

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



“Evaluación de la capacidad bioconservante *in vitro* e *in vivo* de los aceites esenciales de *Satureja boliviana* (Muña) y *Oryganum x majoricum* (Orégano), sobre *Prunus pérsica* (Durazno) entero y *Carica papaya* (Papaya) tipo cuarta gamma”

Tesis presentada por los Bachilleres:

Heredia Chávez, María del Carmen

Montenegro Aya, Henry Armando

Para optar el título profesional de

INGENIERO BIOTECNÓLOGO

Asesor: Ing. Javier Roque Rodríguez

AREQUIPA - PERÚ

2015

DEDICATORIAS

A Dios por permitirme hacer de esta experiencia un aprendizaje, por la vida y la familia.

A mis queridos padres, Clelia y Adolfo por su apoyo incondicional muestra del gran amor que siempre me prodigan.

A Milagros y Melanie, mis hermanas queridas que me inspiran a ser mejor por ellas.

A Iván, esa persona especial que llena mis días y me empuja a seguir adelante.

A mis queridos tíos Rosa, Nora, Raúl y José mis ejemplos de toda la vida

A mi Mamá Amelia, siempre pendiente y amorosa.

A la memoria de Germán, Encarnación y Máximo.

María del Carmen Heredia

A mis padres que me han dado la existencia; y en ella la capacidad por superarme y desear lo mejor en cada paso por este camino difícil de la vida. Gracias por ser como son, porque su presencia y persona han ayudado a construir y forjar la persona que ahora soy.

A mis maestros y amigos; que en el andar por la vida nos hemos ido encontrando; porque cada uno de ustedes ha motivado mis sueños y esperanzas en consolidar un mundo más humano y con justicia. Gracias a todos los que han recorrido conmigo este camino.

Henry Montenegro Aya

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar y siempre a Dios por ponernos en este camino, el de la ciencia.

A los maestros que formaron parte de nuestra vida universitaria, quienes con sus consejos y el compartir de sus experiencias propias permitieron nuestro desarrollo cognoscitivo y personal.

A nuestros amigos y amigas que siempre estuvieron dándonos su apoyo y palabras de aliento

Al personal de laboratorio que nos permitió el desarrollo del presente trabajo.



INDICE DE CONTENIDO

CAPITULO I:INTRODUCCION	6
1. OBJETIVOS	9
1.1 GENERALES.....	9
1.2 ESPECIFICOS	9
2. HIPOTESIS.....	9
3. VARIABLES, INDICADORES Y FACTORES	10
CAPITULO II: MARCO TEORICO	12
2.1 Deterioro Vegetal	12
2.2 Indicadores de calidad de las frutas.....	16
2.3 <i>Carica papaya</i> (<i>papaya</i>).....	18
2.4 durazno (<i>Prunus pérsica</i>),.....	19
2.5 Bioconservación y Bioconservantes.....	21
2.6 Aceites esenciales.....	23
2.7 Satureja boliviana (muña)	28
2.8. <i>Oryganum spp</i> (orégano).....	30
2.9. Microencapsulación	32
2.10 Emulsiones	35
2.11 Cromatografía de gases	38
2.12 Liofilización	42
2.13 Microscopía electrónica de barrido.....	43
2.14 Perspectivas Futuras.....	45
CAPITULO III : MATERIALES Y METODOS.....	46
3.1 Lugar de Ejecución.....	46
3.2 Materiales.....	46
3.3 Métodos.....	50
3.3.1. Extracción y caracterización de los Aceites Esenciales De Satureja boliviana (muña) Y <i>Oryganum x majoricum</i> (orégano)	50
3.3.2. Formulación de emulsiones y elaboración de microcápsulas a partir de los aceites esenciales puros extraídos y de 3 mezclas de concentraciones variadas.....	54
3.3.3. Aislamiento de los microorganismos asociados al deterioro vegetal de <i>Prunus pérsica</i> (durazno) y <i>Carica papaya</i> (papaya).	58

3.3.4. Evaluación de la capacidad antimicrobiana de las emulsiones y microcápsulas elaboradas en cultivos “ <i>in vitro</i> ” frente a la flora microbiana representativa de <i>Carica papaya</i> y <i>Prunus pérsica</i>	59
A. Determinación de la tasa de crecimiento del consorcio microbiano en presencia de aceites esenciales y sus mezclas	59
B. Evaluación de actividad antimicrobiana in vitro por el método de Difusión en Agar.	61
3.3.5. Evaluación de la capacidad bioconservante “ <i>in vivo</i> ” de las mezclas sobre durazno fresco entero como emulsión.....	61
3.3.6. Evaluación de la capacidad bioconservante “ <i>in vivo</i> ” de las mezclas sobre papaya como microcápsulas	64
3.3.7. Análisis estadístico de los datos.....	66
3.4 Diagrama de Flujo.....	67
CAPÍTULO IV : RESULTADOS Y DISCUSION	68
4.1. Extracción y caracterización de los Aceites Esenciales De <i>Satureja boliviana</i> (muña) Y <i>Oryganum x majoricum</i> (orégano).....	68
4.2. Formulación de emulsiones y microcápsulas a partir de los aceites esenciales puros extraídos y de 3 mezclas de concentraciones variadas.....	78
4.3. Aislamiento microorganismos asociados al deterioro vegetal de <i>Prunus pérsica</i> y <i>Carica papaya</i>	88
4.4. Evaluación de la capacidad antimicrobiana de los aceites puros, en mezcla y de las emulsiones y microcápsulas formuladas en cultivos “ <i>in vitro</i> ” frente a la flora microbiana representativa de <i>Carica papaya</i> y <i>Prunus pérsica</i>	93
4.5. Evaluación de la capacidad bioconservante “ <i>in vivo</i> ” de las mezclas sobre durazno fresco entero como emulsión.....	104
4.6. Evaluación de la capacidad bioconservante “ <i>in vivo</i> ” de las mezclas sobre papaya de 4ta gamma como microcápsulas	116
CAPITULO V: CONCLUSIONES.....	133
CAPITULO VI: SUGERENCIAS	135
BIBLIOGRAFÍA	136
ANEXOS.....	148

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Variables independientes y dependientes consideradas para la evaluación de resultados	10
Tabla 1.2. Factores considerados para la evaluación de resultados.....	11
Tabla 2.1. Algunas características de los Mohos más importantes en la pudrición de las frutas ...	13
Tabla 2.2. Temperaturas para crecimiento (°C) de bacterias que causan pudrición blanda en vegetales y frutas.	15
Tabla 2.3. Composición de los aceites esenciales de acuerdo a su grupo funcional base	23
Tabla 2.4. Comparación de los métodos de extracción de aceites esenciales.	26
Tabla 2.5. Clasificación taxonómica de <i>Satureja boliviana</i>	28
Tabla 2.6. Porcentajes de los componentes del aceite esencial de la familia Lamiaceae.....	29
Tabla 2.7. Clasificación Sistemática De <i>Oryganum Vulgare</i> (orégano)	30
Tabla 2.8. Especies de orégano	31
Tabla 2.9. Propiedades fisicoquímicas del aceite esencial de orégano	32
Tabla 2.10. Actividad biológica del orégano.....	32
Tabla 3.1. Formulación de las mezclas básicas.....	54
Tabla 3.2. Diseño Experimental Para La Aplicación De Las Emulsiones	62
Tabla 3.3. Diseño experimental para evaluación de papaya troceada	65
Tabla 4.1. Rendimientos en la extracción de aceite esencial.....	70
Tabla 4.2. Características físicas de los aceites esenciales.....	70
Tabla 4.3. Composición del aceite esencial de orégano <i>O. majoricum</i>	71
Tabla 4.4. Estructuras químicas de los componentes del aceite esencial de <i>Oryganum x majoricum</i> (orégano)	73
Tabla 4.5. Composición porcentual del aceite de <i>Satureja boliviana</i>	75
Tabla 4.6. Estructuras químicas de los componentes del aceite esencial de <i>Satureja boliviana</i> (muña).....	77
Tabla 4.7. Combinaciones de polímeros ensayadas para la técnica de microencapsulación	80
Tabla 4.8. Rendimientos de aceite esencial extraído.....	81
Tabla 4.9. Rendimientos alcanzados por microencapsulación de los aceites puros y las mezclas realizadas	81
Tabla 4.10. Caracterización bioquímica de bacterias Gram (-) aisladas	89

Tabla 4.11. Caracterización bioquímica de bacterias Gram (+) aisladas	90
Tabla 4.12. Características de los hongos aislados.....	90
Tabla 4.13. Bacterias y Mohos aislados de durazno y papaya.	91
Tabla 4.14. Características macro y microscópicas de las levaduras	93
Tabla 4.15. Crecimiento de Microorganismos procedentes de Prunus pérsica (durazno)	95
Tabla 4.16. Logaritmo Natural de las concentraciones	95
Tabla 4.17. Tasa de crecimiento del consorcio microbiano de Prunus pérsica (durazno)	95
Tabla 4.18. Crecimiento de Microorganismos procedentes de <i>Carica papaya</i> (papaya).....	96
Tabla 4.19. Tasa de crecimiento del consorcio microbiano de <i>Carica papaya</i> (papaya).....	97
Tabla 4.20. Diámetros de inhibición mostrados por las emulsiones frente a las bacterias aislados	99
Tabla 4.21. Diámetros de inhibición mostrados por las emulsiones frente a Hongos y levadura aislados	100
Tabla 4.22. Diámetros de inhibición de Microcápsulas frente a Bacterias	102
Tabla 4.23. Diámetros de inhibición mostrados por las Microcápsulas frente a Hongos y Levadura aislados	103
Tabla 4.24. Evaluaciones Fisicoquímicas en durazno	106
Tabla 4.25. Análisis factorial de las propiedades fisicoquímicas de <i>Prunus pérsica</i>	106
Tabla 4.26. Comparaciones múltiples por Tukey entre promedios de cada tipo de Mezcla	107
Tabla 4.27. Comparaciones en parejas de Tukey para índice de Madurez en durazno	109
Tabla 4.28. Concentración de Mohos y bacterias por gramo de durazno	110
Tabla 4.29. Análisis factoriales sobre la concentración de bacterias y Mohos en <i>Prunus pérsica</i> (durazno).....	111
Tabla 4.30. Test de comparación Tukey, Ufc/g respecto a las mezclas	111
Tabla 4.31. Agrupación Tukey por tipo de Mezcla, para ufc/g de Bacterias	112
Tabla 4.32. Comparaciones en parejas de Tukey, por frecuencia de aplicación al día para UFC/g de Bacterias.....	113
Tabla 4.33. Evaluaciones Fisicoquímicas en papaya de IV gamma.....	118
Tabla 4.34. Análisis factoriales de las evaluaciones fisicoquímicas en <i>Carica papaya</i> (papaya)	119
Tabla 4.35. Agrupación por Tukey del pH respecto.....	120
Tabla 4.36. Agrupación de Tukey para % pérdida de peso según temperatura y % Concentración de microcápsulas.....	123

Tabla 4.37. Concentraciones de Mohos y Bacterias en papaya de IV gamma.....	126
Tabla 4.38. Análisis factoriales de las Concentraciones de Mohos y Bacterias.....	126
Tabla 4. 39.Comparaciones en parejas de Tukey para la Concentración de Mohos en UFM/g, para papaya de IV gamma, según mezcla usada	127
Tabla 4.40. Comparación por Tukey de concentración bacterias ufc/g según Mezcla y temperatura	129



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Bacterias que afectan principalmente a los alimentos	14
Figura 2.2. Estructura de las microcápsulas	33
Figura 2.3. Mecanismos que contribuyen a las emulsiones.	36
Figura 2.4 Tipos de Emulsión	37
Figura 2.5. Emulsión Múltiple de tipo W1/O/W2	37
Figura 2.6 Diagrama de un cromatógrafo de gases.	40
Figura 2.7. Componentes Básicos del SEM	44
Figura 4.1 Equipo usado para la extracción de aceites esenciales	69
Figura 4.2 Cromatograma del aceite esencial de <i>Oryganum x majoricum</i> (orégano)	71
Figura 4.3 Cromatograma del aceite esencial de <i>Satureja boliviana</i> (Muña)	76
Figura 4.4 Aceites esenciales puros y mezclas preparadas a diferentes concentraciones.....	78
Figura 4.5 Emulsiones en base a mezclas de aceites puros.	79
Figura 4.6 Pruebas de microencapsulación.....	80
Figura 4.7 Microencapsulación de aceite de Muña	82
Figura 4.8 Microscopía óptica, durante la formación de microcápsulas	84
Figura 4.9 Apariencia de las microcápsulas después de la microencapsulación.....	85
Figura 4.10 Estructura de microcápsulas liofilizadas	86
Figura 4.11 Estructura de microcápsulas liofilizadas	87
Figura 4.12 Aislamiento de bacterias en medios selectivos.....	88
Figura 4.13 Prueba de LIA para caracterización bioquímica de bacterias Gram (-).....	88
Figura 4.14 Pruebas bioquímicas para bacterias Gram (+).....	89
Figura 4.15 Características microscópicas de hongos aislados	91
Figura 4.16 Cultivo de hongos y levaduras en medio Sabouroad	92
Figura 4.17 Aplicación de aceites esenciales sobre flora microbiana de <i>Prunus pérsica</i>	93
Figura 4.18 Curvas de crecimiento del consorcio microbiano aislado de Durazno bajo el efecto de las mezclas formuladas	94
Figura 4.19 Curvas de crecimiento del consorcio microbiano de papaya bajo el efecto de las mezclas formuladas.....	96

Figura 4.20 Comparación de tasa de crecimiento del consorcio microbiano.....	97
Figura 4.21. Evaluación de actividad <i>in vitro</i> por el método de difusión en agar	98
Figura 4.22. Diagrama de dispersión de halos de inhibición por emulsiones sobre bacterias aisladas.....	99
Figura 4.23 Diagrama de dispersión de halos de inhibición por emulsiones en hongos y levadura aisladas	101
Figura 4.24 Diagrama de dispersión de halos de inhibición por microcápsulas sobre bacterias aisladas.....	102
Figura 4.25 Diagrama de dispersión de halos de inhibición por microcápsulas sobre hongos y levadura aisladas	103
Figura 4.26 Aplicación de emulsiones en durazno.....	105
Figura 4.27. Gráfico de caja de pH por tipo de mezcla	108
Figura 4.28. Gráfico de caja para el % pérdida de peso	109
Figura 4.29 Gráfica de cajas para el índice de madurez en <i>Prunus pérsica</i> (durazno)	110
Figura 4.30. Gráfica de caja para concentración de Mohos/g por tipo de mezcla.....	112
Figura 4.31 Concentración alcanzada en ufc/g de bacterias, en presencia de las mezclas aplicadas en <i>Prunus pérsica</i>	113
Figura 4.32. Gráfica de efectos principales en el crecimiento de bacterias sobre <i>Prunus pérsica</i> (durazno)	114
Figura 4.33. Gráfica de puntos para evaluación de textura en <i>Prunus pérsica</i> (durazno)	115
Figura 4.34 Gráfica de puntos para evaluación de color en <i>Prunus pérsica</i> (durazno).....	116
Figura 4.35 Distribución de las unidades experimentales a T 20°C	117
Figura 4.36. Gráfica de efectos principales para pH	120
Figura 4.37. Gráfico de caja para los valores de pH en <i>Carica papaya</i> (papaya)	121
Figura 4.38 Efectos de los factores en papaya de IV gamma	122
Figura 4.39. Gráfica de caja del porcentaje de pérdida de peso en <i>Carica papaya</i> (papaya) ...	123
Figura 4.40 Gráfica de efectos de los tres factores de estudio en <i>Carica papaya</i> (papaya)....	124
Figura 4.41. Gráfica de cajas de índice de madurez en <i>Prunus pérsica</i>	125
Figura 4.42 Gráfica de efectos principales para la concentración de mohos	127
Figura 4.43 Concentración de mohos (ufc/g) en papaya de cuarta gamma, agrupado por tipo de mezcla y temperatura	128
Figura 4.44 Gráfica de efectos principales sobre la concentración de bacterias.....	129

Figura 4.45 Concentración de bacterias en ufc/g en papaya de IV gamma según tipo de mezcla..... 130

Figura 4.46 Gráfica de puntos para la evaluación sensorial del Color en papaya de cuarta gamma131

Figura 4.47 Gráfica de puntos para la evaluación sensorial de textura en papaya de cuarta gamma 132





RESUMEN

La demanda de fruta fresca así como de productos mínimamente procesados, que lleguen a las mesas de los consumidores con características fisicoquímicas, organolépticas y microbiológicas aceptables, es un aspecto que crece en el mercado nacional e internacional día a día. Este trabajo explora la aplicación de aceites esenciales obtenidos de *Satureja boliviana* (muña) y de, *Oryganum x majoricum* (orégano) mediante destilación por arrastre con vapor como bioconservante de *Prunus pérsica* (durazno) fresco entero aplicado en forma de emulsión y sobre *Carica papaya* (papaya) tipo IV gamma, aplicados como microcápsulas embebidas en un recubrimiento comestible.

Se extrajeron aceite esenciales de *Satureja boliviana* y *Oryganum x majoricum*, con porcentajes de rendimiento de 1.18 y 2.244 %v/p los que fueron caracterizados fisicoquímicamente determinando la composición de cada uno de ellos mediante GC-MS. El aceite esencial de *Satureja boliviana* (muña) tiene como compuestos principales a pulegona con 47.01% y p-Mentan-3-ona con 28.04%. El aceite esencial de *Oryganum x majoricum* (orégano) presenta a α -terpineno (16.610%) y 4-terpineol (17.570%) como compuestos principales.

Basados en los aceites esenciales extraídos se formularon 3 mezclas denominadas M1 (25% muña, 75% orégano), M2 (75% muña, 25% orégano) Y M3 (50% muña, 50% orégano). Las mezclas y los aceites esenciales, fueron usados para la preparación de emulsiones y elaboración de microcápsulas. Las emulsiones se prepararon usando Tween 20 al 10%, en una concentración del 5% v/v de la mezcla o aceite a estudiar. Las microcápsulas se obtuvieron por coacervación compleja con goma arábica y gelatina, las que fueron liofilizadas y evaluadas por microscopía electrónica de barrido, con un rendimiento entre 61.19 y 66.36%...

En los ensayos “*in vitro*” se determinó la tasa de crecimiento de los consorcios microbianos asociados a cada una de las frutas en estudio presente frente a los aceites esenciales y mezclas, la mezcla M2 (75% a.e. de muña y 25% a.e. orégano) presento una tasa de decrecimiento de -0.0353 h^{-1} 1.14 veces más rápida que de la tasa de crecimiento del grupo control frente al consorcio microbiano aislado de *Prunus pérsica* (durazno). La tasa de crecimiento del consorcio microbiano de *Carica papaya* (papaya) fue de 0.0150 h^{-1} , 0.16 veces la tasa de crecimiento del grupo control

Se aislaron e identificaron *Klebsiella spp.*, y *Mucor spp.* Procedentes de *Prunus pérsica* (durazno). *Klebsiella spp.*, *Shiguella spp.* *Pseudomona spp.* Así como *Alternaria alternata* de *Carica papaya* (papaya), también se aisló una cepa de levaduras, denominada en el trabajo como L1 presente en ambos frutos y se usaron para las pruebas de determinación de sensibilidad por difusión en agar.

A las pruebas de sensibilidad frente a emulsiones por difusión en agar *Shiguella spp.* Mostró sensibilidad alta con halos de inhibición de 21.5 mm a las mezclas M1, M2 y orégano, *Klebsiella spp.* Presentó sensibilidad alta con halo de inhibición de 22 mm a frente a la emulsión de M3 y sensibilidad media con 19.33 mm frente a emulsión de aceite esencial de orégano. *Pseudomona spp.* Tuvo halos de inhibición de 18mm, equivalente a sensibilidad media frente al a.e. de orégano y finalmente *estreptococcus spp.* Mostro sensibilidad alta (halos de inhibición de 21.45 mm) frente a M1, M2 y a.e. orégano.

De la misma evaluación con microcápsulas al 6.98% p/p (gr aceite encapsulado/ gr de microcápsulas) *klebsiella spp.* y *Shiguella spp.* Desarrollaron sensibilidades medias con halos de inhibición 15 y 17 mm, respectivamente, frente a todas las microcápsulas. *Alternaria alternata* mostró sensibilidad media con un halo de inhibición de 17 mm a M1 y

sensibilidades altas frente a las demás microcápsulas con halos de inhibición entre 21 y 23 mm. Y finalmente *Pseudomona spp.* Y *Mucor spp.* Presentaron sensibilidades medias de 17.5 y 18 mm respectivamente frente a M2.

Finalmente las pruebas microbiológicas “in vivo” se efectuaron con la aplicación de los agentes antimicrobianos, con frecuencias de dosis de (1 y 2 veces al día) como emulsión sobre durazno entero, se evaluaron el pH, % acidez, Sólidos solubles (° Brix), índice de madurez, concentración de mohos y bacterias, así como evaluación organoléptica de textura y color. Se consiguió una mejor bioconservación de durazno con las emulsiones con M2 y aceite esencial de orégano, aplicándolos 1 vez al día.

Las microcápsulas fueron aplicadas al 1 y 5% como agente bioconservante sobre papaya tipo IV gamma mediante recubrimientos, se almacenaron a 10 y 20 °C, se realizaron al igual que en durazno las propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y organolépticas. De lo que se obtuvo una mejor bioconservación a 10°C con 1% de microcápsulas en el recubrimiento conteniendo M1 y M2 y a 20°C con 5% de microcápsulas en el recubrimiento conteniendo M3.

ABSTRACT

The demand for fresh fruit and minimally processed products available to the consumers must to have acceptable physicochemical, organoleptic and microbiological characteristics. This paper explores the application of essential oils obtained from *Satureja boliviana* (muña) and, *Oryganum x majoricum* (oregano) by steam stripping as biopreservative of *Prunus pérsica* (peach) Fresh and whole applied as emulsion, and *Carica papaya* (papaya) IV gamma kind, applied as microcapsules embedded in an edible coating.

Satureja boliviana and *Oryganum x majoricum* essential oil's were extracted, with yields of 1.18 and 2.24% v/w which were characterized physicochemically determining the composition of each one of them by GC-MS. The essential oil of *Satureja boliviana* (muña) exposed as main compounds pulegone with 47.01% and p-Menthan-3-one with 28.04% while essential oil of *Oryganum x majoricum* (oregano) exposed α -terpinene (16,610%) and 4-terpineol (17,570%) as main compounds.

Based on essential oils extracted, three mixes M1 (25% muña, oregano 75%), M2 (75% muña, oregano 25%) and M3 (50% muña, oregano 50%) were made. Mixtures and essential oils were used for the preparation of emulsions and microcapsules. The emulsions were prepared as a solution at 5% v/v of oil or mixes studied. The microcapsules were obtained by complex coacervation with gum Arabic and gelatin, which were lyophilized and evaluated by scanning electron microscopy, with a yield between 61.19 and 66.36% .

The in vitro essay allowed to determinate the grow rate (k) of microbial consortia associated with each of the present study fruits, against essential oils and mixes. The microbial consortium of *Prunus pérsica* (peach) presented a rate of decline $k = -0.0353 \text{ h}^{-1}$ in presence of Mix M2. And the growth rate of the microbial consortium of *Carica papaya* (papaya) was $k = 0.0150 \text{ h}^{-1}$. They were isolated and identified *Klebsiella sp.*, and *Mucor sp.* From *Prunus pérsica* (peach). *Klebsiella sp.*, *Shigella sp.* *Pseudomonas spp.* And *Alternaria alternata* of *Carica papaya* (papaya), also a strain of yeast was isolated, called in the paper like L1 present in both fruits and used for testing sensitivity determination by agar diffusion.

A test of sensitivity to emulsions was performed, where *Shigella sp.* showed high sensitivity to M1, M2 mixtures and oregano's essential oil; *Klebsiella sp.* showed high sensitivity whit an

inhibition zone of 22 mm to M3 and 19.33 mm in presence of oregano's essential oil emulsion. *Pseudomonas spp.* showed a zone of inhibition of 18mm, equivalent to average sensitivity to e.o. oregano and finally *Streptococcus spp.* showed high sensitivity (halos of inhibition of 21.45 mm) in presence of M1, M2 and e.o. oregano.

The test of sensitivity to microcapsules with 6.98% w / w (oil encapsulated g / g microcapsule) was performed and it was found that *Klebsiella spp.* and *Shigella sp.* developed sensitivities mean inhibition zones of 15mm and 17 mm, respectively, against all microcapsules. *Alternaria* showed average sensitivity with a halo of inhibition of 17 mm to M1 and high sensitivities to other microcapsules with inhibition halos between 21 and 23 mm. Finally *Pseudomonas sp.* And *Mucor spp.* They had mean sensitivity of 17.5 and 18 mm respectively compared to M2.

Finally microbiological in vivo test were made with the application dose frequencies (1 and 2 times a day) of antimicrobial agents as emulsion on whole peach. pH, percentage of acidity, soluble solids (° Brix evaluated), maturity index, molds and bacteria concentration and sensory evaluation of texture and color were evaluated. The best bioconservation of peach was achieved with M2 emulsions and essential oil of oregano, applying 1 time per day.

The microcapsules were applied to 1 and 5% in edible coating as bioconservation agent on papaya (IV gamma) physicochemical, microbiological and organoleptic properties were evaluated. The best bioconservation was showed at two temperatures: the first one with M1 or M2 microcapsules at 1% in edible coatings stored at 10°C and the second one with 5% of M3 microcapsules in edible coatings stored at 20°C.

CAPITULO I

INTRODUCCION

El comercio de frutas y hortalizas en los centros de abastecimiento del país es posible bajo dos modalidades : La primera y más común en los centros de abastecimiento conocidos como mercados mayoristas o minoristas en los que se expende las frutas y hortalizas frescas enteras, las que no reciben un tratamiento post cosecha, y cuyo deterioro se encuentra supeditado a las condiciones de transporte, almacenamiento por demás poco controladas, y que al momento de la venta son también expuestas a contaminación por manipulación excesiva e insalubre. Originando de esta manera que los productos que llegan a las mesas de los consumidores tengan un tiempo de vida media menor a lo esperado.

La segunda modalidad se encuentran en los supermercados, donde las exigencias de calidad a los proveedores son mayores, en este ámbito tenemos las frutas y hortalizas troceadas y enlatadas con sus respectivos tratamientos físicos y/o químicos para su conservación, sin embargo actualmente los consumidores demandan alimentos cada vez más seguros, que tomen menor tiempo de preparación y que a la vez estén mínimamente procesados de tal forma que no afecten la salud de los consumidores^{1,2,27}, en este sentido , los vegetales conocidos como productos frescos cortados conocidos como IV gamma, o listos para consumir, están dirigidos a satisfacer la demanda actual, sus tejidos mantienen sus funciones metabólicas activas hasta llegar al consumidor final, por lo que es necesario el desarrollo de tratamientos parciales que minimicen el impacto de las operaciones de cortado troceado y envasado a las que son sometidas, de modo que eviten el crecimiento de microorganismos¹.

El consumo de frutas frescas así como de cuarta gamma, según el último informe de Fruit Logística², viene desarrollando una alta tendencia de producción a nivel mundial, y es un mercado de buenas expectativas para nuestro país se ha podido notar que los consumidores holandeses y alemanes están demandando más frutas “exóticas”, dentro de las cuales se encuentra *Carica papaya* (papaya) y *Prunus pérsica* (durazno), en sus diferentes presentaciones, sin embargo nuestro país no está completamente desarrollado en el comercio exterior de estos frutos por el momento.

En este ámbito *Carica papaya* y *Prunus pérsica* son frutos de pulpa blanda lo que genera una desventaja respecto a otros porque son susceptibles principalmente a daños físicos, químicos y mecánicos desde su cosecha hasta su consumo, los que determinan un hábitat idóneo para ciertos microorganismos que se encargan de su descomposición^{2,27}.

En la actualidad en la industria alimentaria está ampliamente expandido el uso de conservantes químicos para mantener la calidad de diferentes alimentos hasta la llegada a nuestra mesa, pero el uso de estos conservantes químicos altera las diferentes características organolépticas como sabor, textura, color, olor. La mayoría de estos se incorporan con el alimento para su consumo^{27,80}.

Los aceites esenciales han sido citados extensamente debido a las propiedades antimicóticas y microbianas que muchas de ellos presentan debido a que son uno de los principales mecanismos de defensa de las plantas y que son aprovechados en la conservación de los alimentos. Dentro de ellos *Satureja boliviana* a la que la medicina ancestral y las prácticas agrícolas tradicionales atribuyen efectos preservantes de semillas y otros alimentos⁴⁸ cuyos compuestos químicos como mentol, pulegona, piperitona son compartidos con el aceite esencial de *Myntostachis mollis*, por lo que a ambas especies se les confunde comúnmente y llama con el mismo nombre común muña. Por otro lado el aceite esencial de orégano (*Oryganum vulgare*) es bien conocido por sus actividades antibacterianas contra *Escherichia coli*, *Salmonella tiphymurium*, *Salmonella choleare suis* y *Vibrio choleare* y las bacterias gram - positivas: *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, en diferentes grados de sensibilidad.⁵⁴

La FAO establece los métodos necesarios para la manipulación de frutas y hortalizas frescas, donde se resalta la adecuada limpieza y condiciones de transporte para mantener la calidad del producto, y llegado a las mesas se recuerda hacer uso de lejía para desinfectarlas⁷⁸, en otros

casos se aplica también radiaciones, soluciones de amonio cuaternario, compuestos alcalinos y exposición a ozono⁷⁹. Los estudios para la comercialización de papaya tipo IV gama, abarcan el uso de atmosferas modificadas por exposición a ozono⁸¹ y con recubrimientos basados en alginato de sodio.⁸⁰

Por tanto es necesario desarrollar una forma de conservación post cosecha de los frutos frescos como *Prunus pérsica* o de los productos mínimamente procesados conocidos también como frutos de cuarta gamma en base a *Carica papaya* en trozos que permitan extender el tiempo de vida media reportada actualmente que beneficie a los implicados de su cadena productiva, ya sea a los productores y/o vendedores intermedios evitando pérdidas económicas por deterioro, o a los consumidores por pérdidas de calidad nutricional y/o sensorial durante el tiempo de consumo.



1. OBJETIVOS

1.1 GENERALES

Evaluar la capacidad bioconservante “in vitro” e “in vivo” de los aceites esenciales de *Satureja boliviana* (muña) y *Oryganum x majoricum* (orégano), sobre *Prunus* pérsica (durazno) entero y *Carica papaya* (papaya) tipo cuarta gamma

1.2 ESPECIFICOS

- Extraer aceites esenciales puros de *Satureja boliviana* (muña) Y *Oryganum x majoricum* (orégano), por arrastre de vapor, y determinar su composición por GC-MS
- Formular y elaborar emulsiones y microcápsulas a partir de los aceites esenciales puros y de 3 mezclas basados en ellos.
- Evaluar la capacidad antimicrobiana de los aceites puros y en mezclas así cómo sus presentaciones en emulsiones y microcápsulas, en cultivos “in vitro” frente a la flora microbiana representativa de *Carica papaya* (papaya) y *Prunus pérsica* (durazno) asociada al deterioro vegetal.
- Evaluar la capacidad bioconservante “in vivo” de los aceites esenciales puros y en mezclas sobre durazno fresco entero, aplicado como emulsión, y sobre papaya de IV gamma, aplicados como microcápsulas en recubrimiento comestible

2. HIPOTESIS

Debido a que se ha reportado que los metabolitos de plantas aromáticas se encuentran asociados con actividades antimicrobianas es posible que los aceites esenciales de *Satureja boliviana* (muña) Y *Oryganum x majoricum* (orégano), tengan actividad antimicrobiana “in vitro” frente a flora microbiana asociada al deterioro vegetal, y consecuente actividad bioconservante “in vivo” sobre *Prunus pérsica* (durazno) fresco entero aplicado como emulsión, y sobre *Carica papaya* (papaya) ,en presentación tipo IV gama, aplicado como microcápsulas en recubrimiento comestible.

3. VARIABLES E INDICADORES

Tabla 1.1. Variables independientes y dependientes consideradas para la evaluación de resultados

Variable independiente	Dimensión	Indicadores	Sub indicadores
Composición de aceites esenciales	Pruebas in vitro	Concentración de aceites esenciales puros y mezclas, como emulsiones	% p/v aceite esencial de Muña, Orégano ó mezcla (M1,M2,M3) por ml de emulsión
	e in vivo	Concentración de aceites esenciales puros y en mezclas, como microcápsulas	% p/p de aceite esencial puro de Muña, orégano o mezcla (M1,M2,M3) por g de microcápsula
Variable dependiente	Dimensión	Indicadores	Sub indicadores
Capacidad bioconservante	Pruebas in vitro	Tasa media de crecimiento de consorcio microbiológico (k)	Resistencia, Sensibilidad límite Sensibilidad media Sensibilidad alta
		Diámetros de inhibición	
	Pruebas in vivo	Actividad antimicrobiana de emulsiones o microcápsulas	Concentración de microorganismos en 1 g de material vegetal
		Deterioro de material vegetal	pH, ° Brix, Índice de madurez, % acidez, color, textura

Tabla 1.2. Factores de los diseños experimentales para las Pruebas in vivo considerados en la evaluación de resultados

Dimensión	Factor	Indicador
Sobre Prunus pérsica	Frecuencia de aplicación de emulsiones	1,2 veces al día
Sobre Carica papaya	Temperatura de almacenamiento	10,20°C
	Concentración de microcápsulas en el recubrimiento	1, 5 %



CAPITULO II

MARCO TEORICO

2.1 Deterioro Vegetal

El deterioro vegetal puede ser definido como cualquier cambio sensorial, (táctil, visual, oloroso, o de sabor), que el consumidor considere inaceptable, estos cambios son resultado de cambios físicos, químicos, fisicoquímicos, biológicos y microbiológicos. Este puede ocurrir en cualquiera de los eslabones de la cadena alimentaria y en cualquier lugar, ya sea en las zonas de producción, en la cosecha, manejos de post cosecha, almacenamiento, procesado, transporte y distribución, disposición para la venta o durante su preparación.³ El factor causante del deterioro de muchos alimentos puede ser dividido en deterioro biológico y deterioro abiótico.⁴

Tabla 2.1. Algunas características de los Mohos más importantes en la pudrición de las frutas

Género	Problemas de descomposición
Alternaria	Puntos cafés a negros en manzanas, frutos de hueso (cerezas, melocotones, nectarinas, albaricoques y ciruelas) e higos, podredumbre negra de los cítricos
Aspergillus	Puntos negros en duraznos, nectarinas, albaricoques, cítricos e higos
Botryodiplodia	podredumbre de la corona del banano; podredumbre de papayas maduras
Cladosporium	Podredumbre gris restringida con núcleo negro en frutas de hueso, de color verde oliva de crecimiento en las frambuesas, podredumbre negro en las uvas y las manchas de higos.
Colletotrichum	Puntos cafés a negros(antracnosis) en cítricos, aguacates, mangos, y papayas
Diplodia	Pudrición de tallo de frutas cítricas, paltas, mangos y papayas; pudrición acuosa café en duraznos.
Fusarium	Pudrición café de frutas cítricas y piña, pudrición blanda de los higos
Geotrichum	Pudrición ácida de cítricos y duraznos
Gloeosporium	La antracnosis, la podredumbre negro del banano; podredumbre ojo de pepita
Monilinia	Podredumbre parda de frutas de hueso
Mucor	Podredumbre blanda de fresas y peras
Nigrospora	Podredumbre acuosa de plátanos
Penecillium	Moho azul y verde de los cítricos; pudrición de moho azul de las manzanas, uvas, peras, frutas de hueso y los higos, la podredumbre parda de la piña.
Phomopsis	Podredumbre del extremo de los tallos de frutas cítricas y paltas.
Phytophthora	Podredumbre café de las manzanas y los cítricos, la podredumbre coriácea de las fresas
Rhizopus	Pudrición acuosa, suave de manzanas, peras, frutas de hueso, uvas, fresas, aguacates, higos
Trichoderma	Podredumbre de café oscuro a verde en frutas cítricas

Fuente: Voysey, P. (2000). Campden y Chorleywood Food Research Association.⁵

a) **Deterioro biológico**

Este es causado por el proceso normal de maduración o denominado también añejamiento, el que ocurre en todas las materias vivientes, tales como vegetales, frutas, carnes, etc.; por la actividad enzimática propia del tejido de las frutas. También por cambios microbiológicos causados por bacterias, mohos y levaduras. La liberación al ambiente de enzimas microbianas

extracelulares o intracelulares. Este proceso de deterioro, puede ser frecuente disminuido o demorado por un adecuado procesamiento o empaclado de estos alimentos y por un adecuado control de temperatura y humedad dentro del almacenamiento. Los microorganismos en los vegetales pueden provenir de diferentes fuentes, ya sean agua, suelo, aire, animales, insectos, etc.^{3,4}

Las levaduras asociadas al deterioro de las frutas son: *Cándida*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Torulospora*, *Rhodotolura*, *Pichia*, y los Mohos más comúnmente conocidos están: *Aspergillus*, *Mucor*, *Penecillium*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Byssochlamys*.⁵ La tabla 2.1 Menciona las características de algunos mohos asociado a la podredumbre de frutos.

El esquema presentado en la Figura 2.1 propuesto por Voysey⁵ resume los microorganismos más comunes involucrados en el deterioro de las frutas.

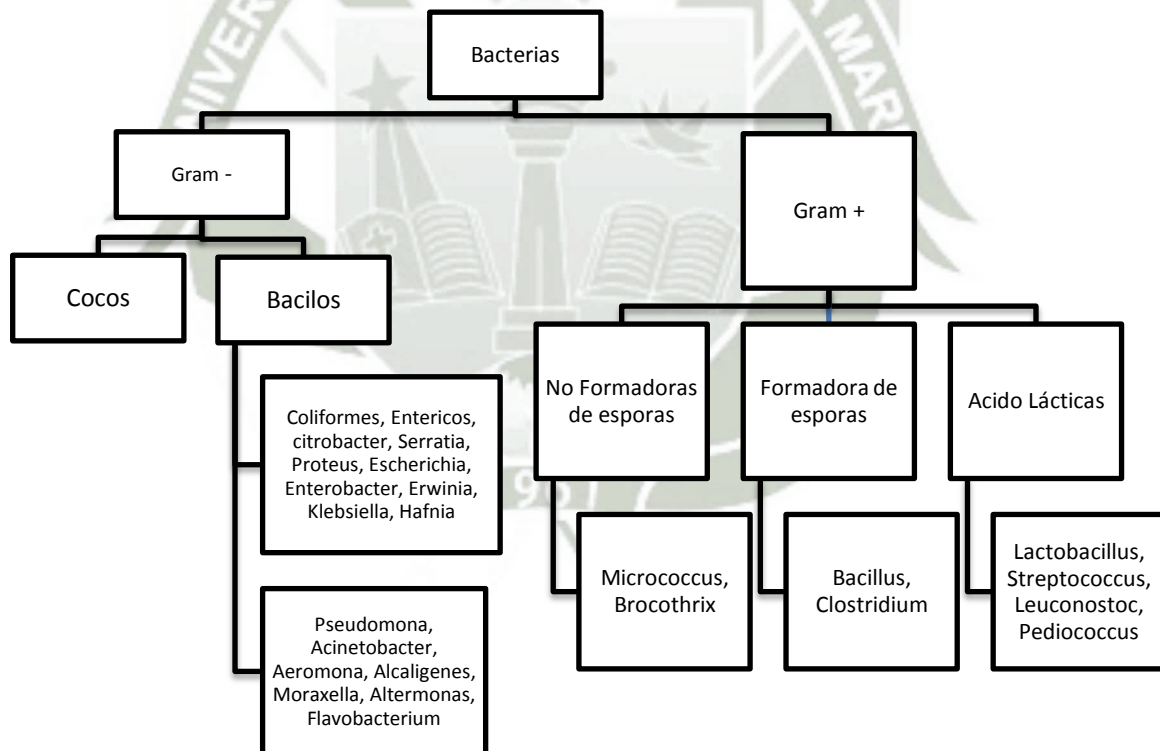


Figura 2.1. Bacterias que afectan principalmente a los alimentos.
Fuente: Voysey, P. (2000). Campden y Chorleywood Food Research Association .⁵

En esencia, el tejido interno de los alimentos es estéril, a excepción de algunos alimentos porosos. Las frutas y verduras albergan algunas especies de microorganismos que producen su deterioro en la superficie y están en función de las condiciones del medio ambiente que la rodea, los que se encuentran influenciados en gran medida por el pH y el contenido de humedad del alimento (actividad de agua del alimento). La velocidad del crecimiento de los microorganismos responsables del deterioro a su vez depende también de la temperatura, de la humedad relativa atmosférica y de la composición de la atmósfera, especialmente del contenido de dióxido de carbono y oxígeno.^{3,4} La tabla 2.2 muestra los rangos de temperaturas de crecimiento de bacterias que causan pudrición en frutos.

Tabla 2.2. Temperaturas para crecimiento (°C) de bacterias que causan pudrición blanda en vegetales y frutas.

Bacteria	Min	Óptimo	Máximo	Especie atacada
Erwinia carotovorasubsp.atroseptica	3	27	35	Mayoría de vegetales, particularmente papas y algunas frutas
Erwinia carotovora subsp.carotovora	6	28-30	37-42	Mayoría de vegetales y algunas frutas
Erwinia chrysanthemi	6	34-37	>45	Piña

Fuente: Voysey, P. (2000). Campden y Chorleywood Food Research Association.⁵

b) Deterioro Abiótico:

Dentro de estos factores se precisan dos tipos, Los que se encuentran asociados intrínsecamente al tipo de alimento como son el pH, la actividad del agua, contenido nutricional, constituyentes antimicrobianos, potenciales REDOX, o la estructura biológica del fruto.⁵ Por otro lado están los factores asociados a las condiciones de procesado y almacenamiento como son La temperatura (calentamiento o congelamiento), acidez, actividad de agua reducida, uso de preservantes, atmósferas de almacenamiento y finalmente una combinación de los tratamientos anteriores.

Entonces el deterioro vegetal se puede resumir como una secuencia de eventos, primero los microorganismos han de ingresar al material vegetal a partir de una o más fuentes; luego el ambiente alimentario (pH, potencial REDOX, nutrientes y agentes de inhibición) favorecen el crecimiento de estos microorganismos, finalmente las condiciones de transporte y almacenamiento permiten el crecimiento y colonización de los mismos.^{3,5}

2.2 Indicadores de calidad de las frutas

La calidad de una fruta está dada por el conjunto de las propiedades físicas, químicas y biológicas que indican una adecuación a los requerimientos sanitarios, físico - mecánicos y nutricionales que deben ser cubiertos por los frutos para su consumo.⁶ Las medidas más comunes sobre calidad son las fisicoquímicas, que generalmente se obtienen en poco tiempo, algunos de estos índices son la firmeza, el color, el olor los sólidos solubles, y la acidez.⁷

- a) **Olor, color y textura.** La combinación de estos tres factores hace que un fruto sea aceptado o no en un determinado mercado; y a su vez estos vienen determinados por el estado de madurez de un fruto.

Primero el color es un factor importante por dos motivos a) influye en la apariencia del fruto y b) es indicativo de la madurez del fruto y de su lozanía; las escalas de medición de este se pueda dar por subjetividad u objetivamente mediante el uso de aparatos electrónicos que se basan en la reflexión de la luz.⁶

El pardeamiento de los frutos frescos reduce su calidad y es uno de los factores limitantes del tiempo de vida de anaquel, el pardeamiento tiene un tiempo de aparición en frutas y vegetales relativo a la cantidad de polifenoles, a mayor cantidad de ellos un pardeamiento más rápido, el origen del pigmento café es complejo y no está completamente entendido, pero se sabe que está involucrado con la oxidación de los polifenoles por las enzimas peroxidasa (POD) y polifenol oxidasa (PPO).⁸

- b) **La firmeza.** Se obtiene con la ayuda de un “Penetómetro”, este indicador es principalmente en frutos de pulpa un buen indicador sobre el estado de madurez, usado comúnmente en duraznos, tal como lo indica.⁷ También llamada **Textura**, por algunos otros autores como Gonzales⁶ indica que esta es una propiedad física determinada por el sentido del tacto, donde la mano y la boca son los instrumentos primarios, generalmente se mide por la resistencia a una presión mecánica que ejercen los tejidos de las frutas; utilizándose como instrumentos de mediada además del ya mencionado tenderómetros, fibrometros, entre otros, Además de calificaciones valoradas por opiniones en escala.

- c) **pH.** Este indicador es un factor que puede ralentizar hasta casi detener, el crecimiento de muchos microorganismos, por lo tanto se debe considerar como una fuente de información sobre los microorganismos potencialmente activos a fin de considerarlo como método de conservación (Bases de la conservación de alimentos).⁹ en estudios realizados sobre uvilla y mora por Gonzales⁶ el valor de pH de estos frutos aumenta con el deterioro de estos. La mayoría de los mohos pueden crecer sobre un gran rango de pH, La levaduras están favorecidas por pH entre 4 y 4,5. Y la mayoría de bacterias son favorecidas por pH cercanos a la neutralidad.¹⁰
- d) **Sólidos solubles.** Este indicador se utiliza para estimar el contenido de azúcares en las frutas, ya que estos son los componentes mayoritarios en el zumo de frutas. La técnica más común de medición de este parámetro se encuentra basada en la refractometría.⁷
- e) **Acidez de las frutas y vegetales.** Debido a que durante los procesos metabólicos normales forman muchos ácidos orgánicos en los tejidos de las plantas. Los ácidos cítricos son más frecuentes y abundantes en tejidos de plantas comestibles. En la mayoría de las frutas, el contenido de ácido orgánico disminuye durante y después del proceso de maduración. Cuando se dice que el fruto está maduro, el nivel de acidez está bajo. El grado de acidez de la fruta se mide por titulación química y se expresa en porcentaje de ácido cítrico y de la relación de los parámetros de % acidez y sólidos totales nos permiten establecer el índice de madurez.^{6,7}
- f) **Humedad.** Tiene una gran influencia en el desarrollo de mohos, pero más que la humedad del sustrato es la disponibilidad de agua (actividad de agua, a), A 25C algunas especies pueden crecer a una k menor a cero, lo que evidentemente encontraran sobre frutas secas, confituras, leche en polvo, productos de charcutería desecados, granos y derivados de los cereales. Sin embargo la mayoría de los mohos prefieren una k más elevada de 0,80 a 0,95.^{6,7}
- g) **Tasa de respiración.** Como explican Montes y Arévalo¹¹ es un excelente indicador de la actividad metabólica del tejido y por tanto, es muy útil la precisión del potencial de almacenamiento del producto. La fórmula general para la respiración es:



Durante este proceso ocurre una pérdida de sustrato que en frutas y hortalizas que no son repuestos, dando inicio el proceso de deterioro del producto. La respiración que ocurre en presencia de oxígeno es un excelente indicador de la actividad metabólica del tejido, por tanto puede ser usada como guía de la vida útil del producto. La respiración es un proceso complejo, afectado por un gran número de factores. En el caso de frutos tropicales los factores ambientales son los más importantes, desde el punto de vista de su tecnología post-cosecha.

2.3 *Carica papaya (papaya)*

Se cree que se originó a lo largo de las costas del Caribe en América central, donde se encuentra una gran diversidad, siendo las especies salvajes mayoritarias a las domesticadas, actualmente crece en todos los países tropicales y muchas regiones subtropicales del mundo.

Se ubica en el género de las dicotiledóneas *caricácea*¹², según recientes clasificaciones taxonómicas proponen que algunas especies asignadas al género *Carica* es mejor asignarlas al género *Vasconsella* de este modo se propuso una reorganización en la que *Carica papaya* es la única especie dentro del género *Carica*.¹³

Los frutos se encuentran listos para su cosecha a los cinco o seis meses después de su florecimiento, lo que ocurre a los cinco u ocho meses después de la germinación de las semillas estos varían entre los 15 a 50 cm de longitud, de 12 a 25 cm de diámetro y un peso de 450 a 2500 gramos o más. Se encuentra formado por tres partes, el exocarpio o cáscara, el mesocarpio o pulpa y el endocarpio que contiene las semillas y mucílago. La pulpa varía del color pálido a amarillo rojizo y es rica en agua, azúcares, vitaminas, minerales y sustancias colorantes.¹⁴

Existen diferentes variedades o cultivares de uso comercial. En Centro y Suramérica, se conocían las variedades Maradol o mamey, también conocida como la cubana, la Criolla y la tipo Cartagena y la tipo Paraguanera. Existe una gran cultura en el desarrollo de frutos pequeños o mini frutos de diferentes tipos, provenientes de la variedad Solo y especialmente en nuestra región la variedad Arequipeña es muy conocida.

La producción de *Carica papaya* (papaya o Lechosa) está altamente limitada por la enfermedad viral de la Mancha Anillada de la papaya (VMAP) o en inglés papaya Ringspot Virus (PRSV); presentándose la manifestación de la enfermedad al poco tiempo de ser trasplantada.¹⁵ Durante la post cosecha, el principal patógeno microbiano el *Colletotrichum gloesporioides*, causante de la antracnosis, acompañado de marchitamiento, pudrición radical, mancha foliar, pudrición de flores y tizón en plántulas, en los frutos causa el pelado del mismo, mancha chocolate, que afectan al exterior del fruto y, por lo tanto, originan pérdidas económicas, en este aspecto las esporas del hongo germinan después de 48 horas y forman un tubo germinativo que penetra de manera directa la cutícula del fruto inmaduro, en donde se mantiene latente y se reactiva durante el periodo de maduración del fruto.¹⁶

En cuanto al análisis de percepción y comportamiento del consumidor peruano de papaya, Salazar Rojas¹⁷ concluye que muchos de los consumidores al parecer prefieren papayas dulces y la asocian buena para la salud porque ayuda a la fácil digestión de los alimentos. Parece ser que los frutos pequeños y medianos (de hasta 2 kg de peso) son los preferidos, debido a la dulzura de la fruta y a la utilización mediata o inmediata de consumo. En el informe del 2010 del ministerio del Ambiente, Scotto¹⁵, menciona que la papaya no se consume instantáneamente en los hogares, sino que se almacena el menos de 1 a 3 días, Aquí existe una potencial aplicación biotecnológica que podría satisfacer esta necesidad del consumidor que el de prolongar la vida en anaquel o en el estante del fruto de la papaya y también el sabor como ya se está experimentando en otros países con éstos rasgos.¹²

2.4 Durazno (*Prunus pérsica*),

Fruto procedente de China, fue probablemente llevado a Persia por algunos comerciantes, de donde llegó a Europa y luego llevado a México por los españoles, e integrados a los demás países durante las expediciones de conquista y la época de la colonia, es uno de los frutos que produce una gran variedad, su vida comercial es menor a los 20 años, puesto que pierden vigencia ante la aparición de una variedad más atractiva. Pertenece a la familia de las Rosáceas, genero *Prunus*, especie *Prunus pérsica*.^{18,19}

Los frutos pueden tener de 5 a 7.5 cm de diámetro, de color amarillento con tonalidades rojizas, cuya carne es amarilla o blanquecina, sabor dulce, jugoso y refrescante. Junto con las cerezas, ciruelas y albaricoques son frutas de hueso llamadas drupas, pues la pulpa comestible

tiene un hueso en el medio.²⁰ Fruto rico en hierro, magnesio, potasio, fósforo y zinc, así como vitaminas A (sobre todo en la cáscara), C, B1, B2 y B3.^{18,21}

En cuanto a los requerimientos climáticos, es un tipo de cultivo que requiere de inviernos fríos y lluviosos, con primaveras secas, libre de lluvias y neblinas, veranos secos y calurosos, y otoño templado y fresco, a falta de este se pueden observar floraciones o brotación irregular, tardía y muy prolongada, caída de yemas frutales y vegetativas, frutos de bajo calibre por falta de hojas, caída de frutos, frutos deformes o muerte del árbol, las temperaturas que se deben manejar para su cultivo están entre 21 a 27 °C siendo -1°C la temperatura crítica y la máxima de 40 °C.¹⁹

Dentro de las variedades encontradas en el Perú están: Huayco Rojo, Huayco crema, Oro Azteca, Fortaleza, Dixie Red, California, Florida, Nectarinas, Blanquillos, Lamce, Amarillo moqueguano, amarillo Alicante y Criollos abridores.²²

Muchos compuestos pueden contribuir al sabor de la pulpa, dentro de ellos los compuestos aromáticos volátiles (alcoholes, aldehídos, ésteres) los que contribuyen al aroma típico, como por ejemplo el hexanal y el linalool. Los principales ácidos orgánicos son el ácido málico (50%), seguido del ácido cítrico, quínico y succínico, los que se encuentran expresados como ácido málico existiendo entre un 0.9 a 1.6% de peso fresco, el contenido de ácido ascórbico (vitamina C) es generalmente bajo (10mg/100 g peso fresco), finalmente en cuanto a este aspecto los azúcares medidos por refractometría pueden alcanzar un 20% o más.²³

Entre los hongos que atacan el durazno se dividen en dos grupos. El primero es el grupo de los hongos que causan pudriciones radicales, compuesto por los géneros *Phytophthora* y *Armillaria*. El segundo es un grupo de hongos que causan enfermedades tanto en el tejido radical como en la parte aérea de la planta aquí están los géneros *Pythium*, *Fusarium*, *Fusicocum*, *Rhizoctonia*, *Stereum* y *Verticillium*.¹⁹ En algunos huertos de durazno, se presentan daños con síntomas de pudriciones morenas que comienzan con manchas de color café, extendiéndose hasta invadir completamente el fruto, atacan también las flores y ramitas del árbol, síntomas que son causados por *Monilinia frutícola*.²⁴

Su consumo se da como fruta de temporada, en ensaladas de frutas, gelatinas, pasteles entre otros. Una vez maduros se recomienda almacenar no más de tres días, porque pierden sabor y

aroma. Se conservan a temperatura ambiente en un lugar fresco y ventilado, o en la parte baja del refrigerador. En la industria se utiliza para hacer jugos, zumos, conservas de frutas, yogures, mermeladas. Dentro de las exportaciones un análisis determinado por Ayuda Proyecto²⁵, indica que al 2008 eran mayores las exportaciones de duraznos frescos a los duraznos en conserva, además señala que “En cuanto al desarrollo de una oferta de exportación de duraznos frescos y derivados se registra que ha sido incipiente y los envíos muestran un comportamiento irregular” .^{25,26}

2.5 Bioconservación y Bioconservantes

La bioconservación está entendida como la extensión de la vida de anaquel de un alimento asegurando su calidad mediante el uso de micro biota controlada y/o sus compuestos antimicrobianos. Se puede agregar a este ámbito el uso de extractos naturales vegetales que tienen capacidad biocida y/o bioestática, para prevenir el desarrollo de microorganismos de riesgo alimentario.^{27,28}

Alternativas prometedoras son la aplicación de lavados con soluciones de ácidos orgánicos, ácido peracético o peróxido de hidrogeno como también la aplicación de aceites esenciales, oleorresinas y péptidos antimicrobianos, considerados como bioconservantes por su procedencia natural.²⁹

Dentro de las ventajas del uso de bioconservantes se detallan que estos son de uso seguro en la cadena alimentaria humana y con menos limitaciones que los conservantes químicos, debido a que son moléculas producidas de forma natural, sin embargo esta definición se aplica a aquellas sustancias producidas por microorganismos fermentativos endógenos de alimentos tradicionales, y no completamente aplicable a los extractos naturales puesto que algunos de ellos han reportado toxicidad por consumo excesivo de los mismos como es el caso de aceite esencial de payco (*Chenopodium Ambrosides*) .^{27,30}

Otras ventajas que se pueden citar es que no causan impacto medioambiental puesto que son rápidamente degradadas en la cadena alimentaria humana, poseen un espectro de acción bien definido, su aplicación es compatible con el etiquetado de producto biológico, entre otros. Sin embargo también posee desventajas como son la falta de regulación de su uso a nivel mundial,

alteración de las cualidades sensoriales de los alimentos y en algunas ocasiones costos de producción elevados.²⁷

Una forma de aplicar estas sustancias antimicrobianas en las dos últimas décadas ha sido el uso de recubrimientos y empaques. Los Recubrimientos alimenticios, son películas que envuelven al alimento y que puede ser consumida como parte del mismo, este tipo de conservación se viene desarrollando como respuesta al interés de tener productos naturales, más sanos, seguros y respetuosos con el medio ambiente.^{31, 32}

Los componentes más comunes de los recubrimientos comestibles son aquellos que se aplican a las frutas para sustituir la cera natural que se ha eliminado durante el lavado y cepillado de las mismas, son generalmente resinas o ceras como la cera de abeja o la carnauba, esta tecnología permite diseñar y formular productos que se adapten según la forma de aplicación y el tipo de producto al que vayan destinados.³³ Se emplean en forma de finas capas mediante inmersión, pulverización o envolturas, y el método depende de las propiedades reológicas de las películas y la superficie de los frutos.³²

Se pueden clasificar los componentes por sus características en tres clases a) Los hidrocoloides que dan al recubrimiento buenas propiedades mecánicas, b) Lípidos que reducen la deshidratación y la transpiración pero no son buenos formadores de film y c) los compuestos que constituyen una mezcla de los dos anteriores aprovechando las cualidades de cada uno de ellos.³³

Dentro de los carbohidratos utilizados se puede citar la celulosa, y sus derivados, metilcelulosa, alginatos, pectinas, goma arábiga, almidones y almidones modificados. Para las proteínas podemos citar aquellas que provienen de trigo, avena, las lácteas, las obtenidas de animales marinos como peces y camarones, la gelatina o las proteínas de soya, y dentro de los lípidos como ya se mencionan las ceras acilglicéridos y ácidos grasos. Para su formulación se pueden incorporar productos naturales con actividad antimicrobiana, que es lo que proponemos, procedentes de plantas, organismos marinos insectos o microorganismos como alternativas viables.³²

2.6 Aceites esenciales

Los aceites esenciales son sustancias volátiles, aromáticas y líquidas, cada una características de cada planta que son producidas o secretadas en diferentes partes de la planta como en las hojas, corteza, flores, resinas frutas y raíces. Son considerados subproductos volátiles de metabolismos secundarios de diferentes células de la planta. La cantidad de aceite esencial que se encuentra en la mayoría de las plantas es de un valor de 1 a 10% pero también pueden contener cantidades que varían de 0.01% a 10%. Estas se obtienen por diferentes métodos físicos, por ejemplo destilación con vapor que llevan el olor y el sabor mismo del material vegetal del cual proceden.^{34, 35}

La principal fuente de aceites esenciales son las plantas aromáticas de las familias de Anacardiaceae, Apiaceae, Asteraceae, Chenopodiaceae, Cupressaceae, Gentianaceae, Lamiaceae, Myrtaceae, Pinaceae, Piperaceae, Poaceae, Rutaceae, Verbenaceae Y Zingiberaceae.³⁶ Toman el nombre de aceites ya que su apariencia física y consistencia que es bastante similar a los aceites grasos, pero se diferencian de ellos porque al dejar caer unas gotas de esencia sobre el papel, éstas se volatilizan fácilmente sin dejar ninguna huella ni mancha grasos.³⁷

Tabla 2.3. Composición de los aceites esenciales de acuerdo a su grupo funcional base

Grupo funcional	Naturaleza química	Ejemplo
Hidrocarburos	Terpenicos	Limoneno, α -terpineno
	Aromáticos	Cumeno, p -cimeno
	Sesquiterpenicos	Trans- β -cariofileno
Aldehídos	Monoterpenicos	Citral
	Alifáticos	Nonanal, octadecanal
	Aromáticos	Cinamaldehido
Alcoholes	Monoterpenicos	Geraniol, citronelol
	Alifáticos	3-decanol
	Sesquiterpenicos	Espatuleno, cedrol
	Aromáticos	Alcohol bencílico
Fenoles	Aromáticos	Timol, carvacol

Fuente: Díaz Fajardo, Olga Liliana.³⁹

Estas sustancias contienen componentes fuertemente aromáticos que se encargan de dar a la planta un olor, sabor y aroma característico y único. Además, las plantas usan estos compuestos a su favor para la atracción de insectos polinizadores o en defensa como repelente de organismos así como antibacterianos.^{35, 38}

En un aceite esencial como composición se encuentra a los hidrocarburos alicíclicos y aromáticos denominados terpenos junto con sus derivados oxigenados como alcoholes, aldehídos, cetonas, esteres y ácidos los cuales son responsables del aroma que caracteriza a cada aceite esencial.⁴⁰ La unidad química estructural que los diferencia de otros compuestos naturales es la unidad de isopreno C_5 en la estructura hidrocarbonada.³⁶

Los productos derivados de los terpenos que tienen oxígeno reciben el nombre de alcanforos, como ejemplo: en los hidrocarburos terpénicos figuran los limonenos, el mirceno, el pineno.³⁵ Los metabolitos volátiles se pueden clasificar de acuerdo a los grupos funcionales presentes en la estructura como se muestra en la Tabla 2.3

Como algunas propiedades físicas que presentan los aceites esenciales Azaña⁴¹ menciona:

- Son líquidos a temperatura ambiente, pero fácilmente volátiles a condiciones de temperatura variables.
- Generalmente no son coloreados.
- Presentan una densidad menor a la del agua
- Tienen un índice de refracción elevado
- Tiene la capacidad de desviar la luz polarizada
- Tienen un punto de ebullición superior a $100^{\circ}C$
- Son arrastrables en vapor de agua.

El uso de los aceites esenciales es muy diverso, ya sean por parte de industria de alimentos, farmacéutica, cosmética y química, en la alimentaria es usado para preservar alimentos y bebidas ya que cuentan con un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de microorganismos encargados de la descomposición, también siendo incorporados en diferentes productos de consumo como jarabes, bebidas no alcohólicas mermeladas etc. Así como también en productos de uso externo como cremas, jabones, saborizantes, geles, aromatizantes.^{36, 41}

La forma cómo los aceites esenciales actúan inhibiendo en el desarrollo y crecimiento de los microorganismos encargados de la descomposición es muy complejo y aún no ha sido ampliamente estudiado y explicado. Se menciona que el modo de acción de los aceites esenciales depende en cierto grado del tipo de microorganismo y también está relacionado con la composición y estructura de la pared celular y membrana externa de los mismos. Las investigaciones mencionan que los aceites esenciales actuarían a nivel del metabolismo intermedio inactivando enzimas de reacción.⁴¹

También se señala que las diferentes aplicaciones que presentan estos aceites esenciales dependen de la composición química, calidad, propiedades fisicoquímicas, actividad biológica y las propiedades organolépticas. Es por eso que es de gran interés la importancia de realizar controles de calidad de estos y estudiar ampliamente su composición.³⁶

2.6.1. Métodos de obtención de aceites esenciales

De las plantas aromáticas el más utilizado ha sido la destilación con agua (hidrodestilación), además de este encontramos otro métodos como son destilación con agua y vapor y la destilación por arrastre de vapor, la elección del método depende tanto de las características del aceite y de la ubicación en la planta.³⁹

- a) **Destilación con agua (hidrodestilación).** La porción de material vegetal aromático de donde se desea extraer el aceite esencial se sumerge en el agua. La hidrodestilación consiste en llevar a estado de ebullición el agua, que penetra los tejidos de la planta y disuelve una parte del aceite esencial presente en las estructuras contenedoras; esta disolución acuosa, se difunde a través de las membranas de las células y el aceite se vaporiza inmediatamente desde la superficie. Este proceso continúa hasta que se remueve todo el aceite contenido en las glándulas de la planta, de tal manera, que los vapores generados puedan ser condensados y colectados.^{42, 43}

Un factor importante en la hidrodestilación es la hidrólisis, el cual es la ruptura de una molécula orgánica por medio del agua, debido a que los aceites esenciales contienen cantidades de esteres que se hidrolizan a ácido y alcoholes cuando se realiza la hidrodestilación, es conveniente disminuir la cantidad de agua usando en su lugar vapor seco.^{44, 45}

b) Destilación con agua y vapor. Se carga el material vegetal colocándolo sobre una malla que sirve como un fondo falso y no permite el contacto directo con el agua. Una vez iniciado el proceso, el agua dentro del alambique se lleva hasta ebullición y el vapor generado *in situ* pasa a través del material vegetal. Se debe tener en cuenta evitar que el material vegetal se quemé ya que la cámara de agua lo protege del calentamiento directo. Es necesario que el vapor de agua generado pase a través de la carga uniformemente para tener y garantizar una buena extracción del aceite esencial.^{42, 45} El tiempo total de la destilación depende de la naturaleza de los componentes del aceite esencial a extraer, si el aceite posee compuestos de alto punto de ebullición, entonces el tiempo de destilación será también elevado.⁴⁴

Tabla 2.4. Comparación de los métodos de extracción de aceites esenciales.

Método	Ventajas	Desventajas
Hidrodestilación	Disposición simple y económica Método ampliamente utilizado	Difícil de controlar el calentamiento El sobrecalentamiento puede quemar la muestra vegetal, dando así un aceite de baja calidad. Mayor uso energético Los tiempos de extracción son largos
Destilación con agua y vapor	No se calienta directamente la muestra los tiempos de extracción son medios Configuración del sistema simple y económica	Existe un riesgo de extracción incompleta El volumen de agua requerido limita el el tiempo de extracción
Destilación con arrastre de vapor	No se calienta la muestra directamente Tiempos cortos de extracción	Las temperaturas altas pueden causar hidrólisis de los compuestos presentes en el aceite esencial Es un poco más costosa.
Extracción por fluidos supercríticos	Tiempo de extracción aún más corto Mejores rendimientos	Ceras cuticulares y compuestos de alto peso molecular pueden ser extraídos junto con el aceite.

Fuente: Vargas R. Adriana P., Bottia S. Edwin J.³⁶

c) Destilación con arrastre de vapor. Se obtiene aceites esenciales con buenos rendimientos, y, a parte, se pueden procesar grandes cantidades de material vegetal. Este método es una destilación de la mezcla de dos líquidos inmiscibles y consiste en

una vaporización a temperaturas inferiores a las de ebullición de cada uno de los componentes volátiles por efecto de una corriente directa de vapor de agua. Los vapores que salen del cuello de Cisne se enfrían en un condensador donde regresan a la fase líquida, los dos productos inmiscibles, agua y aceite esencial, finalmente, para terminar se separan en un vaso Florentino.^{42, 44, 45} En la Tabla 2.4 se muestran las ventajas y desventajas de las diferentes técnicas de obtención de aceites esenciales

Técnica usada para la obtención de aceites esenciales, los que son en su mayoría mezcla de sustancias terpenoides cuya temperatura de ebullición está por encima de los 200°C, temperaturas a las cuales la recuperación se torna poco práctica dado que estas sustancias se descompondrían. Dada la ley de Dalton, donde la relación de las presiones de vapor de dos componentes es directamente proporcional a las concentraciones molares, como consecuencia un componente de presión de punto de ebullición elevado (con presión de vapor relativamente pequeña) puede ser codestilada por “arrastre” con un líquido en el que sea inmiscible y de punto de ebullición menor. Así los aceites esenciales pueden ser arrastrados por el vapor de agua, al método en el que el vapor de agua se genera en otro balón y se deja pasar por medio de un tubo hacia donde se encuentra el material vegetal se le denomina método del vapor vivo^{82,83}.

- d) Extracción por fluidos supercríticos.-** Los fluidos supercríticos son líquidos y gases en condiciones ambientales, llevados a unas condiciones de funcionalidad de presión elevada y temperatura moderada, por encima de su punto crítico. Resultando de esta operación que presentan elevado poder disolvente en dicho estado supercrítico.⁴⁶

Esta técnica de separación es conocida por su inocuidad. Con esta técnica es posible tener extractos libres de disolvente usando la extracción por fluidos supercríticos y además la extracción es más rápida que usando otros métodos de extracción convencionales. Estas ventajas son debidas a la alta volatilidad de los fluidos supercríticos y a las propiedades de transporte mejoradas. Usando dióxido de carbono (fluido supercrítico), el tratamiento se da a una temperatura moderada y es posible lograr una alta selectividad de microcomponentes valiosos en productos naturales. La selectividad del dióxido de carbono también es apropiada para la extracción de aceites

esenciales, pigmentos, carotenoides antioxidantes, antimicrobianos y sustancias relacionadas, que son usadas como ingredientes para alimentos, medicinas y productos de perfumería y otros materiales biológicos.⁴⁷

2.7 *Satureja boliviana* (muña)

Planta a la que se le atribuye propiedades medicinales, antisépticas, antiespasmódicas, analgésicas, antiescabióticas, e incluso insecticida si se usa la parte del tronco etc. Las hojas son usadas en infusión para tratar enfermedades respiratorias, malestares estomacales y dolores reumáticos. Crece en la zona andina de Perú, Bolivia y Argentina.^{48, 49, 50} Su denominación común en Perú es “muña” u “orégano de los Incas”; esta denominación también se usa para nombrar a *Mintostachys mollis*, planta arbustiva con los que comparte algunos componentes como carvacrol y pulegona; siendo el porcentaje de rendimiento de aceites esenciales mucho mayor en *Satureja boliviana* que en *Mintostachys mollis*, cuyos valores reportados se encuentran entre 1.5 y 2.2 %.^{50, 51}

Tabla 2.5. Clasificación taxonómica de *Satureja boliviana*

CATEGORÍA	CLASIFICACIÓN
REINO	Vegetal
DIVISION	Magnoliophyta
CLASE	Magnoliopsida
Sub-CLASE	Asteridae
ORDEN	Lamiales
FAMILIA	Lamiaceae
GENERO	<i>Satureja</i>
ESPECIE	<i>Satureja boliviana</i>

Fuente: Urrunaga S., R.; Urrunaga S., E.; Acurio U., L.⁴⁸

Satureja boliviana es una planta subarborescente, del tipo perenne, con altura entre los 60 a 150 cm. de longitud, de tallos ramosos puberulentos, es decir que presenta pequeños pelillos finos en pocas cantidades. Hojas pequeñas muy aromáticas. Con presencia de floración después de la estación lluviosa de color blanquecino liláceo. Hojas opuestas, con pecíolos de 0,6-1,4 cm de largo y láminas de 1-3,5 por 0,8-2,5 cm, aovadas a anchamente aovadas, obtusas, levemente dentadas. Flores de 2-14 por verticilastro, pediceladas, dispuestas en cimas pedunculadas axilares, con brácteas lineales o lanceoladas.^{48, 52}

Tabla 2.6. Porcentajes de los componentes del aceite esencial de la familia Lamiaceae

<i>Satureja boliviana</i>		<i>Minthostachys mollis</i>	
Compuesto	(%)	Compuesto	(%)
α – Cadineno	-	Carvacrol	22.70
8- Cadenena	-	Limoneno	17.39
Isomentona	33.61	R(-) carvona	16.38
Carvacrol	11.14	Acetato de nerilo	4.51
Pulegona	9.79	Acetato de mentilo	2.40
1-metil-2-(1-metil)-benceno	9.04	N.I	2.20
1,8 Cineol	9.02	N.I.	2.10
Sabineno	2.92	Metilheptonona	2.05
Indo bornil acetato	1.53	N.I	1.95
α – Tujeno	1.35	N.I.	1.87
α – Pineno	1.09	b-pineno	1.18
Γ -Terpineno	1.04	Mentona	0.28
α – Terpineol	1.00		
Cariofileno	1.00		
Epibiciclosesquifelandreno	0.97		
Espatulanol	0.43		

Fuente: Figueroa Soliz, Nelson; Estevez Martini, Tito; Giménez Turba, Alberto.⁵¹

Estudios sobre la composición de los aceites esenciales dan como componentes principales, α -pineno 1.29%, pulegona 9.79%, carvacrol 11.14 %, isomentona 33.61%.⁵¹ Como se muestra en la Tabla 2.6. Mientras que Viturro⁵⁰ describió 56 compuestos aromáticos volátiles en los aceites esenciales de *Satureja boliviana* proveniente de Argentina comparándolos con composiciones estudiadas de aceites esenciales provenientes de diferentes zonas del Perú, de las cuales tiene en común mentona (12.6-54.1%), isomentona (15.1- 29.7%), pulegona (2.2-12.6 %), timol (0.2-6.8 %), carvacrol (0.4-6.8%), cariofileno (1.6-1.8%), espatunelol (0.3-1.7%) y linalool (1.8-3.1%) entre otros compuestos.

El aceite esencial de *Satureja boliviana* presenta actividad microbiana de amplio espectro y actividad antimicótica contra dermatofitos y hongos saprofitos. Además se evaluó y corroboró

actividad contra huevos de *Triatoma infestans*.⁵¹ Mientras que Lizárraga⁴⁹, describe una actividad antimicrobiana del extracto metanólico total, y de sub-extractos obtenidos con acetato de etilo, n-hexano, cloroformo frente a siete microorganismos incluyendo a *Shigella sonnei* y *Salmonella enteritidis*.

2.8. *Oryganum* spp (orégano)

Tabla 2.7. Clasificación Sistemática De *Oryganum Vulgare* (orégano)

CATEGORIA	CLASIFICACION
REINO	Planta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Genero	<i>Oryganum</i>
Especie	<i>O.Vulgare</i>
Nombre Binomial	<i>Oryganum vulgare</i> L.
Nombre común	orégano, mejorana silvestre, orenga

Fuente: Klauer, Dieter Fritz.⁵³

El *Oryganum vulgare* (orégano) cuyo nombre deriva del término griego “oros” (montaña) y “ganos” (ornamento) que quiere decir “el ornamento, “decoración de montañas”. Esta planta es nativa de Europa central, meridional y Asia central. En Asia menor se asemeja mucho a al mejorana, pero se diferencia de este por la composición química de su aceite esencial ya que su aceite esencial carece de compuestos fenólicos.⁵⁴

En el Perú la mayor producción se encuentra en Tacna con 1091 seguido por Moquegua con 328 hectáreas y Arequipa (Caylloma, Arequipa) con 286. Comercialmente más conocidos tenemos al *O. vulgare* (orégano griego), *O.onites* (orégano turco), *L.graveolens* y *L. berlandieri* (orégano mexicano).⁵³

Tabla 2.8. Especies de orégano

NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE COMÚN
<i>Oryganum syriacum</i>	orégano Sirio
<i>Oryganum Onites</i>	orégano de Creta
<i>Oryganum dictamus</i>	Dittany de Creta
<i>Oryganum vulgare aureum</i>	Mejorama dorada trepadora
<i>Oryganum vulgare hirtum</i>	orégano griego
<i>Oryganum laevigatum</i> “ Herrensausen”	orégano Herrenhausen
<i>Oryganum laevigatum</i> “Hopleys”	orégano Purpura
<i>Oryganum x majoricum</i>	orégano italiano
<i>Oryganum kaliteri</i>	orégano kaliteri
<i>Oryganum rotundifolium</i>	orégano hermoso
<i>Lipia graveolens</i>	orégano Mexicano
<i>Oryganum majorana</i>	orégano Sicilano o mejorana dulce

Fuente: Salamanca G Mónica A; Sánchez B, Marly Y.⁵⁵

El orégano (*Oryganum vulgare*) es en cuanto a forma generalmente polimorfa, esto varía por el medio y época donde se desarrolle, lo cual genera varias especies. Presenta tallos rectos, ramificados y aromáticos que llegan a alcanzar entre 0.30 y 0.70 m. En cuanto a las hojas son enteras, ovales, opuestas, las cuales brotan de dos en dos en cada nudo. En el Perú se cultivan dos especies: el orégano “zambito y el “Nigra”, también en algunas zonas el “orégano chileno” que se piensa que es un cruce de las dos anteriores, tiene poco valor comercial.⁵³

Dentro de la composición química del aceite esencial de orégano se encuentra al carvacrol y el timol entre 7 y 16%, compuestos fenólicos como flavonoides (luteolina, agliconas, alcoholes alifáticos y derivados del fenil propano) que son de gran abundancia con un porcentaje de 90% del total. Además se ha encontrado ácidos como el coumerico, ferulico, cafeico y vanílico, estos están presentes en la especie *O. onites*. Dentro de la composición de aceites esenciales tenemos al pireno, alfa-oipeno, sesquiterpenos, cimeno, lipiol, ácido tánico, citral, L-mimoneno y geraniol.⁵⁵

Estudios demostraron que el aceite esencial de orégano tiene actividad contra bacterias gram negativas como *Salmonella Typhimirium*, *E. coli*, *Klebsiella Pnuemonae*, *Yersinia enterocolitica* y gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Listeria*

monocytogenes y *Bacillus subtilis*. Además actividad anti fúngica contra *Candida Albicans*, *C. trpicalis*. *Turlopsis glabrata*, *aspergillus Niger*, *Geotrichum* y *Rhodotorula*.⁵⁵

Tabla 2.9. Propiedades fisicoquímicas del aceite esencial de orégano

<i>PROPIEDAD</i>	<i>VALOR</i>
Índice de refracción a 20°C	1.4723
Poder rotario a 20°C	18.35
Densidad	0.901 g/ml
Solubilidad en etanol 70GL	Ligeramente soluble
Índice de ester	28.40
Constituyente carbonilados	11.95

Fuente: Klauer G., Dieter.⁵³

Dentro del uso terapéutico el orégano tiene aplicaciones en el tratamiento de enfermedades como ataques asmáticos, antirreumático, expectorante, dolor de dientes, dolores menstruales, tónico nervioso, dolor de oídos, cólicos intestinales y para dolores musculares. También tiene propiedades antimicrobianas, desinfectante, fungicidas, bactericidas. Se reporta que las hojas de orégano también se usan para la elaboración de carnes y embutidos así mismo para elaboración de fármacos, cosméticos y licores.⁵⁵

Tabla 2.10. Actividad biológica del orégano.

ACTIVIDAD	GÉNERO
Antioxidante	Oryganum Lippia
Antimicrobiana	Oryganum Lippia
Antiparasitaria	Lippia
Estrogenica	Oryganum
Antigenotóxica	Oryganum Lippia
Insecticida	Oryganum

Fuente: Arcila L., Cynthia C; Loarca P., Guadalupe; Uribe E. Salvador L .González de Mejía.⁵⁶

2.9. Microencapsulación

Esta es una técnica desarrollada para proteger una sustancia de las reacciones con su entorno, también se utiliza para enmascarar sabores y olores no deseados y de transformar líquidos en ingredientes sólidos que puedan ser fácilmente manipulables; las sustancias se encuentran

envueltas en un material que forma una película fina sobre ellas. Entonces tenemos un soporte que es el material de recubrimiento y El “core” o núcleo que es la sustancia activa. La forma puede variar tendiendo a ser esféricas. La Figura 2.2, esquematiza algunas de estas estructuras.^{57, 58, 59}

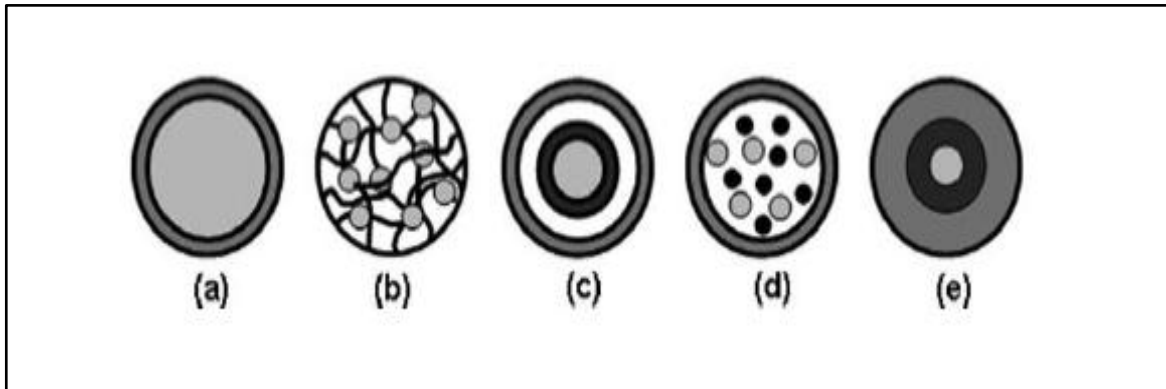


Figura 2.2. Estructura de las microcápsulas. (a) Un núcleo que está rodeado por una capa de material encapsulante. (b) un núcleo que está atrapado dentro de una red continua de material encapsulante. Las variaciones de estos incluyen cápsulas con varios núcleos o varias capas (c) (d) (e).
Fuente: Quispe-Arpasi.⁵⁷

Para la preparación de la matriz de soporte se pueden utilizar Gomas, como la goma arábiga, agar agar, alginato de sodio, carragenina; Carbohidratos como son el almidon, dextranos, sacarosa; Celulosas como por ejemplo carboximetilcelulosa, lípidos y proteínas como la gelatina, caseína, grenetina entre otros.⁶⁰ Para determinar las características morfológicas se emplean técnicas de microscopía óptica y electrónica. En cuanto a la distribución de tamaño se puede determinar por técnicas de tamización, sedimentación, o con un equipo llamado Coulter Counter.⁶¹

Las técnicas de microencapsulación son: basado en procesos físicos. Secado por atomización (spray drying), enfriamiento tras atomización (spray chilling), recubrimiento en lecho fluidizado, disco giratorio con orificios múltiples. Y los procesos basados en procesos químicos como son coacervación compleja, polímero-polímero incompatible, y proceso de inyección sumergido.^{57, 61}

2.9.1. Métodos de microencapsulación

- a) **Deshidratación por atomización.** Se pulveriza un producto líquido (emulsión o/w) por el contacto con una corriente de gas caliente (generalmente aire) para obtener un polvo instantáneo.⁵⁷
- b) **Enfriamiento y refrigeración de aspersiones** la diferencia radica en que no se evapora agua alguna (temperaturas bajas). Comprende dos pasos, en el primero se forma una emulsión del material de núcleo (materia activa más polímero, materia activa con disolvente), con un disolución del material de membrana. En el segundo, la emulsión se envía a una boquilla de atomización y pulverizado donde se secan las microcápsulas.⁶²
- c) **Cobertura en lecho fluidizado.** Llamada también recubrimiento en suspensión de aire o proceso en este proceso se utiliza un lecho fluidizado para las partículas sólidas suspendidas en el aire y el material encapsulante se pulveriza sobre las partículas, formando una capa. A su vez mediante la Liofilización se consigue la deshidratación de casi todos los materiales y aromas termosensibles. Las microcápsulas liofilizadas presentan una estructura más porosa que las atomizadas.^{57, 62}
- d) La **coacervación** se define como la separación de dos fases líquidas en sistemas coloidales. En la práctica existe la coacervación simple que se refiere a sistemas que solo tienen un soluto coloidal (ej, gelatina), mientras que la coacervación compleja trata de sistemas conteniendo más de un soluto (ej. gelatina y goma acacia). Los pasos más importantes en este proceso son: (a) Formación de una fase triple químicamente inmiscible, (b) Aplicación de la cobertura y (c) Solidificación de la cobertura.
- e) La **coacervación compleja** es el proceso de separación de fases que tiene lugar de forma espontánea cuando en un medio acuoso se mezclan dos o más coloides que presentan carga opuesta (policatión y polianión), como consecuencia de la atracción electrostática que sufren. En los procedimientos de microencapsulación por coacervación compleja se utilizan generalmente combinaciones de una proteína y un polisacárido, en concreto gelatina y goma arábiga (goma acacia) respectivamente. Es uno de los procesos más estudiados. La gelatina es una proteína anfotérica (presenta

carga positiva a valores de pH inferiores a su punto isoeléctrico $-pI$, y carga negativa a valores de pH superiores) facilita la oclusión de una considerable cantidad de agua. La goma arábiga presenta carga negativa en todo el rango de pH. En consecuencia, a pH inferiores a su pI, la gelatina está cargada positivamente e interacciona con las moléculas de goma arábiga, con lo que se produce una neutralización de cargas y una desolvatación de la mezcla polimérica, que se separa en una fase líquida o coacervado complejo. En el proceso de microencapsulación por coacervación el aspecto más importante que hay que tener en cuenta es el control del pH, ya que determina la ionización de ambos coloides, así como la proporción relativa en que se mezclan éstos y la concentración polimérica total.^{57, 62}

2.10 Emulsiones

El uso de emulsiones a nivel industrial está ampliamente extendido en la actualidad, está en todos los diferentes productos de utilización diaria como los de cuidado personal como cremas hidratantes, protectoras para los rayos UV, etc. En la industria alimentaria se tienen a las de tipo mayonesa o salsa que usan como emulsión la yema de huevo y en agricultura están los insecticidas y pesticidas. En la industria farmacéutica estas sirven para encapsular los fármacos.⁶³

Entonces, decimos que una emulsión es la dispersión termodinámicamente inestable de dos fases líquidas inmiscibles, una es la fase continua y la otra es fase dispersa. Es decir se tienen dos líquidos inmiscibles, como aceite y agua y estos se agitan, se forman gotas de un líquido en otro. Las gotas formadas de un líquido en otro se conoce como emulsión. Debido a que las fases son inestables pueden convertirse cinéticamente estables (metaestables) por la ayuda de agentes tensioactivos o agente emulsificantes, en el caso de los polisacáridos por modificación de sus propiedades reológicas, como la gelación.^{63, 64}

Los emulsificantes son moléculas que se absorben en la superficie de las gotas, formando una membrana protectora que retarda el acercamiento de las gotas y su agregación, por lo cual ayuda la formación de la emulsión y le da estabilidad. Ruiz R.⁶⁴ menciona dos grandes grupos de emulsificantes: a) Surfactantes de bajo peso molecular: ésteres de sacarosa, lecitina, mono glicéridos. b) Emulsificantes macromoleculares: proteínas de huevo y leche.

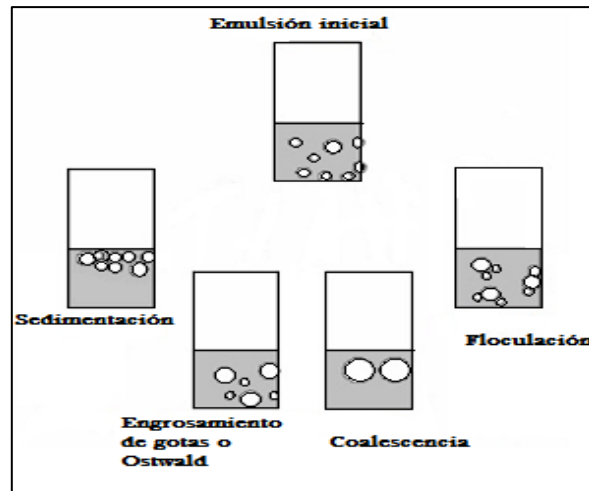


Figura 2.3. Mecanismos que contribuyen a las emulsiones.

Fuente: Cárdenas.⁶⁵

La inestabilidad de una emulsión es decir la ruptura de la emulsión, puede ser debido a cuatro mecanismos de inestabilidad diferentes la Figura 2.3 muestra estos mecanismos.^{63, 65}

Cárdenas⁶⁵ define las necesidades de una emulsión listándolas así:

- Dos o más líquidos inmiscibles entre si
- Un surfactante que estabilice la emulsión formada
- Agitación para dispersar las fases

La función del agente emulsificante es disminuir la tensión superficial de la interface de los dos líquidos permitiendo así la formación de la emulsión con una adecuada agitación. Se reporta que el diámetro de las gotas de la fase dispersa están entre 0.1 a 100 μm .⁶³

Las emulsiones generalmente constan de una fase acuosa y la otra un aceite polar. Las emulsiones pueden ser de dos tipos, una en la cual la fase dispersa es de agua o solución acuosa y la fase en donde están inmersas las gotas (fase continua) es aceite, estas se conocen como agua en aceite (W/O, wáter-in-oil) y el otro tipo de emulsión es donde el aceite es la fase dispersa en una fase continua acuosa o agua, estas se conocen como aceite en agua (O/W, oil-in-water).^{63, 65}

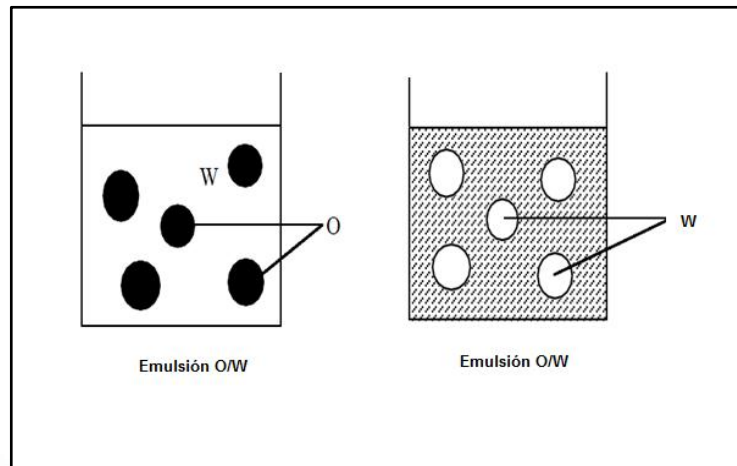


Figura 2.4 Tipos de Emulsión

Fuente: Cárdenas.⁶⁵

A parte de las mencionadas se ha descrito otro tipo de emulsiones conocidas como emulsiones múltiples. En estas se caracteriza porque las gotas de la fase dispersa, contienen a su vez gotas que son inmiscibles con la gota que las contiene y que son miscibles con la fase continua. .^{63,65}

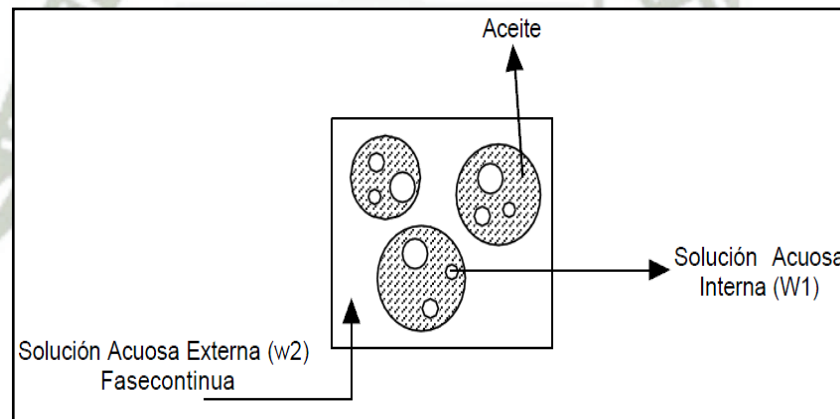


Figura 2.5. Emulsión Múltiple de tipo W1/O/W2

Fuente: Cárdenas.⁶⁵

En resumen las emulsiones son sistemas heterogéneos de dispersiones de un líquido en otro líquido inmiscibles entre ellos. Para que las emulsiones sean sistemas estables hace falta de un tercer componente que disminuya la tensión superficial de la interface que se encuentra entre los dos líquidos como los emulsificantes o surfactantes.

2.11 Cromatografía de gases

La cromatografía de gases GC es una técnica analítica de separación que ha experimentado un desarrollo más espectacular desde sus inicios en los años cincuenta. Se ha utilizado para resolver numerosos problemas en la industria, medicina, biología y análisis ambiental. Actualmente se emplea como técnica de rutina y control de una gran variedad de áreas. Además, sus posibilidades han sido ampliándose a medida que se ha mejorado la instrumentación disponible (columnas capilares, integradores computarizados, sistemas de gradiente de temperatura, nuevos detectores, etc.). Esta técnica cromatográfica es la que ofrece mejor poder de resolución para compuestos orgánicos volátiles. Su principal limitación se encuentra en la labilidad térmica de los solutos, los cuales deben estar estables a la temperatura requerida para su volatilización.

En CG la fase móvil es un gas, mientras que la fase estacionaria puede ser: (a) un sólido adsorbente, o (b) un líquido retenido en un soporte sólido (columna empaquetada) o impregnando las paredes de una columna capilar (columna abierta).⁶⁶

En cromatografía de gases, la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica, esto implica que la muestra debe ser volátil y térmicamente estable. La elución se produce por el flujo de un gas inerte, como He, N₂, H₂, aunque de acuerdo con el tipo de detector es necesario emplear gases específicos. Por lo tanto cabe distinguir dos tipos generales de CG.⁶⁷

- Cromatografía gas-sólido CGS (cromatografía de adsorción), y
- Cromatografía gas-líquido CGL (cromatografía de partición).

El fundamento de las separaciones mediante CGS se encuentra en las diferencias de volatilidad de la mezcla de los solutos cromatografiados, y en su capacidad para ser adsorbidos por el sólido activo. En el caso de separaciones CGL, tienen como fundamento las diferencias de volatilidad y solubilidad de la mezcla en solutos a separar.

Los principios teóricos de la CG no difieren básicamente de los estudiados para la cromatografía en general. De hecho, el concepto dinámico del plato teórico (ecuación de Van Deemter) es el que más se adecua a la situación experimental de la CGL.

La CGS es mucho menos utilizada que la CGL debido a que presenta los problemas siguientes:

- a. Falta de linealidad de las isothermas de adsorción (variación de la relación de distribución con la concentración), lo que da lugar a picos asimétricos, volúmenes de retención dependientes del tamaño de muestra y recuperación incompleta para algunos solutos.
- b. Tiempos de retención excesivamente grandes, en especial, para moléculas voluminosas y polares, las cuales necesitan una temperatura elevada para conseguir tiempos o volúmenes de retención adecuados, lo que puede afectar a la estabilidad térmica de las mismas; por ello, el campo de aplicación de la CGS se restringe normalmente a solutos de bajo peso molecular.
- c. Falta de reproducibilidad debido a que los sólidos adsorbentes son más difíciles de estandarizar y preparar de forma reproducible que los líquidos. Además, la variedad de adsorbentes comercialmente asequibles es mucho menor que la de fases líquidas utilizadas en CGL.

A pesar de estos inconvenientes, existen algunas razones que justifican el empleo de la CGS en casos concretos: Valcarcel.⁶⁶

- La selectividad es frecuentemente mayor en la separación de gases inorgánicos, isómeros geométricos e hidrocarburos de bajo peso molecular.
- Los sólidos adsorbentes son más estables frente a la temperatura y el oxígeno que las fases líquidas.

La CGL es el método más importantes y generalizados para separar determinados componentes químicos de mezclas complejas. En este caso la fase estacionaria es un líquido que está inmovilizado sobre la superficie de un soporte sólido por adsorción o por enlace químico. La velocidad de migración de un analito a través de la columna está determinado por su relación de distribución entre fase líquida inmovilizada y la fase gaseosa. Aunque el principio de la CGL lo estableció por primera vez Martin y Synge en 1941, su utilidad como técnica de separación de especies semejantes no se demostró experimentalmente hasta al cabo de una década. Sin embargo, a los tres años de demostrada su eficacia ya apareció en el mercado el primer aparato comercial de cromatografía de gases. Desde entonces, el aumento

de aplicaciones de esta técnica ha sido fenomenal. Por ejemplo, en 1965 aparecían anualmente más de 2000 publicaciones sobre cromatografía de gases; en 1985, el número aumentó a 5000.⁶⁸

Los principales componentes de un cromatógrafo de gases se nombran a continuación y se muestra en la Figura 2.6. Estos son: Barquero.⁶⁷

- Botella de gas portador (contiene la fase móvil)
- Reguladores de presión
- Filtros de oxígeno y humedad (indican la presencia de O₂)
- Columna cromatográfica (se coloca en el horno)
- Detector (con un sistema para control de temperatura)
- Sistema receptor, procesador y de almacenamiento de la información)
- Registrador o un monitor

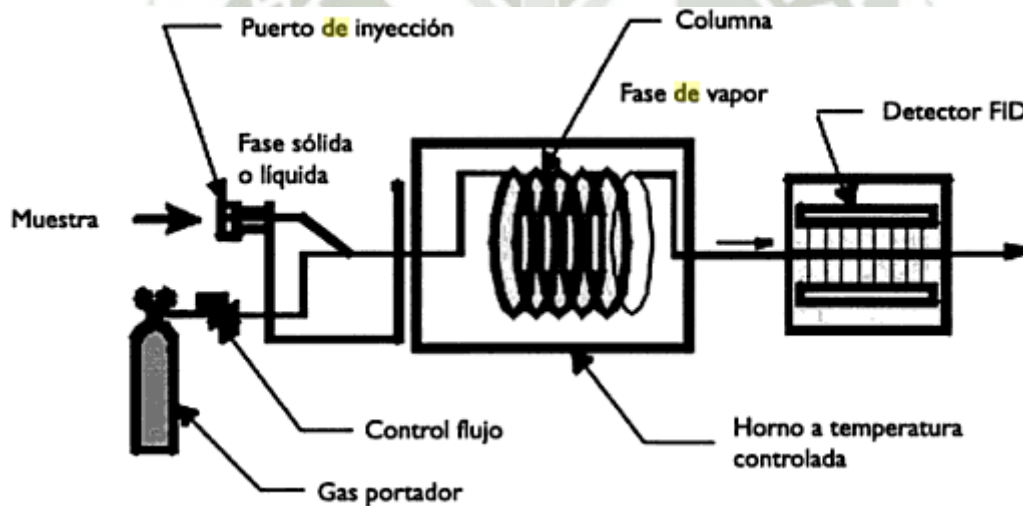


Figura 2.6 Diagrama de un cromatógrafo de gases.

Fuente: Barquero.⁶⁷

En la CGL como ya sabemos la fase móvil es un gas y la fase estacionaria es un líquido adsorbido a las superficies internas de un tubo o columna (funcionamiento tubular o capilar) o a un soporte sólido (funcionamiento en la columna empaquetada) como la tierra diatomeas, teflón en polvo o finas cuentas de vidrio. En general el líquido se aplica como un sólido disuelto en un disolvente volátil, como el éter. Por ejemplo, las cuentas de vidrio se sumergen

en una disolución de poli etilenglicol. A la temperatura utilizada para la cromatografía de gases, el poli etilenglicol funde y permanece en las cuentas como una película líquida. La muestra puede ser cualquier compuesto capaz de ser volatilizado sin sufrir descomposición, se introduce como líquido con un gas inerte – helio, argón o nitrógeno- y a continuación se calienta. Esta mezcla gaseosa pasa a través del tubo. El funcionamiento en columna empaquetada el tubo tiene de 1 a 20 metros de longitud y 0,5cm de diámetro. En el método capilar la longitud es de 30 a 100 metros. Para conseguir resoluciones muy elevadas, se utilizan sistemas capilares de dos kilómetros de tubo. Los compuestos vaporizados se redistribuyen continuamente entre la fase móvil gaseosa y la fase estacionaria líquida, de acuerdo con sus coeficientes de reparto y son, en consecuencia, cromatografiados. Al final de la columna se usa un detector apropiado.^{68,69}

2.11.1 La cromatografía de gases – espectrometría de masas (GC-MS). La CG es una técnica separativa que permite la separación de mezclas muy complejas. Pero una vez separados, detectados, e incluso cuantificados los componentes individualmente de una muestra problema, el único dato de que disponemos para la identificación de cada uno de ellos es el tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos. Este dato no es suficiente para una identificación inequívoca, sobre todo cuando analizamos muestras con un número elevado de componentes.

Por otra parte la espectrometría de masas puede identificar de manera inequívoca cualquier sustancia pura, pero normalmente no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin separar previamente sus componentes, debido a la extrema complejidad del espectro obtenido por superposición de los espectros particulares de cada componente.

La CG-MS produce un espectro de masa de cada componente al igual que su masa y ubicación en el cromatograma. Este medio poderoso de detección puede utilizarse cuando no se dispone de muestras estándares que ayuden a determinar las identidades de los solutos.⁷⁰

Por lo tanto la asociación de las dos técnicas, CG y MS da lugar a una técnica combinada CG-MS que permite la separación e identificación de mezclas complejas, la cual es la técnica que se usa en la identificación de los componentes de los aceites esenciales del presente.

2.12 Liofilización

Los principios de la liofilización fueron aplicados inicialmente hace unos 50 años en la deshidratación de pequeñas cantidades de productos médicos y farmacéuticos, pero su uso en gran escala empezó recién durante la segunda guerra mundial por la demanda de plasma sanguíneo. Actualmente, el método de liofilización es un proceso relativamente costoso para productos alimenticios, pero la suavidad del tratamiento es el mejor motivo de interés para su aplicación en escala industrial. El objetivo primordial de los estudios de investigación es la preparación de un alimento deshidratado ideal, que luego del almacenaje prolongado a temperaturas normales, mantenga, al rehidratarse el color, sabor, aroma y apariencia del producto fresco.⁷¹

Consiste en sacar el agua a una sustancia congelada saltándose el paso por el estado líquido: se congela una solución acuosa de la sustancia química que se desea liofilizar y, a esa baja temperatura que impide cambios químicos que produzcan deterioro, se le somete un alto vacío que pasa el agua del estado sólido al estado gaseoso, sin pasar por el estado líquido. Es una forma de secar un producto químico a temperaturas bajísimas, sin el deterioro que produciría el recalentamiento.⁷²

Otro autor describe que la liofilización es la remoción del agua de las células congeladas (sólidas) a presión reducida (sublimación).⁷³

Las principales ventajas de la liofilización son: Barreto.⁷¹

- Las bajas temperaturas evitan cambios químicos en las sustancias termolábiles, incluyendo cambios de color.
- La pérdida de constituyentes volátiles, exceptuando el agua, se reduce al mínimo.
- Los productos se pueden secar sin formar “espuma”
- Los constituyentes del material sólido permanecen dispersos, no acumulándose en la superficie.
- La coagulación de los productos es mínima y especialmente se evita la desnaturalización de proteínas.
- La reducción de volumen es mínima.

2.13 Microscopía electrónica de barrido

El microscopio óptico y el electrónico de transmisión operan de manera fundamentalmente igual: un haz ancho de energía electromagnética (formado por fotones o por electrones) se hace pasar a través de la muestra; como resultado, al pasar el haz emergente a través de unas lentes (de cristal o electromagnéticas) se forma una imagen ampliada. En ambos instrumentos se utiliza el principio de refracción de la energía electromagnética por medio de lentes, para formar una imagen aumentada.⁷⁴

El microscopio electrónico de barrido SEM hace uso de un principio totalmente diferente para la formación de la imagen, es decir la amplificación electrónica de señales generadas al irradiar la superficie de la muestra con un haz muy estrecho de electrones. Por lo tanto generar imágenes de una superficie, con una resolución alta y una apariencia tridimensional dentro de un intervalo amplio de aumentos. En el microscopio electrónico de barrido se construyen imágenes y contraste aprovechando la emisión de electrones (electrones secundarios) de una muestra, cuando sobre ella incide un haz enfocado de electrones de alta energía.⁷⁵

Mediante el uso de un generador de barrido se hace que el haz de electrones atraviese la muestra siguiendo un rastreo de trama o barrido. La señal generada por los electrones secundarios de la muestra que inciden sobre el ánodo se amplifica y se utiliza para modular la intensidad de un punto que barre un tubo de rayos catódicos (esencialmente igual que el tubo de imagen de un receptor de televisión) poniéndola en preciso registro con la pauta de barrido del haz de electrones. De este modo, mediante el uso de detectores que transducen la señales que de ella emana, son transformadas en corrientes eléctricas que se emplean para formar una imagen.⁷⁴

La SEM soluciona el problema de cortes asociado con la microscopia electrónica de transmisión. En la práctica puede discriminar objetos separados por una distancia de apenas 20 nm y suele producir un aumento de 1000 a 10000x.⁷⁶

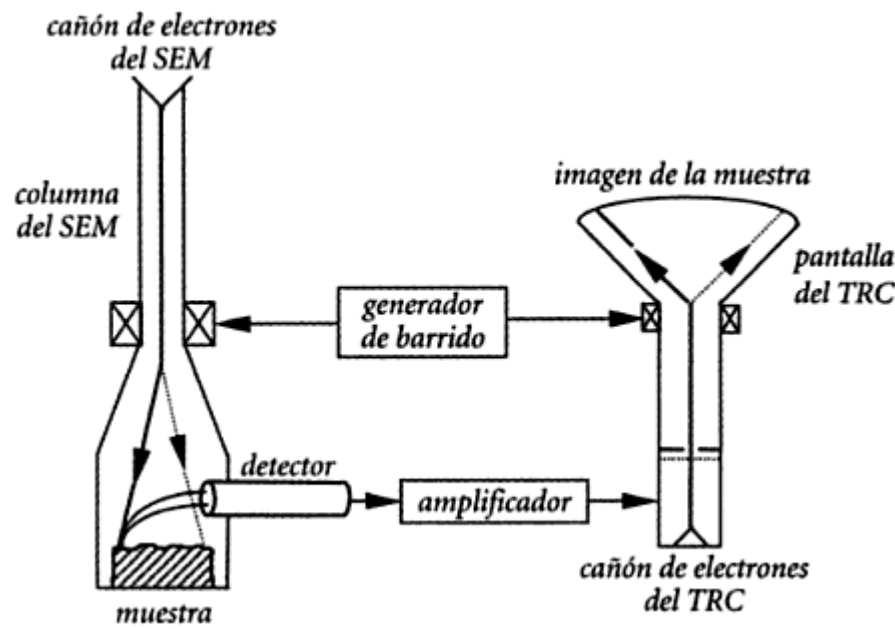


Figura 2.7. Componentes Básicos del SEM

Fuente: Hernández y Mora.⁷⁵

Los componentes básicos del SEM son (Figura 2.7): Hernández y Mora.⁷⁵

- Cañón de electrones que produce un haz con energía entre 5 KeV y 30 KeV con un diámetro efectivo entre 0.1 μm y 10 μm .
- Lentes electromagnéticas condensadoras que reducen el diámetro del haz, de manera que la superficie de la muestra se tiene un diámetro apropiado al aumento de la imagen.
- Apertura final la cual controla la divergencia del haz incidente en la muestra.
- Una lente objetivo que enfoca el haz en la superficie de la muestra.
- Sistema de barrido, el cual permite la construcción de la imagen en la pantalla TRC por el barrido del haz en la superficie de la muestra.
- Detectores de señales emitidas por la muestra (electrones secundarios, electrones reflejados, rayos X, etc.)
- Tubo de rayos catódicos para la presentación de la imagen.

Las aportaciones de SEM al conocimiento de la biología animal y vegetal así como a muchas otras ciencias han sido muy grandes. Con esta metodología se han podido conocer mucho mejor las superficies de las células y tejidos, las relaciones intercelulares e infinidad de detalles finos de las superficies de plantas y animales. La obtención de imágenes de alta calidad a voltajes de aceleración muy bajos mediante el empleo de lentes compuestas electromagnéticas y electrostáticas, ha capacitado a los investigadores para observar material biológico muy sensible, con haces de electrones acelerados con muy bajo voltaje que no causan daños por radiación.⁷⁷

2.14 Perspectivas Futuras

Actualmente, se encuentra en revaloración el consumo de productos frescos, que brinden a sus consumidores los requerimientos nutricionales necesarios para una buena salud. En este ámbito el consumo de frutas y verduras es uno de los productos más atractivos, encontrándose actualmente en el mercado disposición de frutas tanto frescas enteras listas para consumir, sin embargo tienen una vida útil de 3 a 7 días en anaquel, lo que conlleva a pérdidas económicas por parte de los productores.

La bioconservación es una alternativa al uso actual de diferentes conservantes químicos. Además del aceite esencial de muña y orégano diferentes aceites esenciales de diversas fuentes vegetales han sido estudiados por sus propiedades antimicrobianas y son evaluadas como bioconservantes. Además de recubrimientos o films puede que surjan diferentes formas de aplicación de aceites esenciales como bioconservantes a alimentos frutícolas junto con otras fuentes de aceites esenciales y así tenga un efecto superior para prolongar aún más el tiempo de conservación de estos. Estudios futuros puede que se enfoquen en utilizar el componente químico del aceite esencial que le da la característica de capacidad antimicrobiana para así tener un uso selectivo en los bioconservantes tanto en forma de recubrimiento o films.

Por tanto la puesta en práctica de los métodos que se están desarrollando dará un valor agregado y culminaran por el relanzamiento de productos frescos enteros, y los mínimamente procesados, dando una alternativa más sana y segura tanto al consumidor como al productor.

CAPITULO III

MATERIALES Y METODOS

3.1 Lugar de Ejecución

El proyecto se desarrolló en los laboratorios H-301 Y H-302 de la Universidad Católica de Santa María. Laboratorio de Control calidad H-201, Laboratorio de Química Orgánica F-302 y laboratorio de microbiología de la escuela profesional de industrias alimentarias de la Universidad Nacional de San Agustín. En los meses de Setiembre del 2012 a Julio del 2013.

3.2 Materiales

A. Materiales Biológicos

- *muña (Satureja boliviana)*
- *orégano (Oryganum x majoricum)*
- *durazno (prunus pérsica)*
- *Carica papaya* (papaya)

B. Materiales de laboratorio

- Bagueta

- Botellas de 50 ml con rociador
- Bureta graduadas de 10, 20 ml
- Cámara de New Bauer
- Fiolas de 5, 10, 50 y 250 ml
- Frascos de color caramelo con tapa rosca y tapón de 10 ml
- Láminas Porta y Cubre objetos
- Micropipetas automáticas 10, 100 y 1000 ul.
- Peras de decantación
- Peróxido de Hidrógeno
- Picnómetro 10 ml
- Picnómetro de 10 ml
- Pipetas graduadas de 1, 2, 5 y 10 ml
- Placas Petri 10 x 45 mm
- Placas Petri 15mm x 90 mm
- Probetas de 10, 50 , 100 y 1000 ml
- Termómetro 0 -100°c
- Tubos de ensayo de 10, 15 y 20 ml
- Vasos de precipitados 50, 100 y 500 ml

C. Reactivos

- Alcohol etílico 96% (Diproquim)
- Aceite de inmersión (Q.P.Merck)
- Agar Citrato de Simmons (Q.P. Merck)
- Alcohol acetona (Q.P.Merck)
- Agar Cetrimide (Q.P. Merck)
- Agar Chapman (Q.P. Merck)
- Agar McConkey (Q.P. Merck)
- Agar saburoad (Q.P. Merck)
- Agar verde Brillante (Q.P. Merck)
- Agua destilada
- Peróxido de Hidrogeno

- Discos de eritromicina (Oxoid)
- Indol (Reactivo de Kovacks)
- Biftalato de potasio
- Caldo peptonado ((Q.P. Merck)
- Gelatina (Fisher)
- Formaldehido 25%
- Goma arábica (grado alimenticio, MAS VENTAS)
- Hidróxido de Sodio (Diproquim)
- Hidroxido de Potasio (Diproquim)
- Tween 20, (Thomas Baker)
- N-hexano (G.C. Merck)
- Agar TSI (Q.P. Merck)
- Agar LIA (Q.P. Merck)
- Agar Manitol salado (Q.P. Merck)
- Cristal violeta (Q.P. Merck)
- Safranina (Q.P. Merck)
- Medio Sim (Q.P. Merck)
- Caldo Nutritivo (Q.P. Merck)
- Lugol (Q.P. Merck)
- Medio MRVP (Q.P. Fisher)
- Sulfato de Sodio anhidro (Q.P. Merck)

D. Equipos

- Agitador orbital J.P SELECTA ROTATERM
- Balanza de precisión (BL6 Sartorius, EEUU)
- Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas GCMS-QP2010
ULTRA SHIMADZU
- Equipo de extracción por arrastre de vapor
- Equipo de Liofilización FREEZONE 2.5 L.
- Estufa de secado J.P. SELECTA CONTERM

- Horno microondas SAMSUNG
- Incubadora J.P. Selecta
- Licuadora OSTER
- Microscópio Óptico CARL ZEISS PRIMOSTAR
- Microscopio de Barrido electrónico SEM XL20 Philips con microanalizador EDAX DX41
- pH metro de mesa HANNA 2210
- Refractómetro ABBE digital, OPTIC IVYMEN SISTEM
- Refrigeradora

E. Otros

- Papel filtro lento
- Perforadores
- Asa de Kohl
- Papel de Aluminio
- Algodón
- Gasa estéril
- Bisturí
- Campos estériles
- Asa de digrasky
- Materiales de escritorio

3.3 Métodos

3.3.1. Extracción y caracterización de los Aceites Esenciales De Satureja boliviana (muña) Y *Oryganum x majoricum* (orégano)

A. Recolección de material vegetal

- Para la extracción de los aceites esenciales, se procedió primero con la obtención del material vegetal, en mercado local, determinando su procedencia y especie.
- Se dejó secar a la sombra y temperatura ambiente, las plantas se encontraban unidas en pequeños grupos de un grosor similar a fin de permitir un secado homogéneo, y se colgaron con las hojas hacia abajo.
- Para determinar la humedad se pesaron 10 g de materia prima y se dejó en la estufa para su secado a 90 ± 5 °C por una hora, finalmente se volvió a pesar y determino el % de humedad con la siguiente fórmula:

$$\% H = \frac{wp}{wo} * 100\% \quad (3.1)$$

Dónde:

%H: porcentaje de humedad

Wp: peso perdido por la muestra (g)

Wo: peso inicial de la muestra (g)

B. Extracción del aceite esencial

- **Método:** Destilación por arrastre de vapor
- **Procedimiento:**
 - Una vez que se obtuvo el material vegetal seco, se procedió a separar hojas de tallo manualmente, las hojas desprendidas se trituran en mortero para buscar una mayor Área de contacto con el vapor.

- Con el material vegetal preparado, se procedió a cargar el equipo, el que consiste de un calderín, una torre de destilación y condensador, se llenó en una bolsa de tela porosa las hojas secas y trituradas. Las hojas se colocan en la torre de destilación y se cierra herméticamente a fin de evitar fugas de vapor.
- El equipo cuenta con un tablero de control para arrancar el calentamiento del agua, dicho calentamiento se da por medio de una resistencia en contacto directo con el agua del calderín. Por lo que después de haber llenado el calderín con agua hasta el nivel máximo permitido, se cierran las llaves de ingreso, y se procede al calentamiento del agua hasta alcanzar temperatura de ebullición y generarse el vapor alcanzando una presión de 1.2 bar.
- Se abre la llave de paso para permitir que el vapor llegue a la torre de destilación y entre en contacto con el material vegetal, el vapor pasa entonces a la columna de condensación a la que ha estado circulando previamente agua fría en contracorriente.
- El producto condensado se recolecto en botellas de 4 litros de boca estrecha relacionada al diámetro del cuerpo de la botella, esta característica permitió una mejor recolección del aceite esencial dado que por las diferencias de densidad este quedaba en la parte superior y al llenarse la botella quedara el aceite en la boca.
- El aceite recolectado, paso por una segunda separación ayudándonos de peras de decantación, en las que se depositó y dejo reposar por el lapso de tres días.
- Finalmente se puso en contacto con sulfato de sodio anhidro a fin de eliminar las gotas de agua que quedaron.
- El rendimiento cuantitativo se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$R = \frac{V}{m} * 100\% \quad (3.2)$$

Dónde:

- R: Rendimiento
- V: Volumen de aceite obtenido (ml)
- m: masa de materia vegetal seca (g)

C. Caracterización física de los aceites esenciales

C.1 Determinación del índice de refracción

- Se calibro el refractómetro con agua destilada, cuyo valor debe ser de 1.33 a 20°C.
- Con ayuda de una pipeta pasteur nueva, se colocó una gota del aceite esencial a evaluar en el prisma del refractómetro y se cierra de forma que no se creen burbujas.
- Con ayuda de las perillas de compensación se movieron los campos visuales a fin de que se observe una separación adecuadamente definida del campo oscuro y claro sobre la línea de intersección de la X que se observa al fondo.
- Se procedió a la lectura del índice de refracción y de la temperatura dada por el equipo.
- Finalmente se determina el índice de refracción con ajuste por temperatura con la siguiente ecuación:

$$n_d^t = n_d^{t'} + 0.0004x(t' - 20^\circ C) \quad (3.3)$$

C.2. Determinación de la densidad por picnómetro

- El picnómetro limpio y seco se pesó en balanza analítica.
- Se procedió a llenar con el aceite cuidando que el contenido que pudiese rebalsar del capilar se limpie adecuadamente para evitar lecturas erróneas.
- Se tomó el peso del picnómetro lleno.
- La densidad es la relación de la masa por unidad de volumen, por lo que se expresaron los resultados usando la ecuación:

$$\rho = \frac{M2 - M1}{V} \left(\frac{g}{mL} \right) \quad (3.4)$$

Dónde:

M2: Masa del picnómetro lleno (g)

M1: Masa del picnómetro vacío (g)

V: Volumen del picnómetro (mL)

D. Caracterización Química por Cromatografía de gases con detección por espectroscopia de Masas

- **Fundamento:** Es la combinación de dos técnicas, la de cromatografía de gases, que permite la separación de una mezcla de componentes previamente volatilizados entre una fase móvil, la que es un gas inerte, y una fase estacionaria, que es una capa de polímero empaquetado en la columna capilar⁶⁷. El soluto más rápido es el primero en eluir de la columna ingresa en el detector generándose una señal electrónica que es detectada y se generan un cromatograma.⁸⁵ Una vez separados los componentes del analito este va al espectrómetro donde las moléculas son ionizadas y luego colectadas por campos magnéticos, la velocidad de los iones dependerá de la masa generándose así el espectro y la identificación inequívoca de los componentes del analito.⁸⁴
- **Procedimiento:** Una vez obtenido los aceites esenciales libres de agua, se determinó su composición mediante cromatografía de gases con detector de Masas GCMS-QP2010 ULTRA SHIMADZU del laboratorio de control de calidad de la UCSM.
 - Las muestras fueron disueltas en hexano grado GC en una relación de 10 mg / 10 ml.
 - El cromatógrafo se equipó con una columna capilar RTX-5MS (30 m x 0.25 mm DI x 0.25 um espesor del film) , 1ul de la muestra se inyectó por medio del autoinyector AOC Shimadzu en modo *splitless*
 - Se usó como carrier el gas Helio con flujo de 1mL/min, dado que es uno de los gases que da menos interferencias.
 - Las condiciones de inyección se fijaron en 250°C, y temperatura del detector de 300°C. La temperatura de columna se fijó en 40°C. la cual fue calentada por 10 minutos. aumentó 30°C por minuto hasta llegar a 140°C, y por ultimo 10 °C por minuto hasta llegar a 240 °C una vez ahí se mantuvo por 10 minutos.

- El espectrómetro de masas se operó en modo de Impacto electrónico (EI, 70eV)
- Para la denominación de los compuesto se realizó una búsqueda en la librería electrónica de NIST (National Institute of Standards and technology). NIST/EPA/NIH MASS SPECTRAL LIBRARY.

3.3.2. Formulación de emulsiones y elaboración de microcápsulas a partir de los aceites esenciales puros extraídos y de 3 mezclas de concentraciones variadas.

Para la formulación de emulsiones y elaboración de microcápsulas, inicialmente se desarrollaron tres mezclas base a partir de los aceites esenciales puros, cuya composición se muestra en la Tabla 3.1 Se procedió a envasarlos en recipientes de vidrio color caramelo previamente esterilizados.

Tabla 3.1. Formulación de las mezclas básicas

Mezcla	Aceite (% v/v)	
	muña	orégano
1	25	75
2	75	25
3	50	50

Fuente: Elaboración propia

A. Formulación de las emulsiones

- Se preparó 250 ml de solución Tween 20 al 10% v/v, para lo cual medimos en probeta graduada 25 ml de Tween 20 y se diluyo en fiola de 250 ml.
- Se dispusieron 5 frascos con tapa dispensadora tipo spray, y cebaron con la solución Tween 20 al 10% preparada.
- Se dispuso 50 ml de solución Tween 20 al 10% en cada uno de los frascos, y con ayuda de una pipeta graduada se retiro 2.5 ml de la solución.
- A los dos primeros frascos se añadió 2.5ml del aceite esencial puro por frasco; a los tres siguientes 2.5 ml de mezcla por frasco.

- Los frascos se rotularon y agitaron vigorosamente durante 10 minutos cada uno dando lugar a la emulsión del aceite y se guardaron en refrigeración hasta su uso.

B. Elaboración de microcápsulas

- **Método:** Coacervación compleja
- **Procedimiento:** La técnica descrita a continuación se usó tanto para los ensayos previos en los que se determinó la concentración de las soluciones de los polímeros encapsulantes, así como para realizar las microencapsulaciones de los aceites esenciales puros y sus mezclas. La técnica, según Alvim⁷⁰ y Vahapzadeh⁸⁶, con modificaciones fue la siguiente.
 - a. Se preparó 100 ml de solución de goma arábiga y 100 ml de solución de gelatina, y se llevó a una temperatura de 40°C, por calentamiento en microondas.
 - b. Se mezcló la solución de gelatina con un volumen V del aceite esencial bajo agitación por 2 minutos a 1000 rpm, manteniendo la temperatura de 40°C, con ayuda del Hotshaker, las condiciones de agitación y temperatura se mantuvieron en adelante hasta el paso f.
 - c. Se agregó la solución de goma arábiga previamente calentada a 40°C, sobre la mezcla anterior.
 - d. La emulsión tuvo lugar mediante agitación en caliente durante 30 minutos a 1000 rpm.
 - e. Se llevó el pH a 4 ± 0.5 añadiendo unas gotas de ácido acético glacial continuando con la agitación por 1 hora.
 - f. Se procedió a un segundo cambio de pH ajustándolo hasta 9 ± 0.5 , esta vez con unas gotas de solución de NaOH 1N.
 - g. Se procedió a enfriar la emulsión obtenida bajo agitación a temperatura ambiente, quitando la calefacción del hotshaker y agregando 300 ml de agua desionizada.

- h. Todo el sistema se llevó a un baño de hielo y se agregó 1.5 ml de Formaldehido 30%, como agente reticulante, cuando el sistema alcanzo los 15°C. y manteniendo en agitación a 10°C por 8 horas.
- i. Una vez que se lograron formar las microcápsulas se procedió a su separación, se decantó el sobrenadante y se concentró mediante centrifugación hasta reducir el volumen final a la décima parte, guardándose así en frascos oscuros debidamente rotulados y en refrigeración a 10°C.
- j. El porcentaje de rendimiento en peso se determina mediante la ecuación 3:

$$R = \frac{Wc}{Wp + Wac} \times 100\% \quad (3.5)$$

Dónde:

- Wc: peso de coacervato obtenido
- Wp: peso de la goma arábica más peso de la gelatina
- Wac: peso del aceite

B.1. Determinación de las concentraciones de goma arábica, gelatina y aceite para la microencapsulación.

Para determinar las concentraciones de las soluciones de gelatina y goma arábica a usar en la microencapsulación de los aceites esenciales, se hizo una prueba en vacío, es decir se prepararon soluciones con concentraciones distintas y se procedió a la técnica de coacervación por cambios de pH sin incluir el compuesto a encapsular a fin de observar su comportamiento. Las soluciones preparadas fueron del 2.5 y 5 % p/v. y se ensayaron tres combinaciones, la primera trabajando con ambas soluciones al 2.5%, la segunda con solución de goma arábica al 2.5% y solución de gelatina al 5%, y la tercera combinación de solución de goma arábica al 5% y solución de gelatina al 2.5%; en estos ensayos se usó como volumen base de aceite vegetal 3 ml.

A partir de los resultados de la prueba anterior se tomó la combinación de soluciones con mejor rendimiento y características de separación y se usó para determinar el volumen de aceite esencial a ser encapsulado, ensayándose dos volúmenes, 1 y 2 ml, usándose para estas pruebas los aceites esenciales puros de orégano y muña. Para esta evaluación se consideró el porcentaje de rendimiento y aspecto al microscopio óptico.

B.2. Microencapsulación de aceites esenciales puros y en mezcla

Una vez establecidas las concentraciones de las soluciones de goma arábiga y de gelatina, así como el volumen de aceite esencial a usar en la técnica descrita en este apartado se procedió a la microencapsulación de los aceites esenciales y de las mezclas con la técnica como se describió al inicio

a) Observación de las microcápsulas en microscopio óptico

Durante el proceso de microencapsulación se fueron tomando muestras a fin de observar el desarrollo de la coacervación y formación de las microcápsulas.

- Se tomo una alícuota con pipeta pasteur nueva.
- Colocamos la alícuota en el portaobjetos y encima de la muestra el cubreobjetos
- Se llevo a microscopio óptico acercando el condensador a la platina y bajando la intensidad de la iluminación, sin filtro para mejorar el contraste.
- En algunos casos es necesario dejar reposar la muestra unos minutos para observar mejor.

b) Observación de las microcápsulas por microscopía electrónica de barrido.

Finalmente las microcápsulas concentradas, se llevaron a liofilización a fin de tenerlas secas y permitir así la visualización de las estructuras obtenidas por microscopía electrónica de barrido.

Liofilización:

- Las microcápsulas se colocaron en frascos propios del equipo de liofilización y se llevaron a congelamiento -20°C por 24 – 36 horas.
- Con las muestras completamente congeladas, los frascos se colocaron en el equipo ayudado de las anillas a presión
- Se enciende la bomba de vacío bajando a una presión de 0.133 mbar y temperatura del condensador de -40°C permitiendo así la sublimación del agua y posterior desorción del agua ligada. El tiempo de operación del equipo en estas condiciones fue de 3 días.

Observación por microscopía electrónica de barrido

Luego de la liofilización las muestras se llevaron al centro de Microscopía electrónica de la UNSA, en donde se realizó la preparación de las muestras para ser observadas en el Microscopio Electrónico de barrido modelo SEM XL20 Philips, el que se encuentra equipado con Detector de Electrones retrodispersados y microanalizador EDAX DX41.

- las muestras fueron descompactadas por fricción en mortero
- Se recubrieron la superficie con partículas de oro por “sputtering”
- La muestra recubierta se coloca en el microscopio y se toman las imágenes necesarias por medio del software con el que esta equipado.

3.3.3. Aislamiento de los microorganismos asociados al deterioro vegetal de *Prunus pérsica* (durazno) y *Carica papaya* (papaya).

- **Procedimiento:**
 - Se obtuvo muestras de *Prunus pérsica* (durazno) y *Carica papaya* (papaya) de los mercados locales, las muestras se tomaron asépticamente y se colocaron en recipientes estériles.
 - Ambas frutas se pelaron a fin de separar las cáscaras, que es donde se alojan los microorganismos responsables del deterioro vegetal.
 - Un gramo de cáscara se diluye en 10 ml de caldo nutritivo y una gota y se agita vigorosamente para permitir el desprendimiento de los microorganismos.
 - Con ayuda del asa de kohl, se sembró por el método de agotamiento por estría en los medios de cultivo diferenciales siguientes:
 - Agar Sabouraud con cloranfenicol, para aislar levaduras.
 - Agar EMB, para aislar bacilos y enterobacterias gram negativas,
 - Agar cetrimide, para aislar pseudomonas.

- Agar Manitol salado, para aislar staphilococcus y micrococcus
 - Agar SS para salmonella o shiguella
 - Agar PDA con oxitetraciclina, para mohos.
- Todas las placas fueron incubadas a 37°C por 24 horas. Con excepción de los medios PDA que se incubaron durante 7 días a temperatura ambiente, guardándolas los 3 primeros días en oscuridad.
 - Las colonias de bacterias con características diferentes entre sí, se aislaron por repicado y se observaron bajo tinción de gram.
 - Se realizaron pruebas de confirmación por el método IMVIC, y los medios bioquímicos TSI, LIA, citrato para gram negativos; prueba de catalasa y coagulasa, crecimiento en manitol y resistencia a eritromicina, para gram positivos. Y evaluación de características microscópicas tanto para levaduras como para hongos.

3.3.4. Evaluación de la capacidad antimicrobiana de las emulsiones y microcápsulas elaboradas en cultivos “*in vitro*” frente a la flora microbiana representativa de *Carica papaya* y *Prunus pérsica*.

A. Determinación de la tasa de crecimiento del consorcio microbiano en presencia de aceites esenciales y sus mezclas

- **Método:** Determinación de la curva de letalidad bacteriana con modificaciones
- **Procedimiento:**
 - Se obtuvieron muestras de las frutas, se peló y pesó 1 g de cáscara, se colocó en un matraz 10 ml de caldo peptonado se incubó por 24 horas a temperatura ambiente hasta obtener una turbidez equivalente a la escala 1 de Mc Farland correspondiente a 3.0×10^8 ufc/ml.
 - Se diluyó a la tercera parte colocando 5ml de cultivo con 10 ml de caldo de peptonado para obtener una concentración de 1.0×10^8 ufc/ml.
 - Se practicó una segunda dilución colocando 1 ml de esta dilución en un matraz de 100 ml con caldo peptonado obteniendo una concentración de 1.0×10^6 ufc/ml. Con esta dilución se prepararon 6 tubos, los 5 primeros constituidos por 9,45 ml de inóculo y

0,55 ml de mezcla, y un sexto tubo como blanco llevando 9,45 ml de inóculo y 0,55 de sol. De TWEEN 20 al 10%. Se realizó conteo en cámara de New Bauer de los microorganismos totales iniciales.

- Se realizó un seguimiento del crecimiento, haciendo el conteo a las 4, 8, 12, 24 y 48, en la que se tomó alícuotas por duplicado de cada tubo y se sembraron 100 ul por profundidad en agar nutritivo, realizando el conteo de colonias a las 24 horas, practicando diluciones de ser necesario. A partir de los datos obtenidos se construyó curvas de crecimiento y determino la tasa de crecimiento como un indicador de la actividad de las mezclas sobre el consorcio en estudio.
- Se obtuvieron las curvas de crecimiento y a partir de estos datos mediante la ecuación de crecimiento exponencial se obtuvo la tasa de crecimiento de cada uno de los microorganismos partiendo de la ecuación de crecimiento exponencial:

$$\circ N = N_0 e^{kt} \quad (3.6)$$

Donde: N: concentración en el tiempo (ufc/ml)

No: Concentración inicial

t: Tiempo (h)

k: tasa de crecimiento medio

- Con los datos de las curvas de calibración procedimos a la determinación de la tasa de crecimiento por el método analítico

$$N = N_0 e^{kt}$$

- Aplicando logaritmo

$$\ln(N) - \ln(N_0) = kt \quad (a)$$

- A partir de la ecuación (a) despejamos K

○

$$\circ k = \frac{\ln(N) - \ln(N_0)}{t} \quad (3.7)$$

- Hallamos la relación del k de las mezclas o los aceites respecto al grupo control

$$R = \frac{k_i}{k_{control}} \quad (3.8)$$

Ki: valor absoluto tasa de crecimiento h⁻¹, de la mezcla o aceite esencial puro

K control: tasa de crecimiento h⁻¹ del grupo control.

- **Evaluación de actividad antimicrobiana in vitro por el método de Difusión en Agar.**
- **Procedimiento:**
 - Se prepararon suspensiones de los microorganismos a la concentración de 1×10^9 ufc/ml, en el caso de hongos se contabilizó esporas.
 - Un mililitro de esta suspensión se colocó en el fondo de las placas Petri y se agregó 15 mililitros de medio de cultivo APOX (Medio Agar Papa Oxitetraciclina) para el cultivo de los mohos y levaduras o Mueller Hinton para bacterias.
 - Luego de gelificar los medios se dispuso 5 discos de papel filtro por placa, estos fueron previamente esterilizados y sumergidos en las soluciones de microcapsulas y de las emulsiones 24 horas antes.
 - Se dejó crecer y evaluamos los halos de inhibición formados se evaluaron a las 24 horas para bacterias y levaduras mientras que el tiempo de evaluación fue de 3 días para hongos
 - Para la preparación del medio APOX ⁸⁷se pelaron 80 gramos de papa blanca, se cortaron y depositaron en un recipiente conteniendo 250 mL de agua destilada, se llevó a ebullición por 10 min. Posteriormente, la mezcla se filtró y la solución resultante fue completada hasta 250 mL, con agua destilada. La solución resultante fue mezclada con 2.5 g de Agar y 2.5 g de sacarosa. Esta solución se esterilizo a 120 °C x 15 min. Paralelamente se preparó 100 mL de una solución de Oxitetraciclina al 0.1%. Se mezcló ambas soluciones 250 mL + 30 mL de solución oxitetraciclina, para obtener el Medio Agar Papa Oxitetraciclina (APOX).

3.3.5. Evaluación de la capacidad bioconservante “in vivo” de las mezclas sobre durazno fresco entero como emulsión

El diseño experimental para la evaluación de la aplicación de las emulsiones se recoge en la Tabla 3.2.

- **Procedimiento:**

- Se tomaron grupos de dos duraznos por cada mezcla y se colocó en bases de tecnopor, a cada uno se aplicó una dosis de las mezclas una y dos veces al día, hasta observar síntomas de deterioro vegetal.
- Un Blanco fue llevado a cabo con solución de tween 20 al 10% en las mismas condiciones y finalmente un control que solo se guardó como los demás. Todos los grupos formados, se colocaron en un lugar fresco expuesto a condiciones ambientales.
- La aplicación de cada una de las mezclas formadas en spray se realizó de tal forma que cubra la superficie del durazno desde una distancia de 10 cm. El diseño se desarrolló por duplicado.

A. Evaluación Organoléptica

Se desarrolló tomando en cuenta color, y textura al inicio y al final de la aplicación de los tratamientos.

- la **escala de textura:** (1) Completamente liso, (2) Liso,(3) Semi liso ,(4) Rugoso, (5) Completamente rugoso.
- la **Escala de Color:** (1) Color característico, (2) Leves manchas pardas, (3) Completamente pardo

Tabla 3.2. Diseño Experimental Para La Aplicación De Las Emulsiones

<i>TRATAMIENTO</i>	<i>MEZCLA</i>	<i># APLICACIÓN DE EMULSIÓN AL DÍA</i>
1	M1	1
2	M2	1
3	M3	1
4	OREGANO	1
5	MUÑA	1
Blanco	Sol Tween 20 al 10%	1
6	M1	2
7	M2	2
8	M3	2
9	ORÉGANO	2
10	MUÑA	2
Blanco	Sol Tween 20 al 10%	2
Control		0

Fuente: Elaboración propia

A. Evaluación fisicoquímica

- a. **% Acidez Total:** Para la determinación de los valores iniciales se tomó 3 muestras representativas de durazno y se cortaron en trozos hasta obtener 10g, se licuó con 100 ml y se tomó 1ml de jugo, se diluyó con 9ml de agua destilada en un vaso precipitado de 50ml. Se agregó 3 gotas de solución de fenolftaleína al 1%, esta solución se tituló con Hidróxido de Sodio 0,1 N, hasta que obtuvo un color rosa grosella. Se obtuvo el gasto de la base y se calculó el grado de ácido cítrico con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ ácido cítrico} = \frac{\text{ml gastados} \times \text{meq de ácido cítrico} \times \text{normalidad de NaOH}}{\text{gr de muestra}} \times 100\% \quad (3.9)$$

- b. Para aplicar la ecuación considerar que el contenido de ácido cítrico de 1 ml de muestra para la titulación viene de 0.1 g de muestra
- c. **pH:** Para la determinación de los valores iniciales se tomaran 3 muestras representativas de durazno y se cortaran en trozos hasta obtener 10 g, se licuarón con 100 ml de agua destilada, eliminando partículas en suspensión tras dejar en reposo para que el líquido decante, luego se introdujo los electrodos del potenciómetro, en el vaso con la muestra.
- d. **°Brix:** El jugo obtenido para la determinación de pH se filtró y de este filtrado se midió el ° Brix. La misma técnica se aplicó para cada una de las muestras luego del tratamiento.
- e. **Índice de Madurez:** Se aplicó una relación simple entre acidez (g/ml), y porcentaje de sólidos solubles disueltos es decir, °Brix.
- f. **Recuento de Mohos y/o Bacterias.** Para recuento de hongos y bacterias se tomó 1gr de muestra de fruta a evaluar y se diluyo en 10 ml de caldo de soya previamente esterilizado, se incubo por 2 horas y se realizaron diluciones

seriadas de 10^{-1} , 10^{-2} , y 10^{-3} , se tomó 0.1 ml de estas diluciones y se puso en placas Petri pequeñas, a las que se añadió 15 ml del medio APOX a 45°C, para recuento de mohos y agar nutritivo para recuento de bacterias, se dejó enfriar hasta solidificar, se cuidó de mezclar bien antes de su solidificación y seco las tapas de las placas para evitar humedad.

Para el conteo de mohos se incubó a 25°C durante 3 a 5 días, aunque se lleva a cabo la evaluación de crecimiento de micelio aéreo desde los 3 días, se cuentan aquellas placas en el que el número de colonias sea entre 0 y 300 y se multiplica por el factor de dilución de la placa, el volumen madre y así se obtuvo la cantidad de UFC (unidades formadoras de colonias) por gramo de alimento. Para el conteo de bacterias se incubó a 37°C durante 24 horas y se procedió al recuento de igual manera que los mohos.

3.3.6. Evaluación de la capacidad bioconservante “*in vivo*” de las mezclas sobre papaya como microcápsulas

El diseño experimental para la evaluación de la aplicación de las emulsiones se recoge en la Tabla 3.3

- **Procedimiento:**
 - se elaboró la mezcla para un recubrimiento comestible que contenía 6% de pectina, 5% de Gelatina, 5% Aceite microencapsulado y 84% de agua destilada, todo en %p/p
 - Se realizó la mezcla de todos los componentes en caliente a 50°C en baño María, mezclando por 15 min con ayuda de un mixer, después se dejó la mezcla a temperatura ambiente por 20 min hasta llegar a 18 °C.
 - Para la aplicación de los recubrimientos se obtuvo 2 kg de papaya a la cual se peló y cortó en trozos de 2 cm de lado aproximadamente, todos los utensilios a utilizar se incorporaron la noche anterior en solución de hipoclorito de sodio al 1.5%,
 - Una vez obtenidos los trozos, se separaron en porciones de 10 y fueron bañadas completamente con las mezclas de recubrimiento comestible, se dejó secar y se colocaron en un táperes desechables traslúcidos.

- Se envaso y guardó a la temperatura deseada, en refrigeración a 10°C y en una cámara cerrada a fin de aislar de los cambios externos bruscos a 20°C, moviendo las unidades experimentales una vez al día para lograr una distribución de factores como temperatura e incidencia de luz igual en todos los tratamientos

Tabla 3.3. Diseño experimental para evaluación de papaya troceada

Tratamiento	Concentración de micro capsulas (%) en recubrimiento					Temperatura
	M1	M2	M3	orégano	muña	
1	1					10
2	5					10
3	1					20
4	5					20
5		1				10
6		5				10
7		1				20
8		5				20
9			1			10
10			5			10
11			1			20
12			5			20
13				1		10
14				5		10
15				1		20
16				5		20
17					1	10
18					5	10
19					1	20
20					5	20
Blanco 1						10
Blanco 2					con recubrimiento	20
Control						10
Control					sin recubrimiento	20

Fuente: elaboración propia

Las evaluaciones fisicoquímicas y organolépticas desarrolladas fueron las mismas que en las aplicaciones de emulsiones sobre durazno.

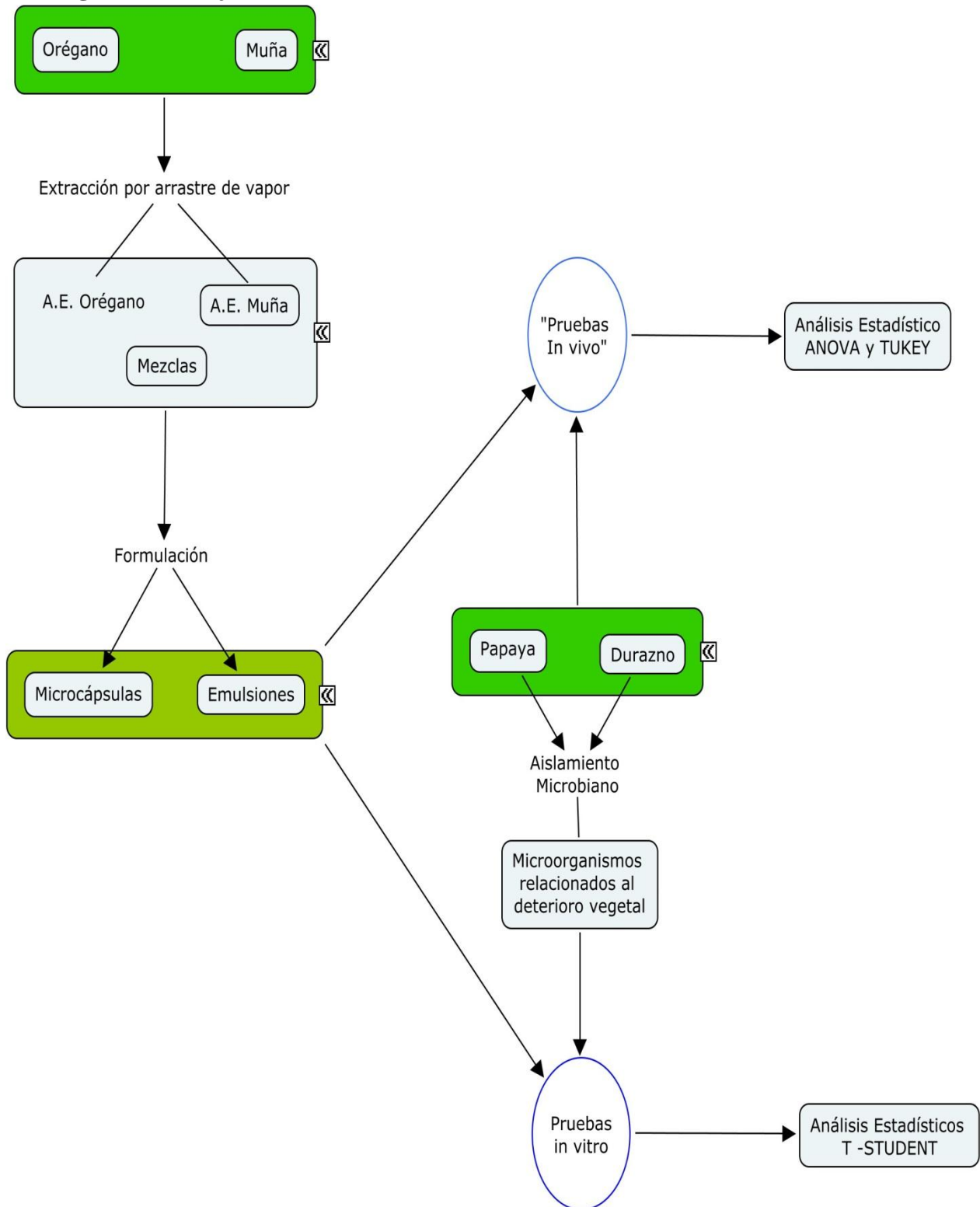
3.3.7. Análisis estadístico de los datos.

Para el tratamiento ordenamiento de los datos se utilizaron los programas Microsoft Excell 2010 , Sigma Plot versión 12 y los análisis estadísticos se desarrollaron en MINITAB V 17.0

Para los análisis “in vitro” se calcularon las tasas de crecimiento medio así como los diámetros de halos de inhibición y se expresaron en relación a la media \pm IC hallado con un nivel de confianza expresado en la leyenda de cada una de las tablas resumen. Basado en una distribución t-student, analizando gráficamente las medias encontradas, usando para el caso de los halos de inhibición una calificación por categoría según se expresó en la metodología.

Los análisis “in vivo” fueron en el siguiente orden primero un análisis factorial a fin de determinar cuál de los factores implicados en cada uno de los diseños experimentales presenta influencia sobre cada una de las variables respuesta, luego se procedió a analizar con mayor profundidad como varían las respuestas según los niveles del factor con influencia mediante un ANOVA de una vía para las estudios en *Prunus pérsica* (durazno) y análisis de dos factores anidados en los que se incluye el grupo control para *Carica papaya* (papaya). Finalmente se realizaron análisis post-hoc de Tukey al 95 % de confianza.

3.4 Diagrama de Flujo



CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Extracción y caracterización de los Aceites Esenciales De *Satureja boliviana* (muña) Y *Oryganum x majoricum* (orégano)

A. Recolección de material vegetal

Se obtuvieron muña, *Satureja boliviana sub. Rusby*, de la localidad de Urubamba – Cuzco y orégano, *Oryganum x majoricum Camb forma laxa*, de la localidad de Moquegua, (15 kg de cada una de las especies) caracterizándolos así a través del Herbarium HUSA de la Universidad Nacional de San Agustín. (El certificado se puede ver en ANEXO 1).

Ambas muestras vegetales se dejaron secando a temperatura ambiente ($18\pm 2^{\circ}\text{C}$), siendo el tiempo de secado para la muña de 5 días y de orégano de 3 días, debido a que este último se adquirió con humedades bajas.

El porcentaje de humedad (base húmeda) logrado después del secado de ambas muestras por duplicado, de acuerdo al método descrito utilizando la ecuación N° 3.1, muña presentó $7.6 \pm 3.181\%$ de humedad, mientras que orégano presentó $7.7 \pm 3.935\%$ de humedad de donde el rango de humedad alcanzado por el orégano presenta mayor amplitud al de muña.

B. Extracción de aceites esenciales

Siguiendo el método descrito en 3.3.1 apartado B, se procedió a la extracción de los aceites esenciales. Se obtuvo un aproximado de 4 litros de agua floral condensada por vez que se cargó el equipo en una botella de vidrio, se dejó reposar y se tomó el líquido de la parte superior que contenía el aceite esencial y agua.



Figura 4.1 Equipo usado para la extracción de aceites esenciales

Se determinó el rendimiento cuantitativo por gramo de materia seca usando la ecuación 3.2, los resultados obtenidos en este ensayo y en otras investigaciones se muestran en la Tabla 4.1

El rendimiento de aceites esenciales de orégano corrobora lo obtenido por Dambolena⁸⁸. Mientras que Viturro⁵⁰ reporta un rendimiento de 0.57% v/p en base a materia vegetal fresca extraído por Hidrodestilación en equipo Clevenger. En general estos dos rendimientos son mayores que los rendimientos obtenidos de otras plantas aromáticas y se encuentran dentro de los rangos reportados.

Tabla 4.1. Rendimientos en la extracción de aceite esencial

<i>Aceite esencial</i>	<i>Rendimiento (%v/p)</i>	
	Practico	reportado
muña	1.818 ± 0.038*	1.20 – 2.20**
orégano	2.244 ± 0.044	1.83 [†] -3.89 [‡] 0.60 -1.80 [§]

Fuente: Elaboración propia

*IC, calculado al 95% de confianza=2 y $\alpha=0.05$ para una prueba de t-student.

**Rango de rendimientos para especies de Lamiáceas rango inferior para *Myntostachis mollis* y rango superior para *Satureja boliviana*⁵¹

† Rendimiento para *O. vulgare*⁸⁸

‡ Rendimiento reportado para *O. majoricum*⁸⁸

§ Rango de rendimiento para *O. majoricum*⁸⁹

C. Caracterización física de los aceites esenciales

La Tabla 4.2 resume las características físicas de los aceites esenciales obtenidos.

Tabla 4.2. Características físicas de los aceites esenciales.

<i>Aceite</i>	<i>Densidad</i>	<i>Índice de refracción (20°C)</i>
muña	0.895 ± 0.038	1.395±0.041
orégano	0.848 ± 0.044	1.460±0.025

Fuente: Elaboración propia

IC, calculado al 95%, n=2; $\alpha=0.05$. Para una prueba de t-student

Literatura reporta un índice de refracción 1.45 y densidad de 0.923 a 20°C para *Oryganum vulgare*⁵⁴, mientras que para *Myntostachis mollis*⁹⁰ los valores reportados fueron de 0.9189 g/ml a 25°C e índice de refracción 1.4720 a 20°C. Las densidades son menores a las reportadas, dado que el método usado para la determinación de las mismas no consideró correcciones por temperatura lo que afecta al resultado.

D. Caracterización Química por GC-MS

La composición cualitativa y cuantitativa de los aceites esenciales estudiados se obtuvo directamente del análisis realizado en el GC-MS, bajo las condiciones descritas en los métodos (3.3.1, acápite D)

D.1. Cromatografía de gases para el aceite esencial de orégano

La Tabla 4.3 muestra los componentes del aceite esencial de *Oryganum x majoricum*, donde los compuesto con mayor porcentaje son 4-terpineol y α -terpineno dos monoterpenos monocíclicos, el carvacrol (monoterpeno) se encuentra en un 9.17%, compuesto que le da el olor característico del orégano.

Tabla 4.3. Composición del aceite esencial de orégano *O. majoricum*

# Pico ¹	Tiempo de retención (min)	Area % ²	Compuesto
1	9.9	2.890	(+)-Sabineno
2	10.141	2.690	β -mirceno
3	10.479	1.690	α -felandreno
4	10.669	8.810	(+)-4-careno
5	10.792	9.400	β -Cimeno
6	10.91	7.270	β -felandreno
7	11.328	16.610	α -Terpineno
8	11.716	3.210	(+)-4-careno
9	11.847	2.110	Linalol
10	11.942	2.740	4-Tujanol (Hidrato de Sabineno)
11	13.052	17.570	(-)-4-Terpineol
12	13.185	2.780	α -Terpinol
13	13.515	1.440	Timol metil eter
14	13.637	2.750	Isotimol metil eter
15	13.7	4.290	Linalil Antranilato
16	14.201	9.170	Carvacrol
17	15.781	3.370	Cariofileno
18	17.261	1.200	Espatulenol

Fuente: Elaboración propia

1. Es el número que corresponde al orden de aparición del pico en el cromatograma
2. Este porcentaje de Área corresponde al porcentaje del compuesto en el aceite

El cromatograma (Figura 4.2) y las estructuras químicas (Tabla 4.4) de los componentes del aceite esencial de orégano se muestran a continuación.

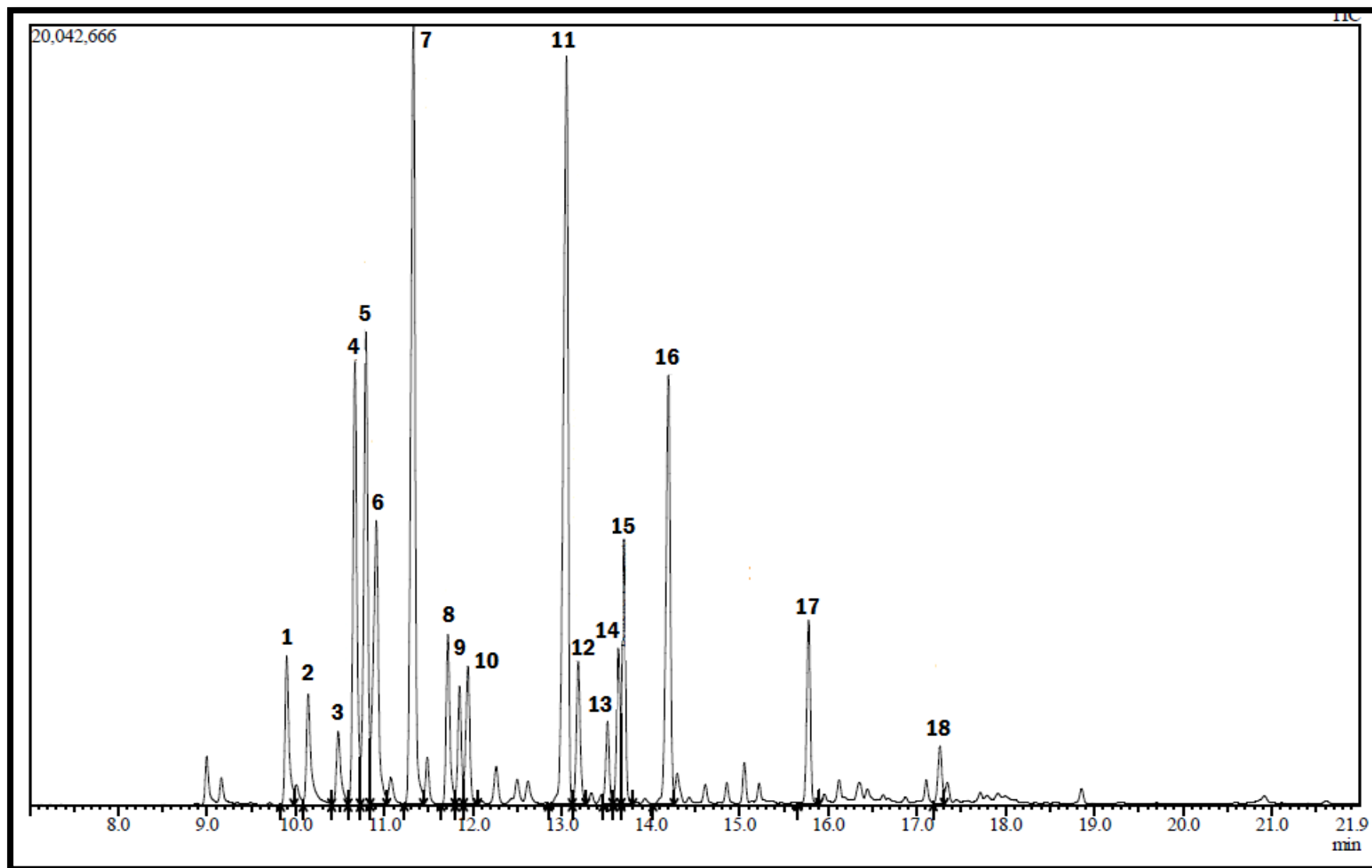


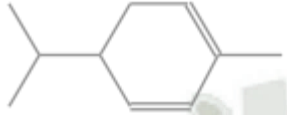

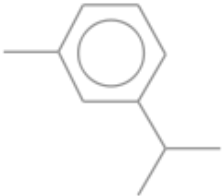



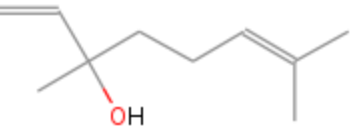


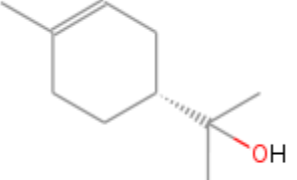
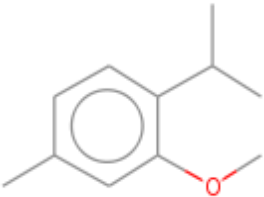
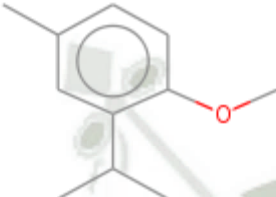
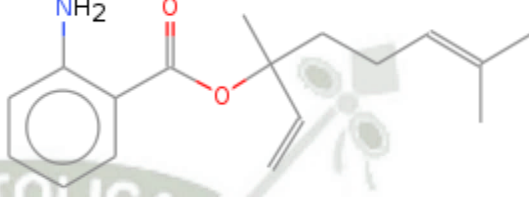
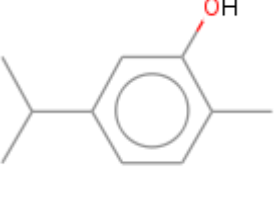
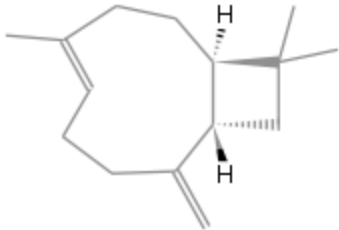
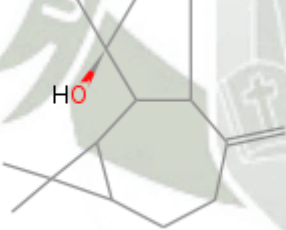
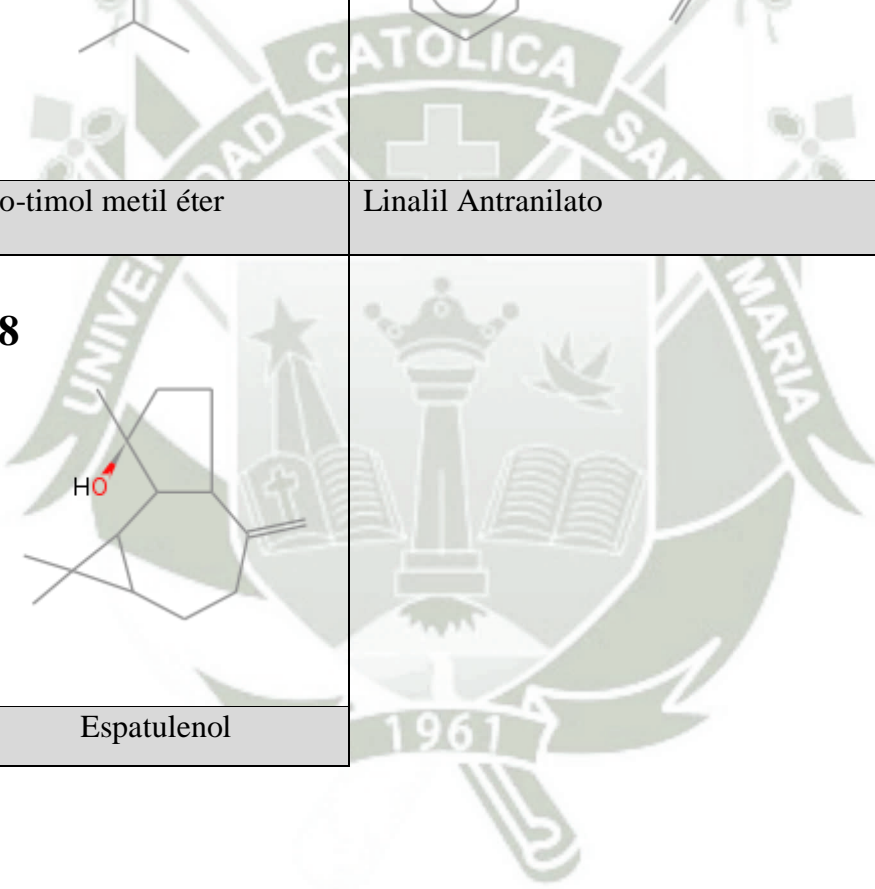


Figura 4.2 Cromatograma del aceite esencial de *Oryganum x majoricum* (orégano). La numeración de cada pico corresponde los diferentes componentes del aceite, la identificación y estructura de cada compuesto se aprecia en la Tabla 4.4

Tabla 4.4. Estructuras químicas de los componentes del aceite esencial de *Oryganum x majoricum* (orégano)

<p>1</p> 	<p>2</p> 	<p>3</p> 	<p>4</p> 
<p>(+)-Sabineno</p>	<p>β-Mirceno</p>	<p>α-Felandreno</p>	<p>(+)-4-Careno</p>
<p>5</p> 	<p>6</p> 	<p>7</p> 	<p>8</p> 
<p>β-Cimeno</p>	<p>β-Felandreno</p>	<p>α-Terpineno</p>	<p>(+)-4-Careno</p>
<p>9</p> 	<p>10</p> 	<p>11</p> 	<p>12</p> 
<p>Linalol</p>	<p>4-Tujanol (Hidrato de Sabineno)</p>	<p>(-)-4-Terpineol</p>	<p>α-Terpinol</p>

<p>13</p> 	<p>14</p> 	<p>15</p> 	<p>16</p> 
<p>Timol metil éter</p>	<p>Iso-timol metil éter</p>	<p>Linalil Antranilato</p>	<p>Carvacrol</p>
<p>17</p> 	<p>18</p> 		
<p>Cariofileno</p>	<p>Espatulenol</p>		

Si bien los componentes encontrados son los esperados, la composición varía de aquella dada en revisiones previas, en las que hidratos de sabineno son las más abundantes hasta con un 50%⁸⁸ La falta de este compuesto según se explica en la información recabada por Lis⁹¹ donde el principal quimiotipo de los aceites esenciales de *Oryganum majorana* son los alcoholes monoterpénicos hidrato de cis-sabineno, hidrato de trans-sabineno y acetato del hidrato de cis-sabineno, , pero dado que estos hidratos presentan inestabilidades generan un arreglo durante la destilación formando los compuestos terpiene-4-ol, α -terpineol y α - y γ -terpineno. Se revisaron los puntos de ebullición de los compuestos los que incrementan en orden de acuerdo a la aparición, entendiendo que 4-careno fue identificado como tal dos veces en la cromatografía debiendo ser uno la conformación trans y el otro conformación cis, que define dos puntos de ebullición diferentes y por tanto aparición en dos picos separados.

D.2 Cromatografía de gases para el aceite esencial de muña

La Tabla 4.5 muestra la composición porcentual obtenida del aceite esencial de *Satureja boliviana*. En la composición encontramos 7 compuestos, siendo los más abundantes, pulegona y p-Mentan-3-ona,

Tabla 4.5. Composición porcentual del aceite de *Satureja boliviana*

# Pico ¹	Tiempo de retención (min)	Area(%) ²	
1	10.005	0.48	β -Pineno-(1S)-(-)
2	10.234	1.12	Etil-amilcarbinol
3	11.845	4.55	β -Linalool
4	12.734	28.04	p-Mentan-3-ona
5	12.851	14.39	p-Mentan-3-ona
6	12.949	1.81	trans-Dihidrocarvona
7	13.788	47.01	Pulegona
8	15.775	2.60	Cariofileno

Fuente: Elaboración propia

1. Es el número que corresponde al orden de aparición del pico en el cromatograma
2. Este porcentaje de Área corresponde al porcentaje del compuesto en el aceite

El cromatograma Figura 4.3 y las estructuras químicas Tabla 4.6 se muestran a continuación.

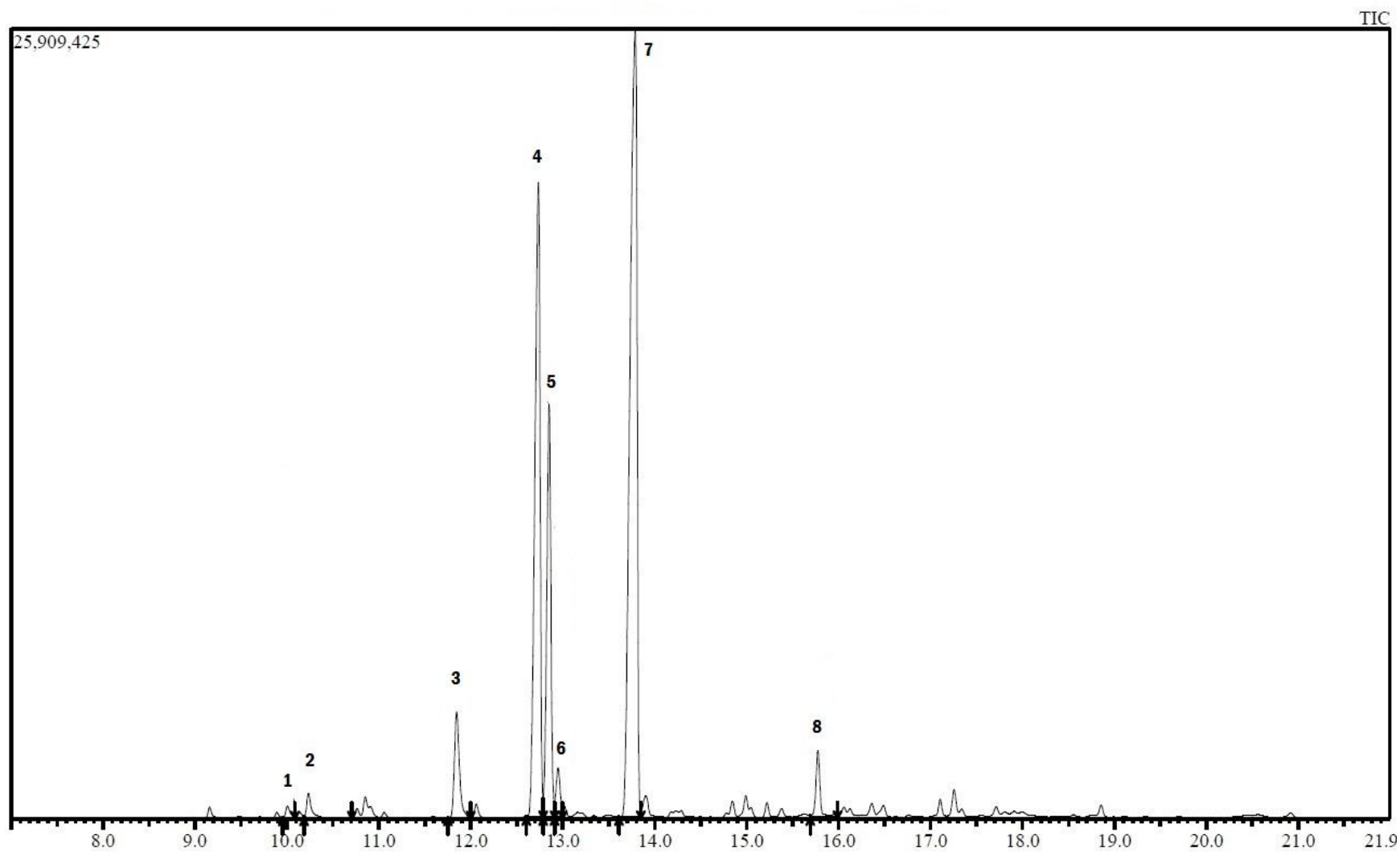

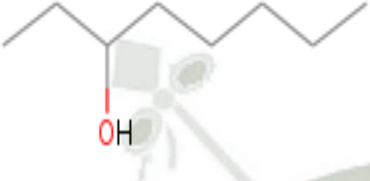
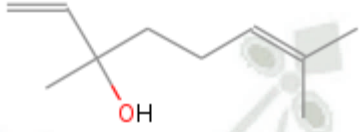
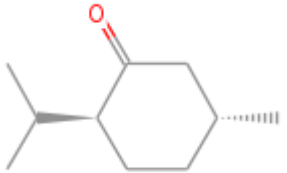
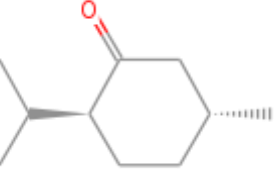
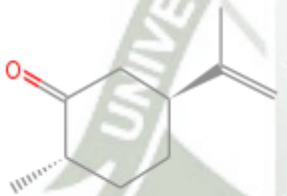
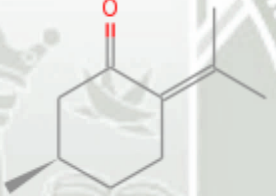
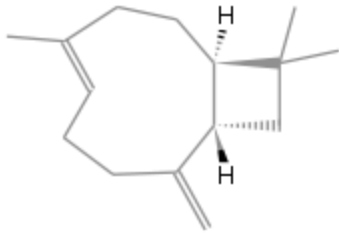


Figura 4.3. Cromatograma del aceite esencial de *Satureja boliviana* (muña) La numeración de cada pico corresponde los diferentes componentes del aceite, la identificación y estructura de cada compuesto se aprecia en la Tabla 4.4

Tabla 4.6. Estructuras químicas de los componentes del aceite esencial de *Satureja boliviana* (muña)

1 	2 	3 	4 
β -Pinoeno-(1S)-(-)	Etil-amilcarbinol	β -Linalool -	p-Mentan-3-ona
5 	6 	7 	8 
p-Mentan-3-ona	trans-Dihidrocarvona	Pulegona	Cariofileno

Figuroa³², describe 15 compuestos aromáticos siendo el más abundante la isomentona con un 33.61%, carvacrol con 11.14% y pulegona con 9.79%. Para nuestras muestras p-Mentan-3-ona un isómero de isomentona en un total de 42.43% y pulegona con 47.01%, ambos compuestos característicos de los aceites esenciales de la familia de las lamiáceas, pero en proporciones diferentes clasificadas al quimiotipo de las cetonas monoterpénicas.

4.2. Formulación de emulsiones y microcápsulas a partir de los aceites esenciales puros extraídos y de 3 mezclas de concentraciones variadas

Una vez obtenidos y caracterizados los aceites esenciales se procedió a la formulación de tres mezclas básicas a partir de estos como se describe en el capítulo 3 Se obtuvo un volumen total de 10 ml por cada mezcla, los que se almacenaron adecuadamente. Según se observa en la Figura 4.4.



Figura 4.4. Aceite esenciales puros y mezclas preparadas a diferentes concentraciones.

A. Formulación de emulsiones

A partir de estas mezclas formuladas rotuladas como M1: mezcla de 25% muña, 75% orégano; M2: mezcla de 25% orégano, 75% muña y M3: Mezcla de 50% muña, 50% orégano. Se elaboraron las emulsiones para su posterior aplicación tal como se estableció en los métodos.

Se obtuvieron 6 frascos tipo dispensador con un volumen total de 50 ml, llevando el rotulo correspondiente, adicionalmente se llamaron M4 al frasco con emulsión de aceite de muña puro Y M5 al frasco con emulsión de aceite de orégano, el sexto frasco contenía 50 ml de solución Tween 20 al 10% para ser usado como blanco.

Para una buena formación de las emulsiones, fue necesario agitar bien los frascos durante 2 días, dejando reposar estos durante unos 3 días, al cabo de los cuales se notó la formación estable de la emulsión, viendo que cada frasco tomó un color blanco lechoso, excepto el frasco rotulado como Blanco que no cambió del color natural ya que tiene la solución de tween 20 al 10% v/v (color amarillo tenue) (Figura 4.5).

Las emulsiones obtenidas son del tipo aceite en agua (o/w), el tween es un polisorbato no iónico hidrófilo, el que presenta un alto poder emulsificante y suspensor, lo que permitió las características obtenidas por las emulsiones.



Figura 4.5. Emulsiones en base a mezclas y aceites puros.

B. Elaboración de las microcápsulas

La Microencapsulación de las mezclas y aceites puros, así como los ensayos previos que fueron necesarios para afinar el procedimiento se desarrolló basándose en el método descrito en el capítulo 3.3.2.

B.1 Determinación de la concentración de soluciones de polímeros

Los ensayos previos a la preparación de las microcápsulas permitieron determinar la concentración de cada una de las soluciones de los polímeros a usar.

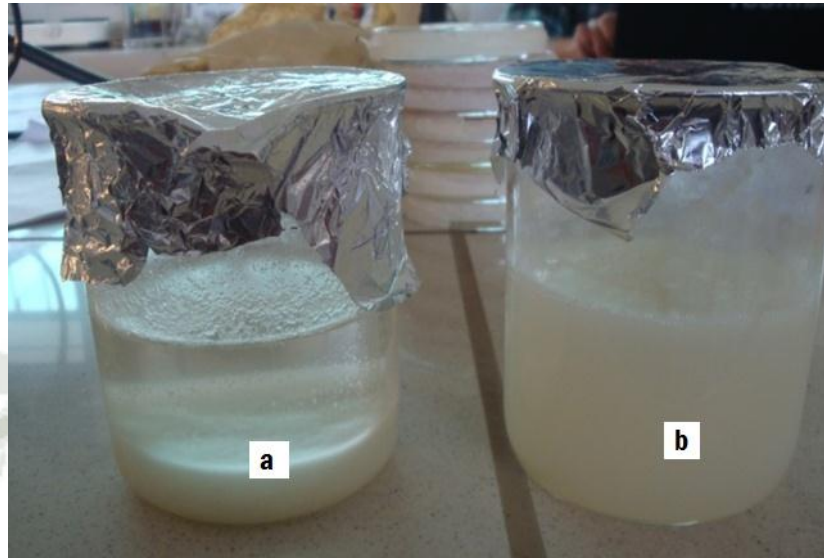


Figura 4.6 Pruebas de microencapsulación a. Soluciones de gelatina y goma arábica al 2.5% b. Solución de gelatina al 2.5% y sol. Goma arábica al 5%

La Tabla 4.7, recoge las observaciones de los ensayos realizados por cada combinación hecha donde la combinación número 1, fue la que permitió mejores condiciones de trabajo.

Tabla 4.7. Combinaciones de polímeros ensayadas para la técnica de microencapsulación

Combinación	Sol. Goma arábica (%p/v)	Sol. Gelatina (%p/v)	OBSERVACIONES
1	2.5	2.5	Formación de dos fases distinguibles capaces de ser separadas por decantación
2	5.0	2.5	Formación de coloidal, incapaz de ser filtrado
3	2.5	5.0	Formación coloidal, con aceite disperso en la superficie

Fuente: Elaboración propia

B.2 Determinación de volumen de aceite esencial a microencapsular

La Tabla 4.8. Rendimientos de microencapsulación de aceite esencial extraído Tabla 4.8, Resume los rendimientos obtenidos al probar dos volúmenes de encapsulación diferentes,

Tabla 4.8. Rendimientos de microencapsulación de aceite esencial extraído

<i>Aceite</i>	<i>Volumen de aceite, ml</i>	<i>Rendimiento (%)</i>	<i>Rendimiento Promedio (%)</i>
muña	1.0	60.89	61.210 ± 2.046*
orégano	1.0	61.54	
muña	2.0	55.80	57.080 ± 8.073
orégano	2.0	58.36	

Fuente: Elaboración propia

*IC, calculado al 90% , n=2; $\alpha=0.05$. Para una prueba de t-welch

Al aplicar la prueba de t-de welch (debido a que las varianzas no son iguales), se obtiene un estadístico $p=0.197$, con lo que se infiere que no existe diferencia estadística entre los rendimientos para volumen todas estas pruebas se realizaron al 90% de confianza. Al no haber diferencia estadística entre estos intervalos se determinó usar 1.5 ml de aceite esencial o de mezcla en la elaboración de microcapsulas.

B.3 Microencapsulación de aceites esenciales puros y en mezclas

Una vez determinadas las concentraciones de las soluciones de gelatina y goma arábiga así como el volumen de aceite a microencapsular, la Tabla 4.9 resume los porcentajes de rendimiento obtenido del proceso de microencapsulacion de cada una de las mezclas y de los aceites.

Tabla 4.9. Rendimientos alcanzados por microencapsulación de los aceites puros y las mezclas realizadas

<i>MICROCAPSULAS</i>	<i>%R</i>
M1: 25% muña, 75% orégano	61.19
M2: 75% muña, 25% orégano	63.86
M3: 50% muña, 50% orégano	62.92
M4: 100 %muña	66.36
M5: 100% orégano	62.15

Fuente: Elaboración propia

Los rendimientos obtenidos en general están alrededor del 60%, resultados obtenidos por Siow⁹³, presentan rendimientos por coacervación compleja de 63.7 ± 2.8 % cuando se usa gelatina del tipo A (gelatina con p.I. ácido); y cuando se usa gelatina tipo B (p.I. básico) se tiene un rendimiento de 61.1 ± 1.3 %, usando relación de goma arábiga - gelatina de 1:1, tal como se ha desarrollado en el presente estudio.

Para determinar el rendimiento fue necesario hallar la humedad de las microcápsulas y con este valor determinar el peso seco (W_c) que se usó en la ecuación 3.5. Las microcápsulas se guardaron en frascos ámbar bajo condiciones de temperaturas ambientales bajas.

a) Descripción de la técnica final de microencapsulación

La técnica con la cual se realizó la microencapsulación de los aceites esenciales y las mezclas siguió los pasos generales descritos en la metodología considerando que las soluciones de los polímeros fueron de 2.5% p/p y el volumen a microencapsular fue de 1.5ml. En lugar de glutaraldehído, como reticulante según sugieren Vahapzadeh⁷⁰ y Alvim⁸⁶ se cambió el reticulante por formaldehído al 37%, debido a que fue más accesible, se tomó en cuenta para su manejo los cuidados necesarios, para lavar este compuesto se añadió el doble del volumen contenido en los vasos de agua destilada, con lo que se logra una mejor separación de las cápsulas, observándose la formación de dos fases a) Una acuosa debido al exceso de agua destilada y b) una orgánica como se muestra en la figura 4.7

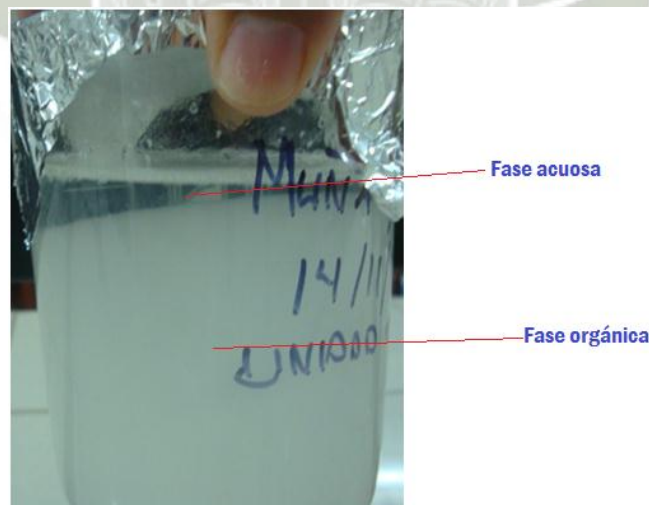


Figura 4.7. Microencapsulación de aceite de muña, se observan dos fases las microcápsulas formadas denominadas gotas de coacervato al fondo del vaso de precipitado, la fase acuosa hacia la superficie.

Finalmente una separación definitiva de las microcápsulas fue lograda mediante centrifugación eliminando el agua sobrenadante por decantación.

b) Observaciones al microscopio óptico durante la microencapsulación

Durante el proceso de microencapsulación se observaron, bajo microscopio óptico, las siguientes etapas:

a) Al inicio del proceso las gotas de aceite se encuentran dispersas en la solución de gelatina, presentando tamaños variables a 100x, en esta etapa se busca la dispersión del aceite en toda la solución, sin embargo aún no se está dando el proceso de coacervación propiamente dicho y la emulsión es inestable.

b) las gotas de aceite emulsionadas distribuidas en toda la solución se ven ahora rodeadas completamente por el material encapsulante, se observa que inicia la coacervación claramente por el cambio de turbidez puesto que la goma arábiga como la gelatina en aquellos puntos en que sus cargas eléctricas son contrarias se están atrayendo;

c) y d) se muestra como una fina capa de coacervado rodean las gotas de aceite, a su vez también se forma en la solución capas finas de coacervado que no presentan aceite en su interior, esta se observan en las imágenes como manchas informes con menor volumen y

e) microcápsulas obtenidas luego de los ajustes de pH que permitieron la coacervación completa y la reticulación de la membrana por acción del formaldehído, una vez separadas del medio de reacción por una operación de decantación y de centrifugación, secas en estufa a 30°C, vistas a 100x, se observan en un color más claro las membranas que se han formado alrededor del aceite encapsulado, presentan formas heterogéneas, no regulares, tamaños variables

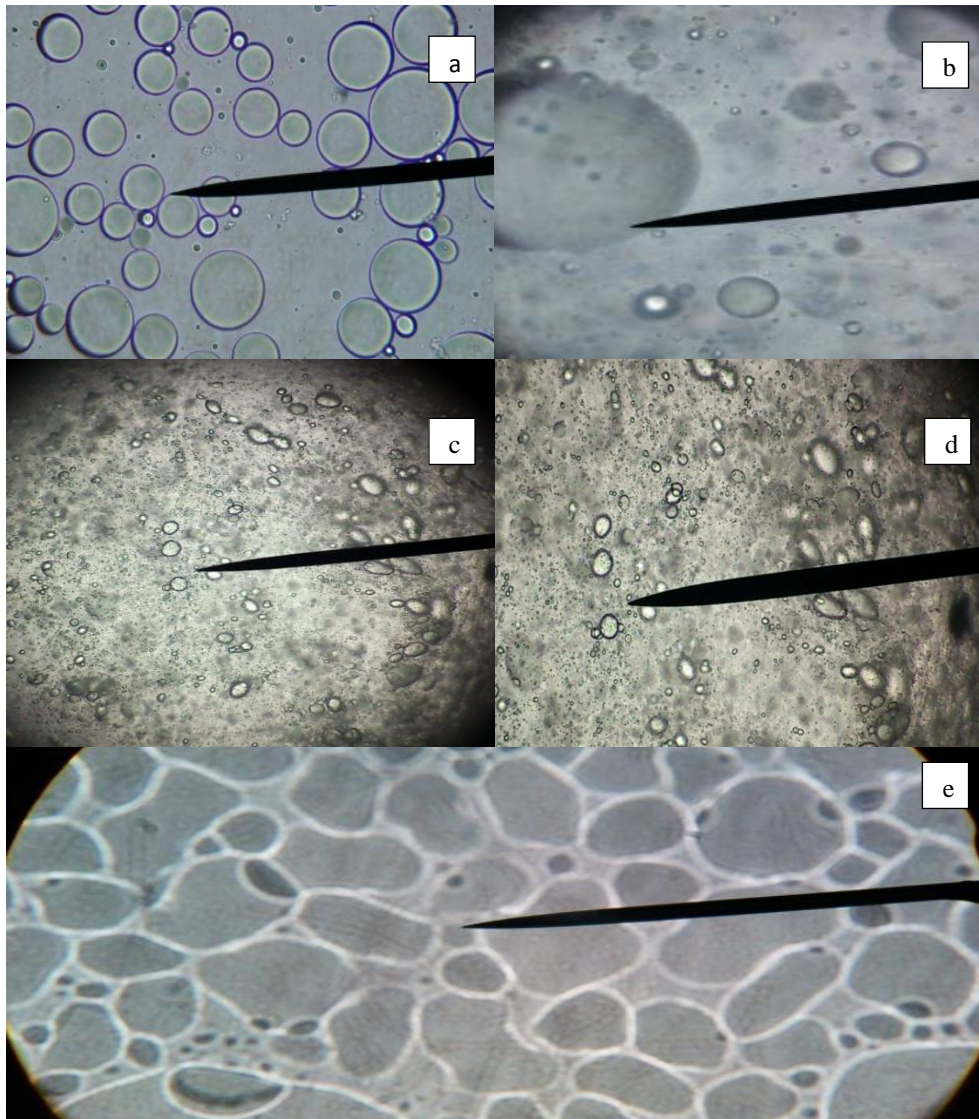


Figura 4.8. Microscopía óptica durante la formación de microcápsulas. a) Dispersión de las gotas de aceite esencial en solución de gelatina 100x b) emulsión de aceite en la solución de polímeros encapsulantes 100x, c) y d) formación de las gotas de coacervato 40x, e) vista de las microcápsulas formadas de tamaños heterogéneos y formas irregulares 100 x, luego ser secadas.

Weinbreck ⁹⁴ demostró que a partir de observaciones microscópicas, las gotas más pequeñas de aceite se encapsularon fácilmente mientras que algunas gotas grandes eran encapsuladas parcialmente e inclusive no llegan a ser encapsuladas. Las cápsulas también se ven diferentes dependiendo del tamaño de las gotas de aceite. Gotas grandes estaban rodeadas individualmente por una delgada capa de coacervato. Dichas observaciones son también compatibles con las hechas en estos ensayos.

c) Observación de las microcápsulas por microscopía de barrido electrónico**Figura 4.9. Apariencia de las microcápsulas después de liofilización**

Las microcápsulas liofilizadas obtienen un color crema característico, desprendiendo olor a los aceites esenciales que contenían, en una intensidad menor a la que es perceptible cuando los tenemos concentrados. La Figura 4.9 muestra las microcápsulas liofilizadas obtenidas de una textura parecida a la del papel.

La Figura 4.10 y Figura 4.11, muestran las imágenes de las microcápsulas al microscopio electrónico de barrido obtenidas a partir de las mezclas y de los aceites esenciales puros de orégano y muña, en todas se observan láminas de coacervado, libre de aceite, que conforma la mayor parte de las estructuras.

Observamos que las estructuras formadas se han fusionado, quedando atrapados gotas de aceite en medio que se ven como protuberancias circulares (figura 4.11, c), los tamaños medios obtenidos son de 6 a 12 μm de diámetro, y en algunos casos también se ven estructuras tipo tubulares (figura 4.10, c), en las que se sugiere puede estar atrapado el aceite esencial o adherido al material a la superficies de los coacervados, las flechas rojas en las imágenes muestran las microcápsulas de aceite. Los tamaños observados son muy variados, siendo para las formas esféricas de 15 a 40 μm de diámetro en las microcápsulas de muña, a su vez son las más abundantes y grandes de las observadas. Los diámetros medios de las otras microcápsulas van de 6 a 20 μm . Las estructuras observadas dan indicios de haber formado según la clasificación de Quispe⁶¹ un núcleo dentro de una red de material encapsulante.

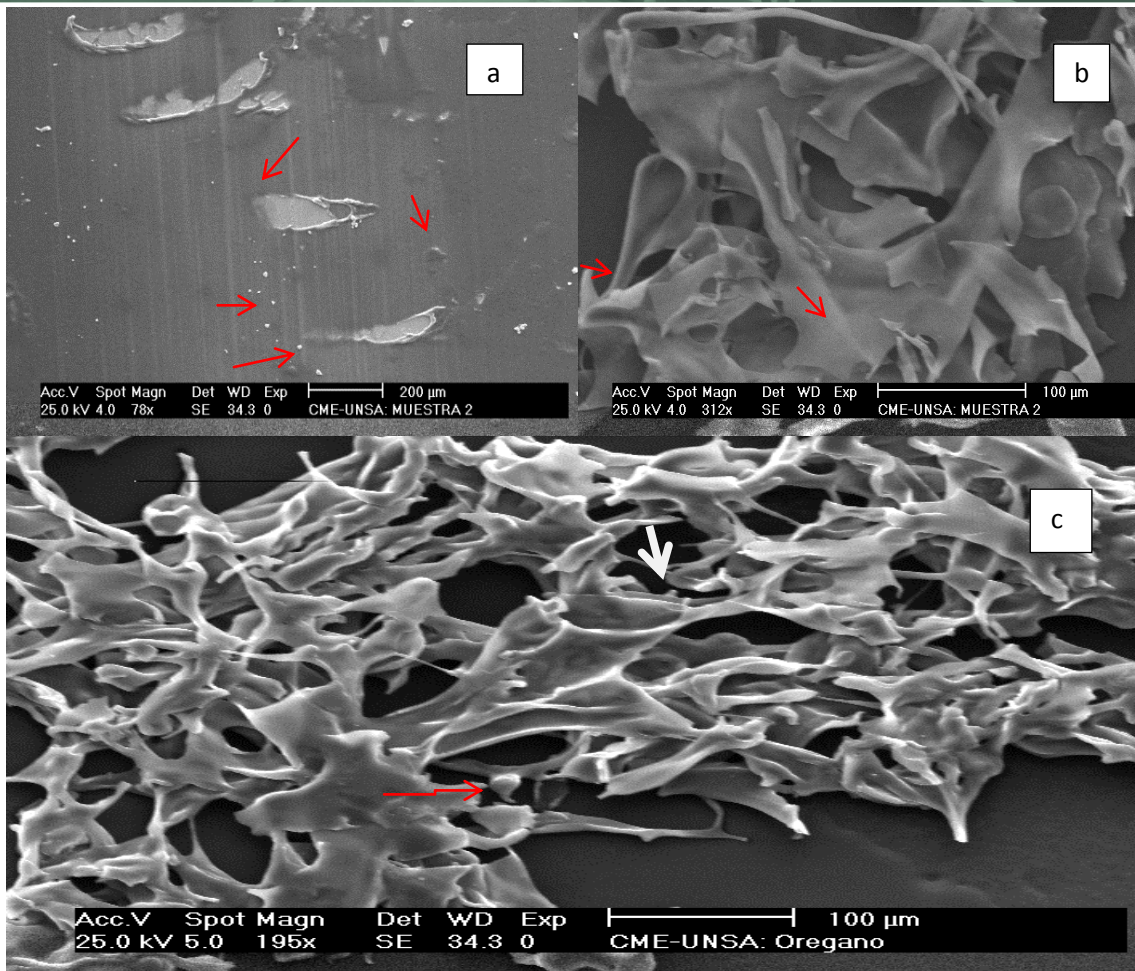


Figura 4.10. Estructura de microcápsulas liofilizadas, Mezcla 2(25% A.E. orégano, 75% A.E. muña).(50% A.E orégano, 50% A.E.muña) a) Aumento 78x, b) Aumento 312x. c) Estructura de microcápsulas liofilizadas, A.E. orégano Aumento 195x.

Durante la elaboración de las microcápsulas se agregó formaldehído como reticulante, buscando que la forma no se pierda, la relación usada fue de 0.244:1 p/p de formaldehído –polímero. Miró⁹⁵ usa como reticulante glutaraldehído en relaciones menores también evaluó las características a diferentes pH, siendo el rango de pH básico el que fomenta un mejor endurecimiento y separación de las microcápsulas. La reticulación por medios enzimáticos o químicos permiten una liberación de los aromas o componentes encapsulados de manera más prolongada⁹⁴.

El uso de formaldehído no resultó en una buena reticulación, dentro de las propiedades del formaldehído es soluble en agua al 40% v/v a 20°C, probablemente durante el proceso de coacervación que se llevó a cabo a 40°C, la reticulación esperada no ha sido fomentada

adecuadamente, adicionalmente tanto Weinbreck ⁹⁴ como Miró ⁹⁵ dejaron 48 horas de reposo para la reticulación, mientras que en la presente investigación solo dejamos como máximo 24 horas de reposo.

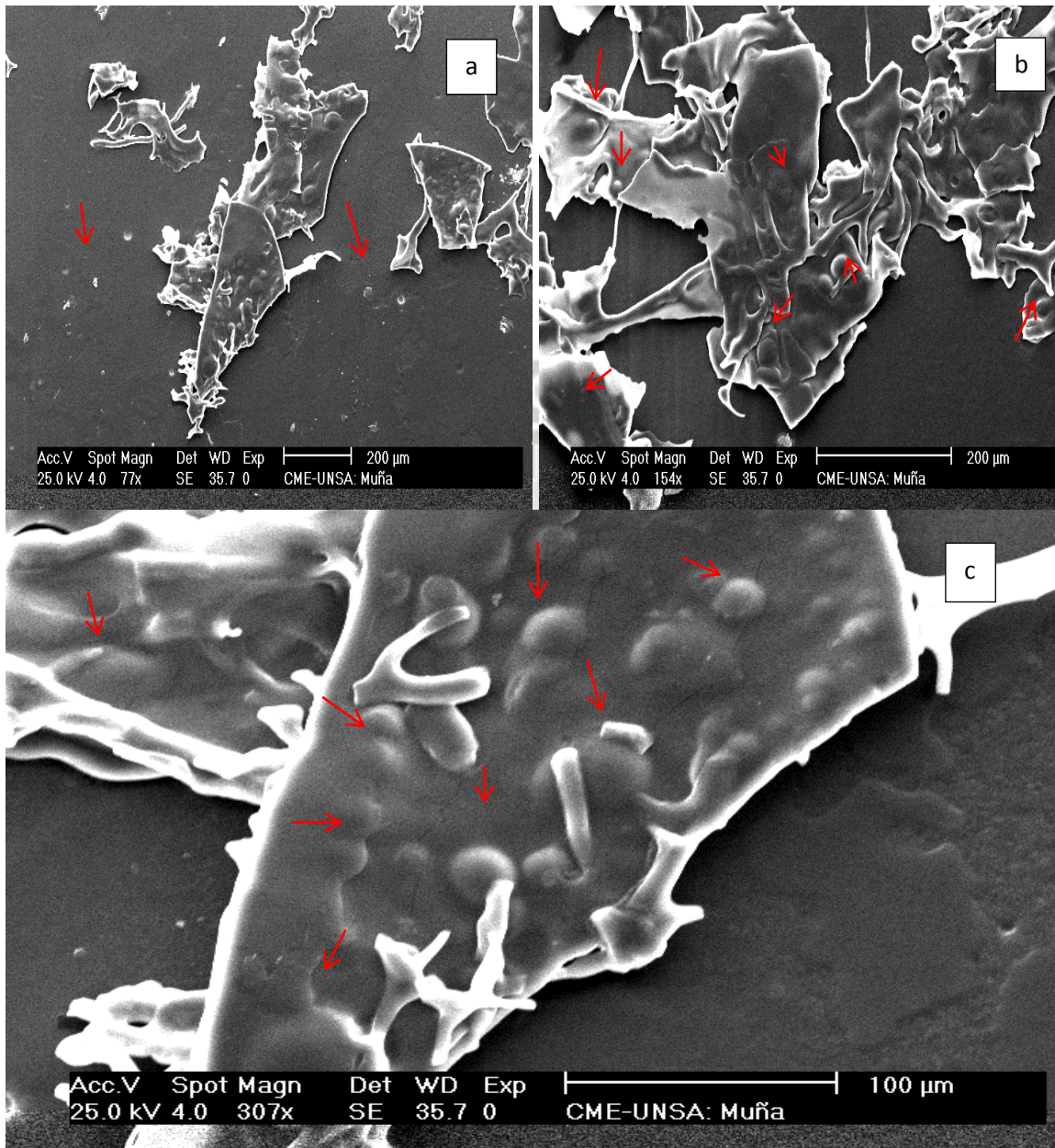


Figura 4.11 Estructura de microcápsulas liofilizadas, A.E. muña. a) Aumento 77x, b) Aumento 154x, c) Aumento 307x

4.3. Aislamiento microorganismos asociados al deterioro vegetal de *Prunus pérsica* y *Carica papaya*

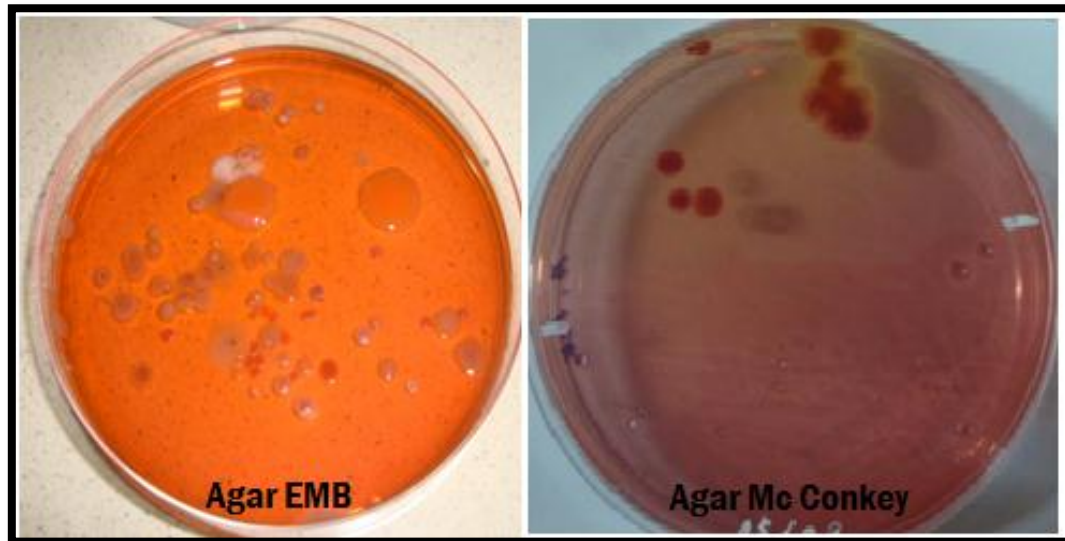


Figura 4.12. Aislamiento de bacterias en medios selectivos.

Se logró la caracterización de la microflora nativa de *Prunus pérsica* (durazno) y *Carica papaya* (papaya), las variedades utilizadas fueron las de mayor abundancia en la estación de Setiembre a Noviembre, siendo la variedad Huayco en cuanto a durazno y la variedad Norteña en cuanto a papaya. Las frutas se consiguieron del mercado central de San Camilo – Arequipa.

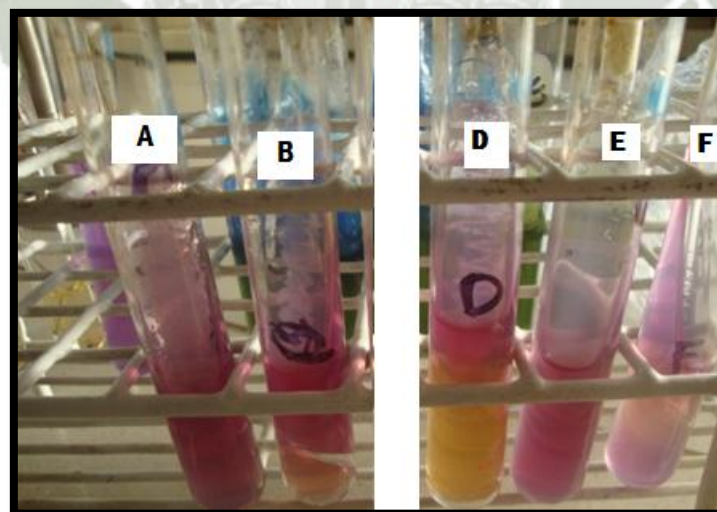


Figura 4.13. Prueba de LIA para caracterización bioquímica de bacterias Gram (-)

Las muestras fueron recolectadas asépticamente para mantener la microflora sin alteraciones, la caracterización se logró utilizando el método descrito en el Capítulo 3. En este método se

contempló el aislamiento de microorganismos aerobios, por ser estos los que mayormente afectan a las frutas.

Se aislaron 7 cepas diferentes de bacterias a partir de los medios de cultivo diferencial, las cepas fueron nombradas de la A a la G, la Tabla 4.10 y la

Tabla 4.11 muestran el resultado de las pruebas bioquímicas realizadas para cada bacteria después de haber sido caracterizadas como Gram (-) ó Gram (+)

Tabla 4.10. Caracterización bioquímica de bacterias Gram (-) aisladas

morfología	TSI	LIA	OF		CS	MR	VP	Mot	H ₂ S	Indol	Microorganismo	Medio de cultivo diferencial
			Ana	Ae.								
A Bacilo	A/A ±	K/K	+	+	+	+	+	+	-	-	Klebsiella sp.	EMB
B Cocobacilo	A/A ±	K/A	+	+	+	+	V	+	-	-	Enterobacter sp.	EMB
D Bacilo	A/A ±	K/A	+	+	+	v	+	+	-	-	Serratia sp	EMB
F Bacilo	K/A -/-	K/A	+	-	-	+	-	-	-	-	Shiguella	Medio SS
E Bacilos	k/k	K/K	-	+	N.A	N.A	NA	+	-	-	Pseudomona	Agar cetrimide

Fuente: Elaboración propia
Mot. : Motilidad

La identificación microbiológica de las bacterias se logró en base a los resultados de las pruebas bioquímicas y el uso de tablas de clasificación usadas para este fin.

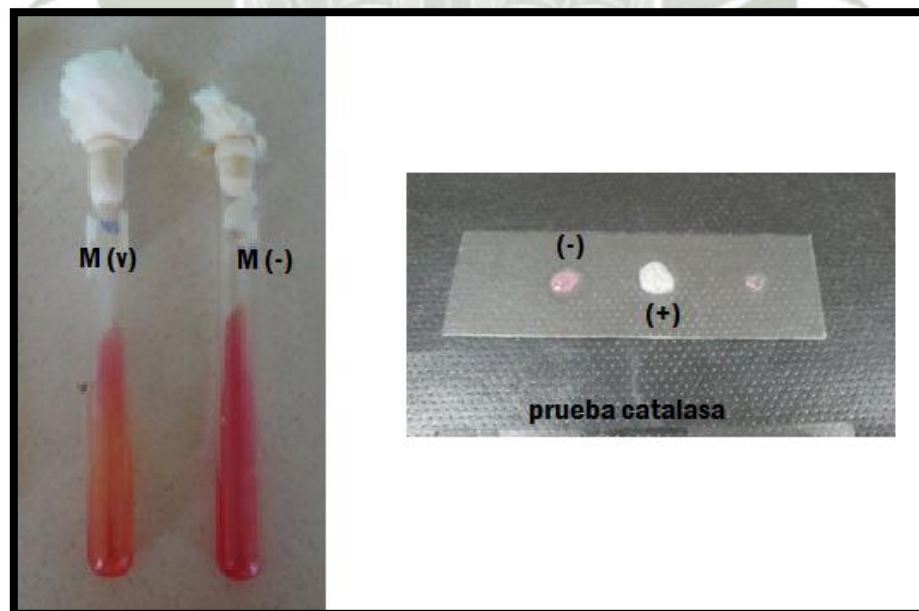


Figura 4.14. Pruebas bioquímicas para bacterias Gram (+)

Tabla 4.11. Caracterización bioquímica de bacterias Gram (+) aisladas

	<i>morfología</i>	<i>Catalasa</i>	<i>Manitol</i>	<i>Eritromicina</i>	<i>Microorganismo</i>	<i>Medio de cultivo diferencial</i>
C	cocos	-	-	Resistente	Streptococcus sp.	Agar Manitol salado
G	tetradas	+	V	Sensible	Micrococcus sp.	Agar Manitol salado

Fuente: Elaboración propia

Se aisló hongos relacionados a la pudrición de los frutos, a partir de tejido que presento contaminación, se puso en caldo nutritivo y diluyó seriadamente hasta 10^{-4} , a partir del cual se sembró las placas Petri con PDA más oxitetraciclina para evitar el crecimiento de bacterias. Al cabo de 5 días se observó 4 colonias distintas en las diferentes placas, se repicó en nuevas placas para obtener cultivos puros y se observaron las características de crecimiento microscópico y macroscópico las que se encuentran descritas en la Tabla 4.12

Tabla 4.12. Características de los hongos aislados

<i>HONGO</i>	<i>Características Macroscópicas</i>	<i>Características Microscópicas</i>
Alternaria alternata	Micelio vegetativo negro Micelio aéreo Negro Crecimiento rápido, 4 días	Dematiaceo, estructuras color marrón con KOH Estructuras en cadenas
Botritis	Miscelio aéreo blanco algodonoso que toma colores marrones oscuros con la madurez del cultivo.	Conidioforos largos, con algunas ramificaciones y conidias juntas con un aspecto de racimos
Aspergillus	Miscelio aéreo blanco, con desarrollo de puntos negros pegados a la placa a partir de los 5 días, reverso de color crema.	Hifas Hialinas, septadas, vesícula central de forma circular, rodeada de esporas.

Fuente: elaboración propia

La Figura 4.15 muestra las características microscópicas observadas para la identificación de hongos

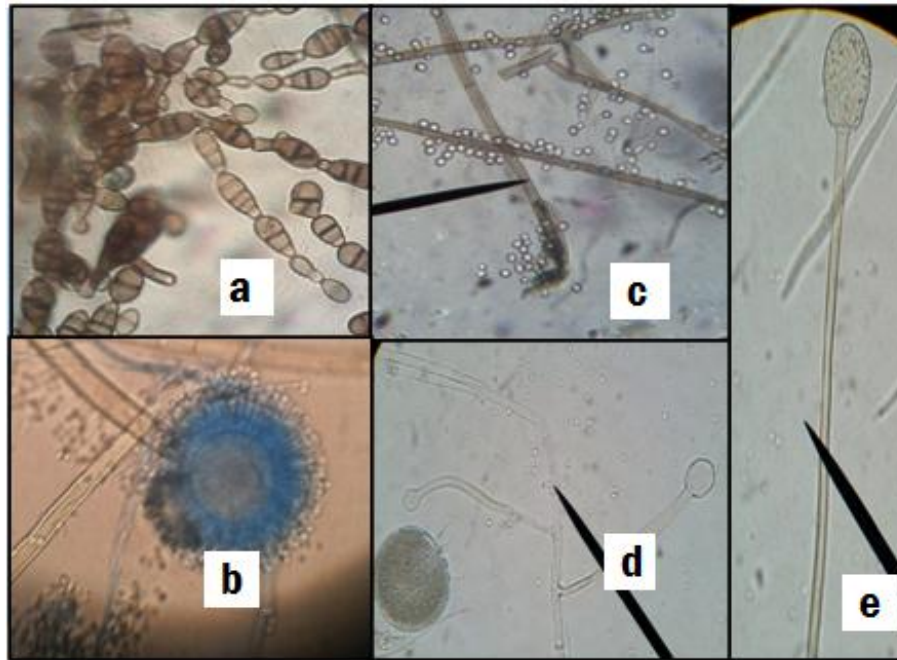


Figura 4.15. Características microscópicas de hongos aislados. a) Microconidias de *Alternaria alternata*, b) Vesícula *Aspergillus Niger* rodeada por métulas y conidios, c) esporangioforos septados de *Mucor* sp. Con esporangiosporas alrededor d) esporangio lleno de esporangiosporas en color oscuro de *Mucor spp.* e) Columnella descubierta de *Mucor spp.*

La Tabla 4.13 recoge en resumen la microflora aislada de *Prunus pérsica* (durazno) así como de *Carica papaya* (papaya)

Tabla 4.13. Bacterias y Mohos aislados de durazno y papaya.

	papaya	durazno
Gram negativos	<i>Klebsiella</i> sp. <i>Shiguella</i> sp. <i>Pseudomona</i> sp.	<i>Klebsiella</i> sp. <i>Enterobacter</i> sp. <i>Serratia</i> sp.
Gram positivos	<i>Streptococcus</i> sp. <i>Micrococcus</i> sp.	<i>Micrococcus</i> sp.
Mohos	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Mucor</i> sp. <i>Aspergillus Niger</i>

Fuente: Elaboración propia

La presencia de Enterobacterias en muestras de alimentos se debe generalmente a contaminación del tipo fecal, debido al manejo inadecuado de los mismos, durante la cadena de producción. Sin embargo la sociedad de fitopatología Americana (APS), por sus siglas en inglés, reconoce a

algunas enterobacterias como causantes de enfermedades fitopatológicas, tales como *Pseudomonas carica-papayae* robbs, *Erwinia* sp. y *Enterobacter cloacae*, esta última causa en las papayas amarillamiento interno dando a la fruta una textura friable⁹⁶, Dentro los hongos que causan enfermedades en el fruto de la papaya se encuentra la *Alternaria alternata*⁹⁷ por lo tanto la presencia en los aislamientos queda adecuadamente justificada. De otra parte *Aspergillus Niger* es responsable de la podredumbre de las frutas maduras conocida como el moho azul, al igual que *Mucor spp.* Que produce la podredumbre de los frutos de durazno de forma lenta, tal como lo nombra la APS.⁹⁶



Figura 4.16. Cultivos de hongos y levaduras en medio Sabouroad

De durazno se aislaron 4 tipos de levaduras diferentes (Figura 4.16) siendo una de ellas idéntica a la única cepa de levadura aislada en papaya. Las cepas no se identificaron con pruebas bioquímicas, pero se observaron sus características macro y micro morfológicas las que se presentan en la Tabla 4.14

Las colonias 1 y 3 son las que presentan mayor crecimiento, ambas procedentes de durazno, la colonia 4 proviene de papaya, siendo la única en este fruto, las características microscópicas de la colonia 1 es muy parecida al género *Sacharomyces*. Sin embargo para asegurar el género y especie, es necesario observar no solo las características de reproducción vegetativa. Sino también las fisiológicas y bioquímicas, siendo estas últimas las que no se estudiaron.

Tabla 4.14. Características macro y microscópicas de las levaduras

<i>Levaduras</i>	<i>Macroscópica</i>	<i>Microscópica</i>
Colonia 1	Color blanco Arrosetada Seca	Vesículas redondas con vesículas de menor tamaño adyacentes.
Colonia 2	Color amarillento Puntiforme Velloidades	Vesículas con membrana exterior gruesa, presenta dos vesículas adyacentes en su interior.
Colonia 3	Blanquesina - cremosa Puntiforme Mucosa Con velloidades	Vesículas grandes agrupadas de 2 o 3 con centro pequeño
Colonia 4	Blancas Puntiforme 1 mm Mucosa	Vesículas circulares achatadas por los costados.

Fuente: Elaboración propia

4.4. Evaluación de la capacidad antimicrobiana de los aceites puros, en mezcla y de las emulsiones y microcápsulas formuladas en cultivos “in vitro” frente a la flora microbiana representativa de *Carica papaya* y *Prunus pérsica*.

A. Evaluación del crecimiento del consorcio microbiano en presencia de aceites esenciales y sus mezclas



Figura 4.17. Aplicación de aceites esenciales sobre flora microbiana de *Prunus pérsica*.

Las mezclas a base de los aceites esenciales de orégano y muña así como los aceites esenciales puros, fueron evaluados para determinar el poder inhibitorio sobre un consorcio de microorganismos obtenido a partir de cascara de papaya y de durazno, con repetición, según lo descrito en los métodos.

A.1) Tasas de crecimiento de consorcio microbiológico en *Prunus pérsica*

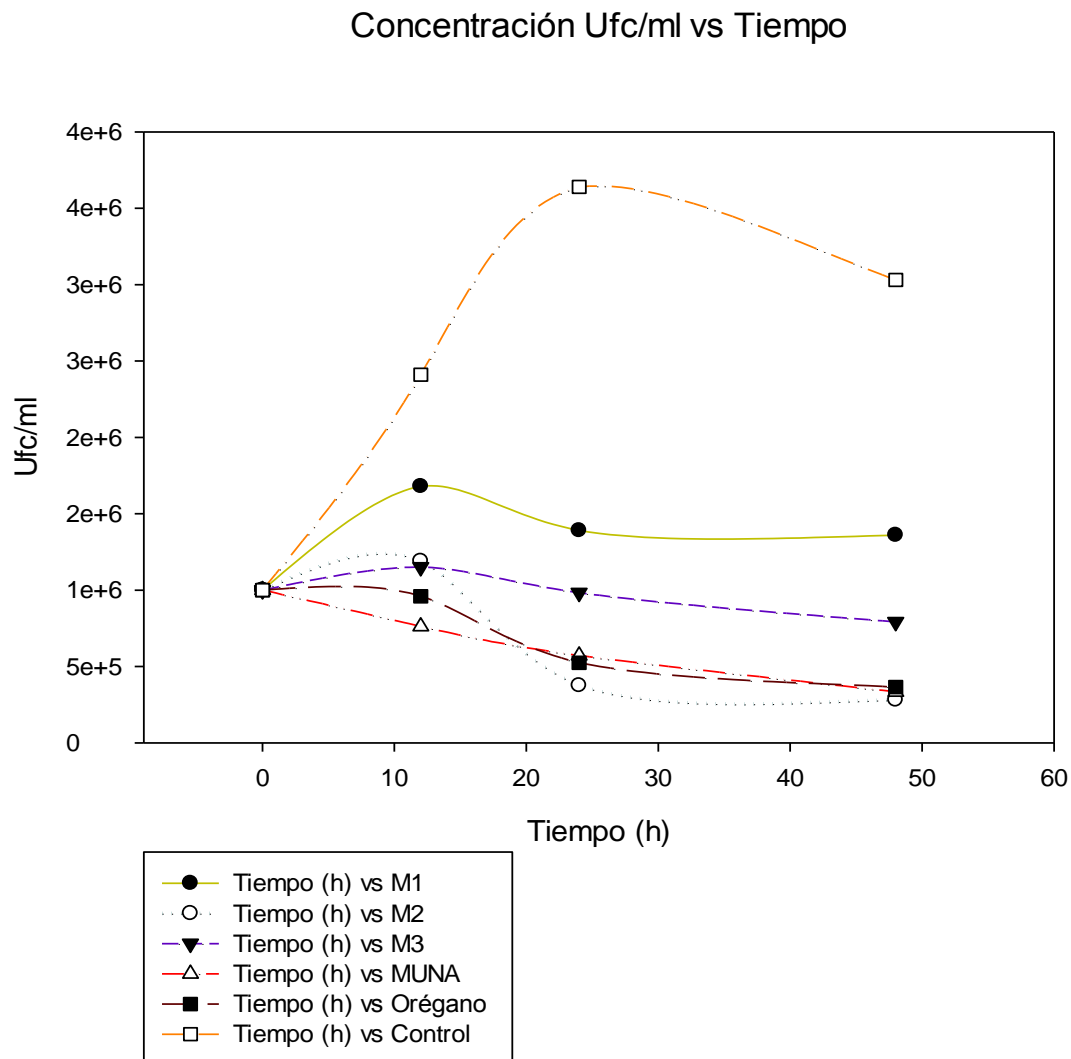


Figura 4.18. Curvas de crecimiento en M.O. de durazno bajo el efecto de las mezclas formuladas

La Tabla 4.15 recoge los datos de concentración del consorcio microbiano de *Prunus pérsica* (durazno) en el tiempo, expuesto a cada uno de los aceites y las mezclas, a partir de los cuales se construyeron las curvas de crecimiento (Figura 4.18)

Tabla 4.15. Crecimiento de Microorganismos procedentes de *Prunus pérsica* (durazno)

Tiempo (h)	Concentración consorcio microbiológico (ufc/ml)					
	M1	M2	M3	MUÑA	ORÉGANO	CONTROL
0	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+06
12	1.68E+06	1.19E+06	1.15E+06	7.62E+05	9.60E+05	2.41E+06
24	1.39E+06	3.75E+05	9.82E+05	5.71E+05	5.24E+05	3.64E+06
48	1.36E+06	2.81E+05	7.91E+05	3.33E+05	3.65E+05	3.03E+06

Las concentraciones reportadas son la media de n=2

Fuente: Elaboración propia

Procedemos a obtener los logaritmos naturales de los datos de crecimiento en el tiempo.

Tabla 4.16. Logaritmo Natural de las concentraciones

	Ln (x10)					
	M1	M2	M3	MUÑA	ORÉGANO	CONTROL
	13.82	13.82	13.82	13.82	13.82	13.82
12	14.33	13.99	13.96	13.54	13.77	14.70
24	14.14	12.83	13.80	13.26	13.17	15.11
48	14.12	12.55	13.58	12.72	12.81	14.92

Fuente: Elaboración propia.

A partir de la ecuación 3.7 y los datos de la Tabla 4.16, calculamos analíticamente la tasa de crecimiento promedio y la relación entre ellas, las que se presentan en la Tabla 4.17.

Tabla 4.17. Tasa de crecimiento del consorcio microbiano de *Prunus pérsica* (durazno)

Tiempo (h)	K (h ⁻¹)					
	M1	M2	M3	Muña	Orégano	Control
12	0.0432	0.0145	0.0116	-0.0227	-0.0034	0.0733
24	-0.0158	-0.0962	-0.0132	-0.0240	-0.0505	0.0344
48	-0.0018	-0.0240	-0.0180	-0.0449	-0.0301	-0.0153
K (h ⁻¹)*	0.0085±0.0767**	-0.0353±0.1397	-0.0065±0.395	-0.0305±0.0310	-0.0280±0.0586	0.0308±0.1103
R	0.2774	1.1451	0.2115	0.9919	0.9092	1.0000

Fuente: Elaboración propia

* IC, calculado al 95% , n=3 α=0.05. Para una prueba de t-student

El consorcio microbiológico procedente de *Prunus pérsica* (durazno), frente a la mezcla M2 (75/ muña, 25% orégano) exhibe una tasa de crecimiento negativa (-0.0353±0.1397 h⁻¹), decreciendo en un 114.51% respecto del crecimiento en el tubo control.

A.2) Tasas de crecimiento de consorcio microbiológico en *Carica papaya* (papaya)

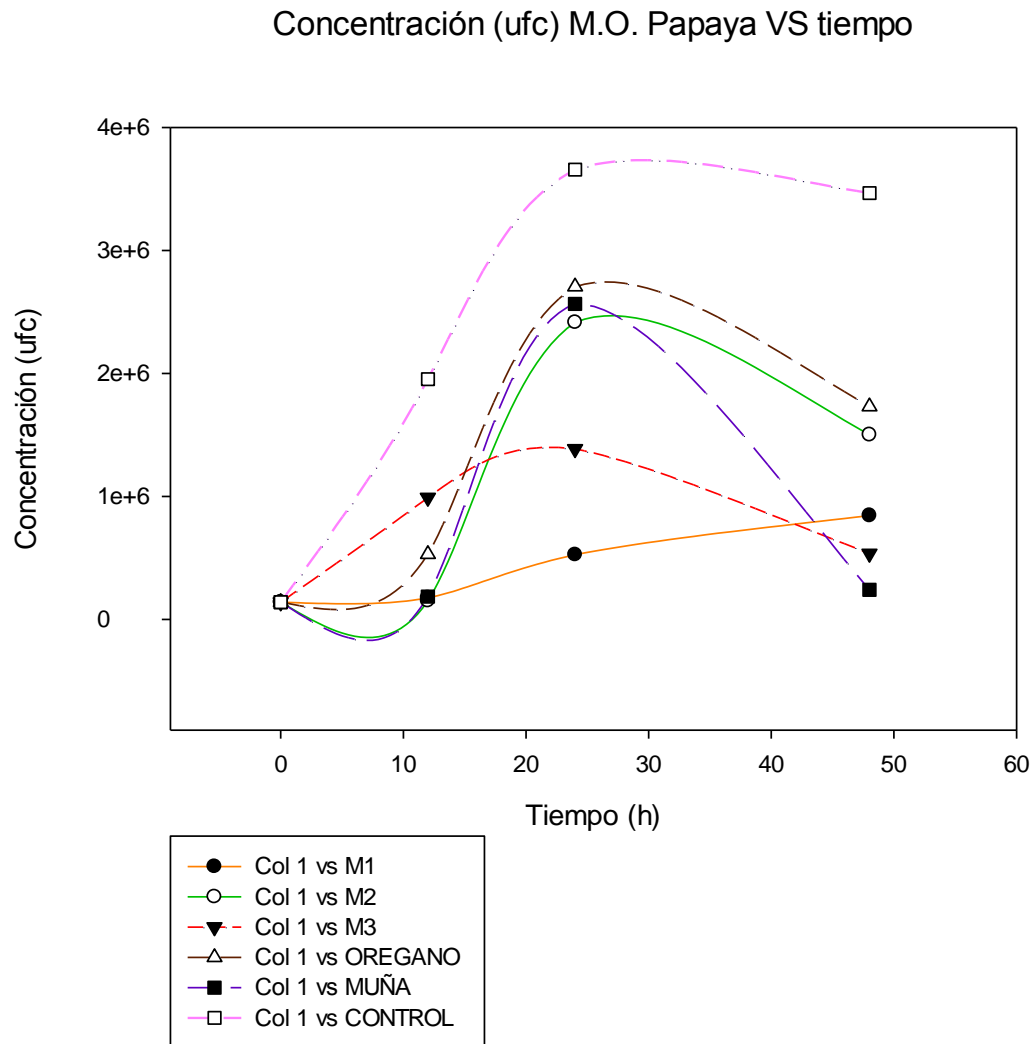


Figura 4.19. Curvas de crecimiento en M.O. de papaya bajo el efecto de las mezclas

La Tabla 4.18 recoge los datos de concentración del consorcio microbiano de *Carica papaya* (papaya) en el tiempo, expuesto a cada uno de los aceites y las mezclas, a partir de los cuales se construyeron las curvas de crecimiento (Figura 4.19).

Tabla 4.18. Crecimiento de Microorganismos procedentes de *Carica papaya* (papaya)

Tiempo (h)	Concentración (ufc/ml)					
	M1	M2	M3	MUÑA	ORÉGAN	CONTROL
0	1.40E+05	1.40E+05	1.40E+05	1.40E+05	1.40E+05	1.40E+05
12	1.75E+05	1.50E+05	9.90E+05	5.30E+05	1.85E+05	1.95E+06
24	5.25E+05	2.42E+06	1.39E+06	2.71E+06	2.57E+06	3.66E+06
48	8.44E+05	1.50E+06	5.35E+05	1.73E+06	2.40E+05	3.47E+06

Las concentraciones reportadas son la media de n=2

Fuente: Elaboración propia

A partir de los datos para la curva de crecimiento, se obtuvieron los logaritmos en el tiempo y aplicando la ecuación 3.7, se determinó la tasa de crecimiento promedio $k(h^{-1})$, y se obtuvo la relación promedio, todos estos valores se encuentran en la Tabla 4.19

Tabla 4.19. Tasa de crecimiento del consorcio microbiano de *Carica papaya* (papaya)

Tiempo (h)	K (h ⁻¹)					
	M1	M2	M3	MUÑA	ORÉGANO	CONTROL
12.0	0.0186	0.0057	0.1630	0.1109	0.0232	0.2195
24.0	0.0916	0.2317	0.0283	0.1360	0.2193	0.0525
48.0	0.0396	-0.0399	-0.0796	-0.0374	-0.1976	-0.0044
K(h ⁻¹)*	0.0499±0.0933**	0.0659±0.3613	0.0372±0.30196	0.0698±0.2328	0.0150±0.5180	0.0892±0.2891
R	0.5596	0.7387	0.417	0.7832	0.1679	1.0000

Fuente: Elaboración propia

* IC, calculado al 95% , n=3 α=0.05. Para una prueba de t-student

Siendo la tasa de crecimiento (k) del consorcio microbiológico de papaya en presencia de aceite esencial de orégano igual a $0.0150 \pm 0.5180 h^{-1}$, que equivale al 16.79% del crecimiento del grupo control, se asocia a los componentes del aceite esencial de orégano como agentes con poder antimicrobiano que se asociara más adelante a la bioconsecuación de papaya.

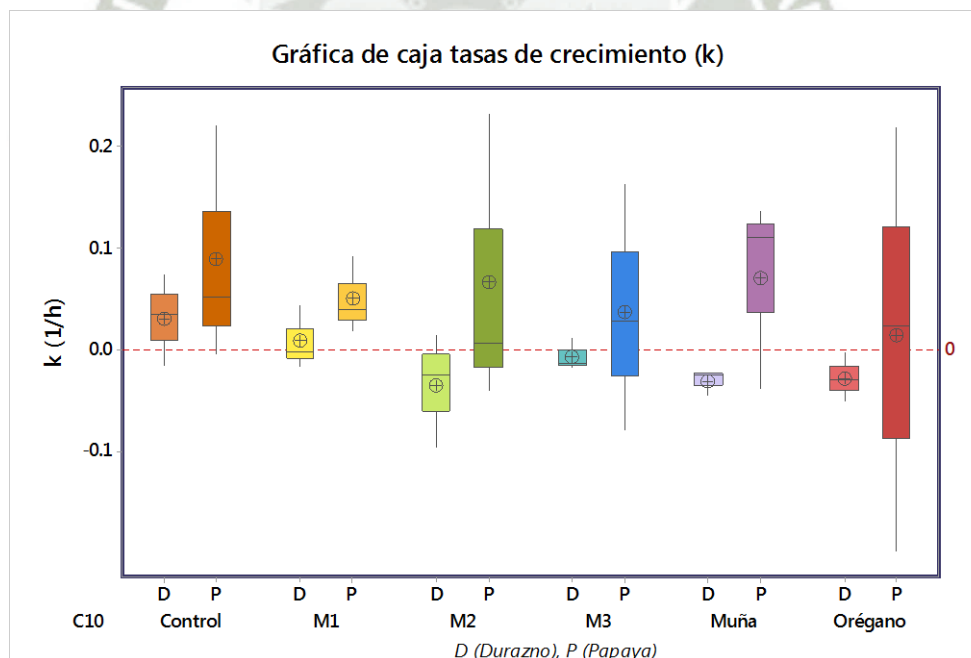


Figura 4.20. Comparación de tasa de crecimiento del consorcio microbiológico

Finalmente una comparación por gráfico de cajas para las tasas de crecimiento en durazno y papaya se puede observar en la Figura 4.20, donde la tasa de crecimiento del consorcio

microbiológico de durazno es menor a la tasa de crecimiento del consorcio bacteriano de papaya en los tubos control, lo que se ve reflejado en las curvas de inhibición ya que a pesar de la presencia de las mezclas o los aceites las tasas de crecimiento son positivas, lo que indica que uno o más de los microorganismos presentes en papaya es resistente. Para definir mejor estos comportamientos se continuó con los análisis de halos de inhibición.

B. Evaluación de actividad antimicrobiana in vitro por el método de Difusión en Agar.

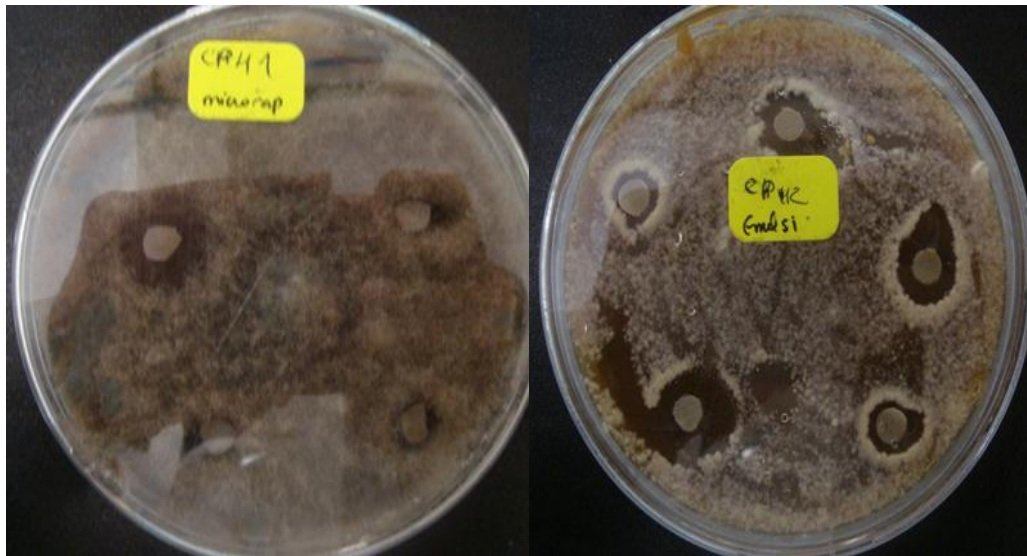


Figura 4.21 Evaluación de actividad *in vitro* por el método de difusión en agar. Evaluación de los halos de inhibición de microcápsulas sobre *Mucor spp.* (Derecha) y halos de inhibición de emulsiones sobre *Alternaria Spp.* (Izquierda).

Para este ensayo se usaron los microorganismos que presentaron mayor crecimiento de las bacterias aisladas se usaron *Klebsiella spp.*, *Shiguelia spp.*, *Streptococcus spp.*, *Pseudomona sp.*, de los hongos se usó *Mucor sp.* Y *Alternaria alternata*, y finalmente de las levaduras se usó la colonia 1, codificándola como LV1. Para la clasificación de la actividad se consideró actividad nula es decir resistencia si el diámetro fue menor igual a 8 mm, sensibilidad límite, si el diámetro es de 9 a 14 mm, sensibilidad media si el diámetro va de 15 a 19 mm y finalmente muy sensible si el diámetro es igual o superior a 20 mm, estos parámetros de evaluación fueron usados por Alzamora⁹⁸

B.1: Halos de inhibición desarrollados por emulsiones

Las Tabla 4.20 y Tabla 4.21, muestran el diámetro de los halos de inhibición obtenidos, las emulsiones tuvieron una concentración de 5% v/v o 4.39% p/p promedio de los aceites esenciales o sus mezclas.

Tabla 4.20. Diámetros de inhibición mostrados por las emulsiones frente a las bacterias aislados

<i>Mezclas</i>	<i>Pseudomona</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Shiguella</i>	<i>Streptococcus</i>
M1	11.50 ± 0.45	12.33 ± 1.34	12.5 ± 2.25	21.5 ± 0.45
M2	7.50 ± 0.45	13.16 ± 1.09	8.5 ± 0.45	21.5 ± 0.45
M3	9.00 ± 0.00	22.00 ± 1.38	11 ± 0.90	15 ± 0.00
MUÑA	9.00 ± 0.00	15.33 ± 1.24	10.5 ± 2.25	10.5 ± 1.35
OREGANO	18.00 ± 0.90	17.33 ± 1.44	13.5 ± 1.35	24 ± 0.90

Fuente: Elaboración propia
IC, calculado al 90% , n=6; α= 0.05. Para una prueba de t-student

La Figura 4.22 muestra mediante un diagrama de dispersión los datos obtenidos, las líneas horizontales a lo largo de la gráfica corresponden a los límites enunciados anteriormente para la clasificación de la actividad observada.

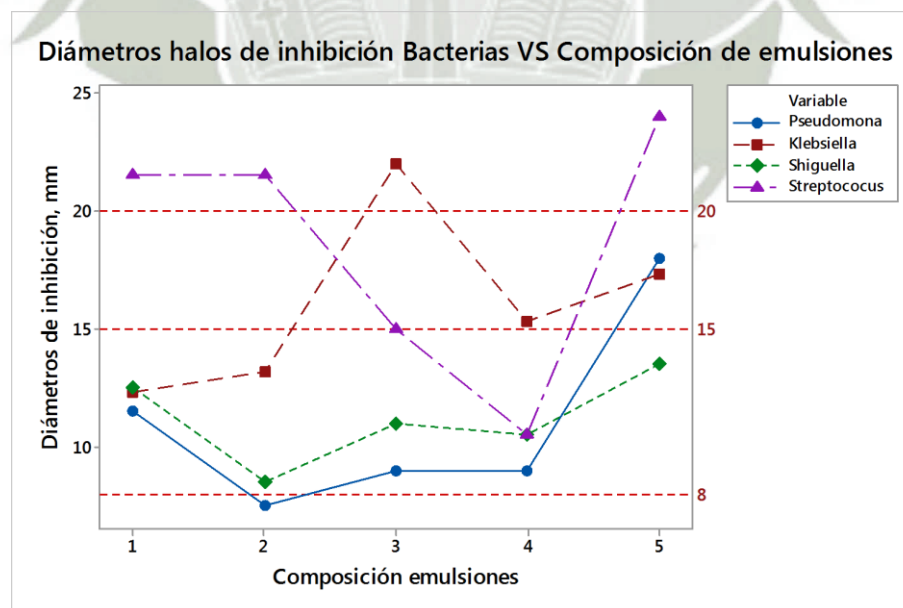


Figura 4.22 Diagrama de dispersión de halos de inhibición por emulsiones sobre bacterias aisladas.
En la Gráfica, 4, representa aceite esencial de muña y 5 el aceite esencial de orégano

De este gráfico observamos que *Streptococcus spp.* es sensible a las mezclas 1 y 2 así como al aceite esencial de orégano, mostrando sensibilidad límite y media para la mezcla 3 como para el aceite esencial de muña, siendo el aceite esencial de orégano el que presenta mayor efecto sobre *Streptococcus spp.*, la mezcla 2 presenta en su composición un 25% de aceite de orégano, por lo tanto hay sinergismo en esta proporción entre a.e de orégano y de muña frente a *Streptococcus spp.* La cepa de *Shiguella spp.* estudiada muestra una sensibilidad límite, siendo las que producen una mayor sensibilidad las mezclas 1, 3 y el aceite de orégano puro, lo que nos muestra que la composición del aceite esencial de orégano es el presenta mayor efecto sobre *shiguella spp.*

Para *Klebsiella spp.*, la mezcla 3 presenta una sensibilidad alta, lo que nos sugiere que existe un sinergismo de los componentes de los aceites esenciales de orégano y de muña en relación 1:1.aportando mayor efecto la composición de aceite de orégano, puesto que este presenta también sensibilidad media con halo de inhibición mayor a las otras mezclas. Finalmente *Pseudomona spp.* muestra sensibilidad límite con todas las mezclas evaluadas a excepción del a.e. de orégano que ejerce una sensibilidad media.

En conclusión el aceite esencial de orégano produce sensibilidad límite a media en las bacterias evaluadas procedentes de *Carica papaya*, siendo las cepas más sensibles *Streptococcus.spp.*

Tabla 4.21. Diámetros de inhibición mostrados por las emulsiones frente a Hongos y levadura aislados

<i>Mezclas</i>	<i>Mucor spp.</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Levadura 1</i>
M1	12.5 ± 2.5 ¹	10.5 ±0.45	6.5± 0.45
M2	10.5±0.45	13.5±1.35	7±0.00
M3	8.5 ± 3.2	10.5±0.45	7±0.00
MUÑA	8.5± 3.2	14.5±0.45	8±0.00
OREGANO	9.5±4.06	13.5±0.44	9±0.90

Fuente: Elaboración propia

¹IC, calculado al 90% , n=6; α= 0.05. Para una prueba de t-student

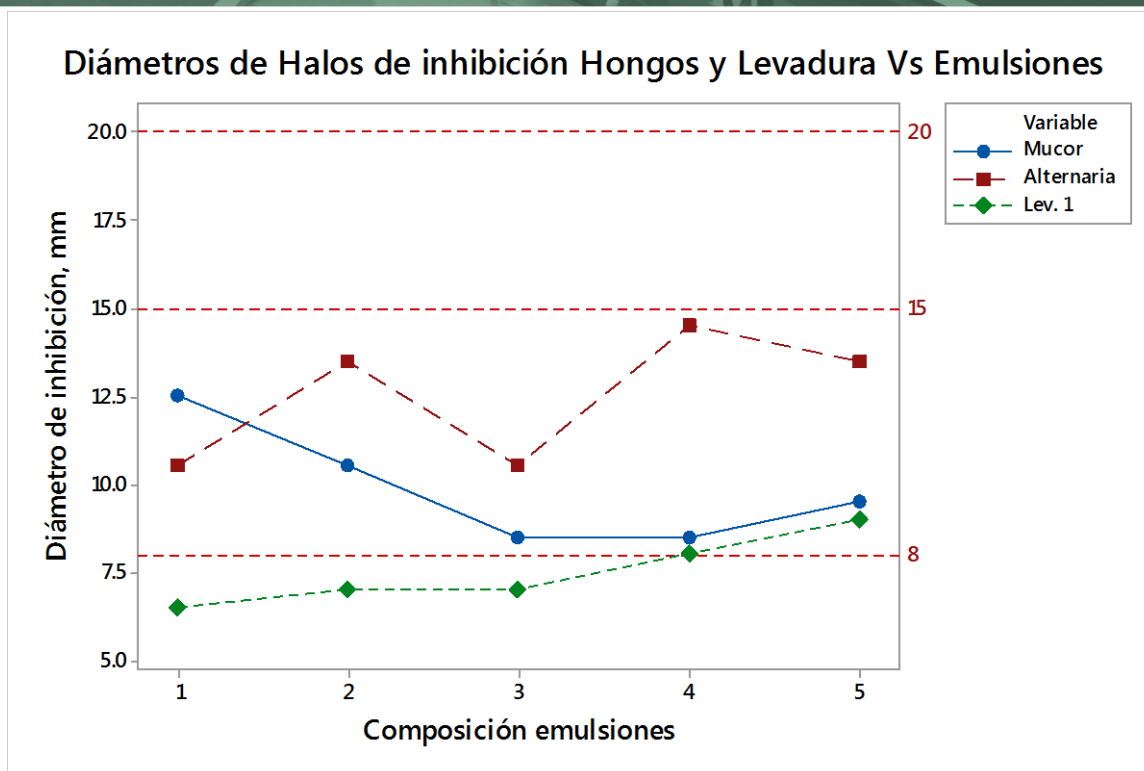


Figura 4.23. Diagrama de dispersión de halos de inhibición por emulsiones en hongos y levadura aislada. En la Gráfica 4 representa aceite esencial de muña y 5 el aceite esencial de orégano

La cepa de levaduras evaluada muestra Resistencia a las emulsiones de las mezclas como de los aceites esenciales puros. Finalmente las cepas de hongos estudiadas fueron *Mucor spp.* y *Alternaria spp.*, la primera mostró una sensibilidad límite ante todas las mezclas y aceite esencial puros, *Alternaria spp.* Muestra valores muy cercanos a la categoría de sensibilidad media, siendo los más cercanos la mezcla 2 y el aceite esencial. de muña, lo que nos muestra que es sensible a sus componentes.

B.2. Halos de inhibición de microcápsulas

Las Tabla 4.22 y

Tabla 4.23 presentan los diámetros de los halos de inhibición exhibidos frente a las microcápsulas usadas, la concentración de los aceites esenciales en las microcápsulas se calculó a partir de los datos de humedad y rendimiento logrados además del rendimiento de carga teóricos reportados por Siow⁹³, siendo de 6.98% p/p,. Los datos recogidos fueron recopilados 3 días después de la siembra y observados constantemente. El mayor crecimiento se dio el primer día.

Tabla 4.22. Diámetros de inhibición de Microcápsulas frente a Bacterias

<i>Variable</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Pseudomona</i>	<i>Shiguella</i>	<i>Klebsiella</i>
M1	8.50 ± 6.76	13.00 ± 0.90	17.00 ± 2.70	15.00 ± 1.35
M2	15.00 ± 0.90	19.00 ± 0.00	17.00 ± 0.90	15.00 ± 2.70
M3	12.00 ± 0.90	15.00 ± 0.00	15.00 ± 0.90	13.00 ± 6.76
MUÑA	13.50 ± 1.35	14.00 ± 0.90	16.50 ± 1.35	15.00 ± 0.90
ORÉGANO	14.50 ± 1.35	13.00 ± 0.45	15.00 ± 0.90	16.00 ± 1.80

Fuente: Elaboración propia
 HC, calculado al 90%, n=6; $\alpha= 0.05$. Para una prueba de t-student

La Figura 4.24 muestra mediante un diagrama de dispersión los datos obtenidos, las líneas horizontales a lo largo de la gráfica corresponden a los límites enunciados anteriormente para la clasificación de la actividad observada.

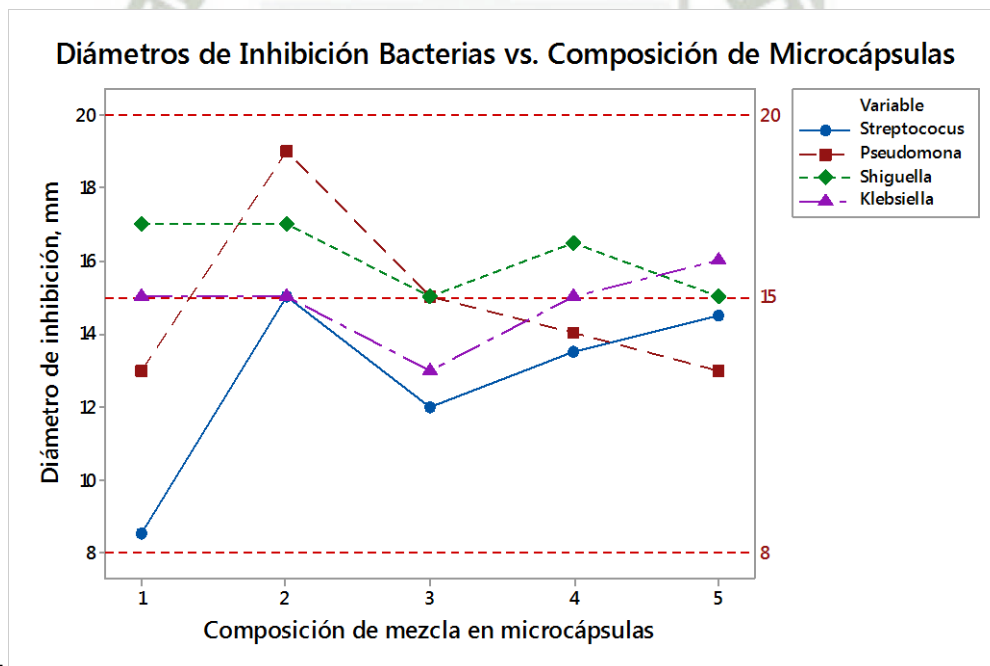


Figura 4.24. Diagrama de dispersión de halos de inhibición por microcápsulas sobre bacterias aisladas

Se observa que *Streptococcus* presenta sensibilidad límite frente todas las microcápsulas evaluadas e inclusive resistencia a M1, *Pseudomona* y *Shiguella* presenta sensibilidad media para las microcápsulas M2 y de muña, por lo que son los compuestos del aceite esencial de muña los

que ejercen un mayor efecto, finalmente el intervalo de confianza de los diámetros de inhibición de *Klebsiella sp* muestran sensibilidad media. De estas observaciones la mezcla 2 ejerce efecto sobre todas las bacterias, que va de actividad media a alta, confirmando el sinergismo de esta proporción de mezcla además que sugiere una liberación del núcleo de las microcápsulas mayor.

Tabla 4.23. Diámetros de inhibición mostrados por las Microcápsulas frente a Hongos y Levadura aislados

	<i>Mucor</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Lev. 1</i>
M1	13.00 ± 0.901	17.000 ± 0.901	9.500 ± 0.451
M2	17.50 ± 3.15	21.000 ± 0.901	11.500 ± 0.451
M3	9.00 ± 0.000	20.500 ± 0.451	13.000 ± 0.901
MUÑA	11.50 ± 0.451	22.000 ± 1.802	11.000 ± 0.901
ORÉGANO	8.50 ± 1.352	23.000 ± 0.901	8.500 ± 0.451

Fuente: Elaboración propia

¹IC, calculado al 90% , n=6; $\alpha = 0.05$. Para una prueba de t-student

LV1 frente a las microcápsulas muestra una sensibilidad límite ante todas las mezclas y a. e. puros, por el contrario *Alternaria sp*. Presenta sensibilidades de media a altas siendo las microcápsulas más efectivas las de los aceites esenciales puros, finalmente *Mucor sp*. Presenta sensibilidad media ante la mezcla 2 y limite frente a las demás microcápsulas.

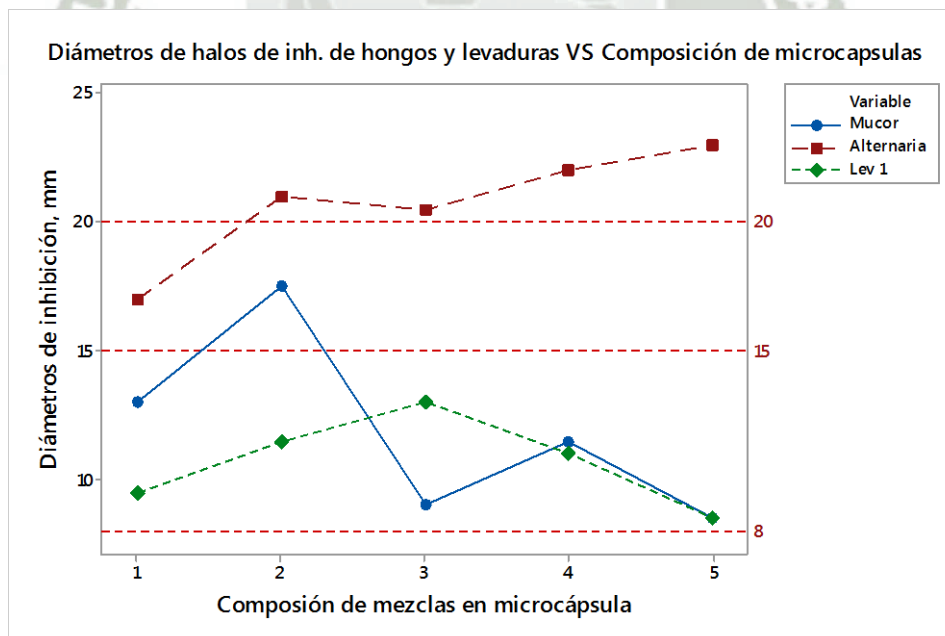


Figura 4.25. Diagrama de dispersión de halos de inhibición por microcápsulas sobre Hongos y Levadura aisladas

Se da una mejor liberación de los principios activos de las microcápsulas que contienen la mezcla 2, lo que se observa claramente en los gráficos, dado que todas las bacterias evaluadas así como los hongos tienen sensibilidades medias a altas, las levaduras presenta una sensibilidad limite ante las microcápsulas y resistencia ante las emulsiones lo que nos sugiere que el material encapsulante permite una liberación prolongada de los metabolitos activos y mayor estabilidad ante temperaturas lo que comprobó Jiamrungraksa⁹⁹ con aceite de galangal recubierto con alginato de sodio, permitiendo que su actividad en el tiempo se mantenga y tenga mejor efecto.

Figueroa⁵¹ demostró que los aceites esenciales de *Satureja boliviana* con isomentona (33.61%), carvacrol (11.14%) y pulegona (9.79%) generaron halos de inhibición de 21 mm en *S. aureus*, 31 mm sobre *Bacillus subtilis*, 16 mm para *Salmonella flexeri*. Presentando resistencia *S. entereditis* así como *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* y *M. canis*. Por lo que podemos asociar la presencia de pulegona y p-Mentan-3-ona en el aceite esencial extraído como los responsables de la actividad antimicrobiana exhibida. En forma de emulsión frente a *Streptococcus spp.* y *Alternaria alternata*.

Albado⁵⁴ extrajo aceites esenciales de *Oregano vulgare*, con carvacrol (9%), terpineol (12.19%), y p-cimeno (6.86%), los que exhibieron halos de inhibición de 28 mm de *Staphilococcus spp.*, frente a *Bacillus spp.* 14 mm y frente a *Salmonella spp.* 15 mm, y frente a *Pseudomona aeuroginosa* exhibió resistencia, mientras que en el estudio realizado *Pseudomona spp.* y *Streptococcus spp.* mostraron sensibilidad extrema ante aceites esenciales de orégano aplicados como emulsiones con 17.57% de terpineol, asociando a este compuesto la actividad antimicrobiana.

4.5. Evaluación de la capacidad bioconservante *in vivo* de las mezclas sobre durazno fresco entero como emulsión

Se adquirió una caja de durazno variedad Huayco del mercado mayorista de frutas LA PARADA, Río Seco – Arequipa en el mes de diciembre. Se clasificaron y escogieron los frutos que tuvieran apariencia color y textura saludable e igual entre sí, además de tener pesos y tamaños cercanos a fin de disminuir la variabilidad.

FiSe colocaron en bases de tecnopor codificándose, y se procedió a aplicar las emulsiones previamente preparadas según el diseño experimental. Se evaluó el efecto de cada una de las emulsiones en dos frecuencias de aplicación, además de considerar dos tratamientos adicionales

para realizar las comparaciones, un Blanco para corroborar si la solución de Tween 20 al 10% tiene algún efecto y un Control absoluto sin ningún tratamiento. Para las evaluaciones se tomó en cuenta, el cambio de pH, los °Brix, la acidez, el índice de madurez, y conteo de microorganismos.

Cambios en las características organolépticas también fueron evaluados considerándose color y textura los que fueron evaluados por análisis descriptivo; el tiempo de almacenamiento fue de 8 días. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo como se describe en los métodos



Figura 4.26. Aplicación de emulsiones en durazno

- a) Evaluación fisicoquímica de pH, % pérdida de peso, % acidez, sólidos solubles e índice de madurez.**

Una vez establecidos las unidades experimentales se procedió a la aplicación de los tratamientos hasta observar cambios tales como indicios de crecimiento bacteriano o fungal, exudaciones u

olor desagradable en alguno de los tratamientos, el tiempo de aplicación fue de 8 días a una temperatura de $18 \pm 2^\circ\text{C}$, bajo sombra y en continuo cambio de posiciones para evitar tendencias. La Tabla 4.24 resume los resultados obtenidos de las evaluaciones fisicoquímicas

Tabla 4.24. Evaluaciones Fisicoquímicas en durazno

Mezcla	Frecuencia de aplicación	pH	%Pérdida de peso	% Acidez	°Brix	IM
M1	1	4.71	24.78	0.43	12.00	28.47
M2	1	4.36	23.71	0.43	11.00	25.30
M3	1	3.74	31.17	0.39	12.00	31.63
OREGANO	1	4.19	25.25	0.79	12.00	15.29
MUÑA	1	4.61	22.76	0.28	12.50	45.47
M1	2	5.56	27.62	0.32	12.00	37.96
M2	2	4.45	27.81	0.44	13.50	30.84
M3	2	4.11	30.05	0.32	12.00	37.96
OREGANO	2	4.07	33.26	0.47	15.00	31.63
MUÑA	2	4.68	30.45	0.42	12.00	28.47
BLANCO	1	4.89	28.53	0.16	18.00	115.27
BLANCO	2	5.27	32.65	0.22	19.00	89.65
CONTROL	0	5.03	38.07	0.39	18.00	46.96

Las evaluaciones fueron hechas por duplicado y la tabla reporta la media aritmética de las evaluaciones

Fuente: Elaboración propia

Los análisis factoriales para cada una de las variables respuestas se resumen en la Tabla 4.25, no se consideró para estos análisis el grupo Control ya que este es considerado como un grupo de comparación externo sobre el que el factor frecuencia no ha sido evaluado.

Tabla 4.25. Análisis factorial de las propiedades fisicoquímicas de *Prunus pérsica*

Variable Respuesta	<i>p</i>	Factor	Conclusion preliminar
pH	0.003	Mezcla	El tipo de mezcla en la emulsión ejerce un efecto significativo
	0.099	Frecuencia	
% pérdida de peso	0.721	Mezcla	No existe diferencia significativa de los efectos de cada factor
	0.736	Frecuencia	
IM	0.001	Mezcla	El tipo de mezcla en la emulsión ejerce un efecto significativo
	0.9116	Frecuencia	

* Esta conclusión debe ser tratada con cuidado, dado que la comparación incluye a los grupos control, por lo que debe observarse mejor las agrupaciones obtenidas

Fuente: Elaboración propia

a.1. pH,

Determinado en el análisis factorial que el factor Mezcla es fuente de diferencias estadísticas, se procedió a un ANOVA unidireccional tomando como variable el tipo de mezcla e incluyendo en este análisis al grupo control, de donde se obtuvo un estadístico $p < 0.05$ (0.002), aceptando la hipótesis alterna que indica que existe diferencia, a lo que siguió la comparación de emparejamiento por Tukey, los resultados se recogen en la Tabla 4.26

Tabla 4.26. Comparaciones múltiples por Tukey entre promedios de cada tipo de Mezcla

<i>MEZCLA</i>	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Agrupación</i>	
BLANCO	4	5.143	A	
M1	4	5.133	A	
CONTROL	2	5.025	A	B
MUÑA	4	4.645	A	B
M2	4	4.4075	A	B
OREGANO	4	4.1275	B	
M3	4	3.928	B	

Fuente: Elaboración propia

¹Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

El pH alcanzado al cabo del tiempo de aplicación fue diferente para las emulsiones a base de aceite de orégano y la mezcla M3, siendo menores que las demás, la teoría de conservación de alimentos nos indica que los pH ácidos retardan el crecimiento bacteriano, por tanto la conservación del alimento es de manera más adecuada, el pH de las frutas se encuentra en el rango ácido.

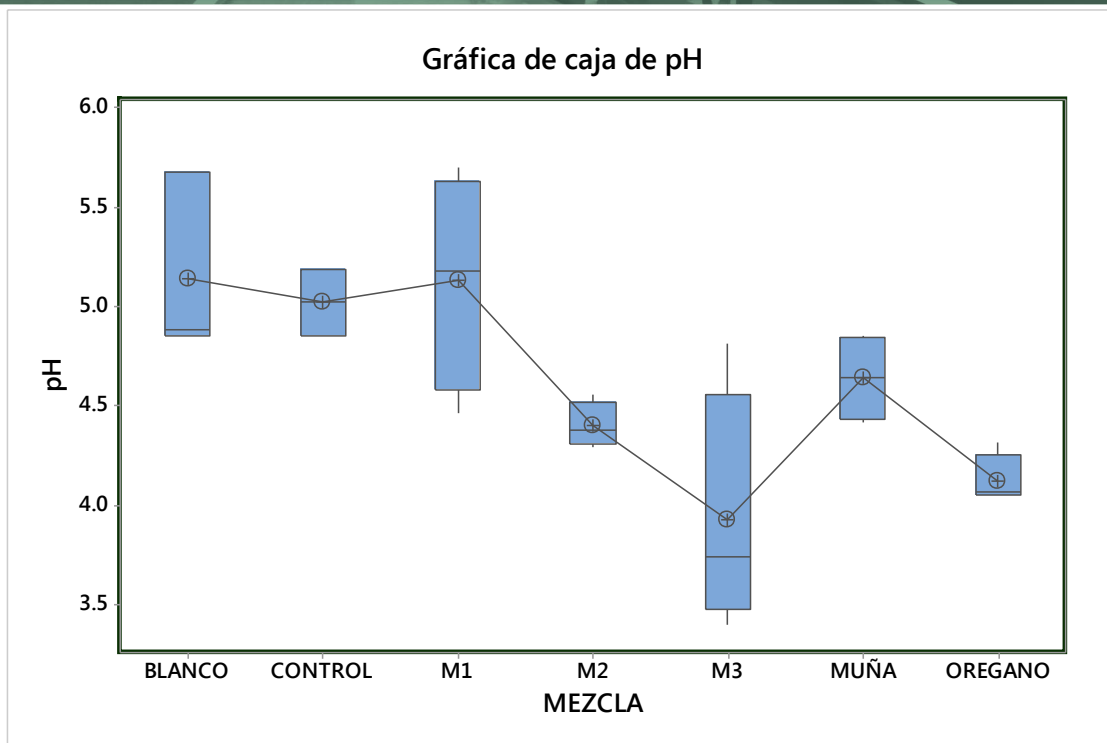


Figura 4.27. Gráfico de caja de pH por tipo de mezcla

Los grupos Blanco y control, además de los tratamientos con la Mezcla 1, alcanzaron valores de pH medios entre 4.5 y 5.5 este rango de pH favorece el crecimiento de la mayoría de microorganismos causantes de pudrición. García M.¹⁰⁰ realizó una caracterización fisicoquímica de duraznos, en la que parte de pH inicial de 3.81, llegando a un rango de 4.0 a 4.2 después de almacenamiento hasta alcanzar características como textura y color inaceptables, si bien la variedad evaluada por García M.¹⁰⁰ y las condiciones de almacenamiento no son las mismas para nuestro estudio los valores alcanzados se encuentran dentro de los rangos obtenidos en nuestras evaluaciones finales.

a.2. Porcentaje de pérdida de peso

Se realizó un ANOVA unidireccional considerando el grupo control para determinar alguna diferencia con los tratamientos propuestos obteniendo un $p > 0.05$, concluyendo que la pérdida de peso se debió al proceso normal de la maduración de las frutas y no se vio afectado por las pruebas, a pesar que al momento de aplicar las emulsiones y al ser estar líquidas podrían haber aportado humedad y disminuir la tasa de evapotranspiración, que era lo que se esperaba.

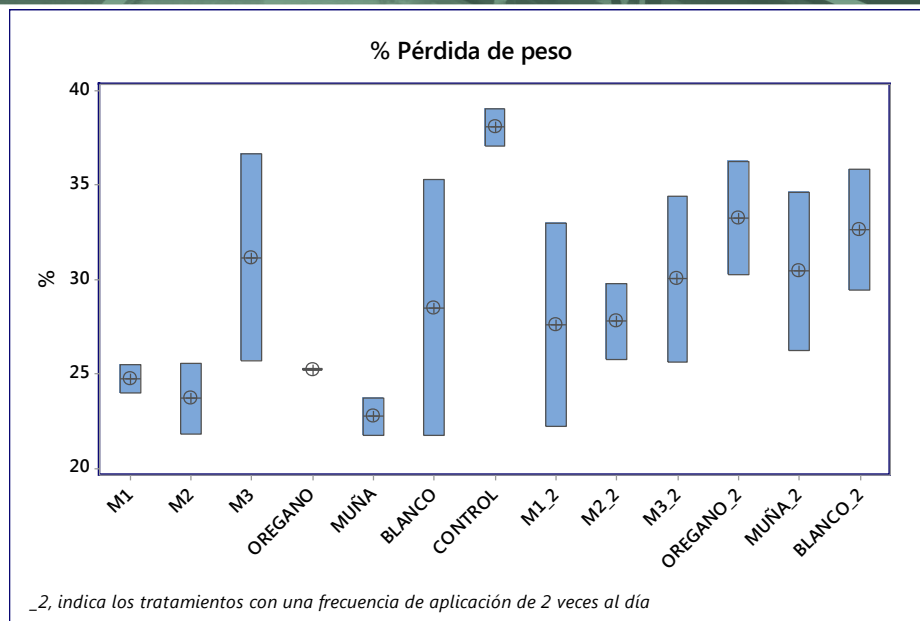


Figura 4.28. Gráfico de caja para el porcentaje de pérdida de peso

a.3. Índice de Madurez

El ANOVA unidireccional con el factor mezcla como variable independiente dio, considerando al grupo control, como resultado $p < 0.05$ (0.001) y la consecuente comparación por Tukey (Tabla 4.27) comprobó que hay una diferencia en el Índice de madurez debido a la composición de las emulsiones en comparación con los grupos control y blanco.

Tabla 4.27. Comparaciones en parejas de Tukey para índice de Madurez en durazno

MEZCLA	N	Media	Agrupación
BLANCO	4	98.2	A
CONTROL	2	46.96	A B
MUÑA	4	36.97	B
M3	4	34.8	B
M1	4	33.21	B
M2	4	28.07	B
OREGANO	4	23.46	B

Fuente: Elaboración propia

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Los blancos y el grupo control llegaron a un índice de madurez superior a las mezclas, con valores estadísticos iguales entre sí, a pesar de la diferencia de sus medias, Solo el Blanco logró valores de índice de madurez mayor a los otros tratamientos, García M.¹⁰⁰, reporta rango de

índice de madurez de fruto entre 37.50 a 50.43, los valores alcanzados por los tratamientos se encuentra por debajo de este rango entre 23.46 y 36.97, dado que el blanco al recibir solución con tween al 10% contribuye al aumento de la actividad del agua, a_w , lo que debe contribuir a aumentar los sólidos solubles y disminuir la acidez, que han sido relacionadas para obtener el índice de Madurez.

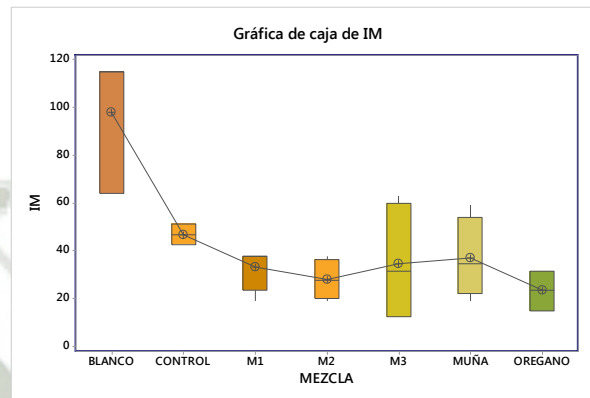


Figura 4.29 Gráfica de cajas para el índice de madurez en *Prunus pérsica* (durazno)

b) Evaluaciones microbiológicas sobre la concentración de Mohos y Bacterias

Se obtuvo la concentración de Mohos y Bacterias por duplicado, en un gramo de muestra, la Tabla 4.28 resume las concentraciones logradas.

Tabla 4.28. Concentración de Mohos y bacterias por gramo de durazno

<i>Mezcla</i>	<i>Frecuencia de aplicación</i>	<i>Mohos Ufm/g</i>	<i>Bacterias Ufc/g</i>
M1	1	600	100
M2	1	300	60
M3	1	1800	75
OREGANO	1	500	135
MUÑA	1	400	140
M1	2	900	115
M2	2	1600	75
M3	2	1000	160
OREGANO	2	900	335
MUÑA	2	900	210
BLANCO	1	2800	720
BLANCO	2	3200	485
CONTROL	0	2800	870

Fuente: Elaboración propia

Para la evaluación de la concentración de Mohos y Bacterias, se realizaron los conteos a las 24 horas para bacterias y 96 horas para colonias de mohos. Los análisis factoriales se resumen en la Tabla 4.29

Tabla 4.29. Análisis factoriales sobre la concentración de bacterias y Mohos en *Prunus pérsica* (durazno)

<i>Variable Respuesta</i>	<i>p</i>	<i>Factor</i>	<i>Conclusión preliminar*</i>
Mohos	0.000	Mezcla	El tipo de mezcla en la emulsión ejerce un efecto significativo
(ufc/g)	0.062	Frecuencia	
Bacterias	0.000	Mezcla	El tipo de mezcla y su interacción con la frecuencia de aplicación ejercen un efecto significativo
(ufc/g)	0.242	Frecuencia	
	0.001	Mezcla*Frecuencia	

* Esta conclusión debe ser tratada con cuidado, dado que la comparación incluye a los grupos control, por lo que debe observarse mejor las agrupaciones obtenidas

Fuente: Elaboración propia

b.1. Evaluación de concentración de mohos

De los análisis estadísticos Unidireccionales, con respecto al factor Mezcla, considerando al grupo control, se obtuvo un estadístico $p < 0.05$, y se procedió a realizar las comparaciones post hoc por test de Tukey al 95 %, las agrupaciones logradas se observan en la Tabla 4.30

Tabla 4.30. Test de comparación Tukey, Concentración (Ufc/g) respecto a las mezclas

<i>Mezcla</i>	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Agrupación</i>
BLANCO	4	3050	A
TESTIGO	4	2800	A
M3	4	1400	B
M2	4	950	B
M1	4	750	B
OREGANO	4	700	B
MUÑA	4	650	B

Fuente: Elaboración propia

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

La prueba de agrupación determina que las diferencias se encuentran entre los grupos Blanco y control respecto a las mezclas.

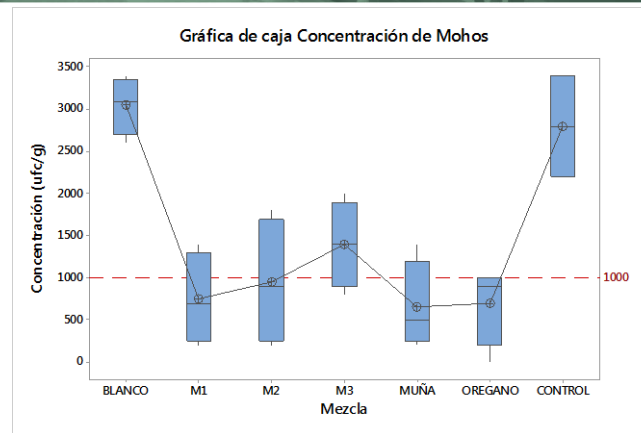


Figura 4.30. Gráfica de caja para concentración de Mohos/g por tipo de mezcla

Dada la norma técnica sanitaria NTS N°071- MINSA/DIGESA-v.0.1 aprobada con RM – 591 – 2008 – MINSA, Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de Calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de Consumo humano¹⁰¹, no establece límites de mohos en frutas y hortalizas frescas sin embargo dentro de la misma norma para frutas desecadas nos dan un límite máximo de 1000 el que se tomó como referencia para las evaluaciones, este valor se marcó en la gráfica de caja, de donde se rescata que las medias obtenidas por las emulsiones con las mezclas M1, aceite de muña y aceite de orégano puro, quedan por debajo de este límite.

b.2. Evaluación de concentración de bacterias.

Del análisis de varianza para determinar las diferencias entre los grupos control y Blanco respecto al factor mezcla dan como resultado un $p < 0.05$, continuando con el análisis post hoc obteniendo la Tabla 4.31 de comparación por Tukey.

Tabla 4.31. Agrupación Tukey por tipo de Mezcla, para ufc/g de Bacterias

<i>MEZCLA</i>	<i>N</i>	<i>MEDIA</i>	<i>AGRUPACIÓN</i>
CONTROL	2	870.0	A
BLANCO	4	602.5	B
OREGANO	4	235.0	C
MUÑA	4	175.0	C
M3	4	117.5	C
M1	4	107.5	C
M2	4	67.50	C

Fuente: Elaboración propia

De donde se deduce que la concentración del grupo Testigo y el tratamiento Blanco, son estadísticamente mayores a las concentraciones de bacterias alcanzadas al cabo de los tratamientos por las aplicaciones de las emulsiones, y diferentes entre sí.

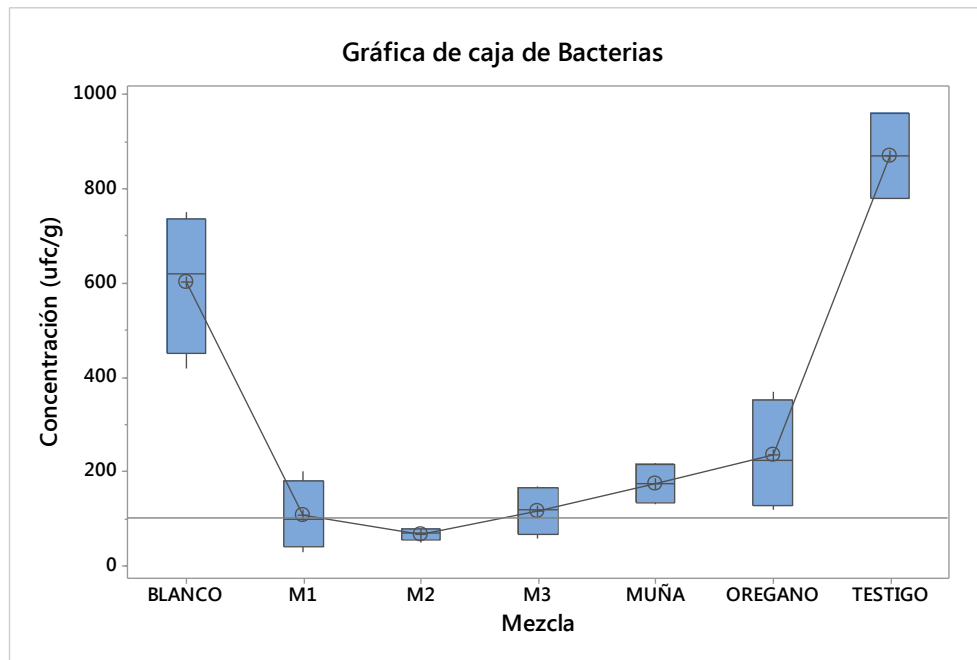


Figura 4.31. Concentración alcanzada en ufc/g de bacterias, en presencia de las mezclas aplicadas en *Prunus pérsica* (durazno)

De la Figura 4.31 de caja, los intervalos de confianza de las emulsiones a partir de las mezclas M1 y M3 albergan a 100 ufc/g, lo que implica que al cabo del tiempo de aplicación llegaron al máximo permisible en frutas según la Norma técnica establecida por DIGESA, la mezcla M2 en emulsión preserva mejor la calidad microbiana de los duraznos frescos, los que al cabo del tratamiento no llegan a los límites máximo permisibles.

Tabla 4.32. Comparaciones en parejas de Tukey, por frecuencia de aplicación al día para UFC/g de Bacterias

APLICACIÓN	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
0	4	870.0	A
2	10	179.0	B
1	10	102.0	B

Fuente: Elaboración propia

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

En cuanto al efecto que tiene el factor de aplicación por día de un análisis de varianza seguido de comparaciones en pareja de Tukey permitió establecer que los grupos control, alcanzan una concentración mayor de microorganismos en comparación a los que reciben la aplicación de las emulsiones.

Observamos que las medias agrupadas cuando se realiza la agrupación 1 vez al día logra alcanzar concentraciones en el límite máximo permisible, mientras que el intervalo de confianza y la media de las concentraciones alcanzadas por la aplicación dos veces al día el intervalo es mayor y aunque cruza por el límite los datos son más dispersos.

Una mejor visualización de estos resultados se graficó el comportamiento de la concentración bajo el efecto de estos dos factores (ver Figura 4.32), donde se observa que a mayor número de aplicación mayor concentración de bacterias, efecto que se justifica con el hecho de que mayores aplicaciones generan una mayor humedad en el ambiente que rodea y permite el crecimiento de microorganismos y que la Mezcla 2 retarda el crecimiento de bacterias, que corrobora las observaciones anteriores.

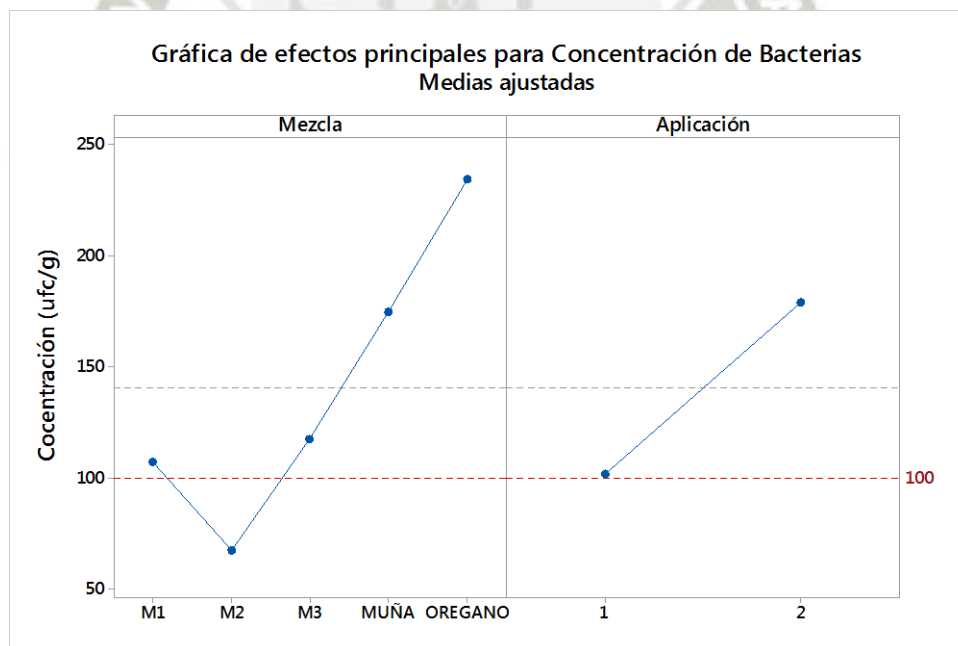


Figura 4.32. Gráfica de efectos principales en el crecimiento de bacterias sobre *Prunus pérsica* (durazno)

c) Evaluaciones sensoriales, de color y textura.

Fueron llevadas a cabo al terminar los tratamientos, y se valoraron en las escalas dadas en el capítulo 3, a partir de los datos se construyeron gráficas de puntos a fin de visualizar mejor los resultados e interpretarlos.

c.1. Textura,

Para su evaluación se dio una escala entre 1 y 5, siendo 1 textura lisa y conservada y 5 Completamente rugosa. Los blancos y los controles llegaron a calificaciones entre 4 y 5, los que no se muestran en los gráficos, de entre los tratamientos los que mejor preservaron la textura con una frecuencia de aplicación al día de una vez fueron la emulsión con aceite de orégano terminando con una calificación de 1, seguido de las emulsiones con aceite esencial de muña y M3 con calificación 2, y M1 con calificación 3, siendo que los blancos con calificaciones de 3 y 4 y los controles alcanzaron calificación de 5, lo que no se muestra en los gráficos, y va de la mano con los resultados de % de pérdida de peso, si bien no existe diferencia estadística, si se observa una diferencia en la textura, siendo que los controles tuvieron una pérdida de peso mayor a los demás, se tradujo en la textura rugosa de la superficie, mientras que los otros tratamientos y dada la aplicación de un producto líquido que creó atmósfera húmeda instantes después de la aplicación ayudaron a la conservación de la textura lisa.

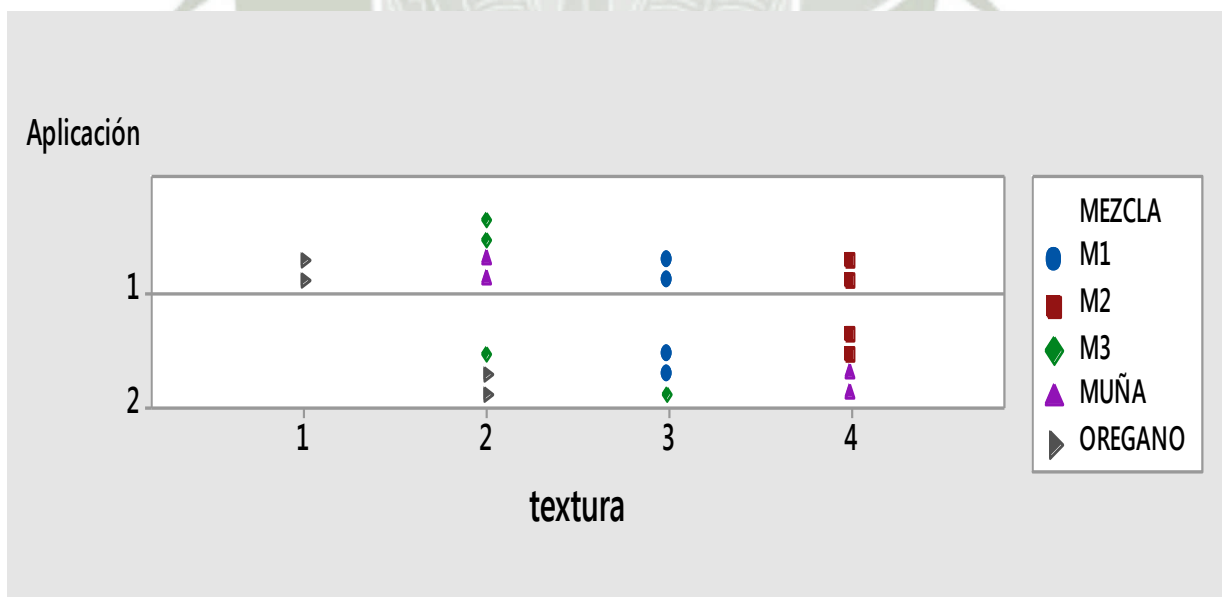


Figura 4.33. Gráfica de puntos para evaluación de textura en *Prunus pérsica* (durazno)

Cuando la aplicación fue de dos veces al día, sin embargo la aplicación de las emulsiones con a.e. de muña pasaron de conservar una textura lisa con una aplicación a una rugosa con dos aplicaciones el mismo efecto se observó con las emulsiones de a.e. de orégano que paso de 1 a 2, sin embargo para las emulsiones a partir de M1 y M2 se mantuvieron igual, y para M3 las evaluaciones se dividieron entre calificación 2 y 3, estos cambios se deben a la apreciación del sujeto que realiza la evaluación por lo que los criterios están sujetos a esta variabilidad.

c.2. Color

Se evaluó en una escala del 1 al 3, donde 1 representa al color característico y 3 a presencia de pardeamiento y/o evidencia de pudrición, siendo que la única aplicación que mostro diferencia fue a partir de las emulsiones de aceite esencial de muña, con relación a las demás la frecuencia no genero cambio.

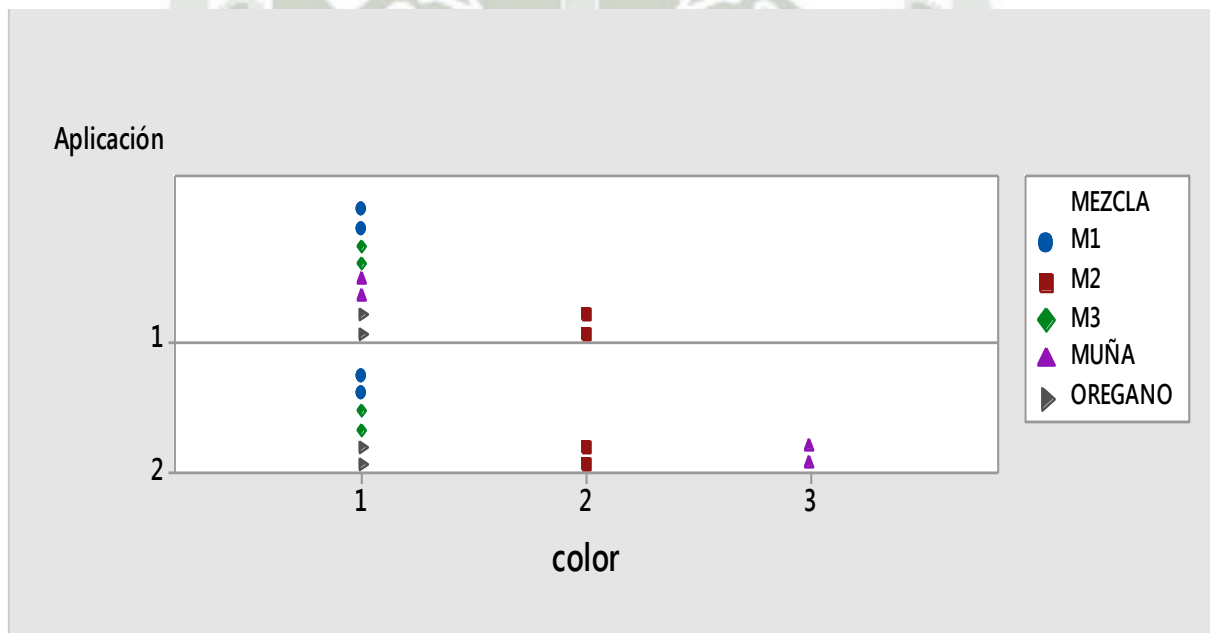


Figura 4.34. Gráfica de puntos para la evaluación de color en *Prunus pérsica* (durazno)

4.6. Evaluación de la capacidad bioconservante “*in vivo*” de las mezclas sobre papaya de 4ta gamma como microcápsulas

Para la aplicación de microcápsulas en papaya tipo IV gamma, se realizó los recubrimientos según se establece en la metodología, sin embargo en las pruebas previas, la mezcla quedaba como una masa sobre el fruto, por lo que se adicionó para darle plasticidad glicerol al 3%, lográndose así una mejor distribución y capa de recubrimiento homogénea.

Se hicieron los cálculos necesarios para que en la fórmula dada la concentración de aceite por g de microcápsulas húmedas (6.98%) tuviera una concentración del 5% p/p en el recubrimiento, lo que nos dio 7.16 g de microcápsulas por 100 gramos de recubrimiento. El tiempo de almacenamiento fue de 5 días antes de observar características desagradables en la apariencia de los tratamientos.



Figura 4.35. Distribución de las unidades experimentales a T 20°C

a) Evaluación Físicoquímica, pH, % pérdida de peso, %acidez, Sólidos solubles e índice de Madurez

La Tabla 4.33 recoge las medias de los resultados obtenidos de las evaluaciones físicoquímicas en papaya de IV gamma cada una de las temperaturas de almacenamiento. La estrategia de análisis de datos fue al igual que en durazno un ANOVA factorial seguido de un ANOVA unidireccional más comparación con Tukey cuando sea necesario.

Tabla 4.33. Evaluaciones Fisicoquímicas en papaya de IV gamma

CONCENTRACIONES	MEZCLAS	% PÉRDIDA DE PESO		pH		IM		°BRIX		% ACIDEZ	
		T/ 10°C	T/20°C	T/ 10°C	T/ 20°C	T/ 10°C	T/ 20°C	T/ 10°C	T/ 20°C	T/ 10°C	T/ 20°C
1%	M1	14.28	28.18	5.54	5.55	41.95	63.67	18.95	19.10	0.45	0.30
	M2	14.51	27.14	4.65	5.36	53.17	96.50	19.15	19.45	0.36	0.20
	M3	12.52	30.51	6.18	4.11	47.84	84.67	19.50	19.10	0.41	0.23
	M4	9.90	32.93	5.34	5.22	36.95	48.34	19.00	19.30	0.51	0.40
	M5	12.81	27.67	6.67	5.28	29.53	75.47	19.35	19.00	0.66	0.25
5%	M1	10.005	30.83	5.29	5.15	64.34	62.50	18.50	19.30	0.29	0.31
	M2	10.92	28.37	6.11	4.44	28.67	65.17	19.55	19.10	0.68	0.29
	M3	8.46	27.63	6.23	4.38	37.34	95.67	19.75	19.20	0.53	0.20
	M4	9.35	28.50	5.50	5.49	44.60	64.00	19.20	19.20	0.43	0.30
	M5	7.67	24.92	4.89	4.11	42.00	95.84	19.15	18.90	0.46	0.20
Controles	C/R	12.36	36.20	6.11	5.24	55.22	95.67	19.40	19.10	0.35	0.20
	S/R	12.62	32.86	6.86	6.67	65.33	130.00	19.60	19.00	0.30	0.15

Fuente: Elaboración propia

Se realizaron los análisis factoriales para determinar el principal factor que ejerce efecto sobre cada una de las variables respuestas obtenidas, los resultados se recogen en la Tabla 4.34.

Tabla 4.34. Análisis factoriales de las evaluaciones fisicoquímicas en *Carica papaya* (papaya)

Variable Respuesta	Factor	Primer análisis factorial p	Segundo análisis factorial	Conclusión preliminar*
pH	Mezcla	0.928	-	La temperatura es el factor de efecto principal
	Concentración	0.279	-	
	Temperatura	0.002	0.027	
	Temp*Mezcla	0.042	0.004	
%pérdida de peso	Mezcla	0.616	-	Concentración y temperatura ejercen efecto significativo en la variable respuesta, *
	Concentración	0.035	0.003	
	Temperatura	0.000	0.000	
IM	Mezcla	0.286	-	La temperatura ejerce un efecto significativo en la variable respuesta
	Concentración	0.035	-	
	Temperatura	0.000	0.000	
	Con*Temp	0.022	0.003	
	Temp*Mezcla	0.031	-	

* Esta conclusión debe ser tratada con cuidado, dado que la comparación incluye a los grupos control, por lo que debe observarse mejor las agrupaciones obtenidas

Fuente: Elaboración propia

a.1. El pH.

Dado que del primer análisis factorial se determinó que la temperatura de almacenado y la interacción de Temperatura y mezcla tenían efecto en el pH se representaron en la Figura 436 los efectos principales, en la que observamos que la temperatura de refrigeración contrario a lo que se esperaba no evita que el pH suba, lo que se puede asociar con los estudios de Jiamrungraksa⁹⁹, quien determino las isothermas de liberación del aceite esencial de galangal a 37°C Y A 120°C determinando que a mayor temperatura la liberación del compuesto es en menor tiempo, aplicando a nuestro caso de estudio la temperatura de refrigeración puede haber afectado la tasa de liberación del compuesto siendo más efectiva a la temperatura ambiente.

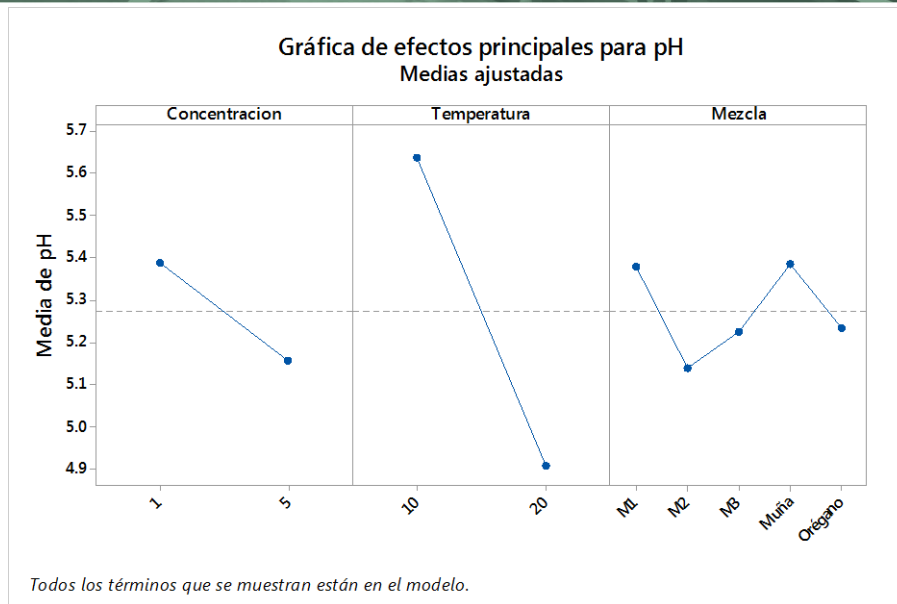


Figura 4.36. Gráfica de efectos principales para pH

Dado que la interacción de los factores temperatura y mezcla dieron evidencias de ejercer efectos significativos y el segundo análisis factorial tomando en cuenta solo estos factores corroboró la acción que ejercen, se procedió a los análisis de agrupación por Tukey anidado. El agrupamiento obtenido respecto a las muestras se observa en la Tabla 4.35

Tabla 4.35. Agrupación por Tukey del pH respecto a Mezcla y temperatura en *Carica papaya* (papaya)

<i>Temperatura</i>	<i>Mezcla</i>	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Agrupación</i>
10	Sin Recub	2	6.860	A
	M3	4	6.205	A
	Con Recub.	2	6.105	A B
	orégano	4	5.780	A B
	muña	4	5.415	A B
	M1	4	5.410	A B
	M2	4	5.378	A B
20	Sin Recub	2	6.665	A
	muña	4	5.355	A B
	M1	4	5.348	A B
	Con Recub.	2	5.235	A B
	M2	4	4.900	A B
	orégano	4	4.690	A B
	M3	4	4.243	B

Fuente: Elaboración propia

De esta tabla se desprende claramente que la mezcla M3 a 20°C .la que mantiene mejor el pH seguido de orégano a la misma temperatura. Lo que se observa también en la Figura 4.37

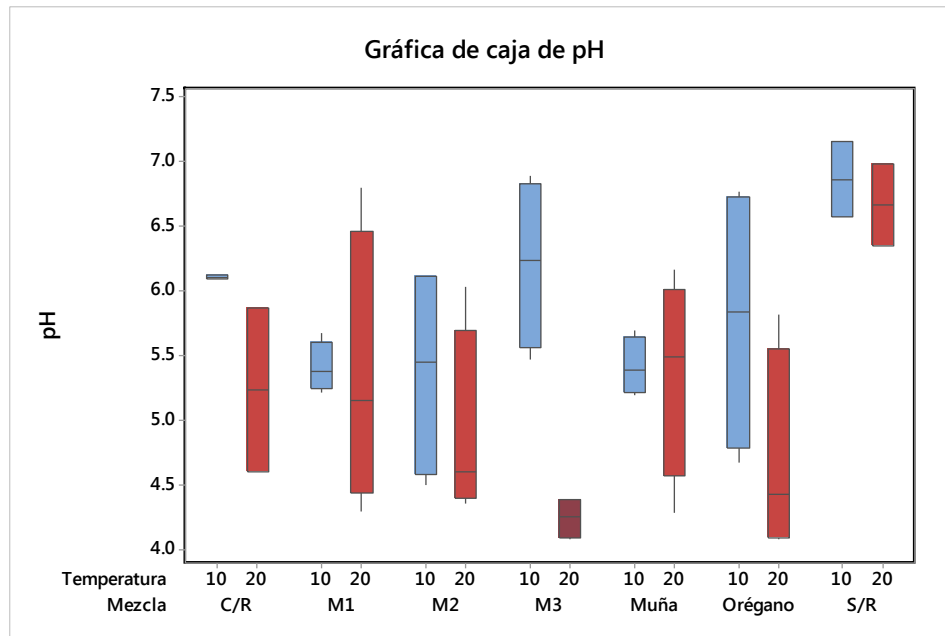


Figura 4.37. Gráfico de caja para los valores de pH en *Carica papaya* (papaya)

Los valores de pH alcanzados en los tratamientos oscilan entre 4.89 y 6.86 para temperaturas de 10°C y entre 4.38 y 6.67 para temperaturas de 20°C, en un estudio de las propiedades fisicoquímicas sobre la madurez de frutos tropicales. Torres R. et al.¹⁰², Menciona valores de pH entre 5.97 +/- 0.03 después de un almacenamiento de 7 días en frutos enteros de papaya Hawaiana, en este estudio el pH muestra una tendencia a Ser mayor en los tratamientos sin recubrimiento, se sabe que al exponer los frutos a operaciones de troceado permitimos que la senescencia se acelere por exposición de los tejidos al oxígeno desatando una serie de reacciones enzimáticas y desarrollo de azúcares, de otro lado Zuhair¹⁰³. Evaluó el cambio de pH de los frutos de *Carica papaya* L. cv. Hongkong, en los que se observó que el pH disminuía según los estadios de maduración iniciándose en valores de 6.20 y llegando a 5.70, Sanudo¹⁰⁴ también estudió los cambios de pH en *Carica papaya* variedad Maradol, estableciendo que los cambios de pH dependen de la variedad y el estadio de maduración. El rango de pH en el que se encuentran nuestras muestras se encuentran dentro de los rangos evaluados por los investigadores citados, sin embargo no podemos afirmar si han aumentado o disminuido debido a que no se tomó los

valores iniciales, pero desde el punto de vista de pH adecuados alcanzados se afirman que los más ácidos preservarían mejor la fruta.

c.2. Pérdida de peso,

Según el análisis de factores, la temperatura y su interacción con

la concentración de microcápsulas influyen en el % de pérdida de peso. La gráfica de efectos principales (Figura 4.38) nos permite ver que hay menor % de pérdida de peso a la temperatura de 10°C y concentración de aceite en microcápsulas al 5% p/p en los recubrimientos, siendo las temperaturas bajas las que evitan mayores pérdidas de peso.

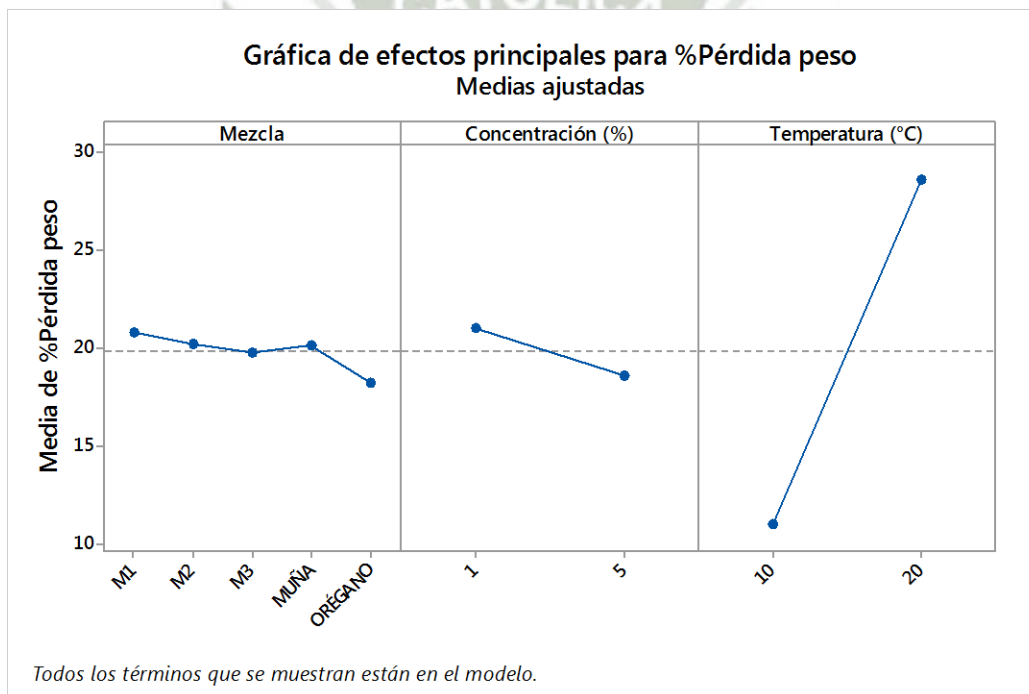


Figura 4.38 Efectos de los factores en papaya de IV gamma

Los análisis de ANOVA unidireccional anidado seguido de prueba de Tukey, incluyendo para los análisis de comparación los controles, a fin de confirmar los hallazgos anteriores, en los que se considera como concentración de microcápsulas igual a 0 de los controles, para evaluar cuál de los tratamientos evito mejor la pérdida de peso se resumen en la Tabla 4.36.

Tabla 4.36. Agrupación de Tukey para %pérdida de peso según temperatura y % Concentración de microcápsulas

TEMPERATURA	% CONCENTRACIÓN	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
20	0	2	34.53	A
	1	5	29.29	B
	5	5	28.048	B
10	1	5	12.804	C
	0	2	11.404	C
	5	5	9.290	C

Fuente: Elaboración propia

De la Figura 4.39 observamos que los tratamientos almacenados a 20°C pierden más peso que los almacenados a 10°C, de los tratamientos almacenados a 20 °C pierden menos peso que los controles a su misma temperatura, en comparación de los almacenados a 10°C donde la pérdida de peso es estadísticamente igual entre los tratamientos y sus controles. La concentración de microcápsulas no es por tanto un factor que evite la pérdida de peso ni mucho menos el tipo de mezcla encapsulado.

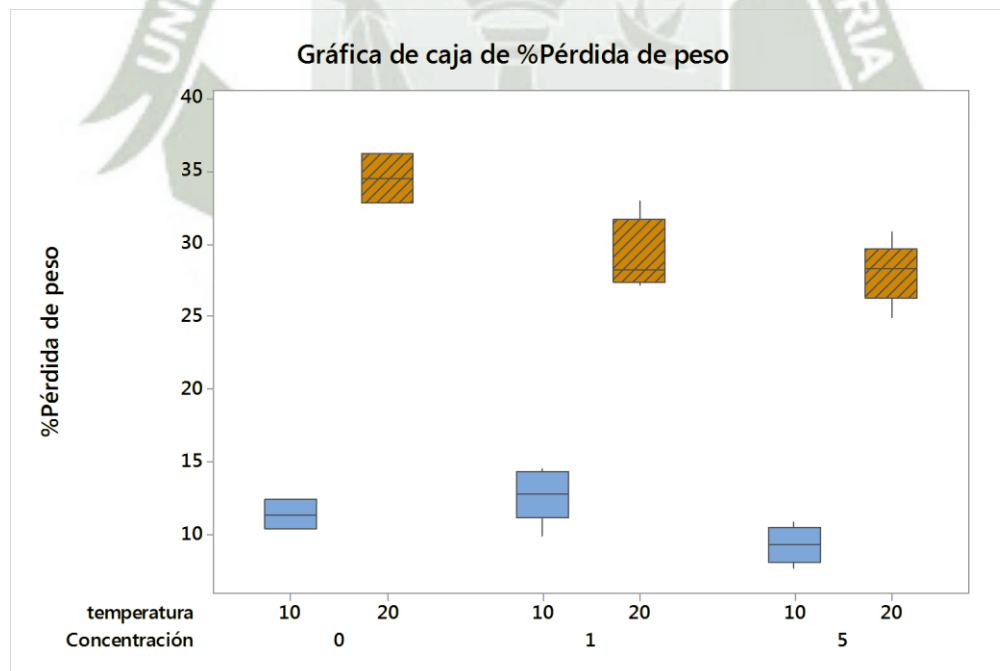


Figura 4.39. Gráfica de caja del %pérdida de peso en *Carica papaya* (papaya)

Finalmente se concluye que los recubrimientos no marcaron diferencia Estadísticamente significativa sobre el % de pérdida de peso, a los 10°C con respecto al control Absoluto, recordando que la pérdida de peso es consecuencia de la evapotranspiración, al cortar los frutos se logró una mayor exposición de área capaz de perder agua⁷⁹, dado que los tratamientos llevan recubrimientos se esperaba que esta pérdida se viera claramente marcada, efecto que no se presentó, lo que se puede explicar afirmando que el efecto de la temperatura sobre la pérdida de peso fue mayor, en refrigeración, contrariamente a lo que se observó a los 20°C donde la pérdida de peso de los tratamientos sin recubrimiento fueron mayores a los que recibieron recubrimientos corroborando los datos teóricos. Almeida ¹⁰⁶, evaluó la pérdida de peso en frutos enteros llegando a 13.36% en frutos sin recubrimiento almacenados a temperatura ambiental de 25°C y con HR de 82%, para nuestros controles a 20°C la pérdida de peso fue de 36.2% más del doble de lo alcanzado en los otros estudios, el almacenamiento en nuestra experiencia no considero crear una atmosfera con humedad controlada, expuesta a las humedades relativas bajas de la ciudad de Arequipa que está alrededor del 30%, lo que favorecería la pérdida de peso por desecación.

c.3. Índice de Madurez.

La prueba del análisis de influencia de los tres factores dio como resultado que solo la temperatura es el único factor que determina una diferencia significativa entre los resultados.

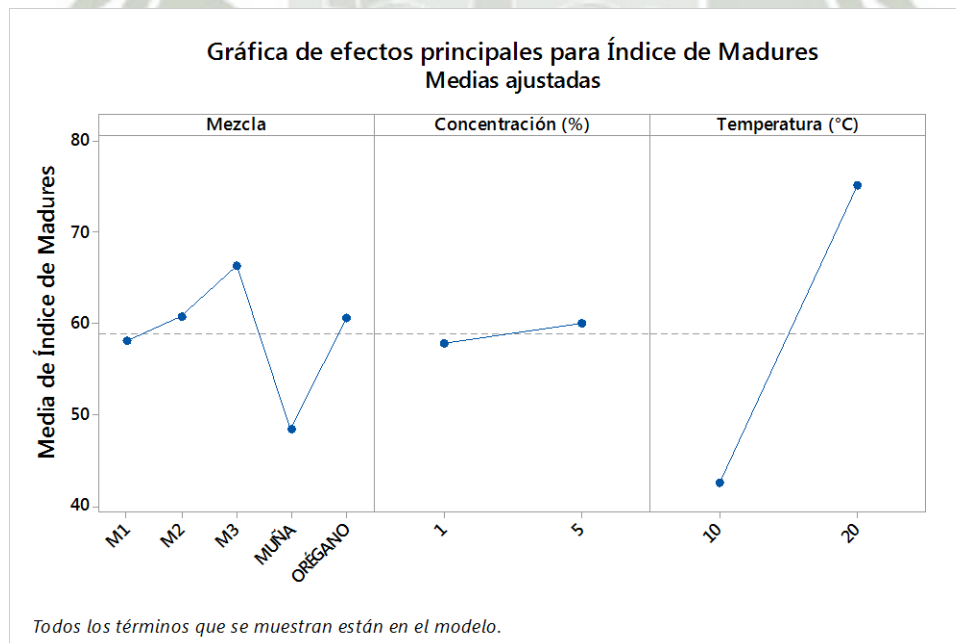


Figura 4.40. Gráfica de efectos de los tres factores de estudio en *Carica papaya* (papaya)

La gráfica de efectos muestra claramente que la temperatura de refrigeración permite mantener los índices de madurez bajos, y dentro de ellos aquellos tratamientos que recibieron microcápsulas de muña en sus recubrimientos.

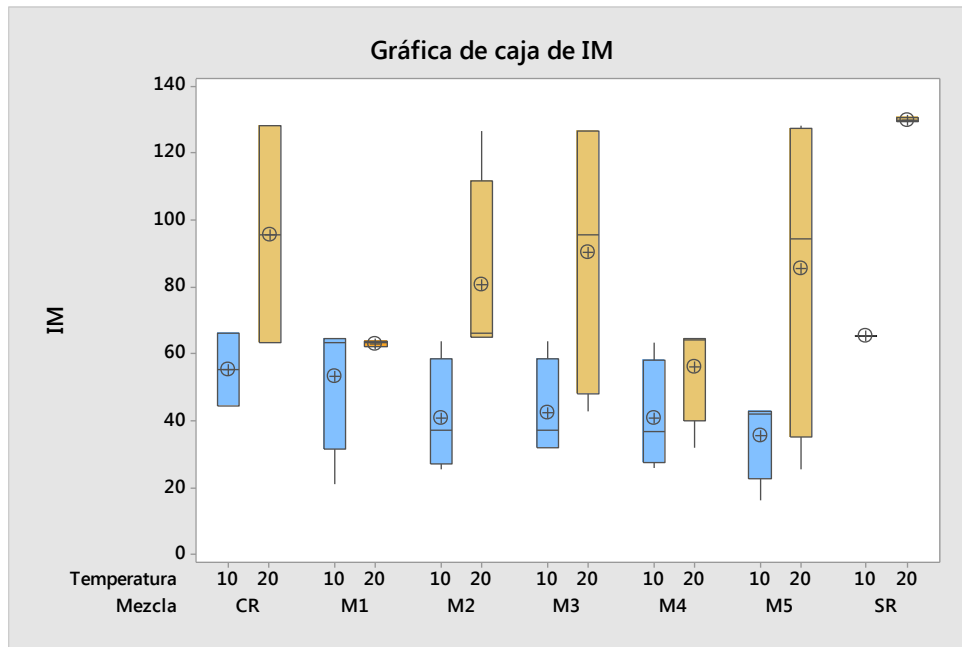


Figura 4.41. Gráfica de cajas de índice de Madurez en *Prunus pérsica*

La prueba de agrupación por Tukey considerando como factor las temperaturas, demostró que a los 10°C se logra un índice de madurez de 42.64 y es menor estadísticamente a los 20°C que llegó a 75.18 en promedio (los valores se pueden observar en los gráficos de efectos), un dato importante a destacar es que los tratamientos con recubrimiento tuvieron IM menores a los tratamientos sin recubrimiento, sin embargo las pruebas realizadas no muestran diferencias estadísticamente significativas. Torres R.¹⁰², en sus evaluaciones observa que el IM inicia el primer día en 44.29 y llega al cabo de 7 días de evaluación a 139.52 en frutas enteras, en comparación con los valores obtenidos en nuestras pruebas que llegan a 130 como índice de madurez, para los tratamientos sin recubrimiento y que los demás están por debajo de este valor podemos decir que hay evidencias de control de la maduración debido a que nuestro tiempo de almacenamiento fue de 5 días, y que dado que el tejido sufrió alteraciones por las acción mecánica del troceado, se esperaba que los índices de madurez fueran mayores a los de una fruta entera.

b) Evaluaciones microbiológicas, Mohos y Bacterias

Tabla 4.37. Concentraciones de Mohos y Bacterias en papaya de IV gamma

TEMPERATURA		10 °C		20 °C	
MEZCLA	CONCENTRACIÓN	BACTERIAS (ufc/g)	MOHOS (ufm/g)	BACTERIAS (ufc/g)	MOHOS (ufm/g)
M1	1	50	90	250	0
M2	1	50	250	200	2700
M3	1	100	0	100	1400
MUÑA	1	50	150	150	1100
ORÉGANO	1	50	0	100	1050
M1	5	0	150	100	0
M2	5	0	700	100	1750
M3	5	50	500	100	0
MUÑA	5	100	300	100	1900
ORÉGANO	5	100	900	100	1250
CONTROL	C/R	400	2650	1400	2750
CONTROL	S/R	300	2300	1150	5600

Fuente: Elaboración propia

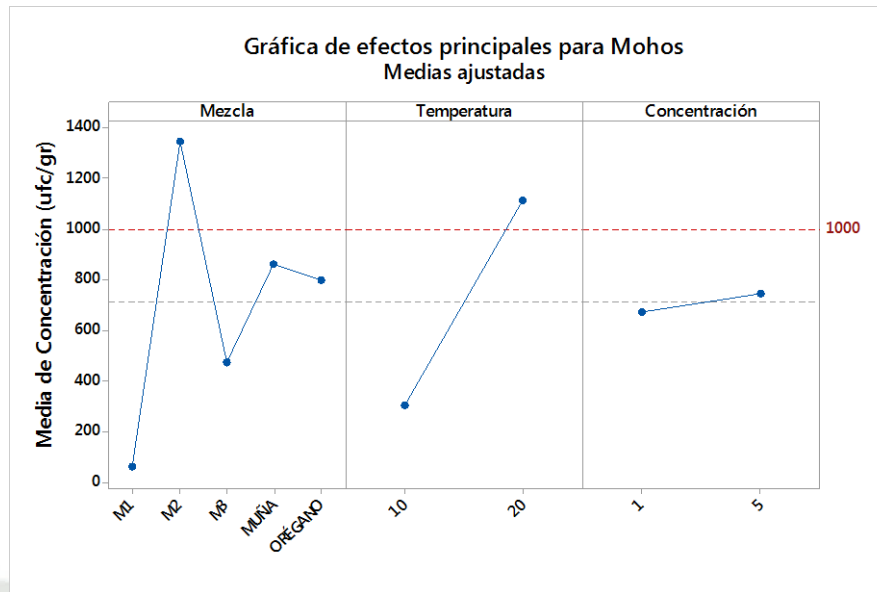
Los análisis factoriales se resumen en la Tabla 4.38

Tabla 4.38. Análisis factoriales de las Concentraciones de Mohos y Bacterias

Variable Respuesta	Factor	Primer análisis factorial p	Segundo análisis factorial	Conclusión
Mohos	Mezcla	0.006	0.000	La temperatura y el tipo de mezcla es el factor de efecto principal
	Concentración	0.718	-	
	Temperatura	0.002	0.000	
	Temp*Mezcla	0.013	0.000	
Bacterias	Mezcla	0.988	0.000	Mezcla y temperatura ejercen efecto significativo en la variable respuesta
	Concentración	0.124	-	
	Temperatura	0.003	0.012	

Fuente: Elaboración propia

b.1. Mohos.



4.42 Gráfica de efectos principales para la concentración de mohos

Los factores de tipo de Mezcla, temperatura y sus interacciones ejercen las diferencias estadísticamente significativas, el ANOVA de dos factores anidados del factor mezcla por temperatura con su consecuente prueba de comparación de Tukey demuestra que los tratamientos en cuyos recubrimientos no hubo microcápsulas y aquellos sin recubrimientos presentan mayor concentración de mohos/g.

Tabla 4. 39. Comparaciones en parejas de Tukey para la Concentración de Mohos en UFM/g, para papaya de IV gamma, según mezcla usada

<i>Mezcla(Temperatura)</i>	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Agrupación</i>
S/R(20)	2	5600	A
C/R(20)	2	2750	B
C/R(10)	2	2650	B C
S/R(10)	2	2300	B C D
M2(20)	4	2225	B C
MUÑA(20)	4	1500	B C D E
ORÉGANO(20)	4	1150	B C D E
M3(20)	4	700	C D E
M2(10)	4	475	D E
ORÉGANO(10)	4	450	D E
M3(10)	4	250	E
MUÑA(10)	4	225	E
M1(10)	4	120	E
M1(20)	4	0	E

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Fuente: Elaboración propia

Además con ayuda de la gráfica afirmamos que los demás tratamientos tienen menores concentraciones, de estos los que recibieron en sus recubrimientos microcápsulas con mezclas M1 y M3 evitan la proliferación de mohos por encima del límite máximo permitido a ambas temperaturas.

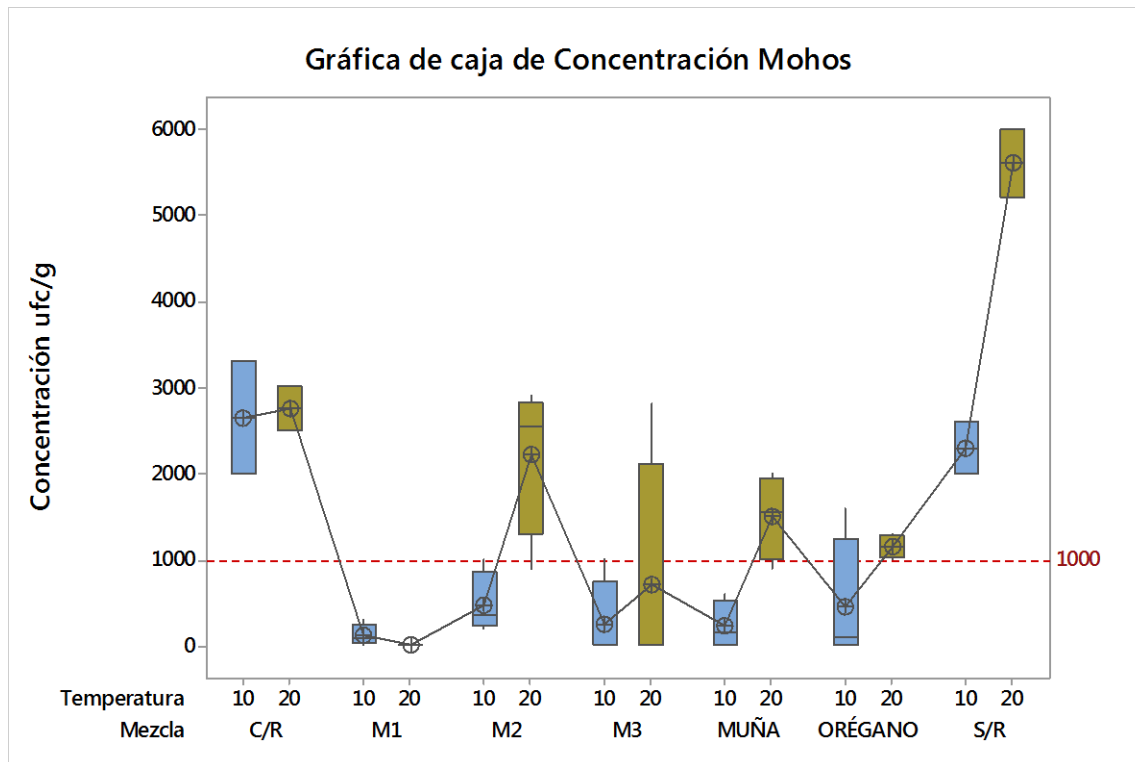


Figura 4.43. Concentración de Mohos (ufc/ g) en papaya de IV gamma, agrupado por Tipo de mezcla y temperatura

b.2. Bacterias.

De los análisis factoriales considerando a temperatura y concentración en los que se incluyen los grupos control se obtuvo la gráfica de efectos principales, en la que se observa que la refrigeración ejerció el control sobre el desarrollo de bacterias y que los recubrimientos sin el agente bioconservante no evitan el desarrollo bacteriano.

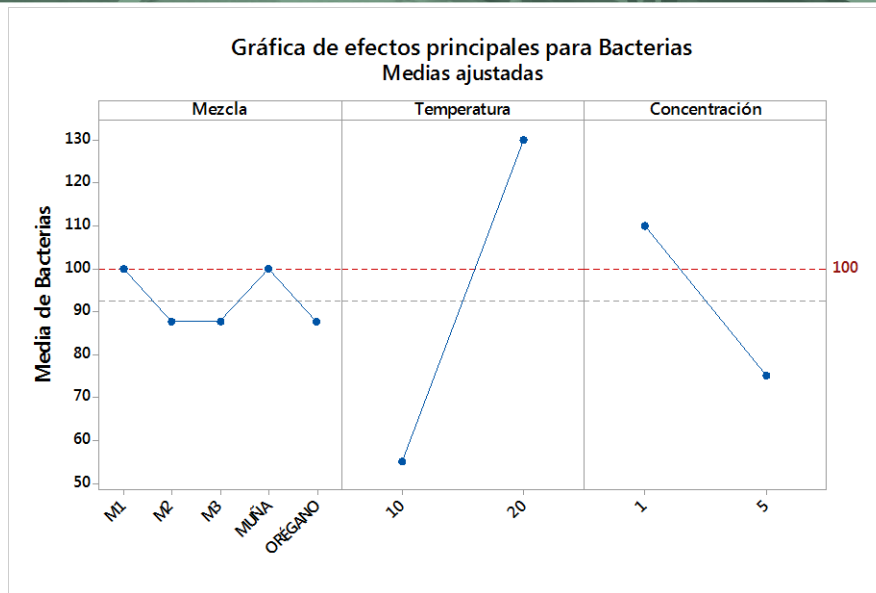


Figura 4.44 Gráfica de efectos principales para la concentración de bacterias

De los análisis factoriales se determinó la agrupación por Tukey considerando los factores mezcla y temperatura la Tabla 4.40 muestra los agrupamientos obtenidos.

Tabla 4.40. Comparación por Tukey de concentración bacterias ufc/g según Mezcla y temperatura

<i>Mezcla(Temperatura)</i>	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Agrupación</i>
C/R(20)	2	1400	A
S/R(20)	2	1150	A
C/R(10)	2	400	B
S/R(10)	2	300	B
M1(20)	4	175	B
M2(20)	4	150	B
MUÑA(20)	4	125	B
M3(20)	4	100	B
ORÉGANO(20)	4	100	B
ORÉGANO(10)	4	75	B
M3(10)	4	75	B
MUÑA(10)	4	75	B
M1(10)	4	25	B
M2(10)	4	25	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Fuente: Elaboración propia

La media alcanzada por el Control con recubrimiento (C/R) es mayor a la del control sin recubrimiento (S/R), no estadísticamente diferentes entre sí a las mismas temperaturas, los frutos con recubrimiento si bien están en alguna medida menos expuestos a los factores ambientales, condiciones oxidativas

entre otros, esta barrera por sí sola no constituye un agente antimicrobiano, por lo que se atribuye efectivamente a las microcápsulas el menor crecimiento bacteriano en los frutos.

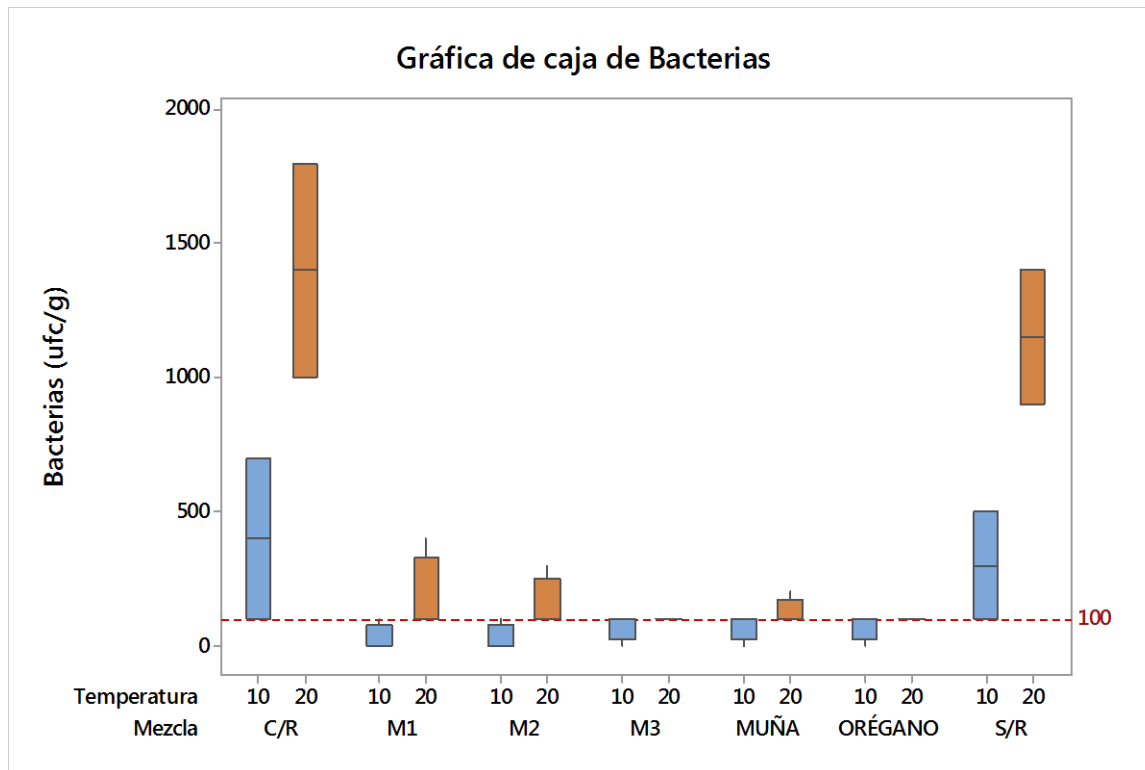


Figura 4.45. Concentración de bacterias en ufc/g en papaya de IV gamma según tipo de mezcla

En este caso se esperaba encontrar una diferencia significativa entre la actividad antimicrobiana representada por las cada uno de los contenidos de las microcápsulas. Diferencia que no es evidente.

Para que el agente antimicrobiano (a. esenciales y /o sus mezclas), ejerza su actividad es necesario la liberación del mismo desde la matriz que lo conserva, dado que las aplicaciones de las microcápsulas fueron sobre una matriz de recubrimiento adicional, la barrera que hay entre el agente activo y la fruta según la distribución que haya alcanzado será en algunos casos de un espesor mayor que otro, lo que fomenta la liberación del agente activo de una manera más controlada y que tenga menos probabilidades de evaporarse, por lo que la actividad antimicrobiana se mantiene por un periodo de tiempo mayor.

Y finalmente los análisis para el factor de tipo de mezcla nos determina que los grupos controles alcanzan una concentración de ufc/g estadísticamente mayores, que sobre pasan el límite máximo permitido en la norma para frutas.

c) Evaluaciones sensoriales

Se evaluó las características de Color y textura según las escalas establecidas en el capítulo de métodos, vamos a detallar los resultados por temperatura.

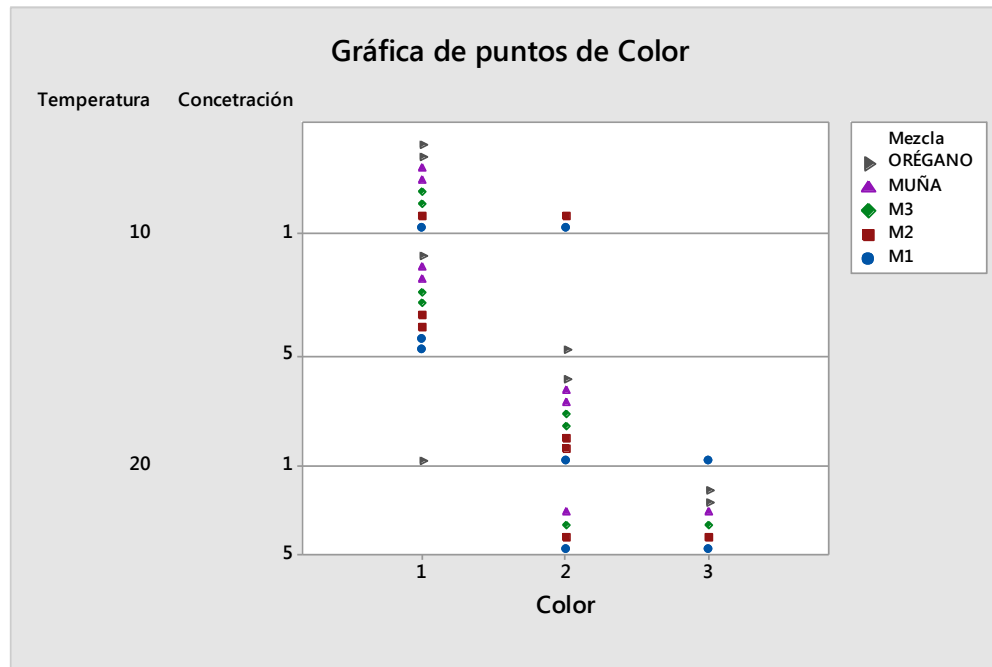


Figura 4.46 Gráfica de puntos para la evaluación sensorial del "Color" en papaya de cuarta gamma

De la evaluación de color las muestras en general a 10°C mantuvieron el color a lo largo de los 5 días de almacenamiento, mientras que a 20 °C el desarrollo de coloraciones diferentes a la característica fue más evidente, mostrándose coloraciones rojizas, dado que como se ha establecido anteriormente el factor que más influye en la conservación es la temperatura, evaluamos la actividad de las mezclas sobre esta característica a la temperatura de 20°C, de donde se infiere que la mezcla de orégano no preserva del desarrollo de color. El cambio de color en las frutas se da por reacciones enzimáticas, menciona que el pardeamiento se da por oxidación de compuesto fenólicos, debido a la presencia de enzimas como la polifenol oxidasa, (PPO)⁷⁹, presencia de cobre y oxígeno, para determinar exactamente el mecanismo que contribuyo al pardeamiento se debería hacer ensayo de la actividad de esta enzima en presencia de los aceites esenciales, y determinar si alguno de ellos la inhibe, pero dado los recubrimientos se creó una barrera entre la superficie activa del fruto y el oxígeno.

La textura se conservó mejor, al igual que el color a refrigeración, el recubrimiento con microcápsulas de M3 a 1% preserva mejor las características, y a 20°C la mayoría de las evaluaciones tuvieron como calificación 3, tanto a 1% como a 5%, por lo que no es exactamente el contenido de las microcápsulas en los recubrimientos lo que evita la pérdida de textura sino más bien el recubrimiento en sí mismo y

como ya se había mencionado la baja humedad del ambiente favorece a la pérdida de agua y por tanto alteración de la textura.

En cuanto a la percepción los recubrimientos lograron que el olor remanente de las microcápsulas se atenuara, sin embargo el grosor alcanzado (no fue caracterizado) en algunas muestras fue mayor, añadiendo sabores no característicos de la papaya, cuando se probaron. Por lo que se debe buscar una técnica de aplicación mejor a fin de mejorar en estos aspectos.

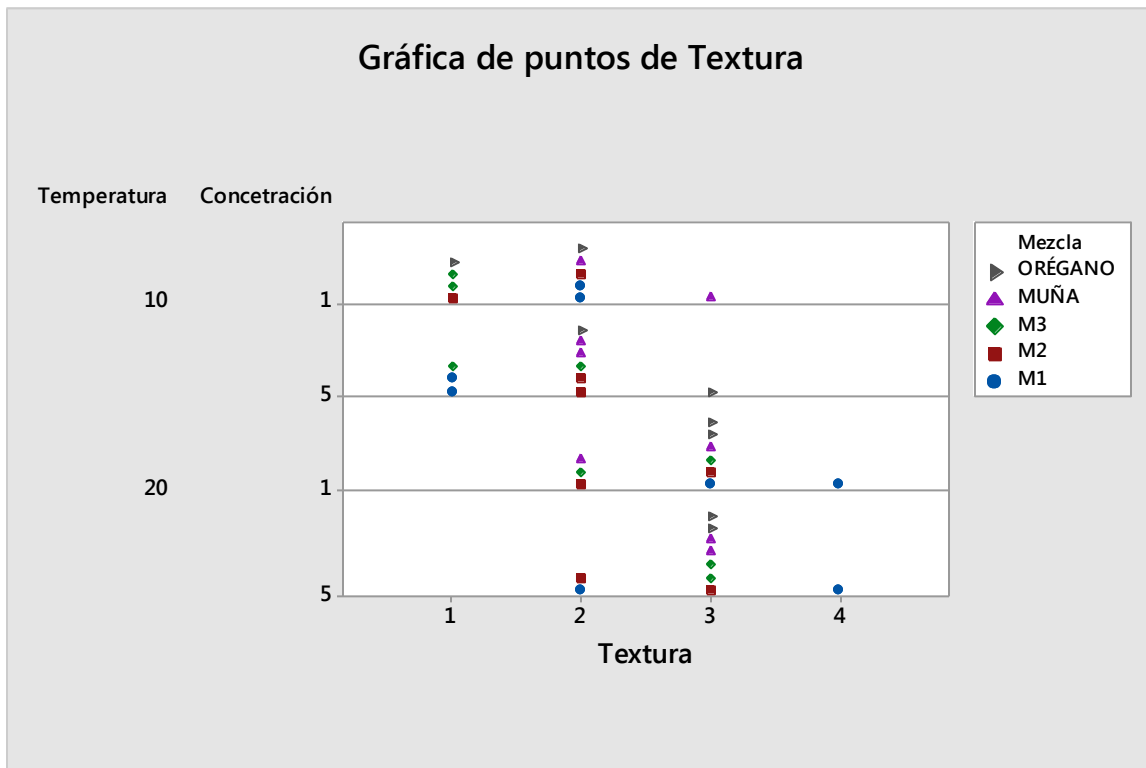


Figura 4.47. Gráfica de puntos para evaluación sensorial de Textura en papaya de cuarta gamma

CAPITULO V

CONCLUSIONES

PRIMERO

Se obtuvo aceite esencial de *Satureja boliviana sub especie Rusby* y de *Oryganum x majoricum camb. Forma laxa* con rendimiento de 1.82% y 2.25% respectivamente. Los principales compuestos del aceite esencial *Satureja boliviana* fueron pulegona 47.01% y p-Mentan-3-ona con 42.43%; mientras que del orégano se obtuvo terpinen-4-ol en un 20.35% y a-terpineno con 16.61%.

SEGUNDO

Se formularon 3 mezclas basadas en los aceites esenciales obtenidos denominadas M1 (25% a.e. muña, 75% a.e. de orégano), M2 (25% a.e. orégano, 75% a.e. muña) y M3 (50% a.e. muña, 50% a.e. orégano). A partir de las mezclas y los aceites esenciales puros se formularon emulsiones al 5% v/v y microcápsulas con rendimiento de microencapsulación del 60% y 6.98% p/p de carga de aceite o mezcla por gramo.

TERCERO

Se evaluó la actividad antimicrobiana de las mezclas y los aceites esenciales puros in vitro. La mezcla 2, M2, controló el crecimiento del consorcio microbiano aislado del fruto de *Prunus pérsica* (durazno) con una tasa de crecimiento $k=-0.0353 \text{ h}^{-1}$, demostrando actividad antimicrobiana frente a *Klebsiella sp* en forma de emulsiones y sobre *Mucor sp* en forma de microcápsulas.

El aceite esencial de orégano controló el crecimiento del consorcio microbiano aislado del fruto de *Carica papaya* (papaya) con una tasa de crecimiento de $k= 0.0150 \text{ h}^{-1}$, demostrando actividad antimicrobiana frente a *Pseudomona sp* y *streptococcus sp* las que desarrollaron sensibilidad de media a alta .en forma de emulsión. *Shiguella sp* y *Alternaria alternata* presentaron sensibilidad media frente a todas las microcápsulas.

CUARTO

Se comprobó que la mezcla M2 y el a.e de orégano aplicados en forma de emulsión 1 vez al día sobre *Prunus pérsica* (durazno) fresco, entero; permite la bioconservación del fruto manteniendo valores de pH ácidos, índice de madurez de 23 - 36, así como el desarrollo de bacterias por debajo de las concentraciones permitidas por parte de M2 y desarrollo de mohos debajo del límite por a.e. orégano.

Se demostró la capacidad de bioconservación en frutos de *Carica papaya* (papaya) bajo presentación de 4ta gamma mediante control del desarrollo de mohos y bacterias por parte de las mezclas M1 y M2 a temperaturas de refrigeración y concentraciones de 1% de microcápsulas en los recubrimientos y la mezcla M3 a la temperatura de 20 °C con 5% de microcápsulas en los recubrimientos.

CAPITULO VI

SUGERENCIAS

Los estudios de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales de *satujeja boliviana* no son muy amplios, por lo que deben ser mejor estudiados y probados con otros microorganismos diferentes a los aislados en este proyecto; además de completar aquellos que por su crecimiento lento o poco abundante no fueron considerados en los estudios in vitro.

En las aplicación in vivo para durazno entero se consideró la aplicación de las emulsiones por atomización, algunos otros estudios fueron llevados a cabo con aplicación de los aceites esenciales como baños previos en soluciones de los agentes antimicrobianos, por lo que esta modalidad de aplicaciones se debería estudiar como una mejora, tomando en cuenta que los aceites esenciales puros son volátiles, lo que debe ser controlado al momento de la aplicación.

Completar los estudios de microencapsulación de los aceites esenciales puros requiere de determinar la tasa de liberación del núcleo de las microcápsulas y corroborar que esta tenga un efecto positivo o negativo sobre el control de microorganismos. A su vez mejorar las técnicas de coacervación, o en su defecto de microencapsulación con otros polímeros y por otras técnicas a fin de evaluar el comportamiento de los resultados aquí obtenidos.

BIBLIOGRAFÍA

1. López Alonso, R., G. Antolin Giraldo, and T. Torres Zapata. 'Tecnología De Envasado Y Conservación De Alimentos'. *Universidad San Martin de Porres*. Recuperado a partir de [http://www.usmp.edu.pe/publicaciones/boletin/fia/info49/articulos/Envasado%20y%20Conservacion%20de%20Alimentos%20\(1\).pdf](http://www.usmp.edu.pe/publicaciones/boletin/fia/info49/articulos/Envasado%20y%20Conservacion%20de%20Alimentos%20(1).pdf) el 10 de Agosto del 2012
2. FRUIT LOGISTICA,. (2012). *Informe de Valor*. Recuperado a partir de <http://media.peru.info/siicex/resources/sectoresproductivos/InfoValor%20Fruit%20Logistica%202012.pdf> el 10 de Agosto del 2012
3. Sapers, g. M., Gorny, j. R., y Yousef, a. E.(2005) *Microbiology of fruits and vegetables*. London: Taylor y Francis Group.
4. Salas Valerio, Francisco W. *DETERIORO E INDICE DE DETERIORO* (1st ed.). Lima: Universidad Agraria La Molina. Recuperado de <http://tarwi.lamolina.edu.pe/~fwsalas/cursos.htm> el 10 de Agosto de 2012
5. Voysey, P. (2000). *Microbial food spoilage* (1st ed.). Campden y Chorleywood Food Research Association. Recuperado de <http://www.nbbcfod.info/foodmatters/documents/146microbialfoo.pdf> el 10 de Agosto del 2012
6. Gonzales Cabrera, M. V.(2010) Conservacion de Mora, Uvilla y Frutilla mediante la utilización del aceite esencial deCanela (Cinnamomun zeynalicum). Tesis para obtener el titulo de Bioquímico Farmacéutico, Escuela superior politecnica de Chiborazo, Chimborazo.
7. Bresmez Llecha, J. *Técnicas de control de calidad en fruta. Tesis doctorales en red*. Recuperado el 18 Octubre 2012, de <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/6877/CAPITOL2.pdf;jsessionid=987A221CA5B296F7DC3601EA7BFE7B0A.tdx1?sequence=2>
8. Rico, D., Martín-Diana, A., Barat, J., & Barry Ryan, C. (2007). Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. *Trends in Food Science &*

Technology, 18(7), 373-386. doi:10.1016/j.tifs.2007.03.011

9. *Bases de la conservación de alimentos*. (2013). Recuperado el 20 Octubre 2012, de <https://melenaramirez.files.wordpress.com/2013/08/tema2-basesconservacion.pdf>
10. King, María. *Spoilage and preservation of food* (1ra edición). Texas: Food quality and standars. Recuperado de <http://www.eolss.net/sample-chapters/c10/e5-08-06-02.pdf> el 18 Octubre 2012
11. Montes, J., y Arévalo, s.(2001).*Determinación del calor de respiración de frutas*.Revista amazónica de investigación, 2(1), 37-37.
12. Litz, R. (Ed.).(2005)*Biotechnology of fruits and nuts crops*.Tropical Research and Education Center, University of florida, CABI Publishing.
13. Australian Government (2008). *The Biology and Ecology of papaya (paw paw), Carica papaya L., in Australia* (1st ed.). Office of the gene technology Regulator. Recuperado de [http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/content/papaya-3/\\$FILE/biologypapaya08.pdf](http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/content/papaya-3/$FILE/biologypapaya08.pdf)
14. García, M. (2010). *Guía técnica del cultivo de la papaya* (1st ed.). arce la libertad: centro nacional de tecnología agropecuaria y forestal “Enrique Álvarez Córdova. Recuperado de <http://www.centa.gob.sv/docs/guias/frutales/GUIA%20CULTIVO%20PAPAYA.pdf>
15. Scotto Espinoza, C. (2010). *Análisis comparativo desde el punto de vista económico y ambiental, la agricultura orgánica, de mercado nacional y de exportación, con las posibles aplicaciones de cultivos transgénicos*. (3rd ed.). Lima: Ministerio del Ambiente. Recuperado de [http://pe.biosafetyclearinghouse.net/consultorias/ovmeconomicoambientalcscotto\(febrero%202011\).pdf](http://pe.biosafetyclearinghouse.net/consultorias/ovmeconomicoambientalcscotto(febrero%202011).pdf)
16. Zavala, M., Tun Suárez, J., Cristóbal Alejo, J., Ruiz Sánchez, E., Gutiérrez Alonso, O., Vázquez Calderón, y otros.(2005) *Control Postcosecha de la Antracnosis en papaya y sensibilidad de Colletotrichum Gloeosporioides (Penz.) Sacc. a fungicidas Organosintéticos*. Universidad Autónoma de Chapingo – Mexico.

17. Salazar Rojas, I.(2007) *Estrategia para posicionar la papaya procedente de Leoncio Prado (Huánuco) en el mercado nacional*. Tesis para optar el grado académico de Magíster en administración con mención en mercadotecnia. UNMSM.
18. Ruiz Merlín, J. *El cultivo del Duraznero en el estado de Oaxaca* (1st ed.). Oaxaca: Agroproduce. Recuperado de <http://www.oeidrus-oaxaca.gob.mx/produce/junio06/contenido.pdf> el 25 de Febrero del 2013
19. Gratacós, E. (s.f.). *El Cultivo de Duraznero Prunus Persica (L.)Batsch*. Apuntes para la catedra de Fruticultura de hoja caduca. Pontificia universidad catolica de valparaiso. (Recuperado el 8 de Octubre de 2012, de <http://www.biblioteca.org.ar/libros/211462.pdf>)
20. García Álvarez, M. (2013). *El melocotón*. CITRIFRUT, 30(1), 67-69. Recuperado de <http://www.fruticulturacubana.co.cu/>
21. Sierra Exportadora, (2013). *Perfil comercial del durazno fresco - Sierra Exportadora*. Recuperado de <http://www.sierraexportadora.gob.pe/perfil-comercial-del-durazno-fresco> el 3 Marzo 2014.
22. Swisscontact Perú,. (2009). *Cultivo de melocotonero. Manual práctico para productores* (1st ed., p. 25). Lima: Swiss contact Perú. Recuperado de http://web01.swisscontact.vserver.apexis.ch/fileadmin/documents/Peru/FOLLETO_CHEVES_MELOCOTON_9_YRMA_20120822.pdf
23. Layne, D., y Bassi, D. (2008). *The peach botany production and uses*. Wallingford, UK: CABI.
24. Velázquez martínez, E.(2012)*Control biológico y químico de monilinia fructicola (wint) honey in vitro agente causal de la pudrición café del fruto de durazno*. Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo(UMICH), Mexico. Recuperado el 8 de octubre de 2012, de <http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/jspui/handle/123456789/5464>
25. Ayuda Proyecto. (28 de Enero de 2009). *AYUDA PROYECTO*. Recuperado el 8 de Octubre de 2012, de <http://www.ayudaproyecto.com/boletin/60.htm>
26. CNP2, E. (2012). *Producción y exportación mundial de duraznos al alza*. *Connuestroperu.com*. Recuperado el 8 October 2012, de

<http://www.connuestroperu.com/economia/27814-produccion-y-exportacion-mundial-de-duraznos-al-alza>

27. Unidad de Vigilancia y Transferencia de Tecnología del Cis Galicia Diseño y Tecnología para el proyecto BIOEMPRENDE. Bioconservación alimentaria. Ferrol, 2010.(Recuperado el 8 de octubre del 2012. http://observatorio.bioemprende.eu/index.php?option=com_content&view=section&layout=t=blog&id=18&Itemid=125&lang=es
28. De la Fuente Salcido, Norma Margarita y Barboza Corona, José Eleazar. (2010) *Inocuidad y bioconservación de Alimentos*.Acta Universitaria, Vol. 20, Núm 1. Universidad de Guanajuato.
29. Kyanko, María V.; Russo, Mara L.; Fernández, Mariela; Pose, Graciela. (2010). *Efectividad del Ácido Peracético sobre la reducción de la carga de Esporas de Mohos causantes de Pudrición Poscosecha de Frutas y Hortalizas*.Información Tecnológica,Vol. 21(4).
30. Amole, O., & Yusuf, O. (2002).THE ANALGESIC EFFECTS OF CHENOPODIUM AMBROSIOIDES.*Nigerian Journal Of Natural Products And Medicine*, 6(1). doi:10.4314/njnpm.v6i1.11690
31. Gómez, Enrique. *Recubrimientos para frutas y hortalizas*. Abril, 2011. www.deccopostharvest.com/.../recubrimientos_frutas_hortalizas.pdf.
32. Figueroa, Jorge; Salcedo, Jairo; Aguas, Yelitza; Olivero, Rafael; Narvaez, German. (2011).*Recubrimientos comestibles en la conservación del mango y aguacate, y perspectiva, al uso del propóleo en su formulación*. Rev. Colombiana cienc. Anim. 3(2).
33. Sánchez González, L., Chiralt, A., Cháfer, M., Vargas, M., & González Martínez, C. (2008). Incorporación de productos naturales en recubrimientos comestibles para la conservación de alimentos. In *VIII Congreso SEAE Bullas 2008*. Recuperado a partir de http://www.agroecologia.net/recursos/publicaciones/publicaciones-online/2009/eventos-seae/cds/congresos/actasbullas/seae_bullas/verd/posters/5%20P.%20CALIDAD/calidad3.pdf

34. Koul, O., Walia, S., y Dhaliwal, G. S. (2008). *Essential oils as green pesticides: potential and constraints*. *Biopesticides International*, 4(1), 63-84.
35. Alton, J., y Alton, A. (2012). *Common essential oils*. *Selfreliantnetwork11.blogspot.com*. Recuperado el 13 October 2012, de <http://selfreliantnetwork11.blogspot.com/2012/05/common-essential-oils.html>
36. Vargas R. Adriana P., Bottia S. Edwin J. (2008) *Estudio de la composición química de los Aceites esenciales de seis especies Vegetales cultivadas en los municipios de Bolívar y el Peñón*. (Título de Grado en Química). Universidad Industrial de Santander.
37. González V. Ángela A. (2004). *Obtención De Aceites Esenciales y Extractos Etanolicos De plantas del Amazonas*. (Tesis para optar el título de ingeniería química). Universidad nacional de Colombia - Sede Manizales, Departamento de Ingeniería Química.
38. Prins, Cláudia L; Viera, Ivo J. C y Freitas, Silvério P.(2010) *Growth regulators and essential oil production*. *Braz. J. PlantPhysiol*, 22(2), 91-102.
39. Diaz Fajardo, O. (2007). *Estudio comparativo de la composición química de los aceites esenciales de Aloysia triphylla LÂ'HER BRITTON cultivada en diferentes regiones de Colombia* (Tesis para optar el título de Licenciado en Química). Escuela de Química. Universidad Nacional de Santander.
40. Yáñez Rueda X, Mancilla, Lugo. L.; Parada Parada, D. (2007). *Estudio del aceite esencial de la cáscara de la naranja dulce (Citrus sinensis, variedad Valenciana) cultivada en Labateca (Norte de Santander, Colombia)*. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*.
41. Azaña E., Isaac L. (2010). *Efectividad Antibacteriana in vitro del aceite esencial de Minthostachys Mollis griseb (muña) sobre bacterias prevalentes en patologías peri apicales crónicas de origen odontológico*. Tesis para optar el título de odontólogo. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
42. Bandoni, A. (2003). *Los recursos vegetales en Latinoamérica. Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores* (2nd ed.). Buenos Aires: CYTED Ciencia y tecnología para el desarrollo.

43. Cerpa Chávez, M. (2007). *Hidrodestilación de Aceites esenciales. Modelado y caracterización* (Tesis para optar grado de doctor en Ingeniera Química). Universidad de Valladolid.
44. Ortuño Sánchez, M. (2006). *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfume*. Orihuela. (alicante). Aiyana Ediciones. Primera Edición.
45. Paredes P., Diego O.; Quinatoa C. Fabián D. (2010) *Desarrollo de un sistema de extracción de aceites esenciales*. Tesis de grado Previa a la obtención del título de: Ingeniero mecánico Riobamba, Ecuador.
46. Raventos S, Merce. (2003). *Industria Alimentaria: tecnologías emergentes*. Editorial UPC. Primera Edicion.Barcelona.
47. Peredo H, Palov L,Lopez G. (2009). *Aceites esenciales: Métodos de extracción*. Departamento de Ingeniería Química y Alimentos. México.
48. Urrunaga Soria, Rosa; Urrunaga Soria, Emma; Acurio Usca, Lourdes. (1994). *Investigación de la satureja boliviana planta medicinal andina*. SITUA. Año 3, N° 5, 57-60.
49. Lizarraga, Emilio; Abdala, Lidia R. (2004). *Compuestos fenólicos mayoritarios en Satureja boliviana (Benth.) Briq.(lamiaceae)*. Acta Farmacéutica Bonaerense, vol. 23, no 2, p. 198-200.
50. Viturro, C. I., Molina, A., Guy, I., Charles, B., Guinaudeau, H. and Fournet.(2000). *A. Essential oils of Satureja boliviana and S. parvifolia growing in the region of Jujuy, Argentina*. Flavour Fragr. J. 15(6), 377–382.
51. Figueroa S, Nelson; Martini T. Estevez; Giménez T, Alberto. (1995). *Propiedades antibacterianas, antimicóticas e insecticidas de aceites esenciales de especies vegetales aromáticas nativas*. BIOFARBO, 4(4), 51-62.
52. Scadaliaris, Melina; Fuentes, E.; Lovey, R. J. (2007). *Dos especies de Lamiáceas comercializadas en Córdoba (Argentina) bajo el nombre de "Peperina"*. MULTEQUINA, 16, 73-81.

53. Klauer García, Dieter. (2009). *Manual técnico de cultivo ecológico de orégano (Origanum sp. L)* (1st ed., p. 58). Arequipa: El taller. Recuperado de <http://file:///C:/Users/GIGABYTE/Dropbox/tesis/aceites/manual-cultivo-ecologico-oregano.pdf>
54. Albado Plaus, E., Sáez Flores, G., y Gabriel Ataucusi, S. (2001). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). *Revista Médica Herediana*, 12(1), 16-19.
55. Salamanca G Mónica A; Sánchez B, Marilly Y. (2009). *Extracción y caracterización de la oleorresina del orégano (origanum vulgare)*. Universidad tecnológica de Pereira Facultad de tecnología Escuela de tecnología química Grupo de oleo química Pereira.
56. Arcila L, C., Loarca P, G., Uribe E., S., & González de Mejía,. (2004). El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos De Nutrición*, 54(1).
57. Quispe Arpasi, D., Matos Chamorro, A., y Quispe Condori, S. (2011). *Microencapsulación de aceites y su aplicación en la industria de alimentos*. Lectura, I CONGRESO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN – IASD UNIVERSIDAD PERUANA UNIÓN.
58. Weinbreck, F., Minor, M., y de Kruif, C. (2004). Microencapsulation of oils using whey protein/gum Arabic coacervates. *Journal Of Microencapsulation*, 21(6), 667-679. doi:10.1080/02652040400008499
59. Parra H, Ricardo A. (2010). *Revisión: Microencapsulación de Alimentos*. Revista Facultad Nacional Agraria de Medellín. 63(2): 5669-5684.
60. Matos Ch., Alfredo; Quispe C, Socrates; Mas Ch., Kevin J.(2011) *Determinación de la Eficiencia de Microencapsulación de Aceite Esencial de orégano (Origanum vulgare) en β -Ciclodextrina*. I congreso nacional de investigación – IASD. Universidad peruana unión, Lima.

61. Lozano Berna, Miguel. (2009). *Obtención De Microencapsulados Funcionales De Zumo De Opuntia Stricta Mediante Secado Por Atomización*. Tesis para optar el título de Ingeniero Técnico Industrial, con especialidad en Química Industrial.
62. Monllor Pérez, Pablo. (2007). *Caracterización de microencapsulados aplicados sobre materiales textiles*. Tesis presentada para lograr el título de Doctor. Universidad politécnica de Valencia.
63. Aranberri, I., Fletcher, P., Binks, B., & Clint, J. (2006). Elaboración y caracterización de emulsiones estabilizadas por polímeros y agentes tensioactivos. *Revista Iberoamericana De Polímeros*, 7(3), 211- 231. Recuperado de <http://www.ehu.eus/reviberpol/pdf/AGO06/aranberri.pdf>
64. Ruiz R. Jacqueline O. (2004). *Caracterización reológica de emulsiones Aceite-en-agua (o/w) estabilizadas con goma de mezquite y quitosano y su efecto en la Permeabilidad de películas comestibles*, Universidad Autónoma Metropolitana México, D. F.
65. Cárdenas, A. (2003). *Emulsiones Múltiples* (2nd ed.). Mérida: Laboratorio de Formulación, Interfases, Reología y Procesos. Recuperado de <http://www.firp.ula.ve/archivos/cuadernos/S277A.pdf>
66. Valcárcel Cases, M., & Gómez Hens, A. (1988). *Técnicas analíticas de separación*. Barcelona: Reverte • .
67. Barquero Quiroz, M. (2006). *Principios y aplicaciones de la cromatografía de gases*. San José • , Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica.
68. Skoog, D., West, D., & Holler, F. (2001). *Fundamentos de química analítica*. Barcelona, Reverte • .
69. Freifelder, D. (2003). *Técnicas de bioquímica y biología molecular*. Barcelona, Reverte.
70. Alvim, I., y Grosso, C. (2010). *Microparticles obtained by complex coacervation: influence of the type of reticulation and the drying process on the release of the core material*. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 30(4), 1069-1076. doi:10.1590/s0101-20612010000400036
71. Barreto, H. (1966). *Liofilización un método de secado para alimentos*. Lima: Instituto

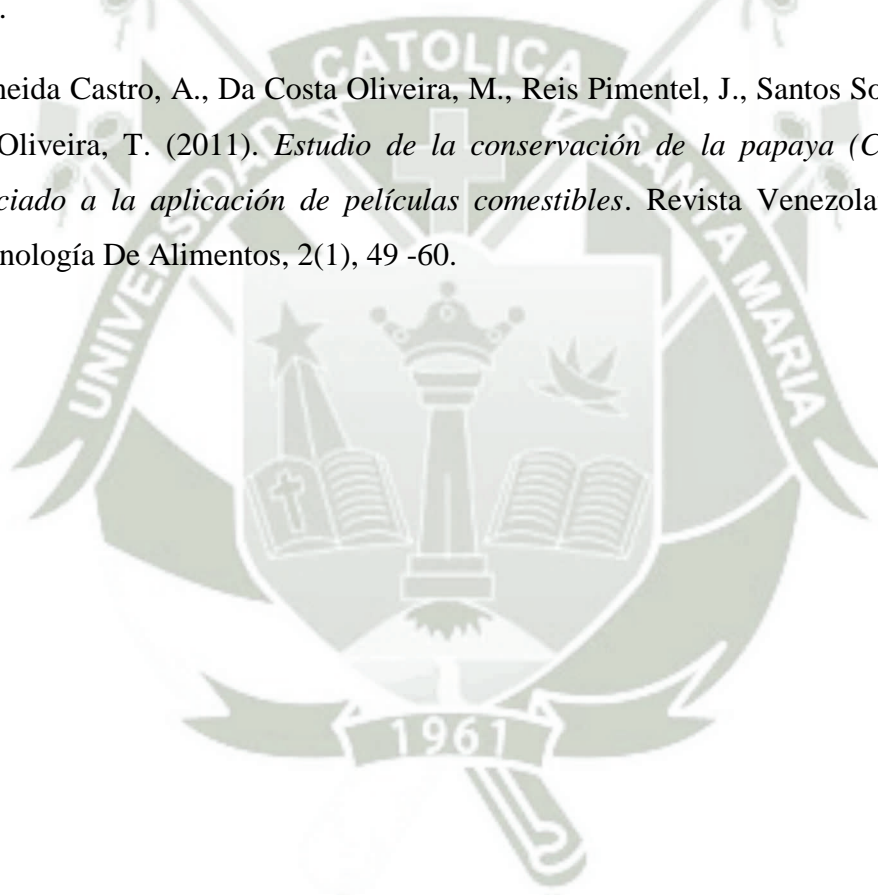
interamericano de ciencias agrícolas de la OEA zona andina.

72. Montoya Villafañe, H. (2008). *Microbiología básica para el área de la salud y afines*. Medellín: Editorial Universidad de Antioquia.
73. Hernández, A., Ileana, A., & Arrieta Ronald, R. (2003). *Microbiología Industrial*. UNED.
74. Stainer R, Ingraham J, Wheels M, Painter P. (1992). *Microbiología*. España. Editorial Reverte S.A.
75. Hernández Albañil, H., & Espejo Mora, E. (2002). *Mecánica de fractura y análisis de falla*. Bogotá •: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Mecánica.
76. Tortora, G., Funke, B., Case, C., & Rotger Anglada, R. (1993). *Introducción a la microbiología*. Zaragoza, Acribia.
77. Vázquez Nin, G., & Echeverría, O. (2000). *Introducción a la microscopia electrónica aplicada a las ciencias biológicas*. México: Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México.
78. *CODEX ALIMENTARIUS. Frutas Y Hortalizas*. (2007) 1st ed. Roma: FAO.
79. Silvana Vero, G. (2015). *Métodos para desinfección de frutas y hortalizas* (1st ed.). Horticom. Recuperado de Horticom, el 16 Junio del 2014, de <http://www.horticom.com/pd/imagenes/64/763/64768.pdf>
80. Horticom, (2015). *Frutas IV gamma*. Recuperado el 16 Junio del 2014, de <http://www.horticom.com/pd/imagenes/64/763/64763.pdf>
81. Freshplaza.es,. (2015). *papaya de IV gama: el uso de ozono no compromete las propiedades antioxidantes*. Recuperado 18 Setiembre 2015, a partir de <http://www.freshplaza.es/article/79506/papaya-de-IV-gama-el-uso-de-ozono-no-compromete-las-propiedades-antioxidantes>
82. Ocampo C, R. (2008). *Curso práctico de química orgánica*. Manizales, Colombia: Universidad de Caldas.
83. Berk, Z. (2009). *Food process engineering and technology* (2nd ed.). San Diego.

84. Gutiérrez, M., y Drogue, M. (2002). *Identificación de compuestos volátiles por GC-MS* (1ra ed.). BOLETÍN INTEXTER (U.P.C.).
85. Agilent,. *Guía de selección de columnas Agilent J&W para GC*. Recuperado 15 September 2015, a partir de <http://www.agilent.com/cs/library/selectionguide/public/5989-6159ES.pdf>
86. Vahapzadeh, F., Zivdar, M., & Najafi, A. (2004). *Microencapsulation of Orange Oil By Complex Coacervation and Its Release Behavior*. IJE Transactions B: Applications, 17(4), 333-342.
87. Ramírez López, Santiago; Quispe Condori, Sócrates; Quito Vidal, Moisés (2010). *Identificación de Mohos Asociados al Deterioro Post Cosecha de Frutos de Cocona (Solanum sessiliflorum Dunal)*. Revista investigación ciencia tecnología de alimentos. 1(1)
88. Dambolena, J., Zunino, M., Lucini, E., Olmedo, R., Banchio, E., Bima, P., y Zygodlo, J. (2010). *Total Phenolic Content, Radical Scavenging Properties, and Essential Oil Composition of Origanum Species from Different Populations*. Journal Of Agricultural And Food Chemistry, 58(2), 1115-1120. doi:10.1021/jf903203n
89. Tabanca T. Özek N., K. H.C. Baser G. Tümen (2004). *Comparison of the Essential Oils of Origanum majorana L. and Origanum x majoricum Cambess*. Journal of Essential Oil Research 16, (3.)
90. Cano Pérez Carlos (2007). *Actividad antimicótica in vitro y elucidación estructural del aceite de esencial de las hojas de Mintostachys mollis muña*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Tesis para optar el grado académico de Magister en recursos vegetales y terapéuticos.
91. Lis, A., Piter, S., y Gora, J. (2007). *A comparative study on the content and chemical composition of essential oils in commercial aromatic seasonings*. Herba Polonica, 53(1), 21 - 26.
92. Ortuño S, Manuel F. (2006). *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfume*. Primera Edición.. Aiyana Ediciones.

93. Siow, L. (2012). *Effect of pH on Garlic Oil Encapsulation by Complex Coacervation.* *J Food Process Technol*, 04 (01). doi:10.4172/2157-7110.1000199
94. Weinbreck F, Minor M, de Kruif CG. (2004). *Microencapsulation of Oils using Whey Protein / Gum Arabic Coacervates.* NIZO food research, PO Box 20, 6710 BA Ede, The Netherlands.
95. Miró Specos, M.M.; Escobar, Germán; Marino, Patricia; Puggia, César; Defain Tesoriero M. Victoria; Hermida, Laura (2010). *Aroma finishing of cotton fabrics by means of microencapsulation techniques.* *Journal of industrial textiles*, Vol. 40, No. 1, 13-32
96. Apsnet.org., *Education Center. Introductory Level Disease Lessons.* Recuperado 12 Setiembre 2014, a partir de <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/Pages/default.aspx>
97. Jiménez Díaz, José A. (2002) *Manual práctico para el cultivo de la papaya hawaiana.* 1ra edición - GUACIMO, CR; Earth. 108 pp.
98. Alzamora, L., Morales, L., Armas, L., & Fernández, G. (2001). *Medicina Tradicional en el Perú: Actividad antimicrobiana in vitro de los Aceites Esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas.* *Anales De La Facultad De Medicina UMSM*, 62(2), 156-161. Recuperado a partir de <http://file:///C:/Users/GIGABYTE/Downloads/4167-13998-1-PB.pdf>
99. Jiamrungraksa, Thichanee, y Charuchinda, Sireerat '*Preparation And Characteristics Of Galangal Essential Oil/Alginate Microcapsules*'. *Journal of Metals, Materials and Minerals* 20.2 (2010): 89-92.
100. García M., Auris Damely. (2006). *Caracterización Física y química de duraznos (Prunus pérsica (L.) Batsch) y efectividad de la refrigeración comercial en frutos acondicionados.* *BIOAGRO*. 18(2), 115 – 121.
101. DIGESA,. (2003). *Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano.* Recuperado 12 Setiembre 2014, a partir de http://www.digesa.sld.pe/norma_consulta/RM%20615-2003MINSAs.pdf

102. Torres, R., Montes, E., Pérez, O., & Andrade, R. (2013). *Relación del Color y del Estado de Madurez con las Propiedades Fisicoquímicas de Frutas Tropicales*. Información Tecnológica, 24(3), 51-56. doi:10.4067/s0718-07642013000300007
103. Zuhair, R., Aminah, A., Sahilah, A., & Eqbal, D. (2013). *Antioxidant activity and physicochemical properties changes of papaya (Carica papaya L. cv. Hongkong) during differen tripening stage*. International Food Research Journal, 20(4), 1653-1659.
104. Sanudo, B. J.A., Siller, C. J., Osuna, E. T., Muy, R. D., Lopez, A. G. and Labavitch, J. (2008). *Control of ripening in fruits of papaya (Carica papaya L.) with 1-methylcyclopropene and 2-chloroethyl phosphonic acid*. Rev. Fitotec. México 31: 141-147.
105. Almeida Castro, A., Da Costa Oliveira, M., Reis Pimentel, J., Santos Souza, D., & Vieira de Oliveira, T. (2011). *Estudio de la conservación de la papaya (Carica papaya L.) asociado a la aplicación de películas comestibles*. Revista Venezolana De Ciencia Y Tecnología De Alimentos, 2(1), 49 -60.



ANEXOS

ANEXO 1. CERTIFICADO DE CLASIFICACIÓN HERBARIUM HUSA



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



"AÑO DE LA INVERSIÓN PARA EL DESARROLLO RURAL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA"

CONSTANCIA Nº 013-2013-HUSA

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

HACE CONSTAR:

Que la muestra presentada por la Srta. **María del Carmen Heredia Chavez**, estudiante de la escuela Profesional de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de San Agustín, para la Ejecución de su Trabajo de investigación denominado: "**Uso de aceites esenciales de Muña y Orégano como conservantes**". Las muestras fueron traídas al Laboratorio de Botánica al estado fresco, de la localidad de Arequipa para su determinación en el *Herbarium Arequipense (HUSA)* y corresponde a la especie:

1. *Satureja boliviana Rusby "muña"*
2. *Oryganum x majoricum Camb. forma laxa*

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



Blgo. Leoncio Mariño Herrera
DIRECTOR
Herbarium Arequipense (HUSA)

Arequipa 31 de Mayo del 2013.

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

ANEXO2. INFORMES DE CROMATOGRAFÍA DE GASES DE LOS ACEITES ESENCIALES



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ +51 54 251210 ANEXO 1166
✉ laboratorioensayoucsm@gmail.com 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Apto. 1350
AREQUIPA - PERU



INFORME DE ENSAYO
N° DE INFORME: ANA27F13.000851A

Nombre del Cliente	: MARIA DEL CARMEN HEREDIA
Dirección del Cliente	: PASAJE N° 1 106 SECTOR LOS JACINTOS
RUC	: NO CORRESPONDE
Condición del Muestreado	: POR EL CLIENTE
Descripción	: ACEITE ESENCIAL DE MUÑA
Tamaño de muestra	: 2,5 mL
Fecha de Recepción	: 27/06/2013
Fecha de Ejecución del ensayo	: 28/06/2013
Fecha de Emisión de Informe	: 02/07/2013
Página	: 1 de 2

I. ANALISIS FISICO – QUIMICO:

ANÁLISIS	RESULTADO
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE METABOLITOS SECUNDARIOS CROMATOGRAFÍA GASEOSA CON DETECCIÓN DE MASAS	<ul style="list-style-type: none"> • Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methyl • 3-Octanol • 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl- • Cyclohexanone, 5-methyl-2-(1-methylethyl)-, • Cyclohexanone, 5-methyl-2-(1-methylethyl)-, • Cyclohexanone, 2-methyl-5-(1-methylethenyl) • Pulegone • Caryophyllene
DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE METABOLITOS SECUNDARIOS (%) CROMATOGRAFÍA GASEOSA CON DETECCIÓN DE MASAS, MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN, POR NORMALIZACIÓN INTERNA (ÁREA)	<ul style="list-style-type: none"> • Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methyl (0,48 %) • 3-Octanol (1,12 %) • 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl- (4,55 %) • Cyclohexanone, 5-methyl-2-(1-methylethyl)-, (28,04 %) • Cyclohexanone, 5-methyl-2-(1-methylethyl)-, (14,39 %) • Cyclohexanone, 2-methyl-5-(1-methylethenyl) (1,81 %) • Pulegone (47,01 %) • Caryophyllene (2,6 %)

OBSERVACIONES:
Este documento al ser emitido sin el símbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por INDECOPI-CRT



Q.F. Ricardo A. Abril Ramirez
CQFDA 00624
JEFE DE LABORATORIO LECC



Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

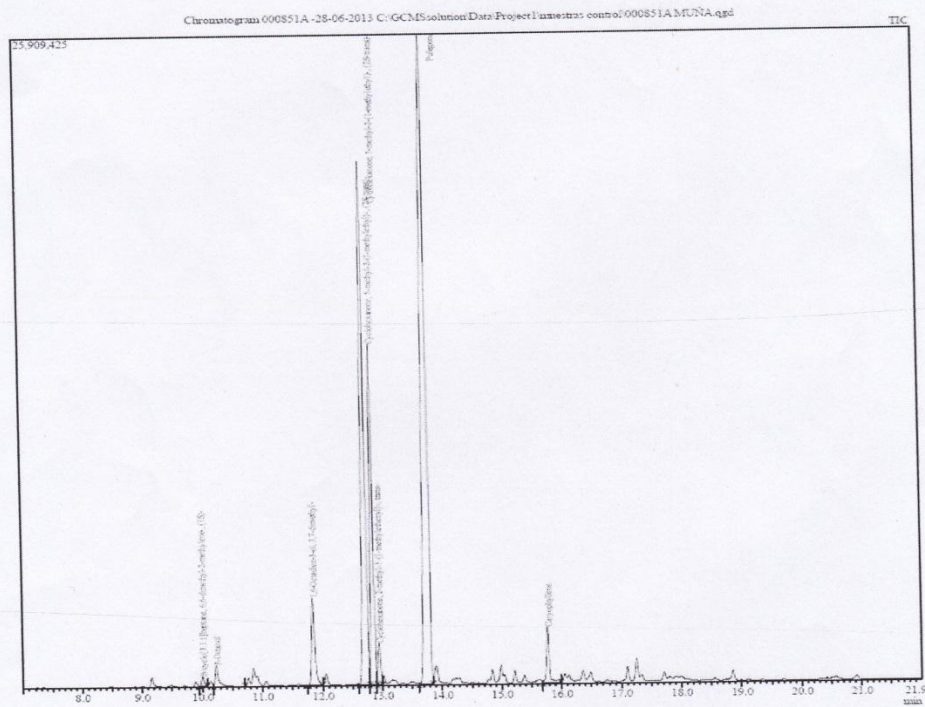


Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ +51 54 251210 ANEXO 1166
✉ laboratorioensayoucsm@gmail.com 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Aptdo. 1350
AREQUIPA - PERU



INFORME DE ENSAYO
N° DE INFORME: ANA27F13.000851A

Nombre del Cliente : MARIA DEL CARMEN HEREDIA
Dirección del Cliente : PASAJE N° 1 106 SECTOR LOS JACINTOS
RUC : NO CORRESPONDE
Condición del Muestreado : POR EL CLIENTE
Descripción : ACEITE ESENCIAL DE MUÑA
Tamaño de muestra : 2,5 mL
Fecha de Recepción : 27/06/2013
Fecha de Ejecución del ensayo : 28/06/2013
Fecha de Emisión de Informe : 02/07/2013
Página : 2 de 2



Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	10.005	9.955	10.063	1413557	0.48	403909	0.59	3.50	V	Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methyl-
2	10.234	10.185	10.705	3318375	1.12	827971	1.20	4.01	SV	3-Octanol
3	11.845	11.750	12.000	13437931	4.55	3481948	5.05	3.86	V	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-
4	12.734	12.605	12.785	82755422	28.04	20844952	30.26	3.97	V	Cyclohexanone, 5-methyl-2-(1-methylethyl)-, (
5	12.851	12.785	12.910	42465022	14.39	13572742	19.70	3.15	V	Cyclohexanone, 5-methyl-2-(1-methylethyl)-, (
6	12.949	12.910	13.000	5339678	1.81	1649033	2.39	5.24	V	Cyclohexanone, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-
7	13.788	13.610	13.850	138743131	47.01	25885263	37.57	5.36	V	Pulegone
8	15.775	15.690	15.990	7665301	2.60	2226010	5.23	3.44	SV	Caryophyllene
				295138417	100.00	68891830	100.00			

Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEÚTICAS, BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD



Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ +51 54 251210 ANEXO 1166
✉ laboratorioensayoucsm@gmail.com 🌐 http://www.uicsm.edu.pe 📄 Aptdo. 1350
AREQUIPA - PERU



INFORME DE ENSAYO
N° DE INFORME: ANA27F13.000851B

Nombre del Cliente : MARIA DEL CARMEN HEREDIA
Dirección del Cliente : PASAJE N° 1 106 SECTOR LOS JACINTOS
RUC : NO CORRESPONDE
Condición del Muestreado : POR EL CLIENTE
Descripción : ACEITE ESENCIAL DE OREGANO
Tamaño de muestra : 10 mL
Fecha de Recepción : 27/06/2013
Fecha de Ejecución del ensayo : 28/06/2013
Fecha de Emisión de Informe : 02/07/2013
Página : 1 de 2

I. ANALISIS FISICO – QUIMICO:

ANÁLISIS	RESULTADO
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE METABOLITOS SECUNDARIOS CROMATOGRAFÍA GASEOSA CON DETECCIÓN DE MASAS	<ul style="list-style-type: none"> • Bicyclo[3.1.0]hexane, 4-methylene-1-(1-methyl-) • beta.-Myrcene • .alpha.-Phellandrene • (+)-4-Carene • Benzene, 1-methyl-3-(1-methylethyl)- • .beta.-Phellandrene • 1,4-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)- • (+)-4-Carene • 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl- • Bicyclo[3.1.0]hexan-2-ol, 2-methyl-5-(1-methyl-) • 3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)- • 3-Cyclohexene-1-methanol, .alpha.,.alpha.,4-t • Benzene, 2-methoxy-4-methyl-1-(1-methylethyl)- • Benzene, 1-methoxy-4-methyl-2-(1-methylethyl)- • 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-, 2-aminoben • Phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)- • Caryophyllene • 1H-Cycloprop[e]azulen-7-ol, decahydro-1,1,7
DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE METABOLITOS SECUNDARIOS (%) CROMATOGRAFÍA GASEOSA CON DETECCIÓN DE MASAS, MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN, POR NORMALIZACIÓN INTERNA (ÁREA)	<ul style="list-style-type: none"> • Bicyclo[3.1.0]hexane, 4-methylene-1-(1-methyl- (2,89 %) • beta.-Myrcene (2,69 %) • .alpha.-Phellandrene (1,69 %) • (+)-4-Carene (8,81 %) • Benzene, 1-methyl-3-(1-methylethyl)- (9,40%) • .beta.-Phellandrene (7,27 %) • 1,4-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl) (16,61%) • (+)-4-Carene (3,21 %) • 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl- (2,11%) • Bicyclo[3.1.0]hexan-2-ol, 2-methyl-5-(1-methyl- (2,74 %) • 3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl) (17,57 %) • 3-Cyclohexene-1-methanol, .alpha.,.alpha.,4-t (2,78 %) • Benzene, 2-methoxy-4-methyl-1-(1-methylethyl) (1,44 %) • Benzene, 1-methoxy-4-methyl-2-(1-methylethyl) (2,75 %) • 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-, 2-aminoben (4,29 %) • Phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)- (9,17 %) • Caryophyllene (3,37 %) • 1H-Cycloprop[e]azulen-7-ol, decahydro-1,1,7 (1,20 %)

OBSERVACIONES:

Este documento al ser emitido sin el símbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por INDECOPI-CRT

Q.F. Ricardo A. Abril Ramirez
CQFDA 00624
JEFE DE LABORATORIO



Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD



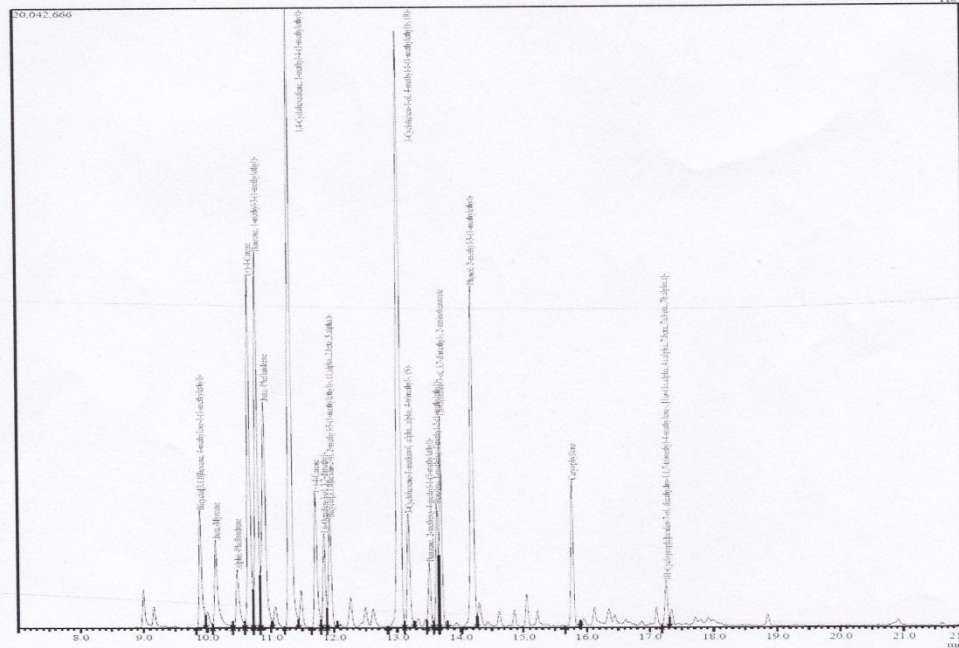
Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ +51 54 251210 ANEXO 1166
✉ laboratorioensayoucsm@gmail.com 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Aptdo. 1350
AREQUIPA - PERU



INFORME DE ENSAYO
N° DE INFORME: ANA27F13.000851B

Nombre del Cliente : MARIA DEL CARMEN HEREDIA
Dirección del Cliente : PASAJE N° 1 106 SECTOR LOS JACINTOS
RUC : NO CORRESPONDE
Condición del Muestreo : POR EL CLIENTE
Descripción : ACEITE ESENCIAL DE OREGANO
Tamaño de muestra : 10 mL
Fecha de Recepción : 27/06/2013
Fecha de Ejecución del ensayo : 28/06/2013
Fecha de Emisión de Informe : 02/07/2013
Página : 2 de 2

Chromatogram 000851B -28-06-2013 C:\GCMS\data\Project1\muestras control\000851B OREGANO.gr4



Peak#	R. Time	I. Time	F. Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	9.900	9.830	9.980	11884518	2.89	3833191	3.10	3.10	V	Bicyclo[3.1.0]hexane, 4-methylene-1-(1-methyl-)
2	10.141	10.085	10.405	11066550	2.69	2854227	2.31	3.88	V	beta-Mircene
3	10.479	10.405	10.590	6971144	1.69	1896606	1.53	3.68	V	alpha-Pinellandrene
4	10.669	10.590	10.730	36293099	8.81	11390238	9.21	3.19	V	(+)-4-Carene
5	10.792	10.730	10.840	38729000	9.40	12164782	9.84	3.18	V	Benzene, 1-methyl-3-(1-methylethyl)-
6	10.910	10.840	11.025	29954432	7.27	7308218	5.91	4.10	V	beta-Pinellandrene
7	11.328	11.225	11.440	68404820	16.61	20025838	16.20	3.42	V	1,4-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-
8	11.716	11.640	11.795	13222509	3.21	4383416	3.55	3.02	V	(+)-4-Carene
9	11.847	11.795	11.890	8673034	2.11	3043913	2.46	2.85	V	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-
10	11.942	11.890	12.050	11278452	2.74	3564121	2.88	3.16	V	Bicyclo[3.1.0]hexan-2-ol, 2-methyl-5-(1-methyl-)
11	13.052	12.850	13.115	72368848	17.57	19242330	15.56	3.76	V	3-Cyclohexene-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-
12	13.185	13.115	13.270	11451953	2.78	3680159	2.98	3.11	V	3-Cyclohexene-1-methanol, alpha, alpha, 4,4-
13	13.515	13.465	13.575	5916145	1.44	2136944	1.73	2.77	V	Benzene, 2-methoxy-4-methyl-1-(1-methylethyl)-
14	13.637	13.575	13.665	11319688	2.75	4016507	3.25	2.82	V	Benzene, 1-methoxy-4-methyl-2-(1-methylethyl)-
15	13.700	13.665	13.800	17677972	4.29	6829667	5.52	2.59	V	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-, 2-aminoben-
16	14.201	14.025	14.265	37745776	9.17	11032817	8.92	3.42	V	Phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-
17	15.781	15.660	15.900	13884368	3.37	4736339	3.83	2.93	V	Caryophyllene
18	17.261	17.185	17.310	4949503	1.20	1499755	1.21	3.30	V	1H-Cycloprop[ε]azulen-7-ol, decalhydro-1,1,1-
				411791808	100.00	123639058	100.00			

Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad

ANEXO 3. PROGRAMACIÓN DEL CROMATOGRAFO DE GASES ASOCIADO A ESPECTOMETRO DE MASAS

```

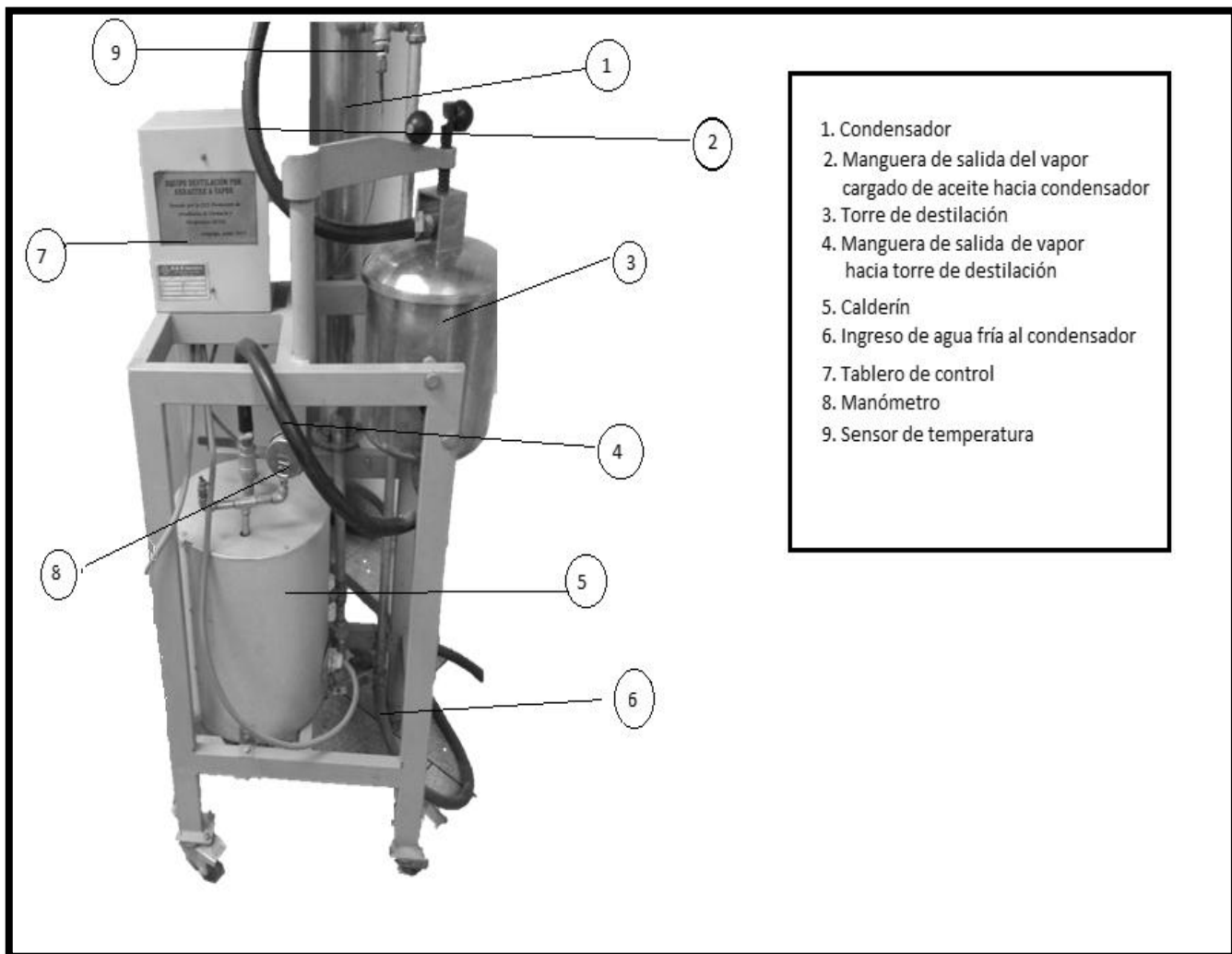
[Comment]
10 mg/10 ml hexano
===== Analytical Line 1 =====
[AOC-20i]
# of Rinses with Presolvent :3
# of Rinses with Solvent(post) :3
# of Rinses with Sample :3
Plunger Speed(Suction) :High
Viscosity Comp. Time :0.2 sec
Plunger Speed(Injection) :High
Syringe Insertion Speed :High
Injection Mode :Normal
Pumping Times :5
Inj. Port Dwell Time :0.3 sec
Terminal Air Gap :No
Plunger Washing Speed :High
Washing Volume :8uL
Syringe Suction Position :0.0 mm
Syringe Injection Position :0.0 mm
Use 3 Solvent Vial :1 vial
[GC-2010]
Column Oven Temp. :50.0 °C
Injection Temp. :240.00 °C
Injection Mode :Splitless
Sampling Time :2.00 min
Flow Control Mode :Pressure
Pressure :24.9 kPa
Total Flow :30.0 mL/min
Column Flow :0.66 mL/min
Linear Velocity :29.6 cm/sec
Purge Flow :3.0 mL/min
Split Ratio :-1.0
High Pressure Injection :OFF
Carrier Gas Saver :OFF
Oven Temp. Program
Rate Temperature(°C) Hold Time(min)
- 50.0 5.00
15.00 240.0 5.00
< Ready Check Heat Unit >
Column Oven : Yes
SPL1 : Yes
MS : Yes
< Ready Check Detector(FTD) >
< Ready Check Baseline Drift >
< Ready Check Injection Flow >
SPL1 Carrier : Yes
SPL1 Purge : Yes
< Ready Check APC Flow >
< Ready Check Detector APC Flow >
External Wait :No
Equilibrium Time :3.0 min
[GC Program]
[GCMS-QP2010 Ultra]
IonSourceTemp :200.00 °C
Interface Temp. :240.00 °C
Solvent Cut Time :5.00 min
Detector Gain Mode :Relative
Detector Gain :0.76 kV +0.00 kV
Threshold :0
[MS Table]
--Group 1 - Event 1--
Start Time :7.00min
End Time :22.00min
ACQ Mode :Scan
Event Time :0.30sec
Scan Speed :1250
Start m/z :40.00
End m/z :400.00
Sample Inlet Unit :GC
Use MS Program :OFF
Configuration Control
<<Instrument>>
Name : Instrument1
ID : 1
Communication : USB
<<GC Configuration>>
Name : GC-2010
GCSerial# : O20524800562AE
GCROMVersion : 2.1000
GCUnitID :
# of Analytical Lines : 1
Gas Pressure Unit : kPa
Save Monitored Value : No
Sampling Period : 1000.00msec
Atomosphre Compensation : No
    
```

GC System On When tuning on the power :
Semi-Auto
System On Mode : None
Max Temp. of Oven : 350.00°C
START TIME : 0.00min
STOP TIME : 0.00min
SLEEP TIME : Not Done
FLOW OFF TIME : Not Done
CRG time : None
Relay : None
OCI/PTV Fan : None
Coolant Consumption of CRG
Column Oven : 100.00min
INJ2 : 100.00min
<<Autosampler>>
AutoInjector : AOC-20i
ROM Version : 3.20
Serial # : C11314815377
Unit ID : Injector Auto
Sampler : None
ROM Version :
Serial # :
Unit ID :
Rack Type : Long
Vial Capa : 1.5mL
Syringe Capa : 10uL
Barcode Reader : None
<<Injection Port>>
Name : SPL1
Injection Unit Type : SPL
Carrier Gas : He
Heater Zone : INJ1
Max Temp : 470.00°C
Flow Unit Type : AFC-2010
Flow Zone : CAR1
Slot : SLOT1
Primary Pressure : 500-900kPa
Purge Flow : 3.00mL/min
Inlet Pressure : 100kPa
Injection Port Maintenance(Septum) :
100times
Injection Port Maintenance(Insert) :
500times
<<Column>>
Name : Rtx-5MS
Serial # :
Thickness : 0.25um
Length : 30.0m

Inside Diameter : 0.25mm
Max Usable Temp : 330°C
Installation Date : 2011/12/13
Description :
<<GC Detector>>

<<MS>>
Name : MS
Detector Type : MS
Serial # : O20524800562AE
ROM Version : 1.02
Model : Dual Stage TMP (Ultra)
Manufacture Year Month : 2011-03
Unit ID :
Heater Zone : DET1
Max Temp : 350.00°C
Ion Source : EI
Ion Source Temp : 200.00°C
Reagent Gas(Port1) : None
Reagent Gas(Port2) : None
TMP1 : 200
TMP2 : 200
RP2 : None
PG : Present
IG : Present
Jet Separator : None
DI : None
Vacuum Unit : Pa
Filament Time : 1000hours
Ion Source Time : 1500hours
Detector Time : 6000hours
RP Time : 15000hours
RP Oil Time : 3000hours
Baseline : 1000
Vacuum Leak(28/69) : 2.00
Intensity Ratio : +-50%
Max Mass Shift : +-0.15u
FWHM : +-0.20u
Det Gain : 2.50kV
Max Mass Shift after Tuning : +-0.15u
<<Additional Heater>>
<<Additional Flow>>
<<Other Units : 0>>

ANEXO 4: EQUIPO DE DESTILACION POR ARRASTRE DE VAPOR



ANEXO 4. DESCRIPCION DE MEDIOS DE CULTIVO MICROBIOLÓGICOS

4.1 CALDO NUTRITIVO

Medio de cultivo utilizado para propósitos generales, para el desarrollo de microorganismos con escasos requerimientos nutricionales. Su uso está descrito en muchos procedimientos para el análisis de alimentos, aguas y otros materiales de importancia sanitaria.

Fundamento

Medio no selectivo, contiene pluripeptona y extracto de carne que constituyen la fuente de carbono y nitrógeno necesarios para el adecuado desarrollo bacteriano. Puede ser utilizado además, como preenriquecimiento en la búsqueda de *Salmonella* spp. a partir de alimentos, ya que permite recuperar células dañadas, diluir metabolitos tóxicos y sustancias inhibitorias.

Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Pluripeptona	5.0	Emplear 8 g de polvo por litro de agua destilada. Si es necesario, calentar hasta disolver. Distribuir y esterilizar en autoclave a 118-121°C durante 15 minutos.
Extracto de carne	3.0	
pH final: 6.9 ± 0.2		

Siembra

Por inoculación directa de la muestra o del microorganismo en estudio.

Incubación

En aerobiosis, a 35-37 °C durante 24 horas.

Resultados

Examinar los tubos para evaluar el crecimiento por turbiedad. Cuando sea necesario, subcultivar en medios sólidos apropiados y realizar la identificación bioquímica.

Microorganismos	Crecimiento
P. mirabilis ATCC 43071	Bueno
E. coli ATCC 25922	Bueno
S. aureus ATCC 25923	Bueno
S. epidermidis ATCC 14990	Bueno
S. typhimurium ATCC 14028	Bueno
P. aeruginosa ATCC 27853	Bueno

Características del medio

Medio preparado: ámbar claro

Almacenamiento

Medio deshidratado: a 10-35 °C.

Medio preparado: a 2-8 °C.



4.2 AGAR SABOURAUD

Medio utilizado para el aislamiento, identificación y conservación de hongos patógenos y saprófitos. También es útil para el cultivo de levaduras.

Fundamento

Medio de cultivo recomendado para el aislamiento y desarrollo de hongos, particularmente los asociados con infecciones cutáneas (piel, pelo, etc.).

En el medio de cultivo, la pluripectona y la glucosa, son los nutrientes para el desarrollo de microorganismos. El alto contenido de glucosa, la presencia de cloranfenicol y el pH ácido, favorecen el crecimiento de hongos por sobre el de bacterias.

Además, al medio de cultivo, pueden agregarse otros agentes selectivos de crecimiento.

Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Pluripeptona	10.0	Suspender 65 g del polvo por litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar hasta uniformar. Calentar agitando frecuentemente y hervir 1 minuto hasta disolver. Distribuir y esterilizar 15 minutos a 118-121°C. Mantener en lugar fresco, pues la exposición al calor hidroliza los componentes. Distribuir en placas o en tubos con cierre hermético
Glucosa	40.0	
Cloranfenicol	0.05	
Agar	15.0	
pH final: 5.6 ± 0.2		

Siembra

Depende del uso, puede ser tanto en tubo como en placa. Consultar referencias de métodos recomendados.

Incubación

El tiempo de incubación dependerá del microorganismo que se esté buscando aislar.

Resultados

Microorganismos	Crecimiento
Saccharomyces cerevisiae	Bueno
Aspergillus niger	Bueno
Candida albicans ATCC 10231	Bueno

Características del medio

Medio preparado: ámbar claro, ligeramente opalescente sin ningún precipitado.

Almacenamiento

Medio deshidratado: a 10-35 °C.

Medio preparado: a 2-8 °C.



4.3 E.M.B. AGAR.

Este medio (también denominado E.A.M.) es utilizado para el aislamiento selectivo de bacilos Gram negativos de rápido desarrollo y escasas exigencias nutricionales. Permite el desarrollo de todas las especies de la familia Enterobacteriaceae.

Fundamento

Este medio combina las fórmulas de Holt-Harris y Teague con la de Levine, para obtener un mejor rendimiento en el aislamiento selectivo de enterobacterias y otras especies de bacilos Gram negativos. La diferenciación entre organismos capaces de utilizar la lactosa y/o sacarosa, y aquellos que son incapaces de hacerlo, está dada por los indicadores eosina y azul de metileno; éstos ejercen un efecto inhibitorio sobre muchas bacterias Gram positivas. Muchas cepas de *Escherichia coli* y *Citrobacter spp.* Presentan un característico brillo metálico. Las cepas que utilizan la lactosa poseen centro oscuro con periferia azulada o rosada, mientras que las que no lo hacen son incoloras.

Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Peptona	10.0	Suspender 36 g del polvo en un litro de agua destilada. Reposar 5 minutos; mezclar, calentando a ebullición durante 1 o 2 minutos hasta su disolución. Esterilizar en autoclave a no más de 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 45°C y distribuir agitando suavemente.
Lactosa	5.0	
Sacarosa	5.0	
Fosfato dipotásico	2.0	
Agar	13.5	
Eosina	0.4	
Azul de metileno	0.065	
pH final: 7.2 ± 0.2		

Siembra

En superficie, por estriado a partir de un inóculo poco denso, para obtener colonias aisladas.

En profundidad, para favorecer el desarrollo de clamidiosporas.

Incubación

De 24 a 48 horas a 35-37 °C, en aerobiosis.

Resultados

Microorganismos	Tipo de Colonia
Escherichia coli ATCC 25922	Verdosas con brillo metálico y centro negro azulado
Klebsiella pneumoniae ATCC 700603	Mucosas, rosa púrpura, confluentes
Proteus mirabilis ATCC 43071	Incoloras
Enterococcus faecalis ATCC 29212	Incoloras, pequeñas, puntiformes
Shigella flexneri ATCC 12022	Incoloras
Salmonella typhimurium ATCC 14028	Incoloras

Características del medio:

Placas preparadas: color púrpura.

La esterilización del medio de cultivo reduce el azul de metileno al color naranja. El color púrpura se restaura por agitación. La presencia de un precipitado en el medio esterilizado es normal y no debe ser removido, ya que es parte esencial del mismo.

Almacenamiento:

Medio deshidratado: a 10-35 °C.

Medio preparado: a 2-8 °C.



4.4 AGAR CETRIMIDE

Medio utilizado para el aislamiento selectivo de *Pseudomonas aeruginosa* y de otras especies del género.

Fundamento

La fórmula de este medio está desarrollada para favorecer la selección de *P. aeruginosa* y estimular la formación de pigmentos. Es éste un medio muy semejante al King A, en el cual el cloruro de magnesio y el sulfato de potasio promueven la formación de piocianina, pioverdina y piomelanina de *P. aeruginosa*. La cetrimida es un detergente catiónico que actúa como agente inhibidor, libera el nitrógeno y el fósforo de las células de casi toda la flora acompañante, aunque inhibe también algunas especies de *Pseudomonas*.

Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Peptona de gelatina	20.0	Suspender 45,3 g del polvo por litro de agua destilada. Agregar 10 ml de glicerina. Dejar reposar 5 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante 1 minuto. Distribuir en tubos o frascos y esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C.
Cloruro de magnesio	1.4	
Sulfato de potasio	10.0	
Agar	13.6	
Cetrimida	0.3	
pH final: 7.2 ± 0.2		

Siembra

En superficie, por inoculación directa de la muestra o a partir de un caldo de enriquecimiento (Cerebro Corazón Infusión o Tripteína Soya Caldo).

Incubación

De 24 a 48 horas a 35-37 °C, en aerobiosis.

Resultados

Microorganismos	Crecimiento
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Bueno - excelente
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Inhibido

Staphylococcus aureus ATCC 25923	Inhibido
----------------------------------	----------

Características del medio:

Medio preparado: ámbar claro, opalescente con precipitado.

Almacenamiento:

Medio deshidratado: a 10-35 °C.

Medio preparado: a 2-8 °C.



4.5 AGAR MANITOL SALADO

Medio de cultivo selectivo y diferencial, utilizado para el aislamiento y diferenciación de estafilococos. Es recomendado para el aislamiento de estafilococos patogénicos a partir de muestras clínicas, alimentos, productos cosméticos y otros materiales de importancia sanitaria.

Fundamento

Se trata de un medio altamente selectivo debido a su alta concentración salina. Los estafilococos coagulasa positiva hidrolizan el manitol acidificando el medio; las colonias aparecen rodeadas de una zona amarilla brillante. Los estafilococos coagulasa negativos, presentan colonias rodeadas de una zona roja o púrpura. Las colonias sospechosas, se repicarán en un medio sin exceso de cloruro de sodio para efectuarles, posteriormente, la prueba de la coagulasa.

En el medio de cultivo, el extracto de carne y la pluripeptona, constituyen la fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales, el manitol es el hidrato de carbono fermentable, el cloruro de sodio (que se encuentra en alta concentración) es el agente selectivo que inhibe el desarrollo de la flora acompañante, y el rojo fenol es el indicador de pH.

Las bacterias que crecen en un medio con alta concentración de sal y fermentan el manitol, producen ácidos, con lo que se modifica el pH del medio y vira el indicador de pH del color rojo al amarillo.

Los estafilococos crecen en altas concentraciones de sal, y pueden o no fermentar el manitol. Los estafilococos coagulasa positiva fermentan el manitol y se visualizan como colonias amarillas rodeadas de una zona del mismo color.

Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Extracto de carne	1.0	Suspender 111 g de polvo por litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 o 2 minutos. Distribuir y esterilizar en autoclave a 118-121°C durante 15 minutos.
Pluripeptona	10.0	
d-Manitol	10.0	
Cloruro de sodio	75.0	
Agar	15.0	
Rojo de fenol	0.025	
pH final: 7.4 ± 0.2		

Siembra

Sembrar en superficie un inóculo denso de la muestra.

Incubación

De rutina: durante 18-24 horas a 35-37 °C, en aerobiosis.

La American Public Health Association (A.P.H.A) recomienda la incubación durante 3 días a 32 °C, en aerobiosis.

Resultados

Microorganismos	Crecimiento	Características de las colonias
Staphylococcus aureus ATCC 25923	Excelente	Amarilla
Staphylococcus epidermidis ATCC 14990	Bueno	Roja
Escherichia coli ATCC 25922	Inhibido	Inhibido
Klebsiella pneumoniae ATCC 700603	Inhibido	Inhibido

Características del medio

Medio preparado: rojo

Almacenamiento:

Medio deshidratado: a 10-35 °C.

Medio preparado: a 2-8 °C.

4.6 SALMONELLA SHIGELLA AGAR.

Medio de cultivo utilizado para el aislamiento de Salmonella spp. y de algunas especies de Shigella spp. A partir de heces, alimentos y otros materiales en los cuales se sospeche su presencia.

Fundamento

Es un medio de cultivo selectivo y diferencial. La selectividad, está dada por las sales biliares y el verde brillante, que inhiben el desarrollo de bacterias Gram positivas, de la mayoría de los coliformes.

Es diferencial debido a la fermentación de la lactosa, y a la formación de ácido sulfhídrico a partir del tiosulfato de sodio.

Los pocos microorganismos fermentadores de lactosa capaces de desarrollar, acidifican el medio haciendo virar al rojo el indicador de pH, obteniéndose colonias rosadas o rojas sobre un fondo rojizo. Salmonella, Shigella y otros microorganismos no fermentadores de lactosa, crecen bien en el medio de cultivo, y producen colonias transparentes.

La producción de ácido sulfhídrico se evidencia como colonias con centro negro debido a la formación de sulfuro de hierro.

Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Pluripeptona	5.0	Suspender 60 g del polvo por litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar hasta homogeneizar. Calentar a ebullición durante 2 o 3 minutos. NO ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE. Enfriar a 45-50°C y distribuir unos 20 ml por placa. Secar la superficie del medio unos minutos en la estufa.
Extracto de carne	5.0	
Lactosa	10.0	
Mezcla de sales biliares	8.5	
Citrato de sodio	8.5	
Tiosulfato de sodio	8.5	
Citrato férrico	1.0	
Agar	13.5	
Verde brillante	0.00033	
Rojo neutro	0.025	
pH final: 7.0 ± 0.2		

Siembra

Sembrar por estriado la superficie del medio de cultivo.

Incubación

Durante 24-48 horas a 35-37 °C, en aerobiosis.

Resultados

Microorganismos	Colonias
Salmonella typhimurium ATCC 14028	Transparentes, centro negro
Shigella flexneri	Incoloras
Shigella sonnei	Incoloras
Proteus mirabilis ATCC 43071	Transparentes, centro negro
Escherichia coli ATCC 25922	Rosadas a rojas
Klebsiella pneumoniae ATCC 700603	Rosadas cremosas y mucosas
Enterococcus faecalis ATCC 29212	Incoloras, de muy escaso crecimiento

Características del medio

Medio preparado: rojo naranja.

Almacenamiento:

Medio deshidratado: a 10-35 °C.



4.7 PAPA GLUCOSA AGAR.

Medio de cultivo utilizado para el aislamiento y recuento de hongos y levaduras en muestras clínicas, alimentos, cosméticos y otros materiales.

Fundamento

Tanto la glucosa presente como la infusión de papa favorecen el desarrollo exuberante de hongos y levaduras, mientras que el desarrollo bacteriano es inhibido con el agregado de ácido tartárico luego de la esterilización hasta alcanzar un pH: 3.5 ± 0.2 . Una vez agregado el ácido no se puede recalentar ya que el agar se hidroliza.

Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Infusión de papa	4.0	Disolver 39 g de polvo en un litro de agua destilada. Dejar reposar 5 minutos. Calentar hasta ebullición con agitación continua. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Si se desea ajustar el pH a 3.5 agregar aproximadamente 14 ml de una solución estéril de ácido tartárico al 10 %, cuando el agar se encuentra entre $45-50^{\circ}\text{C}$.
Glucosa	20.0	
Agar	15.0	
pH final: 5.6 ± 0.2		

Siembra

- Técnica De Pour Plate: sembrar 0.1 o 1 ml y agregar 15 ml del Papa Glucosado Agar fundido y enfriado a $45-50^{\circ}\text{C}$
- En superficie: por estriado

Incubación

En aerobiosis, a $22-25^{\circ}\text{C}$ ó $30-32^{\circ}\text{C}$ según el método seguido, durante 5 días o mayor tiempo.

Resultados

Microorganismos	Crecimiento
Aspergillus niger	Bueno
Candida albicans	Bueno
Sacharomyces cerevisiae	Bueno

Características del medio

Medio preparado: ámbar claro ligeramente opalescente.

Almacenamiento:

Medio deshidratado: a 10-35 °C.

Medio preparado: a 2-8 °C.



/4.8 AGAR MUELLER HINTON

Este medio de cultivo ha sido recomendado universalmente para la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos. Además es útil con el agregado de sangre para el cultivo y aislamiento de microorganismos nutricionalmente exigentes.

Fundamento

Medio de cultivo nutritivo no selectivo que promueve el desarrollo microbiano. El Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), recomendó su uso en forma rutinaria para la realización del antibiograma en medio sólido, debido a una serie de factores que se detallan a continuación: presenta buena reproducibilidad lote a lote en las pruebas de sensibilidad, su contenido en inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina es bajo, la mayoría de los patógenos crece satisfactoriamente y una gran cantidad de datos han sido evaluados y avalados usando este medio de cultivo.

Cuando se suplementa con sangre de carnero al 5%, es útil para realizar las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en especies de estreptococos.

Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Infusión de carne	300.0	Suspender 37 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Dejar embeber de 10 a 15 minutos. Calentar con agitación frecuente y hervir durante 1 minuto. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 45°-50°C y distribuir a cajas de Petri (o agregar los suplementos que se desee) hasta un nivel de 4 mm sobre una superficie horizontal (25-30 ml en placas de 9 cm de diámetro).
Peptona ácida de caseína	17.5	
Almidón	1.5	
Agar	15.0	
pH final: 7.3 ± 0.1		

Siembra

Siembra Hisopado en superficie. El inóculo microbiano dependerá del grupo microbiano o microorganismo en estudio.

Incubación

La atmósfera, el tiempo y temperatura de incubación dependerán del grupo microbiano o microorganismo en estudio.

Características del medio

Medio preparado: ámbar.

Almacenamiento

Medio deshidratado: a 10-35 °C.

Medio preparado: a 2-8 °C.



ANEXO 5. DIAGRAMAS PARA INTERPRETACION E IDENTIFICACION DE ENTEROBACTERIAS FRECUENTES AISLADAS EN CLINICA

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

K = alcalino
 A = ácido
 R = rojo
 N = neutro
 ± = enteropatógenas importantes
 (*) Ver texto

Fuente: Jave Marquez, Mercedes. Guía de prácticas de Microbiología I, 2009.



ANEXO 6: DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA IDENTIFICACION DE COCOS GRAM POSITIVOS

