

**UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE
APURÍMAC**

FACULTAD DE INGENIERÍA

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL**



**“CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA
DEL ACEITE ESENCIAL DE LAUREL (*Laurus nobilis*) EN HONGOS
AISLADOS DE TALLARINES DE CASA”**

TESIS

PRESENTADO POR:

Bach. MARCIA VALVERDE CABALLERO

**PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO
AGROINDUSTRIAL**

ABANCAY - PERÚ

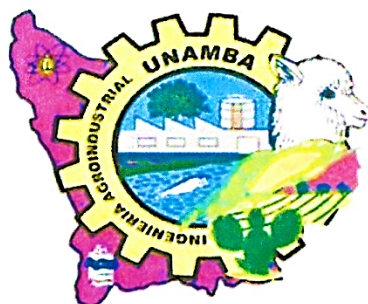
2019



UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



TESIS

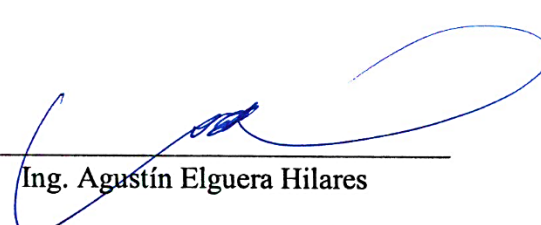
“CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL ACEITE ESENCIAL DE LAUREL (*Laurus nobilis*) EN HONGOS AISLADOS DE TALLARINES DE CASA”

Presentado por **MARCIA VALVERDE CABALLERO**, para optar al título de:

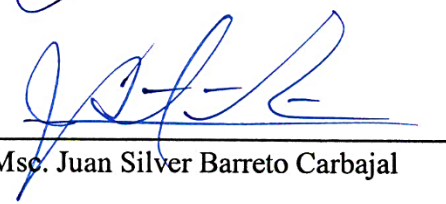
INGENIERO AGROINDUSTRIAL

Sustentado y aprobado el 11 de enero de 2019 ante el jurado:

Presidente:


Ing. Agustín Elguera Hilares

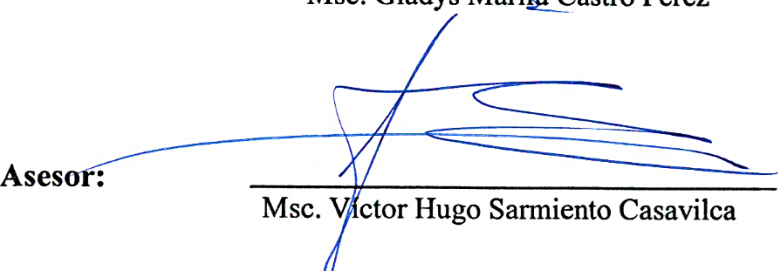
Primer miembro:


Msc. Juan Silver Barreto Carbajal

Segundo miembro:


Msc. Gladys Marilú Castro Pérez

Asesor:


Msc. Victor Hugo Sarmiento Casavilca

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios, por haberme brindado sabiduría, paciencia, fortaleza y salud para finalizar con éxito esta meta en mi vida.

A mi familia por su apoyo incondicional, comprensión, cariño y siempre estar presentes en mi vida cuando más los necesitaba.

Mi agradecimiento especial al Ing., Mg. Víctor Hugo Sarmiento Casavilca, asesor de la presente tesis, que puso de manifiesto toda su sabiduría, experiencia y responsabilidad profesional, lo cual ha sido importante para lograr los objetivos propuestos.

A la Universidad de Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, por darme la oportunidad de alcanzar mis metas profesionales, a sus autoridades y a su personal académico, mis maestros de la carrera de Ingeniería Agroindustrial, por todos los conocimientos y valores inculcados en mi trayectoria estudiantil y por hacer factible el presente trabajo.



DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi madre por su sacrificio y esfuerzo, por ser mi fuerza y templanza para culminar con éxitos mis estudios profesionales. A mis hermanos por sus consejos, comprensión, amor y apoyo incondicional.

A mis compañeros y amigos, quienes sin esperar nada a cambio compartieron su conocimiento, además de brindarme todo su apoyo moral y ánimos para lograr este objetivo.



ÍNDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	3
CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	4
1.1 Descripción del problema.....	4
1.2 Enunciado.....	5
1.3 Objetivos	5
1.4 Justificación:	6
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	7
2.1 Antecedentes.	7
2.2 Marco referencial	8
2.2.1 Características botánicas del laurel.....	8
2.2.2 Descripción taxonómica del laurel	10
2.2.3 Componentes activos del laurel.....	11
2.2.4 Usos, beneficios y propiedades del laurel.....	12
2.2.5 Los aceites esenciales y sus características químicas	12
2.2.6 Biosíntesis de los aceites esenciales y metabolismo de las plantas	15
2.2.7 Métodos de extracción del aceite esencial.....	17
2.2.8 El aceite esencial de laurel.....	19
2.2.9 Propiedades de actividad antibacterianas y antifúngicas de los aceites esenciales	20
2.2.10 Antifúngicos o antimicóticos químicos	21
2.2.11 Métodos para la determinación de la actividad antimicrobiana	23
2.2.12 Características relativas a la morfología y desarrollo de los hongos	25
2.2.13 Intoxicaciones alimentarias por hongos.....	25
2.2.14 Caracterización e identificación de hongos	26
2.2.15 El tallarín de casa.....	27
2.2.16 Información Nutricional del tallarín de casa	27
2.2.17 Productores de tallarines que trabajan con la DIREPRO y la Cámara de Comercio de Apurímac	27
2.3 Marco conceptual	29
CAPÍTULO III. DISEÑO METODOLÓGICO	33
3.1 Definición y operacionalización de variables	33
3.2 Hipótesis de la investigación.....	34
3.2.1 Hipótesis general	34
3.2.2 Hipótesis específicas	34
3.3 Tipo y diseño de la investigación.....	34
3.4 Población y muestra	37



3.5 Procedimiento de la investigación.....	37
3.5.1 Etapa I: Obtención de aceite esencial de <i>Laurus nobilis</i>	37
3.5.2 Etapa II: Análisis fisicoquímicos del aceite esencial de <i>Laurus nobilis</i>	39
3.5.3 Etapa III: Aislamiento de hongos y obtención del cultivo puro	40
3.5.4 Etapa IV: Evaluación de la actividad antifúngica del aceite esencial de <i>Laurus nobilis</i>	44
3.6 Material de investigación	47
3.6.1 Instrumentos de investigación	47
CAPÍTULO IV. RESULTADOS.....	49
4.1 Resultados y discusiones.....	49
4.1.1 Extracción del aceite esencial de <i>Laurus nobilis</i> por hidrodestilación.....	49
4.1.2 Características físicas del aceite esencial de <i>Laurus nobilis</i>	49
4.1.3 Caracterización química por espectrometría infrarroja (FT-IR) del aceite esencial de laurel	51
4.1.4 Aislamiento y descripción de hongos.....	53
4.2 Contrastación de hipótesis.....	61
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	62
5.1 Conclusiones	62
5.2 Recomendaciones.....	62
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXOS.....	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de laurel por cada 100g.....	11
Tabla 2. Grupo funcional de cada compuesto.....	14
Tabla 3. Clasificación de los antifúngicos por su estructura química.....	21
Tabla 4. Clasificación según su mecanismo de acción.....	22
Tabla 5. Composición de tallarín en 100g.....	27
Tabla 6. Productores de tallarines en la provincia de Abancay asociados a la DIREPRO.....	28
Tabla 7. Operacionalización de variables.....	33
Tabla 8. Esquema del diseño experimental de la investigación.....	36
Tabla 9. Composición de agar papa dextrosa.....	42
Tabla 10. Parámetros presentes en la extracción del aceite esencial de laurel....	49
Tabla 11. Características físicas del aceite esencial de laurel.....	49
Tabla 12. Características sensoriales del aceite esencial de laurel.....	50
Tabla 13. Componentes químicos del aceite esencial de laurel.	51
Tabla 14. Características morfológicas de los hongos aislados del tallarín de casa.	54
Tabla 15. Promedio de diámetros de inhibición obtenidos de cada tratamiento.....	58
Tabla 16. Análisis de Varianza (ANVA) para concentración, cepa de hongo y el tiempo	75
Tabla 17. Pruebas de múltiple rangos para diámetros por tiempo.....	76
Tabla 18. Pruebas de múltiples rangos para diámetros por concentración.....	77
Tabla 19. Pruebas de múltiples rangos para diámetros por hongo.....	78
Tabla 20. Análisis de Varianza (ANVA) evalúala diámetro por concentración.	80
Tabla 21. Verificación de Varianza.....	80
Tabla 22. Prueba de Kruskal-Wallis para diámetro por concentración.....	80
Tabla 23. Pruebas de múltiples rangos para diámetros por concentración.....	81
Tabla 24. Análisis de Varianza (ANVA) evalúala diámetro por hongo.	82
Tabla 25. Verificación de Varianza.....	82
Tabla 26. Pruebas de múltiples rangos para diámetros por concentración.....	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol de laurel.	9
Figura 2. Hojas de laurel	16
Figura 3. Rutas biosintéticas del metabolismo secundario	16
Figura 4. Mecanismo de acción de los antifúngicos	16
Figura 5. Diagrama de flujo de la hidrodestilación del aceite esencial de <i>Laurus nobilis</i>	37
Figura 6. Diagrama del aislamiento de hongos y obtención del cultivo puro.	40
Figura 7. Dilución del tallarín de casa.	41
Figura 8. Diagrama de flujo de la evaluación de la actividad antifúngica.	44
Figura 9. Siembra de esporas por diseminación.	45
Figura 10. Curva del espectro infrarrojo (FT-IR) del aceite esencial de laurel.	51
Figura 11. Selección de hongos.	53
Figura 12. Fotografía microscópica de la cámara húmeda del hongo 1	54
Figura 13. Fotografía microscópica de la cámara húmeda del hongo 2	55
Figura 14. Fotografía microscópica de la cámara húmeda del hongo 3	56
Figura 15. Intervalos de diámetro vs. concentración.	59
Figura 16. Intervalos de diámetro vs. hongo	59
Figura 17. Hongo 1 cultivado en cámara húmeda a 72 horas	70
Figura 18. Hongo 2 cultivado en cámara húmeda a 72 horas	70
Figura 19. Hongo 3 cultivado en cámara húmeda a 72 horas	71
Figura 20. Diámetros de inhibición a las 48 horas	72
Figura 21. Diámetros de inhibición a las 72 horas	73
Figura 22. Diámetros de inhibición a las 96 horas	74
Figura 23. Intervalos de diámetro vs. tiempo	76
Figura 24. Intervalos de diámetro vs. concentración.	78
Figura 25. Intervalos de diámetro vs. hongo	79
Figura 26. Perfiles de los diámetros de inhibición de los hongos a diferentes concentraciones	79
Figura 27. Intervalos de diámetro vs. concentración.	81
Figura 28. Intervalos de hongo vs. concentración.	83
Figura 29. Hojas de laurel	84
Figura 30. Hojas de laurel recién recolectadas y puestas para el secado.	84
Figura 31. Hojas de laurel secas y trozadas para su respectiva extracción de aceite esencial.	85
Figura 32. Equipo de destilación.	85

“CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA
DEL ACEITE ESENCIAL DE LAUREL (*Laurus nobilis*) EN HONGOS
AISLADOS DE TALLARINES DE CASA”

Esta publicación está bajo una Licencia Creative Commons



ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ANVA: Análisis de varianza

C₁: Concentración 1 (0.03 µl/ µl)

C₂: Concentración 2 (0.06 µl / µl)

C₃: Concentración 3 (0.1 µl / µl)

CMI: Concentración Mínima de Inhibición

DIREPRO: Dirección Regional de la Producción

E. A. P: Escuela Académico Profesional

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos

FTIR: Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier

GRAS: Considerado como sustancias seguras

H1: Hongo 1

H2: Hongo 2

H3: Hongo 3

INDECOPI: Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual.

NTP: Norma técnica peruana

PDA: Agar papa dextrosa

pH: Potencial de hidrogeno

t1: 48 horas

t2: 72 horas

t3: 96 horas

UNAMBA: Universidad nacional Micaela bastidas de Apurímac



INTRODUCCIÓN

El tallarín de casa es un producto que se consume en todos los estratos sociales y en todas las zonas de la región Apurímac, las personas de todas las edades, niños, adultos y ancianos, lo consumen por ser un alimento disponible, fácil de preparar e incluir en cualquier receta, siendo parte de los platos típicos de nuestra región. Asimismo, es producido por microempresas de manera semi-industrial y productores artesanales, quienes abastecen al mercado. Debido a la capacidad y cualidades de producción más allá de seguir con un proceso implementado en Buenas Prácticas de Manufactura, se ve una debilidad en el proceso de producción, el cual, es el secado del producto, punto clave a considerar debido al grado de humedad con el que los tallarines de casa son envasados, empaquetados, transportados y almacenados antes de llegar al consumidor, ya que esto propiciara la proliferación y el crecimiento de hongos.

El control del crecimiento microbiano es uno de los factores mas importantes a considerar en la conservación de alimentos, por lo que la sustitución de los agentes antimicrobianos químicos por sustancias naturales que alarguen la vida útil de los productos sin alterar las características sensoriales y nutricionales de estos se hace cada vez más atractiva. A lo que se ha ido incrementando notoriamente en los últimos años el interés por parte del consumidor en demandar la reducción de la cantidad de conservantes y contar con alimentos libres de estos, llevando a la búsqueda de nuevas rutas de preservación es indispensable, así como estudiar el efecto que puedan tener, se ha considerado diferentes productos naturales como formas de conservación para la estabilidad microbiológica de los alimentos para lograr extender la vida útil de los alimentos sin perder sus características, uno de los cuales son los aceites esenciales. Se sabe que los aceites esenciales, extraídos de diferentes plantas aromáticas, poseen compuestos que exhiben distintos niveles de actividad antimicrobiana, además de ser altamente volátiles a temperatura ambiente, a diferencia de otros agentes antifúngico, además de tener buenos resultados en la conservación de alimentos sustituyendo a los conservantes sintéticos; esto los hace atractivos para su estudio y aplicación como una alternativa adecuada y natural como conservante alimentarios.

El presente trabajo tiene como objetivo realizar la caracterización fisicoquímica además de evaluar la actividad antifúngica del aceite esencial de laurel (*Laurus nobilis*) en hongos aislados de tallarines de casa. La determinación de los componentes activos presentes en el aceite esencial de las hojas de laurel del distrito de Curahuasi, nos permitirá demostrar el efecto antifúngico que éste posee.

RESUMEN

La presente investigación se realizó en los laboratorios de la E. A. P. de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac con el fin de caracterizar el aceite esencial de *Laurus nobilis* y determinar la actividad antifúngica en hongos aislados del tallarín de casa.

El Laurel es una planta de hojas densas y verdes las cuales son utilizadas en las preparaciones culinarias e infusiones médicas, es así que en nuestra región de Apurímac se asocia más con el consumo de los tallarines de casa, producto incluido en nuestros platos típicos y consumido por las personas de todas las edades. A lo que surge la necesidad de caracterizar fisicoquímicamente al aceite esencial de laurel para evaluar su actividad antifúngica en hongos aislados de tallarín de casa.

La obtención del aceite esencial de hojas de *Laurus nobilis* se realizó mediante la hidrodestilación, obteniendo así un rendimiento de 0.45%, con 0.8947 g/ml de densidad y 1.472 de índice de refracción, concordando con la bibliografía citada. Mientras la medición de las propiedades químicas se realizó con el espectrómetro infrarrojo (FTIR), mostrando así que este posee 20 componentes orgánicos como el nerolidol, conífero, dl-limoneno y canabidol. Para la determinación de la actividad antifúngica, se aisló tres tipos de hongos a partir del tallarín de casa obtenidos del mercado las Américas, mediante el método de vertido en placa y extensión en placa, incubados a 30°C por 72 horas, se seleccionaron las 3 cepas más predominantes para purificarlas y someterlas a los tratamientos de inhibición del aceite esencial de *Laurus nobilis*.

El efecto antifúngico se realizó por el método de difusión en agar PDA y una siembra de esporas por diseminación, se colocaron dos discos de agar con 5 mm de diámetro por placa, se trabajó con concentraciones de 0.03; 0.06 y 0.1 µl de aceite esencial de laurel por µl de solución. Se midieron los diámetros de inhibición a las 48, 72 y 96 horas, según el análisis estadístico a una confianza de 95%, se obtuvo que la concentración 3 con 0.1 µl/ µl presenta mayor poder antifúngico para el caso de los tres hongos y los hongos que presenta mayor susceptibilidad al aceite esencial de *Laurus nobilis* son el hongo 2 y el hongo 3. Debiendo estos resultados a la presencia de nerolidol, conífero y plumbagin entre los compuestos más destacados en el aceite de laurel los que le confieren propiedades antifúngicas.

Palabras claves: aceite esencial, actividad antifúngica, hidrodestilación, diseminación, inhibición.

ABSTRACT

The present investigation was carried out in the laboratories of the E. A. P. of Agroindustrial Engineering of the National University Micaela Bastidas of Apurímac with the purpose of characterizing the essential oil of *Laurus nobilis* and to determine the antifungal activity in fungi isolated from the house noodle.

The Laurel is a plant with dense and greenish leaves which are used in culinary preparations and medical infusions, so in our Apurímac region is associated more with the consumption of home noodles, product included in our typical dishes and consumed by people of all ages. To which arises the need to physicochemically characterize the laurel essential oil to evaluate its antifungal activity in isolated house noodle fungi.

Obtaining the essential oil of leaves of *Laurus nobilis* was done by hydrodistillation, obtaining a yield of 0.45%, with 0.8947 g / ml of density and 1.472 of refractive index, agreeing with the aforementioned bibliography. While the measurement of the chemical properties was carried out with the infrared spectrometer (FTIR), showing that it has 20 organic components such as nerolidol, coniferous, dl-limonene and cannabidol. For the determination of the antifungal activity, three types of fungi were isolated from house noodles obtained from the Americas market, by means of the plate pouring method and plaque extension, incubated at 30°C for 72 hours, the 3 strains were selected most predominant to purify and subject them to the inhibition treatments of the essential oil of *Laurus nobilis*.

The antifungal effect was carried out by the PDA agar diffusion method and a spore sowing by dissemination, two agar disks with 5 mm diameter were placed per plate, 0.03; 0.06 and 0.1 µl of laurel essential oil per µl of solution. The inhibition diameters were measured at 48, 72 and 96 hours, according to the statistical analysis at a confidence of 95%, concentration 3 was obtained with 0.1 µl / µl of presentation of the antifungal power for the case of the three fungi and fungi that presents greater susceptibility to the essential oil of *Laurus nobilis* are the fungus 2 and the fungus 3. These results are due to the presence of nerolidol, coniferous and plumbagin among the most prominent compounds in laurel oil, which give it antifungal properties.

Key words: essential oil, antifungal activity, hydrodistillation, dissemination, inhibition.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción del problema

En la actualidad los consumidores demandan alimentos con características libres de sustancias químicas que cumplen la función de conservante, asociando alimentos seguros con alimentos frescos que hayan recibido el menor proceso posible. En la conservación de alimentos los factores más importantes a considerar es el control del crecimiento microbiano, por lo que la sustitución de los agentes antifúngicos químicos, por sustancias naturales que no alteren las características sensoriales y nutricionales de los alimentos, se hace cada vez más atractiva.

Los tallarines de casa es uno de los productos de mayor consumo y producción en Apurímac, la población lo consumen por ser un alimento disponible, fácil de preparar e incluir en cualquier receta. Sin embargo los tallarines tienden a deteriorarse debido a que en su composición química posee carbohidratos (C, H, O) y proteínas (C, H, O, N además de S y P) en 85% aproximadamente adicionándole a este el incremento de humedad en el producto, ya sea por un secado inconcluido antes del envasado, empaquetado o un mal almacenamiento, propician las condiciones de crecimiento y la proliferación de los hongos en los tallarines de casa, deteriorando este producto. Estos hongos pudieron llegar a los tallarines de casa de diversas maneras, como son: la materia prima contaminada, utensilios, equipos y/o en el mismo envase.

Por otro lado, se afirma que el aceite esencial extraído del laurel (*Laurus nobilis*) posee efecto antifúngico y antimicrobiano, lo que lo hace atractivo como una alternativa adecuada y natural, reemplazando a los conservantes alimentarios para incrementar la vida útil de los tallarines de casa. Por lo que se requiere conocer la concentración de aceite esencial de laurel que inhibirá el crecimiento de hongos, supervivencia y resistencia.

1.2 Enunciado

Problema General

- ¿Cuál es la caracterización fisicoquímica del aceite esencial de laurel (*Laurus nobilis*) y cuál es su actividad antifúngica en hongos aislados de tallarines de casa?

Problemas Específicos

- ¿Cuáles son las características físicas y químicas del aceite esencial de laurel (*Laurus nobilis*)?
- ¿Cuáles son las características morfológicas de los hongos aislados en medio selectivo del tallarín de casa?
- ¿Cuál es la concentración adecuada del aceite esencial del laurel (*Laurus nobilis*) como agente de inhibición del crecimiento de hongos aislados de tallarín de casa?

1.3 Objetivos

Objetivo General

- Realizar la caracterización fisicoquímica y evaluar la actividad antifúngica del aceite esencial de laurel (*Laurus nobilis*) en hongos aislados de tallarines de casa.

Objetivos Específicos

- Caracterizar el aceite esencial de laurel (*Laurus nobilis*) fisicoquímica.
- Aislar en medio selectivo y describir morfológicamente a los hongos contaminantes del tallarín de casa.
- Determinar la concentración adecuada del aceite esencial de laurel (*Laurus nobilis*) como agente de inhibición del crecimiento de los hongos aislados de tallarín de casa.

1.4 Justificación:

La disponibilidad de los equipos y materiales de los laboratorios de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac y el apoyo de los docentes conocedores de los procesos y manejos de los equipos permitieron el desarrollo de esta investigación.

El consumo de tallarines de casa se ha ido incrementando notoriamente en los últimos años, al formar parte de nuestros platos típicos, lo consumen las personas de todas las edades ya sean niños, adultos y ancianos, su consumo hoy en día no solo es local, sino es a nivel nacional, conllevando al incremento de la producción del mismo, para poder atender la creciente demanda del mercado. Asimismo, el proceso de producción del tallarín de casa ya no es de manera artesanal, sino semi industrial, produciendo a mayor escala, hecho que genera mayor utilidad para las microempresas dedicadas a la producción y comercialización de este producto.

La investigación significó una inversión aproximada de 5000 soles el cual fue asumido por mi persona, dinero con el que se compraron: materia prima, insumos, equipos y materiales adicionales de vidrio, metal y plástico.

El aceite esencial extraído de las hojas de laurel por el método de hidrodestilación, posee actividad antifúngica y sus componentes son volátiles a temperatura ambiente, a diferencia de los antifúngica químicos, a quienes se busca sustituir con el aceite esencial de laurel, a través, de esta investigación, estas características hacen que el aceite esencial de laurel sea un producto que no afecta al medio ambiente.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes.

Cruz y Quispe (2018) evaluaron el “Efecto antimicótico del extracto etanólico de las hojas secas de *Laurus nobilis* (laurel) en cepas de *Cándida albicans*, in vitro.” En ésta investigación, el extracto etanólico al 100% de las hojas secas de *Laurus nobillis* (laurel), ha demostrado tener mayor efecto antimicótico, con un halo de inhibición promedio de 25mm, el cual es catalogado como muy sensible y el extracto al 50% demostró tener mediana actividad antimicótica catalogado como sensible, con un halo de inhibición promedio de 15.3 mm frente a las cepas de *Candida albicans* ATCC, in vitro.

Rangel, *et al.*, (2017) evaluó la “Actividad antifúngica, modo de acción y efectos anti-biopelícula del aceite esencia de *Laurus nobilis* Linnaeus contra *Candida spp.*” Además, comparó el aceite esencial de laurel con nistatina (medicamento antifúngico) cuyas concentraciones variaron de 250 a 500 mg/ml, para el tratamiento de *Candida albicans*, mostrando efectos nocivos contra la adhesión y formación de biopelícula característica de esta levadura. Mientras (Ricci, *et al.*, 2002) en “Efecto repelente de los aceites esenciales de laurel y lemongrass sobre *Brevicoryne brassicae* L. (Homoptera: Aphididae) en repollo” realizado para esto una comparación de efectividad entre el laurel y el lemongrass, para lo que obtuvo el aceite esencial por arrastre vapor de agua, la efectividad se evaluó por el método de pulverización directa sobre plantas de repollo a las concentraciones de 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3%., teniendo como resultado que el aceite esencial de laurel (*L. nobilis*) a una concentración de 2% y a las 6 horas alcanzo los valores máximos de repelencia sobre *Brevicoryne brassicae* L. en repollo, mientras que el lemongrass alcanzó valores similares a las 24 horas con la concentración de 3%.

Mello, *et al.*, (2014) estudió la “Composición química y actividad antibacteriana de aceite esencial de *Laurus nobilis* para los agentes patógenos transmitidos por los alimentos y su aplicación en fresco Salchicha toscana almacenada a 7°C” para lo cual las salchichas toscanas se trataron con aceite esencial de hojas de laurel a 0,05g/100g y 0,1g/100g. Se determinó que el aceite esencial de laurel presenta un efecto antimicrobiano más fuerte a una concentración de 0.1g/100g, alargando así la vida útil del producto.

Gigante (2014) estudio el “Potencial de los aceites comerciales de Canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y Laurel (*Laurus nobilis*) en el control de *Fusarium oxysporum*”. Realizando los bioensayos a la dosis de 300 µg/ml del aceite esencial en el medio de cultivo PDA. Donde la velocidad de crecimiento del hongo fue de 5,75 mm/día en PDA, 5,22 mm/día en aceite esencial de laurel y de

2,44 mm/día en aceite esencial de canela. El aceite esencial de canela redujo alrededor del 60% la velocidad de crecimiento del hongo mientras el laurel un 9%.

Callejas (2013) estudió el “Efecto de la poda sobre la cantidad y el rendimiento del aceite esencial de *Laurus nobilis*” mediante una extracción de aceite esencial con hexano, determinando que una planta de laurel con un despunte presenta mejores rendimientos que una planta sin podar. Además menciona que existen numerosos estudios sobre la composición química de los aceites esenciales obtenidos a partir de las hojas de *Laurus nobilis* de las regiones mediterránea y europea, en los cuales se mencionan que los principales componentes del aceite esencial son cineol (44,12%), eugenol (15,16%), sabineno (6,20%), 4-terpineol (3,60%), α -pineno (2,74%), metileugenol (2,48%), α -terpineol (2,19%) y α -pineno (2,05%). Sin embargo, estos presentan importantes diferencias en la composición química del aceite según la variedad, los métodos de cultivo, la época de cosecha y la procedencia geográfica de la planta.

Herrera (2006) estudió la “evaluación in vitro del efecto bactericida de extractos acuosos de laurel, clavo, canela y tomillo sobre cinco cepas bacterianas patógenas de origen alimentario”. El extracto de laurel presentó mayor poder inhibitorio contra *S. aureus*, siendo éste el único microorganismo frente al cual su acción es consistente en las dos diluciones ensayadas (10^3 y 10^5); adicionalmente, presentó inhibición frente a las demás cepas, pero con un comportamiento irregular, mostrando halos de 5 mm contra *E. coli*, a excepción de *Ps. aeruginosa* contra la que no se observó ningún efecto inhibitorio.

2.2 Marco referencial

2.2.1 Características botánicas del laurel

Antiguamente se solía utilizar una corona de laurel cuando hacían competencia o certámenes y de esta manera se coronaba con honores y gloria al triunfador. Es así que el término “Laurear” significa premiar, enaltecer y honrar. Su nombre científico es (*Laurus nobilis*) y es un árbol de tronco liso, con ramas levantadas, lauráceo, hojas puntiagudas, de hojas densas y verdes. Además, se utilizaban sus hojas para preparaciones culinarias y también infusiones médicas. El laurel es un árbol pequeño que crece en el Mediterráneo Europeo, Gran Bretaña, el Sur de Asia y el Medio Oriente Nativo de Asia Menor, aclimatado en la Europa mediterránea. Crece a una altitud 50-1000 msnm, precipitación: 2000 - 4000 mm a temperaturas: 20 - 27 °C (Cruz, 2013; Bravo, 2017).

Laurus nobilis, es un árbol dioico siempre verde de 5 - 10 m de altura, de tronco recto con la corteza gris y la copa densa, oscura. Ramaje erecto, de hojas perennes, coriáceas, esparcidas, con inflorescencias axilares de pedúnculos cortos; Flores blancas dispuestas de 4 - 6. La

unisexualidad de las flores es debido a un fenómeno de aborto, y prueba de ello es la presencia de 2-4 estaminodios en las flores femeninas. Fruto en drupa (semejante a una nuececilla pequeña), ovoide, de 1 - 1.5 cm de longitud que por dentro tiene una semilla blanca de 4mm de longitud, tornándose de color negro en la madurez. (Cruz, 2013).



Figura 1. Árbol de laurel de cuatro metros de altura con un rendimiento en hojas de laurel aproximadamente de 70 kilogramos. (2018).

Las hojas simples, alternas, lanceoladas u oblongo - lanceoladas, estiradas en la punta roma, y en la base estrechas, de consistencia algo coriácea, aromáticas, con el borde en ocasiones algo ondulado. Miden unos 3 - 9 cm de largo con hasta 5 cm de ancho y poseen corto pecíolo. El haz es de color verde oscuro lustroso, mientras que el envés es más pálido. El nervio medio sobresale mucho en ambas caras de color amarillento claro formando una red fina en ambas caras. (Cruz, 2013; Mañe, 1949).

Características microscópicas de las hojas de laurel (corte transversal): la epidermis tiene la cutícula recia, solo existen estomas en la cara inferior. En el mesofilo, junto a la cara superior,

hay dos-tres filas de células en empalizada y debajo tejido esponjoso fofo. Se observan grandes células oleíferas esféricas, con pared suberificada y que contienen una esencia incolora; son sobre todo abundantes en el tejido empalizada, en su límite inferior con el tejido esponjoso y en el parénquima de paredes gruesas del nervio principal. Pro encima y por debajo del haz vascular colateral del nervio medio hay una capa de fibras esclerenquimatosas muy lignificadas. En las dos caras, entre la epidermis y la capa de refuerzo, hay tejido colenquimatoso que interrumpe el mesofilo. Las células contienen tanino junto con clorofila. (Mañe, 1949)

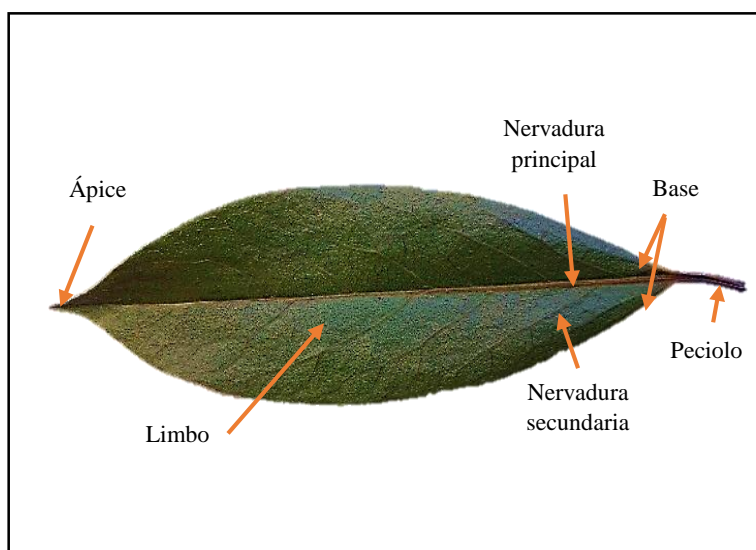


Figura 2. Hojas de laurel, con 7cm de largo y 3 cm de ancho (2018).

2.2.2 Descripción taxonómica del laurel

Describe la clasificación taxonómica del laurel (Cruz y Quispe, 2018).

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Sub clase: Magnoliidae

Orden: Laurales

Familia: Lauraceae

Tribu: Laureae

Género: Laurus.

Especie: *Laurus nobilis* L.

Nombres comunes: laurel, aurelero, aurero, lauredo, laurel común, árbol o laurel de Apolo.

2.2.3 Componentes activos del laurel¹

- Aceites esenciales: cineol, pineno, linalol, alfa-terpineol acetato, sabineno, limoneno, terpineno, metil-eugenol y canfeno. Los frutos poseen más aceite esencial que las hojas: 3% de aceite esencial en frutos y 1% en sus hojas.
- Alcoholes: eugenol en sus hojas y ácidos orgánicos: acético, fórmico, pelargónico, propiónico en sus hojas, cinámico, láurico (frutos).
- Ácidos orgánicos: acético, fórmico, pelargónico, propiónico (hojas) cinámico, láurico (frutos).
- Las hojas también contienen pequeñas dosis de lactonas sesquiterpénicas (costunólida y laurenobiolida) y taninos.
- Minerales: Mn, Ca, K, P, Mg, Fe, Na y Zn. Además, las hojas contienen pequeñas cantidades de lactonas sesquiterpénicas y taninos.

Se describe la composición química del Laurel por cada 100g (Tabla 1)

Tabla 1

Composición química del laurel por cada 100g

Componente	Cantidad
Agua	5.5 g
Calorías	313 kcal
Lípidos	8.3 g
Carbohidratos	74.97 g
Fibra	26.3 g
Calcio	834 mg
Potasio	529 mg
Magnesio	120 mg
Fósforo	113 mg
Vitamina C	46.5 mg
Niacina	2000 mg
Vitamina B-6	1000 mg
Ácido fólico	180 mcg

Fuente: Bravo 2017.

¹ Los componentes principales del aceite esencial de laurel son cineol, pineno, linalol, alfa-terpineol acetato, sabineno, limoneno, terpineno, metil-eugenol y canfeno, (Bravo, 2017).

2.2.4 Usos, beneficios y propiedades del laurel

- Su madera es fácil de trabajar ya que al tener un secado muy rápido no tiene defectos que se vean a simple vista, dando excelentes resultados en cualquier uso maderero que se le dé. El tronco recién cortado las capas externas son de color beige amarillento y las capas internas son de color café claro, su textura es fina y homogénea, con olor agradable a caña dulce, no tiene un sabor distintivo, (Bravo, 2017).
- Contiene cineol y eugenol (componentes destacados), son los que le dan a esta planta la propiedad de facilitar las digestiones, así como prevenir la acidez y reducir los gases. Además, ayuda a mejorar y estimular el apetito, actualmente se utiliza en tratamientos para personas que necesitan ganar peso (fitoterapia) preparándolo en comidas o té, (Bravo, 2017).
- El Laurel tiene propiedades bactericidas, antisépticas, antiinflamatorios, expectorantes, por lo que se lo utiliza en afecciones del aparato respiratorio como gripe o bronquitis. Al ser diurética y sudorífera favorece en la eliminación de líquidos, ayuda a los riñones y se usa actualmente en dietas de adelgazamiento, (Bravo, 2017).
- En cosmetología se utiliza sus aceites esenciales por el aroma en perfumes, cremas, lociones. Además, como tratamiento capilar tiene un efecto regenerador del cuero cabelludo, para combatir la caspa, la seborrea como también la caída del cabello y a prevenir la calvicie, (Bravo, 2017).
- Las hojas se emplean como condimento natural en la cocina a nivel mundial ya sea en asados, productos ahumados, incluso se añaden a sopas y guisos, sean frescas, secas, enteras o troceadas, a medida que se cuecen dan un profundo y rico aroma y sabor. (Bravo, 2017).

2.2.5 Los aceites esenciales y sus características químicas

Los aceites esenciales son líquidos viscosos semivolátiles, aromáticos obtenidos a partir de material vegetal (brotes, flores, semillas, hojas, ramas, corteza, madera, frutos y raíces). Se caracterizan por un olor fuerte y son sintetizados por las plantas aromáticas como metabolitos secundarios. En la naturaleza juegan un papel importante en la protección de las plantas como antibacterianos, antivirales, antifúngicos e insecticidas (Bakkali *et al.*, 2008).

La composición de los aceites de algunos tipos de plantas puede variar según la época de la cosecha y la situación geográfica. Generalmente, los procedentes de plantas cosechadas durante o inmediatamente después de la floración, poseen una mayor actividad antimicrobiana.

La composición de los aceites de diferentes partes de una misma planta, también puede variar ampliamente. Se conocen alrededor de unos 3000 aceites esenciales, de los cuales unos 300 son los más importantes comercialmente, destinados para el mercado de condimentos y fragancias. (Burt, 2004). En cuanto a su composición química, los aceites esenciales contienen una buena porción de hidrocarburos junto con compuestos oxigenados, tales como cetonas, alcoholes, acetatos, 1,3-benzodioxoles y furanocumarinas, entre otros, los cuales prevalecen en las partes aéreas de las plantas, mientras que los hidrocarburos se concentran básicamente en las raíces. Presentan variaciones en la proporción de sus constituyentes, ya que en ocasiones se transforman unos en otros según la parte de la planta, el momento de su desarrollo o el momento del día de la recolección (Vargas y Bottia, 2008).

A condiciones ambientales, los aceites esenciales son líquidos menos densos que el agua, pero más viscosos que ella. Poseen un color en la gama del amarillo, hasta ser transparentes en algunos casos. La definición aceptada: Un aceite esencial es un producto volátil obtenido de una materia prima vegetal mediante una destilación, ya sea con vapor o por inmersión en agua caliente. También, aquel que es obtenido desde el epicarpio de las frutas cítricas, mediante un proceso mecánico o prensado (Martínez, 2008).

Son inflamables, no son tóxicos, aunque pueden provocar alergias en personas sensibles a determinados terpenoides, son en general inocuos, mientras la dosis suministrada no supere los límites de toxicidad. Sufren degradación química en presencia de la luz solar, del aire, del calor, de ácidos y álcalis fuertes, generando oligómeros de naturaleza indeterminada. Son solubles en los disolventes orgánicos comunes. Casi inmiscibles en disolventes polares asociados (agua, amoníaco). Tienen propiedades de solvencia para los polímeros con anillos aromáticos presentes en su cadena. Son aceptados como sustancias seguras GRAS (Generally Regarded as Safe) por la FDA (Food and Drug Administration) (Norman, 1998), es decir forma parte de las hierbas consideradas seguras para empleo medicinal en humanos. Se encuentra catalogado como categoría 1 (hierbas seguras) por la Asociación Norteamericana de Productos Herbales. Tiene aprobación de uso medicinal humano por las autoridades sanitarias de España (Alonso, 2004).

Los aceites esenciales son mezclas homogéneas de compuestos químicos orgánicos, provenientes de una misma familia química, como los terpenoides. Los terpenoides son a menudo llamados isoprenoides teniendo en cuenta que el isopreno es su precursor biológico. Presentan una gran variedad estructural, derivan de la fusión repetitiva de unidades ramificadas de cinco carbonos basadas en la estructura del isopentenilo, son monómeros considerados

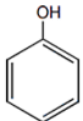
como unidades isoprénicas y se clasifican por el número de unidades de cinco carbonos que contienen en mono, sesqui, di, tri, tetraterpenos. Los productos que provienen del metabolismo del isopreno abarcan a los terpenos, los carotenos, las vitaminas, los esteroides, etc. Tienen la propiedad en común, de generar diversos aromas agradables y perceptibles al ser humano (Martínez, 2008).

Los componentes de los aceites esenciales se clasifican en terpenoides y no terpenoides.

- **No terpenoides.** En este grupo tenemos sustancias alifáticas de cadena corta, sustancias aromáticas, sustancias con azufre y sustancias nitrogenadas. No son tan importantes como los terpenoides en cuanto a su uso y aplicaciones (Escudero, 1999).
- **Terpenoides.** Son los más importantes en cuanto a propiedades y comercialmente. Son una clase de sustancias química que se halla en los aceites esenciales, resinas y otras sustancias aromáticas de muchas plantas, como los pinos y muchos críticos. Principalmente encontramos en los aceites monoterpenos (C10), aunque también son comunes los sesquiterpenos (C15) y los diterpenos (C20). Pueden ser alifáticos, cíclicos o aromáticos (Escudero, 1999).

Tabla 2

Grupo funcional de cada compuesto

Compuesto	Grupo Funcional	Ejemplo	Propiedades
Alcohol	$\begin{array}{c} \\ -C-OH \\ \end{array}$	Mentol, geraniol	Antimicrobiano, antiséptico, tonificante, espasmolítico.
Aldehído	$\begin{array}{c} O \\ \\ R-C-H \end{array}$	Citral, citronelal	Espasmolítico, sedante, antiviral.
Cetona	$\begin{array}{c} O \\ \\ R^1-C-R^2 \end{array}$	Alcanfor, tuyona	Mucolítico, regenerador celular, neurotóxico.
Ester	$\begin{array}{c} O \\ \\ R^1-C \\ \\ O-R^2 \end{array}$	Metil salicilato	Espasmolítico, sedativo, antifúngico.
Éteres	-C - O - C -	Cineol, ascaridol	Expectorante, estimulante.
Éter fenólico	Anillo - O - C	Safrol, anetol, miristicina	Diurético, estomacal, expectorante.
Fenol		Timol, eugenol, carvacrol	Antimicrobiano Irritante Estimulante inmunológico.
Hidrocarburo	Sólo contiene C y H	Pineno, limoneno	Estimulante descongestionante antivírico, antitumoral.

Fuente: Escudero, 1999.

Es característico de las esencias la presencia de terpenos, fundamentalmente mono y sesquiterpenos; sin embargo, no todas las esencias están compuestas exclusivamente por terpeno, existen algunas que carecen de estos y están constituidas por derivados bencénicos, fenoles, esteroides e hidrocarburos lineales, hasta por componentes difícilmente relacionados con las esencias, como alcaloides, glicosidos y una gran variedad de compuestos heterocíclicos como derivados piridinicos, aminas, sulfuros, etc. (Vargas y Bottia, 2008).

Existen diferentes factores que influyen sobre la composición química de un aceite esencial, entre ellos se puede destacar los siguientes:

- Condiciones geobotánicas del medio: clima, altitud, tipo de suelo, pluviosidad.
- Medio de cultivo: fertilizantes, abonos y pesticidas.
- Época de recolección y parte de la planta
- Modo de almacenamiento y manejo del material vegetal: fresco, seco, fermentado, tratamiento post-cosecha.
- Modo de obtención del aceite: destilación (hidrodestilación, arrastre vapor).
- Edad de la planta y su estado fenológico.

Uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta en la modificación de la composición de los aceites, está relacionado con el momento oportuno para comenzar la cosecha del material vegetal, ya que existe un momento óptimo en cada órgano de la planta para una acumulación máxima de principios activos, que son función de su estado fenológico, y también puede deberse a variaciones durante el día.

2.2.6 Biosíntesis de los aceites esenciales y metabolismo de las plantas

Las plantas producen diversos compuestos orgánicos que aparentemente no parecen tener una función directa en su crecimiento y desarrollo. Estas sustancias se conocen como metabolitos secundarios, productos secundarios o productos naturales. Estos compuestos no se relacionan directamente con el proceso de fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, síntesis de proteínas, asimilación de nutrientes, formación de carbohidratos, los cuales hacen parte del metabolismo primario de la planta. El metabolismo primario proporciona las moléculas de partida para las rutas del metabolismo secundario, entre las que se encuentra (Duran *et al.*, 2007).

Ácido shikimico: da origen a muchos componentes aromáticos, aminoácidos aromáticos, ácido cinámico y ciertos polifenoles, y Aminoácidos: precursores de los alcaloides y antibióticos peptídicos que incluyen las penicilinas y cefalosporinas. Los metabolitos secundarios de las

plantas pueden dividirse según la estructura química en tres grupos, a saber: terpenos o terpenoides, fenoles y sus derivados, y alcaloides. En la figura 3 se ilustra la relación que existe entre los metabolitos primarios y secundarios (Duran *et al.*, 2007).

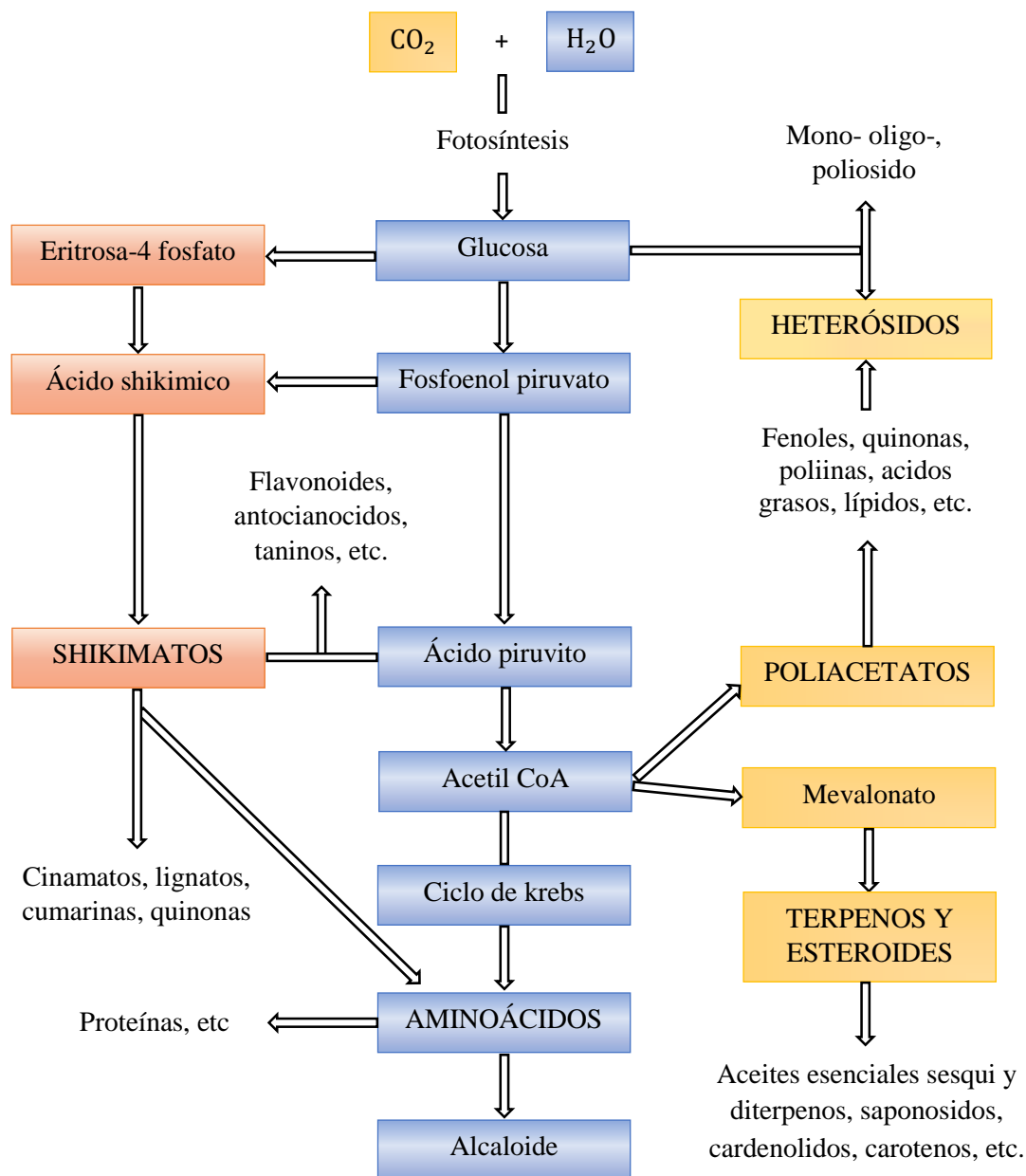


Figura 3. Rutas biosintéticas del metabolismo secundario (Merino, 2011)

Durante varios años se ha considerado que los metabolitos secundarios en las plantas son un material de desecho de las mismas. Sin embargo, se ha demostrado que estos cumplen importantes funciones ecológicas en las plantas como agentes atrayentes de polinizadores, sustancias de reserva de planta, regulan los procesos de evaporación de agua, hacen parte del mecanismo de defensa contra depredadores y otros vegetales (Vargas y Bottia, 2008).

La distribución de los metabolitos secundarios dentro de los grupos de las plantas presenta alguna característica particular, cabe mencionar las siguientes (Vargas y Bottia, 2008).

- Una planta contiene una mezcla de metabolitos secundarios con cantidades variables en diferentes células, tejidos y órganos.
- En el organismo individual o tejido, las cantidades y tipos de productos del metabolismo secundario varían con la edad o con las condiciones ambientales de plantas.
- Especie de géneros firmes o familias de plantas pueden presentar los mismos metabolitos secundarios.

Los terpenos o isoprenoides constituyen uno de los grupos más grandes de compuestos secundarios ampliamente presentes en el reino vegetal. Entre ellos, se encuentran los componentes de esencias, bálsamos y resinas. En las plantas, los isoprenoides pueden sintetizarse por dos rutas diferentes, a saber: la ruta del ácido mevalónico y/o la ruta de metileritriol fosfato (MEP).

Dependiendo del número de átomos de carbono, los terpenos se pueden clasificar en monoterpenos, C₁₀ (por ejemplo: limoneno, mentol, timol, alcanfor), sesquiterpenos, C₁₅ (farnesol), diterpenos, C₂₀, etc., donde cada uno de ellos presenta una función característica. Por ejemplo, los monoterpenos presentan acción antiséptica, o se emplean como expectorantes (Vargas y Bottia, 2008).

2.2.7 Métodos de extracción del aceite esencial

2.2.7.1 Destilación con agua (Hidrodestilación)

El principio de la destilación en agua es llevar a estado de ebullición una suspensión acuosa de un material vegetal aromático, de tal manera que los vapores generados puedan ser condensados y colectados. El aceite, que es inmisible en agua, se separa posteriormente. En la destilación con agua el material vegetal siempre debe encontrarse en contacto con el agua, si el calentamiento del equipo es con fuego directo, el agua presente en la cámara extractora debe ser suficiente y permanente para llevar a cabo toda la destilación a fin de evitar el sobrecalentamiento y carbonización del material vegetal, dado que este hecho provoca la formación de olores desagradables en el producto final; el material vegetal debe ser mantenido en constante agitación a fin de evitar aglomeraciones o sedimentación del mismo en el fondo del recipiente, lo cual puede provocar su degradación térmica. El tiempo total de destilación es función de los componentes presentes en el aceite esencial. Si el aceite contiene compuestos de alto punto de ebullición, el tiempo de destilación deberá ser mayor, los aceites esenciales

obtenidos mediante destilación en agua normalmente presentan notas más fuertes y un color más oscuro con respecto a los producidos por otros métodos (Albarracín y Gallo, 2003).

2.2.7.2 Destilación agua-vapor

En este sistema de extracción se emplea un vapor húmedo, proveniente del agua en ebullición, que traspasa el material vegetal suspendido encima y apoyado sobre una malla. La mayoría de plantas herbáceas se destilan por este método (Stashenko, 2009)

En este caso el vapor puede ser generado mediante una fuente externa o dentro de la propia cámara extractora, aunque separado del material vegetal, la diferencia radical existente entre este sistema y los anteriormente mencionados es que el material vegetal se encuentra suspendido sobre un tramado (falso fondo) que impide el contacto del material vegetal con el medio líquido en ebullición, este sistema reduce la capacidad neta de carga de materia prima dentro del extractor pero mejora la calidad del aceite obtenido (Albarracín y Gallo, 2003).

2.2.7.3 Destilación por Arrastre Vapor

La planta, semilla, hierva, etc., se sitúa en un recipiente a través del cual se hace pasar vapor de agua generado en otro recipiente (Pérez, 2006), que penetra el material vegetal a presión más alta que la atmosférica, la corriente de vapor rompe las células o canales oleíferos en la planta y arrastra la mezcla volátil, que se condensa luego de atravesar un refrigerante. Generalmente los aceites son más livianos que el agua y muy poco solubles en ella; por ende, pueden ser separados por decantación. La excepción la presenta el aceite de clavo, que es más pesado que el agua y se recoge debajo de ella. El método de arrastre con vapor se usa para extraer aceites de rizomas, raíces, semillas (vetiver, valeriana, jengibre, anís, cardamomo, etc.) y de hojas secas o fermentadas de algunas plantas (Antolinez *et al.*, 2008).

2.2.7.4 Extracción con disolventes

En el método de extracción con disolventes volátiles, la muestra seca y molida se pone en contacto con disolventes orgánicos tales como alcohol y cloroformo, entre otros. Estos disolventes solubilizan la esencia, pero también solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasas y ceras, obteniéndose al final una oleoresina o un extracto impuro. Se utiliza a escala de laboratorio porque a nivel industrial resulta costoso por el valor comercial de los disolventes, porque se obtienen esencias

contaminadas con otras sustancias contaminadas con otras sustancias, y además por el riesgo de explosión e incendio característicos de muchos disolventes orgánicos volátiles (Peredo, 2009).

Los disolventes derivados del petróleo, como éter dietílico, ciclohexano, hexano, acetato de metilo, propanol, etc., son tóxicos al inhalarlos o contacto con la piel. (Ortuño 2006). Los métodos más usados son extracción pro reflujo, mediante el equipo soxhlet y la extracción por disolventes, mayormente usada a nivel laboratorio, es la maceración o extracción alcohólica, en la cual la materia orgánica reposa en soluciones de alcohol por periodos de tiempo definidos. Los aceites esenciales son recuperados evaporando el alcohol (Chua *et al*, 2008).

2.2.8 El aceite esencial de laurel.

Los aceites esenciales de *L. nobilis* son de gran valor y se utilizan como materia prima de perfumes, cosméticos, especias y productos de aromaterapia, fitoterapia y nutrición (Callejas, 2013). El aceite esencial de las hojas frescas de *Laurus nobilis*, extraído por arrastre vapor, presentan como componentes como: cineol (40,91%) además de monoterpenos como α -pineno (5,82%), β -pineno (4,55%), sabineno (6,92%), limoneno (2,10%), linalol (1,29%) entre otros Sin embargo no sucede lo mismo con el resto de componentes mayoritarios, que varían notablemente dependiendo de la procedencia del material vegetal, los métodos de cultivo, la época de cosecha (Centurión, 2017; Callejas, 2013). El aceite esencial de *L.nobilis*, se caracterizan por un contenido muy alto de eugenol y por sus actividades biológicas, especialmente las propiedades antioxidantes. Incluso posee un efecto antiinflamatorio, probado en ratones y ratas. Un efecto antiinflamatorio dependiente de la dosis (Can y Buchbauer, 2010). Además, tiene actividad antifúngica debido a la presencia de los principales monoterpenos y sesquiterpenos identificados, probablemente actos que interfieren con la biosíntesis de la pared celular y permeabilidad iónica de la membrana, y tiene efectos perjudiciales en Adhesión y formación de biopelículas de *C. albicans*. Como este aceite esencial es de uso gratuito, seguro y con una toxicidad insignificante de acuerdo con la FDA, podría ser considerado un objetivo prometedor para el desarrollo de fármacos (Furtado *et al.*, 2014).

De la misma manera los extractos de la corteza de *L. nobilis* presentaron actividad contra *Botrytis cinerea* y *Spodoptera littoralis*, efecto que puede atribuirse a la presencia de alcaloides. El aceite esencial de laurel ha demostrado efecto fungistático *in vitro* contra *Ascosphaera apis*, un hongo infectante de colmenas de abejas (Alonso, 2004). El uso interno del 1,8-cineol ha demostrado disminuir el ritmo cardíaco y descender la presión arterial en

animales de laboratorio. Además, ha sido utilizado en cosméticos, para el tratamiento de la tos, dolores musculares, neurosis, reumatismo, asma y afecciones urinarias (Cruz, 2013).

2.2.9 Propiedades de actividad antibacterianas y antifúngicas de los aceites esenciales

Desde hace mucho tiempo se han reconocido las propiedades antibacterianas de algunos aceites esenciales. Además de propiedades antibacterianas, los aceites o sus componentes han mostrado también propiedades antivíricas, antifúngicas, herbicidas e insecticidas. La capacidad antifúngica y antibacteriana de los aceites esenciales de muchas especies de plantas han sido probadas por diferentes autores (Burt, 2004; Blázquez, 2014). A pesar de los beneficios que puede suponer el empleo de determinados aceites esenciales en el aumento de la vida útil de los productos mínimamente procesados, junto con la mejora en su actividad antioxidante, su uso también puede aportar a los mismos, sabores y aromas extraños, lo cual puede limitar su aplicación (Almela, 2012).

La aplicación de aceites esenciales es un método muy atractivo para controlar enfermedades tanto en cosecha como en post-cosecha. Estos materiales son una mezcla compleja de compuestos volátiles producidos en diferentes partes de las plantas, y han sido reconocidos por poseer diversas funciones, incluyendo conferir la resistencia a plagas y enfermedades; algunos aceites esenciales, así como, sus constituyentes han demostrado poseer propiedades antibacterianas y antifúngicas (Da Silveira *et al.*, 2014). Aunque, la actividad antimicrobiana de un aceite esencial, se atribuye principalmente a sus principales compuestos, el efecto sinérgico o antagonista de un compuesto en se debe considerar un porcentaje menor en la mezcla. Cada uno de los componentes del aceite esencial tiene su propio aporte a la actividad biológica del aceite. Los aceites esenciales como agentes antimicrobianos presentan dos personajes principales: el primero es su origen natural que significa más seguridad para las personas y el medio ambiente y la segunda es que han de considerarse de bajo riesgo para desarrollo de resistencia por microorganismos patógenos. Se cree que es difícil para los patógenos desarrollar resistencia a tal mezcla de componentes del aceite (Daferera *et al.*, 2003).

La actividad de los aceites esenciales puede ser atribuida a daños letales sobre la célula fúngica, ya que se altera la capacidad reproductiva y germinativa; sin embargo, no se cuenta con la información adecuada que posibilite determinar el sitio o sistemas biológicos que este afecte. (Alzate *et al.*, 2008). Mientras Cruz y Quispe (2018), atribuye la actividad antimicótica y antimicrobiana a presencia de los compuestos químicos los cuales son taninos, flavonoides y alcaloides.

Los antimicrobianos de los alimentos

Son compuestos químicos añadidos o presentes en los alimentos que retardan el crecimiento o causan la muerte de los microorganismos, aumentando así la resistencia a la alteración de la calidad de alimento. Los blancos principales de los agentes antimicrobianos son los microorganismos productores de intoxicaciones alimentarias (agentes infecciosos productores de toxinas) y los que alteran los alimentos, cuyos productores metabólicos finales o enzimas causan malos olores, sabores desagradables, problemas de textura, cambios de coloración o riesgo sanitario. La mayor parte de los antimicrobianos solamente son bacteriostáticos o fungistáticos, por lo que su efectividad sobre los alimentos es limitada. Por otra parte, debido a que algunos microorganismos pueden no verse inhibidos o destruidos por las dosis convencionales de antimicrobianos utilizados individualmente (legalmente aprobadas y/o sensorialmente aceptables), puede ser preferible utilizar una combinación de ellos, ampliando así el espectro de cobertura en la preservación de alimentos en general. (Sáez, 2000).

2.2.10 Antifúngicos o antimicóticos químicos

Es conocida como una sustancia que tiene como capacidad evitar la reproducción o el crecimiento de algunos tipos de hongos que incluso pueden provocar la muerte. Produciendo una variación en los componentes de una célula fúngica que logre bloquear su crecimiento, alterando su posibilidad o aptitud de supervivencia ya sea de forma directa o de forma indirecta (Gregori, 2005). Los antimicóticos pueden clasificarse según su estructura (Tabla 3) y de acuerdo a su mecanismo de acción (Tabla 4).

Tabla 3

Clasificación de los antifúngicos por su estructura química

Clasificación de los antifúngicos por su estructura	
Polienos	Nistatina, natamicina, anfotericina B
Azoles	Imidazol: clotrimazol, ketoconazol. Triazoles: fluconazol, itraconazol Triazoles de segunda generación: boriconazol, rabuconazol, posaconazol
Alilaminas	Terbinafina, naltifina
Lipopeptidos	Papulacandinas Triterpenos, glicosilados Equinocandinas: caspofungina, anidulofungina, micalofungina
Pirimidinas	Flucitosina
Otros	yoduro de potasio, ciclopirox, grisofulvin

Fuente: Cruz, 2018.

Tabla 4

Clasificación según su mecanismo de acción

Antifúngicos que actúan sobre las membranas citoplasmática	Antifúngicos que actúan sobre la pared	Antifúngicos que actúan sobre el núcleo
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Polienos ▪ Azoles 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Lipopeptidos 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Pirimidinas fluoradas ▪ Misceláneos
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Alilaminas ▪ Tiocarbamatos 		

Fuente: Cruz, 2018.

Mecanismo de acción

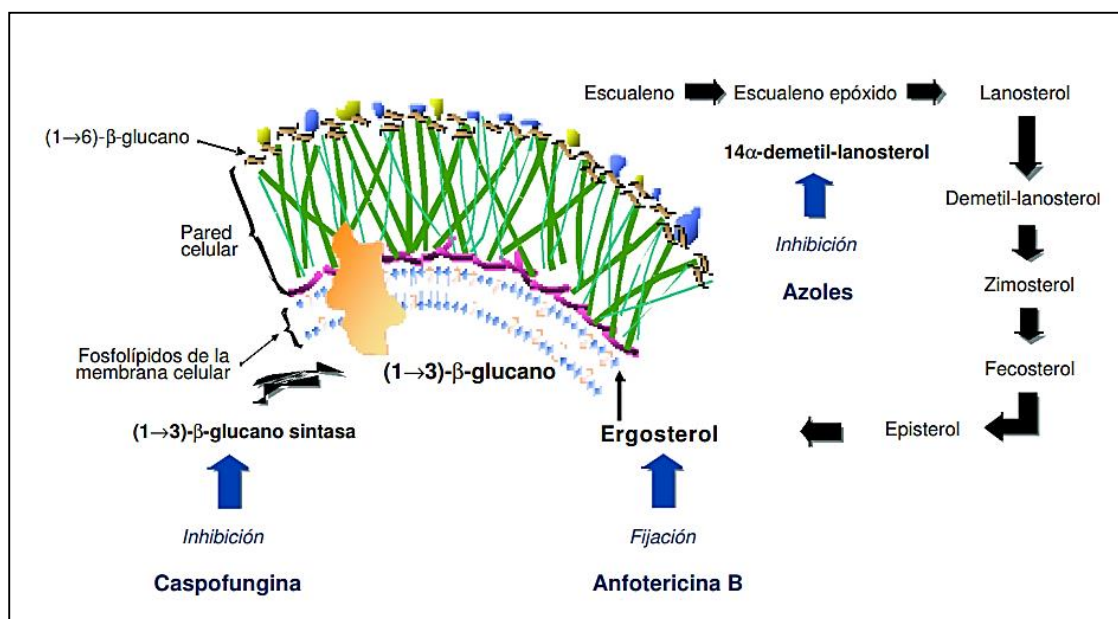


Figura 4. Mecanismo de acción de los diferentes antifúngicos

Antimicóticos que actúan sobre las membranas citoplasmáticas:

▪ **Los polienos:**

Actúan alterando la permeabilidad de la membrana lo que permite una pérdida de proteínas, glúcidos y cationes monovalentes y divalentes, causas de la muerte celular (Gregori, 2005).

▪ **Los azoles:**

Contienen un anillo con átomos de N libres unidos mediante enlace C-N a otros anillos aromáticos. La naturaleza de estos anillos modifica las propiedades fisicoquímicas, efecto terapéutico, toxicidad, etc. (Gregori, 2005).

- **Las alilaminas:**

Actúan inhibiendo la enzima escualeno epoxidasa y disminuyen la concentración de ergosterol, aumentando los niveles de escualeno. Como consecuencia, aumenta la permeabilidad de la membrana plasmática, se altera la organización celular y disminuye el crecimiento del hongo (Gregori, 2005).

- **Los tiocarbamatos:**

Tienen acción fungistática. El compuesto más conocido es el tolnaftato que bloquea la síntesis de ergosterol al inhibir la epoxidación del escualeno. Se emplea en el tratamiento tópico de dermatomicosis, tiñas, intertrigos micóticos, vaginitis micótica. (Gregori, 2005).
Antimicóticas que actúan sobre la pared celular:

- **Los lipopéptidos:**

Actúan inhibiendo la síntesis de glucanos a través de la inactivación de la enzima 1,3-betaglucano sintetasa, enzima responsable de formar este polímero de la glucosa que es esencial para la estructura de la pared de la célula fúngica. La pared se debilita y se torna incapaz de soportar el estrés osmótico, por lo que la célula muere (Gregori, 2005).

Antimicóticas que actúan sobre el núcleo:

- **Las pirimidinas fluoradas:**

Actúan como antimetabolitos. La más conocida de este grupo es la fluocitosina o 5-fluorocitosina que inhibe el crecimiento y reproducción de los hongos. Este fármaco se convierte en 5-fluorouracilo (5-FU), el cual es fosforilado e incorporado al ARN, convirtiéndose en un dexosinucleótido. Este compuesto inhibe a la timidilato sintetasa e impide la síntesis de proteínas de la célula (Gregori, 2005).

2.2.11 Métodos para la determinación de la actividad antimicrobiana

Para la evaluación antimicrobiana de aceites esenciales, se aplica generalmente métodos convencionales probados con capacidades antibióticas. Hay dos técnicas básicas usadas para la valoración de actividades antibacteriales y antimicóticas.

El primer método es difusión en agar (pozo o disco) y el segundo es el método de dilución (agar o caldo líquido). Las pruebas y evaluaciones de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales son difíciles debido a su volatilidad, insolubilidad en agua y complejidad (Ochoa, 2011).

- **Método de Difusión en agar**

El método de difusión en agar ha sido probablemente el más utilizado para determinar la actividad antimicrobiana contra microorganismos aeróbicos. En este método, existen dos formas de identificar la difusión y, por lo tanto, la efectividad del aceite esencial. En la primera, el agar solidificado se inocula con la suspensión requerida del microorganismo; un papel filtro es impregnado con una solución de concentración conocida del aceite esencial, el cual es colocado en la superficie del agar. En la segunda, se perfora el agar solidificado y previamente inoculado, usando un perforador estéril, y se vierte una solución de cierta concentración del aceite esencial en las perforaciones. (Bonev, *et al.*, 2008).

Posteriormente, las cajas Petri son incubadas a la temperatura y tiempo óptimos. El principio es la difusión del aceite esencial hacia todo el agar, lo que conduce a la inhibición del crecimiento de los microorganismos mediante la formación de zonas de inhibición. Por lo que se supone que el diámetro de las zonas aumentara al incrementar la concentración del aceite esencial (Bonev, *et al.*, 2008).

La aplicación de los métodos de difusión en agar para probar agentes antifúngicos es limitada a la fecha, sin embargo, este método tiene buena correlación con los métodos de referencia de la NCCLS (Méndez y Herrera, 2001). Los resultados de la prueba de difusión en agar son generalmente cualitativos. La susceptibilidad del microorganismo en prueba está relacionada con el tamaño de la zona de inhibición en milímetros. Los microorganismos se denominan susceptibles cuando el diámetro de la zona es mayor a 30-35 mm, intermedios cuando el diámetro de la zona varía entre 20 y 30 mm, o resistentes con una zona cuyo diámetro es menor a 15-20 mm (López *et al.*, 2005).

- **Método dilución en agar**

El método de dilución en agar es utilizado generalmente para determinar si éste es letal contra un microorganismo, además se usa con microorganismos aeróbicos o micro aerofilicos con una velocidad variable de crecimiento. Para esta técnica, se preparan diferentes diluciones de los aceites esenciales; posteriormente, las diluciones se añaden a los agares y éstos son puestos en cajas petri para su solidificación. Finalmente, los microorganismos en prueba previamente diluidos son inoculados en los agares e incubados a su temperatura y tiempo óptimos (de 16-24 h) (López *et al.*, 2005).

2.2.12 Características relativas a la morfología y desarrollo de los hongos

Como las plantas, animales y protistas, los hongos son eucariotas, organismos cuyos núcleos celulares están contenidos en membranas. No obstante, los hongos presentan una combinación de características que justifica su ubicación en un reino eucariótico separado. (Nabor, 2006).

Los hongos pequeños, filamentosos, multinucleados y, en ciertos casos, pluricelulares. Muchos de ellos se reconocen la apariencia algodonosa del micelio vegetativo. El organismo de los hongos está constituido por el micelio que es un agregado de filamentos o hifas. Estas hifas son de dos tipos funcionales:

- Hifas vegetativas que penetran en el sustrato para absorber las sustancias nutritivas.
- Hifas fértiles (aéreas), que producen las células reproductoras.

Todas las hifas de un tipo particular en un hongo forman una masa entrelazada denominada micelio. Un hongo puede tener un micelio único o varios tipos de micelios, a medida que experimenta las fases de su ciclo vital. Los hongos son heterótrofos, pero como ya sabemos, no ingieren los alimentos como los animales. Por el contrario, absorben el alimento después de descomponerlo en pequeñas moléculas, que atraviesan entonces la membrana plasmática mediante difusión o con la ayuda de las proteínas de transporte. (Nabor, 2006).

2.2.13 Intoxicaciones alimentarias por hongos

Los hongos están ampliamente distribuidos en la naturaleza y se ven frecuentemente sobre pan viejo, queso o frutas. Cada filamento, denominado hifa, crece fundamentalmente en el extremo por un mecanismo de extensión celular. Las hifas crecen en masa en lo que se denomina micelio, que puede verse fácilmente sin ayuda del microscopio (Madigan *et al.*, 1999). Algunos hongos que crecen sobre materiales vegetales producen toxinas con efectos indeseables para plantas y animales. Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos con diferentes propiedades químicas, biológicas y toxicológicas, producidas por hongos toxigénicos que se desarrollan en productos vegetales. Estas sustancias provocan intoxicaciones conocidas como micotoxicosis. Elevados niveles de micotoxinas en la dieta pueden causar efectos adversos agudos y crónicos sobre la salud del hombre y de una gran variedad de especies animales, pudiendo afectar a distintos órganos, aparatos o sistemas; especialmente al hígado, riñón, sistema nervioso, endócrino o inmunitario (Ruiz y Front, 2007).

Debido al bajo peso molecular las micotoxinas suelen ser muy termoresistentes y pueden difundirse grandes distancias en los alimentos por lo que tratamientos térmicos suelen ser inefectivos y la simple eliminación del hongo no evita la micotoxina, ya que es crecimiento superficial pero los productos de su actividad (micotoxinas) pueden difundirse al interior del producto. (Martínez, 2008).

2.2.14 Caracterización e identificación de hongos

La identificación de los hongos es posible a dos niveles dependiendo de la exactitud que se desea. Como primer nivel, los especímenes frescos pueden ser comparados con ilustraciones que están disponibles en guías específicas y con claves simples, reconociendo el género de los hongos. La investigación a segundo nivel es examinándolos microscópicamente, la medición de esporas, test químicos, otras características y consultado con especialistas y trabajos publicados. La observación microscópica constituye a la primera etapa del estudio del micelio, que permite conocer algunas características de los microorganismos, en los hongos se observan los tubos filamentosos del micelio llamado hifas en células que contienen uno o dos núcleos, las fíbulas o clamps (Carranza, 2006).

Para la identificación de los hongos se observan las características de las cepas tales como tamaño, color, tipo de micelio y forma de las colonias, además se observan al microscopio las diferentes estructuras tales como hifas, micelio, conidios y conidióforos. Barnett y Hunter (1972) muestran las claves dicotómicas para la determinación taxonómica a nivel de género las cuales se utilizan para comparar las características de crecimiento (Maldonado *et al.*, 2017).

Para la observación microscópica se realiza la cámara húmeda.

Cámara húmeda

Las cámaras húmedas son un medio rápido y directo para obtener esporulación y ayudar a identificar hongos. Un dispositivo para cultivo en cámara húmeda es un sistema que consta de una placa petri conteniendo un disco de papel filtro y una varilla de vidrio de “U” que soporta dos láminas porta y cubre objetos. Asépticamente se selecciona una pequeña porción de medio de cultivo estéril (Agar), y se coloca sobre la lámina porta objetos. Realizada la siembra del hongo en estudio, la preparación se cubre con la otra lamina y el papel filtro humedece conservando la asepsia, asegurarse que el papel filtro siempre esté húmedo y agregar agua si fuera necesario. La placa es incubada a temperatura ambiente (20 – 25° C) por 3 a 5 días. Pasado este período, debe haber suficiente crecimiento del hongo para describir las características del hongo; observar al microscopio primero con el objetivo de menor aumento

y, si fuera necesario, con el mayor para ver detalles. Dibujar y describir las estructuras visualizadas en el ocular: micelio, conidióforos, conidios, etc. (Gilchrist *et al.*, 2005).

2.2.15 El tallarín de casa

Las pastas (pastas alimenticias) constituyen los productos, derivados de los cereales, más simples utilizados en la dieta humana. Las pastas alimenticias incluyen productos tales como espaguetis, macarrones fideos y tallarines. Son obtenidas por desecación de una masa no fermentada, elaborada con sémolas, de trigo duro, trigo semiduro, trigo blando o sus mezclas y agua potable (Madrid, 2001).

El tallarín de casa es una pasta seca hecha de harina fortificada de trigo, huevos de granja, una pizca de sal yodada y agua, basada en la receta tradicional aprendida de los migrantes italianos que llegaron a Apurímac en el siglo XX. El color de la masa es determinado por la yema del huevo, que es rico en carotenoides y, hoy en día, es elaborado por la población urbana de Abancay, considerándolo como uno de los principales platos típicos de la región (Huamán, 2012).

2.2.16 Información Nutricional del tallarín de casa

Producto con un alto valor nutricional de fácil asimilación, dirigido a personas de intensa actividad y niños gracias a su buena palatabilidad.

Tabla 5

Composición de tallarín en 100g

Componentes	Tallarín (100g)
Carbohidratos	70.5 g
Proteínas	15 g
Agua	11 g
Grasa	2.5 g
Fibra y ceniza	1 g
Energía	374 kcal

Fuente: Huamán, 2012. *Tallarín casero abanquino DOÑA MICA*.

INDECOPI.

2.2.17 Productores de tallarines que trabajan con la DIREPRO y la Cámara de Comercio de Apurímac

En la tabla 6 podemos observar las microempresas productoras de tallarines de casa de la provincia de Abancay la cuales trabajan junto a la DIREPRO y la cámara de comercio de

Apurímac, quienes les dan soporte en cuanto a las mejoras de producción y promueven la venta de los tallarines de casa.

Tabla 6

Productores de tallarines en la provincia de Abancay asociados a la DIREPRO y la Cámara de Comercio de Apurímac

Distrito/Localidad	Producto	Organización
Abancay	Tallarines de casa	Asoc. Tallarines de casa Santo Domingo
Abancay	Tallarines de casa	Tallarines de casa el laurel
Abancay	Tallarines de casa	Asociación de productores doña Vissi
Tamburco	Tallarines de casa	Tallarines de casa Misky
Villa Ampay	Tallarines de casa	Tallarín de casa Rafu
Abancay	Tallarines de casa	Tallarín de casa San Miguel
Abancay	Tallarines de casa	Tallarines de casa Leomi
Abancay	Tallarines de casa	Agroindustrias Bella Abanquina SAC *
Abancay	Tallarines de casa	Asoc. De productores agropecuarios "Amancaes"
Abancay	Tallarines de casa	Asoc. Marca colectiva "Doña Mica"
Tamburco	Tallarines de casa	Tallarines Delizzia
Abancay	Tallarines de casa	Tallarines Abanquina
Abancay	Tallarines de casa	Carlita
Abancay	Tallarines de casa	Eli's
Abancay	Tallarines de casa	Asoc. De productores agro. San Miguel
Abancay	Tallarines de casa	Tallarines de casa "La Abanquina"
Abancay	Tallarines de casa	Tallarines de casa buen gusto prod. Chipani E.I.R.L
Abancay	Tallarines de casa	Asoc. De productores agro. Delizzia Abanquina
Abancay	Tallarines de casa	Asoc. De productores agrop. Amancaes

Fuente: DIREPRO y Cámara de Comercio de Apurímac 2018.

*El señor Quispe en calidad de gerente general de la microempresa tallarinera “Agroindustrias Bella Abanquina SAC” menciona que dicha entidad tiene una producción semi industrial con aproximadamente 15 toneladas de tallarines de casa por mes, esto varía de acuerdo a la demanda y tiene como mercado las quintas restaurant en un 50% mientras la otra parte es distribuida a otras provincias y distritos de la región de Apurímac. (Quispe S. F., comunicación personal, 13 de enero de 2019).

En la tabla 6 observamos las microempresas productoras de tallarines de casa de la provincia de Abancay que trabaja con la DIREPRO y la Cámara de Comercio de Apurímac, quienes les

dan soporte a estas empresas tallarineras en cuanto formas de producción y venta de su producto, quienes a la vez mencionan que la empresa de mayor capacidad de producción es la tallarinería “Agroindustrias Bella Abanquina SAC” mientras las demás empresas tienen una producción de 2000 a 3000 kilos mensuales.

El Tec. Berrocal en calidad de Coordinador de Programas Sociales Transferido “CAUSAY”, menciona que “la Municipalidad Provincial de Abancay realiza la licitación de tallarines de casa dos veces al año, el volumen a comprar varía al pasar los años, siendo así que en el 2016 se compró 23 000 kg, en el 2017 fueron 13 000 kg y el año 2018 cierra con 14 300 kg de tallarines de casa. Siendo nuestro proveedor la empresa Agroindustrias Bella Abanquina SAC, quien en estos tres años ha sido ganador de la licitación por contar con la documentación requerida y cumplir con las expectativas en la visita in situ de la planta” (Berrocal C. R., comunicación personal, 09 de diciembre de 2018).

2.3 Marco conceptual

- **Aceite:** cualquiera de los diferentes líquidos viscosos, generalmente no miscibles con agua. Los aceites naturales de plantas y animales son mezclas volátiles de terpenos y de estrés simples (que corresponden a los aceites esenciales) o son glicéridos de ácidos grasos.
- **Aceite esencial:** Aceite natural con olor característico, secretado por ciertas plantas aromáticas. Los terpenos son compuestos fundamentales. Son obtenidos por destilación, extracciones grasas neutras frías o solventes (alcohol), o presión y utilizados en los perfumes, condimentos, y medicinas.
- **Aleuriospora:** Espora (conidio) producida por un corto pedículo al final de un filamento no diferenciado; dt. aleurioconidio.: Aleurias o aleuriosporas, son esporas que se forman en las hifas. Se presentan más comúnmente en los dermatofitos.
- **Análisis organoléptico:** Una muestra (principalmente de alimento o bebida) basada exclusivamente en la valoración de los sentidos (vista, gusto, olfato, etc.). En la práctica, un análisis organoléptico es una prueba de degustación o cata para determinar la calidad del producto. El análisis organoléptico es una prueba siempre subjetiva que involucra directamente al gusto y olfato, pero que también está relacionada con el sentido de la vista y del tacto
- **Antifúngico:** Toda sustancia que tiene la capacidad de evitar el crecimiento de algunos tipos de hongos o incluso de provocar su muerte.
- **Ápice:** Punta o extremo de una cosa; especialmente, de la lengua.

- **Biosíntesis:** Conjunto de reacciones químicas que permiten a un ser vivo elaborar sustancias orgánicas complejas, como las proteínas, grasas, etc., a partir de otras más sencillas.
- **Blastoconidia:** Cúmulos esféricos e interválicos sobre las hifas. Es una estructura de reproducción asexual que se origina por gemación en los hongos blastomicetales, también llamados levaduras no esporógenas, que no presentan formas sexuales ni balistosporas. Se crean gemaciones de manera repetida, formando cadenas y separados por septos. Suelen producirse en gran cantidad durante los periodos favorables para el crecimiento del hongo y sirven para dispersarlo y aumentar su población en corto periodo de tiempo.
- **Caracterización:** determina los atributos peculiares de alguien o de algo, de modo que claramente se distinga de los demás.
- **Clamidosporas:** Esporas que se forman del engrosamiento de las hifas. No se consideran formas de reproducción, sino de resistencia, porque generalmente nacen en condiciones adversas. Pueden ser terminales o intercalares como *Mucor sp*
- **Clavidiforme:** En forma de clava o mazo, donde el grueso va en aumento desde la punta hasta el extremo opuesto.
- **Concentración:** Cantidad de sustancia disuelta por unidad de solvente en una disolución. La concentración se mide de varias formas. La cantidad de sustancia disuelta por unidad de volumen (su símbolo es c).
- **Conidio:** Es una espora asexual inmóvil formada directamente a partir de una hifa o célula conidiógena o esporogena. Aparecen en los hongos: Zigomicetos, Ascomicetos y algunos Basidiomicetos.
- **Conidióforo:** Es una estructura microscópica especializada en la producción asexual de miles de esporas llamadas conidios.
- **Diterpenos:** Los diterpenos son otra gran familia de terpenoides que, según las circunstancias, pueden aparecer en los aceites esenciales junto con los monoterpenos (C-10) y sesquiterpenos (C-15). Se trata de compuestos con 20 átomos de carbono (cuatro unidades de isopreno, C20), por lo que su peso molecular es superior al de monoterpenos y sesquiterpenos, y su volatilidad menor.
- **Espora:** Célula reproductiva asexual o célula en reposo capaz de desarrollar un organismo nuevo sin fusionarse con otra célula.

- **Fisión binaria:** Es una manera de reproducción asexual en la cual el ADN se duplica, se divide el citoplasma y se da lugar a dos células hijas
- **Gemación:** también llamado fisión binaria, se generan una yema o conjuntos de yemas en las zonas externas de la membrana plasmática. Se forma un abultamiento, el núcleo de la célula madre se divide, los núcleos hijos pasan a la membrana plasmática y forma estos abultamientos; las yemas pueden producir otras yemas en su superficie antes de separarse de su célula madre.
- **Hialino:** Transparente, translúcido.
- **Inhibición:** Suspensión transitoria de una función o actividad de un organismo mediante la acción de un estímulo adecuado.
- **Intoxicación:** Es la entrada de un tóxico en el cuerpo en cantidad suficiente como para producir un daño.
- **Micotoxinas:** Las micotoxinas son compuestos químicos de naturaleza orgánica, de bajo peso molecular y gran estabilidad en relación a condiciones de pH y temperatura. Actualmente se conocen unas 500 distintas. Son producidas por cepas toxigénicas de hongos que contaminan las materias primas durante el cultivo y/o almacenamiento.
- **Monoterpenos:** Se caracterizan por presentar 10 átomos de carbono y por lo tanto dos unidades de isopreno. Presentan gran variabilidad de hidrocarburos, alcoholes, aldehidos y otros compuestos oxigenados que, en conjunto, engloban gran cantidad de isómeros no sólo funcionales sino también de posición y geométricos. Están considerados como una de las más grandes familias de productos naturales
- **Morfología:** La morfología se ocupa del estudio de las formas y estructuras que constituyen a los seres vivos en general, como células, bacterias, virus, vegetales, hongos o animales. Su abordaje puede tener un interés específicamente descriptivo, en atención a la funcionalidad y características de determinada estructura o sistema, o comparativo, en el contraste entre diferentes especies, o, incluso, de una misma especie a lo largo del tiempo.
- **NCCLS:** Es una organización en la que están representados y participan el gobierno, la industria médica y las profesiones médicas. ocupa una posición singular que le permite responder a las necesidades y abordar los problemas de la comunidad de salud mediante: la elaboración, evaluación y disseminación de normas y pautas mundiales con consenso voluntario, del aporte de un foro para la comunicación y educación de sus miembros y de los usuarios de los servicios de salud, y el fomento

de una coordinación mundial a través de la cooperación e interacción con las organizaciones nacionales e internacionales.

- **Proliferación:** Se refiere a multiplicarse con abundancia o a reproducirse en formas similares.
- **Pseudohifas:** Es un estado intermedio entre una fase unicelular y otra miceliar. Este es un estado propio de las levaduras y se forma a partir de gemaciones. Las yemas no se desprenden de la célula madre, y posteriormente se alargan hasta dar origen a una estructura similar a la hifa verdadera. Su aparición ocurre principalmente cuando hay estrés ambiental por falta de nutrientes o por cualquier otra causa.
- **Septadas:** Las células están separadas entre sí por tabiques incompletos denominados septos.
- **Sesquiterpenos:** Se caracterizan por poseer 15 átomos de carbono y por tanto tres unidades de isopreno. Aunque por regla general la mayoría de ellos presentan una unión regular “cabeza-cola”, existen algunos que son el resultado de transposiciones en esta estructura.
- **Termoresistente:** Que resiste altas temperaturas sin alterar sus propiedades.

CAPÍTULO III

DISEÑO METODOLÓGICO

3.1 Definición y operacionalización de variables

A continuación, se presentan las variables independientes, dependientes, los indicadores y los índices que se utilizó en la investigación.

Tabla 7

Operacionalización de variables: Independientes, Dependientes, Indicadores e Índices

VARIABLES	DEFINICIÓN	INDICADORES	ÍNDICES
<u>Independiente</u>			
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Concentración de aceite esencial de laurel. 	El aceite esencial de laurel, será colocado en las placas en discos de inhibición a diferentes concentraciones.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ C₁=concentración 1 ▪ C₂=concentración 2 ▪ C₃=concentración 3 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ µl/µl
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tipos de hongos aislados. 	Tres cepas de hongos	<ul style="list-style-type: none"> ▪ H1 = hongo 1 ▪ H2 = hongo 2 ▪ H3 = hongo 3 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ morfología macroscópica ▪ morfología microscópica
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tiempo de evaluación. 	Periodos de tres tiempos diferentes.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ t₁ = 48 horas ▪ t₂ = 72 horas ▪ t₃ = 96 horas 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ horas
<u>Dependiente</u>			
Efecto inhibitorio sobre hongos predominantes en el tallarín de casa.	Capacidad para evitar la reproducción o reproducir la muerte del hongo en placas Petri mediante diámetros de inhibición.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Diámetros de inhibición. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ mm



3.2 Hipótesis de la investigación

3.2.1 Hipótesis general

- La caracterización fisicoquímica del aceite esencial de laurel (*Laurus nobilis*) permite evaluar la actividad antifúngica sobre los hongos aislados de tallarín de casa.

3.2.2 Hipótesis específicas

- La espectrometría infra roja (FT-IR) caracteriza el aceite esencial de laurel fisicoquímicamente.
- Se puede aislar en medio selectivo a los hongos contaminantes del tallarín de casa y describirlos morfológicamente.
- Las concentraciones evaluadas del aceite esencial de laurel son efectivas como agente de inhibición del crecimiento de los hongos aislados de tallarín de casa.

3.3 Tipo y diseño de la investigación

De acuerdo a su propósito o finalidades perseguidas es una investigación aplicada, porque depende de los descubrimientos y avances existentes.

El tipo de diseño de investigación es experimental de uso general, porque involucra la manipulación intencional de una acción para analizar sus posibles efectos.

El análisis estadístico se realizó en un diseño factorial de 3^3 que consiste en 27 tratamientos o puntos experimentales, cada tratamiento se realizó por duplicado (2 placas y en cada placa dos discos de agar) con un total de 108 observaciones, cuyos resultados fueron evaluados estadísticamente a fin de determinar las diferencias significativas entre ellos.

Modelo estadístico

El diseño factorial $a*b*c$ se describe mediante el comportamiento de la respuesta Y.

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + B_l + a(\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

$$i = 1, 2, \dots, a \text{ (Nivel de factor A)}$$

$$j = 1, 2, \dots, b \text{ (Nivel de factor B)}$$

$$k = 1, 2, \dots, c \text{ (Nivel de factor C)}$$

$$l = 1, 2, \dots, r \text{ (Bloque)}$$

Dónde:

Y_{ijkl} = observación individual.

μ = media general.

α_i = efecto del i -ésimo nivel del factor A.

β_j = efecto del j -ésimo nivel del factor B.

γ_k = efecto del k -ésimo nivel del factor C.

B_l = efecto del l -ésimo bloque.

$\alpha(\beta)_{ij}$ = efecto de la interacción del i -ésimo nivel del factor A y del j -ésimo nivel del factor B.

$(\alpha\gamma)_{ik}$ = efecto de la interacción del i -ésimo nivel del factor A y del k -ésimo nivel del factor C.

$(\beta\gamma)_{jk}$ = efecto de la interacción del j -ésimo nivel del factor B y del k -ésimo nivel del factor C.

$(\alpha\beta\gamma)_{ijk}$ = efecto de la interacción del i -ésimo nivel del factor A y del j -ésimo nivel del factor B y del k -ésimo nivel del factor C.

ε_{ijkl} = efecto aleatorio o error en la obtención de Y_{ijkl}

Los niveles serán:

α_i = **Concentración** (3 niveles; $i=1, 2, 3$)

A_1 = 0.03 μ l/ μ l

A_2 = 0.06 μ l/ μ l

A_3 = 0.1 μ l/ μ l

β_j = **Hongo** (3 niveles; $j=1, 2, 3$)

B_1 = Hongo 1

B_2 = Hongo 2

B_3 = Hongo 3

γ_k = **Tiempo** (3 niveles; $k=1, 2, 3$)

C_1 = 48 horas

C_2 = 72 horas

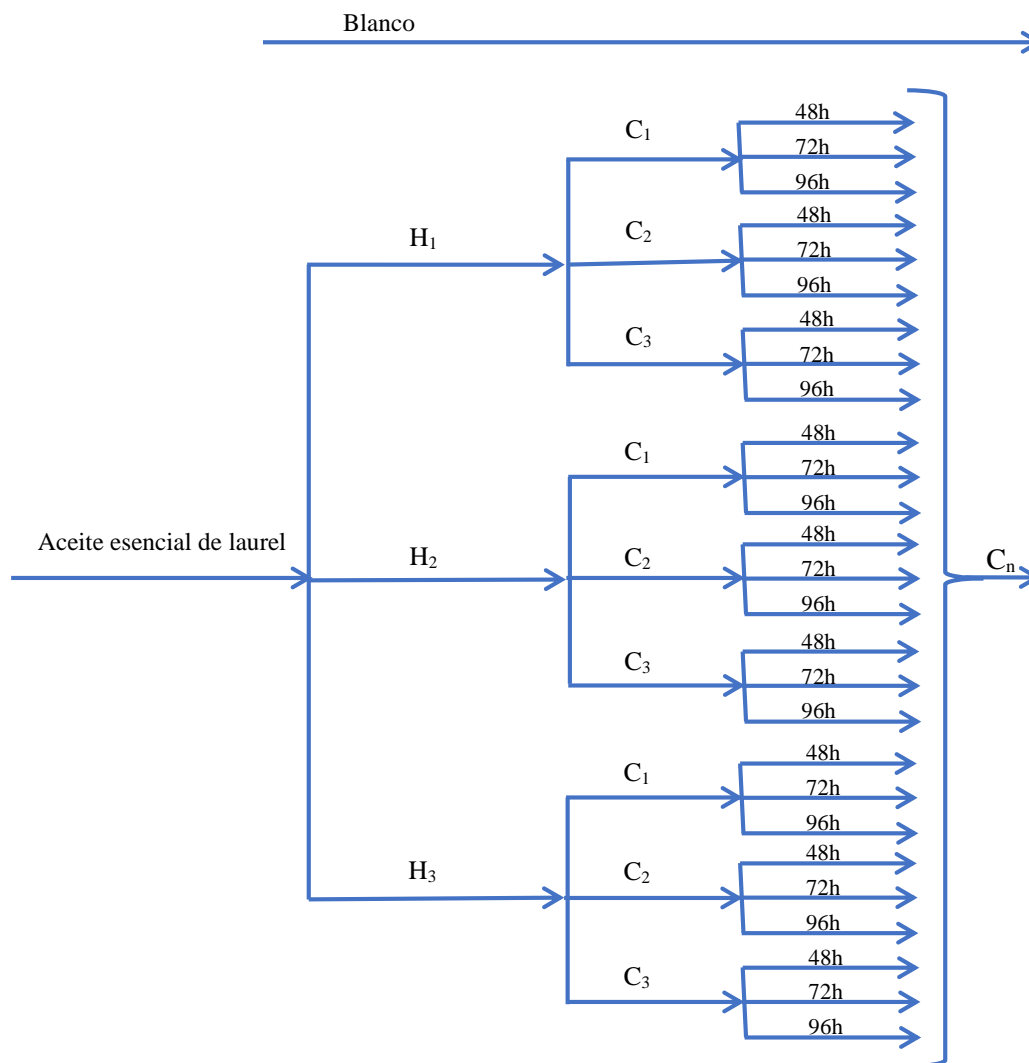
C_3 = 96 horas

Tabla 8

Esquema del diseño experimental de la investigación

Caracterización del aceite esencial de laurel	Aislamiento y preparación de cepas	Determinación de la actividad antifúngica
---	------------------------------------	---

DISEÑO



PARÁMETROS

- T°= ambiente
- H₁=cepa de hongo 1
- H₂=cepa de hongo 2
- H₃=cepa de hongo 3
- T°=30°C
- t= 72 horas
- C₁= concentración 1 (0.03 µl/µl).
- C₂= concentración 2 (0.06 µl/µl).
- C₃= concentración 3 (0.1 µl/µl).
- C_n= concentración con mayor inhibición.
- T°=30°C

CONTROL

- HR
- Índice de refracción
- Densidad
- Color
- Olor
- Identificación morfológica de las cepas aisladas.
 - Color
 - Forma
 - Aspecto
- Diámetros de inhibición (mm).
- Tiempo: 48, 72 y 96 horas.



3.4 Población y muestra

La población está definida por las cepas presentes en 1 kilo de tallarín de casa los cuales fueron obtenidos del mercado las Américas.

Para este trabajo de investigación la determinación de la muestra fue no probabilístico, en el cual la muestra se seleccionó dependiendo cuales fueron los más representativos de la población de hongos aislados del tallarín de casa. Además, el tamaño de muestra fue de 10g de tallarín de casa los cuales fueron inoculados y se tomó una dilución de 10^{-3} de cada cepa pura aislada para cumplir con las unidades experimentales propuestas.

3.5 Procedimiento de la investigación

3.5.1 Etapa I: Obtención de aceite esencial de *Laurus nobilis*

La obtención del aceite esencial *Laurus nobilis* se realizó mediante la destilación con agua también llamado hidrodestilación.

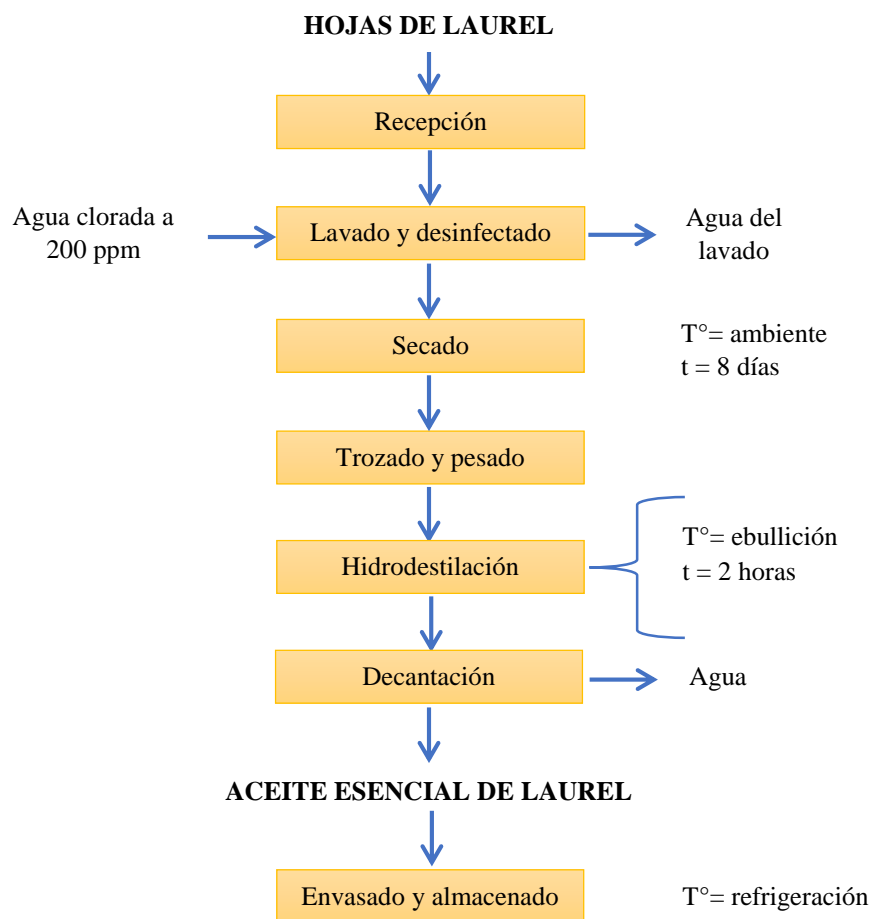


Figura 5. Diagrama de flujo de la hidrodestilación del aceite esencial de *Laurus nobilis*.

Las hojas frescas de laurel (*Laurus nobilis L.*) provenientes del distrito de Curahuasi, provincia de Abancay departamento de Apurímac, se tomaron de las ramas situadas en la base de la copa del árbol del laurel, antes de la floración.

a) Recepción y pesado.

Las hojas de laurel fueron transportadas en bolsas tejidas en rafia de polipropileno al laboratorio de Biotecnología Agroindustrial de la Escuela Académico Profesional Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, para su posterior secado.

b) Lavado y desinfectado.

El lavado y desinfectado se realizó con la finalidad de remover las materias extrañas adheridas a las hojas de laurel para asegurar un óptimo rendimiento del proceso y la calidad del aceite esencial de laurel, para lo que se utilizó hipoclorito de sodio a una concentración de 200 ppm durante 5 minutos y enjuagando con agua destilada.

c) Secado.

El secado de las hojas de laurel se realizó a temperatura ambiente durante ocho días en un ambiente aislado y lejos del sol, con el fin de evitar: pérdidas en sus componentes volátiles, crecimiento de moho y putrefacción de las hojas realizando rotaciones a diario para un secado uniforme.

d) Trozado y pesado.

El trozado de las hojas de laurel se realizó cortando las hojas de laurel en trozos de 1.5 por 2 cm de ancho y largo aproximadamente de manera manual para obtener un mejor rendimiento del aceite esencial, asimismo facilitar el flujo de la materia por el balón hidroddestilador, seguido de un pesado en una balanza digital, para determinar la cantidad de materia prima seca-cortada y determinar el rendimiento del aceite esencial de laurel.

e) Hidrodestilación.

Las hojas trozadas de laurel se introdujeron en el balón de destilación junto al agua en una relación de 1:5 (150 g de hojas de laurel: 750 ml de agua). A medida que el Balón de destilación y la mezcla se calientan hasta llegar a la temperatura de ebullición por dos horas, cada componente cambia a la fase gaseosa. Las moléculas gaseosas generadas recorren a

través del brazo lateral del balón de destilación hacia un condensador Graham, el cual tiene la cámara del condensador llena de agua fría con la finalidad condensar el vapor conectándolo a una pera decantadora.

f) Decantación.

Se realizó con la pera de decantación (material de vidrio), aprovechando el principio de la diferencia de densidades existente entre ambos fluidos, el aceite esencial se coloca en la parte superior del agua de acuerdo a este principio formando dos fases y facilitando la decantación, considerando un rango de temperatura de 20 a 30 °C con la finalidad de evitar pérdidas de aceite esencial por volatilización.

g) Envasado y almacenado

El aceite esencial obtenido se envaso en un recipiente de vidrio color ámbar de 30 ml de capacidad para evitar la degradación química por acción de la luz, calor y aire. Se almacenó en una temperatura de refrigeración para su posterior caracterización fisicoquímica y determinación antifúngica.

3.5.2 Etapa II: Análisis fisicoquímicos del aceite esencial de *Laurus nobilis*

a) Determinación de las características sensoriales y el rendimiento

Se determinaron las características sensoriales como el color, olor sabor y apariencia del aceite esencial de laurel mediante la vista, el olfato y el gusto.

El rendimiento de la extracción del aceite esencial de las hojas de laurel se determinó por medio de las siguientes ecuaciones (Granados *et al.*, 2013 y Ochoa, 2011).

$$\% \text{ Rendimiento } p/p = \frac{\text{masa final del aceite (g)}}{\text{masa inicial de material vegetal (g)}} * 100$$

b) Determinación de la densidad por el método picnométrico

Para determinar la densidad se procedió de acuerdo a la Norma Técnica Peruana NTP 319.081 (1994), determinación de la densidad y la densidad relativa (Anexo 1). Los ensayos se realizaron en el Laboratorio de Química de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial – UNAMBA.

c) **Determinación de la composición química del aceite esencial de *Laurus nobilis* por el método espectrometría infrarroja (FTIR)**

Los compuestos presentes en el aceite esencial de laurel se determinaron mediante espectrometría infra roja (FTIR). El espectro infrarrojo permite detectar la presencia de grupos hidroxilo, carbonilo, anillos aromáticos, enlaces dobles C=C, etc. Para determinar el espectro basta con colocar una gota del aceite esencial.

3.5.3 Etapa III: Aislamiento de hongos y obtención del cultivo puro

Para el aislamiento de los hongos se compró 1 kg de tallarín de casa envasado de una tienda comercial del mercado las Américas, sin considerar la marca.

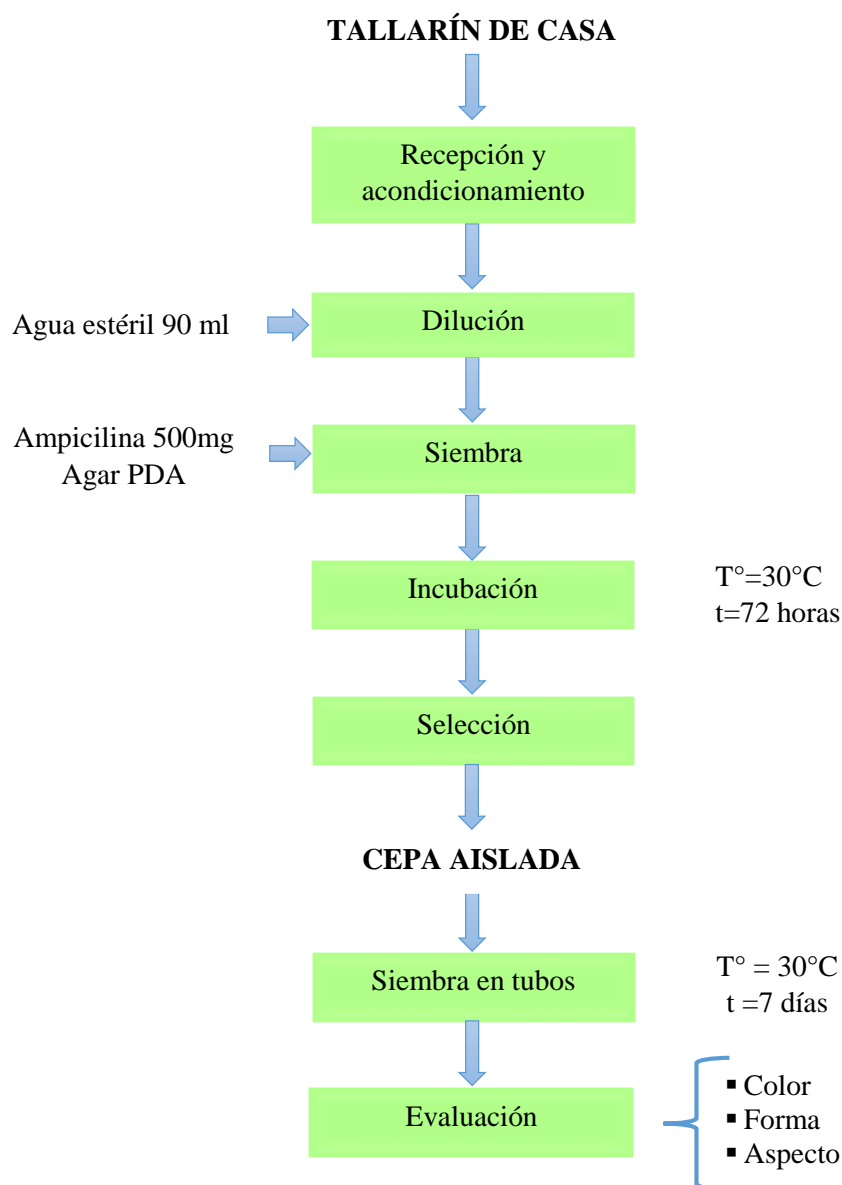


Figura 6. Diagrama del aislamiento de hongos y obtención del cultivo puro.

a) Recepción y acondicionamiento:

Se recibió 1 kilo de tallarines de casa envasado, manteniéndolo cerrado hasta el momento de hacer el aislamiento de hongos.

b) Dilución:

Se realizó la dilución el cual consiste en introducir 10 gramos de tallarines de casa en un matraz con 90 mililitros de agua estéril, se procede con la dilución, en una serie de tubos de ensayo que cada uno contienen 9 mililitros de agua destilada estéril. Se tomó un mililitro del matraz usando una pipeta estéril, el cual se colocó en el primer tubo de ensayo, sin retirar la pipeta del mismo se vierte, este corresponde a la dilución 10^{-1} el tubo es agitado y con una nueva pipeta se retiró 1 mililitro de la dilución de 10^{-1} para introducirlo en el segundo tubo de ensayo el cual fue la dilución 10^{-2} , y así sucesivamente utilizando una nueva pipeta para cada tubo de ensayo, hasta la sexta dilución.

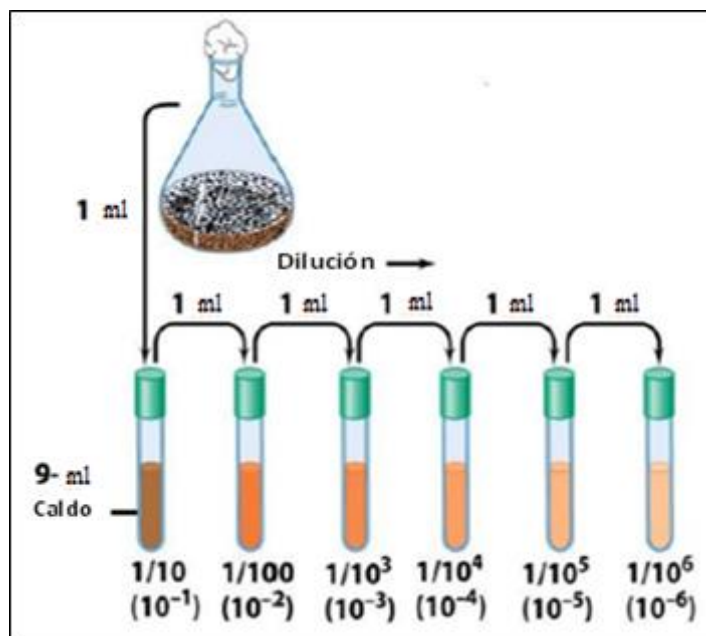


Figura 7. Dilución del tallarín de casa.

Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo usado para este estudio, es Agar Papa Dextrosa (PDA) el cual permitió el crecimiento de los mismos en condiciones controladas y poder mantenerlos en estado puro.

Se preparó el medio a partir de la base deshidratada de agar, de acuerdo a la siguiente composición:

Tabla 9
Composición de agar papa dextrosa

Componentes	Cantidad
Infusión de papa	200,0 g/l
Dextrosa	20,0 g/l
Agar	17,0 g/l
Agua destilada	1L

Se lavaron las papas, pelaron, revanaron y se las hizo hervir hasta que se cosan, se filtraron a un matraz, donde se le añadió 20 gramos de dextrosa y 17 gramos de agar, a donde se aforó a 1 litro con agua destilada. Se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión y se dejó enfriar hasta la temperatura de 45 - 50°C.

Una vez autoclavado el agar, antes de ser plaqueado se coloca la ampicilina al agar PDA la solución de ampicilina para evitar el crecimiento de bacterias en las placas y posteriormente se vertió a las placas Petri esterilizadas.

Preparación de solución de ampicilina:

Se autoclavó un envase de 20 ml de capacidad con 10 ml de agua destilada, una vez autoclavado se le agregó 500 mg de ampicilina.

c) Siembra:

Se procedió a sembrar por incorporación las diluciones en placas petri con agar PDA (Agar Papa Dextrosa) los cuales fueron preparados con ampicilina previamente.

Se tomó 1 ml de la sexta dilución incorporándola a la placa Petri vacía estéril, asimismo se incorporó el agar PDA sobre el volumen de esporas, tapado la placa se procedió a girar suavemente las placas en sentido horario y anti horario para homogenizar las esporas.

d) Incubación:

Las placas sembradas son envueltas en papel para que la probabilidad de contaminación de estas sean las más bajas y recibir la incubación a 30°C de temperatura por 72 horas.

e) Selección:

Pasados las 72 horas se seleccionaron a las cepas más predominantes que crecieron en las placas para luego sembrarlas en tubos de ensayo y obtener las cepas aisladas.

f) Siembra en tubos:

Con la ayuda de un asa de siembra se tomó a la cepa más predominante con el debido cuidado para luego colocarlo en un tubo con agar PDA, al que contenía 10 ml de medio de cultivo (PDA) y estéril en los tubos de ensayo con una inclinación pico flauta.

Una vez se tuvo los cultivos puros de los hongos se realizó una resiembra a tubos de ensayo inclinados.

g) Evaluación:

Después de la obtención de las cepas puras de los hongos se identificaron las características morfológicas de la siguiente manera:

Se preparó una cámara húmeda para la identificación microscópica para lo cual se tuvieron 2 placas:

- Placa 1: Se coloca un disco de papel filtro (Whatman N°1) en el fondo de una placa Petri, en la parte superior del papel filtro se colocó dos soportes de vidrio cortados aproximadamente a un tamaño de 6 cm de longitud. Sobre los soportes se colocó una lámina portaobjeto. El disco de papel filtro se humedeció con agua destilada estéril, para mantener la humedad durante todo el periodo de incubación.
- Placa 2: Se vertió agar en una placa Petri (manto delgado), una vez solidificado se cortaron en cuadrados de 1 x 1 cm de agar, con ayuda de un bisturí.
- Se coloca sobre la lámina de portaobjetos (placa 1) los cuadros de agar que se cortaron, sobre este cuadrado se sembró el hongo, a continuación, se coloca un cubreobjetos y se procedió a conservar en la cámara húmeda e incubar a 30°C durante 3 días.
- La observación se realizó en un microscopio con aceite de inmersión, con el objetivo 100x.

3.5.4 Etapa IV: Evaluación de la actividad antifúngica del aceite esencial de *Laurus nobilis*

Para determinar la actividad antifúngica del aceite esencial de laurel, se aplicó la técnica microbiológica de difusión en agar. Una vez las cepas de los hongos ya purificados en tubos de ensayo con PDA inclinados en pico flauta, estos fueron usados para la suspensión de espora, asimismo, se prepararon las concentraciones del aceite esencial.

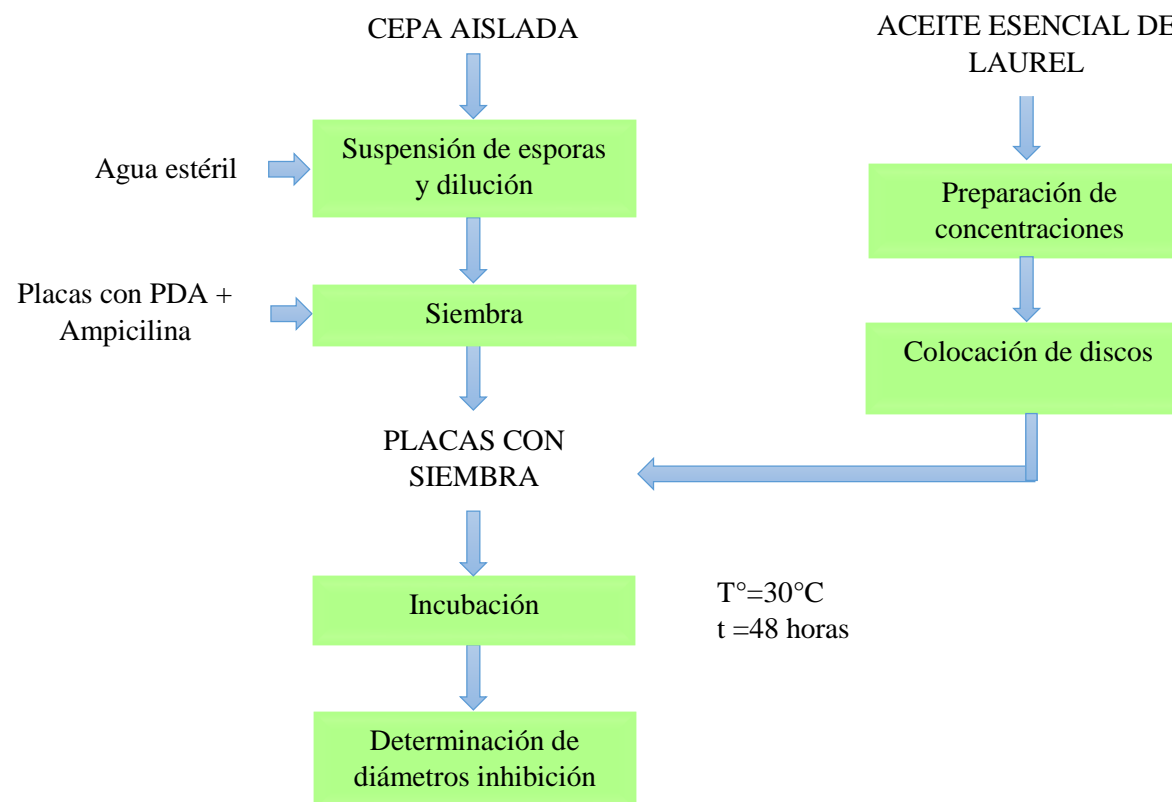


Figura 8. Diagrama de flujo de la evaluación de la actividad antifúngica

a) Suspensión de esporas y dilución.

Para la preparación de la suspensión de esporas de los hongos, se tomaron las cepas ya purificadas. Las esporas se removieron, lavando la superficie del cultivo con 10 ml de una solución de agua destilada previamente esterilizada, luego se tomó 1 ml de esta suspensión para sembrar por incorporación en un matraz, con 10 ml de PDA el cual se dejó incubar por 72 horas a 30°C, pasado este tiempo se agregó 10 ml de agua destilada estéril con el cual se enjuagó las esporas de hongos, teniendo esta suspensión se procedió a diluir hasta la concentración 10^2 (concentración óptima de 1×10^6 UFC/ml en la que se midieron los diámetros de inhibición).

b) Siembra.

Una vez solidificado el agar PDA en las placas, se realizó la siembra de esporas por diseminación.

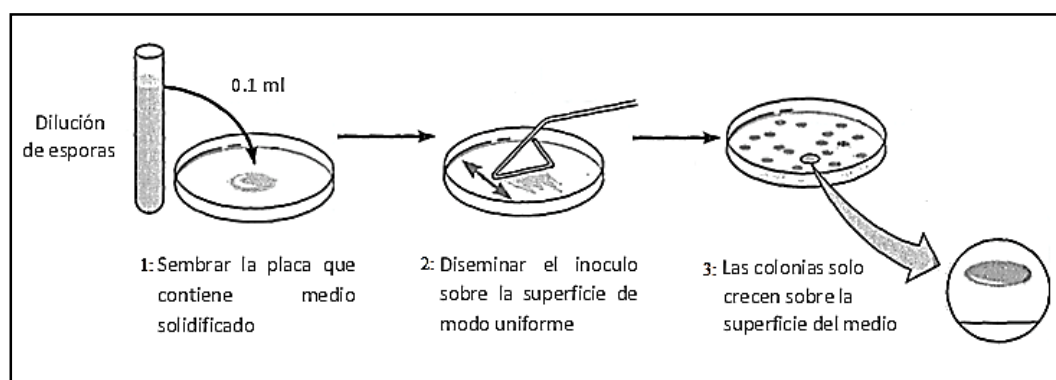


Figura 9. Siembra de esporas por diseminación.

c) Preparación de concentraciones.

Las concentraciones (C) fueron preparadas en matraces con volúmenes de 5, 10 y 15 μ l de aceite esencial con agar PDA por disco de agar de 150 μ l de solución (discos de agar de 5 mm de diámetro).

Concentración 1: Se colocó 14.5 ml de agar PDA en un matraz de 50 ml de capacidad a una temperatura de 40 – 50°C, con 0.5 ml de aceite esencial, dando una solución de 15 ml.

Concentración 2: Se colocó 14 ml de agar PDA en un matraz de 50 ml de capacidad a una temperatura de 40 – 50°C, con 1ml de aceite esencial, dando una solución de 15ml.

Concentración 3: Se colocó 13.5 ml de agar PDA en un matraz de 50ml de capacidad a una temperatura de 40 – 50°C, con 1.5 ml de aceite esencial, dando una solución de 15 ml.

Cada solución se agitó hasta homogenizarla y luego verterla en una placa, una vez solidó el agar se procedió a fomar discos con la ayuda de un sacabocado para colocarlos en las placas que ya están con las siembras de las cepas aisladas.

De esta manera se tuvo:

C1 = 0.03 μl / μl con un volumen de 5 μl por disco de agar.

C2 = 0.06 μl / μl con un volumen de 10 μl por disco de agar.

C3 = 0.1 μl / μl con un volumen de 15 μl por disco de agar.

d) Colocación de discos de inhibición.

Con la ayuda de una pinza se colocan los discos de agar en las placas (dos discos de agar por placa) sobre la siembra de esporas de manera equidistante. También se considero emplear como control negativo una placa sembrada sin ningún disco para las tres cepas de hongos.

e) Incubación.

Posteriormente, las placas petri fueron incubadas a la temperatura de 30°C y controlar el tiempo de 48, 72 y 96 horas.

f) Determinación de diámetros de inhibición.

Para la medida de la zona de inhibición se tuvo en cuenta la medida de los diámetros de inhibición con la ayuda de una regla (en mm) y con la siguiente ecuación:

$$D.I. = DI_{\text{aparente}} - DD$$

D.I. = Diámetro de inhibición (mm).

D.D. = Diámetro del disco de agar (mm).

D.I_{aparente} = Diámetro de inhibición + Diámetro del disco de agar

3.6 Material de investigación

3.6.1 Instrumentos de investigación

3.6.1.1 Materia prima

- Para la obtención del aceite esencial de laurel se utilizó 4 Kg de hojas de laurel (*Laurus nobilis*) provenientes del distrito de Curahuasi, ubicado a 2684 msnm, - 13.5425 de latitud y -72.6958 longitud. 13° 32' 33" Sur, 72° 41' 45" Oeste, de la provincia de Abancay, departamento de Apurímac. La cosecha de las hojas de laurel se realizó en el mes de septiembre, antes de la floración, estas hojas fueron secadas en sombra.
- Para el aislamiento de los hongos se compró 1 Kg de tallarín de casa envasado de una tienda comercial del mercado las Américas - Abancay, sin considerar la marca.

3.6.1.2 Equipos

- Balanza, capacidad 2 Kg
- Incubadora, marca Memmert, modelo INE-400.
- Espectrometro FT-IR, modelo Nicolet iS 10, marca Thermo Scientific.
- Microscopio RELEVAION III LED
- Autoclaven vertical, marca Famarel, modelo FV3035.
- Refrigeradora, marca Mabe, modelo RM390JXPX.
- Horno Microondas, marca Samsung, modelo AME0103M/SAM.
- Equipo de destilación de vidrio: balón de destilación de 500 ml de capacidad con juntas de vidrio esmerilado, condensador Graham.
- Cocina eléctrica

3.6.1.3 Materiales

- Vaso precipitado de 500 ml, 50 ml de capacidad.
- Pera decantadora de 150 ml de capacidad.
- Frasco color ámbar de 30 ml de capacidad.
- Matraz Erlenmeyer de 500 ml y 50 ml de capacidad.
- Pipetas de 10 ml, 5 ml, 2 ml, 1 ml de capacidad.
- Probeta de 100 ml de capacidad.
- Placas Petri
- Embudo de vidrio
- Picnómetro de 10 ml de capacidad.

- Micropipeta de 100 μ l de capacidad.
- Tubos de ensayo tapa rosca de capacidad de 15 ml.
- Mechero Bunsen
- Gradilla
- Asa de siembra
- Jarras medidoras
- Pinzas
- Algodón
- Alcohol al 96°

3.6.1.4 Medio de cultivo

- Agar papa dextrosa (Agar-agar, Dextrosa – glucosa, Papa)

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1 Resultados y discusiones

4.1.1 Extracción del aceite esencial de *Laurus nobilis* por hidrodestilación

El proceso de destilación se realizó en el balón destilador de 2000 ml de capacidad al cual se le introdujo 150 g de material vegetal con 750 ml de agua en relación de 1:5.

Tabla 10

Parámetros del aceite esencial de laurel extraído por hidrodestilación.

Parámetros	Cantidad
Cantidad de materia vegetal	4000 g
Tiempo de destilación	2 horas
Peso del aceite esencial	17.8732 g
Rendimiento del aceite esencial p/p	0.45%

Se realizó 22 tratamientos de hidrodestilación con 4 Kg de hojas de laurel las cuales se secaron hasta obtener un 40% de humedad, el tiempo fue de 2 horas, teniendo 15 ml de aceite esencial *Laurus nobilis* con un peso de 13.5549 g. Dando un rendimiento 0.45% en pesos/peso (p/p) de la extracción Camacho *et al.*, (2011) menciona que el rendimiento de los aceites esenciales es 0,1 a 1% del peso seco de la planta. Teniendo así que el rendimiento en p/p de *Laurus nobilis* obteniendo por hidrodestilación es 0.4%, (Andreatta *et al.*, 2012) mientras De Corato *et al.*, (2010) obtuvo 0.6% de rendimiento de aceite esencial obtenido con la técnica de dióxido de carbono supercrítico. El rendimiento en peso/peso obtenidos en la presente investigación concuerdan con los resultados reportados en la literatura científica de Camacho *et al.*, (2011) y Andreatta *et al.*, (2012), indicando que las condiciones en las que las hojas fueron acondicionadas y secadas en un ambiente que no altero las propiedades del aceite esencial.

4.1.2 Características físicas del aceite esencial de *Laurus nobilis*

Las características físicas del aceite esencial de hojas de laurel se determinaron a una temperatura ambiente, los resultados se muestran a continuación.

Tabla 11*Características físicas del aceite esencial de laurel*

Propiedades físicas	Índice
Densidad	0.8947 g/ml
Índice de refracción	1.472

Como se puede observar en la tabla 11, se tiene que el aceite esencial de laurel es menos denso que el agua (1.00 g/ml) lo que hace que el aceite se coloque en la parte superior del agua, esta diferencia de densidades nos permitió la separación del aceite esencial del agua. Se calculó la densidad en (g/ml) a una temperatura de 20°C (NTP 319.081.1974) y el índice de refracción (NTP 319.075.1974). De donde se obtuvo una densidad de 0.8947 g/ml y un índice de refracción de 1.472 a 20°C, Según (Albaladejo, 1999) el índice de refracción disminuye cuando aumenta la temperatura y es directamente proporcional a la densidad. Este parámetro varía con la longitud de onda del rayo de luz refractada y la temperatura. Las características físicas del aceite esencial de laurel son parámetros de calidad aromática que permiten tomar decisiones en futuros proyectos de rentabilidad comercial. Frente a los resultados obtenidos de la densidad y el índice de refracción, estos nos indican que el aceite obtenido tiene posibilidades de ser comercializado.

Las características sensoriales que presenta el aceite esencial de laurel obtenido mediante la técnica de hidrodestilación se muestran en la tabla 12.

Tabla 12*Características sensoriales del aceite esencial de laurel*

Características sensoriales	Índice
Olor	Característico fuerte
Color	Transparente
Aspecto	Líquido limpio y fluido
Sabor	Amargo astringente

El aceite esencial de las hojas de laurel proveniente del distrito de Curahuasi, provincia de Abancay tiene como características sensoriales: olor característico fuerte, color transparente, sabor amargo astringente y un aspecto líquido limpio y fluido. Valbuena (2018) lo caracteriza organolépticamente con un Olor: fresco fuerte y dulce aromático, Color: amarillo claro, Apariencia: líquida, asimismo Furtado *et al.*, (2014) y Andreatta *et al.*, (2012) mencionan que posee un color: amarillo pálido, aunque también varían en un rango de incoloro a amarillo claro y un olor característico. Las características sensoriales obtenidas en esta investigación son similares a las mencionadas, debido a que estos datos podrían variar de acuerdo a la época de cosecha y/o lugar de procedencia.

4.1.3 Caracterización química por espectrometría infrarroja (FT-IR) del aceite esencial de laurel

En la figura 10 se muestra la curva de los componentes que presenta el aceite esencial de laurel. En la que la absorbancia está en función al número de ondas (cm^{-1}). Este equipo tiene la capacidad de cualifica a los componentes del aceite esencial de laurel mas no los cuantifica.

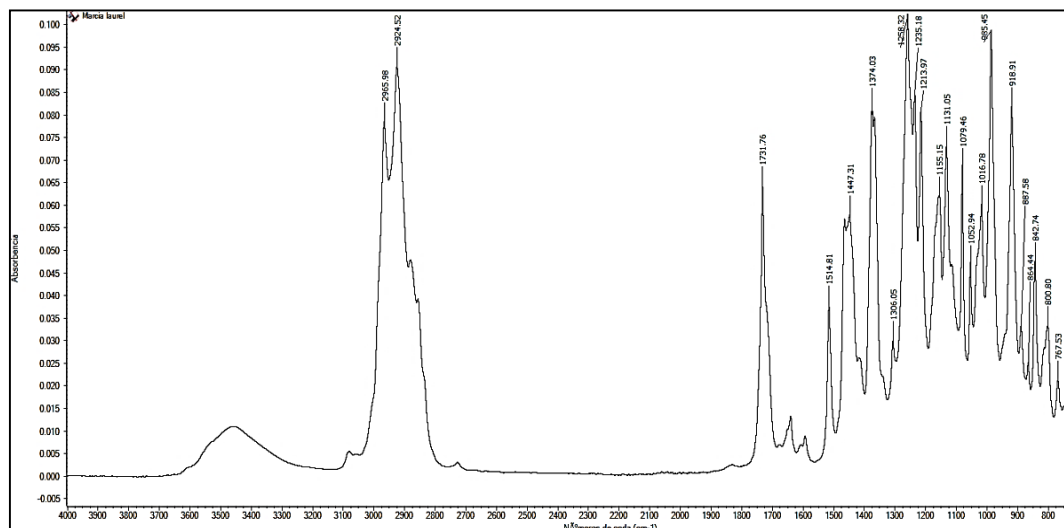


Figura 10. Curva del espectro infrarrojo (FT-IR) del aceite esencial de laurel.

La curva muestra la lectura de los compuestos volátiles presentes en el aceite esencial de *Laurus nobilis* mediante el Estrometro Infrarrojo (FTIR).

En la tabla 13 se observa los componentes químicos encontrados en el aceite esencial de laurel mediante espectrometría infrarroja (FT-IR).

Tabla 13*Componentes químicos del aceite esencial de laurel*

Compuesto	
1.	Trans-Nerolidol
2.	Coniferol
3.	DI-limoneno
4.	cannabidiol
5.	(S)- (-)-Limoneno
6.	Rotenona
7.	Pinanediol
8.	Plumbagin
9.	(1R)- (-)-mirtenol
10.	Naftalato de Sodio
11.	Cannabigerol
12.	2-metilhexanona
13.	4- nitrchalcona
14.	Xilenos, isómeros más etilbenceno
15.	Éter Etilico De Benzoína
16.	Trans,Trans-dibencilidenacetona
17.	2-acetilfenotiazina
18.	Beta- naftoflavona
19.	3-hidroxiflavona
20.	Levorfanol

Mediante el espectrómetro infrarrojo se determinó 20 componentes orgánicos del aceite esencial de laurel. Teniendo como componentes principales: Nerolidol, Conífero, Plumbagin, DI-limoneno y Rotenona. Estos están muy influenciados por muchos factores, incluido el genotipo de las especies de plantas, estacionalidad, condiciones geográficas y climáticas (Mello *et al.*, 2014).

Los aceites esenciales se pueden caracterizar por dos o tres compuestos principales, que se encuentran en mayores concentraciones (20-70%) que otros compuestos presentes. Se sabe que los aceites esenciales tienen diferentes efectos biológicos y que las actividades antifúngicas se producen principalmente debido a la presencia de monoterpenos y sesquiterpenos (Rangel *et al.*, 2017). Así tenemos que los componentes que presentan características antifúngicas:

Nerolidol (C₁₅H₂₆O): También conocido como Peruvicol, es un alcohol sesquiterpénico con múltiples facetas farmacológicas y actividades biológicas, su aroma es leñoso, se usa agente aromatizante y en perfumería. (Keong, 2016). Se tiene que es uno de los componentes principales de la Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) y se ha demostrado que este compuestos es activos contra un amplio espectro de bacterias grampositivas y gramnegativas, también se ha probado su efectividad junto al Eugenol (este caso esta como Alcohol Coniferilrco el cual es un intermedio en la biosíntesis de Eugenol (Steep, 2018))

en cinco hongos, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Pityrosporum ovale*, *Penicillium chrysogenum* y *Trichophyton mentagrophytes* demostrando ser un potente antifúngico (Kubo et al., 1993). Y el Plumbagin componente principal de las raíces de *P. scandens* el cual tiene actividad *antibacteriana in vitro*, que inhibe el crecimiento de *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus* (Ribeiro de Paiva et al., 2003).

Además de tener la Rotenona, la cual es un componente principal del género *Derris*, *Lonchocarpus* y *Tephrosae*. Es un insecticida que actúa por la vía estomacal inhibiendo la respiración celular, siendo muy eficaz contra ácaros e insectos (Ross y Smith, 2008) y D-limoneno un potenciador inmune, antidepresivo, antimutagénico, también es utilizado como insecticida para repeler o matar hormigas, pulgones, cochinillas, moscas, ácaros, cucarachas, avispas, rosales, plantas ornamentales ya que no es tóxico para los seres humanos y animales domésticos (Steep, 2018). No hay estudios que reporten la citotoxicidad del aceite esencial de *L. nobilis* en humanos. Sin embargo, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) aprobó su consumo y uso para humanos, incluyendo al aceite esencial de *L. nobilis* (de hojas de laurel) en la lista de sustancias generalmente consideradas seguras (GRAS), lo que significa que es seguro para el consumo debido a una toxicidad insignificante. Sin embargo, no se ha proporcionado más información sobre las concentraciones tóxicas (Rangel et al., 2017).

4.1.4 Aislamiento y descripción de hongos

4.1.3.1 Aislamiento y obtención del cultivo puro

El aislamiento de hongos a partir del tallarín de casa se logró de acuerdo al diagrama de aislamiento de hongos y obtención del cultivo puro (figura 11).

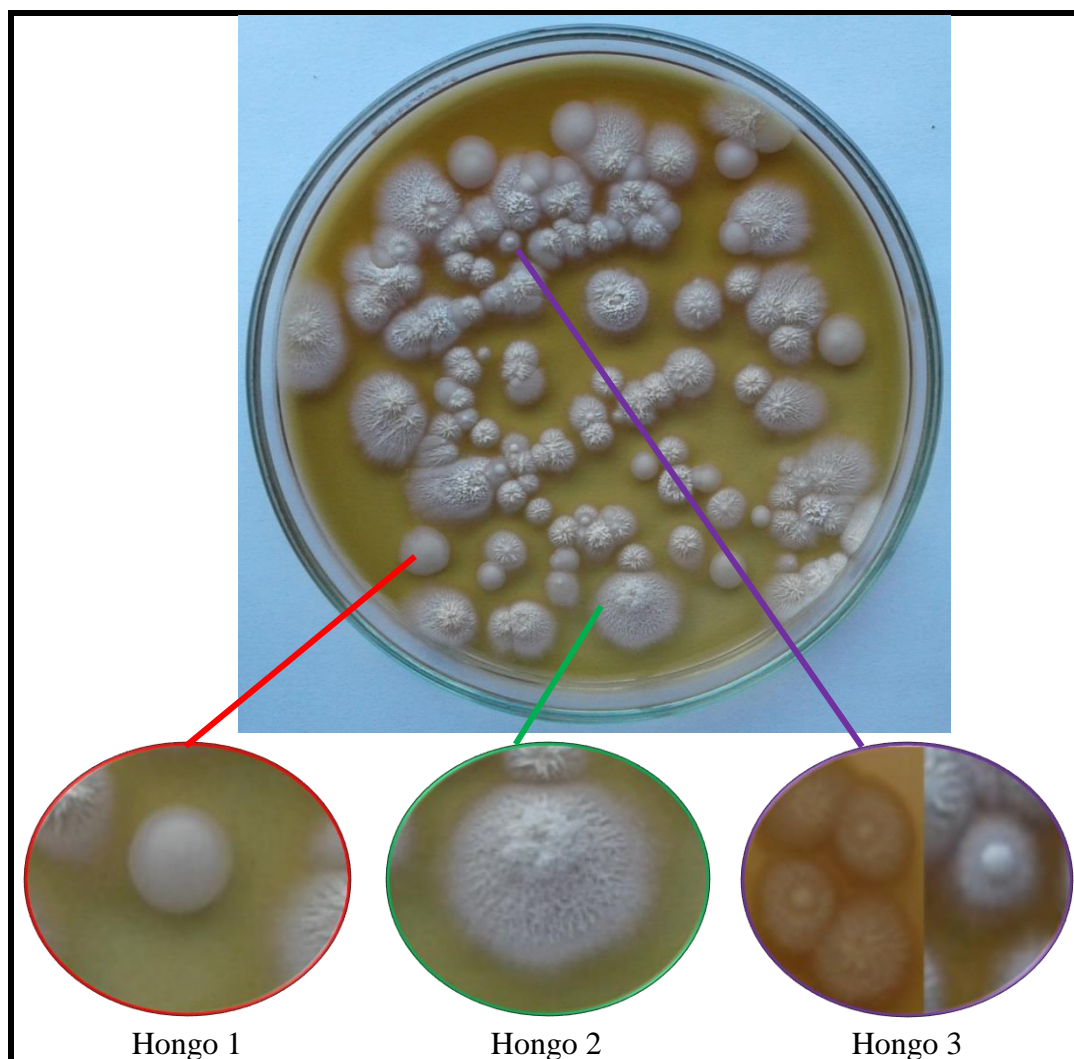


Figura 11. Selección de hongos (2018).

Una vez sembrado la dilución 10^{-6} en las placas Petri, a las 72 horas de incubación se observó que el crecimiento de los hongos era óptimo para diferenciar las colonias de entre sí, se extrajeron tres hongos de dicha placa los cuales fueron purificados para la evaluación antifúngica.

4.1.3.2 Descripción macroscópica de colonias de los hongos

Purificados los hongos, se realizó la identificación morfológica de los hongos mediante la cámara húmeda, la cual se incubó 72 horas a 37°C para tener un buen desarrollo de los hongos, las características morfológicas de los hongos se muestran en el siguiente cuadro.

Tabla 14*Características morfológicas de los hongos aislados del tallarín de casa*

Hongos	Forma	Elevación	Margen	Color	Aspecto
Hongo 1	Circular	Convexa	Entero	Blanco	Cremoso
Hongo 2	Circular	Pulvinado	Ondulado	Blanco	Algodonoso
Hongo 3	Circular	Umbonado	Ondulado	Blanco	Algodonoso y cremoso

Se observó que las tres colonias de hongos que fueron aislados del tallarín de casa presentan una forma circular y un color blanco. El hongo 1 presenta una elevación convexa con un margen entero y un aspecto cremoso, la cámara húmeda nos muestra que se trata de una levadura (anexo 2). El hongo 2 tiene una elevación pulvinada, margen ondulado y un aspecto algodonoso, mientras que el hongo 3 tienen una elevación umbonado con un margen ondulado y un aspecto algodonoso en el borde y cremoso en el medio.

4.1.3.3 Descripción microscópica de colonias de los hongos

Para la descripción microscópica se realizó la cámara húmeda para cada hongo.

- **Descripción microscópica del hongo 1**

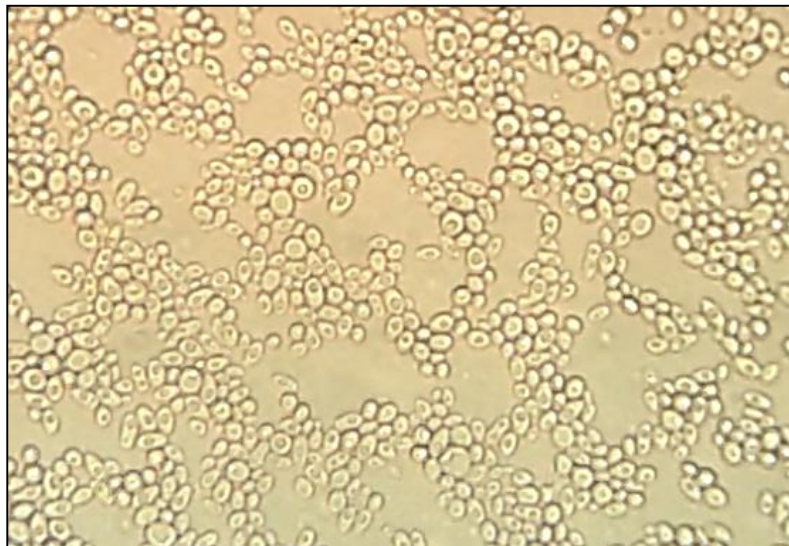


Figura 12. Fotografía microscópica de la cámara húmeda del hongo 1.

En la figura 12 se observan células ovoides y esféricas, de las cuales algunas se encuentran en gemación (Anexo 2). Por lo que podemos afirmar que se tratan de levaduras del género *Saccharomyces sp*, las cuales son las más comunes en los alimentos como panes, frutas suelo, etc., (Dendy y Dobraszcyk, 2004) quien menciona que las levaduras son seres unicelulares y con formas variables (esféricas, ovaladas y cilíndricas) con una reproducción por gemación cuando a la levadura le sale una protuberancia con formación de un nuevo núcleo y

compartiendo el citoplasma durante un periodo de tiempo. Después se forma una doble pared de separación (Vadillo, S. y Mateos, E., 2002).

▪ **Descripción microscópica del hongo 2**

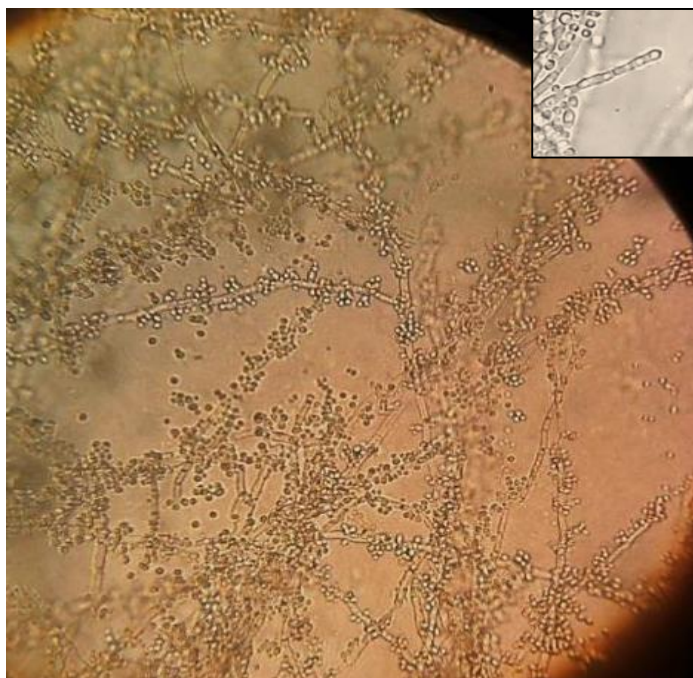


Figura 12. Fotografía microscópica de la cámara húmeda del hongo 2.

En la izquierda de la figura 13 se observa que el hongo 2 el cual posee un micelio septado, hialino, con macroconidio y microconidios en los conidióforos (conidiósporas sobre las hifas) formándose en los extremos de las hifas madres (Anexo 2). Estas características se asemejan a la descripción de Barnett y Hunter, (1998) quienes menciona que *Trichophyton sp.* Microscópicamente presenta microconidia hialina, pequeña, en los lados de las hifas por lo común son esféricos, piriformes (en forma de lagrima) o en forma de clava; macroconidios hialinas, claviformes con ápice redondeado que nacen de manera individual en los extremos de las hifas o en conidioforos cortos; Causando dermatomicosis en el hombre. Concordando con Forbes, *et al.*, (2009). Quien, además, realizo la descripción sobre las especies más comunes de *Trichophyton* caracterizándolo como un hongo de crecimiento lento que produce colonias aplanadas o sobre elevadas, por lo general color blanco a rojizo, con una superficie algodonosa o aterciopelada. El color rojo cereza característico se observa mejor en el reverso de la colonia: sin embargo, este se produce recién después de 3 a 4 semanas de incubación. Es posible que algunas cepas carezcan de la pigmentación rojo oscura en el aislamiento primario. Las colonias pueden ser de dos tipos, algodonosas o granulares. Los microconidios presentan forma de lagrima nacen con más

frecuencia a los lados de las hifas; por lo general no hay macroconidias pero cuando están presentes son lisos, de paredes delgadas y con forma de lápiz (Forbes, *et al.*, 2009). Esta descripción del *Trichophyton sp.* Concuerta con las características del hongo 2, por lo que podemos suponer que el hongo 2 es del género de *Trichophyton sp.*

▪ **Descripción microscópica del hongo 3**

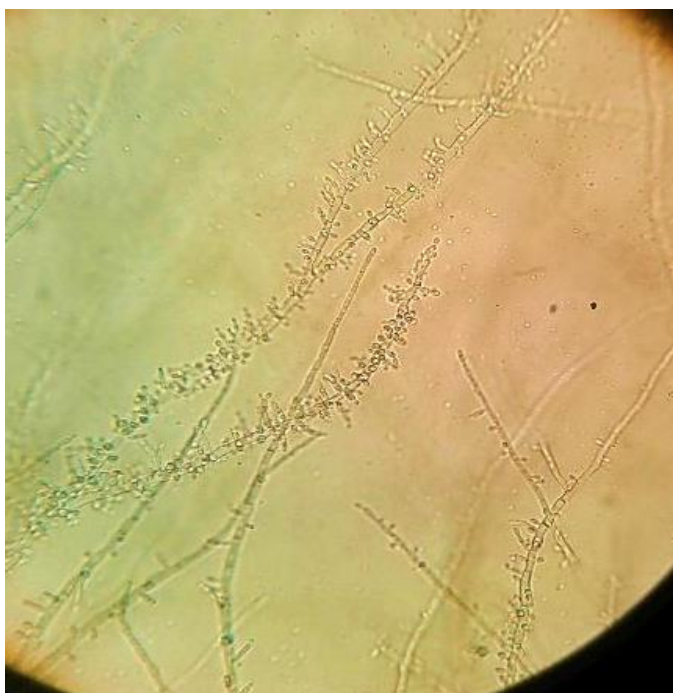


Figura 13. Fotografía microscópica de la cámara húmeda del hongo 3.

En la izquierda de la figura 14 se observa que del hongo 3, el pseudomicelio es muy ramificado, hialino, blastosporos cilíndricos cortos con microconidios sobre las hifas madres (Anexo 2). Vadillo, S. y Mateos, E., (2002) menciona que *Candida sp.* Forma colonias de color crema, normalmente lisas, en algunas cepas se forma micelio en el borde de la colonia. Forbes, *et al.*, (2009) cita a este género de levadura como una de las más comunes en alimentos y bebidas. Por lo que nuestro hongo 3 es del género *Candida sp.*

Estos tres hongos aislados del tallarín de casa, tienen la como hábitat aquellos ambientes que les permitan cumplir con su ciclo de vida. En este caso los hongos pudieron llegar a habitar en los tallarines de casa, debido al mal uso de las buenas prácticas de manufactura (BPM) durante el proceso de manipulación, elaboración, envasado, almacenamiento, transporte o distribución. De la evaluación de la cámara húmeda tenemos que uno de estos hongos es levaduras el cual se encuentra con frecuencia en las hojas y las flores, aunque en número muy pequeño, siendo los

insectos un importante vector de diseminación de las mismas. Están sobre la epidermis de frutas y pueden penetrar a los tejidos subyacentes como resultado de un daño mecánico (Carrillo y Audisio, 2007). Asimismo, se obtuvo que el hongo 2 y 3, también el suelo es un importante reservorio para estas tres especies de hongos, desde el cual pudieron llegar a los tallarines de casa, pero también suelen hallarse en el agua (lagos y ríos). Su presencia depende de la temperatura, el pH, la humedad y la disponibilidad de azúcares simples. La “Norma Sanitaria que establece los Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano” menciona que los mohos con un plan de muestreo de 3 clases con un nivel de microorganismos (m) es de 10^2 siendo aceptable y obtenible con buenas prácticas de manufactura puede tener un valor cero, mientras el nivel de contaminación riesgoso (M) es 10^3 lo que indica que existe malas prácticas higiénicas (R.M. N° 591-2008-MINSA, 2008).

4.1.3.4 Actividad antifúngica del aceite esencial de *Laurus nobilis*

La prueba se realizó por duplicado, con un blanco como testigo. La actividad antifúngica del aceite esencial de *Laurus nobilis* se determinó para el caso de las tres cepas de hongos aislados del tallarín de casa. Para lo cual se tiene a continuación la tabla 15 donde se puede observar los promedios de los diámetros de inhibición.

Tabla 15*Promedio de los diámetros de inhibición obtenidos de cada tratamiento*

Hongos	Factores		Promedio de los diámetros (mm)
	Concentración	Tiempo	
Hongo 1	C1	48 h	11.9
		72 h	10
		96 h	8.5
	C2	48 h	18.2
		72 h	14.3
		96 h	11.2
	C3	48 h	21.4
		72 h	15.8
		96 h	13.3
Hongo 2	C1	48 h	26.6
		72 h	12.7
		96 h	10.1
	C2	48 h	29.7
		72 h	14
		96 h	10.3
	C3	48 h	38.4
		72 h	16.7
		96 h	13.4
Hongo 3	C1	48 h	13.3
		72 h	10.8
		96 h	8.9
	C2	48 h	16.5
		72 h	14.4
		96 h	12.4
	C3	48 h	51.8
		72 h	23.3
		96 h	16.3

Nota: Concentraciones de C1=0.03 μ l/ μ l; C2=0.06 μ l / μ l y C3=0.1 μ l/ μ l.

De la tabla 15 se tiene que el diámetro promedio de inhibición más alto es de 51.8 mm, presentado por el hongo 3 a una concentración de 0.1 μ l/ μ l (C3) a un tiempo de 48 horas, mientras que el hongo 1 presento un diámetro promedio de inhibición es de 8.5 mm, esto nos indica que el hongo 3 es susceptible a la efectividad antifúngica del aceite esencial de laurel, mientras el hongo 1 es resistente.

Los datos obtenidos se procesaron con el paquete estadístico StatGraphics, donde se evalúa un análisis de varianza (ANVA), con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$;

y para escoger el mejor tratamiento con el aceite esencial de laurel y obtener el Rankin en efectividad de inhibición de los hongos predominantes en el tallarín de casa se realizó la prueba Tukey (figura 15)

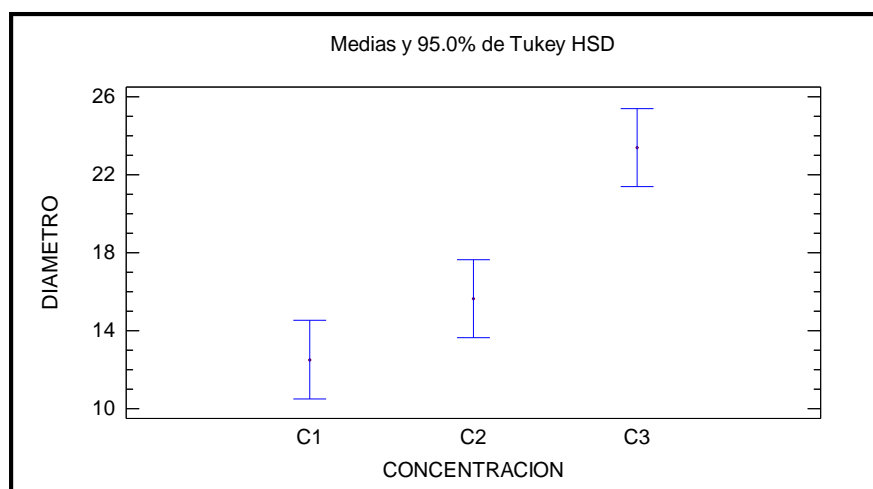


Figura 14. Intervalos de diámetro vs. Concentración. Intervalos de confianza simultaneo de 95% de tukey.

En la figura 15. Se tienen los intervalos de los diámetros de inhibición con los límites máximos y mínimos según la concentración a las que fueron evaluados. Podemos observar que a la concentración 1 la media es la más baja mientras a la concentración 3 la media es la más alta, además se puede observar que no existe una diferencia significativa entre las concentraciones 1 y 2 pero si existiendo una diferencia significativa de la concentración 3 con respecto a las concentraciones 1 y 2.

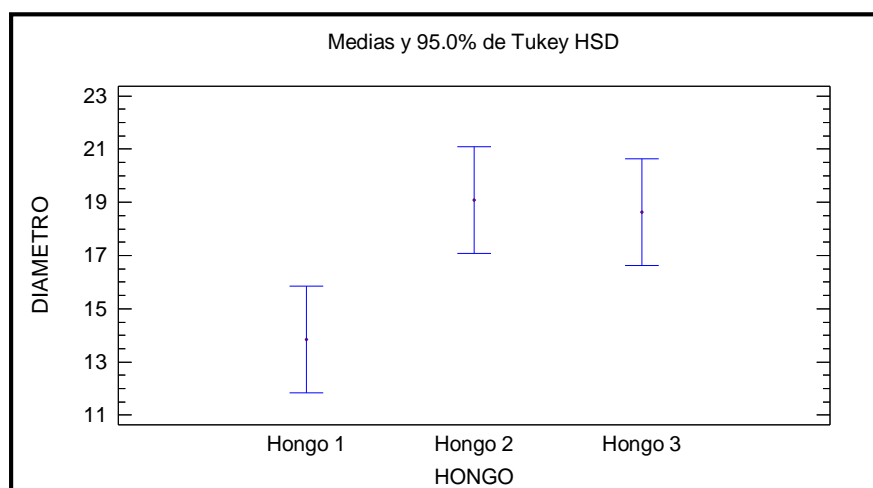


Figura 15. Intervalos de diámetro vs hongo. Intervalos de confianza simultaneo de 95% de tukey

En la figura 16. Se tienen los intervalos de los diámetros de inhibición con los límites máximos y mínimos según la cepa de hongo a las que fueron evaluados.

Podemos observar que la media del hongo 1 es la más baja mientras las medias de los hongos 2 y 3 son las más alta (no hay diferencia significativa entre el hongo 2 y 3), corroborando que existe una diferencia significativa del hongo 1 para los hongos 2 y 3.

De la tabla 23 el análisis estadístico se muestra en el anexo 4, del ANVA se tiene que el valor - P del modelo es menor al de 0.05 para los efectos principales de los factores: concentración, tiempo y hongos son altamente significativos en su interacción sobre los diámetros con un 95.0% de nivel de confianza. Para determinar cuál tratamiento es mejor, se realizó la prueba Tukey, la cual nos muestra que el mejor tiempo es 48 horas, la mejor concentración es la concentración tres (C3 = 0.1 μ l/ μ l) (figura 22), además se tiene que el hongo 2 y 3 tienen las medias de los diámetros similares siendo más altos que el hongo 1 (figura 23).

Además, se realizó el ANVA simple al tiempo de 48 horas para la concentración (figura 24) y el tipo de hongo. De donde se tiene que la concentración sí influye en el diámetro y corrobora que la mejor concentración es la C3 (0.1 μ l/ μ l). Mientras en el ANVA simple para: diámetro por hongo, se tiene que el diámetro varía según el tipo de hongo (figura 25).

En el presente estudio, se encontró que la concentración 3 (0.1 μ l/ μ l) es la que obtuvo mayor promedio de diámetros de inhibición. Los productos naturales se consideran inhibidores potentes de actividad microbiana cuando sus valores CMI son iguales o menores que 500 mg / ml (Duarte *et al.*, 2007). Por lo tanto, los resultados en el presente estudio revelaron que el aceite esencial de *Laurus nobilis* tiene fuertes efectos antifúngicos. Se ha demostrado que el aceite esencial puede interferir en biosíntesis de la pared celular y/o puede aumentar la permeabilidad iónica de la membrana de la célula fúngica (Rangel *et al.*, 2017). Nuestros resultados indican que la actividad antifúngica del aceite esencial parece estar relacionada con la biosíntesis de la pared celular y la permeabilidad iónica de la membrana celular. Estos resultados pueden explicarse por el hecho de que la actividad biológica de un aceite esencial puede ser establecida por la suma de sus componentes. Por lo tanto, la compleja mezcla de los componentes del aceite esencial, puede mejorar su efecto activo, lo que daría como resultado la actividad antimicrobiana (Galindo *et al.*, 2010).

4.2 Contrastación de hipótesis

No se aplica para esta investigación.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- De la caracterización físico química del aceite esencial de laurel (*Laurus nobilis*), se ha encontrado que presenta un rendimiento de extracción de 0.45% (p/p), una densidad de 0.8947 g/ml y un índice de refracción de 1.472, de acuerdo al análisis de Espectroscopia Infra Roja FT-IR, se ha evidenciado la presencia de nerolidol, conífero y plumbagin entre los compuestos más destacados.
- Se logró aislar tres cepas de microorganismos contaminantes predominantes en el tallarín de casa, y de acuerdo a la identificación morfológica se trata de una levadura y dos tipos distintos de hongos filamentosos, los cuales pudieron llegar a contaminar el tallarín de casa estando presentes en los utensilios, equipos, envases o incluso en la misma materia prima.
- El volumen de 15 μ l, que equivale a la concentración de 0.1 μ l de aceite esencial / μ l de solución probada, es la más efectiva para inhibir los hongos contaminantes predominantes en el tallarín de casa, según las pruebas estadísticas a un nivel de significancia de 0.05.

5.2 Recomendaciones

- Analizar los componentes químicos del aceite esencial de laurel, mediante cromatografía para la determinación de los porcentajes cuantitativos de los componentes químicos del aceite esencial de laurel, para así determinar que componente es el responsable de la actividad antifúngica del aceite esencial de laurel sobre los hongos de tallarín de casa y realizar estudios que optimicen el proceso de extracción del aceite esencial de laurel, haciendo el correspondiente escalamiento para su obtención a nivel de plantas piloto.
- Identificar especies exactas de los microorganismos predominantes contaminantes del tallarín de casa, usando técnicas de identificación por DNA, para lograr así árboles filogenéticos de estos microorganismos
- Aplicar la concentración encontrada del uso del aceite esencial de laurel, para la producción comercial de tallarín de casa y alargar su vida útil de esta manera.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Albarracín M. G. C. y Gallo P. S. G., (2003). *Comparación de dos métodos de extracción de aceite esencial utilizando piper aduncum Cordoncillo procedente de la zona cafetera*. (tesis para optar el grado de Ingeniero Químico). Universidad Nacional de Colombia. Colombia.
2. Almela Camañas, C. (2012). Incorporación de aceites esenciales en la conservación del caqui “Rojo Brillante” y melón “Piel de Sapo” mínimamente procesados. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
3. Alonso, J., R. (2004). *Tratado de Fitofármacos y Nutraceuticos*. Rosario, Argentina. Ed. Corpus.
4. Alzate O., D., A., Mier, M., G., I. Afanador K., L., Durango R., D., L., y García P C., M. (2008). Evaluación de la Fitotoxicidad y la Actividad Antifúngica *Contra Colletotrichum Acutatum* de los Aceites Esenciales de Tomillo (*Thymus Vulgaris*), Limoncillo (*Cymbopogon Citratus*), y sus Componentes Mayoritarios. Revista De La Facultad De Química Farmacéutica. 16. 116-125
5. Andreatta, E. A., Longo, B. M., Utrera, C., Saavedra, M. y Foco, G. (2012). *Caracterización de Aceites Esenciales del Departamento San Justo (Córdoba)*. Jornadas de Ciencia y Tecnología. Universidad Tecnológica Nacional de Villa Maria, Córdoba, Argentina.
6. Antolínez D., N., Rodríguez L., Plasticidad fenotípica en *Lippia alba* y *Lippia origanoides* (Verbenaceae): Respuesta a la disponibilidad de nitrógeno. *Acta Biol. Colomb.*, 2008,13 (1), 53-64.
7. Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; y Idaomar, M. (2008). Efectos biológicos de los aceites esenciales: una revisión. *Alimento químico toxicol*, 46: 446-475.
8. Barnett, H. L., y Hunter, B., B., (1998). Géneros ilustrados de hongos imperfectos, Saint Paul - Minnesota, EE. UU. Sociedad Americana de Fitopatología.
9. Blázquez, M.A. (2014). Papel de los aceites esenciales naturales en la agricultura sostenible y la conservación de los alimentos. *Journal of Scientific Research & Reports*, 3(14), 1843-1860.
10. Bonev, B., Hooper, J. y Parisot, J. (2008). Principios de la evaluación de la susceptibilidad bacteriana a los antibióticos utilizando el método de difusión en agar. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(6), 1295-1301.
11. Bravo Haro, Josselyn Paola, (2017). *Características Organolépticas de la Canal de Cuy Sometido a Diferentes Fuentes de Humo Natural (Laurus nobilis, Juglans regia, Prunus serotina)*. (Tesis para optar el grado de Ingeniera en Industrias Pecuarias). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamaba. Colombia.
12. Burt S., 2004. Aceites esenciales. Sus propiedades antibacterianas y aplicaciones potenciales en alimentos una revisión. *International journal of food Microbiology*. 94(3). 223-53.
13. Callejas, A., Sierra, N., Almanza, P., “y” Medina, Ó., (2013). Efecto de la poda sobre la cantidad y el rendimiento del aceite esencial de *Laurus nobilis*. *Ciencia y Agricultura*, 10(2), 59-56.
14. Camacho P, Cáceres A, Rodríguez J. (2011). *Extracción de aceite esencial de eucalipto*. Recuperado de <https://es.scribd.com/doc/48247006/Extraccion-de-aceites-esenciales-informe>.



15. Can, B., K. H. y Buchbauer, G. (2010). *Manual de ESENCIAL ACEITES*. CRC Press Taylor & Francis Group, una empresa de Informa.
16. Carranza Díaz, Zurisadai. (2006). Selección e identificación de especies de hongos ectomicorrizogenos del estado de hidalgo más competentes en medio de cultivo sólido. (tesis para optar el título de ingeniero Agroindustrial). Universidad autónoma del estado de hidalgo. Mexico.
17. Carrillo L. y Audisio C. (2007). *Manual de microbiología de los alimentos*. Jujuy, Argentina. 1ª edición. Asociación Cooperadora de la Facultad de Ciencias Agrarias.
18. Centurion Paredes, Jhonatan Alexis. (2017). *Efecto Antibacteriano In Vitro del Aceite Esencial de Laurus Nobilis "Laurel" Sobre Staphylococcus aureus ATCC 2592*. (Tesis para Optar el Título de Médico Cirujano). Universidad Privada Antenor Orrego Facultad de Medicina Humana Escuela Profesional de Medicina Humana. Trujillo.
19. Chua, M., T., Tung, Y., T., y Chang, S., T. (2008). Las actividades antioxidantes de los extraños etanólicos del twing de cinnamomun asmophloeum. *Bioresourse technology*. 99: 1918-1925.
20. Cruz V., J., L. y Quispe, C., C. (2018). "Efecto antimicótico del extracto etanólico de las hojas secas de *Laurus nobilis* (laurel) en cepas de *Candida albicans*, in vitro". (Tesis para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico y Bioquímico), Universidad Inca Garcilaso de la Vega. Perú.
21. Cruz V., y M., (2013). *Evaluación biológica y fisicoquímica de extractos de hojas del complejo laurel (*Litsea glaucescens* Kunth, *L. guatemalensis* Mez y *L. neesiana* (Schauer) Hemsl.)*. (Tesis para Optar al Grado de Doctor en Ciencias Naturales para el Desarrollo), Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
22. Da Silveira, S.M., Bittencourt, F.L., Fronza, N., Cunha, A., JR., Scheuermann, G.N., y Werneck V. (2014). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Laurus nobilis* contra patógenos transmitidos por los alimentos y su aplicación en salchichas toscanas frescas almacenadas en 7 °C. *LWT- Food Science & Technology*, 59, 86-93.
23. Daferera, D.J., Ziogas, B.N., Polissiou, M.G., 2003. La efectividad de los aceites esenciales de plantas en el crecimiento de *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.* y *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*. *Crop Protection*. 22, 39–44. doi: 10.1016 / S0261-2194 (02) 00095-9
24. De Corato, U., Maccioni, O., Trupo, M. y Di Sanzo, G. (2010). Uso del aceite esencial de *Laurus nobilis* obtenido mediante una técnica de dióxido de carbono supercrítico contra hongos de deterioro postcosecha. *Crop Protection*, 29, 142–147.
25. Dendy A. y Dobraszczyk, B., (2004). *Cereales y productos derivados*. Zaragoza, España: Acribia, S.A.
26. Duarte, M. C., Leme, E. E., Delarmelina, C., Soares, A. A., Figueira, G M., y Sartoratto, A. (2007). Actividad de Aceites Esenciales de Plantas Medicinales Brasileñas en *Escherichia Coli*. *Revista de Etnopharmacología*, 11, 197-201.

27. Durán G., D., C., Monsalve, L., A. Martínez, J., R., Stashenko, E., E., (2007). *Comparación de la composición química de los aceites esenciales de las plantas de lippia alba provenientes de diferentes regiones de Colombia. Universidad industrial de Santander.* 13, 435- 38.
28. Escudero, A, 1999. Las plantas de extractos. Madrid.
29. Forbes, B., A., Sahn D. y Weissfeld, A., (2009). *Bailey y Scott. Diagnostico microbiológico.* Buenos aires, Argentina: Panamericana S.A.
30. Furtado, R., Baptista, J., Lima, E., Paiva, L., Barroso, J.G., Rosa, J.S. y Oliveira, L. (2014). Composición química y actividades biológicas de los aceites esenciales de *Laurus de* diferentes islas macaronésicas. *Biochemical Systematics and Ecology*, 55, 333-341. doi: 10.1016 / j.bse.2014.04.004
31. Galindo, L. A., Pultrini, A. M., y Costa, M. (2010). Los efectos biológicos de *Ocimum gratissimum* L. se deben a la acción sinérgica de los múltiples compuestos presentes en el aceite esencial. *Diario de Medicinas Naturales*, 64, 436–441.
32. Gigante Esteve, Ana. (2014). *Potencial de los aceites de canela (cinnamomum zeylanicum) y laurel (Laurus nobilis) en el control de Fusarium oxysporum.* (trabajo fin de grado en ingeniería agroalimentaria y del medio rural). Universidad politécnica de valencia.
33. Gilchrist S., L.; Fuentes D., G.; Martínez C., C.; López A.; R., M.; Duvellier E., (2005). *Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada.* Mexico. Alma McNab
34. Granados, C., Yañes, X., y Acevedo, D. (2013). Evaluación de la Actividad Antioxidante del Aceite Esencial Foliar de *Myrcianthes leucoxylla* de Norte de Santander (Colombia). *La Serena.* Recuperado de <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642014000300003>
35. Gregori Valdez S. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. Scielo - Rev Cubana Farm. 39(2).1-1.
36. Herrera A. y García R., (2006). Evaluación in vitro del efecto bactericida efecto bactericida de extractos acuosos de laurel, tomillo, clavo y canela sobre cinco bacterias patógenas de origen alimentario. *BISTUA*, 4(2), 13-19.
37. Huamán Moscoso Isabel, (2012). *Tallarín casero abanquino DOÑA MICA.* INDECOPI. Recuperado de <https://www.indecopi.gob.pe/web/dop/tallarín-casero-abanquino-dona-mica>.
38. Keong C. W., (2016). *Nerolidol, compuesto que presenta una actividad antifúngica Actividad antibacteriana o Conservante natural.* DOI: 10.3390/molecules21050529.
39. Kubo, I., H. Muroi y M. Himejima. 1993. Actividad antibacteriana contra *Streptococcus mutans* de los componentes del sabor del té mate. *Revista de química agrícola y alimentaria* 41: 107-111.
40. Lopez, M., A., Palou, E., Parish, M. y Davidson, P. (2005). Métodos de ensayo de actividad y evaluación de resultados. En P.M. Davidson, J., Sofos, y A. Branen, *Antimicrobials in Food* (3a edición, capítulo 21, págs. 659-680). Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group. Estados Unidos.

41. Madigan M. T., Martinko J., y Parker J., (1999). *Biología de los microorganismos*. (10^{ma} ed.) Madrid, España. Prentice Hall.
42. Madrid Vicente A. y Madrid Cenzano J. (2001). *Nuevo manual de industrias alimentarias*. Madrid. España: IRAGRA.
43. Mañé Pedro, Alberto Francisco (1949). *Composición del aceite esencial de Laurus nobilis de la Provincia de Laurus nobilis de la Provincia de Buenos Aires*. (Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Química). Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires. Argentina.
44. Marqués Camarena, Manuel. (2015). *Composición química de los aceites esenciales de Lavanda y Tomillo. Determinación de la actividad antifúngica*. (Trabajo Fin de Grado en Ingeniería Agronómica y del Medio Rural). Universidad pontificia de Valencia. Valencia.
45. Martínez V., M. (2008). *Evaluación de la actividad antimicrobiana de aceite esencial de lima*. (Tesis de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos). Universidad de las Américas Puebla. Departamento de Ingeniería Química y Alimentos. Escuela de Ingeniería y Ciencias. Puebla. México.
46. Mataix Verdu, Jose M. (2013). *Nutrición para educadores*. Madrid, España, Díaz de Santos.
47. Mello da, S., S., Bittencourt L. F., Fronza N., Cunha J. A., Neudi S. G. y Werneck V. C. (2014). *Composición química y actividad antibacteriana de Laurus nobilis aceite esencial para los agentes patógenos transmitidos por los alimentos y su aplicación en fresco Salchicha toscana almacenada a 7°C*. *Ciencia y tecnología de los alimentos*. 30(1). 8.
48. Méndez, J. y Herrera, M., L. (2001). *Métodos de susceptibilidad antifúngica, Revisión metodológica*. *SciELO*.36. 1-2
49. Merino T., J. (2011). *Evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de salvia officinalis variedad alba extraído por el método mixto en staphylococcus aureus, Bacillus cereus, salmonella ssp. y echerichia coli*. (Tesis para optar el grado de ingeniero agroindustrial). Universidad nacional Micaela bastidas de Apurímac. E. A. P. de Ingeniería Agroindustrial. Perú.
50. Nabor Murray W. (2005). *Introducción a la Botánica*. Madrid, España: Pearson-Addison-Wesley.
51. Norman, W., D., (1998). *“Elementos de Tecnología de alimentos”*. (13^{va} ed.). México. editorial Continental S.A.
52. Ochoa Pumaylle Kiev, (2011). *Extracción, caracterización y evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de Senecio graveolens Wedd (Wiskataya)*. (Tesis para optar el grado de Ingeniero Agroindustrial), Abancay, Perú.
53. Ortuño M. F., (2006). *Manual práctico de aceites Esenciales, Aromas y Perfumes*. *Aiyana*. España. 274.
54. Peredo L., H. A., Palou G., E. y Lopez M., A.,(2009). *Aceites esenciales: métodos de extracción*. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*. 3(1), 24-32.
55. Pérez, A. T.F. (2006). *Efectividad de los vapores de aceites de tomillo y orégano como agentes antibacterianos*. (Tesis de Maestría. Universidad de las Américas), Puebla, México.

56. R.M. N 591-2008-Ministerio Nacional de Salud. (2008). *Norma Sanitaria que establece los Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano*. (071). Lima. Peru.
57. Rangel P. L, Rosalen P., Silva F, Almeida F. L., Galbiatti de C, Castellanoa R, y Días de C. (2017). Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of *Laurus nobilis* Linnaeus essential oil against *Candida* spp. *Archives of Oral Biology*. 73, 179–18.
58. Ribeiro de Paiva S, Figueiredo MR, Aragão TV, Kaplan MAC. (2003). Actividad antimicrobiana *in vitro* de plumbagina aislada de especies de plumbago. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 959 -961.
59. Ricci, E. M., Padín, S. B., kahan, A. E. “y” Ré, S. (2002). Efecto repelente de los aceites esenciales de laurel y lemongrass sobre *Brevicoryne brassicae* L. (*Homoptera: Aphididae*) en repollo. *Bol. San. Veg. Plagas*, 28, 207-212.
60. Ross R., D., y Smith V., W., F. (2008). ROTENONA: Una herramienta esencial pero difamada para la evaluación de la diversidad de los peces marinos. *BioScience*. 58(2).
61. Ruiz M. J. y Front G., (2007). Toxicidad y evaluación de riesgo con micotoxinas en alimentos. Madrid, España. ed. Soriano J, M. Ediciones Díaz de Santos.
62. Sáez, A. (2000). Revista universidad EAFIT. “obtención del aceite esencial de orégano”, Medellín – Colombia. Vol 06.
63. Stashenko E. E., (2009). Aceites Esenciales. (1^{ra} ed.). Santander. CENIVAM Diseño e Impresión. pg. 13.
64. Steep, H. (2018). Una introducción a los terpenos. *Ciencia y Cultivo*. <http://steephill.com/pdf/Leading-the-Science-Cannabis.pdf>
65. Vadillo, S. y Mateos, E., (2002). *Manual de Microbiología Veterinaria*. Cáceres. España.
66. Vargas, A. y Bottia E. (2008). Estudios de la composición química de los aceites esenciales de seis especies vegetales cultivadas en los municipios de Bolívar y el peñón - Santander, Colombia.

ANEXOS

ANEXO 1. Norma técnica peruana (ITINTEC 319,081). Aceites esenciales. Determinación de la densidad y de la densidad relativa. Diciembre, 1974

Normas a consultar.

ITINTEC 319.077 aceites esenciales. Preparación de la muestra para análisis

ITINTEC 319,079 aceites esenciales. Extracción de muestras

1. Objeto

1.1. La presente norma establece el método para determinar la densidad y la densidad relativa de los aceites esenciales, líquido a la temperatura de 20°C.

2. Definiciones y clasificación

2.1. Densidad a 20°C de un aceite esencial. Es la relación entre el peso (masa) de un volumen dado de aceite esencial y su volumen, determinados a 20°C.

2.1.1. Esta cantidad se expresa en gramos por mililitro y su símbolo es ρ_{20}

2.2. Densidad relativa a 20°C o a 4°C de un aceite esencial. Es la relación entre la densidad del aceite a 20°C y la del agua destilada a 20°C o a 4°C.

2.2.1. Esta cantidad no tiene dimensión y su símbolo es d_{20}^{20} o d_4^{20}

2.2.2. Todas las pesadas se hacen en el aire.

3. Métodos de ensayo

3.1. Principio del método

3.1.1. Esta norma requiere de valores con una precisión de tres cifras decimales: se usa un picnómetro para pesar volúmenes iguales del líquido en ensayo, con el objeto de obviar el uso de grandes cantidades de este.

3.2. Aparatos

3.2.1. Balanza analítica, con una precisión de 0.5 mg.

3.2.2. Baño de agua, mantenido a 20°C ± 0,2°C.

3.2.3. Embudos y sifones para picnómetros.

3.2.4. Picnómetros de 50 ml, 25 ml o 10 ml de capacidad, de acuerdo al volumen de aceite esencial disponible.

3.2.5. Termómetro normalizado, dividido en quintos o decimos de grados Celsius para determinación de temperatura entre 10 y 30°C.

3.3. Procedimiento

3.3.1. La preparación de la muestra para el análisis se efectúa según la norma ITINTEC 319.077.

3.3.2. Se lava cuidadosamente el picnómetro, se escurre, se enjuaga con etanol y éter dietílico y se seca el interior por medio de una corriente de aire seco.

3.3.2.1. Se seca la parte externa del picnómetro con una tela seca o un papel filtro y se inserta el tapón.

3.3.2.2. Se coloca el picnómetro en la balanza y se le deja durante 30 segundos, luego.

3.3.3. Se llena el picnómetro con agua destilada a 20°C y recientemente hervida, teniendo cuidado de evitar la presencia de burbujas de aire.

3.3.3.1. Se coloca el picnómetro en un baño de agua a $20^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos. Se comprueba la temperatura del baño de agua por medio del termómetro normalizado y se enrasa con agua destilada hasta la marca.

3.3.3.2. Se inserta el tampón al picnómetro y se seca la parte exterior con una tela seca o un papel de filtro.

3.3.3.3. Se coloca el picnómetro en la balanza, y se deja durante 30 minutos, luego se pesa con el contenido (P_1).

3.3.4. Se vacía el picnómetro, se lava con etanol y después con éter dietético y se seca por medio de una corriente de aire seco.

3.3.5. Se llena el picnómetro con el aceite esencial, que debe estar a aproximadamente 2°C, evitando la presencia de las burbujas de aire.

3.3.5.1. Se vuelve a colocar el picnómetro en el baño de agua a $20^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ y se le deja durante 30 minutos. Se enrasa con aceite esencial hasta la marca y se procede como en 3.3.3.2. y 3.3.3.3. obteniéndose un peso (P_2).

3.4. Expresión de resultados.

3.4.1. Sea:

Y el peso, en gramos, del picnómetro vacío.

P₁ el peso, en gramos, del picnómetro lleno con agua destilada a 20°C.

P₂ el peso, en gramos, del picnómetro lleno con aceite esencial a 20°C.

3.4.2. La densidad relativa ρ₂₀, en gramos por mililitro, se da por la siguiente formula.

$$\rho_{20} = 0,99718 \frac{P_2 - P}{P_1 - P}$$

La densidad relativa d_{20}^{20} se dad por la formula siguiente:

$$\frac{P_2 - P}{P_1 - P}$$

La densidad relativa d_4^{20} se dad por la formula siguiente:

$$D_4^{20} = 0,99718x D_{20}^{20}$$

ANEXO 2. Fotografía microscópica de los hongos

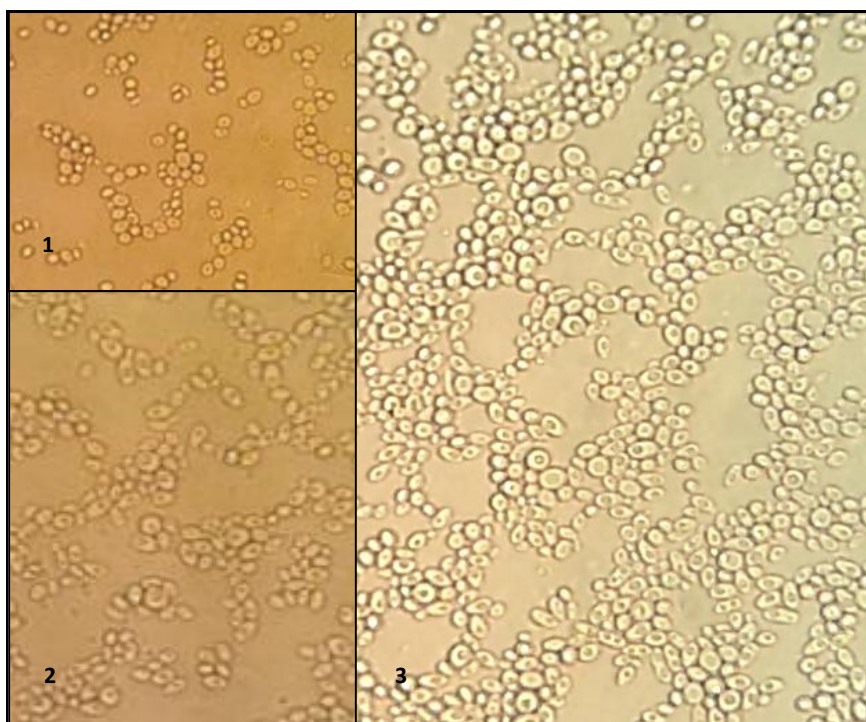


Figura 16. Hongo 1 cultivado en cámara húmeda por 72 horas: en su forma circular (1), ovaladas algunas en gemación (2) y ovaladas, circulares y cilíndricas en gemación (3).

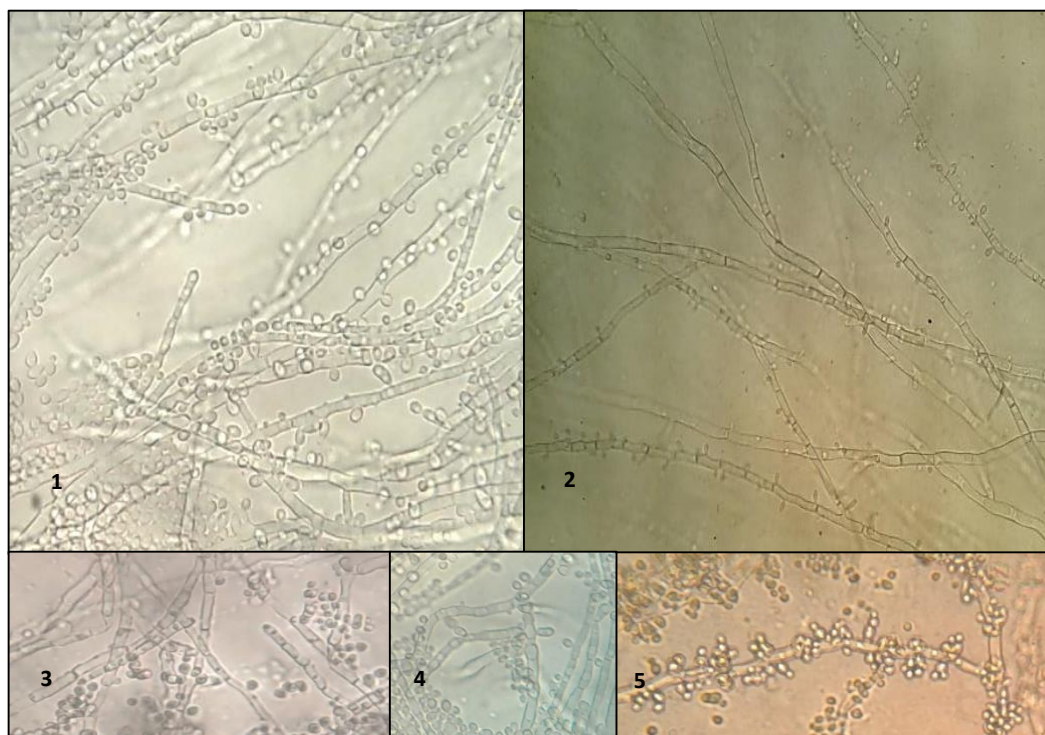


Figura 17. Hongo 2 cultivado en cámara húmeda por 72 horas: micelios hialinos con microconidios sobre las hifas y macroconidios (1, 3, 4, 5) e hifas septadas (2).

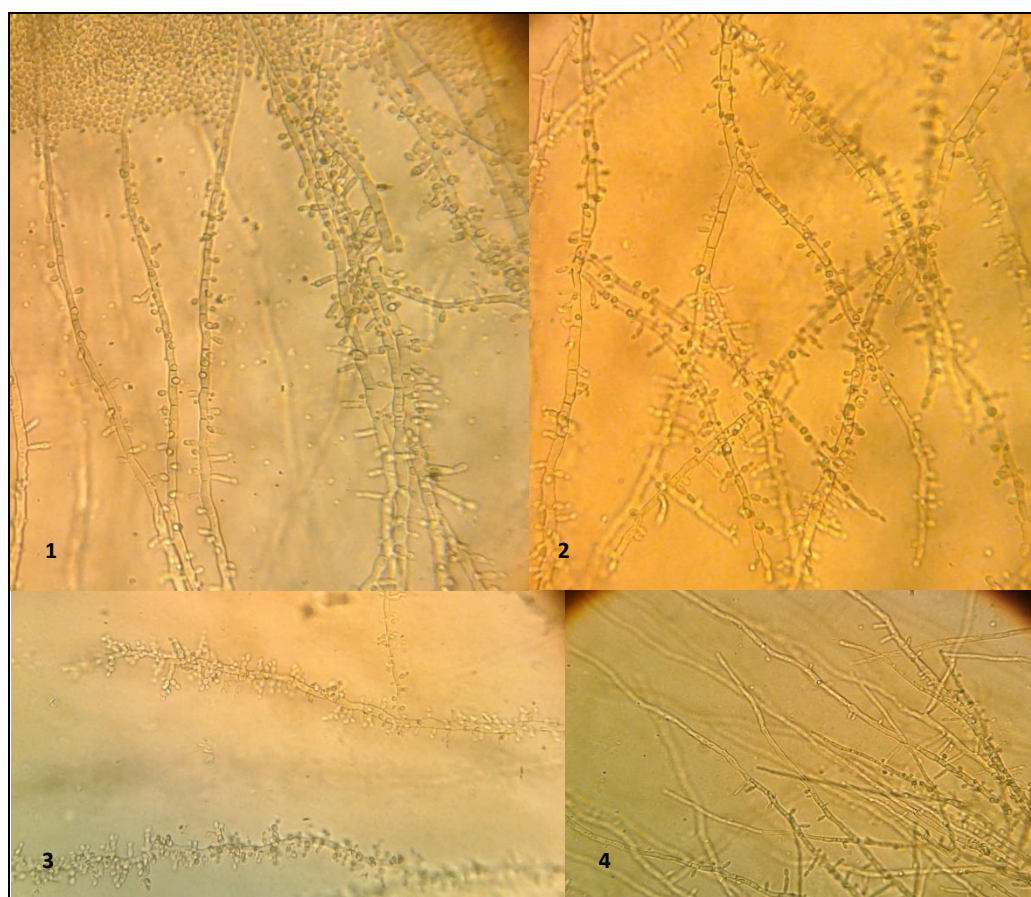


Figura 19. Hongo 3 cultivado en cámara húmeda por 72 horas: pseudomicelio muy ramificado, hialino, blastosporos cilíndricos cortos con microconidios (1, 2, 3) y filamentos (4).

ANEXO 3. Imágenes de los diámetros de inhibición a 48, 72 y 96 horas

A. Imágenes de los diámetros de inhibición a las 48 horas

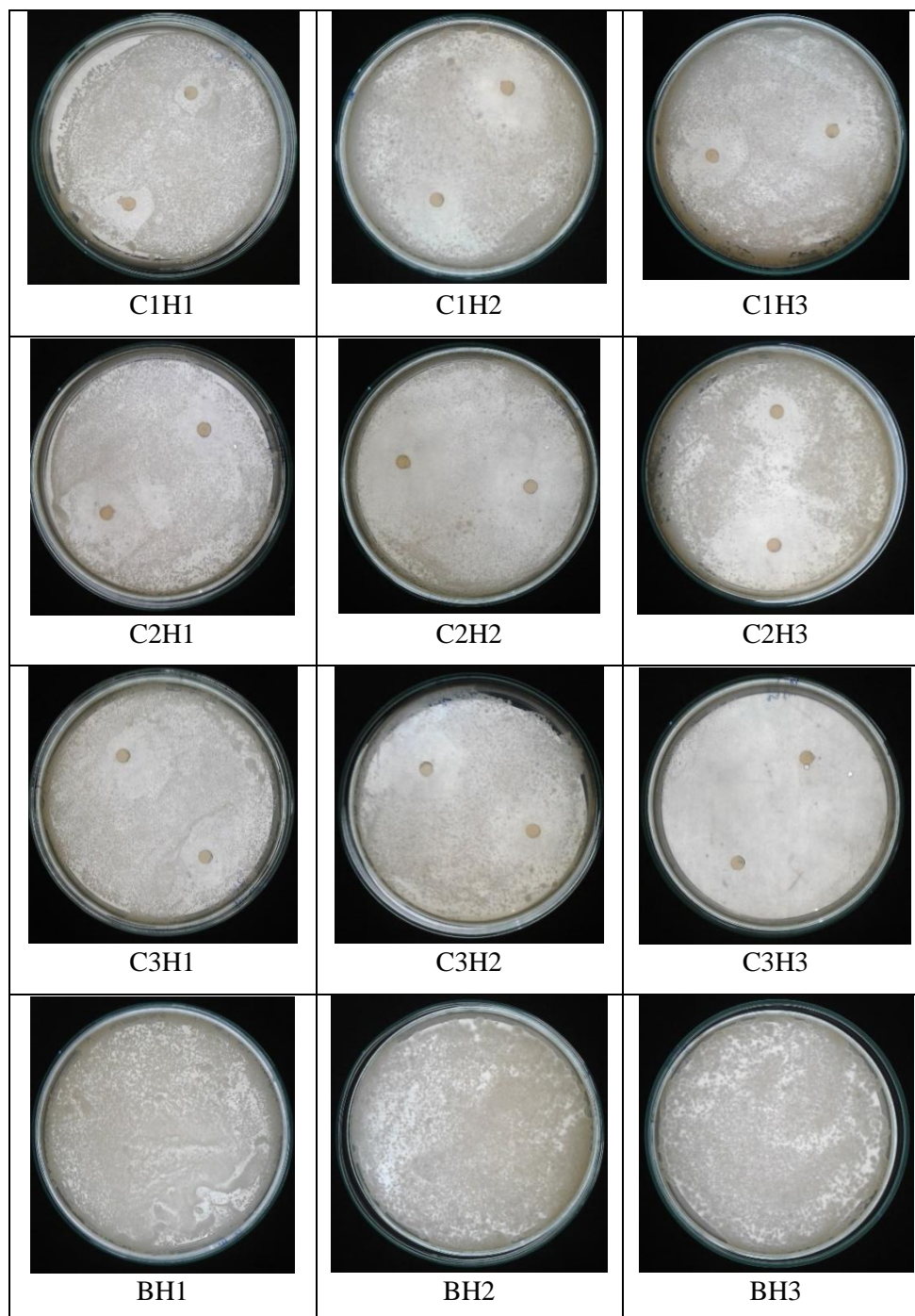


Figura 20. Diámetros de inhibición a las 48 horas. Dónde: C1= concentración 1, C2=concentración 2; C3= concentración 3.H1= hongo 1, H2= hongo 2, H3= hongo 3. B= blanco

B. Imágenes de los diámetros de inhibición a las 72 horas

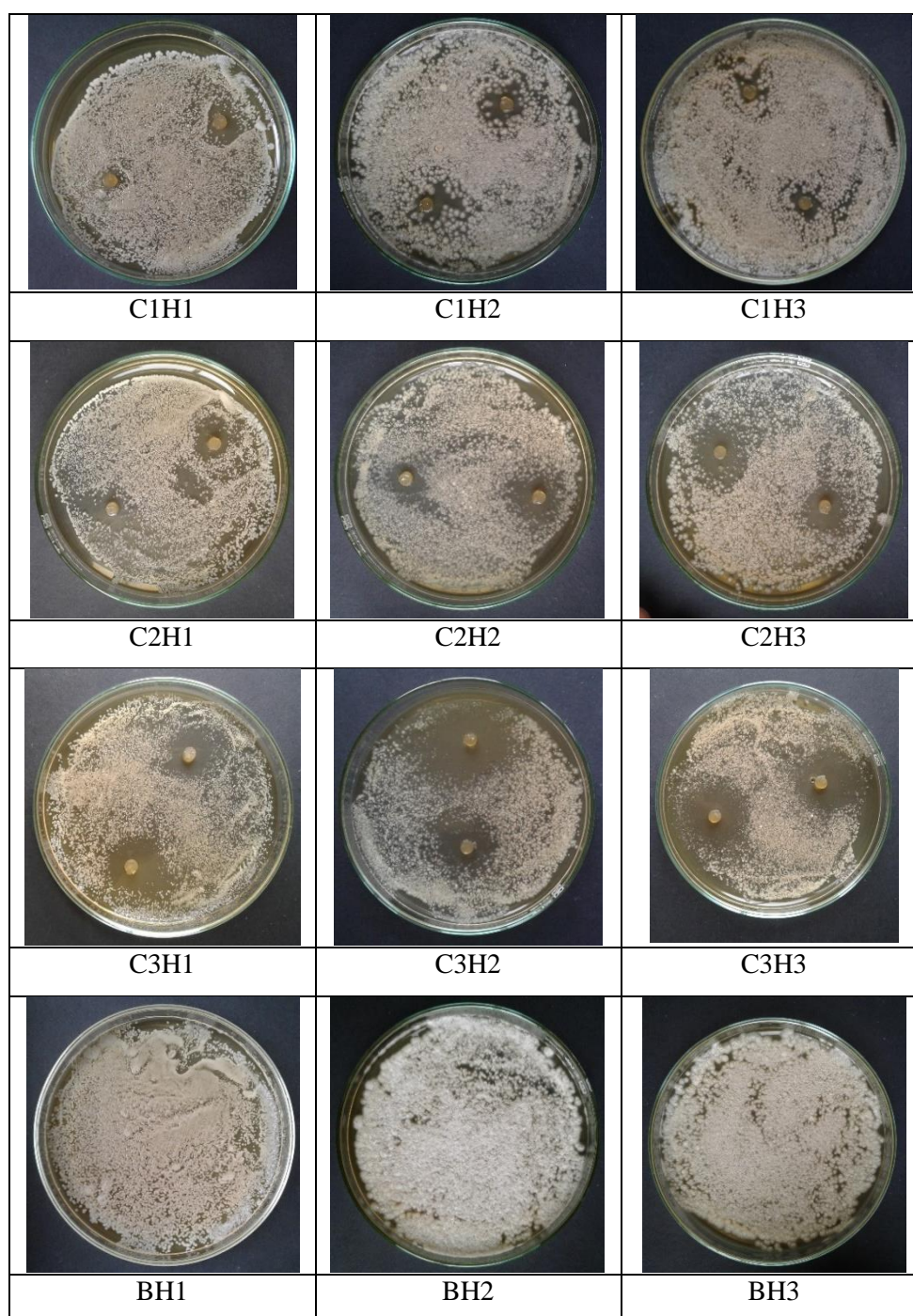


Figura 8. Diámetros de inhibición a las 72 horas. Dónde: C1= concentración 1, C2=concentración 2; C3= concentración 3. H1= hongo 1, H2= hongo 2, H3= hongo 3. B= blanco

C. Imágenes de los diámetros de inhibición a las 96 horas

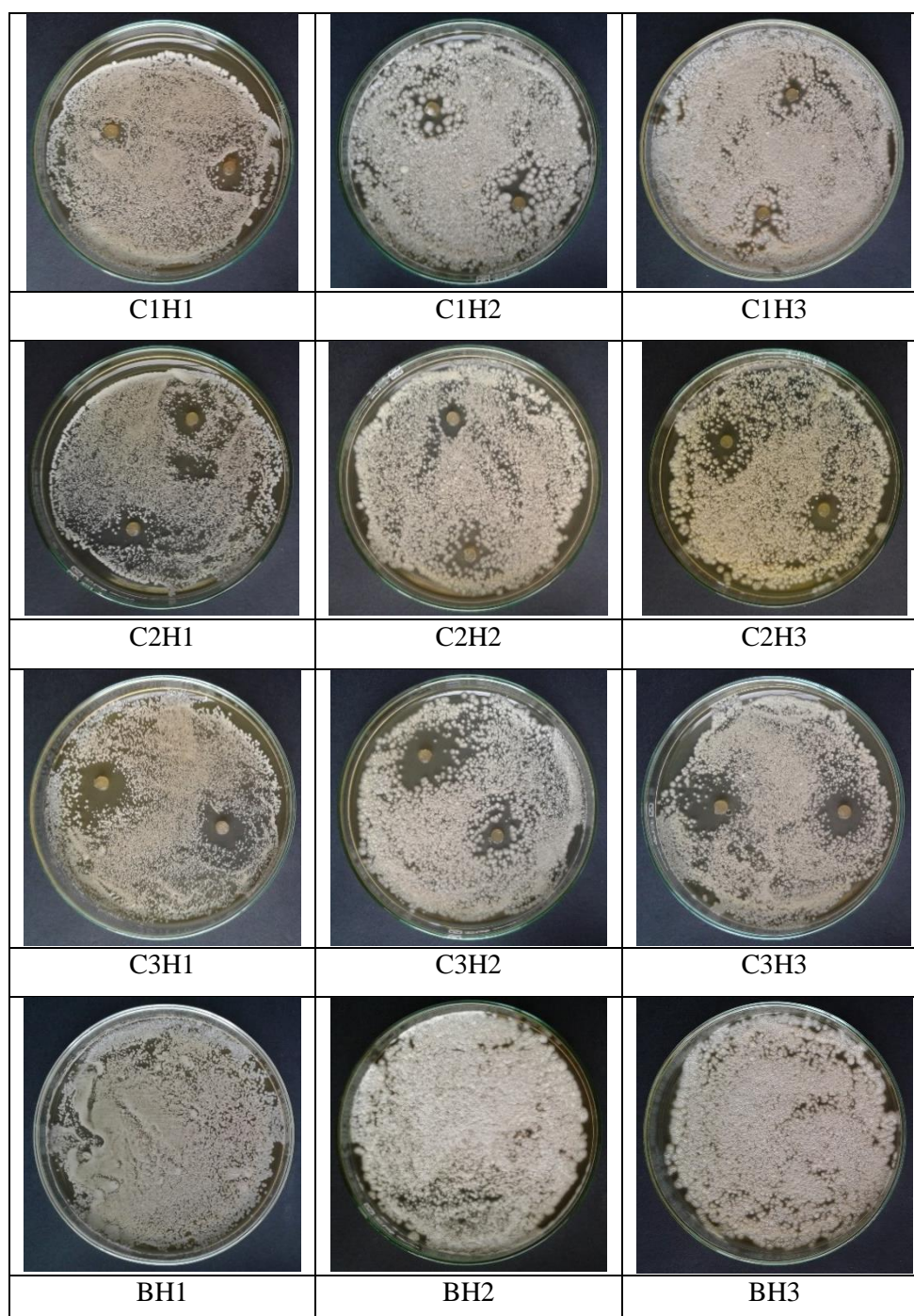


Figura 9. Diámetros de inhibición a las 96 horas. Dónde: C1= concentración 1, C2=concentración 2; C3= concentración 3. H1= hongo 1, H2= hongo 2, H3= hongo 3. B= blanco

ANEXO 4. Análisis estadístico para el modelo matemático que evalúa la concentración, cepa de hongo y el tiempo para diámetros

1. Análisis de Varianza (ANVA) multifactorial para determinar los efectos principales o simples.

Para el ANVA multifactorial se tiene como:

Variable dependiente:

- Diámetro de inhibición

Factores:

- Concentración de aceite esencial
- Hongo (1, 2, 3)
- Tiempo (48 h, 72h, 96 h)

Número de casos completos: 108

Tabla 16

Análisis de Varianza (ANVA) para el modelo matemático que evalúa la concentración de aceite esencial, cepa de hongo y el tiempo para diámetros

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P	Sig.
Efectos Principales						
A: Concentración	2245.05	2	1122.52	22.04	0.0000	**
B: Hongo	605.922	2	302.961	5.95	0.0036	**
C: Tiempo	3738.08	2	1869.04	36.69	0.0000	**
Residuos	5144.46	101	50.9352			
Total (Corregido)	11733.5	107				

* indica una diferencia significativa.

De la tabla 16 se tiene que el nivel de significancia del valor – P es menor a 0.05 por lo que se puede afirmar que al menos uno de los factores difiere del resto, en el análisis de los diámetros de inhibición. Los efectos principales de los factores concentración de aceite esencial, tiempo y hongos son altamente significativos en su interacción sobre los diámetros con un 95.0% de nivel de confianza.

1.1. Pruebas de comparación de medias diámetros por tiempo

Para la prueba de Múltiple Rangos para diámetros por tiempo se usa Tukey HSD al 95%.

Tabla 17

Pruebas de Múltiple Rangos para diámetros por tiempo

Tiempo	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
96	36	11.5917	1.22904	X	48 - 72	*	10.6667	4.00156
72	36	14.65	1.22904	X	48 - 96	*	13.725	4.00156
48	36	25.3167	1.22904	X	72 - 96		3.05833	4.00156

* indica una diferencia significativa.

La primera parte de la tabla 17 agrupa homogéneamente al primer y segundo grupo (tiempo de 96 y 72 horas), donde no existe diferencia estadísticamente significativa entre estos niveles. La segunda parte presenta cada par de tiempos, con sus respectivas diferencias y un intervalo de incertidumbre asociado a esta. Las diferencias que exceden al límite están reportadas entre los dos primeros pares de tiempos, los cuales son estadísticamente significativos con un nivel del 95.0% de confianza.

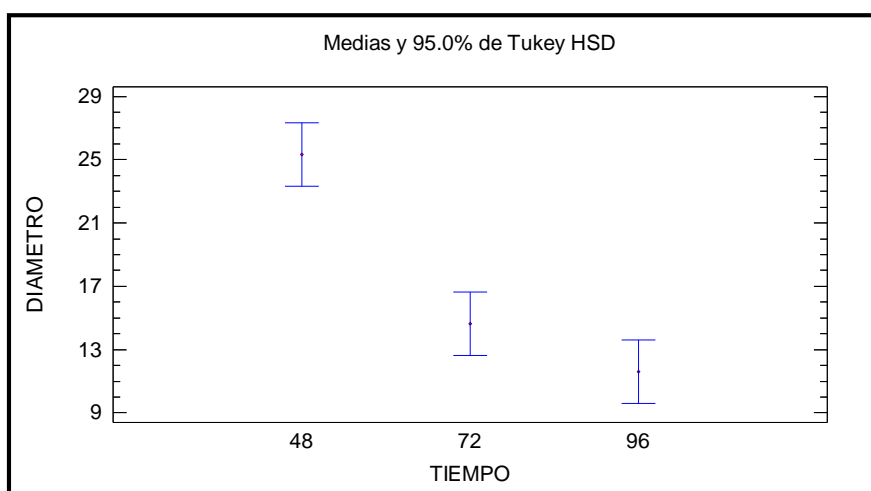


Figura 10. Intervalos de Diámetro vs Tiempo. Intervalos de confianza simultaneo de 95% de tukey

En la figura 23. Se tiene los intervalos de los diámetros de inhibición con los límites máximos y mínimos según el tiempo. Podemos observar que a un tiempo de 48 horas las medias son las más altas mientras a 96 horas la media es la más baja, corroborando que existe una diferencia significativa del tiempo de 48 horas para los grupos de 72 y 96 horas.

1.2.Pruebas de comparación de medias diámetros por concentración de aceite esencial.

Para la prueba de Múltiple Rangos para diámetros concentración se usa Tukey HSD al 95%.

Tabla 18

Pruebas de múltiples rangos para diámetros por concentración de aceite esencial

Tiempo	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
C1	36	12.525	1.18948	X	C1 - C2		-3.13333	4.00156
C2	36	15.6583	1.18948	X	C1 - C3	*	-10.85	4.00156
C3	36	23.375	1.18948	X	C2 - C3	*	-7.71667	4.00156

* indica una diferencia significativa.

La primera parte de la tabla 18 agrupa homogéneamente al primer y segundo grupo (concentración 1 y concentración 2), donde no existe diferencia estadísticamente significativa entre estos niveles. La segunda parte presenta cada par de concentraciones, con sus respectivas diferencias y un intervalo de incertidumbre asociado a esta. Las diferencias que exceden al límite, en este caso el segundo y tercer par de concentraciones son estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza.

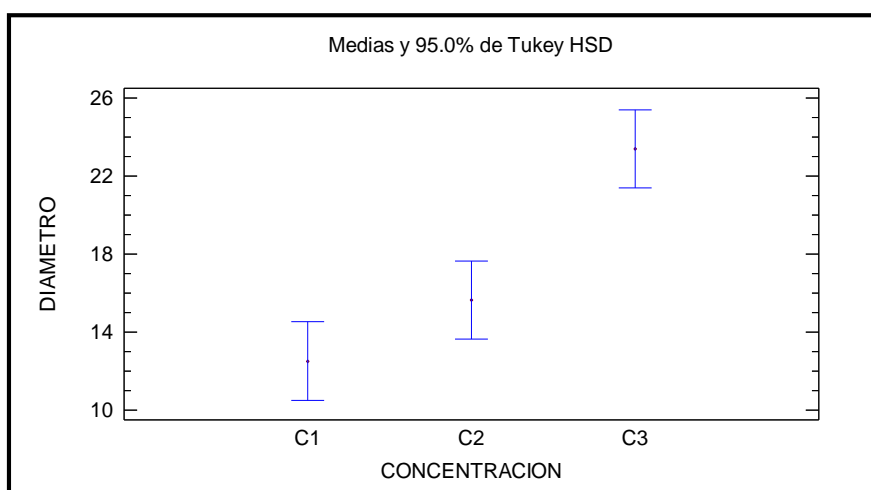


Figura 11. Intervalos de diámetro vs concentración. Intervalos de confianza simultaneo de 95% de tukey.

En la figura 24. Se tienen los intervalos de los diámetros de inhibición con los límites máximos y mínimos según la concentración de aceite esencial a las que fueron evaluados. Podemos observar que a la concentración 1 la media es la más baja mientras a la concentración 3 la media es la más alta, además se puede observar que no existe una diferencia significativa entre las concentraciones 1 y 2 pero si existiendo una diferencia significativa de la concentración 3 para con las concentraciones 1 y 2.

1.3. Pruebas de comparación de medias diámetros por hongo.

Para la prueba de Múltiple Rangos para diámetros por hongo se usa Tukey HSD al 95%.

Tabla 19

Pruebas de múltiples rangos para diámetros por hongo

Tiempo	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homg.	Contraste	Sig.	Dif.	+/- Límites
Hongo 1	36	13.8472	1.18948	X	Hongo 1 - Hongo 2	*	-5.24167	4.00156
Hongo 3	36	18.6222	1.18948	X	Hongo 1 - Hongo 3	*	-4.775	4.00156
Hongo 2	36	19.0889	1.18948	X	Hongo 2 - Hongo 3		0.466667	4.00156

* indica una diferencia significativa.

La primera parte de la tabla 19 agrupa homogéneamente al segundo y tercer grupo (hongo 3 y hongo 2), donde no existe diferencia estadísticamente significativa entre estos niveles.

La segunda parte presenta cada par de hongos, con sus respectivas diferencias y un intervalo de incertidumbre asociado a esta. Las diferencias que exceden al límite, en este caso el primer y segundo par de cepas de hongo son estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza.

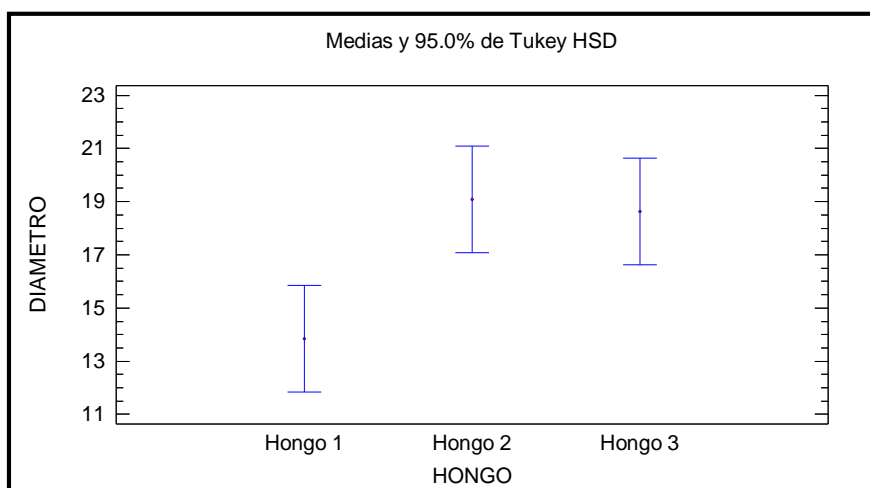


Figura 12. Intervalos de diámetro vs. hongo. Intervalos de confianza simultaneo de 95% de tukey

En la figura 25. Se tienen los intervalos de los diámetros de inhibición con los límites máximos y mínimos según la cepa de hongo a las que fueron evaluados. Podemos observar que la media del hongo 1 es la más baja mientras las medias de los hongos 2 y 3 las media son más alta (no ha diferencia significativa entre el hongo 2 y 3), corroborando que existe una diferencia significativa del hongo 1 para los hongos 2 y 3.

1.4. Gráficos multivariables para diámetros de inhibición.

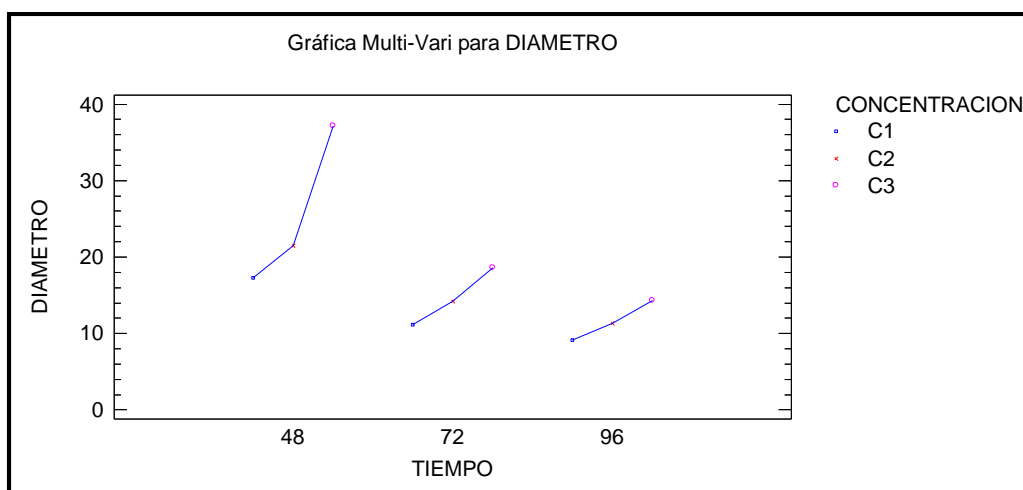


Figura 13. Perfiles de los diámetros de inhibición de los hongos a diferentes concentraciones de aceite esencial de *Laurus nobilis*.

Para la evaluación de la actividad antifúngica del aceite esencia de *Laurus nobilis* en hongos aislados del tallarín de casa, se usó tres concentraciones de aceite esencial de laurel, la figura 26 muestra un diámetro de inhibición mayor con la concentración 3 y los menores a la concentración 1, también podemos observar que el mejor tiempo donde se obtienen los diámetros de inhibición más grandes es a las 48 horas.

2. Análisis de Varianza (ANVA) simple - Diámetro por Concentración de aceite esencial de laurel

Para el ANVA simple a las 48 horas se tiene como:

Variable dependiente:

- Diámetro de inhibición

Factores:

- Concentración de aceite esencial de laurel

Número de observaciones: 36

Número de niveles: 3

Se realiza la prueba-F en la tabla 20 ANVA para determinar si hay relación entre los diámetros según la concentración de aceite esencial.

H_0 = todas las medias son iguales $\square \mu_A = \mu_B = \mu_C$

H_1 = alguna media no es igual \square alguna μ_i es diferente.

Tabla 20

Análisis de Varianza (ANVA) evaluada el diámetro por concentración de aceite esencial.

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2647.68	2	1323.84	10.50	0.0003
Intra grupos	4160.43	33	126.073		
Total (Corr.)	6808.11	35			

Como el p-valor obtenido (0.0003) es menor que el nivel de significancia (0.05) se rechaza H_0 ; y por lo tanto se puede decir que la media del diámetro es diferente estadísticamente entre un nivel de concentración y otro, según el ANVA simple la concentración de aceite esencial influye en el diámetro.

2.1. Determinando cuáles medias son significativamente diferentes de otras.

Tabla 21

Verificación de Varianza

	Prueba	Valor-P
	Levene's	3.61183 0.0381535

Puesto que el valor-P es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95.0% de confianza. Esto invalidará la mayoría de las pruebas estadísticas comunes.

2.2. Contraste Kruskal – Wallis

Tabla 22

Prueba de Kruskal-Wallis para diámetro por concentración de aceite esencial

Concentración	Tamaño Muestra	Rango Promedio
C1	12	11.7917
C2	12	17.0833
C3	12	26.625
Estadístico = 12.2299		Valor-P = 0.00220963

El p-valor obtenido (0.00220963) es menor que el nivel de significación que es 0.05; por lo tanto, se rechaza H_0 , lo que indica que no todas las medianas son iguales y por lo tanto sí existen diferencias significativas en el diámetro de inhibición según la concentración de aceite esencial que tengan, o lo que es lo mismo la concentración de aceite esencial sí que influye en el diámetro.

2.3. Pruebas de comparación de medias diámetros por concentración de aceite esencial de laurel.

Para la prueba de Múltiple Rangos para diámetros por hongo se usa Tukey HSD al 95%.

Tabla 23

Pruebas de múltiples rangos para diámetros por concentración

Concentración	Casos	Media	Grupos Homg.	Contraste	Sig.	Dif.	+/- Límites
C1	12	17.275	X	C1 - C2		-4.2	11.2503
C2	12	21.475	X	C1 - C3	*	-19.925	11.2503
C3	12	37.2	X	C2 - C3	*	-15.725	11.2503

* indica una diferencia significativa.

La primera parte de la tabla 23 agrupa homogéneamente al primer y segundo grupo (concentración 1 y concentración 2), donde no existe diferencia estadísticamente significativa entre estos niveles a diferencia del nivel de la concentración 3.

La segunda parte presenta cada par de concentraciones, con sus respectivas diferencias y un intervalo de incertidumbre asociado a esta. Las diferencias que exceden al límite, en este caso el segundo y tercer par de concentraciones son diferentes estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza.

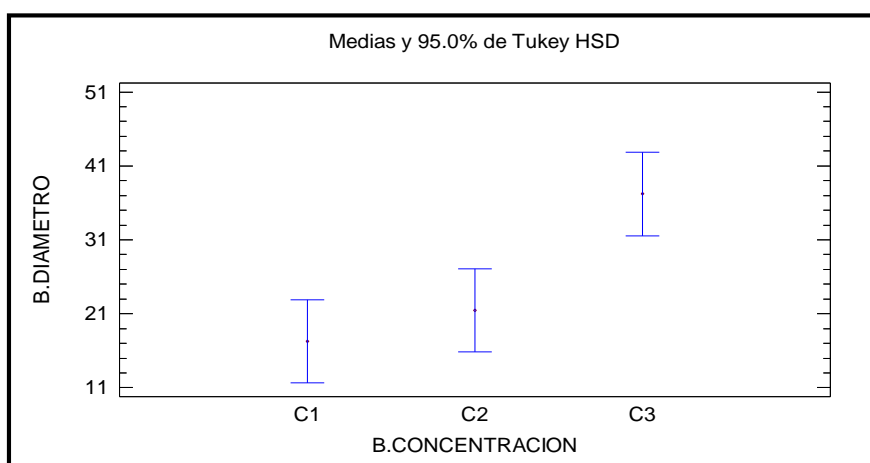


Figura 14. Intervalos de diámetro vs concentración. Intervalos de confianza simultaneo de 95% de tukey.

En la figura 27. Se tienen los intervalos de los diámetros de inhibición con los límites máximos y mínimos según la concentración a las que fueron evaluados. Podemos observar que a la concentración 1 la media es la más baja mientras a la concentración 3 la media es la más alta, además se puede observar que no existe una diferencia significativa entre las concentraciones 1 y 2 pero si existiendo una diferencia significativa de la concentración 3 para con las concentraciones 1 y 2.

3. Análisis de Varianza (ANVA) simple - Diámetro por hongo.

Para el ANVA simple a las 48 horas se tiene como:

Variable dependiente:

- Diámetro del inhibición

Factores:

- Hongo (1, 2, 3)

Número de observaciones: 36

Número de niveles: 3

Se realiza la prueba-F en la tabla 24 ANVA para determinar si hay relación entre los diámetros de inhibición según el hongo.

H_0 = todas las medias son iguales $\square \mu_A = \mu_B = \mu_C$

H_1 = alguna media no es igual \square alguna μ_i es diferente.

Tabla 24

Análisis de Varianza (ANVA) evalúa el diámetro por hongo

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1309.14	2	654.57	3.93	0.0295
Intra grupos	5498.97	33	166.635		
Total (Corr.)	6808.11	35			

Como el p-valor obtenido (0.0295) es menor que el nivel de significancia (0.05) se rechaza H_0 ; y por lo tanto se puede decir que la media del diámetro de inhibición es diferente estadísticamente entre un nivel de hongo y otro, según el ANVA simple el tipo de hongo influye en el diámetro.

3.1. Determinando cuáles medias son significativamente diferentes de otras.

Tabla 25

Verificación de Varianza

	Prueba	Valor-P
Levene's	2.47642	0.0995292

Puesto que el valor-P es mayor que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar (la desviación estándar es la misma en cada uno de los niveles (hongo)), con un nivel del 95.0% de confianza.

3.2. Pruebas de comparación de medias, diámetros por hongo.

Para la prueba de Múltiple Rangos para diámetros por hongo se usa Tukey HSD al 95%.

Tabla 26

Pruebas de múltiples rangos para diámetros por concentración

Hongo	Casos	Media	Grupos Homg.	Contraste	Sig.	Dif.	+/- Límites
Hongo 1	12	17.1667	x	Hongo 1 - Hongo 2	*	-14.4	12.9341
Hongo 3	12	27.2167	xx	Hongo 1 - Hongo 3		-10.05	12.9341
Hongo 2	12	31.5667	x	Hongo 2 - Hongo 3		4.35	12.9341

* indica una diferencia significativa.

La primera parte de la tabla 26 agrupa homogéneamente a dos grupos según la alineación x's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre estos niveles que compartan una misma columna de x's.

La segunda parte presenta cada par de hongos, con sus respectivas diferencias y un límite asociado a esta. Las diferencias que exceden al límite, en este caso el primer par de hongos son diferentes estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza.

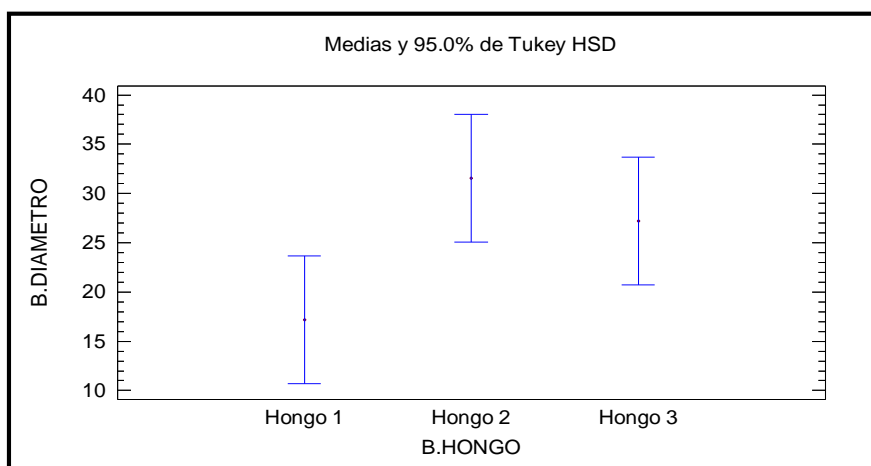


Figura 15. Intervalos de hongo vs concentración. Intervalos de confianza simultaneo de 95% de tukey.

La figura 28. Se tienen los intervalos de los diámetros de inhibición con los límites máximos y mínimos según el hongo. Podemos observar que el hongo 1 presenta la media es la más baja, mientras el hongo 2 la media es la más alta, además se puede observar que no existe una diferencia significativa entre los hongos 1 y 2.

ANEXO 5. Fotografías de las hojas de laurel.



Figura 29. Hojas de laurel



Figura 16. Hojas de laurel recién recolectadas y puestas para el secado.



Figura 17. Hojas de laurel secas y trozadas para su respectiva extracción de aceite esencial.



Figura 18. Izquierda equipo de destilación conformado por el balón destilador el cual contiene la materia orgánica a destilar, el condensador o refrigerante (izquierda) y la pera decantadora la cual permite la separación del aceite esencial del agua por el principio de la gravedad (Derecha).