Cepas microbianas

Las cepas microbianas como: *coliformes fecales* y *Staphylococcus aureus* son ampliamente difundidos en la naturaleza para tal efecto, estas cepas como: *coliformes fecales* se obtuvieron en el laboratorio de microbiología de la Carrera Profesional de Ingeniería Ambiental y *Staphylococcus aureus* fue obtenido en el Hospital “Carlos Monje Medrano” en el laboratorio clínico del Área de microbiología, luego se realizó el aislamiento para las pruebas bioquímicas para posterior ser aplicadas en la inhibición de los aceites esenciales.

#### 3.4. Materiales e instrumentos de laboratorio

##### 3.4.1. Materiales de laboratorio

- Tubos de ensayo
- Vasos precipitado 100, 250 ml (Pyrex)
- Matraz de 250 y 500 ml (Pyrex)
- Placas Petri (Pyrex)
- Probetas de 100, 250ml (Pyrex)
- Pipetas 1,5 y 10 ml (Pyrex)

- Micropipeteador
- Micro pipetas (12 Unidades)
- Espátula, canaletas
- Papel filtro
- Algodón, gasa y pabilo
- Asas de siembra y asa de drigalski
- Mechero bunsen
- Pinzas metálicas
- Gradillas
- Discos de papel filtro
- Papel craft

#### **3.4.2. Equipos de laboratorio**

- Extractor arrastre de vapor (Inducontrol)
- Balanza analítica de 0.001 (PIONEER)
- Autoclave (Jisico-JNA45:13.6)
- Estufa eléctrica (Samsung-9030B)
- Incubadora ( Binder-Serie 03-43903)
- Cocina eléctrica

#### **3.4.3. Reactivos**

- Etanol 96°
- Agua destilada

#### **3.4.4. Medios Cultivos**

- Agar Mueller Hinton: Difco
- Agar baird Parker: Difco
- Peptona
- Agar hierro triple azúcar
- Agar hierro lisina
- Caldo urea

- Agar citrato de Simmons

### 3.5. Metodología experimental

#### 3.5.1. Flujograma de extracción de aceite esencial por arrastre de vapor

En la figura 8 se presenta el flujograma para extracción de aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus labill*) y muña (*Minthostachys mollis*), en donde se utilizó el extractor por arrastre de vapor de capacidad de 5kg.

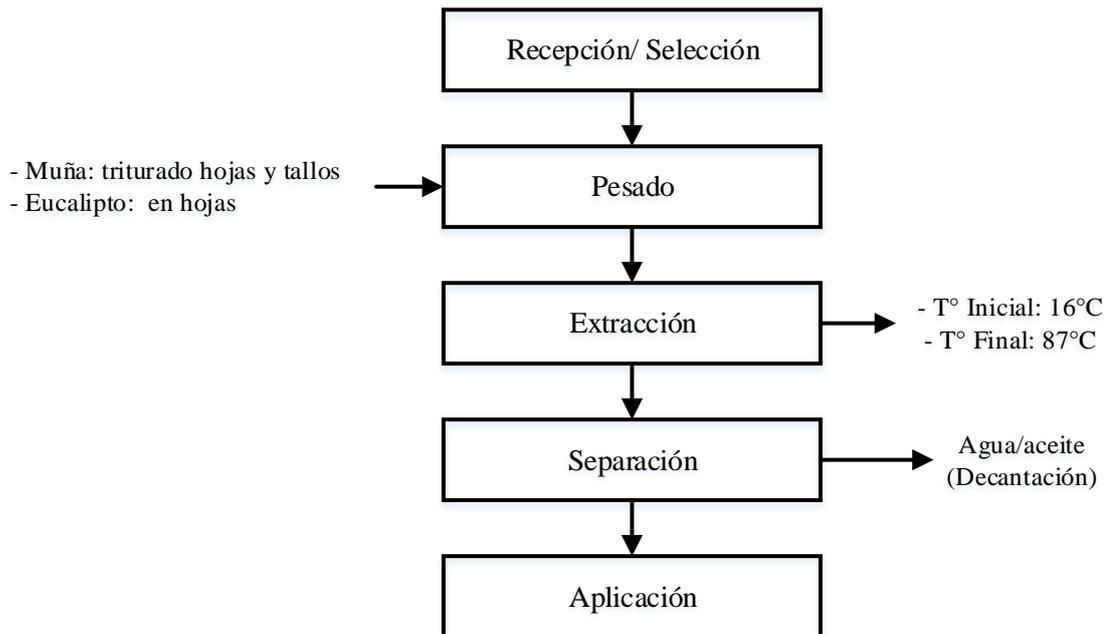


Figura 8. Flujograma de extracción de aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus labill*); muña (*Minthostachys mollis*)

#### 3.5.2. Descripción del flujograma

##### 3.5.2.1. Selección

Se seleccionó hojas verdes y tiernas de eucalipto de variedades *Gunni* y también se seleccionó hojas y tallos triturados aprox. 3 a 5cm de largo de muña variedad *satureja montana ajedrea*

##### 3.5.2.2. Pesado

Se realizó el peso de las hojas de eucalipto y muña en hojas y tallos verde en una cantidad de 5 kg cada muestra, en una balanza de precisión.

### 3.5.2.3. *Extracción*

Se procedió a introducir en el extractor una cantidad de 5 kg de cada muestra (muña, eucalipto) durante 3 horas a una temperatura inicial de 17°C y la temperatura final de 187°C.

### 3.5.2.4. *Separación*

Se utilizó la pera de decantación de 500 ml, en donde se envaso en unos recipientes oscuros de 10 ml, por tanto gracias a la presencia de la densidad del aceite que se logra la separación inmediata

## 3.6. **Determinación del rendimiento del aceite esencial**

Para la determinación del rendimiento del aceite esencial se Eucalipto y Muña se procedió a utilizar el método usado por (Zambrano 2014) en donde:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{M(2)}{M(1)} \times 100$$

M2 = masa del aceite en kg.

M1 = masa de la muestra kg

100 = Factor matemático

## 3.7. **Análisis fisicoquímico del aceite esencial**

En análisis fisicoquímico del aceite de Muña y Eucalipto se realizó mediante la metodología presentada en la tabla 6.

Tabla 6.

*Métodos aplicados para la determinación del análisis fisicoquímico del aceite extraído*

<b>ANÁLISIS</b>	<b>MÉTODO</b>
Determinación índice de Peróxido	Método Volumétrico
Determinación índice de Acidez	Método Convencional
Determinación índice de Iodo	Método de Wijs
Determinación índice de Refracción	Método Pfund
Determinación de Densidad	Método Picnómetro (Norma: INV E-222 e INV E-223)

### 3.8. Determinación de la capacidad mínima inhibitoria

Para la determinación de la capacidad mínima inhibitoria de los microorganismos en estudio se aplicó el procedimiento realizado por Luna, Garcia, & Lopez (2009), con algunas modificaciones que consiste en:

#### **Procedimiento:**

- Sé obtuvo las cepas de los *coliformes fecales* en el laboratorio de microbiología de la carrera profesional de Ingeniería Ambiental de la Universidad Peruana Unión, en caldo de bilis verde brillante y se incubo a 37°C por 24 horas.
- Sé obtuvo la cepas *Staphylococcus aureus*, en el hospital “Carlos Monje Medrano” en el área de Laboratorio Clínico de microbiología
- Se preparó el caldo Peptonada con cloruro de sodio en 20ml en un matraz de 50 ml, y se pasó a esterilizar a 120°C por 15 minutos, luego se utilizó las azas para acopiar de la placa colocando al matraz en medio líquido e incubadora a 37°C por 24 horas.
- Se preparó el medio agar Mueller Hinton y calentar en una cocinilla durante 1 minuto, luego se llevara al equipo “auto clave” juntamente con los materiales: Placas Petri, tubos de ensayo, pinza, hisopos y discos de sensibilidad, durante 30 minutos a 120°C.
- Se vertió el medio agar Mueller Hinton en placas Petri estériles aproximadamente 25 ml por placa, se dejó endurecer durante 5 minutos en un lugar estéril
- Después de 5 minutos se aplicó la muestra de *Coliformes* previamente preparado en caldo de bilis verde brillante con los hisopos en las 18 placas y caldo Peptonada para *Staphylococcus aureus* se realizó la estriada a 18 placas Petri
- Luego se colocó los discos de sensibilidad en las placas Petri en 4 lugares no menor de 15mm y de 1.5cm del borde de la placa utilizando la pinza estéril.
- Se realizó las diferentes diluciones de aceite esencial de muña, eucalipto con alcohol en 25%,50% y 75%.
- Luego se separó en placas Petri para ser aplicado con diferentes concentraciones o diluciones en los discos con el micropipeteador colocando 1 micro litro de la dilución
- Se apuntó los datos con un marcador el tipo de muestra en las placas Petri de *Coliformes fecales* y *Staphylococcus aureus* y las diferentes concentraciones de aceite esencial (25%, 50%, 75%).

- Se colocó las 36 placas Petri en una estufa, incubadora a 37°C por 24 horas, luego se procedió a medir los halos de crecimiento.
- Después de 24 horas se utilizó el instrumento el pie de rey en donde el instrumento presenta resultados en mm, luego se apuntaron en apunte los halos de crecimiento para luego ser comparados las concentraciones en los resultados.

### 3.9. Pruebas bioquímicas de *Coliformes fecales* y *Staphylococcus aureus*

En la figura 9 se muestra la esquema de pruebas bioquímicas para *Coliformes fecales* y *Staphylococcus aureus*, con el propósito de confirmar de dichas cepas (UNAM, 2016, p.20).

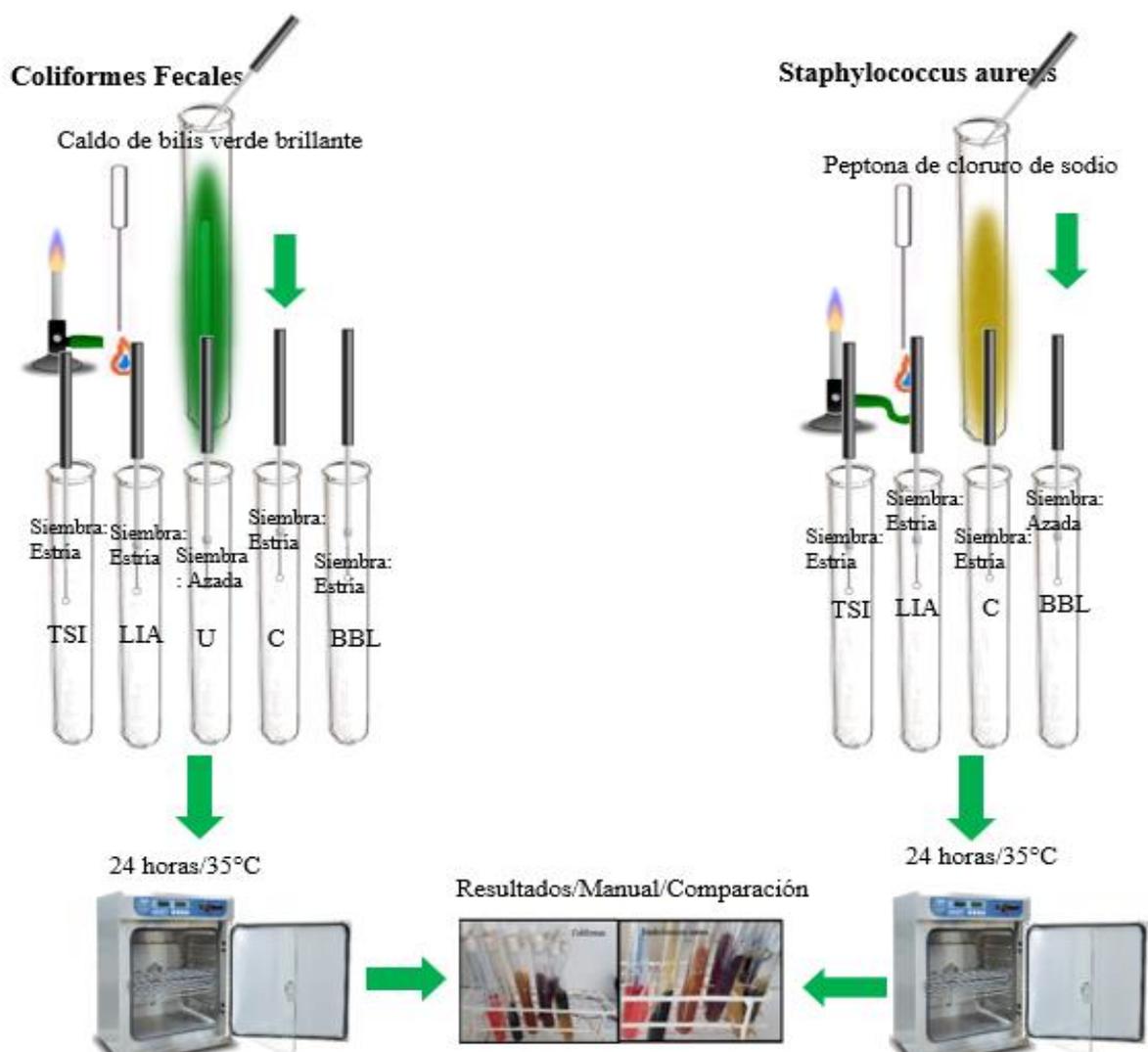


Figura 9. Esquema de las pruebas bioquímicas de Coliformes fecales y *Staphylococcus aureus*

### 3.10. Análisis estadístico de Diseño de bloques completamente al azar “DBCA”

En el siguiente trabajo se aplicó el diseño de bloques completamente al azar, en donde se presenta, 2 bloques como: *coliformes fecales*, *Staphylococcus aureus* y los tratamientos son: aceites esenciales de eucalipto y muña en diluciones 25, 50 y 75%, en un nivel de confianza de 95% y 0.05% de significancia.

Tabla 7.  
*Diseño de bloques completas al Azar*

<b>Cepas microbianas</b>	<b>Aceite esencial de muña (<i>Minthostachys mollis</i>)</b>			<b>Aceite esencial de Eucalipto (<i>Eucalyptus globulus labill</i>)</b>		
Coliformes fecales	25%	50%	75%	25%	50%	75%
Staphylococcus aureus	25%	50%	75%	25%	50%	75%

Nota: Propia

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### 4.1. Rendimiento en la extracción de aceite

La tabla 8 se muestra el rendimiento de los aceites de muña y eucalipto en donde se utilizó 5kg de muña y se obtuvo 50 ml de aceite, 5kg de eucalipto y se obtuvo 52 ml de aceite, por tanto las hojas de eucalipto presencio mayor rendimiento.

Tabla 8.

*Rendimiento de la extracción de aceite esencial de muña y eucalipto*

Planta Aromática	Rendimiento			Rendimiento (%)
	5000 g Volumen (ml)	100 g Volumen (ml)	1000 g Volumen (g)	
Muña	50 ± 0,02	1 ± 2,0	9.2366	0.9268
Eucalipto	52 ± 0,10	1.04 ± 0,25	9.3441	0.9717

Fuente: Propia

En la tabla 8 se muestra el rendimiento del aceite esencial de muña en donde presento: 50 ml de 5 kg de masa. Comparados con Cano, Bonilla, Roque, & Ruiz (2008), Ochoa, Paredes, Liz, & Justino (2012), en su trabajo el rendimiento presento: 20 ml en 2 kg, es más Ramírez, Trejo, Bustamante, & Vargas (2015) reporto un rendimiento de: 0.9083ml en 100g de masa.

Por otro lado en la tabla 8 se presenta el rendimiento de aceite esencial de hojas de eucalipto en donde presento 52 ml en 5 kg masa. Comparados con Moreno, López, & Siche (2010), Alarcón, Pájaro, & Méndez (2017) en su trabajo presento el rendimiento de: 1.02ml en 100g de masa, como también Arcos & Chuquillanqui (2013) reporto un rendimiento de 27.33 ml en 5 kg de masa de hojas de eucalipto.

Cabe resaltar que según Ochoa, Paredes, Liz, & Justino (2012) el rendimiento depende de las condiciones geobotánicas como: el clima, altitud, tipo de suelo, luminosidad, pluviosidad, temperatura, época de recolección y edad de las plantas, por ello la materia prima para este trabajo se recolectó a inicios de florecimiento por tanto se obtuvo mayor rendimiento.

## 4.2. Determinación de análisis fisicoquímico de aceite esencial

Se realizó la caracterización fisicoquímica de los aceites esenciales de Muña y Eucalipto como se aprecia en la tabla 9.

Tabla 9.

*Resultados de la caracterización Fisicoquímica del aceite esencial de muña y eucalipto*

Muestra	Índice de peróxido Meq/Kg	Índice de Iodo (IV)	Índice de Acidez	Índice de Refracción	Densidad relativa g/ml
Aceite de muña	0.75	6.87	1.78	1.486	0.898
Aceite de eucalipto	0.68	8.08	1.82	1.495	0.845
Referencias	(a): (m)0.69-0.78 (e) 0.65-0.70	(b): (m) 6.5-7.02 (e) 8-9	(c): (m)1.35-1.79 (e) 1.52-1.90	d): (m,e) 1.485- 1.55	(e): (m,e) 0.85- 0.98

a: Lipa (2014), b: Eriberto (2015), c: Huisa (2016), d: Málaga (2014) e: NTP 319087

Se aprecia el índice de peróxido en donde se encuentra en una media de 0.75 Meq/kg en muña y 0.68 Meq/kg en eucalipto, confirmando de manera genérica por Lipa (2014) quien afirma el promedio en muña de: 0.69 a 0.79 y eucalipto de:0.65 a 0.70 Meq/kg. Por tanto si los datos sobrepasan el promedio de Meq/kg (estado de oxidación) esto generaría problemas mínimas en el experimento desarrollado (Quispe, 2015).

Con respecto a la caracterización del índice de Iodo los valores presentan de; muña: 6.87, eucalipto: 0.6. Según Eriberto (2015) reporta que el índice de Iodo varía en muña de: 6.5 a 7.02; eucalipto: 8 a 9, dicha variación es debido a que son especies diferentes.

Respecto a la caracterización del índice de acidez como se aprecia en la tabla 9, el promedio en muña es: 1.78; eucalipto: 1.82; entonces comprobando con Huisa (2016) presenta el promedio del índice de acidez en los aceites en donde: aceite de muña: 1.35 a 1.79; eucalipto:1.52 a 1.90. Afirmando que los datos obtenidos están dentro del rango mencionado (Arcos & Chuquillanqui, 2013).

Los resultados de índice de refracción presentó en la tabla 9 un promedio de; muña: 0.898; eucalipto: 0.845, confirmado por Málaga (2014) que reporta el índice de refracción varía de: 1.485 a 1.55 en los aceites, comprobándose la variación, debido a su especie y la velocidad de propagación de cada masa (Granados, Santafe, & Acevedo, 2015).

Según la NTP: 319087 establecida para aceites esenciales la densidad varia de: 0.85 a 0.98, es preciso mencionar en la tabla 9 se aprecia la densidad en muña; 0.898; eucalipto: 0.845 kg/l, por ello esto debe a la diferencia de especie de cada masa que existe un determinado volumen (Stashenko, 2009).

### 4.3. Identificación bioquímica

En la Tabla 10 se presenta las pruebas bioquímicas, para *coliformes fecales* y *Staphylococcus aureus*; en donde cada cepa bacteriana dio positivo para los análisis realizados mostrando así que ambos pueden degradar el azúcar (TSI), (LIA).

Tabla 10.

*Pruebas Bioquímicas para Coliformes Fecales y Staphylococcus aureus*

Cepa	pruebas bioquímicas				
	<sup>a</sup> TSI	<sup>b</sup> LIA	Urea	<sup>c</sup> C	<sup>d</sup> SIM
Coliformes fecales	+	+	+	+	+
Staphylococcus AUREUS	+	+	+	+	+

Nota: <sup>a</sup> Agar Hierro Triple Azúcar; <sup>b</sup>agar hierro lisina; <sup>c</sup>agar citrato de Simmons; <sup>d</sup>sim médium

Las pruebas bioquímicas realizadas para *coliformes fecales* y *Staphylococcus aureus* en donde las pruebas se identificaron positivos. Estos resultados también coinciden con Rodríguez & Muñoz (2017) en donde el medio LIA, TSI, tienen del contenido de carbohidratos como: glucosa, lactosa y sacarosa, estos azúcares ayudan el incremento de microorganismos por ello los medios tienden a virar de color violeta (TSI) y amarillo (LIA) (Castilleja, Barrera, Medrano, Tapia, & Peniche, 2015).

Con respecto al medio urea se identificó positivo, las enzimas viene de ureasa esto libera amoníaco y dióxido de carbono entonces detectan la extensión de microorganismos hasta lograr que el medio vire a color amarillo Ildelfonso et al. (2017). Por otro lado el medio citrato de Simmons (C) tiene del cofactor enzimático y fosfato mono-amónico que es fuente de nitrógeno así mismo este medio tiende a virar a color azul (Alemán, Hernández, & Diaz, 2004).

Se describe el medio sim médium (SIM) para *coliformes fecales* y *Staphylococcus aureus*, que se identificó positivo, en donde Narayanan (2009) identifica que el medio tiene el contenido de la caseína rico en triptófano y la presencia de tres actividades de tiosulfato sódico, sulfato ferroso de amonio que existe la producción de ácidos y gases que son

indicadores de presencia de microorganismo , por tanto el medio tiende a virar de color negro oscuro.

#### 4.4. Determinación de la capacidad mínima inhibidora del aceite esencial extraído

##### 4.4.1. Coliformes Fecales

En la tabla 11 se aprecia la inhibición con aceites esenciales de muña y eucalipto frente a *Coliformes fecales*.

Tabla 11.

*Determinación de los halos de crecimiento en (mm) en Coliformes fecales*

A. esencial	Coliformes fecales					
	25%	50%	75%	Varianza	desviación Estándar	Coefficiente variabilidad
<b>Muña</b>	9.7950 mm	10.7467 mm	13.2700 mm	3.2248	1.796	0.1593
<b>Eucalipto</b>	12.0983 mm	13.2900 mm	14.5875 mm	1.5499	1.245	0.0934

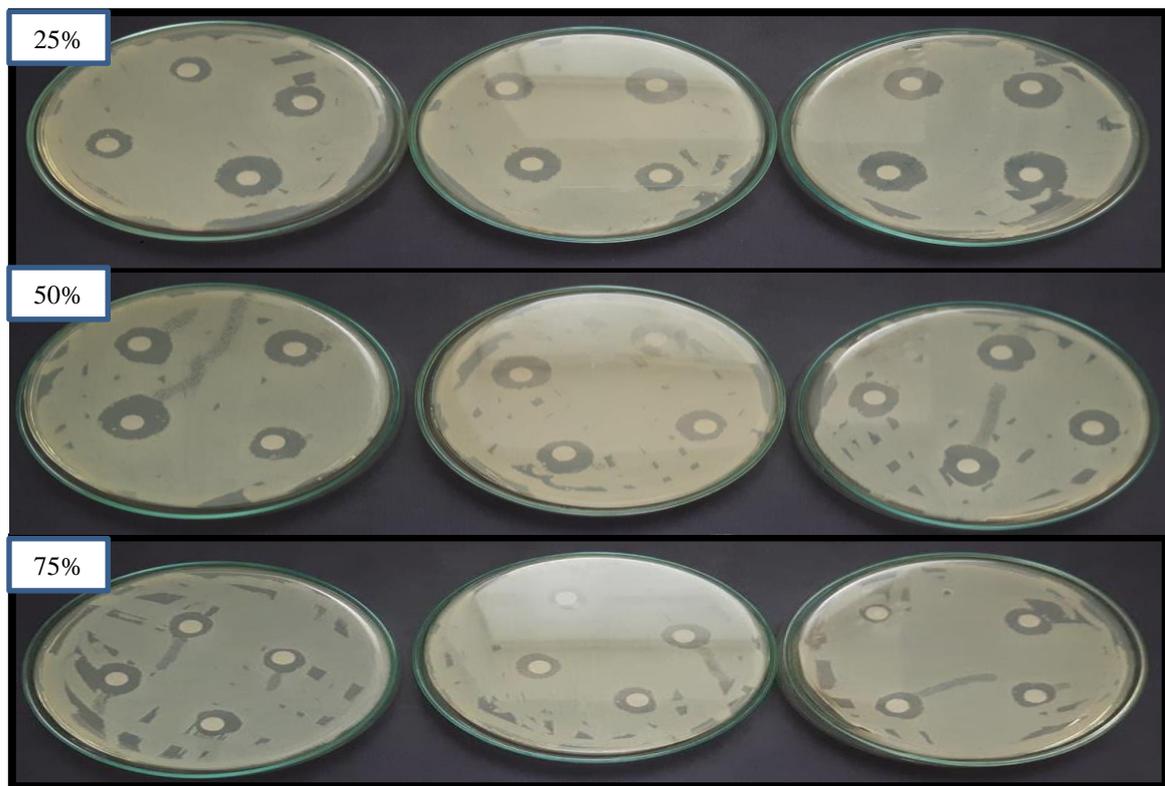


Figura 10. Halos de Inhibición en aceite de Eucalipto en diluciones 25, 50 y 75% frente a *Coliformes fecales*

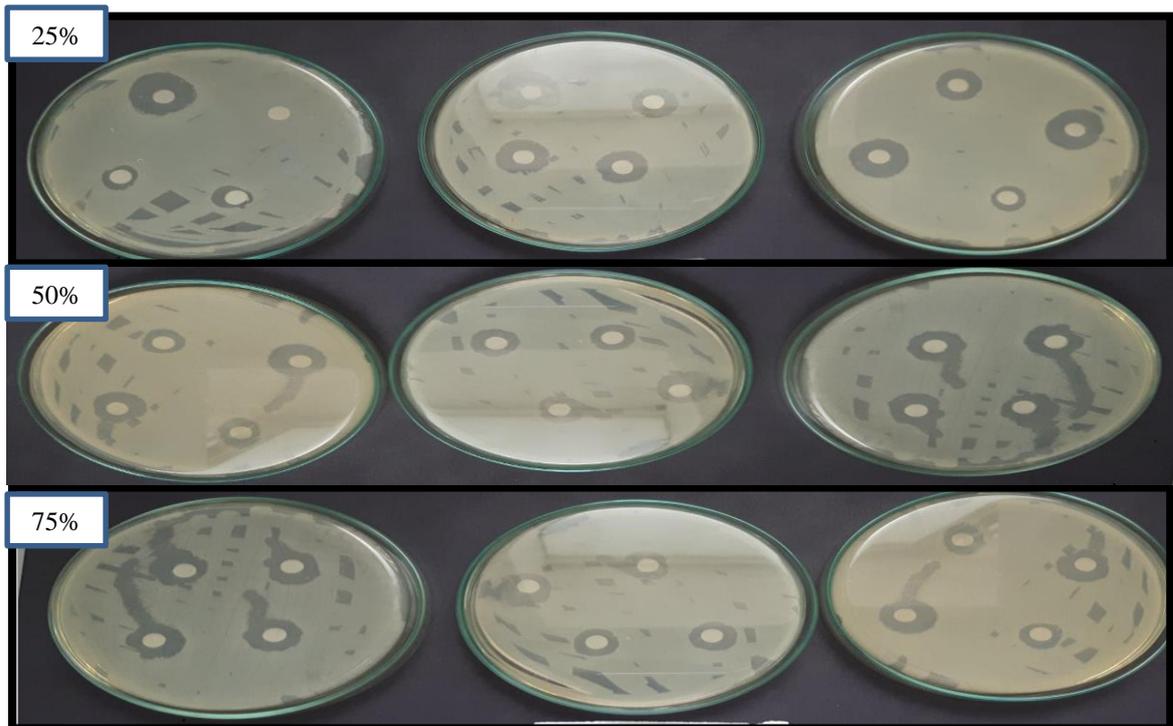


Figura 11. Halos de Inhibición en aceite de Muña en diluciones de 25, 50 y 75% frente a *Coliformes fecales*

En la tabla 11 y figura 10, 11: se presenta halos de crecimiento en *Coliformes fecales*, el crecimiento de los halos generados en diámetro que se reportó con aceite de muña en 25% 9.7950 milímetros; 50% 10.7467 milímetros; 75% 13.2700 milímetros; en aceite de eucalipto en 25% 12.0983mm; 50% 13.2900mm; 75% 14.5875mm. Además Rivera & Ortega (2017) reportó que estas bacterias Gram negativas tienen menos resistencia a la acción de los aceites, como resultados de las cadenas alifáticas como los anillos fenólicos de los componentes del aceite.

Además se ha reportado que los coliformes son menos sensible entre todas las bacterias evaluadas Castañeda (2013). La variabilidad de la actividad de estos aceites hacia diferentes cepas microbianas se atribuye a las diferencias cualitativas y cuantitativas en componente de los aceites. Por otro lado Ochoa, Paredes, Liz, & Justino (2012) recalca que algunos aceites esenciales son capaces de inhibir el crecimiento de varios grupos bacterianos. Gallegos (2015) afirma que esto se debe a los compuestos químicos encontrados en los aceites tales como fenoles isoméricos como el Carvacrol y el timol, el bajo pH de estas moléculas es más disociado e hidrofóbico de las proteínas (Cano, Bonilla, Roque, & Ruiz, 2008).

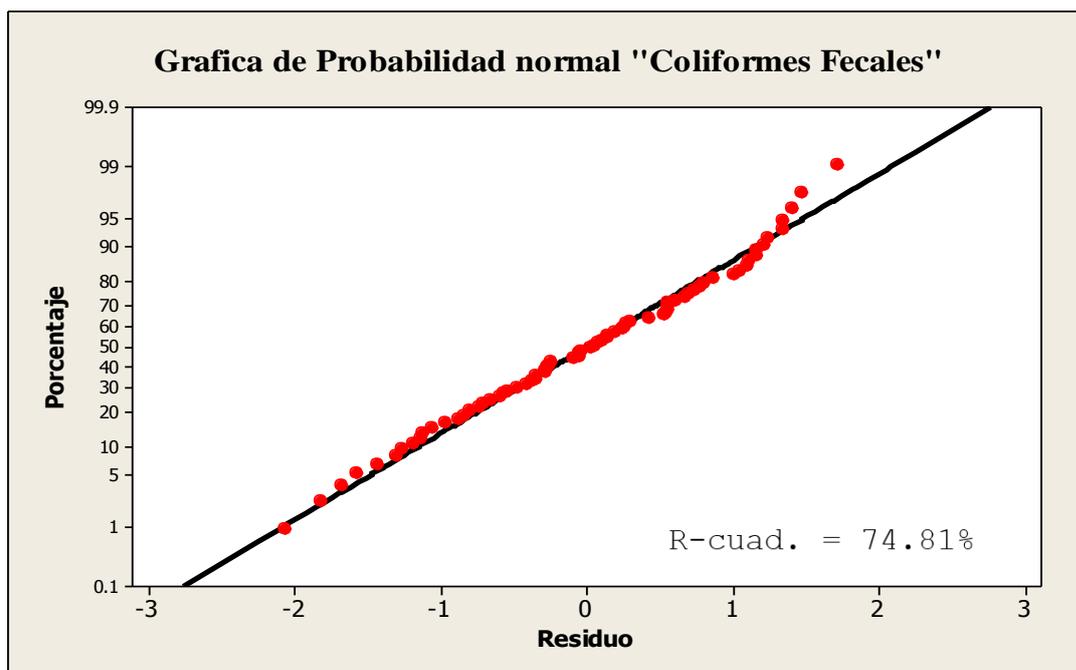


Figura 12. Grafica de Probabilidad normal en "Coliformes fecales"

En la figura 12 se aprecia la gráfica de la probabilidad normal para *Coliformes fecales*, en donde R-Cuadrado presento 74.81% por tanto los puntos presentaron muy cercanas a la línea central. Corroborando con Barreto (2015) que el R-cuadrado es una medida estadística que representa el porcentaje de los movimientos de seguridad, que estos movimientos explica el índice de referencia, por ello el R-cuadrado trabaja de 0 al 100%, en lo cual más cercanos al 0% los puntos están muy lejanos del punto central, entonces cercanos al 100% los puntos tienden estar más cercanos a la línea central. Casanova (2017) afirman que el R-cuadrado tienden a sobrepasar el 65% por ello las pruebas tienden a aceptarse.

#### 4.4.2. *Staphylococcus aureus*

En la tabla 12 se aprecia la mínima inhibidora de los aceites esenciales de muña y eucalipto frente a *Staphylococcus aureus*.

Tabla 12.

Determinación de halos de Crecimiento en (mm) en *Staphylococcus aureus*

A. esencial	Staphylococcus aureus					
	25%	50%	75%	Varianza	desviación Estándar	Coefficiente variabilidad
Muña	9.9600 mm	10.7408 mm	13.1533 mm	2.7712	1.665	0.1475
Eucalipto	11.7200 mm	13.5608 mm	14.3767 mm	1.8520	1.361	0.1029

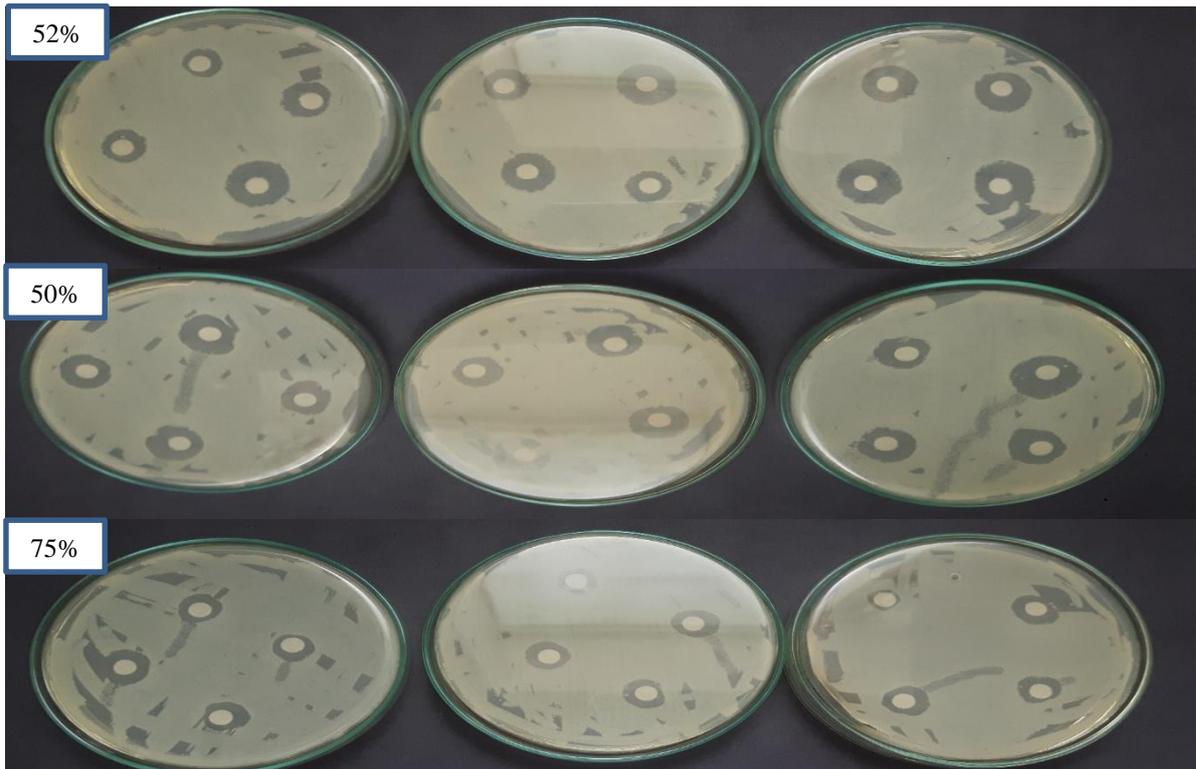


Figura 13. Halos de Inhibición en aceite de muña en diluciones de 25, 50 y 75% frente a *Staphylococcus aureus*

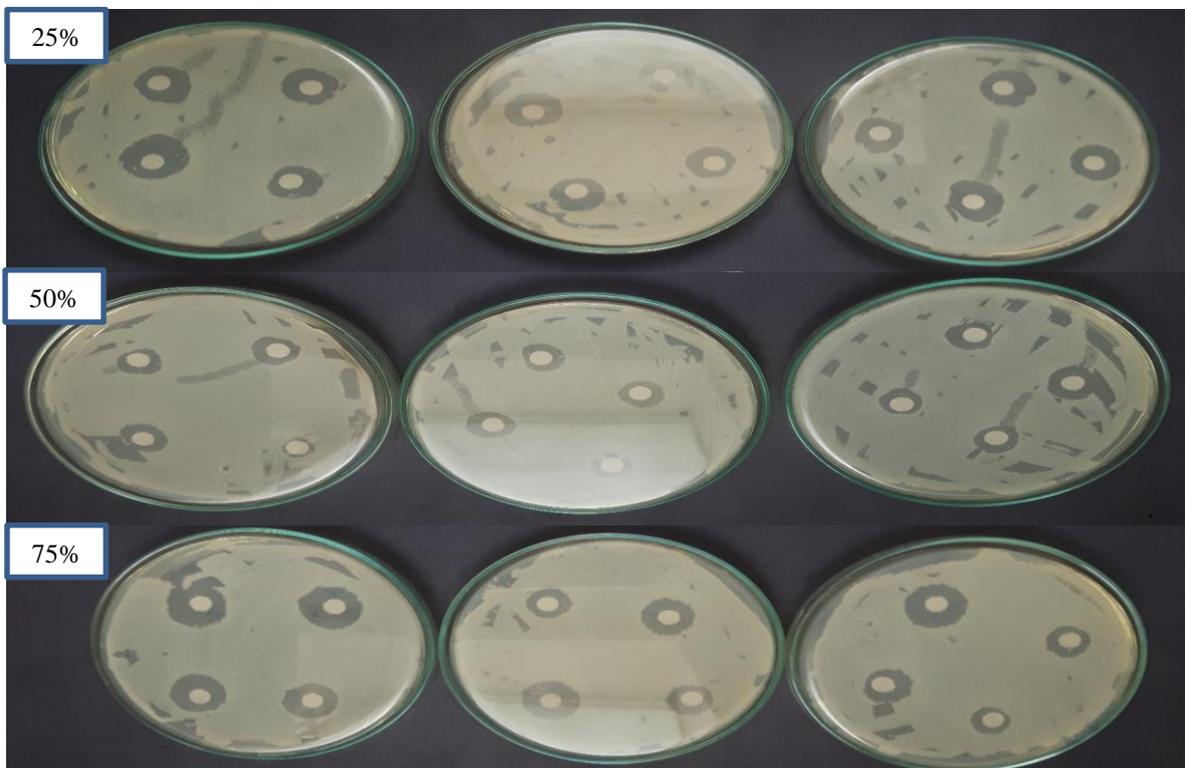


Figura 14. Halos de Inhibición con aceite de Eucalipto en diluciones de 25, 50 y 75% frente a *Staphylococcus aureus*

En la tabla 12 y figura 13,14 se presentan los halos de crecimiento frente a *Staphylococcus aureus* en el aceite de muña presentó al 25% 9.9600mm; 50% 10.7408mm; 75% 13.1533mm; en aceite de eucalipto 25% 11.7200mm; 50% 13.5608mm; 75% 14.3767mm, por tanto Quispe & Mamani (2016) reportan que los *Staphylococcus aureus* están presentes en la piel dañada y alimentos salados, también se reconoce que los aceites esenciales depende de sus propiedades lipofílicas o hidrofílicas también los terpenoides que sirven como ejemplo agente liposolubles, las cuales afectan la actividad de las enzimas catalizadora a nivel de membrana, ciertos componentes de los aceites actúan como desacopladores, las cuales interfieren en la translocación de protones sobre la membrana (Alarcón, Pájaro, & Méndez, 2017)

Según Vega et al. (2017), las alternativas al uso de compuestos químicos como los aceites esenciales esto representa una parte importante de la farmacopea tradicional, ya que se registró con mayor actividad antibacteriana, anti fúngica e insecticida coincidiendo con Castro, Pantoja, & Gomajoa (2017) que reporta los *Staphylococcus aureus* son de Gram positivos que tienen más resistencia que Gram negativo comparados con Vásquez, Gerardo Salhuana, Jiménez, & Abanto (2018) demostraron que existen diferencias significativas con respecto al tamaño de los halos de inhibición. Adicionalmente Quichca (2017) afirma el uso de los aceites en el sector alimenticio es menudo y limitado debido que la dosis antimicrobianos son eficaces que pueden exceder niveles aceptables, coincidiendo con Castañeda (2013) y Ochoa, Paredes, Liz, & Justino (2012) el uso de esos AE son para líneas farmacéuticas.

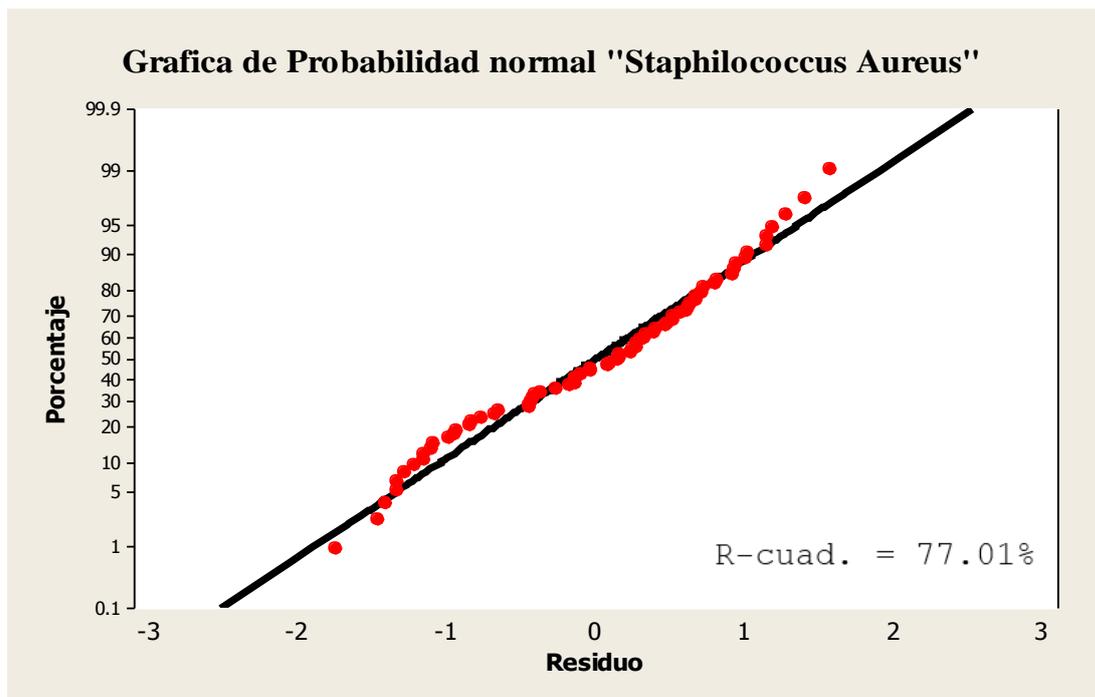


Figura 15. Gráfica de Probabilidad normal en "Staphilococcus aureus"

En la figura 15 se presenta la gráfica de probabilidad normal para *Staphylococcus aureus*, en donde el R- cuadrado presento 77.01% por tanto se afirma que los puntos presentaron cercanas a la línea central corroborando con Barreto (2015) el R-cuadrado es una medida estadística que muestra el porcentaje de los movimientos de seguridad, estos movimientos indica el índice de referencia al igual que Baltasar (2015) afirma que el R-cuadrado trabaja de 0 a 100%, que consiste los cercano al 0% los puntos presentan lejanos a la línea central, entonces el R- cuadrado es cercano al 100% los puntos tiende estar cercanos en la línea, concretando con Casanova (2017) afirma que los experimentos tienden sobrepasar a  $> 65\%$ , por ello estas prueban presenta la validez formando puntos en la línea.

#### 4.5. El efecto inhibitorio en diluciones 25, 50 y 75% de aceite esencial

##### 4.5.1. Análisis de varianza en *Coliformes fecales*

En la figura 16 y 17 se aprecia el análisis de varianza de los halos de crecimiento frente a *Coliformes fecales* y *Staphylococcus aureus*, en donde se trabajó a un nivel de significancia de 95% con un error de 0.05%, las diluciones de aceites 25, 50, 75% el valor  $P = 0.000$  es significativo; en tipos de aceite el valor  $P = 0.100$  presento no significativo y en *Staphylococcus aureus* en diluciones de aceites el valor  $P = 0.000$  es significativo, en los

tipos de aceites presento el valor  $P = 0.783$  no significativo, por otro lado se presenta la prueba de medias en se compara los tipos de aceites.

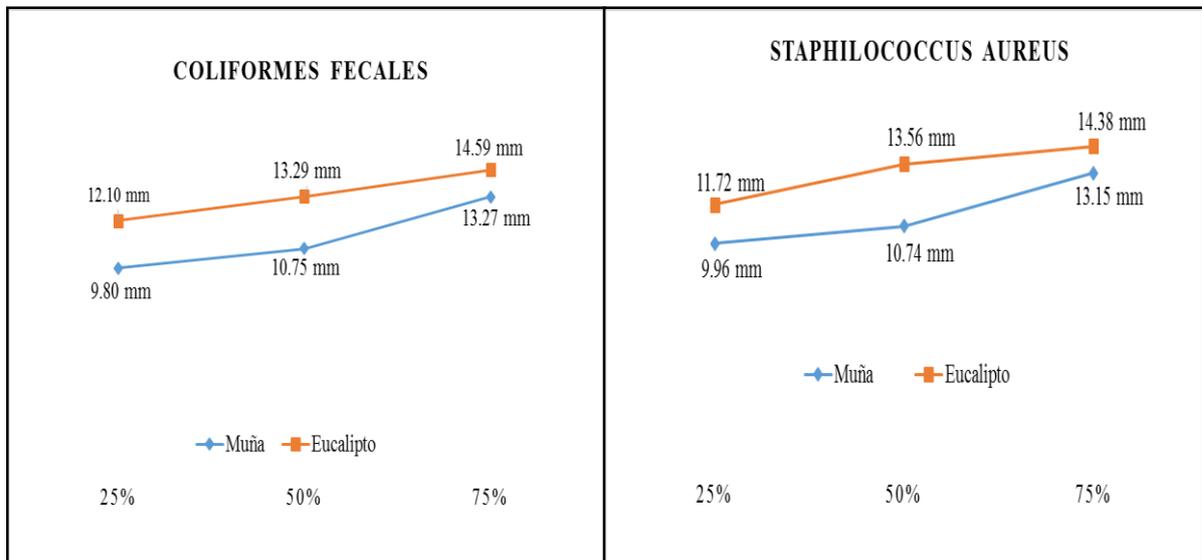


Figura 16. Halos de Inhibición en diluciones de 25, 50, 75% frente a coliformes Fecales y Staphylococcus aureus

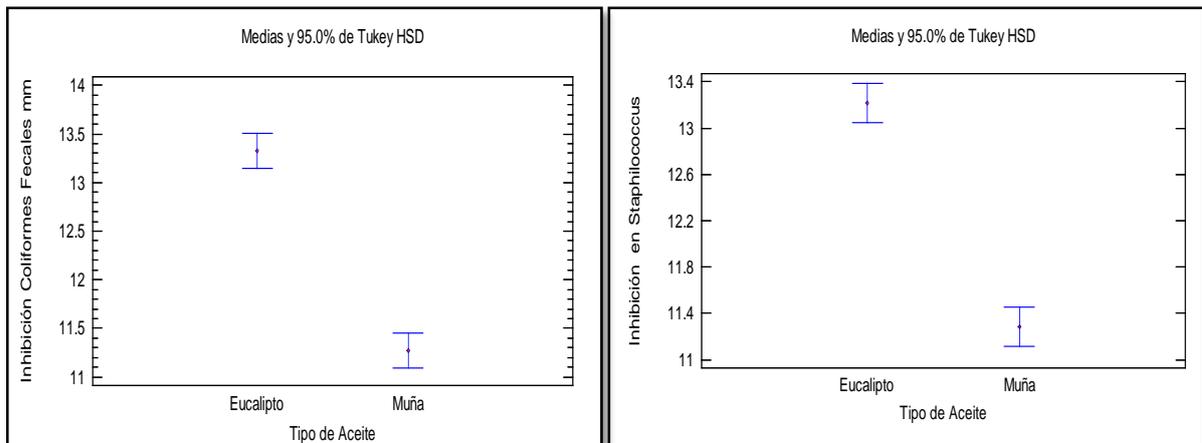


Figura 17. Prueba de medias en Tipos de Aceite (Eucalipto, muña).

En la figura 16 se presenta la inhibición microbiana en diluciones de 25, 50, 75% de aceite esencial frente a *coliformes fecales* y *Staphylococcus aureus*, en donde las pruebas medias afirman el aceite de eucalipto presento mayor inhibición como se aprecia en la figura 17 por tanto comparados con Solano, Escobar, & Reyes (2004) que ejecuto de aceite se muña en diluciones 25, 50, 75 y 100% presento mayor inhibición en 100%, por ello el resultado de la investigación confirma que los aceites esenciales posee el efecto inhibitor frente a bacterias de Gram positivas y negativas.

Por otro lado Alarcón et al. (2017) también evaluó la inhibición y afirmando que el eucalipto tiene el contenido de 95% de cineol, 25% monoterpeno, al igual que Pitarch (2000) quien reporta el contenido de sus principios activos como: 95% de eucaliptol, alfa-pineno, p-cimeno, limoneno, filandreno, aldehídos, butiraldehído, capronaldehído, azuleno, taninos, resina, flavona, eucaliptina, triterpeno y 4% de ácido ursólico, por otro lado Baca (2017) afirma que el eucalipto tiene el contenido de cineol, flavonoides, taninos y ácidos que presenta la acción expectorante antimicrobiana, analgésica, antibacteriana, febrífuga, diurética, cicatrizante, anti reumatismo, vermífuga, antiviral, depurativa, antiséptica. Entonces Ledesma (2005) señala que estos compuestos actúan hasta que las cepas estén en su estado latencia, en donde no provoca ningún tipo de daños. Además Hader, Gelmy, Zapata, & Jiménez (2010) afirma que el eucalipto se diferencia con otras especies de su gran cantidad de alcoholes, cetonas y aldehídos.

Igualmente Castaño, Ciro, Zapata, & Jiménez (2010) afirma que el contenido de principios activos de la muña son: azúcares reductores, compuestos fenólicos, sesquiterpenlactonas, flavonoides, taninos, 15% de mentona, 13.34% de isomentona, 2.94% de linalol, 2.03% de Cariofileno, 1.85% de acetato de Carvacrol, 1.65% espatulenol, 1.48% limoneno, 1.18% Isopulego y 12.99% de compuestos menores. Como Baca (2017) señala que gracias al contenido de sus principios activos inactiva la presencia de los microorganismos.

Las investigaciones similares demuestran que el aceite de eucalipto tiene mayor cantidad de sus componentes de principios activos en donde Alarcón, Pájaro, & Méndez (2017) y Ledesma (2005) corroboran que la mayor parte de estos aceites esenciales de eucalipto son usados en líneas farmacéuticas que ayuda a disminuir el asma, gripes, resfríos, que es muy factible para usos o enfermedades presenciados también afirma la Organización Mundial de la Salud al igual que Roosevelt (2017) quien resalta que los resultados obtenidos contribuyen a las necesidades de cualquier organización como agentes reguladores, fabricantes de alimentos y consumidores.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. Conclusiones

En la extracción de aceite se utilizó el equipo extractor arrastre de vapor en donde se utilizó muestra de 5 kg de muña y eucalipto en donde presento los siguientes rendimientos: muña 0.9268%, eucalipto 0.9717%.

Se realizó la caracterización fisicoquímica al aceite extraído en donde presento en; eucalipto: índice de peróxido Meq/Kg: 0.68, índice de iodo: 8.08, índice de acidez: 1.82, índice de refracción: 1.495 y densidad 0.845. Muña, índice de peróxido Meq/kg: 0.75, índice de iodo: 6.87, índice de acidez: 1.78, índice de refracción: 1.486 y densidad 0.898.

Se logró determinar las pruebas bioquímicas para la confirmación de *Coliformes fecales* y *Staphylococcus aureus* en donde las pruebas presentaron positivo cada prueba, también se logró establecer el efecto inhibitorio en los diluciones (25, 50, 75%) frente a *Coliformes fecales* en donde el valor  $P=0.000$  tuvo significativo, en el tipo de aceite el valor  $P=0.100$  no tuvo el valor significativo. Frente a *Staphylococcus aureus* en las diluciones 25, 50, 75% en valor  $P=0.000$  tuvo un valor significativo, en el tipo de aceite esencial el valor  $P=0.783$  no tuvo valor significativo.

En la determinación mínima inhibidora frente a *Coliformes fecales* en la diferentes diluciones presentó: 25%: 9.7950 mm; 50%: 10.7467mm; 75%: 13.2700mm, el aceite de eucalipto en dilución de 25%: 12.0983mm; 50%: 13.2900mm; 75%: 14.5875mm, frente a *Staphylococcus aureus* en de muña; 25% 9.9600mm; 50% 10.7408mm; 75% 13.1533mm; en aceite de eucalipto en: 25%: 11.7200mm; 50%, 13.5608mm; 75%: 14.3767mm y en la comparación de medias presento el aceite de eucalipto tuvo mayor inhibición.

#### 5.2. Recomendaciones

- Realizar comparaciones sobre los rendimientos de los aceites con diferentes plantas medicinales existentes en la zona sur de la región de Puno.
- Realizar experimentos con cepas microbianas como: Salmonella, listeria, campylobacter, E. coli, Vibrio y cronobacter, estas cepas se encuentran en la industria alimentaria.

- Realizar estudios aplicando los aceites esenciales en la industria panificadora u otros.
- Elaborar un envase tipo cajón de color oscuro para el cuidado del aceite esencial a 4°C.

## REFERENCIAS

- Alarcón, M., Pájaro, N., & Méndez, G. (2017). Actividad anti bacteriana in vitro de aceites esenciales de diferentes especies del genero Citrus. *Articulo* , 1–16. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/rccqf/v46n2/0034-7418-rccqf-46-02-00160.pdf>
- Alemán, Z., Hernández, B., & Díaz, J. (2004). *Control de medios de cultivo con empleo de cepas bacterianas autóctonas como patrones secundarios de referencia. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología* (Vol. 42). Editorial Ciencias Médicas. Retrieved from [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1561-30032004000100004](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032004000100004)
- Alzamora, L., Morales, L., Armas, L., & Fernandez. Gilma. (2001). Medicina Tradicional en Perú, Actividad anti microbiana in vitro de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. *Articulo* , 62, 1–5.
- Arcos, J., & Chuquillanqui, J. (2013). *Cantidad y Calidad de aceites esenciales en hojas de cuatro especies del genero Eucalyptus El Mantaro*. Universidad Nacional del Centro del Perú. Retrieved from [http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/UNCP/3397/Diaz\\_Arcos\\_-\\_Martinez\\_Chuquillanqui.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/UNCP/3397/Diaz_Arcos_-_Martinez_Chuquillanqui.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Baca, C. (2017). *Efecto inhibitorio del aceite esencial “muña” minthostachys mollis sobre el género proteus, causantes de infecciones del tracto urinario*. Universidad Nacional del Altiplano. Retrieved from [http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/4777/Baca\\_Melo\\_Cynhia\\_Madeine.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/4777/Baca_Melo_Cynhia_Madeine.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Baltasar, R. (2015). Metodología de superficie de respuesta en la obtención de biodiesel, optimización de la transesterificación del aceite de ricino para la obtención de biodiesel. *Articulo* , 1–110.
- Barreto, D. (2015). Introducción a MINITAB 15. Puerto Rico. Retrieved from <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:http://academic.uprm.edu/dgonzalez/adiestramientos/Manual%2520Minitab.pdf>
- Brousett-Minaya, M., Torres Jiménez, A., Chambi Rodríguez, A., Mamani Villalba, B., & Gutiérrez Samata, H. (2015). Calidad Fisicoquímica, microbiológica toxicológica de leche cruda en las cuencas ganaderas de la región Puno-Perú. *Scientia Agropecuaria*, 6(3), 165–176. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2015.03.03>
- Cano, C. (2014). Aceite esencial de Muña (*Minthostachys mollis*), y sus propiedades

- Nutricionales. *Artículo* , 11–15. Retrieved from [www.uigv.edu.pe/facultades/farmacia](http://www.uigv.edu.pe/facultades/farmacia)
- Cano, C., Bonilla, P., Roque, M., & Ruiz, J. (2008a). Actividad antimicótica in vitro y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *minthostachys mollis* (muña). *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 25(3), 298–301.
- Cano, C., Bonilla, P., Roque, M., & Ruiz, J. (2008b). *Actividad antimicótica in vitro y metabolitos del aceite esencial de las hojas de Minthostachys Mollis (muña)*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica* (Vol. 25). Instituto Nacional de Salud. Retrieved from [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-6342008000300008](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-6342008000300008)
- Casanova, H. (2017). Statistical Graphing and Data Visualization. *Artículo*, 21(3), 1–23.
- Castañeda, W. (2013). *Efecto Inhibitorio in Vitro del aceite esencial de las hojas de Minthostachys (Muña) sobre Enterococcus faecalis*. Universidad Nacional de Trujillo .
- Castaño, H. I., Ciro, G., Zapata, J. E., & Jiménez, S. L. (2010). Actividad bactericida del extracto etanolito y del aceite esencial de hojas de *rosmarinus officinalis* l. sobre algunas bacterias de interés alimentario. *Artículo* , 148–154.
- Castilleja, D., Barrera, E., Medrano, S., Tapia, J., & Peniche, R. (2015). *Aislamiento, selección e identificación de levaduras Saccharomyces spp. nativas de viñedos en Querétaro, México*. *Agrociencia* (Vol. 49). Colegio de Postgraduados. Retrieved from [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-31952015000700005](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952015000700005)
- Castro, D., Pantoja, A., & Gomajoa, A. (2017). in vitro evaluation of the antimicrobial capacity of the essential oil of dill -*anethum graveolens*- as a growth inhibitor of *staphylococcus aureus*, coliforms and fungi found in trout meat. *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria Y de Zootecnia*, 64(2), 44–51. <https://doi.org/10.15446/rfmvz.v64n2.67212>
- Cerpa, M. (2011). *Destilación de arrastre con vapor*. Retrieved from <http://organica1.org/1311/1311pdf10.pdf>
- Chavarrí, M., Rojas, V., Rumbos, N., & Narcise, R. (2014). Detección de microorganismos en maíz tierno molido comercializado en Maracay, estado Aragua, Venezuela. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología* 2014; 34:33-37, 1–5.
- Chilon, E. (2017). *Forestación con eucalipto y su relacion con la Agroindustria en las zonas alto andinas de la región libertad*. Universidad Nacional de Trujillo . Retrieved from

- [http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/10045/CHILÓN AMAMBAL EDGAR.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/10045/CHILÓN_AMAMBAL_EDGAR.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Cona, E. (2002). Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. *Revista Chilena de Infectología*, 19, 77–81. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182002019200001>
- Coy, C., & Acosta, G. (2013). Antibacterial activity and chemical composition of essential oils of rosemary (*Rosmarinus officinalis*), thyme (*Thymus vulgaris*) and turmeric (*Curcuma longa*) from Colombia. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(2), 237–246. Retrieved from [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962013000200007](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962013000200007)
- Delgado, K. (2012). *Análisis microbiológico para control cualitativo de carne ovina y caprina, seca y salada Orientada por*. Portugal.
- Egusquiza, A. (2008). *Estudio de Pre factibilidad para la produccion y comercializacion de papel a partir de eucalipto*. Pontificia Universidad Católica del Perú . Retrieved from [http://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/bitstream/handle/123456789/1029/FERNANDEZ\\_EGUSQUIZA\\_ALEXANDER\\_PRODUCION\\_PAPEL\\_EUCALIPTO.pdf?sequence=1](http://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/bitstream/handle/123456789/1029/FERNANDEZ_EGUSQUIZA_ALEXANDER_PRODUCION_PAPEL_EUCALIPTO.pdf?sequence=1)
- Elika, W. (2013). *Staphilococcus aureus*. Retrieved from [www.elika.net](http://www.elika.net)
- Eriberto, R. (2015). *Estudio de los aceites y determinaciones de la actividad antimicrobiana del fruto de Schinus molles L. "Molle."* Universidad Nacional Mayor san Marcos .
- Gallegos, V. (2015). *Actividad Antimicrobiana in vitro de colutorios elaborados con aceites esenciales de luma chequen (Feuillee ex molina) A. gray &quot;Arrayan y Minthostachys spicata (Benth). Epling &quot;yueaq muña &quot; frente ala cepa de streptococcus mutans ATCC 25175*. Peru .
- Garzón, B., Prieto, M., Betin, Y., & Cubillos, Lady. (2014). Coliformes, Recuento en placa y numero mas probable para Coliformes. Retrieved August 1, 2018, from [https://issuu.com/orfraies/docs/laboratorio\\_2\\_coliformes\\_1234](https://issuu.com/orfraies/docs/laboratorio_2_coliformes_1234)
- Granados, C., Santafe, G., & Acevedo, D. (2015). Composición química y Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial Folia de eucaliptus camaldulensis. *Articulo*, 235–240. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v18n1/v18n1a27.pdf>
- Guiñez, R., & Parra, A. (2016). Essential oil of eucalyptus globulus labill and eucalyptus nitens h. deane & amp; maiden (myrtaceae) for the control of sitophilus zeamais motschulsky. *Chilean J. Agric. Anim. Sci., Ex Agro-Ciencia*, 32(3), 204–216. Retrieved from <https://scielo.conicyt.cl/pdf/chjaasc/v32n3/aop0516.pdf>

- Hader, C., Gelmy, C., Zapata, J., & Jiménez, S. (2010). Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *rosmarinus officinalis* L. sobre algunas bacterias de interés alimentario. *Artículo*, 1–7. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/1698/169815396006.pdf>
- Heredia, M., & Montenegro, H. (2015). *Evaluación de la capacidad bioconservante in vitro e in vivo de los aceites esenciales de Satureja boliviana (Muña) y Oryganum x majoricum (Oregano), sobre Prunus persica (durazno) entero y Carica papaya (Papaya) tipo cuarta gamma*. Universidad Católica de Santa María, Perú.
- Herrera, F. (2015). Presence of methicillin-resistant staphylococcus aureus in artisan double cream cheese. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 18(1), 29–37. Retrieved from [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0123-42262015000100005](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262015000100005)
- Huisa, C. (2016). Caracterización de Aceites esenciales de Eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill). *Artículo*, 1–20. Retrieved from <http://tecnologiadeprocessos.blogspot.com/2010/03/caracterizacion-de-aceites-esenciales.html>
- Ildelfonso, V., Peinado, H., Borja, C., Cavero, A., Elera, L., Valdivia, J., & Rivera, A. (2017). *Validación del test rápido de la ureasa para la detección del Helicobacter pylori en el Hospital Nacional Cayetano Heredia, Lima, Perú. Revista de Gastroenterología del Perú* (Vol. 37). Sociedad de Gastroenterología del Perú. Retrieved from [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1022-51292017000100009](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1022-51292017000100009)
- Khouri, E., Libano, E., Prendes, J., Varela, J., & Obregos, M. (2010). Crecimiento en Volumen y estado Nutricional de *Eucalyptus globulus* Labill y *Pinus radiata*. *Artículo*, 1–8. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/remcf/v1n1/v1n1a6.pdf>
- Kimbaris, A., Siatas, N., Daferena, D., Tarantilis, P., Pappas, C., & Polissiou, M. (2006). Comparación de los métodos de destilación y extracción asistida por ultrasonido para el aislamiento de compuestos aromáticos sensibles del ajo. *Ultrasonics Sonochemistry*, 13(1), 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2004.12.003>
- Lafont, J., Páez, M., & Lans, E. (2011). Composición fisicoquímica de la semilla y del aceite de la semilla del Canime (*Copaifera officinalis* L.). *Información Tecnológica*, 22(3), 19–26. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642011000300004>
- Ledesma, K. (2005). *Determinación Antibacteriana in vitro* *quot*; de *Menthostachys*

- mollis* Griseb (muña) frente a bacterias orales de importancia estomatológica. Universidad Nacional Mayor de san Marcos. Retrieved from [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/2811/Diaz\\_ik.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/2811/Diaz_ik.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Lipa, F. (2014). *Estudio comparativo en el proceso de extracción de aceite esencial de eucalipto (eucalipto glóbulus labill) mediante el método de destilación por arrastre de vapor y el método de hidrodestilación asistido por radiación microondas*. Universidad Nacional de san Agustín de Arequipa . Retrieved from <http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/3986/IQlihufg025.pdf?sequence=1>
- Luna, P., Garcia, P., & Lopez, M. (2009). Aceites esenciales: Métodos de extracción. *Artículo* , 1–9. Retrieved from [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf)
- Málaga, V. (2014). Analysis of the diffusion of muña (clinopodium bolivianum) Essential oil into water steam. *Ciencia Y Desarrollo* , 47.55. Retrieved from <http://revistas.unjbg.edu.pe/index.php/CYD/article/viewFile/361/312>
- Mastrangelo, A. (2009). *Calidad, medio ambiente y trabajo seguro en forestación. Revista IDeAS*.
- Monteoliva, S. (2018). Variabilidad en la anatomía y densidad de la madera de Eucalyptus globulus: análisis preliminar del efecto de la procedencia, suelo y edad. *Artículo*, 1–8. Retrieved from [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/70935/Documento\\_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/70935/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Moreno, J., López, G., & Siche, R. (2010). Modeling and optimization of extraction process of eucalyptus essential oil (Eucalyptus globulus). *Artículo* , 147.
- Narayanan, K. (2009). Isolation and characterization of culturable bacteria from tropical coastal waters. *Ciencias Marinas*, 35(2), 153–167. Retrieved from [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-38802009000200003](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-38802009000200003)
- Ochoa, P., Paredes, R., Liz, D., & Justino, R. (2012). Extracción, caracterización y evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de Senecio graveolens Wedd (Wiskataya). *Artículo* , 291–302.
- Palacios, J., Pérez, A., & Acosta, D. (2013). *Diseño de un medio de cultivo a base de peptonas vegetales para el cultivo de Clostridium chauvoei*. *Revista Cubana de*

- Investigaciones Biomédicas* (Vol. 32). Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas, Ministerio de Salud Pública. Retrieved from [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-03002013000400007](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002013000400007)
- Pascacio, V., & Quinteros, A. (2016). Evaluación y caracterización de grasas y aceites residuales de cocina para la producción de biodiésel: un caso de estudio. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 32(3), 303–313. <https://doi.org/10.20937/RICA.2016.32.03.05>
- Paucar, L., Reyes, R., Sánchez, R., & Rojo, C. (2015). Estudio comparativo de las características físico-químicas del aceite de sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.), aceite de oliva (*Olea europaea*) y aceite crudo de pescado, 1–12. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2015.04.05>
- Pitarch, C. (2000). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales. *Artículo*.
- PNVIH, I. (2011). Hallan bacteria de SARM en carnes de supermercado - Noticias médicas. *Revista*, 1–3.
- Quichca, J. (2017). *Grado de eficacia del aceite esencial de minthostachys mollis (muña) y clorhexidina al 0,12% en la inhibición del crecimiento de porphyromonas gingivalis. estudio comparativo in vitro. lima 2016*". Universidad Privada Norbert Wiener. Retrieved from <http://repositorio.uwiener.edu.pe/bitstream/handle/123456789/1203/TITULO - Quichca Mendoza%2C Juan Carlos.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Quispe, D., & Mamani, J. (2016). *Efecto inhibitorio in vitro del aceite esencial de minthostachys mollis griseb (muña) sobre microorganismos prevalentes en patologías periapicales crónicas de origen endodóntico una – puno 2016*". Perú.
- Quispe, J. (2015). *Caracterización físico química del Aceite esencial de la Muña ( Minthostachys setosa) y su estudio anti bacteriano*. Universidad Nacional de Trujillo . Retrieved from [http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/3592/QuispeSanchez\\_J.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/3592/QuispeSanchez_J.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Ramírez, V., Trejo, A., Bustamante, selene, & Vargas, A. (2015). Extracción de aceite esencial de Eucalipto y su aplicación como agente antifúngico en un envase activo para conservación de Frambuesa. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 16(2), 228–233. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81343176012>
- Rivera, A., & Ortega, M. (2017). Microbiological conservation of carnic product with

- essential oils *Eugenia caryophyllata* and *Thymus vulgaris*. *Article*, 1–12.  
[https://doi.org/10.18684/bsaa\(v15\)Edici3nEspecialn2.576](https://doi.org/10.18684/bsaa(v15)Edici3nEspecialn2.576)
- Rodr3guez, L. (2016). *Calidad de la carne y contaminaci3n microbiol3gica por Staphylococcus aureus meticilina resistentes en canales de conejos (oryctolagus cuniculus ) procedentes de unidades de producci3n familiar del valle de toluca*. Universidad aut3noma del estado de M3xico.
- Rodr3guez, R., & Mu1oz, E. (2017). Frecuencia y Susceptibilidad Antimicrobiana de Bacterias Causantes de Mastitis en Bovinos de un Establo de Trujillo, Per3. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Per3*, 28(4), 994.  
<https://doi.org/10.15381/rivep.v28i4.13874>
- Roosevelt, A. (2017). *Evaluaci3n de la efectividad antimicrobiana de un colutorio a base de los aceites esenciales de eucalyptus globulus labill (eucalipto) y minthostachys sp. (mu1a), frente a klebsiella pneumoniae atcc 10031, staphylococcus aureus atcc 29737 y candida albicans atcc 10231*. Universidad Wiener. Retrieved from <http://repositorio.uwiener.edu.pe/bitstream/handle/123456789/1087/TITULO - Aylas Canicela%2C Roosevelt Edhair.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Salamanca, M., Benavides, J., Soto, B., Echeverri, R., Bernal, G., & Velasquez, L. (2010). *Evaluaci3n de riesgos de Staphylococcus aureus enterotoxig3nico en alimentos preparados no industriales en Colombia*. Colombia .
- Salcedo, L. (2009a). *Industrializaci3n de la Mu1a*. Universidad Particular de san Antonio Abad del Cusco . Retrieved from <https://es.scribd.com/doc/134993103/PROYEC-MUNA-GIO>
- Salcedo, L. (2009b). *Industrializaci3n de la Mu1a en la Provincia de Cusco*. Retrieved from <https://www.scribd.com/doc/134993103/PROYEC-MUNA-GIO>
- Sheagren, J. (2016). *Temas de Bacteriolog3a y virolog3a &quot;Etiopatogenia microbiol3gica&quot;*; Retrieved from <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Staphylococcus.pdf>
- Sierra, A., & Solis, M. (2017). Efectividad anti microbiana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (tipo) al 25, 50, 100 % frente a *Porphyromonas gingivalis*. *Articulo* .
- Solano, A., Escobar, A., & Reyes, M. (2004). Determinaci3n de la actividad antifungica de aceites esenciales extraidos de *lippia graveolens* (oregano), *rosmarinus officinalis*

- (romero) y eucalyptus globulus (eucalipto) en microsporium canis trichophyton rubrum y epidermophyton floccosum. *Articulo*, 15–96. Retrieved from <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/3147/1/16100703.pdf>
- Stashenko, E. (2009). Uso de los aceites esenciales. Retrieved September 5, 2018, from [www.loviuuu.com/wedesignyouenjoy](http://www.loviuuu.com/wedesignyouenjoy).
- Vásquez, V., Gerardo Salhuana, Jiménez, L., & Abanto, L. (2018). Evaluation of the bacteriological quality of fresh cheeses from cajamarca. *Ecología Aplicada*, 17(1). <https://doi.org/10.21704/rea.v17i1.1172>
- Vega, F., Montenegro, Z., Delgado, M., Alvarez, J., Benavides, A., & Ospina, J. (2017). Evaluación de la capacidad inhibidora de aceites esenciales en Staphylococcus aureus y Escherichia coli. *Articulo*. [https://doi.org/10.18684/bsaa\(v15\)EdiciónEspecialn2.578](https://doi.org/10.18684/bsaa(v15)EdiciónEspecialn2.578)
- Vira, B., Wildburger, C., & Mansourian, S. (2015). Problem Statement: Can Forest and Tree Based Systems Contribute to Food Security and Nutrition. *Articulo*, 9–28. Retrieved from <https://books.openedition.org/obp/2748?lang=es>

# **ANEXOS**

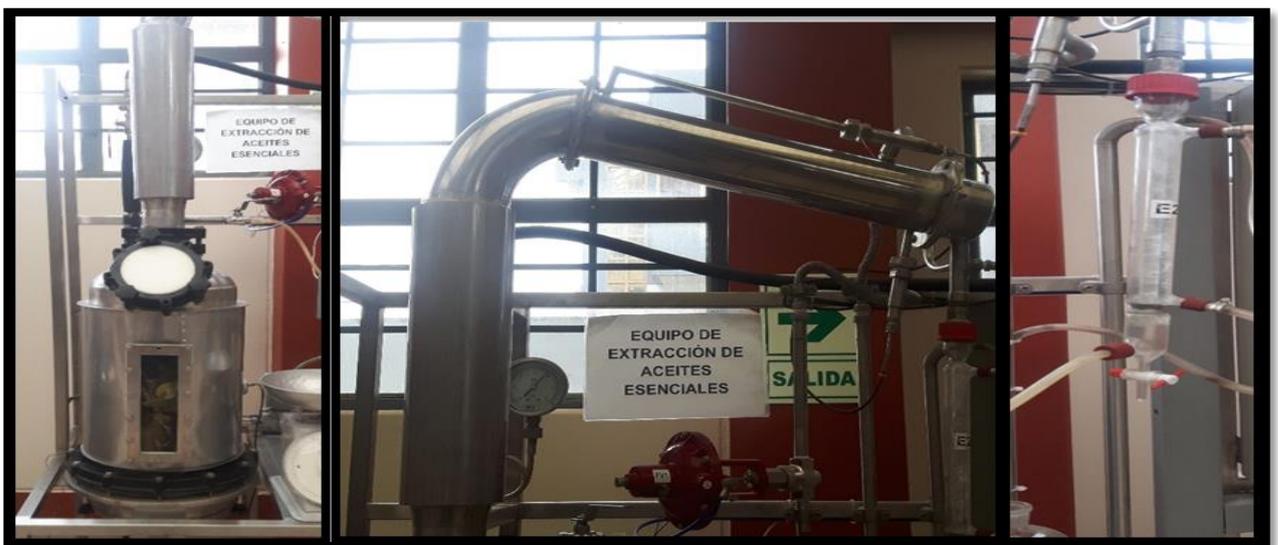
### Anexo A. Utilización de las hojas de eucalipto para la extracción del aceite esencial



### Anexo B. Utilización de las hojas y tallos triturados de muña para la extracción de aceite



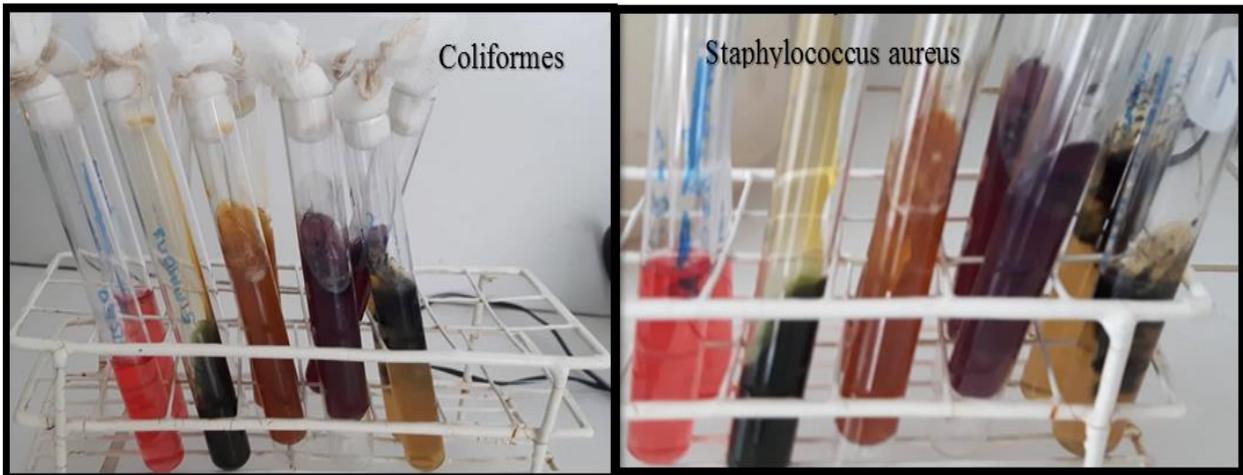
### Anexo C. Extractor (Inducontrol) de aceites esenciales



**Anexo D. Recepción de Aceite esencial en la Pera de decantación**



**Anexo E. Realización de las pruebas bioquímicas "*Coliformes fecales*" y *Staphylococcus aureus***



# Anexo F. Determinación del análisis Físicoquímica de los aceites de "Eucalipto" y "Muña"



**Universidad Nacional del Altiplano - Puno**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

Ciudad Universitaria, Av. Sesquicentenario N° 1150, Telf.: (051)599430 / IP. 10301 / (051) 366080



## LABORATORIO DE EVALUACIÓN NUTRICIONAL DE ALIMENTOS

### INFORME DE ANÁLISIS DE ALIMENTOS Nro. 0038-2018-LENA-EPIA

SOLICITANTE : JHON LAURA TICONA  
 LUGAR DE PROCEDENCIA : UNIVERSIDAD PERUANA UNION  
 FACULTAD : INGENIERÍA Y ARQUITECTURA  
 CARRERA PROFESIONAL : INGENIERIA DE ALIMENTOS  
 TITULO : Evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus globulus labill*); muña (*Minthostachys mollis*) frente a *Staphylococcus aureus* y Coliformes fecales.  
 PRODUCTO : ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO Y MUÑA  
 ENSAYO SOLICITADO : - INDICE DE PEROXIDO  
 - INDICE DE IODO  
 - INDICE DE ACIDEZ  
 - INDICE DE REFRACCION  
 - DENSIDAD  
 FECHA DE RECEPCION : 30 de Octubre del 2018  
 FECHA DE ENSAYO : 30 de Octubre del 2018  
 FECHA DE EMISION : 06 de Noviembre del 2018

#### RESULTADOS:

De acuerdo al Informe de los Análisis de Laboratorio que obra en los archivos los resultados son:

#### RESULTADOS FISICO QUIMICOS

MUESTRA	Meq/Kg INDICE DE PROXIDO	INDICE DE IODO	INDICE DE ACIDEZ	INDICE DE REFRACCION	g/ml DENSIDAD RELATIVA
EUCALIPTO	0,75	6,87	1,78	1,486	0,898
MUÑA	0,68	8,08	1,82	1,495	0,845

#### METODOS UTILIZADOS EN LABORATORIO:

- INDICE DE PEROXIDO : VOLUMETRICO  
 - INDICE DE IODO : WIJS  
 - INDICE DE ACIDEZ : CONVENCIONAL  
 - INDICE DE REFRACCION : PFUND  
 - DENSIDAD : PICNOMETRO (Norma: INV E- 22 e INV E 223)

• CONCLUSION: Los resultados Físico Químicos están conformes.

Puno, C.U. 06 de Noviembre del 2018

  
 Osvaldo Aguiar Alca  
 INGENIERO AGROINDUSTRIAL  
 C.I.P. 160625

  
 Dr. Luis Alberto Jiménez Monroy  
 C.I.P. 19512  
 JEFE DE LABORATORIO

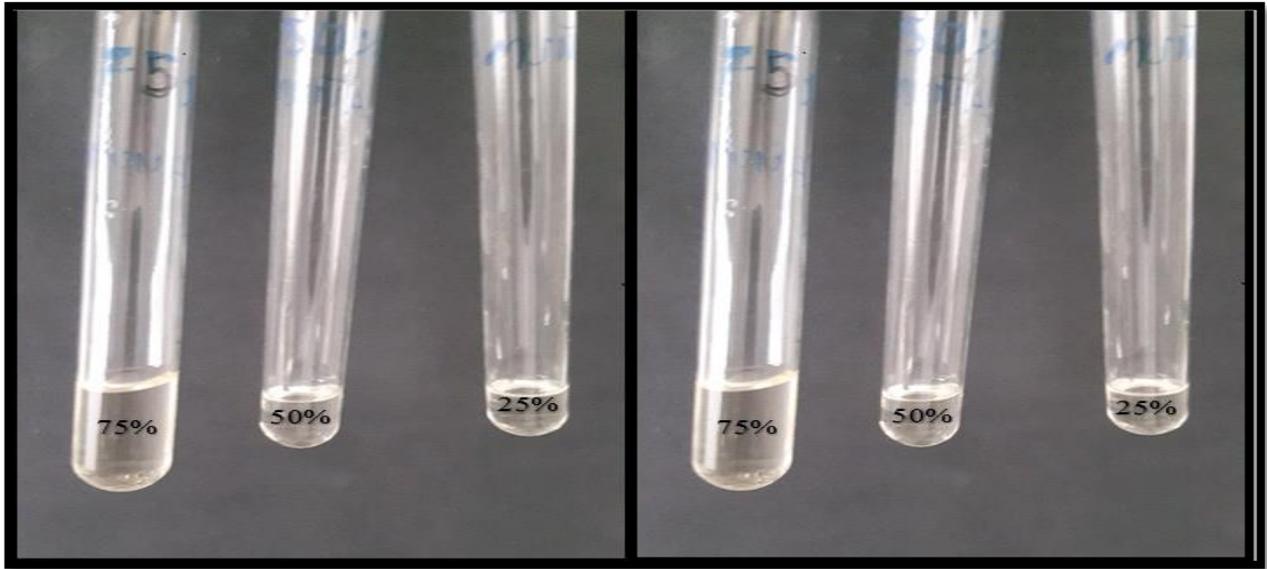
  
 LABORATORIO de Evaluación Nutricional  
 Alimentos Instrumentación  
 C.A. UNA-PUNO

  
 JEFATURA  
 Alimentos Instrumentación  
 C.A. UNA-PUNO

  
 UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO  
 FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
 Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial

E-mail: direccion.epiai@unap.edu.pe

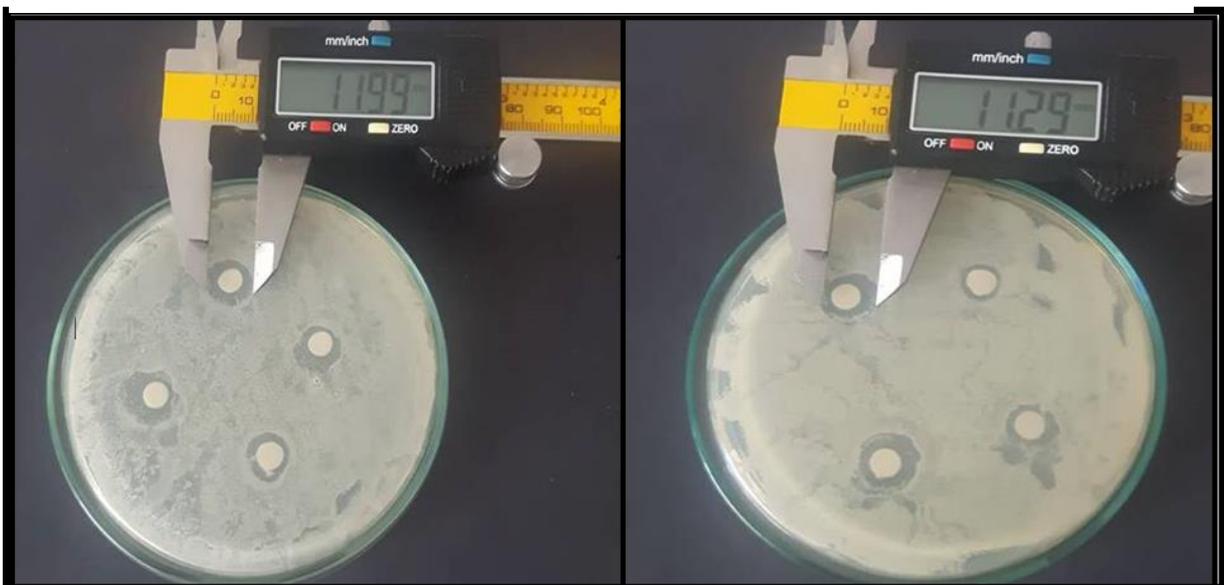
### Anexo G. Realización de las diluciones de aceites esenciales más Alcohol



### Anexo H. Sembrado en placas



### Anexo I. Medición con "Pie de rey" los halos de Crecimiento 1



**Anexo J. Medición con "Pie de rey" los halos de Crecimiento 2**



**Anexo K. Halos de Inhibición con Aceites Esenciales de "Muña", Frente a "Coliformes Fecales" al 25, 50 y 75%**

**HALOS DE INHIBICIÓN CON ACEITE ESENCIAL DE "MUÑA" FRENTE A "COLIFORMES FECALES" AL 25%**

Placa 1		Placa 2		Placa 3	
halos	mm	halos	mm	halos	Mm
1	10.83	1	9.52	1	9.03
2	11.1	2	9.29	2	8.91
3	11.5	3	9.5	3	8.82
4	11.2	4	9.82	4	8.02

**50%**

Placa 1		Placa 2		Placa 3	
halos	mm	halos	mm	Halos	Mm
1	10.17	1	10.48	1	11.01
2	10.5	2	10.4	2	10.87
3	10.1	3	11.5	3	10.99
4	11.06	4	10.65	4	11.23

75%					
Placa 1		Placa 2		Placa 3	
halos	mm	halos	mm	Halos	Mm
1	13.66	1	12.75	1	13.75
2	13.85	2	11.85	2	13.3
3	13.66	3	12.78	3	13.18
4	13.98	4	12.76	4	13.72

**Anexo L. Halos de Inhibición con Aceite esencial de "Eucalipto" Frente a "Coliformes Fecales" al 25, 50 y 75%**

HALOS DE INHIBICIÓN CON ACEITE ESENCIAL DE "EUCALIPTO" FRENTE A "COLIFORMES FECALES" AL 25%

Placa 1		Placa 2		Placa 3	
halos	Mm	halos	mm	halos	Mm
1	11.43	1	12.97	1	12.6
2	11.05	2	12.39	2	11.9
3	11.74	3	12.13	3	12.52
4	11.98	4	12.45	4	12.02

50%					
Placa 1		Placa 2		Placa 3	
halos	Mm	halos	mm	Halos	Mm
1	13.72	1	14.32	1	12.62
2	13.48	2	13.38	2	12.18
3	13.51	3	13.05	3	12.08
4	14.06	4	14.63	4	12.45

75%					
Placa 1		Placa 2		Placa 3	
halos	Mm	halos	mm	Halos	Mm
1	14.65	1	14.82	1	14.26
2	15.84	2	14.07	2	13.58
3	15.22	3	14.03	3	14.26
4	15.46	4	14.67	4	14.19

**Anexo M. Halos de Inhibición con Aceite esencial de "Muña" frente a "Staphylococcus Aureus" al 25, 50 y 75%**

<b>halos de inhibición con aceite esencial de "muña" frente a "Staphylococcus aureus" al 25%</b>					
Placa 1		Placa 2		Placa 3	
halos	mm	halos	mm	halos	Mm
1	9.87	1	10.41	1	9.37
2	9.17	2	10.93	2	9.64
3	9.91	3	10.96	3	9.17
4	9.87	4	10.84	4	9.38

<b>50%</b>					
Placa 1		Placa 2		Placa 3	
halos	mm	halos	mm	halos	Mm
1	10.23	1	11.78	1	10.53
2	10.62	2	11.08	2	10.27
3	10.84	3	11.31	3	10.61
4	10.23	4	11.05	4	10.34

<b>75%</b>					
Placa 1		Placa 2		Placa 3	
halos	mm	halos	mm	halos	Mm
1	12.56	1	13.08	1	13.59
2	12.37	2	13.43	2	13.98
3	12.79	3	13.55	3	13.68
4	12.04	4	13.22	4	13.55

**Anexo N. Halos de Inhibición con Aceite esencial de "Eucalipto" frente a "Staphylococcus aureus" al 25, 50 y 75%**

<b>Halos de inhibición con aceite esencial de "eucalipto" frente a "Staphylococcus aureus" al 25%</b>					
Placa 1		Placa 2		Placa 3	
halos	mm	Halos	mm	halos	Mm
1	12.74	1	11.63	1	11.18
2	12.86	2	11.05	2	11.61
3	12.29	3	11.47	3	11.13
4	12.32	4	11.12	4	11.24

50%					
Placa 1		Placa 2		Placa 3	
halos	mm	Halos	mm	Halos	Mm
1	12.47	1	13.51	1	14.51
2	12.19	2	13.67	2	14.21
3	12.85	3	13.17	3	14.95
4	12.83	4	13.52	4	14.85

75%					
Placa 1		Placa 2		Placa 3	
halos	mm	Halos	mm	Halos	Mm
1	14.93	1	14.32	1	13.34
2	14.29	2	14.61	2	14.51
3	14.47	3	14.72	3	14.79
4	14.33	4	14.07	4	14.14

**Anexo O. Análisis de varianza frente a "*Coliformes fecales*" Utilizando SC ajustada**

Fuente	GL	SC. Sec	SC Ajust	MC Ajust	F	P
Diluciones	2	166.814	166.814	83.407	99.59	0.000
Tipo de aceite	1	2.322	2.322	2.322	2.77	0.100
Error	68	56.951	56.951	0.838		
Total	71	226.087				

**Anexo P. Análisis de varianza frente a "*Staphylococcus aureus*", utilizando SC ajustada**

Fuente	GL	SC. Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Diluciones	2	158.336	158.336	79.168	113.86	0.000
Tipo de aceite	1	0.053	0.053	0.053	0.08	0.783
Error	68	47.283	47.283	0.695		
Total	71	205.672				

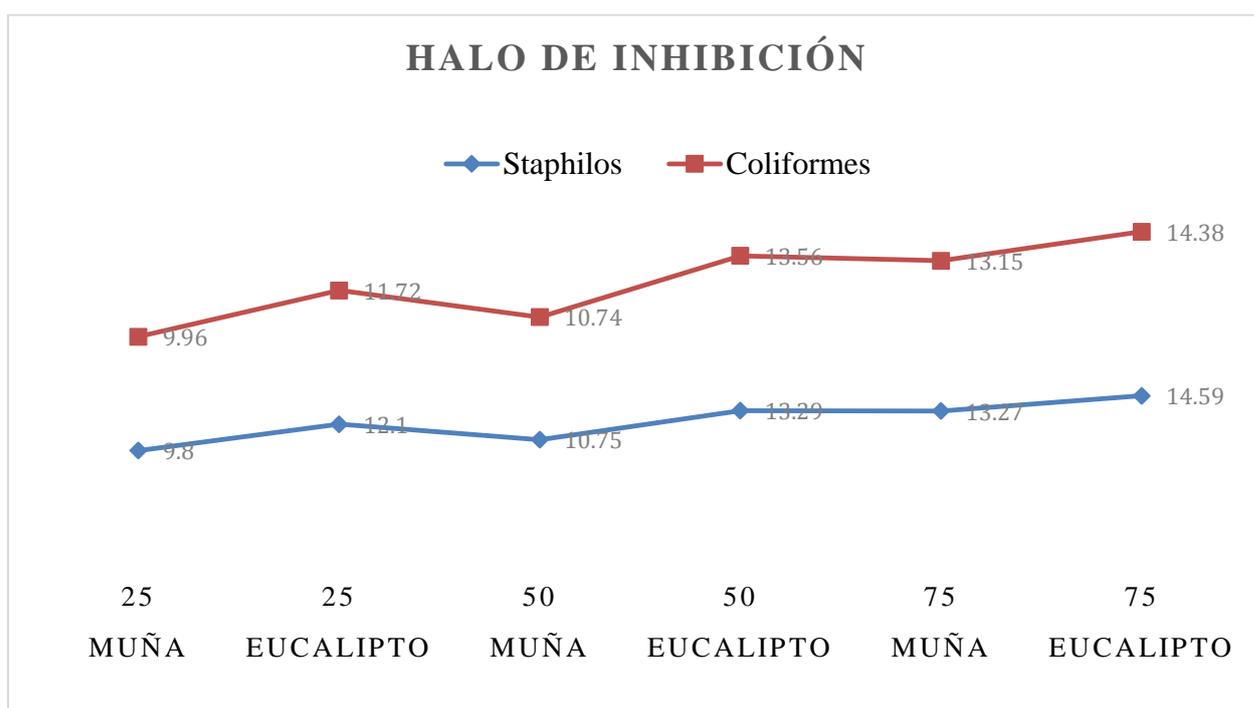
**Anexo Q. Tabla e medias por Mínimos Cuadrados para Inhibición "Coliformes fecales" en mm con Intervalo de Confianza del 95.0%**

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Error Est.</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
MEDIA GLOBAL	72	12.2979			
Porcentaje de Aceite					
25%	24	10.9467	0.157658	10.6321	11.2613
50%	24	12.0183	0.157658	11.7037	12.3329
75%	24	13.9288	0.157658	13.6141	14.2434
Tipo de Aceite					
Eucalipto	36	13.3253	0.128727	13.0684	13.5821
Muña	36	11.2706	0.128727	11.0137	11.5274

**Anexo R. Tabla de medias por Mínimos Cuadrados para Inhibición en *Staphylococcus aureus* con intervalos de confianza del 95.0%**

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Error Est.</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
MEDIA GLOBAL	72	12.2519			
Porcentaje de Aceite					
25%	24	10.84	0.147028	10.5466	11.1334
50%	24	12.1508	0.147028	11.8574	12.4442
75%	24	13.765	0.147028	13.4716	14.0584
Tipo de Aceite					
Eucalipto	36	13.2192	0.120048	12.9796	13.4587
Muña	36	11.2847	0.120048	11.0452	11.5243

**Anexo S. Comparación de Halos de Inhibición en (mm) con aceite de Muña y Eucalipto**



## Anexo T. Matriz de Comparación de aplicaciones de otros autores

Variables	definición	Dimensión	Indicador	Escala	Valor
	Capacidad del aceite esencial de eucalipto (Eucalyptus); muña (Mintostachys mollis)	Cuantitativa-mente	Diámetro de halo de inhibición (Medido en mm)	Cuantitativa razón	0 - 30 mm
			Concentración de aceite esencial se eucalipto (Eucalyptus); muña (Mintostachys mollis)	Cualitativa ordinal	Aceite Puro
	Dilución del aceite esencial de eucalipto (Eucalyptus); muña (Mintostachys mollis)		Concentración del 100% de aceite esencial de eucalipto (Eucalyptus); muña (Mintostachys mollis) , en solución de alcohol al 70° en proporción 4:1	Cualitativa ordinal	Aceite al 75%
			Concentración del 100% de eucalipto (Eucalyptus); muña (Mintostachys mollis) en solución de alcohol al 70° en proporción 1:1	Cualitativa ordinal	Aceite al 50%
			Concentración del 100% de eucalipto (Eucalyptus); muña (Mintostachys mollis) en solución de alcohol al 70° en proporción 1:4	Cualitativa ordinal	Aceite al 25%
Microorganismos prevalentes en patologías	Especies que desempeñan un papel preponderado en el desarrollo en la industria alimentaria	Cepas Bacterianas de Staphylococcus aureus y Coliformes fecales	Crecimiento bacteriano de la cepa	Cualitativa Normal	Si  No