

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**EVALUACION DEL CONTROL ANTIBACTERIANO DE *Erwinia spp*  
EN PAPA CON DOS ACEITES ESENCIALES: MUÑA (*Minthostachys  
mollis*) Y PAICO (*Chenopodium ambrosioides*) PUNO 2017**

**TESIS**

**PRESENTADO POR:**

**Br. Paul Enrique Condori Espinoza**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**PUNO – PERÚ**

**2018**

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO - PUNO  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



EVALUACIÓN DEL CONTROL ANTIBACTERIANO DE *Erwinia spp* EN PAPA CON DOS  
ACEITES ESENCIALES: MUÑA (*Minthostachys mollis*) Y PAICO (*Chenopodium  
ambrosioides*) PUNO 2017.

TESIS

PRESENTADO POR:

Br. Paul Enrique Condori Espinoza

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

Aprobado por el jurado revisor:

PRESIDENTE:

Dr. Dante Joni Choquehuanca Panclas

PRIMER MIEMBRO:

Dr. Belisario Mantilla Mendoza

SEGUNDO MIEMBRO:

Mg. Maria Isabel Vallenias Gaona

DIRECTOR / ASESOR:

Dr. Nicanor Miguel Bravo Choque

Área:

Ciencias Biomédicas

Línea de investigación:

Recursos Naturales y Medio Ambiente

Sub línea de investigación:

Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales

Temas de investigación:

Bioseguridad y Biotecnología Ambiental

**DEDICATORIA*****A Dios.***

*Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud y bienestar para lograr mis objetivos, además de no apartarse de mí en ningún momento*

***A mi Padre***

*Que a pesar del gran sendero que nos distancia me enseñó desde pequeño que la familia lo es todo y que uno no es nada sin ellos y que a pesar de todo uno nunca olvida a sus seres más amados*

***A mi Madre***

*Por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional amor y apoyo presente a través del*

***A mi hijo***

*Por ser mi motivo y mi fuerza para seguir adelante y conllevar los nuevos retos que la vida profesional tiene que ofrecer*

***A Silvana Q. C.***

*Por demostrarme el gran apoyo emocional que necesita uno para salir adelante por y para mi familia*

***A Erick C.E y German S.E***

*Por haberme brindado su apoyo incondicional y por compartir conmigo buenos y malos momentos y demostrarme que la familia nunca te abandona y no estás solo si estas con las personas a las que valoras*

*Paul Enrique Condori Espinoza*

**AGRADECIMIENTO**

❖ *Agradezco a Dios por bendecirme con todo lo bueno que me ha dado, porque él sabe que camino está escrito para mí y que misión tengo en esta vida.*

❖ *Agradezco primeramente a mi madre quien han dado todo el esfuerzo para que hoy sea un profesional íntegro y por apoyarme incondicionalmente en los momentos mas difíciles de mi vida.*

❖ *Agradezco al Dr. Miguel Nicanor Bravo Choque por ser mi asesor, por su entrega y dedicación en la realización de esta investigación, además por los buenos consejos que siempre me dio.*

❖ *Agradezco a mis Jurado por el interés, apoyo y critica, necesarios para la realización de esta investigación y su culminación exitosa.*

❖ *Agradezco a Sr. Lorgio por su apoyo incondicional y por toda la buena disposición que tuvo para conmigo en las pruebas de laboratorios necesarias para la realización de este trabajo.*

❖ *Agradezco a todos mis docentes que me guiaron y me formaron profesionalmente para que mi desempeño sea motivo de orgullo para nuestra casa superior de estudio y para nuestra escuela profesional de Biología.*

❖ *Agradezco a mis hermanos por estar conmigo en la buenas y en las malas, por acompañarme en esta etapa de mi vida.*

❖ *Agradezco a todas aquellas personas que estuvieron conmigo y me ayudaron para culminar este trabajo de investigación con éxito.*

**ÍNDICE GENERAL**

<b>RESUMEN</b> .....	9
<b>ABSTRACT</b> .....	10
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	11
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	14
<b>2.1 Antecedentes</b> .....	14
<b>2.2 Marco teórico</b> .....	16
<b>2.3 Marco conceptual</b> .....	27
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	28
<b>3.1. Área de estudio</b> .....	28
<b>3.2. Tipo de estudio</b> .....	28
<b>3.3. Población y muestra</b> .....	29
<b>3.4. Metodología y procedimiento</b> .....	29
<b>3.4.1 Diseño estadístico</b> .....	34
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSION</b> .....	35
<b>V. CONCLUSIONES</b> .....	49
<b>VI. RECOMENDACIONES</b> .....	50
<b>VI. REFERENCIAS</b> .....	51
<b>VII. ANEXOS</b> .....	56

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Variaciones de los halos de inhibición del aceite esencial de muña ( <i>Minthostachys mollis</i> ) hacia <i>Erwinia</i> spp a las 24 y 72h. ....	36
Figura 2. Variaciones de los halos de inhibición del aceite esencial de paico ( <i>Chenopodium ambrosioides</i> ) hacia <i>Erwinia</i> spp a las 24 y 72h. ....	39
Figura 3. Carga bacteriana de <i>Erwinia</i> spp. en los mercados: Laykakota, Central y Unión y Dignidad de la ciudad de Puno 2017. ....	41
Figura 4. Distribución de datos. Inexistente diferencia significativa del efecto antibacteriano del aceite esencial de muña a las 24 h, comparado con el aceite esencial de paico, obtenidos en la Facultad de Ciencias Biológicas UNA – Puno .....	44
Figura 5. Diferencia estadística significativa del efecto antibacteriano del aceite esencial de muña a las 72 h, comparado con el aceite esencial de paico, obtenidos en la Facultad de Ciencias Biológicas UNA – Puno 2017. ....	46
Figura 6. a) Destiladora de aceite esencial de Muña y Paico mediante el método de arrastre por vapor, b) Aceite esencial de Paico extraído mediante un Embudo de Decantación. Facultad de Ingeniería Agroindustrial, UNA-Puno. durante septiembre a octubre 2017. ....	56
Figura 7. Sembrado de <i>Erwinia</i> spp y preparación del disco de difusión con aceites esenciales. Realizado en la Facultad Ciencias Biológicas UNA-Puno, durante septiembre-octubre de 2017. ....	56
Figura 8. Desarrollo bacteriano de <i>Erwinia</i> spp por mercados en placa mediante el método de vertido en placa. Realizado en la Facultad Ciencias Biológicas UNA-Puno, durante septiembre- octubre de 2017. ....	57
Figura 9. a: Efecto y sensibilidad de <i>Erwinia</i> spp frente al aceite esencial de ( <i>Minthostachys mollis</i> ) Muña, b) Desarrollo de Halos de Inhibición en <i>Erwinia</i> spp frente al aceite esencial de ( <i>Chenopodium ambrosioides</i> ) Paico. Realizado en la Facultad Ciencias Biológicas UNA-Puno, durante septiembre-octubre de 2017. ....	57
Figura 10. Muestra de papa infectada empaquetada durante 24h para la obtención de la cepa de <i>Erwinia</i> spp Realizado en la Facultad Ciencias Biológicas UNA-Puno, durante septiembre- octubre de 2017. ....	58
Figura 11. Identificación de la bacteria mediante Tinción de Gram Realizado en la Facultad Ciencias Biológicas UNA-Puno, durante septiembre- octubre de 2017. ....	58

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características organolépticas del aceite esencial de muña ( <i>Minthostachys mollis</i> )...19	19
Tabla 2. Características organolépticas del aceite esencial de paico ( <i>Chenopodium ambrosioides</i> ) .....20	20
Tabla 3. Terpenos presentes en el aceite esencial de muña ( <i>Minthostachys mollis</i> ) .....22	22
Tabla 4. Compuestos mayoritarios encontrados en el aceite esencial de ( <i>Chenopodium ambrosioides</i> ) por cromatografía de gases de alta resolución con detector de espectrometría de masas (Jaramillo, 2012) .....23	23
Tabla 5. Evaluación del control antibacteriano del aceite esencial de muña ( <i>Minthostachys mollis</i> ) aún 10% en 24 y 72h. llevados a cabo en la Facultad de Ciencias Biológicas UNA –Puno 2017. ....35	35
Tabla 6. Evaluación del control antibacteriano del aceite esencial de paico ( <i>Chenopodium ambrosioides</i> ) aún 10% a 24 y 72h. llevados a cabo en la Facultad de Ciencias Biológicas UNA –Puno 2017 .....38	38
Tabla 7. Carga bacteriana de <i>Erwinia</i> spp de la papa de los mercados Laykakota Central y Unión y Dignidad .....41	41
Tabla 8. Medición de los halos de inhibición (mm) y porcentaje de inhibición de muña y paico frente a <i>Erwinia</i> spp. A las 24h de sembrado. Obtenidos en la Facultad de Ciencias Biológicas UNA –Puno 2017.....43	43
Tabla 9. Medición de los halos de inhibición (mm) y porcentaje de inhibición de muña y paico frente a <i>Erwinia</i> spp. A las 72h de sembrado. Obtenidos en la Facultad de Ciencias Biológicas UNA –Puno. ....46	46

**ÍNDICE DE ACRÓNIMOS**

%: porcentaje  
°C: grados centígrados  
ANOVA: Análisis de la varianza  
AE: Aceite esencial  
cm: centímetro  
DHI: Diámetro de halo de inhibición  
g: gramo  
h: hora  
Kg: kilogramo  
Min: minutos  
ml: mililitro  
mm: milímetro  
msnm: metros sobre el nivel del mar  
PCR: Proteína C Reactiva  
pH: Potencial de hidrogeniones  
s: segundos  
UFC: Unidades formadoras de colonias  
 $\mu$ : micras  
 $\mu$ g: microgramos  
 $\mu$ l: micro litros  
 $\mu$ m: micrómetros  
 $\alpha$ : Alfa  
 $\beta$ : Beta

## RESUMEN

El objetivo de la evaluación del control antibacteriano de *Erwinia spp* mediante dos aceites esenciales fue determinar su carga bacteriana y la efectividad de los aceites esenciales a través del antibiograma y evaluar los halos de inhibición. Los tubérculos fueron acondicionados para la obtención bacteriana y la extracción del aceite esencial de muña (*Minthostachys mollis*) y paico (*Chenopodium ambrosioides*) mediante arrastre de vapor para la obtención de la dosis de control fue de 10  $\mu$ L. Los resultados demostraron la eficiencia del control de muña (*Minthostachys mollis*) a 24 y 72h, mostrando valores por mercados: Laykakota 10 mm, 15.3 mm, Central 14.6 mm y 12.8 mm, Unión y Dignidad 12.5 mm y 15.2 mm, presentando diferencias a las 72h frente al paico (*Chenopodium ambrosioides*), presentando datos similares a 24h: Laykakota 11 mm y 11.8 mm, Central 12.8 mm y 13.5 mm, Unión y Dignidad 12.2 mm y 14.5 mm, siendo menor en consideración al uso de muña, en el desarrollo bacteriano de *Erwinia spp*, el mercado con mayor proliferación fue el mercado Laykakota con una cantidad de:  $4.24 \times 10^2$  UFC/g, duplicando y hasta quintuplicando a los otros puntos de acopio. El mercado Central presento una carga bacteriana de:  $2.81 \times 10^2$  y el mercado Unión y Dignidad una carga bacteriana de  $6.66 \times 10$  UFC. El control positivo de aceite esencial de (*Minthostachys mollis*) muña obtuvo un promedio de 13.87 mm obteniendo un porcentaje de un 53%, en contraposición los discos con (*Chenopodium ambrosioides*) paico tubo un promedio de 12.27 mm, con un porcentaje de inhibición del 47%. Las pruebas de análisis de varianza (ANOVA) demostraron en la medición a 72h una diferencia estadística significativa ( $P < 0.001$ ), a las 24h las muestras no demostraron diferencia significativa ( $P < 0.6427$ ) demostrando que el aceite de muña es más eficiente en condiciones de tiempo a diferencia del paico conforme pasa el tiempo de inoculación, y es prolongado dentro de un área controlada.

**Palabras clave:** Control antibiograma, *Erwinia*, aceite esencial, inóculo, susceptibilidad

## ABSTRACT

The objective of the evaluation of the antibacterial control of *Erwinia* spp by means of two essential oils was to determine its bacterial load and the effectiveness of the essential oils through the antibiogram and to evaluate the inhibition zones. The infected tubers were conditioned for bacterial collection and the extraction of the essential oil of muña (*Minthostachys mollis*) and paico (*Chenopodium ambrosioides*) by steam trawling to obtain the control dose was 10  $\mu$ L. The results showed the efficiency of the control of muña (*Minthostachys mollis*) at 24 and 72h, showing values by markets: Laykakota 10 mm, 15.3 mm, Central 14.6 mm and 12.8 mm, Union and Dignity 12.5 mm and 15.2 mm, presenting differences to the 72h in front of the paico (*Chenopodium ambrosioides*), presenting data similar to 24h: Laykakota 11 mm and 11.8 mm, Central 12.8 mm and 13.5 mm, Union and Dignity 12.2 mm and 14.5 mm, being smaller in consideration of the use of muña, in the development bacterial of *Erwinia* spp, the market with the most proliferation was the market Laykakota with a quantity of:  $4.24 \times 10^2$  CFU / g, doubling and up to five times the other collection points. The Central market presented a bacterial load of:  $2.81 \times 10^2$  and the Union and Dignity market a bacterial load of  $6.66 \times 10^0$  CFU. The positive control of essential oil of (*Minthostachys mollis*) muña obtained an average of 13.87 mm obtaining a percentage of 53%, in contrast the discs with (*Chenopodium ambrosioides*) paico tube an average of 12.27 mm, with a percentage of 47% inhibition. %. The analysis of variance tests (ANOVA) showed a significant statistical difference ( $P < 0.001$ ) in the measurement at 72h, at 24h the samples showed no significant difference ( $P < 0.6427$ ) demonstrating that the muña oil is more efficient in conditions of time unlike the paico as it passes the time of inoculation, and is prolonged within a controlled area.

**Keywords:** Antibiogram control, *Erwinia*, essential oil, inoculated, susceptibility

## I. INTRODUCCIÓN

Desde los inicios de la Agricultura el ser humano ha intentado con llevar y superar los diferentes tipos de daños que atraviesan cada tipo de vegetal al interactuar con un medio agreste, actualmente nuestra región productora de papa presenta un déficit en el manejo fitosanitario, el cual se atribuye al desconocimiento del control de *Erwinia spp.* el mismo que disminuye la producción agrícola como tal, teniendo en cuenta que hoy en día el uso de plantas medicinales es una gran alternativa para preservar y mitigar los daños agrícolas sobre todo en comunidades aisladas, constituyendo motivos suficientes para profundizar en el conocimiento de las plantas medicinales de nuestra región, por tanto el presente trabajo de investigación se basa en la evaluación del control antibacteriano de *Erwinia spp.* en papa con aceites esenciales de muña (*Minthostachys mollis*) y paico (*Chenopodium ambrosioides*), el cual se desarrolló en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Escuela Profesional de Biología en la Universidad Nacional del Altiplano – Puno 2017.

La bacteria de *Erwinia spp.*, es una de las bacterias más importantes en la agricultura, causante de la pudrición blanda de los tubérculos antes y después de la cosecha, y reduce en gran medida los rendimientos de cosecha (Elphinstone,1987). Por otro lado, los problemas encontrados en diferentes zonas de la ciudad de Puno por pudrición blanda en almacenes se consideraron la principal fuente bacteriana hacia el cultivo de papa en la relación tubérculo- semilla. Las bacterias atacan principalmente los órganos carnosos de almacenamiento de sus huéspedes (tubérculos, bulbos, bulbos y rizomas), pero también afectan los brotes, tallos y tejidos del peciolo (Nissen, 2008). Este patógeno presenta un rango de hospederos limitado casi exclusivamente en las papas, su proliferación en regiones templadas muestra un porcentaje de entre un 25 a 30% de desarrollo en cosecha (Doolotkeldieva, 2016), esto ocasionadas por las condiciones agroambientales, dichos problemas afectados por la prevalencia de *Erwnisa spp.* Esto afecta al desarrollo agrícola no solo causando infecciones fitosanitarias (Cardoza, 2008), sino que cada vez estos microorganismos se hacen ampliamente tolerantes a una variedad de agentes de control químico (Pesticidas), siendo así que la resistencia bacteriana de *Erwinia spp.* aumenta por mucho, por lo tanto (Garcia, 2000), se reconoce la influencia que llega a ejercer la bacteria hacia el cultivo con patrones de resistencia en la gravedad de este tipo de infecciones a

tal punto que se considera un problema en la calidad ambiental tanto en el ámbito poblacional como en el agrícola.

Las pérdidas económicas significativas tanto al agricultor como al comerciante proveedor directo hacia el consumidor, como región exportadora tanto la economía como la producción se vería afectada de manera directa disminuyendo los estándares de calidad ante un servicio dado. El trabajo toma como base la determinación de la carga bacteriana de *Erwinia spp* en papa comparando la efectividad de los aceites esenciales de Muña y Paico frente a la *Erwinia spp* como una solución al problema que el mismo precede.

El inicio del proyecto se dio con la colección de muña y paico siendo conocidos por su alto principio activo en sus aceites esenciales los cuales en su mayoría son benéficos contra enfermedades producidas por bacterias. Las muestras fueron conservadas a temperatura ambiente siendo deshidratadas al sol hasta el momento de la extracción del aceite esencial mediante arrastre de vapor, (Castro, 2012). Por lo tanto el tratamiento con plantas medicinales está siendo cada vez más aceptado en los diferentes niveles sociales, por lo tanto, es evidente que los tratamientos a base de plantas medicinales presentan una gran ventaja con respecto a los tratamientos químicos, ya que las plantas y sus principios activos se hallan siempre biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias que se potencian entre sí, la muña (*Minthostachys mollis*) y el paico (*Chenopodium ambrosioides*) las cuales son unas de las hierbas medicinales más usadas en el Perú y no es casualidad, ya que estas plantas brindan un número importante de beneficios y propiedades que pueden ayudar a superar muchos padecimientos bacterianos en los cultivos agrícolas.

Por tanto este trabajo de investigación contiene información de datos obtenidos del trabajo de investigación sobre la actividad antimicrobiana de las especies nativas “muña” y “paico” mediante un antibiograma de muestras, por ende la culminación de esta tesis es de suma importancia para corroborar, aplicar y desarrollar los conocimientos teóricos y prácticos que se adquieren durante la formación profesional, aportando criterios en los procesos tecnológicos desarrollados, finalmente toda la información científica que se brinda a través de la tesis, contribuirá al mejor conocimiento de nuestra realidad y esperamos que estimule a futuros trabajos de investigación a fin de ir resolviendo gradualmente la validación científica de estos importantes recursos de la zona sur peruana. En tal sentido, se plantearon los siguientes objetivos:

**1.1. Objetivo general:**

Evaluar el control antibacteriano de *Erwinia spp* de la papa obtenida de los almacenes de los mercados de la ciudad de Puno mediante el uso de los aceites esenciales de muña y paico.

**1.2 Objetivos específicos:**

- Determinar la carga bacteriana de *Erwinia spp* de la papa obtenida de los mercados de la ciudad de Puno.
- Determinar la efectividad de los aceites esenciales puros a través del antibiograma y evaluar los halos de inhibición presentes de los aceites esenciales hacia la bacteria.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Antecedentes

Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destiladas por arrastre de vapor, son responsables del aroma en las plantas, son mezclas complejas constituidas por diferentes tipos de compuestos orgánicos (León, 2009); se ha visto que los aceites esenciales contienen principios activos que pueden llegar a inhibir diferentes tipos de patógenos lo cual aporta a la investigación (Plazas, 2011)

Los diferentes componentes químicos que poseen las plantas ofrecen una amplia gama de control ante distintos agentes infecciosos en el ambiente (Torres, 2003); la composición química varía según el estado vegetativo de la especie, los contenidos de  $\alpha$ -pineno y limoneno se incrementan notablemente en otoño. Teniendo bajos índices de refracción debido a la presencia de un elevado porcentaje de hidrocarburos terpénicos ( $\alpha$ -pineno,  $\alpha$ -felandreno, limoneno) y al bajo contenido de compuestos oxigenados. (Castro, 2012).

El aceite esencial de muña (*Minthostachys mollis*) extraído de las hojas secas, muestra un color ligeramente más claro (esto se confirmó al evaluar el índice de refracción de ambos aceites) (Díaz, 2005). Las principales diferencias encontradas en los de aceite esencial son la tonalidad y el olor; su obtención se dio por la extracción de 300 g de hojas a 2ml de aceite esencial, lo cual representa un rendimiento de 0,7% (Gravedad del aceite de muña 1,0249) siendo las variantes organolépticas el color, olor, aspecto y sabor, esto presentando la trans-mentona en un 58,86% y pulegona a un 15% (Jaramillo, 2012).

El aceite esencial de paico (*Chenopodium ambrosioides*) presentó 23 metabolitos secundarios superiores al 0,1 %. El compuesto mayoritario es el  $\alpha$ -terpineno (60,29 %), seguido del p-cimeno (20,49 %), 4-careno (7,96 %), trans-ascaridol (1,91 %), carvacrol (1,64 %) (Gómez, 2008).

El método por arrastre de vapor se basa en la destilación de dos líquidos heterogéneos, agua y un aceite esencial, mediante la vaporización selectiva entre los componentes volátiles como no volátiles (Peredo, 2009). Siendo el punto de ebullición de los aceites esenciales (AE) hasta de 300 °C, evaporándose a temperaturas cercanas al punto de ebullición del agua (Cerutti, 2004).

En efecto los aceites esenciales actúan frente a muchos patógenos ya sea por su principio activo o su dosificación (Chacon, 2011), así los conjuntos de técnicas hacen que el aceite esencial tenga validez como agente biocontrolador, así el aceite esencial demostró una alta actividad inhibitoria en las primeras etapas de infección al menos para un patógeno (Brand, *et al.*, 2014).

El efecto antiviral de paico (*Chenopodium ambrosioides*) demostró un porcentaje de inhibición de 93.66% y 100%, respectivamente, a una concentración de 100 µg/ML. se vio la toxicidad aguda de paico (*Chenopodium ambrosioides*) ante variadas especies (Abiodun, *et al.*, 2010).

La *Erwinia spp.* es una bacteria agresiva en la planta debido a una mayor secreción de enzimas pectolíticas debido a esto poseen una alta capacidad de maceración, y por ende de patogenicidad, causando síntomas a las 72 h (Niseen, 2008), con su característica forma de varilla redondeada, crea colonias de células blancas y convexas (Franco 2004). Siendo estas Gram negativas, desarrollándose a una temperatura de 28°C y 30°C en 24 horas (Doolotkeldieva, 2016).

Comúnmente se encuentran en estado de latencia en las lenticelas de los tubérculos iniciándose la pudrición con la saturación del suelo mayoritariamente por el exceso de agua, desarrollándose de forma anaerobia (Elphinstone, 1987), los síntomas causados por estas bacterias en los tubérculos y en la base de los tallos son la clásica alteración enzimática de los tejidos, que se tornan blandos y húmedos (Galindo, 2012).

## 2.2 Marco teórico

### 2.2.1 Tipología y caracterización biológica de las plantas

#### a. Plantas medicinales

Las plantas medicinales siempre han estado envueltas en una aureola de misterio y espejismo en muchos grupos sociales, como solución a problemas de salud o facilitadoras de estados especiales del ser humano (Domínguez, 2004). De este modo el conocimiento de la botánica médica pretende no sólo identificar una riqueza terapéutica en la naturaleza, sino también su aplicación en la prevención de dolencias y enfermedades, sin caer en el error de categorizar las plantas medicinales simplemente como una alternativa temporal, ya que ellas están incluidas en un espectro más amplio. Más para que una planta pueda considerarse medicinal, además de los tratamientos prácticos, debe cumplir con el requisito de tener arraigo histórico, cultural y social. (MERK, 2012).

#### b. Plantas medicinales en el Perú

El Perú es un país privilegiado por la abundante diversidad de recursos que posee, es importante constatar que el uso de la diversidad biológica da sustento a las principales actividades económicas del país, además, que existen actividades tales como la farmacéutica las cuales tienen un potencial de desarrollo muy amplio (Gallegos, 2005). Desde ese punto de vista las plantas medicinales son consideradas todas aquellas que contienen uno o más principios activos, los cuales, administrados en la dosis adecuada, producen un efecto curativo frente a las enfermedades del hombre y de los animales. El hecho de contener más de un principio activo hace que una planta medicinal pueda servir para tratar diferentes afecciones o trastornos (Chanquilla, 2012).

## 1. Muña (*Minthostachys mollis*):

### Descripción botánica

Es un arbusto muy aromático, pubescente, de 0,50 a 1,50 m de altura que crece en forma de mata, el cual presenta hojas aovadas, con una base por lo general redondeada, de 2-3 cm de largo por 1-2 cm de ancho, bordes aserrados, raros enteros y revolutos, con peciolos de 5-10 mm, flores en las axilas de las hojas en cimas de 4 inflorescencias por nudo, con pedúnculos cortos de hasta 10 mm de largo, con 10-20 flores cada uno; cáliz de más o menos 2 mm de largo, corola de color blanco, tubo de más o menos 3 mm de largo (Brand et al., 2014).

### Biogeografía

La muña (*Minthostachys mollis*) habita en los diferentes pisos ecológicos de nuestra serranía, donde se desarrolla entre los 2500 y 3500 msnm, donde existe en abundancia. Es una planta hemicriptófita que durante el invierno (frío y seco) desaparecen sus hojas para brotar nuevamente con las primeras lluvias de la primavera (Carhuapoma, 2009). Llegando a florecer en verano en zonas altas del Perú siendo estos Apurímac, Huaraz, Arequipa y Puno donde su desarrollo y uso son en mayor medida (Zuluaga, 2003).

**Muña (*Minthostachys mollis*)****Clasificación taxonómica (Gallegos, 2015)**

<b>Dominio:</b>	<b>Eukarya</b>
<b>Reino:</b>	<b>Vegetal</b>
<b>Sub reino:</b>	<b>Embryophyta</b>
<b>División:</b>	<b>Magnoliophyta</b>
<b>Clase:</b>	<b>Magnoliopsida</b>
<b>Subclase:</b>	<b>Methachlamydeae</b>
<b>Orden:</b>	<b>Tubiflorae</b>
<b>Familia:</b>	<b>lamiaceae (labiatae)</b>
<b>Género:</b>	<b>Minthostachys</b>
<b>Especie:</b>	<b><i>Minthostachys mollis</i></b>
<b>Nombre vulgar:</b>	<b>“Muña”</b>
<b>Fórmula floral: K (5) C (2-3) A (2-2) G (2) (13)</b>	

**Características organolépticas**

Estos diferentes compuestos otorgan a la muña cualidades altamente eficientes en el manejo bactericida de diferentes males para el hombre y para la agricultura como un agente controlador de la presencia de polilla de la papa (Tabla 1).

Tabla 1. Características organolépticas del aceite esencial de muña (*Minthostachys mollis*)

Variables	Características fenotípicas
Color	Ligeramente verde amarillento turbio
Olor	Aroma fuerte agradable (parecido al mentol)
Sabor	Fuerte sabor fresco poco persistente
Aspecto	Líquido denso casi fluido turbio
Textura	Semi aceitosa

## 2. Paico (*Chenopodium ambrosioides*)

### Descripción botánica

El paico es una planta perteneciente a la familia Chenopodiaceae y conocida comúnmente, hierba santa, hierba de Santa María, hierba hedionda, paico macho, paico oloroso, pichín y té de los jesuitas, es una planta aromática, perenne, más o menos pubescente, con el tallo usualmente postrado, crece en suelos húmedos y bajos, olor fuerte, con alrededor de 40 cm de altura; las hojas son oblongo-lanceoladas y serradas, de entre 4 cm de longitud y 1 cm de ancho, con pequeñas flores verdes en panículos terminales densos, cada uno con 5 sépalos; el cáliz persistente circunda al fruto, y las semillas son negras y no mayores que 0,8 mm de longitud (Gómez, 2008).

### Biogeografía

Originario de la América tropical, se lo encuentra difundido por todo el mundo, en América Latina es común en los países de Perú, Bolivia, Ecuador, Brasil, Argentina y Paraguay. Se encuentra naturalizada en todas las regiones templadas del mundo. En Europa ha sido cultivada desde principios del siglo XVII para utilizarla como té, en donde se propagó, especialmente, por la región mediterránea (Estrada, 2012).

**Paico (*Chenopodium ambrosioides*)****Clasificación taxonómica (Jaramillo, 2012)**

<b>Dominio:</b>	<b>Eukarya</b>
<b>Reino:</b>	<b>Vegetal</b>
<b>División:</b>	<b>Tracheobionta</b>
<b>Clase:</b>	<b>Magnoliopsida</b>
<b>Orden:</b>	<b>Caryophyllales</b>
<b>Familia:</b>	<b>Chenopodiaceae</b>
<b>Sub familia</b>	<b>Chenopodioideae</b>
<b>Género:</b>	<b>Chenopodium</b>
<b>Especie:</b>	<b><i>Chenopodium ambrosioides</i></b>
<b>Nombre vulgar:</b>	<b>“Paico”</b>

**Características organolépticas**

Estos diferentes compuestos otorgan al paico cualidades eficientes en el manejo bactericida de diferentes males para el hombre (Tabla 2).

Tabla 2. Características organolépticas del aceite esencial de paico (*Chenopodium ambrosioides*)

<b>Variables</b>	<b>Características fenotípicas</b>
Color	Ligeramente verdoso lechoso
Olor	Aroma fuerte desagradable altamente irritante
Sabor	Fuerte sabor amargo altamente persistente
Aspecto	Líquido denso casi fluido altamente turbio
Textura	Semi aceitosa

## 2.2.2 Principios activos de las plantas (muña y paico), dosis proporcional y composición química.

### I. Principio activo

El principio activo es aquella molécula la cual es el producto del metabolismo de los organismos vegetales, que posee actividad farmacológica y que es susceptible en la utilización terapéutica, son sustancias que se encuentran en las distintas partes u órganos de las plantas y que alteran o modifican el funcionamiento de órganos y sistemas del cuerpo humano y animal entre ellos los más importantes desde el punto de vista de la etnobotánica son los aceites esenciales, alcaloides, glucósidos, mucílagos, gomas y taninos (Brand, 2014) . La investigación científica ha permitido descubrir una variada gama de principios activos, de los cuales todavía existen en las plantas otros principios activos relevantes denominados nutrientes esenciales, como las vitaminas, minerales, aminoácidos, carbohidratos y fibras, azúcares diversos, ácidos orgánicos, lípidos y los antibióticos. (León, 2009).

### II. Principio activo de la muña

La composición de los aceites esenciales y el principio activo varía en función a la especie, variedad, clima, tipo de suelo, método de cultivo. La muña de algunas regiones alto andinas aún no ha sido estudiado y caracterizado casi totalmente, pero debido a algunos antecedentes se supone que podrían tener actividad antioxidante (Chavarria, 2006), de estos principios activos son complejos, desconociendo aún su naturaleza química; Por lo general pertenecen a una de estas categorías: aceites esenciales, alcaloides, glúcidos, taninos, sapogeninas, fenoles, quinonas, terpenos, carotenoides, cumarinas, flavonoides, resinas. (Jaramillo, 2012)

#### 2.1.Pulegona

Se considera a este principio activo como uno de los más importantes terpenos de los aceites de (*Minthostachys mollis*), es altamente tóxico en grandes cantidades, incluso induce al aborto. Su toxicidad explica probablemente el efecto del aceite contra pestes y parásitos. Esta sustancia es usada en perfumería y como saborizante (OCW 2017 UP Madrid).

## 2.2. Componentes químicos

Tabla 3. Terpenos presentes en el aceite esencial de muña (*Minthonstachys mollis*)

Metabolito	Tiempo de retención (min)	Composición (%)
Pulegona	13.20	36.88
Mentona	11.09	24.24
Limoneno	5.32	0.77
Mirceno	-	Trazas
Mentol	12.8	No detectable

### III. Principio activo del paico

El a-terpineno constituye el principal principio farmacológicamente activo y relativamente volátil a temperatura ambiente del aceite esencial de (*Chenopodium ambrosioides*) (20-80%, según la zona de recolección) (Estrada, 2012). Es de destacar que los componentes bioactivos de la planta provienen de los metabolitos secundarios, y en términos de coeficientes de partición, se clasifican como soluble en agua y soluble en lípidos o alcohol (Ganado, 2006), del cual se puede resaltar el extendido uso que se le dé, al ser muy investigado a lo largo de toda América, Europa, África y Asia para explorar a fondo todas sus propiedades terapéuticas. También, cabe resaltar que la planta se ha encontrado en otras culturas, y se le dio varios usos ya sea como antipalúdico, fungicida o analgésico (Torres, 2003) (Tabla 4).

#### 3.1.A -Terpineno

Los terpinenos son hidrocarburos isoméricos que se clasifican como terpenos. Cada uno de ellos tiene la misma fórmula molecular y el mismo marco de carbono, pero difieren en la posición de los dobles enlaces carbono - carbono. La alfa-terpinina se ha aislado a partir de aceites de cardamomo y mejorana, y de otras fuentes naturales. Se ha demostrado que alfa-terpineno exhibe una función anti fúngica (PUBCHEM, 2010).

### 3.2. Componentes químicos

Tabla 4. Compuestos mayoritarios encontrados en el aceite esencial de (*Chenopodium ambrosioides*) por cromatografía de gases de alta resolución con detector de espectrometría de masas (Jaramillo, 2012)

N° Pico	Compuesto	1 <sub>K</sub> HP – 5 <sup>b</sup>	Área relativa del pico, % <sup>c</sup>		
1	B- Pineno	917	0.11	±	0.001
2	$\alpha$ -terpineno	1017	60.29	±	0.208
3	<i>o</i> -cimeno	1021	0.88	±	1.187
4	<i>p</i> -cimeno	1029	20.49	±	0.002
5	A-Limoneno	1033	1.10	±	0.011
6	1,3,8- <i>p</i> - Metantrieno	1111	0.13	±	0.003
7	<i>p</i> -Metilacetofenona	1178	0.16	±	0.001
8	<i>p</i> -cimen-8-ol	1180	0.22	±	0.002
9	$\alpha$ terpinenol	1188	0.10	±	0.001
19	$\alpha$ metil chabicol	1196	0.25	±	0.010
11	(+)-4-Careno	1205	7.96	±	0.092
12	E-Carveol	1217	0.34	±	0.004
13	1,4 peroxi- <i>p</i> -ment-2-eno	1252	0.91	±	0.019
14	Timol	1290	1.02	±	0.022
15	Carvacrol	1292	1.64	±	0.002
16	<i>Trans</i> -Ascaradiol	1305	1.91	±	0.029
17	<i>p</i> -Cimenol	1307	0.31	±	0.019
18	Eugenol	1350	0.90	±	0.022
19	E-Cariofileno	1423	0.19	±	0.008
20	$\alpha$ – Humuleno	1455	0.22	±	0.015
21	$\alpha$ – patchuleno	1456	0.12	±	0.006
22	Oxido de cariofileno	1580	0.10	±	0.003
23	<i>Trans</i> -fitol	1950	0.48	±	0.029

### 2.2.3 Aceites esenciales

Actualmente los aceites esenciales son considerados como el producto final del metabolismo secundario en las plantas aromáticas. Las cuales están constituidos por terpenos con actividad y composición variada; después de la extracción generalmente son líquidos y rara vez sólidos o pastosos (Alzamora, 2001), el mecanismo de acción de los aceites esenciales ha sido muy poco investigado ante tratamientos bacterianos ajenos al hombre. (Brand, 2014). Los cuales son extraídos en fracciones líquidas volátiles, generalmente destiladas por arrastre con vapor de agua, las cuales son responsables del aroma en las plantas, mayormente presente en las plantas aromáticas, son mezclas complejas constituidas por diferentes tipos de compuestos orgánicos. En la naturaleza los aceites esenciales desempeñan un papel importante en la defensa y protección de las plantas ante agentes externos. Se evaporan por exposición al aire a temperatura y presión ambiente generalmente. (Nissen, 2008).

### 2.2.4 Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales

Los agentes antimicrobianos son agentes con una amplia variedad natural obtenidos de diferentes agentes tales como microorganismos, animales y plantas respectivamente. Un gran número de estos usados para el mantenimiento y conservación de alimentos mientras muchos otros son estudiados actualmente (Ganado, 2006) Los aceites esenciales con mayor actividad antimicrobiana son aquellos en los que se la proporción de compuestos fenólicos es mayor, aunque se ha observado que el elemento traza también son relevantes debido a efectos de sinergia con el resto de componentes (Cano, 2008) la capacidad de los aceites esenciales para inhibir el crecimiento microbiano ha sido estudiada en gran variedad de productos como frutas y verduras mínimamente procesadas (Gallos, 2011).

### 2.2.5 *Erwinia spp.*

La *Erwinia* es una bacteria perteneciente a la Familia **Enterobacteriaceae** el cual posee una distribución climática amplia que refleja la diversidad del desarrollo la cual ataca a una gran diversidad de cultivos y se encuentra en zonas templadas lo cual causa la pudrición blanda de la papa, estas bacterias no ven como limitante el almacenamiento del tubérculo, puesto que estos tienden a proliferarse tanto como en cultivo como en el almacén, en malas condiciones de manipuleo y almacenamiento,

las pérdidas pos cosecha podrían llegar hasta un 100%, en operaciones grandes los daños han alcanzado millonarias pérdidas en una sola temporada de almacenamiento. Se sabe que ocurrieron pérdidas similares en embarques de papa para alimento o siembra, pues la temperatura y el transporte no es el más óptimo en manejo y cuidado (Elphinstone, 1987).

➤ **Características bacteriológicas**

Es una bacteria Gram negativo en forma de bastones rectos, con dimensiones de 0.5 a 1.0 x 1.0 a 3  $\mu\text{m}$ . Su desplazamiento se da por medio de varios flagelos peritricos. el género de las Erwinias contiene algunas especies saprofitas, que son anaerobias facultativas, Es oxidasa negativa, catalasa positiva y fermentadora. La coloración de la mayoría de las colonias es crema y algunas especies producen colonias amarillas. Algunas especies no producen enzimas pécucas y causan marchitamientos o enfermedades necróticas (como el grupo atnylovora), mientras que otras presentan una notable actividad pectolítica y causan pudriciones blandas en las plantas (como el grupo carotovora). Gram (-). (Agrios, 2005)

➤ **Penetración:**

Son diseminadas por insectos, herramientas, manos, lluvia y agua de riego. Generalmente penetra por heridas (heladas, laboreo, insectos). A veces en suelos muy húmedos a través de las lenticelas de raíces sanas (Agrios, 1999).

➤ **Desarrollo:**

Requiere altas humedades (superiores al 90%), para progresar y continuar con éxito la enfermedad, en sus etapas iniciales. Las altas temperaturas aceleran su multiplicación en los espacios intercelulares (Agrios, 1999).

La bacteria es incapaz de penetrar las células vivas, pero produce sustancias que terminan matándolas y desintegrándolas (licuefacción de los tejidos); en estas condiciones les sirven de alimento y en su presencia las bacterias se reproducen y repiten este proceso (Agrios, 1999).

*Erwinia spp.* es una bacteria que se multiplica muy activamente a temperaturas altas (mayores a 25°C), Adicionalmente requiere condiciones de alta humedad en el suelo. En algunos casos puede desarrollarse en condiciones anaeróbicas (Agrios, 2005).

### 2.3 Marco conceptual

➤ **Aceite esencial:**

Los aceites esenciales son en su mayoría sustancias terpénicas y fenilpropánicas, almacenados en tejidos secretores de los órganos vegetales aromáticos. (Cerutti, 2004)

➤ **Antibiograma**

El antibiograma es un método por el cual se analiza los fenotipos de sensibilidad hacia un agente patógeno y permite deducir posibles mecanismos de resistencia. Además de la sensibilidad de antibióticos y su efecto, observados (Chacon, 2011).

➤ **Bacteriosis:**

Enfermedad de las plantas, enfermedad ocasionada por bacterias fitopatógenos. Los cuales afectan a las plantas, situándose dentro de sus tejidos y originando daños creados por las toxinas de su metabolismo.

➤ **Cepa:**

En microbiología, conjunto de virus, bacterias u hongos que tienen el mismo patrimonio genético.

➤ **Halo de inhibición:**

Las zonas de inhibición que rodean a los discos que se miden a fin de determinar la susceptibilidad (resistente, intermedia, susceptible). El diámetro de la zona de inhibición es proporcional a la susceptibilidad de la cepa bacteriana comprobada (OPS, 2013).

➤ ***In vitro:***

Es la técnica que se realiza fuera y dentro de un tubo de ensayo, en un medio de cultivo, o en cualquier otro ambiente artificial controlado en un laboratorio.

➤ **Principio activo:**

Sustancia con composición química exactamente conocida y que es capaz de producir efectos o cambios sobre una determinada propiedad fisiológica a quien se aplica.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Área de estudio

La recolección de las muestras de las plantas de muña y paico fue realizada en el Centro Poblado Jallihuaya, a una altura de 3821 msnm aproximadamente. Latitud: -15, 8739, longitud: -69, 9818 ; la zona de Jallihuaya se constituye una zona ecológica muy característica por encontrarse entre cerros demostrando características pertenecientes a un valle inter andino, donde al realizar una visita se ha determinado que se ubican las muestras vegetales Para la obtención de los aceites esenciales de (*Minthostachys mollis*) muña y de (*Chenopodium ambrosioides*) paico se realizó en el Laboratorio de Procesos Industriales de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional del Altiplano – Puno.

#### 3.2. Tipo de estudio

El estudio se basó en un proceso cualitativo explicativo es de tipo experimental, con pruebas y controles, distribuidos en dos grupos, el primer grupo representado por el aceite esencial de (*Minthostachys mollis*) muña y de (*Chenopodium ambrosioides*) paico, demostrando la capacidad de los aceites esenciales mediante observación directa , para ver la efectividad toxica en la inhibición de la bacteria de papa que produce la pudrición blanda, constituida por 9 placas para (*Minthostachys mollis*) muña y 9 placas para (*Chenopodium ambrosioides*) paico, contrastando a diferentes tiempos con agentes controladores de *Erwinia spp*, y el segundo grupo, fue un control negativo (agua destilada estéril).

### 3.3.Población y muestra

La colección de la muestra portadora de la bacteria se dio del tubérculos infectados importados de Andahuaylas para la obtención del microorganismo causante de la pudrición blanda, se colectó de los diferentes almacenes de la ciudad de Puno, favorecida en su desarrollo por la humedad relativa superior a 80%, temperaturas oscilantes entre 24-32°C (Guevara, 2002) se basó en una distribución homogénea por mercado siendo un 1kg de muestra homogéneamente seleccionada por mercado, colectadas y rotuladas para su transporte hacia el laboratorio.

### 3.4.Metodología y procedimiento

- **Aislamiento de la cepa bacteriana a partir de los mercados Laykakota, Central, Unión y Dignidad**

Se hizo la colección de la muestra en los mercados: Laykakota, Central y Unión y Dignidad, respectivamente, tomando 5 muestras de papa importada de Andahuaylas infectadas por mercado respectivamente, las cuales fueron almacenadas a temperatura ambiente en un lapso de 2 días, para su traslado al laboratorio donde fueron lavadas manualmente con agua destilada y segmentadas en trozos de 2 cm cada una para ser colocada en bolsas Ziplock con 40ml de agua destilada, las muestras fueron almacenadas durante un plazo de 24h dejando sedimentar el tubérculo, luego de la sedimentación se llevó a cabo el proceso de dilución en suero fisiológico con 4 diluciones, esto para encontrar la cepa más pura y así pasar al reconocimiento bacteriano mediante la tinción Gram: Inicialmente para el procedimiento de la tinción Gram, se extrajo una gota de agua destilada para ser vertida sobre una la lámina portaobjetos esto girando la placa para un mayor área de efecto, se usó un asa de siembra para extraer la muestra de cepa diluida, diluyéndolo en las láminas con agua destilada para favorecer su fijación, en un lapso de tiempo de ente 10 a 15 seg. para el fijado total de las muestras, una vez secas las láminas se procedió a teñirlas previa rotulación. Usando azul violeta como fijador durante 20 a 30 seg. Procediendo al vertido con agua destilada en la lámina por encima de la muestra fijada dejando secar durante 5 a 10 seg. Seguidamente se le coloco el reactivo lugol dejando reposar por alrededor de 20 a 30 seg. Procediendo después al lavado de la lámina

con agua destilada por encima de la muestra fijada. Luego, se vertió la muestra de alcohol acetona en las láminas con muestra. por último, se le colocó la safranina para el contraste, donde se hizo la lectura con un microscopio electrónico a un aumento de 100x con aceite de inmersión para determinar la composición bacteriana el cual resultó ser bacterias Gram (-).

- **Obtención del aceite esencial de (*Menthonachys mollis*) muña y (*Chenopodium ambrosioides*) paico y preparación del medio de cultivo.**

Las muestras vegetales fueron colectadas en el Centro Poblado Jalluhuaya, a una altura de 3821 msnm aproximadamente esto a horas de las 9 a 1pm colectadas con ayuda de tijeras especiales para vegetación cortadas desde la base del tallo, guardadas en bolsas de polímero biodegradable las mismas que se almacenaron durante 2 días para ser llevados al laboratorio especializado en extracción de aceite esencial , donde se escogieron manualmente las hojas de los tallos de las especies vegetales, los cuales se cargaron en un hidroddestilador, de manera que formo un lecho fijo compacto, colocándose un total de 3 Kg por muestra siendo un total de 6 Kg de muestra. El vapor de agua se inyectó mediante un distribuidor interno, próximo a su base y con la presión suficiente para vencer la resistencia hidráulica del lecho. Conforme el vapor se pone en contacto con el lecho, la materia prima se calienta liberando el aceite esencial contenido en las plantas, el agua a su vez, debido a su alta volatilidad se evapora. Al ser soluble en el vapor circundante, el aceite esencial es “arrastrado”, corriente arriba hacia el tope del hidroddestilador. La mezcla de vapor saturado y aceite esencial, fueron condensados y enfriados, hasta una temperatura ambiente en el condensador “cuello de cisne” o prolongación curvada del conducto, a la salida del hidroddestilador. A la salida del condensador, se obtuvo una emulsión líquida heterogénea. La cual, se separó en un decantador dinámico o bureta. Este equipo estuvo lleno de agua fría al inicio de la operación y el aceite esencial se fue acumulando, debido a su casi inmiscibilidad en el agua y a la diferencia de densidad y viscosidad con el agua. Posee un ramal lateral, por el cual, el agua es desplazada para favorecer la acumulación del aceite, el vapor condensado acompañante del aceite esencial y que también se obtiene en la bureta, es llamado “agua floral”, posee una pequeña concentración de los compuestos químicos solubles del aceite esencial, lo cual le otorga un ligero aroma, semejante al aceite obtenido. A continuación, el aceite fue retirado de

la bureta y almacenado en frascos acaramelados estériles con tapa, luego los frascos se rotularon y se mantuvieron en refrigeración para su conservación.

Para la siembra bacteriana se acondicionó el Agar Pseudomona el cual fue usado para la propagación y desarrollo de la bacteria de *Erwinia spp.* Ya que este medio presenta las condiciones nutritivas necesarias para su desarrollo, dependientemente de la especificación para su manipulación, del cual se preparó la cantidad de 11.41 mg de Agar en 300ml de agua destilada para 15 placas. Se llevó el medio a esterilización en autoclave a 120 °C por 45 minutos. Antes que el medio se coagule, se plaqueó, vertiendo aproximadamente unos 20 ml de Agar Pseudomona en las placas vacías, habiendo esperado que gelifique. No obstante, se verifico el pH del agua (7.2) empleando un pHmetro manual. Posteriormente a ello se hizo un conteo de la carga bacteriana usando el método de conteo de colonias por difusión en superficie por cuadrante

La preparación de los medios de cultivo se dio de tal manera que presenten los componentes necesarios para verificar la producción y desarrollo del inóculo, el Agar Pseudomona se preparó en cantidades necesarias para un conteo total en 15 placas motivo por el cual fue necesario la cantidad de 11.41 mg diluido en 300ml de agua destilada estéril, el cual se llevó a esterilización en autoclave a 120 °C por 45 minutos. Antes que el medio se coagule, se plaqueo, vertiendo aproximadamente unos 20 ml de medio Pseudomona en las placas vacías, esperando que gelifique. No obstante, se verifico el pH del agua (siendo este de: 7.2) empleando un pHmetro manual. Una vez tomadas las bacterias del Agar Pseudomona se forzó a una prueba de sembrado más, esto para una exhaustiva identificación de la bacteria esta vez usando el Agar Mac Conkey el cual es considerado un medio selectivo para muestras Gram (-) característica presente en nuestra bacteria, de este medio se usó la cantidad de 20.01 mg de Agar diluido en 400 ml de agua destilada para ser vertido en otras 15 placas. Se llevó el medio a esterilización en autoclave a 120 °C por 45 minutos. Siguiendo el mismo procedimiento con el Agar Mac Conkey en las placas 15 vacías. No obstante, se verifico el pH del agua (siendo este de:7.2) empleando un pHmetro manual, ya considerando y colectando la muestra de *Erwinia spp.* Se procedió a su siembra mediante un agar necesario para poder llegar a ver las diferentes medidas de los halos razón por la cual se usó el agar Mueller Hinton el cual se preparó la cantidad de 14.00 g de agar con 400 ml de agua destilada para 16 placas.

Luego se llevó el medio a esterilización en autoclave a 120 °C por 40 minutos. Antes que el medio de cultivo se enfríe, se realizó el paqueo, vertiendo aproximadamente 20 ml de medio Mueller Hinton en cada placa estéril vacía, luego se esperó que gelifique. No obstante, se verificó el pH del agua destilada (7.2), empleando un pH metro manual.

- **Siembra de las cepas de *Erwinia spp.* y preparación de discos con aceite esencial de muña (*Minthostachys mollis*) y paico (*Chenopodium ambrosioides*).**

Las cepas bacterianas de *Erwinia spp* colectadas fueron sembradas en Agar Pseudomona con la técnica de sembrado por agotamiento con ayuda de un asa de kolti, (previamente preparadas para la obtención del sobrenadante en agua destilada durante 24 horas). Tiempo final donde se seleccionaron y recogieron con ayuda de un hisopo estéril, para su posterior colección, las cepas sobrenadantes se procedieron a sembrar en el agar, donde se incubó por 30 a 35 °C por 24 horas, y se procedió al aislamiento, luego se hizo la tinción Gram de algunas colonias. Se tomaron todas las colonias cremas blanquecinas características de la cepa de *Erwinia sp.* para su aislamiento y propagación. Este procedimiento se repitió 3 veces hasta obtener una cepa pura. En los medios Agar Pseudomona y agar Mac Conkey.

Utilizando el aceite esencial se ensayaron las siguientes concentraciones, todas ellas por triplicado. Se hizo perforaciones de papel filtro No. 2 a manera de discos para el antibiograma. Luego, con la ayuda de pipetas automáticas se empaparon dichos discos, cada uno con las cantidades correspondientes, fueron 7 discos por placa y 3 placas por cepa del mercado respectivo, para posteriormente ser utilizadas como inhibidores de la cepa *Erwinia spp.*

- **Determinación de la carga bacteriana de *Erwinia spp* de la papa obtenida de los mercados de la ciudad de Puno 2017.**

La utilización de muestras infectadas con *Erwinia spp*, provenientes de los Mercados de Laykakota, Mercado Central y Mercado Unión y Dignidad de la ciudad de Puno, fueron transportadas con medidas de bioseguridad tomadas en cuenta, ya que las muestras no deben de presentar una sobrecarga bacteriana en el tubérculo, por lo tanto, se aplicó el sistema de empaquetado en bolsas estériles, colocándolos en el recipiente herméticamente cerrado, estas fueron colocadas junto a un material congelante lo suficiente para mantener estable la cadena de frío y disminuir así la propagación de agentes externos capaces de alterar a la muestra bacteriana, esto hasta llegar al laboratorio. Llegado al laboratorio las muestras fueron debidamente lavadas con agua esterilizada dos veces la primera para una limpieza general y la segunda para dar una limpieza más exhaustiva sobre la parte infectada del tubérculo una vez limpio y dejado a secar por unos minutos la muestra fue cortada con un bisturí estéril en trozos de 2 a 3 cm llegando a pesar 50g por muestra empaquetada, evitando la presencia de cascara en la muestra se dejaron durante 24h en reposo con 50 ml de agua destilada. Al promediar las 24 h de tiempo asignado se procedió a la siembra de la cepa pura en el medio con el uso de un hisopo de estéril por cada placa, Se tomó el sobrenadante y se procedió a sembrar en el agar mediante la técnica de sembrado de difusión, se incubo por 30 a 35 °C por 24 horas, y se procedió al conteo. Se contaron todas las colonias cremas blanquecinas características de la cepa de *Erwinia spp*.

### 3.4.1 Diseño estadístico

Para la comparación del aceite esencial de muña (*Minthontachys mollis*) y paico (*Chenopodium ambrosioides*), frente a *Erwinia spp*, al obtener los resultados, se evaluó las diferencias estadísticas entre los aceites esenciales de la Muña y Paico con el control de los bioensayos, para lo cual se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de un diseño completamente al azar (DCA). Para determinar la existencia de diferencias entre los aceites respecto a la inhibición producida en *Erwinia spp*, asimismo se realizó la prueba de rango múltiple de Tukey para realizar la prueba de comparación de medias entre los tratamientos, el análisis de varianza se realizó utilizando el siguiente modelo lineal aditivo:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} \text{ Dónde:}$$

$Y_{ij}$ = Variable de respuesta (halo de inhibición en mm).

$\mu$ = Promedio general.

$\tau_i$ =Efecto de la  $i$ -ésima concentración de aceite o extracto de los aceites esenciales (muña y paico)

$\varepsilon_{ij}$ = Efecto del error experimental.

Las pruebas estadísticas se evaluaron:

Si el resultado es  $p < 0,05$  las pruebas son significativas

Si el resultado es  $p > 0,05$  las pruebas no son significativas

Prueba de rango múltiple de Tukey.

Tukey propuso un procedimiento para evaluar la hipótesis nula con  $\alpha$  siendo exactamente el nivel global de significancia, cuando las muestras tienen tamaños iguales, y en el máximo  $\alpha$ , cuando las muestras tienen  $\alpha$  tamaños diferentes.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

**4.1. EVALUACIÓN DEL CONTROL ANTIBACTERIANO DE *Erwinia spp* DE LA PAPA OBTENIDA DE LOS ALMACENES DE LOS MERCADOS DE LA CIUDAD DE PUNO MEDIANTE EL USO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE MUÑA Y PAICO.**

La evaluación antibacteriana de los tubérculos de papa infectados por *Erwinia spp.* encontrados en los mercados de la ciudad de Puno, se detalla en las siguientes tablas:

Tabla 5. Evaluación del control antibacteriano del aceite esencial de muña (*Minthostachys mollis*) aún 10% en 24 y 72h. llevados a cabo en la Facultad de Ciencias Biológicas UNA –Puno 2017.

Mercados	Control antibacteriano de muña							
	24 Horas				72 Horas			
	1R	2R	3R	Promedios	1R	2R	3R	Promedios
Laykakota	9.5	7	9	<b>8.5</b>	14	15	15.5	<b>14.8</b>
	6	9.5	9	<b>8.2</b>	15	14.5	15	<b>14.8</b>
	10	8	10	<b>9.3</b>	14.5	14.5	15	<b>14.6</b>
	10.5	9	10.5	<b>10</b>	15	15.5	15.5	<b>15.3</b>
	8	9	8	<b>8.3</b>	15	14	15.5	<b>14.8</b>
	6	9.5	8.5	<b>8</b>	14.5	15	15.5	<b>15</b>
	9	10	10.5	<b>9.8</b>	14.5	14.5	14.5	<b>14.5</b>
	15	16	13	<b>14.6</b>	11	13	13	<b>12.3</b>
Central	11.5	9	13.5	<b>11.3</b>	10.5	12.5	12	<b>11.6</b>
	9	12	14.5	<b>11.8</b>	10	12.5	12	<b>11.5</b>
	13	12	14.5	<b>13.2</b>	13	13	12.5	<b>12.8</b>
	12.5	11.5	13	<b>12.3</b>	11	13	13	<b>12.3</b>
	10.5	13.5	12	<b>12</b>	11.5	12.5	13	<b>12.3</b>
	12.5	14.5	14	<b>13.6</b>	10	12.5	12.5	<b>11.6</b>
Unión y Dignidad	10	11	12	<b>11</b>	15	15	15	<b>15</b>
	10.5	13.5	13	<b>12.3</b>	15	15	14.5	<b>14.8</b>
	11	12.5	12.5	<b>12</b>	14	14.5	14	<b>14.2</b>
	7	13	10.5	<b>10.2</b>	14.5	12	13.5	<b>13.3</b>
	10	9	11	<b>10</b>	15	15	15	<b>15</b>
	10	10	11.5	<b>10.5</b>	15	13	17	<b>15</b>
	12.5	13	12	<b>12.5</b>	15	15.5	15	<b>15.2</b>

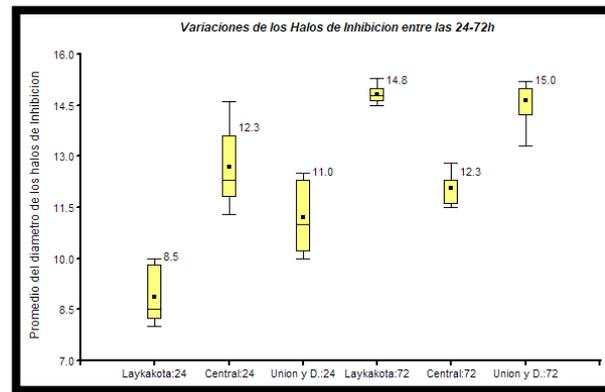


Figura 1. Variaciones de los halos de inhibición del aceite esencial de muña (*Minthostachys mollis*) hacia *Erwinia spp* a las 24 y 72h.

La tabla 5 y figura 1 muestra los resultados de la evaluación del control antibacteriano de *Erwinia spp.* mediante muña y paico, por mercado donde se ve un desarrollo masivo entre los 7 primeros discos de difusión (Laykakota) en comparación a los 7 segundos discos de difusión (Central) pero viéndose una disminución comparándolo con los últimos 7 discos de difusión (Unión y Dignidad) comparándolo a las 72h las muestras no presentaron una variación significativa (Tabla 5).

Las mediciones de los halos de los componentes bacterianos a un 10 % con lapsos de tiempo de 24 y 72 horas respectivamente, las medidas presentaron variación altamente significativa entre los promedios de sembrado, las diferencias entre promedios de halos en el mercado Laykakota presento un incremento altamente exponencial siendo su acrecentamiento superior a 4 mm de distribución demostrando la efectividad del aceite esencial en lapsos largos de tiempo en laboratorio con medios controlados la variabilidad de datos presenta: 6.3 mm/ 6.6 mm/ 5.3 mm/ 5.3 mm/ 6.5 mm/ 7 mm/ 4.7 mm , como tal considerando la diferencia max: 7 mm y la diferencia min: 4.7 mm en el mercado Laykakota.

En el mercado Central la variabilidad entre promedios fue consecuentemente similar con índices de disminución los cuales fueron: -2.3 mm/ 0.3mm/ -0.3 mm/ -0.4 mm/ 0 mm/ 0.3 mm/ -2 mm donde consideramos como la diferencia max: -2.3 mm y min: 0 mm demostrando la capacidad del aceite esencial en un tiempo determinado en el cual presento un efecto menor en consideración al mercado Laykakota debido a la alta agresividad bacteriana.

Ante las muestras del mercado Unión y Dignidad la efectividad del aceite esencial se vio un desarrollo relevante, pero en consideración con los primeros promedios fue mínima siendo las variabilidades entre los halos los siguientes: 4 mm/ 2.5 mm/ 2.2 mm/ 3.1 mm/ 5 mm/ 4.5 mm/ 2.7 mm. Presentando un max: 5 mm y un min: 2.5 mm Su capacidad fue eficiente y no se presentó disminución en comparación al mercado Central, pero siendo inferior comparándolo con el mercado Laykakota.

El aceite extraído de las hojas frescas fueron: 1,4765 y 0,92 y para las secas fueron: 1,4733 y 0,86 respectivamente (Mattos, 2012) con una gravedad específica de 0,9189 que indica la presencia de compuestos oxigenados aromáticos o alicíclicos, según lo visto por el aceite esencial de presenta efecto antibacteriano *in vitro* frente a *Streptococcus mutans*, siendo la CMI de 0.31  $\mu\text{L}/\text{mL}$  y la CMB, de 0.62  $\mu\text{L}/\text{mL}$  a 0.75  $\mu\text{L}/\text{mL}$  (Huari, 2014), en contraste algunas muestras solo son necesarias en cantidades moderadas variando su uso en 25 mg/500 $\mu\text{L}$  con 13,53 mm frente a la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 (Gallegos 2015). Siendo así la mayoría de sus compuestos en mayor concentración: isomentona 39%, pulegona 32%, isomentona 6%, timol 5%, o-cimeno, ácariofileno, elixeno entre otros. (Chaquilla 2012) variando esto con otros autores los cuales minimizan la cantidad de estos compuestos esto debido a la cantidad de muestra usada para el análisis el cual suele ser menor a la cantidad descrita por (Chaquilla 2012), reportando así un contenido de 2,14% de timol, 2,12% de acetato de timol y 0,11% de metileugenol. Estos compuestos son de tipo fenólico y posiblemente (Carhuapoma 2009), la muestra vegetal presentó un amplio historial antimicótico por ende el estudio se llevó a cabo con esta planta la cual es eficiente frente a cepas de *Candida albicans* a las concentraciones de 50 y 100% y frente a los dermatofitos: (*Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton tonsurans*) son sensibles también en los volúmenes ensayados de 5 y 50  $\mu\text{L}$  (cano 2008) datos suficientes para atribuir sus capacidades al manejo agrícola de forma ecológica.

**Tabla 6.**

Tabla 6. Evaluación del control antibacteriano del aceite esencial de paico (*Chenopodium ambrosioides*) aún 10% a 24 y 72h. llevados a cabo en la Facultad de Ciencias Biológicas UNA –Puno 2017

Mercados	Control antibacteriano de Paico							
	24 Horas				72 Horas			
	1R	2R	3R	Promedios	1R	2R	3R	Promedios
Laykakota	9	10	10.5	<b>9.8</b>	11	10	12	<b>11</b>
	10	9	9.5	<b>9.5</b>	12	9.5	11	<b>10.8</b>
	13	9	10	<b>10.6</b>	12	9	12	<b>11</b>
	8	8	10	<b>8.6</b>	11	8	12	<b>10.3</b>
	9	10	11	<b>10</b>	12	10	12	<b>11.3</b>
	10	9.5	9	<b>9.5</b>	11	11	12	<b>11.3</b>
	12	11	10	<b>11</b>	11.5	9	15	<b>11.8</b>
Central	10	9	10	<b>9.6</b>	14	13	13	<b>13.3</b>
	10	9	12	<b>10.3</b>	13	12.5	10	<b>11.8</b>
	11	9.5	13	<b>11.2</b>	13	12	12	<b>12.3</b>
	12	10	10	<b>11</b>	13	13	12	<b>12.6</b>
	11	16	12	<b>13</b>	13	12.5	12.5	<b>12.6</b>
	10.5	12	12	<b>11.5</b>	13	12.5	11	<b>12.2</b>
	13	14	11.5	<b>12.8</b>	13	13	14.5	<b>13.5</b>
Unión y dignidad	11	11	10	<b>10.6</b>	14.5	14.5	14	<b>14.3</b>
	11	10	10	<b>10.3</b>	13	12.5	13.5	<b>13</b>
	10	11.5	11	<b>10.8</b>	11.5	13	11	<b>11.8</b>
	10	13	10	<b>11</b>	13.5	12	12.5	<b>12.6</b>
	9	14	11.5	<b>11.5</b>	11.5	14	12	<b>12.5</b>
	9	12	11	<b>10.7</b>	12.5	15	13.5	<b>13.6</b>
	13	13	10.5	<b>12.2</b>	12	15	13.5	<b>13.5</b>

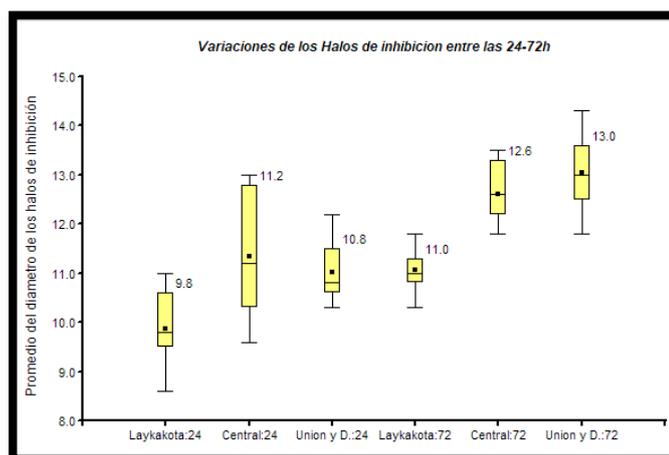


Figura 2. Variaciones de los halos de inhibición del aceite esencial de paico (*Chenopodium ambrosioides*) hacia *Erwinia spp* a las 24 y 72h.

Las mediciones de los halos producidos por paico hacia el componente bacteriano a un 10 % con lapsos de tiempo de 24 y 72 horas respectivamente, las medidas presentaron variación altamente significativa entre lapsos de 1 a 2 días de sembrado.

Las diferencias entre promedios de halos en el mercado Laykakota presento un incremento casi inexistente el cual ve su acrecentamiento superior a un 0.5 mm de distribución demostrando la poca variabilidad en la efectividad del aceite esencial en lapsos largos de tiempo en laboratorio con medios controlados la variabilidad de datos presenta: 1.2 mm/ 1.3 mm/ 0.4 mm/ 1.7 mm/ 1.3 mm/ 1.8 mm/ 0.8 mm , como tal considerando la diferencia max: 1.8 mm y la diferencia min: 0.4 mm en el mercado Laykakota.

En el mercado Central la variabilidad entre promedios fue consecuentemente similar con índices de crecimiento alto los cuales fueron: 3.7 mm/ 3.5 mm/ 1.1 mm/ 1.6 mm/ -0.4 mm/ 0.7 mm/ 0.7 mm donde consideramos como la diferencia max: 3.7 mm y min: -0.4 mm demostrando la capacidad del aceite esencial en un tiempo determinado en el cual presento un efecto mayor en consideración al mercado Laykakota debido a la alta agresividad bacteriana y al eficiente control del bactericida.

Ante las muestras del mercado Unión y Dignidad la efectividad del aceite esencial se vio un desarrollo relevante, pero en consideración con los primeros promedios fue superior siendo las variabilidades entre los halos los siguientes: 3.7 mm/ 2.7 mm/ 1 mm/ 1.6 mm/ 1 mm/ 2.9 mm/ 1.3 mm. Siendo la diferencia max: 3.7 mm y min: 1 mm Su

capacidad fue eficiente y no se presentó disminución en comparación al mercado Central, pero siendo superior comparándolo con el mercado Laykakota.

Entre las 24h de muestreo por mercado se ve un desarrollo mínimo entre los 7 primeros discos de difusión (Laykakota) en comparación a los 7 segundos discos de difusión (Central) pero viéndose un mantenimiento de las variables comparándolo con los últimos 7 discos de difusión (Unión y Dignidad) comparándolo a las 72h las muestras no presenta una variación significativa (Tabla 6).

El estudio del paico en diferentes composiciones tanto: polvo, extracto acuoso, extracto etanólico y aceite esencial (Abiodum 2010) demuestra una capacidad bactericida la cual varía según la cantidad y desarrollo de este (Alzamora 2001), al presentar alta eficiencia ante patógenos (Almeidas 2007), consideramos su uso para la mitigación de la bacteria de *Erwinia spp.* (All any 2012), en algunas muestras vegetales la cantidad de muestra necesaria para el control bacteriano no es mínima a la cantidad de un 30% (Briceño 2011) de tal forma la inserción del paico según los autores presenta mayor efectividad mediante el uso de un componente líquido, preferentemente con el uso del aceite esencial (Estrada 2012). Los tratamientos varían según el grado de desarrollo bacteriano según estudios la dosis efectiva en plazos largos de tratamiento es de: 1.0ml/kg sin presentar efectos adversos (Jaimes 2013), La investigación con *C. ambrosioides* en Nigeria reveló al menos 7 componentes diferentes de los aceites obtenidos: ascaridol,  $\alpha$ -terpinene,  $\beta$ -pinene, p-cimeno, carvacrol,  $\alpha$ -terpinil acetato (Jaramillo 2012) esto en plantas jóvenes se observó mayor concentración de  $\alpha$ -terpineno y menor de ascaridol (Castellanos 2008) lo cual precede el potencial visto en la agricultura mediante el aceite esencial para la protección de vegetales como el frijol (Denloye 2010)

**4.2.DETERMINACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA DE *Erwinia spp* OBTENIDA DE LA PAPA DE LOS MERCADOS DE LA CIUDAD DE PUNO**

Tabla 7. Carga bacteriana de *Erwinia spp* de la papa de los mercados Laykakota Central y Unión y Dignidad

Repeticiones	Zona de Muestreo		
	M. Laykakota	M. Central	M. Unión y Dignidad
	UFC/g	UFC/g	UFC/g
1R	4.12x10 <sup>2</sup>	2.68x10 <sup>2</sup>	6.8x10
2R	4.25x10 <sup>2</sup>	2.69x10 <sup>2</sup>	6.7x10
3R	4.35x10 <sup>2</sup>	2.96x10 <sup>2</sup>	6.5x10
<b>Promedios</b>	<b>4.24x10<sup>2</sup></b>	<b>2.81x10<sup>2</sup></b>	<b>6.66x10</b>

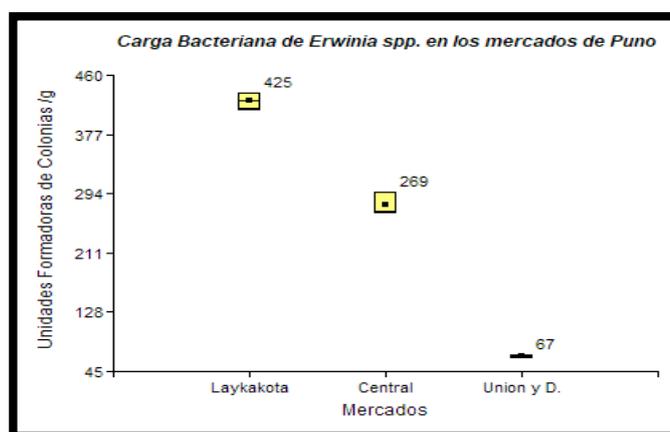


Figura 3. Carga bacteriana de *Erwinia spp.* en los mercados: Laykakota, Central y Unión y Dignidad de la ciudad de Puno 2017.

Las investigaciones sobre la determinación de la carga bacteriana en papas colectadas de los diferentes mercados fueron positivas. se recolectó directamente en los diferentes puntos de acopio de papa, evaluándose para cada punto de acopio de forma variable; es así que el mercado Laykakota tuvo un crecimiento bacteriano mucho mayor a comparación de los mercados Central y Unión y Dignidad respectivamente; evaluándose que el mercado de Laykakota tuvo un promedio de 4.24 x 10<sup>2</sup> UFC/g, esto comparado con los otros dos puntos de acopio que fueron mucho menor. El mercado central mostro

una carga bacteriana de:  $2.81 \times 10^2$  y el mercado Unión y Dignidad una carga bacteriana de  $6.66 \times 10^2$  UFC.

Durante la primera repetición tomada del mercado Laykakota demostró un desarrollo bacteriano alto en comparación a las otras dos zonas de muestreo siendo su max:  $4.35 \times 10^2$  UFC/g siendo este poco variable en comparación con el min:  $4.12 \times 10^2$  UFC/g habiendo una variabilidad de entre  $0.23 \times 10^2$  UFC/g entre las repeticiones, en contra posición las repeticiones en el mercado Central fueron mínimas a comparación del mercado Laykakota hubo una diferencia de un 40% entre mercados siendo max:  $2.96 \times 10^2$  UFC/g y presentando un min:  $2.68 \times 10^2$  UFC/g con una variación de entre  $0.28 \times 10^2$  UFC/g entre el max y el min lo cual demuestra ser menor a comparación del mercado Laykakota pero superior de manera altamente exponencial al mercado Unión y Dignidad el cual su distribución se ve mellada en su desarrollo el cual presenta los diferentes mediciones del desarrollo bacteriano de *Erwinia spp.* el cual presenta un max:  $6.8 \times 10^2$  UFC/g y un min:  $6.5 \times 10^2$  UFC/g en este caso se presentó un desarrollo muy similar entre las repeticiones casi evitando la variabilidad entre los mismos y siendo muy similares (Tabla 5).

La proliferación bacteriana en almacenes se debió a condiciones limitantes tanto en temperatura como humedad no obstante (Rakib,*et al*, 2012) explica que la proliferación es debido a una infección directa por tierra contaminada del cual (Doolotkeldieva, 2016) menciona que su desarrollo se da en 14 días, mientras tanto (Briceño, 2011) presento un conteo máximo de 108 UFC/ml lo cual demostró que en almacenes la cantidad es mucho mayor llegando hasta triplicar la cantidad en mercados como Laykakota y Central; esto considerando la temperatura del ambiente el cual en zonas cerradas se ve aumentada según (Chacón, 2011), esto varía según el tipo de especie de tubérculo infectado siendo mayor en especies poco tolerables (Doolotkeldieva, 2016) su incidencia esta correlacionada con el número de bacterias latentes por tubérculo el cual puede variar de forma significativa (Elphinston, 1987), esto debido al Ph el cual favorece el desarrollo del patógeno en una ambiente no estéril en comparación a un ambiente limpio (Guevara, 2002).

#### 4.3.EFECTIVIDAD DE LOS ACEITES ESENCIALES MEDIANTE ANTIBIOGRAMA Y PROMEDIO DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN PRODUCIDOS POR LOS ACEITES ESENCIALES HACIA LA BACTERIA.

##### Lectura de las placas e interpretación de resultados

Las lecturas del ensayo de disco difusión a diferentes horas con los aceites esenciales de las plantas (*Minthostachys mollis*) muña y (*Chenopodium ambrosioides*) paico frente a *Erwinia spp.*

Tabla 8. Medición de los halos de inhibición (mm) y porcentaje de inhibición de muña y paico frente a *Erwinia spp.* A las 24h de sembrado. Obtenidos en la Facultad de Ciencias Biológicas UNA –Puno 2017.

Tratamientos	Halos de inhibición (mm) frente <i>Erwinia spp</i>	
	Muña	Paico
	24	24
1R	11.39	10.06
2R	10.61	10.06
3R	11.06	10.89
4R	11	10.11
5R	10.22	11.50
6R	10.17	10.56
7R	12	12
<b>Promedio</b>	<b>10.92</b>	<b>10.74</b>
<b>%</b>	<b>50.4</b>	<b>49.6</b>

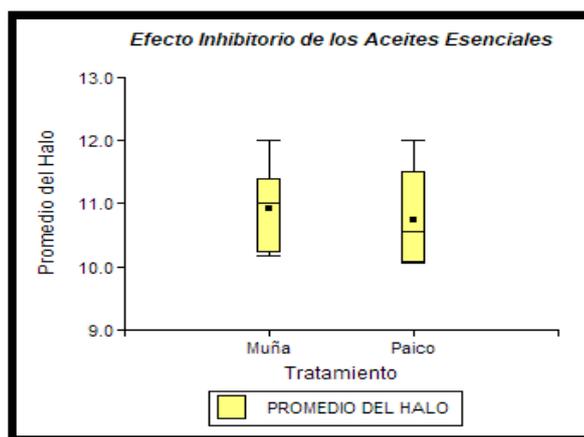


Figura 4. Distribución de datos. Inexistente diferencia significativa del efecto antibacteriano del aceite esencial de muña a las 24 h, comparado con el aceite esencial de paico, obtenidos en la Facultad de Ciencias Biológicas UNA – Puno

Los resultados dados presentaron el control positivo del aceite esencial de (*Minthostachys mollis*) muña obtuvo un promedio de diámetro de halo de inhibición de 13.87 mm, mientras para los discos con aceite esencial de (*Chenopodium ambrosioides*) paico. frente a *Erwinia spp*, se encontraron diámetro de halos de inhibición de 12.27mm, mostrando así, que la muña de acuerdo a la cantidad del aceite equivale a 10  $\mu$ L aproximadamente, formo un halo de inhibición de 13.87mm, cuyo porcentaje de inhibición con respecto al control (*Chenopodium ambrosioides*) paico es del 53%, en tanto (*Chenopodium ambrosioides*) paico, formó un halo de 12.27 mm, con un porcentaje de inhibición del 47% (Tabla 8). Esto demuestra una baja tolerancia hacia la bacteria con el factor tiempo lo cual nos lleva a pensar que debido al tiempo las muestras mitigan su efecto antibacteriano lo cual demuestra una variante en el desarrollo de halos a las 24h viendo su funcionabilidad en un lapso de tiempo menos en cantidades iguales de aceite esencial de desarrollo teniendo ello en cuenta se desarrolló otra evaluación a un tiempo menor de 72h (Tabla 8).

Para analizar estadísticamente las diferencias observadas se procedió con el análisis de varianza (ANOVA) respectivo: Los dos tratamientos realizados en la investigación resultaron no tener diferencia estadística significativa ( $F_c=0.23$ ;  $g_l=13$ ;  $p<0.6427$ ), demostrando que los tratamientos con aceite esencial de muña y paico fue diferente y posee efecto antibacteriano en cepas de *Erwinia spp*. Teniendo en cuenta la significancia de la prueba de análisis de varianza, la prueba de Tukey resultó que los tratamientos no son significativamente diferentes entre sí a las 24 horas de sembrado, con medidas

significativamente iguales como se ve en la (Figura 9). de lo anteriormente señalado, se acepta la hipótesis planteada, puesto que los aceites esenciales de las plantas de muña y paico si presentan potencial como controladores, siendo su eficacia las 24h mayor en la muña y menor en el paico esto debido a si poca agresividad en control hacia la bacteria Fito patógena de *Erwinia spp.*

La mayor concentración se por el efecto inhibitorio; es así que la concentración 450  $\mu\text{g/mL}$  produjo en promedio 22,48 mm de halo de inhibición, mientras que para una concentración de 4,5  $\mu\text{g/mL}$  fue de 11,99 mm (Carhuapoma, 2009) presentado una disminucion a comparación de la evaluación donde fue mayor con menor cantidad de muestra. La capacidad de estos aislados para suprimir el crecimiento de bacterias Fito patógenas, los convierten en un potencial agente de control biológico para reducir la infección por pudrición blanda de tubérculos de papa en el período de almacenamiento (Doolotkeldieva, 2016) demostró como el conteo de células viables de Ea se redujo significativamente al utilizar 0.055% (p/v) mediante el uso del aceite esencial de orégano de  $9.6 \pm 0.26$  en el control a  $-1 1.5 \pm 0.80 \log \text{UFCmL}$  (Coto, 1995), se deben investigar aspectos como la influencia de la nutrición (especialmente Ca, B, Zn) y el estrés hídrico sobre la incidencia de la bacteriosis, la epidemiología de la enfermedad y la deterrninación de un método de muestreo de frutos para su detección a nivel de la planta, entre otros.

Tabla 9. Medición de los halos de inhibición (mm) y porcentaje de inhibición de muña y paico frente a *Erwinia spp.* A las 72h de sembrado. Obtenidos en la Facultad de Ciencias Biológicas UNA –Puno.

Tratamientos	Halos de Inhibición (mm) frente <i>Erwinia spp</i>	
	Muña	Paico
	72	72
1R	14.06	12.89
2R	13.87	11.89
3R	13.44	11.72
4R	13.83	11.89
5R	14.06	12.17
6R	14.11	12.39
7R	13.78	12.94
<b>Promedio</b>	<b>13.87</b>	<b>12.27</b>
<b>%</b>	<b>53</b>	<b>47</b>

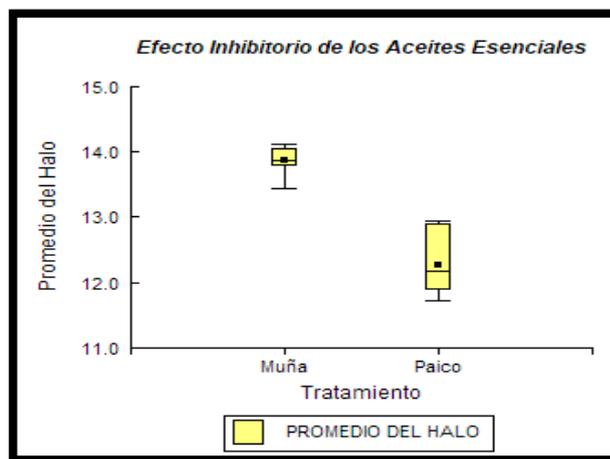


Figura 5. Diferencia estadística significativa del efecto antibacteriano del aceite esencial de muña a las 72 h, comparado con el aceite esencial de paico, obtenidos en la Facultad de Ciencias Biológicas UNA – Puno 2017.

Dado el análisis de resultados se procedió a la medición, los diámetros de los halos de inhibición alrededor de cada disco a las 72 horas de incubación. Las lecturas del ensayo del disco de difusión a las 24 horas con los aceites esenciales de las plantas (*Minthostachys mollis*) muña y (*Chenopodium ambrosioides*) paico frente a *Erwinia spp.*, presentaron resultados los cuales fueron: el control positivo del aceite esencial de (*Minthostachys mollis*) muña obtuvo un promedio de diámetro de halo de inhibición de 13.87 mm, mientras para los discos con aceite esencial de (*Chenopodium ambrosioides*) paico. frente a *Erwinia spp.*, se encontraron diámetro de halos de inhibición de 12.27 mm, mostrando así, que la muña de acuerdo a la cantidad del aceite equivale a 10  $\mu$ L aproximadamente, formo un halo de inhibición de 13.87 mm, cuyo porcentaje de inhibición con respecto al control (*Chenopodium ambrosioides*) paico es del 50.4%, en tanto (*Chenopodium ambrosioides*) paico, formó un halo de 12.27 mm, con un porcentaje de inhibición del 49.6%. Por tanto, la diferencia porcentual es casi nula, mostrando similitud en el diámetro de los halos obtenidos (Tabla 9).

Los 2 tratamientos realizados en la investigación resultaron con diferencia estadística significativa ( $F_c= 61.3$ ;  $gl=13$ ;  $p<0.0001$ ), demostrando que al menos uno de los tratamientos con aceite esencial de muña y paico fue diferente y posee efecto antibacteriano en cepas de *Erwinia spp.* Teniendo en cuenta la significancia de la prueba de análisis de varianza, con la prueba de Tukey resultó que el mejor tratamiento fue el de muña (aceite esencial con 10 $\mu$ L). Donde la dispersión de datos fue mayor en la muestra de paico en consideración a la muña la cual se presentó en menor medida como se observa en la (Figura 8). de lo anteriormente señalado, se acepta la hipótesis planteada, puesto que los aceites esenciales de las plantas de muña y paico si presentan potencial como controladores, siendo su eficacia las 72h mayor en la muña y menor en el paico esto debido a si poca agresividad en control hacia la bacteria fitopatogeno de *Erwinia spp.*(Tabla 9).

El aceite esencial de la (*Minthostachys mollis*) demostró una alta actividad inhibitoria en las primeras 72h de infección hacia el agente Fito patógeno. En comparación a las medidas tomadas (Brand 2012), el rendimiento del aceite esencial de “muña” por arrastre con vapor de agua y mediante el análisis de cromatografía de gases, demostró una mayor

proporción de pulegona, luego mentona y limoneno, esto nos dio las bases para considerar a la pulegona en este estudio como el principio activo mayoritario (Cano, 2008), en comparación con la efectividad del aceite de muña a 72h fue menor, esto debido a la variación en el uso de la muestra que fue altamente menor a la concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  siendo la cantidad necesaria solo 10 $\mu\text{l}$  para demostrar que hubo efectividad en *Erwinia spp.* (Jaramillo 2012),

## V. CONCLUSIONES

- La eficiencia del control antibacteriano mediante el uso de muña (*Minthostachys mollis*) a 24 y 72h respectivamente, fue altamente eficiente siendo los valores: Laykakota 10 mm, 15.3 mm, Central 14.6 mm y 12.8 mm, Unión y Dignidad 12.5 mm y 15.2 mm, presentando mayores diferencias a las 72h frente al paico (*Chenopodium ambrosioides*) presentando datos similares a 24h, demostrando un desarrollo óptimo de: Laykakota 11 mm, 11.8 mm, Central 12.8 mm y 13.5 mm, Unión y Dignidad 12.2 mm y 14.5 mm, siendo menor en consideración al uso de muña el cual fue por poco un tratamiento mejor.
- En el desarrollo bacteriano de *Erwinia spp*, el mercado con mayor proliferación fue el mercado Laykakota el cual presento una cantidad de:  $4.24 \times 10^2$  UFC/g, el cual duplico y hasta quintuplico en cantidad a los otros dos puntos de acopio que fueron mucho menor. El mercado central presento una carga bacteriana de:  $2.81 \times 10^2$  y el mercado Unión y Dignidad una carga bacteriana de  $6.66 \times 10^1$  UFC.
- El control positivo de aceite esencial de (*Minthostachys mollis*) muña obtuvo un promedio de halo de inhibición de 13.87 mm obteniendo un porcentaje de un 53%, en contraposición los discos con (*Chenopodium ambrosioides*) paico formó un halo de 12.27 mm, con un porcentaje de inhibición del 47%. en el desarrollo de halos a las 24 y 72h viendo su funcionabilidad antibacteriana.

## VI. RECOMENDACIONES

- Evaluar e identificar el componente químico principal de los agentes antibacterianos para ver su interacción hacia otros agentes infecciosos en el área agrícola, desarrollando de forma exponencial el cuidado ambiental.
- Consideramos mayores pruebas con el aceite esencial de muña y paico en campo, mediante el uso de un área piloto, para observar el desarrollo de la susceptibilidad antimicrobiana ante un tiempo prolongado en un área *ex situ*.
- Buscar la efectividad de control de los aceites esenciales de muña y paico hacia *Erwinia spp.* a condiciones de *ex situ* mediante el uso de especies nativas preferentemente de la variedad Imilla, mediante la aplicación del tratamiento durante los procesos de aporque de tierra, para evitar la diseminación bacteriana tomado en la zona agrícola de Jalluhuaya,

## VI. REFERENCIAS

- Abiodun. (2010). Chemical composition of three traditional vegetables in nigerian. de departament of food science and technology, osun state polytechnic, iree, osun state, Nigeria. Pakistan Journals of Nutrition 9(9). Pag; 858-860.
- Agrios G. N. (1999). Fitopatología. segunda edición, quinta reimpression. ed. limusa – Grupo, Noriega Editores. México. 838 p.
- Agrios, G. N. (2005). Fitopatología, 2da edición. México, Limusa, 952 p.
- Alzamora, *Et al.* (2001). Medicina tradicional en el Perú: Actividad antimicrobiana in vitro de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas anales de la Facultad De Medicina, Vol. 62, Núm. 2: pp. 156 – 161.
- Brand, *et al.* (2014). Actividad antiviral in vitro de aceites esenciales obtenidos de plantas de la familia verbenaceae y labiatae sobre herpesvirus humano vitae, Universidad de Antioquia Medellín, Colombia, Vol. 21, Núm. 1, Pp. S91-S92.
- Cano. (2008). Actividad antimicótica in vitro y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña) rev Peru Med Exp salud publica.pag 298- 301; 25(3).
- Castellanos y Rubén. (2008). Epazote (*Chenopodium Ambrosioides*). Revisión a sus características morfológicas, actividad farmacológica, y biogénesis de su principal principio activo, ascaridol boletín latinoamericano y del caribe de plantas medicinales y aromáticas, vol. 7, núm. 1, pp. 39 Universidad de Santiago de Chile Santiago, Chile.
- Castro. (2012). Comparación de los compuestos terpénicos del aceite esencial de muña (*Minthostachys mollis*). Extraídos de las hojas frescas y secas, Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias – Huancayo.
- Cardoza, Yuliet (2008). Caracterización de aislamientos de *Erwinia spp.* causantes de pudrición blanda en papa (*Solanum tuberosum l*) Fitosanidad, vol. 12, núm. 2, junio, p. 129 Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal La Habana, Cuba.

- Carhuapoma, S.L (2009). Facultad de Farmacia y Bioquímica, Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb “Ruyaq Muña” Facultad de Farmacia y Bioquímica; 12(2): pp. 83-89.
- Cerutti (2004). Introducción a la obtención de aceite esencial de limón, invenio junio Pg:170- 180.
- Chacón, *et al.*, (2011). Manejo de *Erwinia amylovora* con aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri*) y estudio de resistencia a estreptomicina en arboles de manzano cv. ‘*Golden delicious*’ revista Mexicana de Fitopatología, vol. 29, núm. 2, pp. 119-132.
- Chaquilla (2012). Composición química y contenido de fenoles totales en aceites esenciales de muña *Minthostachys setosa* Briq Epl y anís *Pimpinella anisum* L, Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Químicas, Circuito Universitario s/n, Nuevo Campus Universitario 31125 Chihuahua, Chih. México.
- Chavarria (2006). El uso de microorganismos benéficos: biofertilizantes y biocontroladores, Instituto Nacional de Innovacion y Transferencia en Tecnología Agropecuaria – Costa Rica.
- Diaz (2005). Determinación de la actividad “in vitro” de *Minthostachys mollis* Griseb (Muña) frente a bacterias orales de importancia estomatológica, UNSM. Facultad de Odontología. Lima – Perú.
- Dominguez (2004). Etnobotánica Aplicada: Extractos naturales utilizados en agricultura ecológica; Estación Experimental Agraria de Carcaixent – IVIA.
- Doolotkeldieva, *et al.* (2016). Biological control of erwinia carotovora ssp. carotovora by streptomyces species plant protection department, Kyrgyz-Turkish Manas University, Bishkek City, Kyrgyzstan. Advances in Microbiology, published 24 February, pp. 104-114.
- Elphinstone (1987). La pudrición blanda y la pierna negra de la papa *Erwinia spp*, Boletín de Información Técnica N°21, CIP B3 E4. S (c,1), pp 18.
- Estrada, Saúl; Reyes, Claudia; Fasio, Armando; Molar, Raúl, Zequera, Isidro, Rangel, Dolores (2000). Marchitez Bacteriana en Chile Bell Causada por *Erwinia carotovora* subsp *carotovora* Revista Mexicana de Fitopatología, vol. 18, núm. 2, julio-

- diciembre, pp. 120- 124 Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. Texcoco, México.
- Estrada, *et al.* (2012). Estudio de la eficacia del “paico” (*Chenopodium ambrosioides*) como antihelmíntico, en especímenes silvestres mantenidos en cautiverio en el hogar de paso de fauna silvestre de la Universidad de la Amazonía. Universidad de la Amazonía. Grupo De Investigación en fauna silvestre y semillero de investigación en fauna silvestre – Ankoré.
- Franco (2004). Patogenicidad y virulencia de aislamientos de erwinia sp. en semillas de papa importada. Coronado Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 No. 514 E/ 5ª. B Y 5ª. F, Gaveta 634, 11300, Playa, Ciudad de la Habana.
- Gadano AB, *et al.*, (2006). Argentine folk medicine: genotoxic effects of chenopodiaceae family. *j ethnopharmacol*;103(3):246-51.
- Gallegos (2015). Actividad antibacteriana in vitro de colutorios elaborados con aceites esenciales de; *luma chequen* A.Gray “Arrayán” Y *Minthostachys Spicata* “Yuraq Muña” frente a la cepa de *Streptococcus Mutans Atcc 25175*, Universidad- Nacional De- San Antonio Abad Del Cusco, Facultad de Ciencias Químicas, Físicas, Matemáticas, Farmacia e Informática, Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica.
- Gallo (2011). Actividad antimicrobiana de aceite esencial de tomillo (*Thymus Vulgaris*), Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental, Fundación Universidad de las Americas Puebla. Eshacienda Sta. Catarina Mártir S/N Cholula, Puebla, PC 72810 Mexico.
- Gómez (2008). Epazote (*Chenopodium Ambrosioides*). Revisión a sus características morfológicas, actividad farmacológica, y biogénesis de su principal principio activo, ascaridol boletín latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas, Universidad de Santiago de Chile Santiago, Chile, Vol. 7, Núm. 1, Pp. 39.
- García (2000). Especies y sub-especies de *Erwinia*, causantes de pudrición blanda y pierna negra en la papa cultivada, en el estado Mérida- Venezuela, Laboratorio de Fitopatología. Revista Forestal Venezuela. 44(1), p.107-114, FONAIAP-Merida.
- Jaramillo C, Duarte (2012). Bioactividad del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* colombiano Revista Cubana de Plantas Medicinales; 17(1)54-64.

- León (2009). Estudio De la extracción y determinación de la composición química del aceite esencial de paico (*Chenopodium ambrosioides L.*), Universidad Nacional del Callao, Vicerrectorado de Investigación Editorial Universitaria, ISSN N°2070-089X, Volumen 12 N°1.
- Mattos (2012). Comparación de los compuestos terpéticos del Aceite Esencial de (*Minthostachys Mollis*) extraídos de las hojas frescas y secas, Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias, Universidad Nacional del Centro del Perú. Huancayo.
- Merck (2012). Pulegona. Citado el 11 de octubre del 2017. Disponible en: [http://www.merckmillipore.com/r-%2Bpulegona/MDA\\_CHEM818665/spanish/p\\_MwKb.s1LKrgAAAEWpeEfVhTl](http://www.merckmillipore.com/r-%2Bpulegona/MDA_CHEM818665/spanish/p_MwKb.s1LKrgAAAEWpeEfVhTl)
- Nissen M, Carrión S, Ciampi P, Costa L, Fuentes P, y Schöbitz T (2008). Biocontrol de *Erwinia Carotovora* en Cala (*Zantedeschia Sp*), Instituto de Producción y Sanidad Vegetal. Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Instituto de Ingeniería Agraria Y Suelos. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile, AGRO SUR 36 (2) 59-70.
- OCW (2017). Open Course Ware. Citado el 11 de noviembre del 2017. Disponible en: <http://ocw.upm.es/>
- OPS (2013). Buenas Prácticas de la OMS para Laboratorios de Microbiología Farmacéutica, Red Panamericana de Armonización de la Reglamentación Farmacéutica, Red PARF Documento Técnico N° 1.
- Plazas (2011). Curso de aceites esenciales: Química y proceso de producción, Proyecto uso sostenible de los recursos vegetales del Distrito capital, Centro de Investigación y Desarrollo Científico, Bogota, octubre.
- PUBCHEM (2010). Alpha-Terpinene. Citado el 16 de marzo del 2018. Disponible en :<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/com>.
- Rakib A, Al-Ani, Adhab and Haidar H. Nawar (2012). Antibacterial activity of clove, cinnamon, and datura extracts against *Erwinia carotovora* subsp. atroseptica causative agent of black stem and soft rot on potato, Plant Protection Department, College of Agriculture, University of Baghdad, Baghdad, Iraq. Journal of Medicinal Plants Research Vol. 6(10), pp. 1891-1895.

Torres, Ana M, Ricciardi, Gabriela A. L. - Agrelo de Nassiff, Ada E. (2003). Examen del contenido en ascaridol del aceite esencial de (*Chenopodium ambrosioides L.*). paico Universidad Nacional del Nordeste Comunicaciones Científicas y Tecnológicas Resumen: E-066.

Zuluaga G, Correal C. (2002). Medicinas tradicionales: introducción al estudio de los sistemas tradicionales de salud y su relación con la medicina moderna. Cuadernos del Observatorio de la Vida.

## VII. ANEXOS

## ANEXO A

a)



b)



Figura 6. a) Destiladora de aceite esencial de Muña y Paico mediante el método de arrastre por vapor, b) Aceite esencial de Paico extraído mediante un Embudo de Decantación. Facultad de Ingeniería Agroindustrial, UNA-Puno. durante septiembre a octubre 2017.



Figura 7. Sembrado de *Erwinia spp* y preparación del disco de difusión con aceites esenciales. Realizado en la Facultad Ciencias Biológicas UNA-Puno, durante septiembre- octubre de 2017

## ANEXO B



Figura 8. Desarrollo bacteriano de *Erwinia spp* por mercados en placa mediante el método de vertido en placa. Realizado en la Facultad Ciencias Biológicas UNA-Puno, durante septiembre-octubre de 2017.

a)



b)



Figura 9. a: Efecto y sensibilidad de *Erwinia spp* frente al aceite esencial de (*Minthostachys mollis*) Muña, b) Desarrollo de Halos de Inhibición en *Erwinia spp* frente al aceite esencial de (*Chenopodium ambrosioides*) Paico. Realizado en la Facultad Ciencias Biológicas UNA-Puno, durante septiembre-octubre de 2017.

## ANEXO C



Figura 10. Muestra de papa infectada empaquetada durante 24h para la obtención de la cepa de *Erwinia spp* Realizado en la Facultad Ciencias Biológicas UNA-Puno, durante septiembre-octubre de 2017.

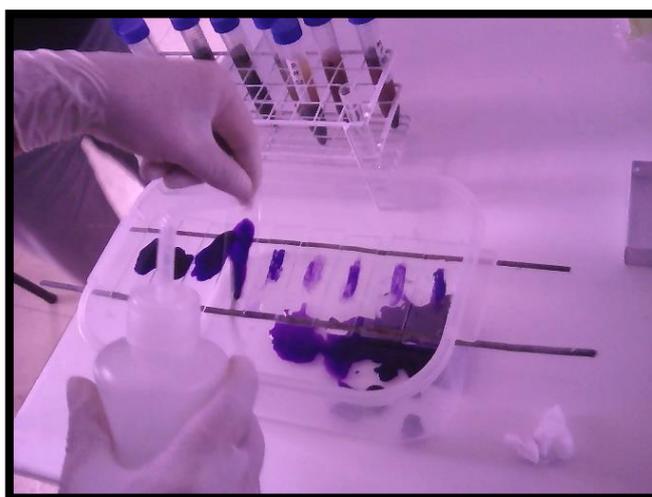


Figura 11. Identificación de la bacteria mediante Tinción de Gram Realizado en la Facultad Ciencias Biológicas UNA-Puno, durante septiembre- octubre de 2017