



**FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y URBANISMO
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL Y COMERCIO EXTERIOR**

TESIS

**“OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE MOLLE
(*Schinus molle* L.) Y SU EVALUACIÓN
ANTIFÚNGICA SOBRE *Colletotrichum* spp. IN
VITRO”**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO
AGROINDUSTRIAL Y COMERCIO EXTERIOR**

Autor:

Bach. Bautista Toro Alex Mait

Asesor:

MSc. Solano Cornejo Miguel Ángel

Línea de Investigación:

Infraestructura, Tecnología y Medio Ambiente

Pimentel – Perú

2020

**“OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE MOLLE (*Schinus molle* L.)
Y SU EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA SOBRE *Colletotrichum* spp. IN
VITRO”**

APROBACIÓN DE LA TESIS

PRESENTADO POR:

Bach. Bautista Toro Alex Mait
Autor

APROBADO POR:

Mg. Aurora Vigo Edward Florencio
Presidente

Ing. Símpalo López Walter Bernardo
Secretario

MSc. Solano Cornejo Miguel Ángel
Vocal

DEDICATORIA

Dedico esta investigación a mis abuelos que siempre me han dado sus consejos para seguir adelante, a mis hermanas para que sigan el camino del estudio y tengan una formación profesional pero principalmente se la dedico a mis padres quienes confiaron plenamente en mí y me brindaron todo su apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios por darme fuerzas para cumplir una meta muy importante y bendecirme al haber puesto muchas personas buenas en mi camino, guiarme y protegerme en todo momento.

A mi abuela Lucinda por cuidarme, ayudarme y motivarme constantemente durante todos los días de mi vida; gracias por siempre.

A papá y mamá por su sacrificio para darme educación y calidad de vida.

A mi novia por apoyarme de manera incondicional.

A toda mi familia por creer en mí y darme consejos para tomar buenas decisiones.

“OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE MOLLE (*Schinus molle* L.) Y SU EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA SOBRE *Colletotrichum* spp. IN VITRO”

"OBTAINING MOLLE ESSENTIAL OIL (*Schinus molle* L.) AND IT'S ANTIFUNGAL EVALUATION ON *Colletotrichum* spp. IN VITRO"

Alex Mait Bautista Toro¹

Resumen

*El propósito de esta investigación fue obtener aceite esencial de molle (*Schinus molle* L.) y evaluar su actividad antifúngica sobre *Colletotrichum* spp. in vitro. Para la obtención del AE se realizó el método de extracción de arrastre de vapor, se pesaron muestras de 100 gr de fruto de molle con 7% y 13% de humedad que fueron trituradas de forma grosera y procesadas a 15, 30, 45 y 60 minutos de tiempo de extracción, obteniendo aceite esencial con rendimientos promedio de 3,68% para frutos con 7% de humedad y 2,44% para frutos con 13% de humedad. Para la evaluación inhibitoria del crecimiento de *Colletotrichum* spp. se evaluó concentraciones de 250, 500 y 750mg/mL de aceite esencial del fruto de molle diluido en agua destilada con Tween 20 al 1%. Se comprobó el efecto inhibitorio del aceite esencial del fruto de molle sobre *Colletotrichum* spp. a diferentes concentraciones, donde 250 y 500mg/mL de AE no tuvieron diferencia significativa en comparación a 750mg/mL cual presentó 37% de inhibición.*

Palabras claves: *Aceite esencial, fruto de molle, antifúngica, *Colletotrichum* spp.*

¹Adscrito a la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial y Comercio Exterior, Pregrado, Universidad Señor de Sipán, Pimentel, Perú, email: btoroalex@crece.uss.edu.pe

Abstract

The purpose of this research was to obtain molle essential oil (Schinus molle L.) and evaluate its antifungal activity on Colletotrichum spp. in vitro In order to obtain the AE, the steam drag extraction method was carried out, samples of 100 gr of molle fruit with 7% and 13% moisture were weighed, which were grossly crushed and processed at 15, 30, 45 and 60 minutes of extraction time, obtaining essential oil with average yields of 3.68% for fruits with 7% humidity and 2.44% for fruits with 13% humidity. For the inhibitory evaluation of the growth of Colletotrichum spp. concentrations of 250, 500 and 750mg / mL of essential oil of the molle fruit diluted in distilled water with 1% Tween 20 were evaluated. The inhibitory effect of the essential oil of the molle fruit on Colletotrichum spp. at different concentrations, where 250 and 500mg / mL of AE had no significant difference compared to 750mg / mL which showed 37% inhibition.

Keywords: *Essential oil, molle fruit, antifungal, Colletotrichum spp.*

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
Resumen.....	v
Abstract.....	vi
I. INTRODUCCIÓN	11
1.1. Situación problemática.....	13
1.2. Antecedentes de Estudio	14
1.3. Teorías relacionadas al tema.....	17
1.3.1. <i>Colletotrichum</i> spp.....	17
1.3.2. Molle (<i>Schinus molle</i> L.).....	20
1.3.3. Aceite esencial de <i>Schinus Molle</i> L.....	22
1.3.4. Aceites esenciales.....	24
1.3.5. Métodos para obtención de aceites esencial	27
1.4. Formulación del problema	30
1.5. Hipótesis	30
1.6. Objetivos.....	31
1.6.1. Objetivo General	31
1.6.2. Objetivos Específicos	31
1.7. Justificación e importancia del estudio.....	31
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
2.1. Tipo y Diseño de Investigación.	32
2.2. Variables – Operacionalización	33
2.3. Población y Muestra	35

2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad.	35
2.4.1. Métodos para la caracterización físico- química del fruto de molle .	35
2.4.2. Método para extracción de aceite esencial y su caracterización físico-química.....	37
2.4.3. Método para la evaluación in vitro de la actividad antifúngica del aceite esencial del fruto de molle sobre <i>Colletotrichum</i> spp.	40
2.5. Procedimientos de análisis de datos	41
2.6. Criterios Éticos.....	42
2.7. Criterios de Rigor Científico.	42
III. RESULTADOS.....	42
3.1. Resultados en Tablas y Figuras	42
3.1.1. Caracterización físico-química del fruto de molle.....	42
3.1.2. Extracción y caracterización del aceite esencial del fruto de molle .	44
3.1.3. Evaluación in vitro de la actividad antifúngica del aceite esencial del fruto de molle sobre <i>Colletotrichum</i> spp.....	47
3.2. Discusión de Resultados	50
IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	52
4.1. Conclusiones	52
4.2. Recomendaciones	53
REFERENCIAS.....	54
ANEXOS	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies del género <i>Colletotrichum</i> spp. que causan antracnosis.	18
Tabla 2. Contenido porcentual de aceite esencial en <i>Schinus molle</i> L.	22
Tabla 3. Grupos funcionales de las moléculas constituyentes de los A.E.	24
Tabla 4. Caracterización físico-química del fruto de molle.	33
Tabla 5. Extracción del aceite esencial del fruto de molle.	34
Tabla 6. Caracterización físico-química del aceite esencial del fruto de molle.	34
Tabla 7. Evaluación in vitro de la actividad antifúngica del aceite esencial del fruto de molle sobre <i>Colletotrichum</i> spp.	35
Tabla 8. Valores promedio de altura y diámetro del fruto de molle.	43
Tabla 9. Características físico-químicas del fruto de molle.	43
Tabla 10. Rendimiento de AE del fruto de molle por arrastre de vapor.	44
Tabla 11. ANVA del Rendimiento de aceite esencial del fruto de molle.	45
Tabla 12. Precisión y exactitud del análisis del rendimiento de aceite esencial del fruto de molle.	45
Tabla 13. Características físico-químicas del aceite esencial del fruto de molle... ..	47
Tabla 14. Porcentaje de Inhibición del Crecimiento de <i>Colletotrichum</i> spp. frente a 250, 500 y 750mg/ml. de aceite esencial del fruto de molle.	48
Tabla 15. ANVA para determinar efecto inhibitorio de aceite esencial de molle sobre <i>Colletotrichum</i> spp.	49
Tabla 16. Prueba (TUKEY $p < 0.05$) para determinar efecto inhibitorio de aceite esencial de molle sobre <i>Colletotrichum</i> spp.	49
Tabla 17. Prueba de comparación de medias TUKEY	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura molecular de los componentes volátiles más comunes del aceite esencial de molle.	23
Figura 2. Principales áreas de aplicación de los aceites esenciales.	26
Figura 3. Destilación de arrastre con vapor.	27
Figura 4. Hidrodestilación.	28
Figura 5. Proceso de extracción de A.E. del fruto de molle.	38
Figura 6. Rendimiento de AE del fruto de molle con 7% de humedad.	46
Figura 7. Rendimiento de AE del fruto de molle con 13% de humedad.	46

I. INTRODUCCIÓN

El uso de los aceites esenciales y su importancia económica e industrial, cada vez se está haciendo más notoria (Sánchez, 2006). Actualmente se está observando un creciente interés en el estudio de productos de origen natural para el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos con propiedades antimicrobianas, antifúngicas y antioxidantes que pueden ser usados en la industria alimentaria (Teixeira et al., 2012), es por ello que los aceites esenciales en la última década han llamado la atención de la comunidad de investigación científica (Dominguez y Santos 2019).

Schinus molle L., comúnmente conocido como pimienta, árbol perteneciente a la familia de las Anacardiaceae, nativo de las regiones subtropicales de América del Sur (Taylor 2005). El resultado de algunos estudios, han revelado un alto contenido de aceite en el fruto de *Schinus molle*, con un agradable aroma picante y un efecto antimicrobiano y antifúngico (Aranda et al., 2011) y (Marongiu et al., 2004). Su aceite esencial extraído se ha caracterizado principalmente por la presencia de mirceno, a-felandreno, b-felandreno y limoneno (Huaman et al., 2004).

Colletotrichum spp. agente causal de la Antracnosis, enfermedad de importancia económica en postcosecha, ya que afecta a frutas maduras durante la cosecha y/o almacenamiento, dependiendo de la especificidad del huésped y las condiciones ambientales. En general, la susceptibilidad de la fruta aumenta en asociación con cambios fisiológicos en la firmeza de la fruta, el pH, la composición de la pared celular, los azúcares solubles y los metabolitos secundarios producidos durante la maduración de la fruta. (Sutapa, Nuckles, & Archbold, 2017).

La antracnosis se muestra a través de manchas redondas acuosas y de color oscuro cuando se encuentra en estado avanzado. Además, provoca un daño superficial, la lesión ataca el fruto deteriorando la pulpa, ocasionando que los frutos echen a perderse y desprenderse de la planta con facilidad (Suzuki y col., 2010; Intra y col., 2011). (Citado por Aguilar, Navarro, Sánchez, Meneses, & Ávila, 2013).

Como consecuencia se reducen el rendimiento de las cosechas con frutos de baja calidad (Rebouca, 2002; Bruwer et al., 2006), lo que conlleva a una disminución del precio de la fruta, tanto en el mercado nacional como en el internacional (Arauz, 2000; Rodríguez et al., 2002). (Citado por Valdés et al., 2017)

Uno de los métodos de control más usados han sido los agroquímicos utilizados para el control de esta enfermedad tuvieron un desempeño importante en el crecimiento de la producción agraria. Sin embargo, el constante uso de agroquímicos ha generado incremento en los costos de producción, resistencia por parte de algunos microorganismos, presencia de residuos pesticidas en los alimentos y, en consecuencia, perjudican la salud del consumidor. (Alzate et al., 2009).

Un método que ha llamado la atención es la aplicación de aceites esenciales como agente control de enfermedades en precosecha y postcosecha. Los AE son una mezcla compleja de compuestos volátiles que se obtienen de las plantas, y son conocidos por poseer diversos beneficios, como su capacidad para resistir a plagas y enfermedades; algunos AE, así como sus constituyentes, han demostrado poder antibacteriano y antifúngico. (Alzate, Mier, Afanador, Durango, & García, 2009).

Perú es conocido como uno de los países que poseen una rica biodiversidad a nivel mundial, teniendo especies vegetales que se pueden aprovechar de forma sostenible, una opción es el árbol nativo *Schinus molle L.*, que cuenta con aplicaciones medicinales, del cual se puede extraer aceite esencial con potencial antimicrobiano y antifúngico, habiendo demostrado un amplio espectro (Chirino et al., 2001; Zeng Yueqin, 2006). (Citado por Llanos, 2012).

1.1. Situación problemática

Colletotrichum spp es uno de los géneros de fitopatógenos más importantes en todo el mundo, infecta a más de 1000 especies de plantas, entre ellas cultivos tropicales y subtropicales de importancia económica, como el mango, cítricos, papaya, palto entre otros (Boonruang et al., 2017). Para el control de *Colletotrichum* spp, generalmente se usan fungicidas como el benomilo, carbendazim, mancozeb y procloraz (Zhou et al., 2016). Asimismo, el uso mixto y rotativo de fungicidas con diferentes mecanismos de acción, son usados para reducir el desarrollo de resistencia y adquirir un mayor control de la enfermedad (Xu et al., 2014). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que *Colletotrichum* spp puede desarrollar altos o medianos niveles de resistencia frente a numerosos fungicidas e ingredientes activos, incluyendo benzimidazoles (Chun et al., 2010), ditiocarbamatos y azoles (Xu et al., 2014), es por ello que la identificación y uso de nuevos productos para el control *Colletotrichum* spp es necesario para el desarrollo de nuevas estrategias a los fungicidas tradicionales.

Así mismo, Couey et al. (1984) y Berrera-Necha et al. (2008), mencionan que los tratamientos con agua caliente en combinación con fungicidas sintéticos generalmente se usan para reducir la presencia de enfermedades postcosecha en diversas frutas y verduras. (Citado por Maqbool et al., 2011)

Ali y Mahmud (2008), y Ali et. al. (2011) señalan que las propiedades organolépticas como sensoriales y su contenido nutricional se ven afectado por los tratamientos térmicos y el constante uso de fungicidas sintéticos, los cuales ocasionan el desarrollo de cepas del patógeno resistente a los fungicidas. (Citado por Maqbool et al., 2011)

Ante ello, Abo-Elyousr (2017), mencionan que los fungicidas químicos, como el imazalil, es usado comúnmente para el controlar de la antracnosis en bananos durante el período postcosecha a fin de prolongar la vida útil de la fruta fresca.

Aunque el control de los patógenos postcosecha actualmente todavía depende principalmente de la aplicación de fungicidas, debido al corto tiempo entre el tratamiento y el consumo, existen fuertes demandas públicas y científicas contra el uso de fungicidas químicos para prevenir impactos cancerígenos, toxicidad residual, ecológicos, la contaminación y particularmente el desarrollo de resistencia fungicida. (Citado por Vilaplana R., Pazmiño L., Chamorro S., 2018).

1.2. Antecedentes de Estudio

Según Martins, Arantes, Candeias, Tinoco, Cruz-Morais (2013), en su estudio denominado “*Propiedades antioxidantes, antimicrobianas y toxicológicas de los aceites esenciales de Schinus molle L.*”, establecieron que:

El objeto de esta investigación fue la de evaluar las propiedades antimicrobianas y antioxidantes del aceite esencial de *Schinus molle*, su composición química y evaluación de su toxicidad. Las propiedades antioxidantes se determinaron utilizando el método de radicales libres 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) y β -caroteno / ácido linoleico y mediante el método de difusión en disco de agar se evaluó las propiedades antimicrobianas y el ensayo de concentración mínima inhibitoria, también se evaluó toxicidad en la salina de *Artemia* y toxicidad aguda con cribado conductual en ratones. En los aceites esenciales de hojas y frutas (AE) se encontraron compuestos dominantes como hidrocarburos monoterpénicos, a saber, α -*phellandrene*, β -*phellandrene*, β -*myrcene*, *limonene* y α -*pinene*. Los AE mostraron una baja actividad antioxidante de eliminación por el método del radical libre DPPH y una mayor actividad por el método del β -caroteno / ácido linoleico. Además, se observó actividades antimicrobianas de AE para Gram+, Gram-, hongos y bacterias patógenas de descomposición en alimentos. Mayor toxicidad mostraron para *Artemia salina* y menor toxicidad en ratones.

El resultado del AE de hojas y frutos de *Schinus molle* demostraron propiedades antioxidantes y antimicrobianas, mostrándose como un potencial agente control en las industrias alimentarias o farmacéuticas.

Según Guédez, Cañizalez, Avendaño, Scorza, Castillo, Olivar, Méndez y Sánchez (2014), titulado “*Actividad antifúngica del aceite esencial de naranja (Citrus sinensis L.) sobre hongos postcosecha en frutos de lechosa (Carica papaya L.)*”, establecieron que:

La acción antifúngica del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis L.*) fue evaluada frente a *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium spp.*, *Penicillium sp.*, *Rhizopus stolonifer* y *Aspergillus flavus*, en medio PDA con un diseño completamente al azar. Los resultados indicaron la existencia de inhibición *in vitro* del aceite esencial de naranja (AEN), superando el 80% de inhibición a una concentración de AE de 1%, y 100% en concentraciones de 2,5 y 5% ($p < 0,05$). Usado como recubrimiento a concentraciones de 2,5 y 5%, reduce la presencia de lesiones en los mismos, sin diferencia significativa ($p < 0,05$), con igual comportamiento *in vitro* e *in vivo*. El AEN puede ser una alternativa eficaz, para el control natural de hongos postcosecha, disminuyendo el volumen de pérdidas de frutas de exportación.

Según Rivadeneira y Álvarez (2015), titulado “*Aceite esencial de Schinus molle L. (molle) como potencial antimicrobiano sobre Streptococcus mutans. Estudio in vitro*” estableció que:

Para el estudio *in vitro* utilizaron 20 placas petri con Agar sangre, se sembró con el método de difusión con disco por concentración del AE de *S. molle* de 100 y 50%, también se usó el residuo de vapor de condensación del aceite, usándose como control positivo gluconato de clorhexidina y como control negativo ADE, el efecto antimicrobiano de los tratamientos en estudio se evaluó a las 24 y 72 h de exposición.

Los resultados demostraron efecto antimicrobiano contra la cepa de *S. mutans* (ATCC 25175), además del residuo del aceite de *S. molle*, en comparación con el gluconato de clorhexidina al 0,12% efectuó mayor inhibición, disminuyendo su efecto a las 72 h, mientras que las concentraciones al 100 y 50% potenciaron su efecto en un 0,8% a las 72 h. comprobándose el potencial efecto antimicrobiano del AE de *S. molle*, en cuanto al gluconato de clorhexidina, demostró ser cualitativamente similar al aceite.

Según Cordero, Anaya y Romero (2017), titulado “*Caracterización química y evaluación de la actividad antifúngica del aceite esencial foliar de Lippia alba contra Colletotrichum gloeosporioides*”, estableció que:

En este trabajo de investigación caracterizaron y evaluaron el potencial *in vitro* del aceite esencial de *Lippia alba* frente a *C. gloeosporioides*. Se usó mediante el método de hidrodestilación asistida por microondas (MWHD) a partir de las hojas, obteniéndose el AE y logrando identificar sus compuestos mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS). Las pruebas *in vitro* se realizaron usando 4 concentraciones (500, 1000, 3000 y 10000 ppm de AE), asimismo, se utilizó un control positivo, Benomil 1 g/L, un control negativo, acetona y un testigo absoluto; el poder inhibitorio del aceite se midió con el porcentaje de índice antifúngico (%I. A). El mayor componente encontrado en el aceite esencial fue el citral (34.62 a 40.03%), siendo además el mayor % I. A, la concentración de 10000 ppm (97.8%), muy parecida a la del Benomil (100%). Lo anterior demostraría su posible uso como fungicida biológico para controlar a *C. gloeosporioides*.

Según Vilaplana, Pazmiño y Valencia, en el año 2018, titulado “*Control de antracnosis causada por Colletotrichum musae en plátano orgánico postcosecha por aceite de tomillo*” estableció que:

La antracnosis en los bananos orgánicos es una enfermedad postcosecha agresiva y difícil de controlar.

Se han estudiado los aceites esenciales para incorporarlos en el manejo integrado de plagas y para reducir los fungicidas sintéticos durante el período postcosecha. Los ensayos in vitro mostraron que el aceite de tomillo era el mejor aceite esencial para controlar el crecimiento micelial de *C. musae*. Este aceite esencial se probó in vivo debido a su efecto fungicida.

Los resultados mostraron que, después del almacenamiento y la vida útil a 20 ° C, la inhibición de la severidad de *C. musae* en fruta tratada con 500 μ LL-1 de aceite de tomillo (30.8%) fue mayor ($p < 0.05$) que con otros tratamientos. Además, 500 μ LL-1 de aceite de tomillo redujo la pérdida de peso, el color y la firmeza retenidos, y ralentizó los cambios de los parámetros químicos en los plátanos orgánicos durante el almacenamiento. Después del período postcosecha, los panelistas no detectaron olor a aceite de tomillo, y la apariencia general también fue mejor, cuando se usa aceite de tomillo, que en fruta no tratada. Estos resultados sugieren que el aceite de tomillo puede usarse potencialmente para controlar la antracnosis en plátanos orgánicos durante el período postcosecha, sin un efecto negativo en su calidad fisicoquímica y sensorial.

1.3. Teorías relacionadas al tema

1.3.1. *Colletotrichum* spp.

1.3.1.1. El género *Colletotrichum* spp.

Según Bailey y Jeger (1992), este género corresponde a los hongos filamentosos que causan los daños más significativos en la economía agrícola, afectando la cosecha de frutas, cereales y vegetales, en el trópico, subtrópico y regiones templadas. (Citado por Cano M., 2006).

Tabla 1. Especies del género *Colletotrichum* spp. que causan antracnosis.

Especies	Fruto o planta afectada	Enfermedad
<i>C. acutatum</i>	Aguacate, almendra, manzana, pera, fresa y cítricos	Antracnosis
<i>C. fragarie</i>	Fresa y guanábana	Antracnosis
<i>C. gloesporioides</i>	Mango, fresa, almendra, cítricos, fresa, manzana	Antracnosis
<i>C. musae</i>	Plátano	Antracnosis y podredumbre de la corona
<i>C. nicotianae</i>	Tabaco	Antracnosis

Fuente: Bailey y Jeger, 1992; Freeman et al., 1998.

Los métodos tradicionales para identificar las especies de *Colletotrichum* spp. se basan en la diferenciación morfológica, tales como el color de las colonias, tamaño de la conidia, temperatura óptima, rango de crecimiento, presencia o ausencia de setas, etc. (Smith y Black, 1990; Bailey y Jeger, 1992).

Freeman et al, (1998), contextualiza que la infección de *Colletotrichum* spp a los cultivos puede ocurrir tanto en la etapa de pre y postcosecha, en la primera ocasiona daño en el desarrollo de la fruta en el campo, y en la segunda, favorece el desarrollo de lesiones durante el almacenamiento de los frutos.

Una vez que el hongo ha infectado al fruto en el campo, puede permanecer latente hasta que se presenten las condiciones óptimas durante la etapa postcosecha, que permitan el desarrollo de la infección. (Citado por Cano M., 2006).

1.3.1.2. *Colletotrichum* spp. en las frutas.

La antracnosis es una enfermedad del trópico que afecta los tejidos de los frutos en estado de madurez, se distribuye en todas las zonas de producción, y es una de las más importantes por las pérdidas que ocasiona (Slabaugh y Grove, 1982). La infección de los frutos puede ocurrir en estado maduro e inmaduro. Todos los cultivos son susceptibles, aunque difieren en el grado de susceptibilidad (Shillingford y Sinclair, 1977).

En la fruta madura, las lesiones son de color café oscuras o negras en forma de rombo, y el desarrollo de manchas marrón, son cubiertas con las conidias del patógeno de color naranja-salmón. La podredumbre puede desarrollarse en la punta y en la pulpa, razón por la cual es común en las frutas que no tienen un almacenamiento adecuado y más aún si se encuentran sin refrigeración (Galán, 1990).

El desarrollo de síntomas en la fruta durante la infección inicial, se presenta antes de la cosecha a través de heridas en la cáscara producidas en el campo, quedando latentes hasta la fase de maduración, pero también puede ocurrir la infección tras la recolección como consecuencia de lesiones producidas por la manipulación o piquetes de insectos (Galán, 1990).

Las medidas de control consisten en una cuidadosa manipulación de la fruta en pre cosecha y postcosecha, recomendándose además la refrigeración rápida del fruto tras la cosecha y el apropiado uso de los fungicidas sistémicos en la postcosecha (Ploetz, 1998).

1.3.2. Molle (*Schinus molle* L.)

1.3.2.1. Aspectos generales

Schinus Molle o “Árbol de Molle”, tiene una raíz esencial, extensa y ligera, cuenta con un tronco y corteza rugosa de color oscuro que puede ser pardo o marrón, cabe recalcar que es una madera persistente y maciza, puede lograr una altura de 15 metros.

Este árbol posee el beneficio de mantener hojas vivas durante todo el año, de esta forma logra convertirse en un perennifolio, este término procede del latín *perennis*, duradero, y de *folium*, hoja; también tiene ramas blandas, suspendidas y divididas. Sus frutos poseen flores pequeñas y crecen en forma de racimos color rosado, con una semilla por cada fruto de un máximo de diámetro de 9 mm. (Llanos, 2012).

1.3.2.2. Utilidad

A) Reforestación - Medio Ambiente: El árbol de Molle, logra establecerse en diversas zonas, ya que es de uso decorativo, por su copa redondeada y abierta, proporcionando sombra de forma moderada.

Según el Sistema Nacional de Información Forestal de México en el 2010, esta planta abarcaba las zonas del sur de Europa, California y el Valle de México.

Otro de los beneficios de esta planta, es el fortalecimiento de la tierra en donde se desarrolla, y por ende la reparación de suelos degradados, logrando también ser una defensa contra las corrientes de viento.

B) Uso etnomedicinal:

Según Palacios (1993), el uso de los frutos, hojas y demás derivados del “Schinus Molle”, han sido usadas por los nativos peruanos, de forma medicinal, logrando resultados sorprendentes.

Yelasco – Negueruela et. Al. (1995) registró que en la Ciudad del Cuzco, se continuaron realizando trabajos con esta planta, tanto de forma interna como externa.

Esta planta ha sobrepasado fronteras con sus efectos, tanto así que en México y Argentina, la emulsión de goma logra ser un producto efectivo para problemas de la vista, y bronquios. (Viturro et al., 2010)

1.3.2.3. Composición fitoquímica del Molle

Schinus molle evidencia el contenido de flavonoides, saponinas, taninos, esteroides, terpenos, alcaloides, gomas, resinas y aceites esenciales mediante análisis fitoquímico. (Chirino et al., 2001) (Citado por Llanos, 2012).

Data de 1976 en donde se recoge una porción líquida ácida del fruto, formado por resina disuelta en aceite volátil; y es donde al aislarse los compuestos químicos de terpenos, se encuentran dos tipos de ácido, que son: isomasticadienonalico e isomasticadienoico.

Dos años más tarde, en 1978, se obtiene el 3-epi-isomasticadienolálico, en el que se descubre la existencia de laccasa, enzima polifenoloxidasas, en la que se basa un posible valor quimiotaxonómico, tres años después de ello, o sea, en 1981, la enzima se purificó y caracterizó. (Viturro et al., 2010).

1.3.3. Aceite esencial de *Schinus Molle L.*

La compleja composición química de *Schinus molle* depende de cada fracción de árbol estudiada. Zeng Yueqin (2006), indicó que la variabilidad se le acredita a dos factores: el primero los de intrínsecos de quimiotipo, refiriéndose al reino y parte analizada de la planta, entre otros; y los de naturaleza extrínsecos, basados en temperatura, procedimiento post-cosecha, etcétera.

Tabla 2. Contenido porcentual de aceite esencial en *Schinus molle L.*

Lugar de estudio	Parte de la planta	Contenido de Aceite esencial (%)
Kramer (1957) Univ. de Nevada, EE.UU.	Hojas	Hasta 2%
Dikshit et al. (1986) Inst. Central de Plantas Medicinales y Aromáticas, India.	Hojas frescas	Hasta 0,8 %
	Hojas secas	Hasta 2%
Zeng Yueqin (2006) Univ. de Valencia, España.	Frutos	De 3 a 5%
	Hojas	De 0,2 a 1%
Sistema Nacional de Información Forestal de México (2010).	Frutos	Hasta 5%
	Hojas	Hasta 2%
Vituro et al. (2010) Proyecto CYTED IV.20, Pontificia Universidad Católica Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.	Hojas secas	De 1 a 3,04%
	Frutos frescos	De 2,6 a 5,6%
	Frutos secos	De 5,3 a 5,6%

Fuente: Sistema Nacional de Información Forestal de México (2010), y Vituro et al. (2010).

1.3.3.1. Metabolitos secundarios volátiles reconocidos.

De las hojas de *Schinus Molle*, se obtiene aceite esencial, el mismo que en 1986, según Dikshit et al. descubrió compuestos orgánicos naturales, tales como: β - mirceno, α -felandreno, β -felandreno, p-cimeno, β -cariofileno y D-limoneno.

Más adelante, Zeng Yueqin (2006) halló que el aceite esencial del fruto, mostraba compuestos predominantes a: α - y β -felandreno, β -espatuleno, α - y β -pineno D-limoneno, *o*-etilfenol mirceno, silvestreno, perillaldehído, carvacrol, canfeno, *p*-cimol y *p*-cimeno.

Vituro et al. (2010) menciona que diversos países de América Latina, compartían elementos frecuentes, entre ellos: α - felandreno, β -felandreno, α -pineno, β -pineno, limoneno, *p*-cimeno y mirceno.

En la siguiente figura, se detallan las estructuras moleculares de los mismos.

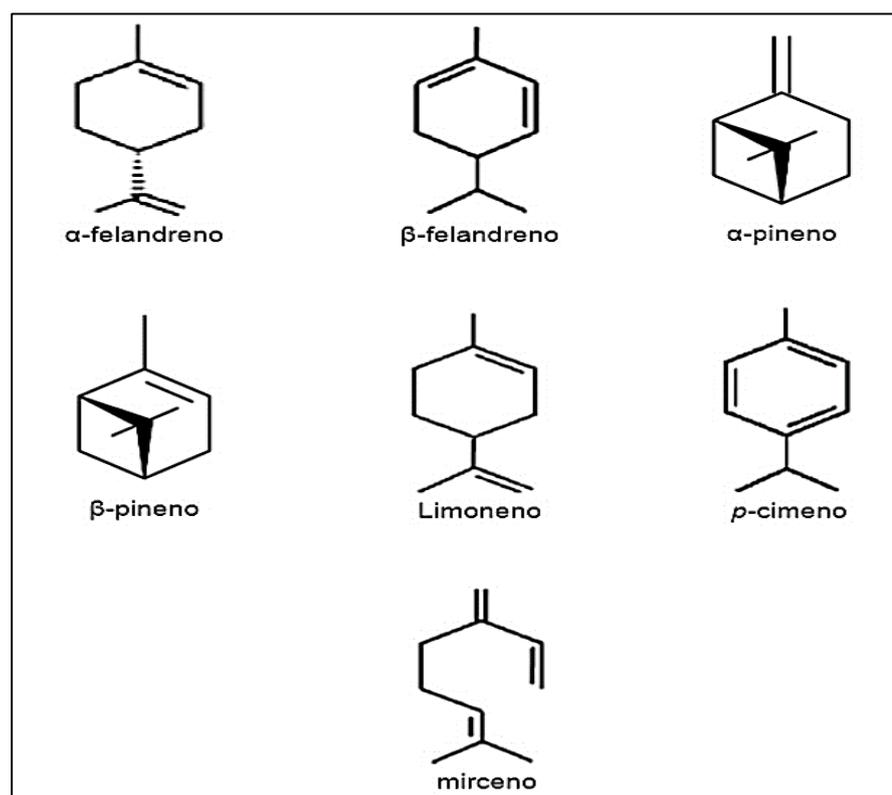


Figura 1. Estructura molecular de los componentes volátiles más comunes del aceite esencial de molle.

Fuente: Nobre et al. (2000), Palá (2002), Quiminet (2009).

1.3.4. Aceites esenciales.

1.3.4.1. Concepto.

En 1999, Hammer et al., puntualiza que los aceites esenciales, manifiestan significativas posesiones que combaten los microorganismos in vitro, específicamente ante los gérmenes, y otros transmitidos por alimentos, este mismo concepto lo cita Martins et al., en 2013.

Otro concepto sobre los AE, lo da Martínez en el 2003, en donde recalca que este tipo de aceites, son porciones líquidas y a la vez son garantes del perfume de las plantas, básicos para la industria cosmética, en el rubro de alimentos y fármacos, en este último los saborizantes.

1.3.4.2. Composición química.

Tabla 3. Grupos funcionales de las moléculas constituyentes de los A.E.

Grupo Funcional	Naturaleza química	Ejemplo
Hidrocarburos	Terpénicos	Limoneno, α -terpineno
	Aromáticos	Cumeno, p-cimeno
	Sesquiterpénicos	Trans- β -cariofileno
Aldehídos	Monoterpénicos	Citral, Nonanal,
	Alifáticos	octadecanal
	Aromáticos	Cinamaldehído
Alcoholes	Monoterpénicos	Geraniol, citronelol
	Alifáticos	3-decanol
	Sesquiterpénicos	Espatulenol, cedrol
Fenoles	Aromáticos	Alcohol bencílico
	Aromáticos	Timol, carvacrol

Fuente: Díaz, 2007.

1.3.4.3. Propiedades físico-químicas.

En 2001, Pauli se refirió al peso molecular de los aceites esenciales el cual se restringe a 250 g/mol, ya que logra que las sustancias se vuelvan volátiles.

Cabe recalcar que al ser líquidos y encontrarse a temperatura ambiente, logran una destilación que los diferencia de los aceites fijos.

En su mayoría logran una reacción química en la que dos o más moléculas se combinan, esto ocurre con alcoholes terpénicos insaturados, haciendo cambios en color, viscosidad y olor; y los tipos de aceites pueden ser: éter de petróleo, cloroformo, benzol o alcohol absoluto.

Su densidad varía de 0.84 a 1.18 g/cm³, en su totalidad, logran ser menos pesada que el agua. Los aceites esenciales contienen índice de refracción elevada, y en su mayoría tiene actividad óptica. (Pérez, 2006)

1.3.4.4. Propiedades biológicas.

Los aceites esenciales, siempre han estado presentes, sobretodo en el ámbito culinario, tanto como principales como aromatizantes; y saborizantes, en este último también era utilizado como conservantes de distintos productos, evitando daño de bacterias u otros.

Vargas y Bottia, 2008, precisaron que para complacer al consumidor, se ha creído conveniente disminuir el uso de conservantes sintéticos, y sustituirlos por los de origen natural.

1.3.4.5. Áreas de aplicación

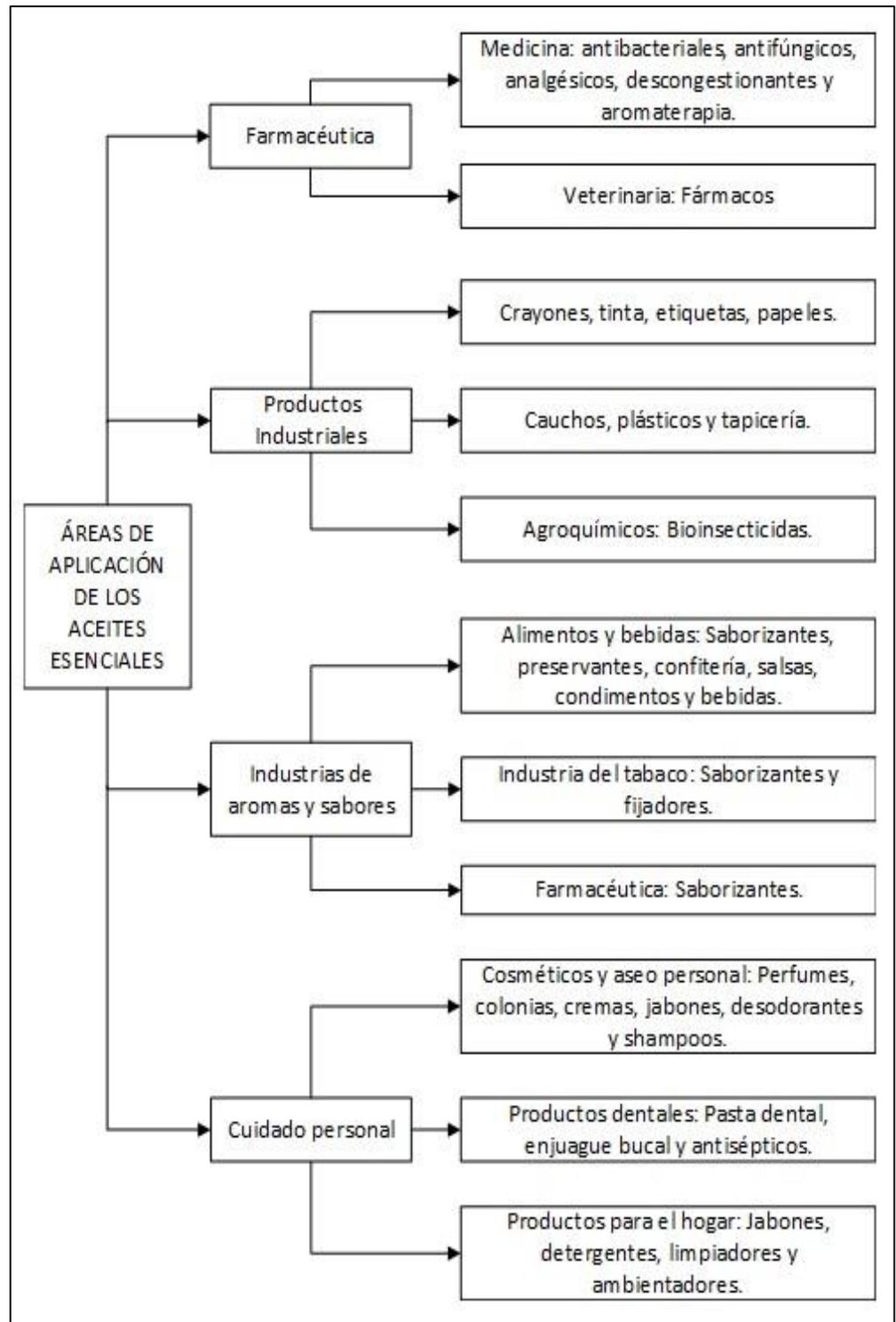


Figura 2. Principales áreas de aplicación de los aceites esenciales.

Fuente: Vargas y Bottia (2008), Díaz (2007).

1.3.5. Métodos para obtención de aceites esencial

1.3.5.1. Destilación con arrastre de vapor

La destilación por arrastre de vapor, es la que tiene mayor manejo en el mercado industrial, debido a su forma de extraer la mayoría de aceites esenciales, sobretodo en el rubro de perfumería. Cabe recalcar que se obtiene un aceite puro, debido a que no necesita tecnología sofisticada.

Este tipo de método logra una mezcla de líquidos, logrando una vaporización de temperaturas, logrando calentar la mezcla y llevarlas al punto exacto de ebullición, en donde finalmente llegan a separarse en un dispositivo.

La elección del procedimiento dependerá del volumen y/o características del aceite (volatilidad, punto de ebullición de los componentes, etc.), así como de la estructura de la planta de la cual se piensa extraer el aceite esencial. (Díaz, 2007).



Figura 3. Destilación de arrastre con vapor.

Fuente: <https://goo.gl/images/XXwDT3>.

1.3.5.2. Hidrodestilación.

Este método logra separar una sustancia volátil por evaporación y seguido de ello por condensación, y lo realiza en flores u otras partes de la planta por medio de vapor de agua. El procedimiento del mismo empieza cuando el vapor empieza a arrastrar el aceite de la parte usada en el proceso.

Logra destilarse porque el punto de ebullición supera el nivel de agua, y por ende, puede ser destilada.

Esta división, logra darse por las densidades y a la inmiscibilidad, en donde la fase orgánica, llega a ser menos densa y flota sobre la acuosa, cabe recalcar que puede haber excepciones.

Fase orgánica: Es quien contiene el aceite esencial.

Fase acuosa: Es considerada la parte que contiene un porcentaje de esencia, un ejemplo es: el agua de rosas, ya que contienen una proporción de agua y aceite.

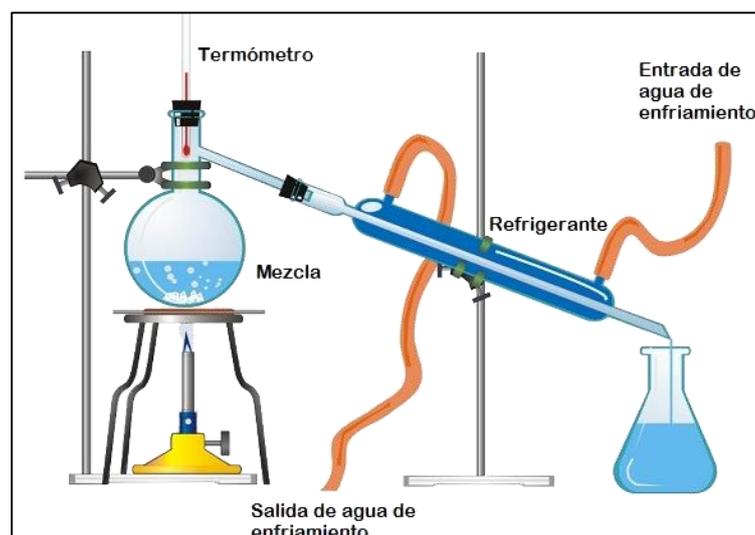


Figura 4. Hidrodestilación.

Fuente: <https://goo.gl/images/T2xLsm>.

1.3.5.3. Extracción con disolventes.

En esta metodología de extracción, la muestra es secada y molida, para luego ser puesta sobre disolventes orgánicos (alcohol, cloroformo, entre otros). Estos disolventes solubilizan no solo la esencia, sino también extraen sustancias como las grasas y ceras presentes en la muestra, lográndose obtener una oleorresina o extracto impuro. Es muy utilizada en laboratorio ya que es muy costosa su aplicación a nivel industrial, debido al costo de los disolventes, y porque además se obtienen extractos contaminadas; otra limitante de su uso a nivel industrial es el riesgo de explosión e incendio por la alta presencia de disolventes orgánicos volátiles (Martínez, 2003).

Las metodologías más usados en laboratorio son la de extracción por reflujo y Soxhlet (Thompson et al., 2004; Proestos y Komaitis, 2006). Sin embargo hay otro método de extracción por disolventes, usado en laboratorio, que es el macerado o extracción alcohólica, aquí la materia orgánica es puesta sobre soluciones de alcohol por un determinado tiempo, aquí los aceites esenciales son extraídos evaporando el alcohol, usando para eso rota-evaporadores (Chua et al., 2008).

Este método de extracción tiene importantes desventajas, sin embargo requiere periodos de tiempo relativamente largos, y los aceites obtenidos tienen presencia de compuesto traza, debido a los disolventes utilizados; lo que limita su uso en la industria alimentaria, la industria cosmética o farmacéutica (Khajeh et al., 2005; Vagi et al., 2005; Guan et al., 2007).

1.3.5.4. Extracción por fluidos supercríticos.

En esta metodología, el material vegetal a usar, es cortado en trozos pequeños, licuado o molido, y es empacado dentro de una cámara de acero inoxidable, en la que se hace circular a través de la muestra bióxido de carbono líquido, permitiendo que las esencias sean solubilizadas y arrastradas, actuando el líquido como solvente, el cual es eliminado por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente, obteniendo al final una esencia pura.

Este procedimiento tiene muchas ventajas, como la obtención de extractos de alto rendimiento, compatible ecológicamente, la eliminación del solvente e fácil, permitiendo además poder reciclarlo, por otro lado el uso de bajas temperaturas durante la extracción no modifican químicamente a los compuestos del aceite, sin embargo, el equipo a utilizar es costoso, ya que requiere de bombas y sistemas de extracción que soporten alta presión (Martínez, 2001).

1.4. Formulación del problema

¿Cuál será el efecto in vitro del crecimiento de *Colletotrichum* spp. aplicando aceite esencial de molle (*Schinus molle* L.) obtenido por arrastre de vapor?

1.5. Hipótesis

Hi: Aplicando aceite esencial del fruto de molle tendrá efecto inhibitorio sobre *Colletotrichum* spp. in vitro.

Ho: Aplicando aceite esencial del fruto de molle NO tendrá efecto inhibitorio sobre *Colletotrichum* spp. in vitro.

1.6. Objetivos

1.6.1. Objetivo General

Obtener aceite esencial de molle (*Schinus molle* L.) y evaluar su efecto antifúngico in vitro sobre *Colletotrichum* spp.

1.6.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar físico-químicamente el fruto de molle.
- Extraer y caracterizar físico-químicamente el aceite esencial del fruto de molle.
- Evaluar in vitro la actividad antifúngica del aceite esencial del fruto de molle sobre *Colletotrichum* spp.

1.7. Justificación e importancia del estudio

Sivakumar y Bautista (2014); Guerra et al., (2015) indican que, en la última década, el requerimiento del consumidor de fruta de alta calidad con pocos residuos de pesticidas ha inducido a los países a reforzar las estrictas regulaciones de importación y exportación con respecto a los límites máximos de estos residuos en la porción comestible de la fruta. (Citado por Vilaplana et. al, 2018)

Debido a estos requisitos para las alternativas naturales a los compuestos sintéticos asociados con la conservación de alimentos, han llevado a la búsqueda de antimicrobianos derivados naturalmente. Los aceites esenciales extraídos de plantas aromáticas y medicinales tienen un amplio antimicrobiano y espectro antifúngico (Perdones et al., 2012; Khalili et al., 2015; Campos-Requena et al., 2017), que podría ser una solución ecológica y económica (Gilles et al., 2010) y su uso cumple con las expectativas de los consumidores para fruta segura y nutricional (Munhuweyi et al., 2017). (Citado por Vilaplana et. al, 2018)

Colletotrichum spp reconocido fitopatógeno que afecta a muchos cultivos tropicales y subtropicales de importancia económica, como el mango, cítricos, papaya, palto entre otros (Boonruang et al., 2017). Para su control, generalmente se usan fungicidas como el benomilo, carbendazim, mancozeb y procloraz (Zhou et al., 2016). Por otro lado, para reducir el desarrollo de resistencia y adquirir un mayor control se viene haciendo uso de compuestos mixtos y/o aplicación rotativa de fungicidas con diferentes mecanismos de acción (Xu et al., 2014). Sin embargo, en algunas investigaciones se han demostrado que *Colletotrichum* spp puede desarrollar diferentes niveles de resistencia frente a numerosos fungicidas e ingredientes activos, como, benzimidazoles (Chun et al., 2010), ditiocarbamatos y azoles (Xu et al., 2014); lo que genera que se desarrollen trabajos de investigación que permitan la identificación y uso de nuevos productos y estrategias para el control *Colletotrichum* spp en reemplazo a los fungicidas de síntesis química.

Es por ello que, y teniendo en cuenta lo descrito arriba, es que el presente trabajo de investigación, busca poder extraer aceite esencial de molle y determinar su potencial antifúngico sobre *Colletotrichum* spp y poder generar una nueva alternativa para el control de este hongo fitopatógeno de importancia económica para la agroindustria de la región Lambayeque.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Tipo y Diseño de Investigación.

2.1.1. Tipo de Investigación.

Según el manejo de variables es *Cuantitativa* y Experimental, estableciéndose las relaciones causa/efecto, confirmando la veracidad o falsedad de las hipótesis establecidas dentro de investigación. Además, es descriptivo, porque controla las variables que intervienen en el proceso de extracción y obtención de un producto con las características deseadas, para la posterior prueba de inhibición in vitro sobre el crecimiento de *Colletotrichum* spp.

2.1.2. Diseño de Investigación.

El diseño que permitirá la evaluación y efecto de las variables independientes en estudio, será mediante un Diseño Completamente al Azar (DCA).

Para determinar el efecto de las variables en estudio se aplicará un ANVA y según el P valor < 0.05, obtenido, se utilizará la prueba de comparación de medias (Prueba de TUKEY) para determinar la similitud estadística entre los tratamientos en estudio.

2.2. Variables – Operacionalización

Tabla 4. Caracterización físico-química del fruto de molle.

	Variables	Dimensión	Indicador	Técnica e instrumento de recolección de datos
V.I	Frutos de molle	100	gr.	Gravimetría
	Tamaño	-	mm.	Medición
	Humedad	-	%	Método AOAC, 2005
	Proteína	-	%	Método AOAC, 2005
V.D	Grasa	-	%	Método AOAC, 2005
	Fibra	-	%	Método AOAC, 2005
	Ceniza	-	%	Método AOAC, 2005
	Carbohidratos	-	%	Método AOAC, 2005

Fuente: *Elaboración Propia.*

Tabla 5. Extracción del aceite esencial del fruto de molle.

	Variables	Dimensión	Indicador	Técnica e instrumento de recolección de datos
V.I.	%Humedad del fruto de molle	7, 13	%	Análisis de Humedad
	Tiempo de extracción	15, 30, 45, 60	min.	Cronometría
V.D.	Rendimiento	-	%	N.T.P. 319.081

Fuente: Elaboración Propia.

Tabla 6. Caracterización físico-química del aceite esencial del fruto de molle.

	Variables	Dimensión	Indicador	Técnica e instrumento de recolección de datos
V.I.	Aceite Esencial del Fruto de Molle	50	mL	Volumetría
V.D.	Densidad	-	g/cm ³	N.T.P. 319.081
	Índice de Refracción	-	-	N.T.P. 319.075
	Índice de Acidez	-	mg KOH/g	N.T.P. 319.085
	Solubilidad en etanol	-	%	N.T.P. 319.084

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 7. Evaluación in vitro de la actividad antifúngica del aceite esencial del fruto de molle sobre *Colletotrichum* spp.

	Variables	Dimensión	Indicador	Técnica e instrumento de recolección de datos
V.I	Concentración de A.E.	250, 500, 750	mg/mL	Volumetría
V.D	Halo de Inhibición	-	mm (diámetro)	PIC

Fuente: Elaboración Propia.

2.3. Población y Muestra

2.3.1. Población

Frutos de molle recolectado de la provincia Chiclayo, distrito Chiclayo.

2.3.2. Muestra

5 kg de frutos de molle.

2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad

2.4.1. Métodos para la caracterización físico- química del fruto de molle

2.4.1.1. Tamaño.

Para determinar el diámetro promedio del fruto de molle, se procedió a tomar una muestra significativa de frutos y mediante el uso de un vernier digital se midió el diámetro de cada fruto, obteniéndose un dato en milímetros.

2.4.1.2. Determinación de Humedad (Método AOAC, 2005).

Se desarrolló pesando en una balanza digital una muestra en fresca y luego se colocó en estufa por 3 días, pasado el tiempo en la estufa, la muestra seca fue pesada, obteniéndose la cantidad de humedad, teniendo en cuenta la diferencia de peso entre la base húmeda frente a la base seca.

2.4.1.3. Determinación de Proteína (Método AOAC, 2005).

Se utilizó el método micro Kjeldahl, el resultado obtenido, determina la cantidad de proteína en bruto que tiene la materia analizada.

2.4.1.4. Determinación de Grasa (Método AOAC, 2005).

Por extracción semi-continua una cantidad de disolvente rodeó la muestra y se calentó hasta su ebullición; dentro del Soxhlet el líquido condensado ha sido sinfoneado regresando al matraz de ebullición y así se pudo medir la grasa, teniendo como valor la pérdida de peso de la muestra.

2.4.1.5. Determinación de Fibra (Método AOAC, 2005).

La muestra que fue deshidratada y exenta de grasa se trató con ácido sulfúrico y luego con hidróxido sódico, ambos en ebullición. El residuo se calcinó a 550 °C, la desigualdad de residuo-cenizas permitió obtener el valor de fibra bruta.

2.4.1.6. Determinación de Ceniza (Método AOAC, 2005).

Para obtener los valores de ceniza, el agua y los componentes volátiles se evaporaron y las sustancias orgánicas quedaron incineradas se usó una mufla capaz soportar T° hasta 600°C., siendo estos pesados para poder determinar la cantidad de cenizas de los frutos de molle.

2.4.1.7. Determinación de Carbohidratos (Método AOAC, 2005).

El extracto no nitrogenado (carbohidratos) se obtuvo, de la diferencia del valor de 100 y la suma de los porcentajes de agua, proteína bruta, cenizas, extracto etéreo y fibra bruta.

2.4.2. Método para extracción de aceite esencial y su caracterización físico-química.

2.4.2.1. Acondicionamiento de la materia prima.

- **Desgrane y molienda:** Se realizó un descarte de tallos, ramas y cualquier tipo de impureza presente, también se separó los frutos que estaban infestados por plagas. Luego se trituró los frutos con un molino manual de acero inoxidable.
- **Pesado y codificado:** Se pesó y codificó por duplicado muestras de 100 gr. de frutos de molle que se utilizó en cada corrida de extracción.

2.4.2.2. Extracción de aceite esencial por arrastre con vapor

- **Destilación:** Se utilizó un equipo de destilación llamado “alambique”, en éste se colocó la materia prima previamente acondicionada. El proceso de extracción fue 60 min.

- **Decantado:** Se vertió el destilado en una pera de decantación y se dejó reposar hasta visualizar la separación de fases: agua – aceite, luego se decantó.
- **Envasado:** Finalmente toda la muestra se colocó en tubos de ensayos, cada uno rotulados para evaluar rendimientos.
- **Almacenamiento:** Las muestras de aceite esencial extraído se almacenó en un lugar limpio y seco.

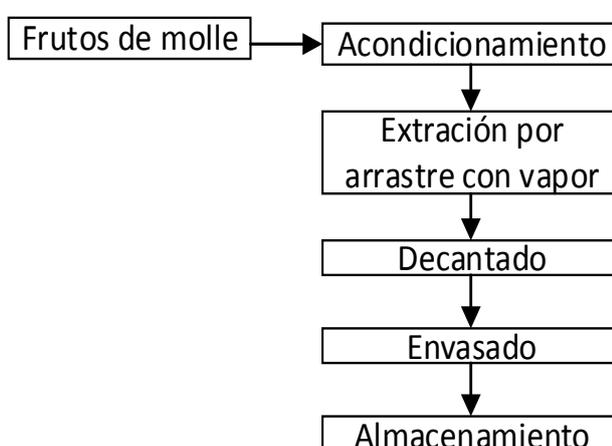


Figura 5. Proceso de extracción de A.E. del fruto de molle.
Fuente: Elaboración propia.

2.4.2.3. Determinación del Rendimiento

Se determinó el rendimiento aplicando la siguiente operación matemática:

$$\%RAE = \frac{\text{Peso de A. E. extraído}}{\text{Peso inicial de la muestra}} \times 100$$

Se utilizaron las muestras previamente acondicionadas y se determinó el peso del aceite esencial extraído en función del tiempo (15, 30, 45, y 60 min). Esta operación se realizó por duplicado.

2.4.2.4. Determinación de la Densidad (N.T.P. 319.081).

Para obtener la densidad primero se pesó solo el picnómetro, después del agua destilada, para a continuación dejarlo vacío y verter el aceite esencial; realizando este proceso a temperatura de 20°C.

$$\rho = \frac{P2 - P1}{P1 - P}$$

Densidad es igual a:

P: peso del picnómetro.

P1: peso del picnómetro con agua destilada.

P2: peso del picnómetro con el aceite esencial.

Nota: Todos los pesos expresados en gramos.

2.4.2.5. Determinación de Índice de Refracción (N.T.P. 319.075).

Se pudo determinar con la lectura directa del equipo electrónico que mide el índice de refracción expresado en números.

2.4.2.6. Determinación de Índice de Acidez (N.T.P. 319.085).

Se utilizó los mg de KOH suficientes para neutralizar los ácidos libres en 1g de aceite esencial.

$$I. A. \frac{5.61 \times V}{P}$$

Dónde:

V: volumen gastado en mililitros de KOH

N: normalidad del KOH utilizado en la titulación.

P: peso en gramos de la muestra de aceite.

2.4.2.7. Determinación de la Solubilidad en etanol (NTP 319.084).

Este análisis se basa en añadir a una cantidad precisa de aceite esencial, un volumen de etanol de concentración determinada hasta que el aceite logre disolverse completamente, agitando constantemente mientras se añade el solvente.

$$S = \frac{V}{V_1}$$

Dónde:

S: solubilidad

V: ml en etanol a la dilución conocida.

V1: mL del aceite esencial

2.4.3. Método para la evaluación in vitro de la actividad antifúngica del aceite esencial del fruto de molle sobre *Colletotrichum* spp.

2.4.3.1. Porcentaje de Inhibición del Crecimiento.

Según (Muñoz & Gutiérrez, 2008) utilizaron la siguiente ecuación que le permitieron obtener los porcentajes de inhibición.

$$\%I = \frac{\emptyset \text{Testigo} - \emptyset \text{Tratamiento}}{\emptyset \text{Testigo}} \times 100$$

Dónde:

%I: %Inhibición

\emptyset Diámetro testigo en medio cultivo PDA

\emptyset Diámetro tratamiento (Aceite esencial)

Las medidas del crecimiento del micelio fueron tomadas cuando el hongo testigo finalizó su crecimiento en la placa.

2.4.4. Instrumentos para la recolección de datos

2.4.4.1. Equipos.

Estufa ODHG- 9030A

Alambique (destilador de aceite esencial)

Balanza analítica A&D GR.

Balanza analítica HENKEL

Cabina de Bioseguridad – Telstar Bio II Advance

Cocina eléctrica Mod. Dinamic Inox MGF8013 – Megafesa

Incubadora – BINDER

Autoclave eléctrico – Modelo N°75X – ALL AMERICAN

Molino manual – CORONA

2.4.4.2. Materiales.

02 Matraz de 500 ml

04 viales

20 placas Petri

01 pipeta 10ml

01 micro pipeta 1000ul

01 papel aluminio

01 algodón

01 pera de decantación

2.5. Procedimientos de análisis de datos

Los datos obtenidos de los ensayos de rendimiento de Aceite Esencial del fruto de molle fueron procesados mediante un diseño factorial en Design Expert 7.0.

Las pruebas in vitro de inhibición sobre *Colletotrichum* spp, se analizaron usando el programa SPSS®, aplicando un ANVA y la prueba de comparación de medias (Prueba TUKEY).

2.6. Criterios Éticos.

En la presente tesis, se utilizaron fuentes bibliográficas físicas y virtuales, basándose en la información más relevante, resaltando a los autores de las mismas; así podrán corroborarlo en distintos párrafos de la investigación.

2.7. Criterios de Rigor Científico.

Los criterios que se han considerado para la presente investigación, han sido basados en preliminares indagaciones, lo que nos confirma que usar métodos y técnicas, con indudables parámetros certifica la información de los diversos autores, valorando sin duda su labor.

III. RESULTADOS

3.1. Resultados en Tablas y Figuras

3.1.1. Caracterización físico-química del fruto de molle

3.1.1.1. Tamaño

Para obtener las medidas se utilizó un vernier digital y se midieron una cantidad de muestras significativas.

Tabla 8. Valores promedio de altura y diámetro del fruto de molle.

Ítems		Frutos de Molle
Altura (mm)	CE	5.52
	SE	4.87
Diámetro (mm)	CE	5.49
	SE	4.69

Fuente: Elaboración propia.

Nota: CE: Con Exocarpio, SE: Sin Exocarpio.

3.1.1.2. Análisis físico-químicos

Los resultados obtenidos se realizaron según los Métodos AOAC, 2005 en el Laboratorio de análisis físico-químicos y microbiológicos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo y se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 9. Características físico-químicas del fruto de molle.

Determinaciones Físico – Químicas	
Humedad	13%
Grasa	18.3%
Carbohidratos	48.56%
Proteína	3.99%
Ceniza	6.9%
Fibra	9.25%

Fuente: Facultad de Ciencias Biológicas – UNPRG.

3.1.2. Extracción y caracterización del aceite esencial del fruto de molle

3.1.2.1. Rendimiento

Tabla 10. Rendimiento de AE del fruto de molle por arrastre de vapor.

Humedad del fruto (%)	Repetición	Tiempo de extracción (min)	Rendimiento de AE %
7%	1	15	1.98
		30	3.34
		45	3.62
		60	3.82
	2	15	2.06
		30	3.44
		45	3.71
		60	3.88
13%	1	15	1.56
		30	2.03
		45	2.36
		60	2.47
	2	15	1.59
		30	2.01
		45	2.32
		60	2.41

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 11. ANVA del Rendimiento de aceite esencial del fruto de molle.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor F	p-value Prob > F
Model	7.825375	7	1.117910714	1490.54762	< 0.0001
A-Humedad	0.497025	1	0.497025	662.7	< 0.0001
B-Tiempo	6.762475	3	2.254158333	3005.54444	< 0.0001
AB	0.565875	3	0.188625	251.5	< 0.0001
Pure Error	0.006	8	0.00075		
Cor Total	7.831375	15			

Fuente: Design Expert 7.0

En la Tabla 9 se muestra el análisis de varianza del rendimiento de aceite esencial del fruto de molle, en la cual podemos ver una significancia o $p = 0.0001 < 0.05$, lo cual nos dice que existe diferencia de los tratamientos en estudio, es decir que las variables en relación al grado de madurez del fruto y el tiempo influyen en el rendimiento de aceite esencial.

Tabla 12. Precisión y exactitud del análisis del rendimiento de aceite esencial del fruto de molle.

Std. Dev.	0.027386128	R-Squared	0.99923385
Mean	0.78625	Adj R-Squared	0.99856347
C.V. %	3.483132321	Pred R-Squared	0.9969354
PRESS	0.024	Adeq Precision	99.1483737

Fuente: Design Expert 7.0

En la Tabla 10 muestra como resultado $R^2 = 0.99$ y $C.V. = 3.48\%$, lo cual nos asegura la confiabilidad de la toma de datos, para el proceso de extracción de aceite esencial del fruto de molle.

En la figura 6 se observa el rendimiento a partir 100 gr. para frutos de molle con 7% de humedad en función del tiempo de extracción por arrastre de vapor. Obteniendo 3.85% de aceite esencial.

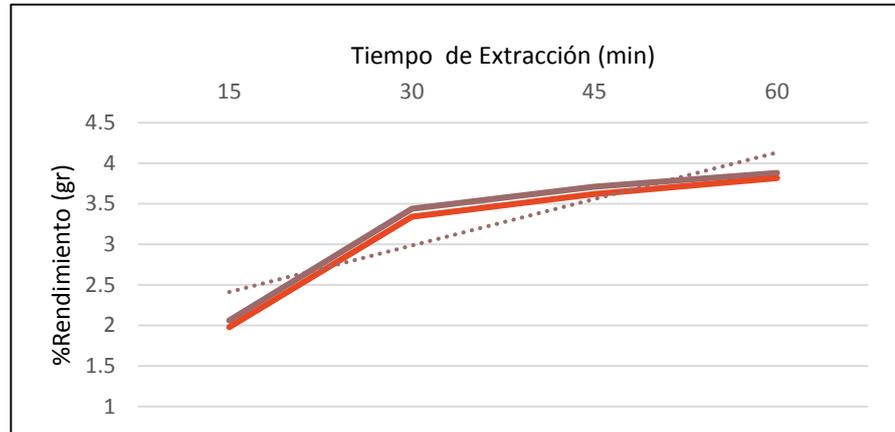


Figura 6. Rendimiento de AE del fruto de molle con 7% de humedad.

Fuente: Elaboración propia.

En la figura 7 se observa el rendimiento a partir de 100 gr. para frutos de molle con 13% de humedad en función del tiempo de extracción por arrastre de vapor. Obteniendo 2.44% de aceite esencial.

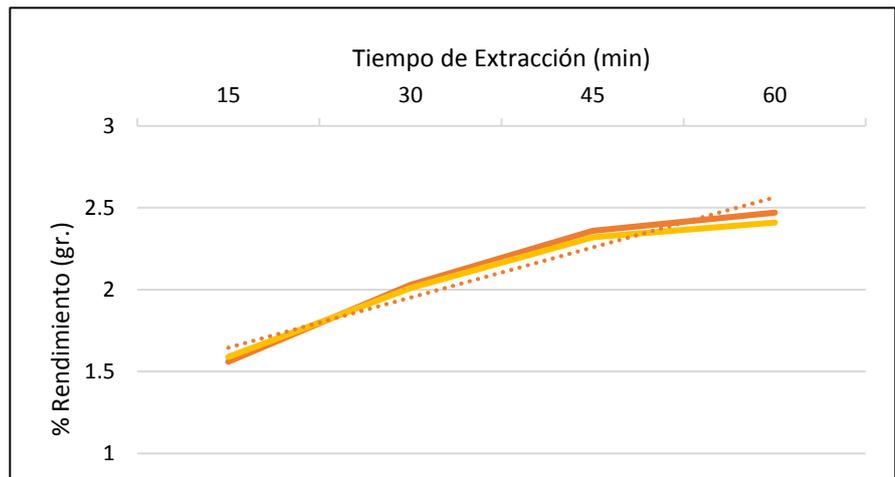


Figura 7. Rendimiento de AE del fruto de molle con 13% de humedad.

Fuente: Elaboración propia.

3.1.2.2. Análisis físico-químicos del Aceite Esencial del fruto de Molle.

Los análisis se realizaron en el Laboratorio de análisis físico-químicos y microbiológicos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, según las Normas Técnicas Peruanas. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 13. Características físico-químicas del aceite esencial del fruto de molle.

Determinaciones Físico – Químicas	
Densidad (g/cm ³)	0.902
Índice de Refracción	1.4820
Índice de Acidez (%)	1.134
Solubilidad en etanol (%)	100

Fuente: Facultad de Ciencias Biológicas – UNPRG.

3.1.3. Evaluación in vitro de la actividad antifúngica del aceite esencial del fruto de molle sobre *Colletotrichum* spp.

Para la prueba in vitro se realizó 3 tratamientos con 4 repeticiones cada uno con concentraciones de 8, 10 y 12% de aceite esencial del fruto de molle diluido en agua destilada y Tween al 1%, se creó una mezcla homogénea que permitió la correcta aplicación del aceite esencial.

En la siguiente tabla se muestra el porcentaje de inhibición con relación al testigo, el cual fue sembrado sin aplicar ninguna concentración de aceite esencial.

Tabla 14. Porcentaje de Inhibición del Crecimiento de *Colletotrichum* spp. frente a 250, 500 y 750mg/ml. de aceite esencial del fruto de molle.

Tratamientos	Rep.	Crecimiento de <i>Colletotrichum</i> (mm)				Promedio	Desviación Estándar	% Inhibición (PIC)
Testigo	1	45	44	42	41	43.00	1.83	0%
	2	40	42	37	41	40.00	2.16	0%
	3	39	38	37	38	38.00	0.82	0%
250mg/ml	1	30	37	38	35	35.00	3.56	13%
	2	38	40	37	37	38.00	1.41	6%
	3	35	38	40	34	36.75	2.75	9%
	4	33	40	37	39	37.25	3.10	8%
500mg/ml	1	37	32	37	35	35.25	2.36	13%
	2	20	40	45	33	34.50	10.85	14%
	3	23	38	42	45	37.00	9.76	8%
	4	29	30	25	35	29.75	4.11	26%
750mg/ml	1	25	27	23	22	24.25	2.22	40%
	2	24	22	28	27	25.25	2.75	37%
	3	24	25	24	23	24.00	0.82	40%
	4	26	25	25	30	26.50	2.38	34%

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 15. ANVA para determinar efecto inhibitorio de aceite esencial de molle sobre *Colletotrichum* spp.

F de V	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	Sig
Tratamientos	1935.50	2	967.750	17.866	.001
Error	487.50	9	54.167		
Total	2423.00	11			

Fuente: IBM SPSS STATISTICS

En la Tabla 15 se muestra el análisis de varianza para el efecto inhibitorio del aceite esencial de molle sobre *Colletotrichum* sp, en ella podemos observar una significancia ó $p = 0.001 < 0.05$, lo cual nos dice que existe una diferencia en alguno de los tratamientos en estudio, es decir que la variable aceite esencial de molle tiene una influencia sobre la inhibición de *Colletotrichum* spp.

Tabla 16. Prueba (TUKEY $p < 0.05$) para determinar efecto inhibitorio de aceite esencial de molle sobre *Colletotrichum* spp.

(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
Tratamientos	Tratamientos				Límite inferior	Límite superior
250 mg/ml	500 mg/ml	-7.0000	4.376	.316	-20.428	6.428
	750 mg/ml	-29.7500*	4.376	.001	-43.178	-16.322
500 mg/ml	250 mg/ml	7.0000	4.376	.316	-6.428	20.428
	750 mg/ml	-22.7500*	4.376	.005	-36.178	-9.322
750 mg/ml	250 mg/ml	29.7500*	4.376	.001	16.322	43.178
	500 mg/ml	22.7500*	4.376	.005	9.322	36.178

Tabla 17. Prueba de comparación de medias TUKEY

Tratamientos	N	Subconjunto	
		1	2
250 mg/ml	4	7.25	
500 mg/ml	4	14.25	
750 mg/ml	4		37.00
Sig.		.316	1.00

Fuente: IBM SPSS STATISTICS.

En las Tablas 16 Y 17, donde se muestran la prueba de comparación de medias de tratamientos (TUKEY < 0.05), podemos observar que el tratamiento 750 mg/ml fue el que mostró el mayor efecto inhibitorio sobre *Colletotrichum* spp. con un promedio de inhibición de 37%, seguido de los tratamientos 500 mg/ml y 250 mg/ml con porcentajes de inhibición de 14.25% y 7.25% respectivamente; asimismo, en esta prueba, se puede observar también que solo existen 2 sub-unidades, mostrándose que los tratamientos 500 mg/ml y 250 mg/ml son similares estadísticamente siendo el tratamiento 750 mg/ml el que se diferencia estadísticamente de los otros tratamientos.

3.2. Discusión de Resultados

3.2.1. Obtención de aceite esencial de Molle.

En la Tabla 11 y figuras 6 y 7 se expresa los resultados del rendimiento de extracción del aceite esencial del fruto de molle, 2,44% para frutos con 13% de humedad y 3,85% para frutos con 7% de humedad. Estos resultados no indican coincidencias con los valores bibliográficos de 5,62 a 8,8% obtenidos por Llanos (2012) pero si se acercan a los 2,6 a 5,6% que menciona Viturro (2010).

Los frutos de molle utilizados en esta investigación fueron triturados para mejorar la extracción de Aceite esencial, asimismo Padilla y Soliz (2014) obtuvieron de manera exitosa aceites esenciales con un rendimiento de 1.2 ml/Kg (fruto sin triturar) y 6 ml/Kg (fruto triturado) para *Schinus molle*.

Dikshit et al (1986) menciona que el rendimiento en frutos puede contener 5 % de aceite esencial y las hojas de 2 %. Según López y Caso (2015), sus resultados de rendimiento obtenido en porcentaje de peso para hojas *Schinus molle* es de 0,21% en promedio, mientras que para frutos de 0,11%; resultados por debajo de los valores obtenidos en esta investigación para frutos de molle, 2,44 y 3,85%.

Puede que el bajo rendimiento de aceites esenciales en los frutos del presente trabajo de investigación, se debería a que este material estuvo en estado fresco y/o a inicios de su madurez, es más Zeng Yueqin (2006) reporta que los frutos de *Schinus molle* presenta un rendimiento de 3 % a 5 %, pero no refiere si en estado fresco o seco. Los factores que inciden en el rendimiento de los aceites del fruto pueden deberse a su estado de madurez y el factor ambiental.

Sin embargo los resultados de esta investigación son semejantes a los obtenidos por el Sistema Nacional de Información de México (2010) (Citado por Castro, 2018), haciendo referencia que pueden lograr hasta un 2% de rendimiento frutos frescos de *Schinus molle*, por ello hay evidencia de demostrable que la humedad de los frutos tanto frescos o secos, afecta el rendimiento de aceite esencial.

3.2.2. Efecto Inhibitorio del aceite esencial del fruto de Molle frente a *Colletotrichum* spp.

En los ensayos para determinar el efecto inhibitorio del aceite esencial de molle sobre *Colletotrichum* spp, se observa que el tratamiento que mostro el porcentaje de inhibición más alto fue el 750 mg/ml, con un porcentaje de 37%, asimismo en la prueba de comparación de medias (TUKEY), este tratamiento demostró ser diferente estadísticamente a los demás tratamientos en estudio, dicho ensayo nos hace concluir que el aceite esencial de molle tiene un potencial antifúngico sobre *Colletotrichum* spp, tal como lo menciona (Martins et al., 2014), quienes nos dicen que se han descrito actividades biológicas para el aceite esencial de *Schinus molle*, como antifúngico.

La actividad antifúngica del aceite esencial de *Schinus molle* tal como se demostró en esta investigación también ha tenido éxito contra hongos tales como *Cándida albicans* y *Aspergillus niger* y otros microorganismos como *S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. faecalis*, *S. mitis*, *S. sobrinus*, *S. sanguise*, *E. coli*, *Enterobacter*, *Shigella exneri*, *K. pneumoniae* según lo citado por Rivadeneira y Álvarez (2015).

Asimismo, (Gómez Garibay et al., 1990; Bennett y Wallsgrove, 1994; Grayer y Harborne, 1994; Osbourne, 1996), nos mencionan que las plantas producen una gran cantidad de metabolitos secundarios, muchos de ellos con actividad antifúngica. Ejemplos bien conocidos de estos compuestos incluyen flavonoides, fenoles y glucósidos fenólicos, lactonas insaturadas, compuestos de azufre, saponinas, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos.

IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

La caracterización del fruto de molle se realizó en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Certificado N°112 (Ver Anexos).

Se logró extraer aceite esencial con el método de arrastre con vapor del fruto de molle con 7 y 13% de humedad, obteniendo 3,85% para frutos secos y 2,44% para frutos frescos.

La caracterización del aceite esencial se realizó en Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Certificado N°113 (Ver Anexos).

Se demostró el efecto antifúngico *in vitro* del aceite esencial de *Schinus molle* sobre *Colletotrichum* spp., llegando a obtener un porcentaje de inhibición de 37%, lo que la convierte en un producto natural como potencial agente de control de *Colletotrichum* spp.

4.2. Recomendaciones

Realizar estudios para disminuir la pérdida de los componentes volátiles de aceite esencial del fruto de molle en diferentes métodos de extracción.

Realizar investigaciones sobre el efecto de la aplicación de aceite esencial de *Schinus molle* en carne de res, pescado y pollo.

Realizar más estudios del aceite esencial del fruto de molle en diferentes partes del Perú y en diferentes estaciones del año.

Estudiar sobre la composición físico-química del hidrolato (agua obtenida por decantación del aceite esencial) para su posible aplicación en la industria alimentaria y no alimentaria.

REFERENCIAS

Adriana, B. G. (2009). Actividad Biocontroladora de Aceites ante Antracnosis (*Colletotrichum Spp.*) de tomate de árbol (*Solanum Betacea*). Cuenca,Ecuador: Universidad del Azuay.

Aguilar, P., Navarro, A., Sánchez, A., Meneses, M., & Ávila, R. (2013). Efecto antifungico de extractos de plantas originarias del estado de Puebla sobre *Colletotrichum gloeosporioides* . *CienciaUAT*, 6-11.

Alzate, D., Mier, G., Afanador, L., Durango, D., & García, C. (Enero de 2009). 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. *vitae*, 16(1), 116-125.

Boonruang, K., Kerddonfag, N., Chinsirikul, W., Mitcham, E.J., Chonhenchob, V., 2017. Antifungal effect of poly (lactic acid) films containing thymol and r -(-)-carvone against anthracnose pathogens isolated from avocado and citrus. *Food Control* 85–93.

Berumen G., Ochoa V., Báez R. & Gutiérrez P. (2015). Efecto del ácido salicilico en la inducción de resistencia a *Colletotrichum sp.* en frutos de plátano durante postcosecha. *Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal*, 27-34.

Cabrera, L. S. (2012). Propiedades y usos del plátano o la banana. *Alimentacion Sana o Natural*, 1-2.

Carchipulla A. (2018). Efecto antifúngico del aceite esencial de árbol de té y gel de aloe vera sobre la pudrición corona en banano. Machala: Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias.

Camacho, A., Giles, M., Ortigón, A., Palao, M., Serrano, B., & Velásquez, O. (2009). Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos. México: UNAM,México.

Cano, M. (2006). Estudio químico del hongo *Colletotrichum musae* cultivado en un medio de plátano (variedad Valery). Xalapa, Veracruz : Universidad Veracruzana.

Bennett, R.N., Wallsgrove, R.M., 1994. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytology* 127, 617–633.

Chung, W.H., Chung, W.C., Peng, M.T., Yang, H.R., Huang, J.W., 2010. Specific detection of benzimidazole resistance in *Colletotrichum gloeosporioides*, from fruit crops by PCRRFLP. *New Biotechnol.* 27, 17–24.

Gañán, L., Álvarez, E., & Castaño, J. (2015). Identificación genética de aislamientos de *Colletotrichum* spp. causantes de antracnosis en frutos de aguacate, banano, mango y tomate de árbol. *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat.*, 339-347.

Gómez Garibay, F., Reyes Chilpa, R., Quijano, L., Calderón Pardo, J.S., Ríos Castillo, T., 1990. Methoxifurans auranols with fungostatic activity from *Lonchocarpus castilloi*. *Phytochemistry* 29, 459–463.

Grayer, R.J., Harborne, J.J., 1994. A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982–1993. *Phytochemistry* 37, 19–42

Hong, Jeum; Yang, Hye; Jung, Heesoo; Yoon, Dong; Sang, Mee; Jeun, Yong. (2015). Application of Volatile Antifungal Plant Essential Oils for Controlling Pepper Fruit Anthracnose by *Colletotrichum gloeosporioides*. *The Plant Pathology*, 269-277.

Huaman, Y., de la Cruz, O.A., Bosilcov, A., Batiu, I., 2004. Essential oil from *Schinus molle* L. from Peru. *J. Essent. Oil Bear. Plants* 7, 223–227.

Jeum Kyu , H., Hye Ji, Y., Heesoo, J., Dong June, Y., Mee Kyung, S., & Yong Chull, J. (2015). Application of Volatile Antifungal Plant Essential Oils for Controlling Pepper Fruit Anthracnose by *Colletotrichum gloeosporioides*. *The Plant Pathology Journal*, 269-277.

Llanos Arapa, S. K. (2012). Extracción y caracterización del Aceite Esencial de Molle (*Schinus molle* L.). Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, 27.

Maqbool, M., Ali, A., Alderson, P. G., Mohamed, M., Siddiqui, Y., & Zahid, N. (2011). Postharvest application of gum arabic and essential oils for controlling anthracnose and quality of banana and papaya during cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, 71-76.

Marongiu, B., Porcedda, A.P.S., Casu, R., Pierucci, P., 2004. Chemical composition of the oil and supercritical CO₂ extract of *Schinus molle* L. *Flavour. Frag. J.* 19, 554–558.

Martínez A. (2003). *Aceites esenciales*. Medellín: Facultad Química Farmacéutica.

Martins, M., Arantes, S., Candeias, F., Tinoco, M., & Cruz, J. (2013). Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils. *Journal of Ethnopharmacology*, 485-492.

Norma Técnica Peruana (NTP – INACAL) revisada en 2016 con código: N.T.P. 319.081, para aceites esenciales.

Norma Técnica Peruana (NTP- INACAL), revisada en 2016 con código: N.T.P. 319.075 para aceites esenciales.

Norma Técnica Peruana (NTP – INACAL), revisada en 2016 con código NTP 319.085, para aceites esenciales.

Norma Técnica Peruana (NTP – INACAL), revisada en 2016 con código NTP 319.084, para aceites esenciales.

Osbourne, A.E., 1996. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *The Plant Cell* 8, 1821–1831.

Pérez Cordero, A., Chamorro Anaya, L., & Vitola Romero, D. (2017). Caracterización química y evaluación de la actividad antifúngica del aceite esencial foliar de *Lippia alba* contra *Colletotrichum gloeosporioides*. *Revista Peruana de Biología*, 211-216.

Taylor, L., 2005. *The Healing power of Rainforest Herbs. A Guide to Understanding and Using Herbal Medicinals*. Square One Publishers, New York.

Segura C. S. (2015). Actividad Antifúngica del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. "Molle" sobre el crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae* (PAT.) Griffon y Maubl . en condiciones de laboratorio . Trujillo, Perú : Universidad Nacional de Trujillo .

Sutapa, R., Nuckles, E., & Archbold, D. (5 de Diciembre de 2017). Effects of Phenolic Compounds on Growth of *Colletotrichum* spp. In Vitro. *Current Microbiology*. doi:<https://doi.org/10.1007/s00284-017-1415-7>

Valdés, L., Calero, D., Gómez, A., Carballo, M., Capote, M., González, I., & Alvarez, J. (2017). Caracterización morfológica, cultural y patogénica de aislados de *colletotrichum* sp. Produciendo antracnosis en mango (*mangifera indica* L.). *La granja: revista de ciencias de la vida*, 38-51.

Vásquez J., & Díaz , D. (2011). Efecto Antimicótico in vitro del aceite de Molle (*Schinus molle* Linneo) sobre *Trichophyton mentagrophytes*. Callao, Lima: Universidad Nacional del Callao .

Vilaplana, R., Pazmiño, L., & Valencia-Chamorro, S. (2018). Control of anthracnose, caused by *Colletotrichum musae*, on postharvest organic banana by thyme oil. *Postharvest Biology and Technology*, 56-63.

Xu, X.F., Lin, T., Yuan, S.K., Dai, D.J., Shi, H.J., 2014. Characterization of baseline sensitivity and resistance risk of *Colletotrichum gloeosporioides* complex isolates from strawberry and grape to two demethylation-inhibitor fungicides, prochloraz and tebuconazole. *Australas. Plant Pathol.* 43, 605–613.

Zhou, Y., Zhang, L., Zeng, K., 2016. Efficacy of *Pichia membranaefaciens* combined with chitosan against *Colletotrichum gloeosporioides* in citrus fruits and possible modes of action. *Biol. Control* 96, 39–47.

Zeng Yueqin. (2006). Identificación y actividad farmacológica de principios de especies antiinflamatorias. Universidad de Valencia. Recuperado de http://www.tesisnaxarxa.net/TESIS_UV/AVAILABLE/TDX-0403108-115541//yueqin.pdf

ANEXOS



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
LABORATORIO DE ANALISIS FISICOQUIMICOS
Y MICROBIOLÓGICOS
CIUDAD UNIVERSITARIA - LAMBAYEQUE – PERU



CERTIFICACIÓN DE CALIDAD DE ALIMENTOS N° 112

I. DATOS DE SOLICITANTE:
Nombre : Bautista Toro Alex Mait
Proyecto de Tesis : Obtención de aceite esencial del fruto de molle (*Schinus molle L.*) y su evaluación antifúngica sobre *Colletotrichum spp*

II. DATOS DE LA MUESTRA:
Nombre : Frutos de molle
Forma de presentación : Envase con frutos de molle
Estado del envase : Bueno
Naturaleza del envase : Plástico
Marca : No indica
Procedencia : Chiclayo
Rendimiento : No indica
Fecha de producción : 28-11-18
Fecha de vencimiento : No indica
Autorización sanitaria : No indica
Llegada al laboratorio : 28-11-18
Fecha de análisis : 28-11-18

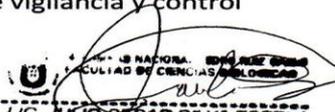
III. TIPO DE ANALISIS
Fisicoquímico

IV. DOCUMENTO NORMATIVO
Reglamento sobre vigilancia y control Sanitario de Alimentos y Bebidas (DS.007- 98-SA)

V. RESULTADO DEL ANALISIS
1. Determinación de criterios fisicoquímicos

Humedad	: 13.0 %
Grasa	: 18.3 %
Carbohidratos	: 48.56 %
Proteína	: 3.99 %
Ceniza	: 6.9 %
Fibra	: 9.25 %
Acidez (ácido oleico)	: 5.21 %

VI. CONCLUSIONES
La muestra cumple con los requisitos del Reglamento sobre vigilancia y control Sanitario de Alimentos y Bebidas (DS.007- 98-SA).


LIC. JULIO CESAR SILVA ESTELA
Biólogo - Microbiólogo Parasitólogo
JEFE DE LABORATORIO

Lambayeque, Noviembre del 2018

Figura 1. Certificado de la caracterización del fruto de molle.

Fuente: Facultad de Ciencias Biológicas - UNPRG



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
LABORATORIO DE ANALISIS FISICOQUIMICOS
Y MICROBIOLÓGICOS
CIUDAD UNIVERSITARIA - LAMBAYEQUE – PERU



CERTIFICACIÓN DE CALIDAD DE ALIMENTOS Nº 113

I. DATOS DE SOLICITANTE:

Nombre : Bautista Toro Alex Mait
Proyecto de Tesis : Obtención de aceite esencial del fruto de molle
(*Schinus molle* L.) y su evaluación antifúngica sobre *Colletotrichum* spp

II. DATOS DE LA MUESTRA:

Nombre : Aceite esencial de Molle
Forma de presentación : Envase con aceite esencial de molle
Estado del envase : Bueno
Naturaleza del envase : Plástico
Marca : No indica
Procedencia : Chiclayo
Rendimiento : No indica
Fecha de producción : 28-11-18
Fecha de vencimiento : No indica
Autorización sanitaria : No indica
Llegada al laboratorio : 03-12-18
Fecha de análisis : 03-12-18

III. TIPO DE ANALISIS

Fisicoquímico

IV. DOCUMENTO NORMATIVO

Reglamento sobre vigilancia y control Sanitario de Alimentos y Bebidas (DS.007- 98-SA)

V. RESULTADO DEL ANALISIS

1. Determinación de criterios fisicoquímicos

Densidad : 0.902 g/cm³
Índice de refracción : 1.4820
Solubilidad : 100 %
Índice de acidez : 1.134 %
Contenido de alcohol : 9.25 %
Alcoholes : 1.25 %
Grados Brix : 77
Índice de peróxido : 2.85 mEq de Oxígeno/kg de aceite

VI. CONCLUSIONES

La muestra cumple con los requisitos del Reglamento sobre vigilancia y control Sanitario de Alimentos y Bebidas (DS.007- 98-SA)

UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
LIC. JULIO CESAR SILVESTELA
Biólogo Microbiólogo Parasitólogo

JEFE DE LABORATORIO

Lambayeque, Diciembre del 2018

Figura 2. Certificado de la caracterización del aceite esencial del fruto de molle.

Fuente: Facultad de Ciencias Biológicas - UNPRG



Figura 3. Estufa en la que se determinó humedad del fruto de molle (7 y 13%)
Fuente: Elaboración propia



Figura 4. Frutos de molle con 7% y 13% de Humedad
Fuente: Elaboración propia.



Figura 5. Frutos de molle triturados groseramente.

Fuente: Elaboración propia.



Figura 6. Pesado de muestras (100gr) para el proceso de extracción.

Fuente: Elaboración propia.



Figura 7. Alambique que se usó para la extracción de A.E. del fruto de molle por arrastre de vapor.

Fuente: Elaboración Propia.

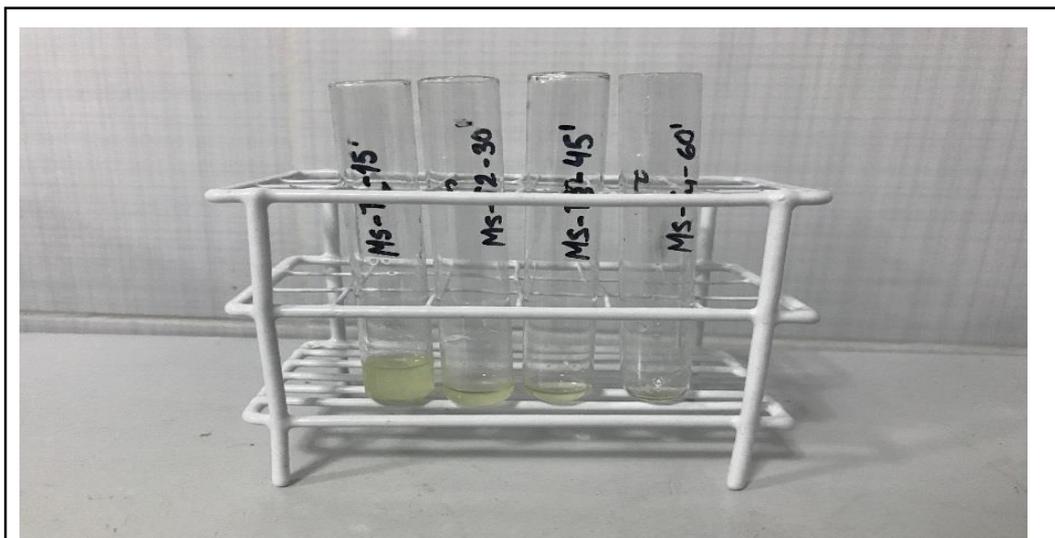


Figura 8. Aceite esencial extraído en diferentes tiempos (min.) (%H= 7)

Fuente: Elaboración propia.

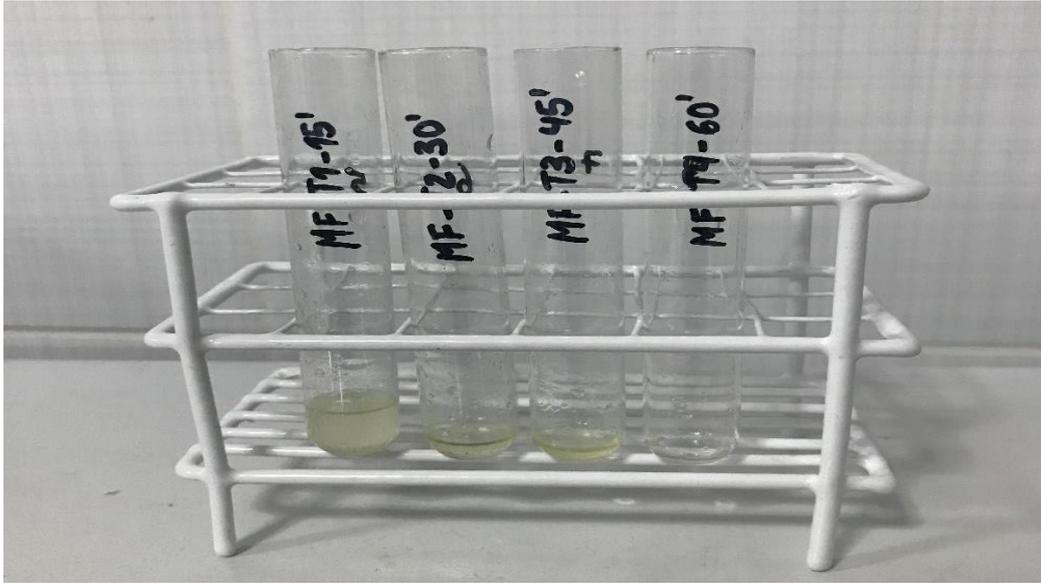


Figura 9. Aceite esencial extraído en diferentes tiempos (min.) (%H= 13)

Fuente: Elaboración propia.



Figura 10. Preparación de medio de cultivo (Papa Dextrosa Agar).

Fuente: Elaboración propia.



Figura 11. Reactivación de *Colletotrichum spp.* en Cabina de Bioseguridad.

Fuente: Elaboración propia.



Figura 12. Inhibición de *Colletotrichum spp.* a 250mg/mL de A.E. del fruto de molle.

Fuente: Elaboración propia.



Figura 13. Inhibición de *Colletotrichum* spp. a 500mg/ml de A.E. del fruto de molle.

Fuente: Elaboración propia.



Figura 14. Inhibición de *Colletotrichum* spp. a 750mg/ml de A.E. del fruto de molle.

Fuente: Elaboración propia.