UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

ESCUELA DE INGENIERÍA PARA EL DESARROLLO AGROINDUSTRIAL

CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

TESIS DE GRADO

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO AGROINDUSTRIAL

TEMA:

VALORACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Citrus sinensis* (NARANJA) Y *Citrus nobilis* (MANDARINA) COMO INHIBIDORES DE MICROORGANISMOS EN LA CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS

AUTORA:

NARVÁEZ BAQUE FLOR JAJAIRA

DIRECTORA DE TESIS:

Ing. M.Sc. SONNIA ESTHER BARZOLA MIRANDA

QUEVEDO - LOS RÍOS - ECUADOR

2015

UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
Facultad de Ciencias de la Ingeniería
Escuela de Ingeniería para el Desarrollo Agroindustrial

Teléfonos: (593-05) 2750320 – 2752430 – 2753302
Fax: (593-05) 2753300 – 2753303
e-mail: info@uteq.edu.ec
Pàgina web: www.uteq.edu.ec

Quevedo – Los Ríos – Ecuador
Km. 1.5 vía a Quito

CASILLAS
Guayaquil: 10672
Quevedo: 73

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, **FLOR JAJAIRA NARVÁEZ BAQUE**, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normatividad institucional vigente.

_____

FLOR JAJAIRA NARVÁEZ BAQUE

UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
Facultad de Ciencias de la Ingeniería
Escuela de Ingeniería para el Desarrollo Agroindustrial

Teléfonos: (593-05) 2750320 – 2752430 – 2753302
Fax: (593-05) 2753300 – 2753303
e-mail: info@uteq.edu.ec
Pàgina web: www.uteq.edu.ec

Quevedo – Los Ríos – Ecuador
Km. 1.5 vía a Quito

CASILLAS
Guayaquil: 10672
Quevedo: 73

CERTIFICADO

La suscrita, Ing. M.Sc. SONNIA ESTHER BARZOLA MIRANDA, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que la Egresada **FLOR JAJAIRA NARVÁEZ BAQUE**, realizó la tesis de grado previo a la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial titulada: **VALORACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Citrus sinensis* (NARANJA) Y *Citrus nobilis* (MANDARINA) COMO INHIBIDORES DE MICROORGANISMOS EN LA CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS,** bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

Ing. M.Sc. SONNIA ESTHER BARZOLA MIRANDA
DIRECTORA DE TESIS

UNIVERSIDAD TECNICA ESTATAL DE QUEVEDO
Facultad de Ciencias de la Ingeniería
Escuela de Ingeniería para el Desarrollo Agroindustrial

Teléfonos: (593-05) 2750320 – 2752430 – 2753302
Fax: (593-05) 2753300 – 2753303
e-mail: info@uteq.edu.ec
Pàgina web: www.uteq.edu.ec

Quevedo – Los Ríos – Ecuador
Km. 1.5 vía a Quito

CASILLAS
Guayaquil: 10672
Quevedo: 73

CERTIFICACIÓN

Yo, Soc. Teddy Elizabeth de la Cruz Valdivieso con CC N°. 091048152-2, docente de la Facultad de Ciencias de la Ingeniería de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifico que he revisado la tesis de grado de la Egresada **FLOR JAJAIRA NARVÁEZ BAQUE** con CC N°. 120528584-2 previo a la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial, titulada **"VALORACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Citrus sinensis* (NARANJA) Y *Citrus nobilis* (MANDARINA) COMO INHIBIDORES DE MICROORGANISMOS EN LA CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS"** habiendo cumplido con la redacción y corrección ortográfica que se ha indicado.

Soc. Teddy Elizabeth de la Cruz Valdivieso
DOCENTE DE LA F.C.I.

UNIVERSIDAD TECNICA ESTATAL DE QUEVEDO
Facultad de Ciencias de la Ingeniería
Escuela de Ingeniería para el Desarrollo Agroindustrial

Teléfonos: (593-05) 2750320 – 2752430 – 2753302
Fax: (593-05) 2753300 – 2753303
e-mail: info@uteq.edu.ec
Pàgina web: www.uteq.edu.ec

Quevedo – Los Ríos – Ecuador
Km. 1.5 vía a Quito

CASILLAS
Guayaquil: 10672
Quevedo: 73

CERTIFICACIÓN

Yo, **Sungey Naynee Sánchez LLaguno Ph.D.,** docente de la Facultad de Ciencias de la Ingeniería de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifico que he revisado la tesis de grado de la Egresada **FLOR JAJAIRA NARVÁEZ BAQUE** con CC N°. 120528584-2 previo a la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial, titulada **"VALORACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Citrus sinensis* (NARANJA) Y *Citrus nobilis* (MANDARINA) COMO INHIBIDORES DE MICROORGANISMOS EN LA CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS"**, habiendo cumplido con la redacción y corrección ortográfica que se ha indicado.

Sungey Naynee Sánchez LLaguno Ph.D.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

UNIVERSIDAD TECNICA ESTATAL DE QUEVEDO
Facultad de Ciencias de la Ingeniería
Escuela de Ingeniería para el Desarrollo Agroindustrial

Teléfonos: (593-05) 2750320 – 2752430 – 2753302
Fax: (593-05) 2753300 – 2753303
e-mail: info@uteq.edu.ec
Pàgina web: www.uteq.edu.ec

Quevedo – Los Ríos – Ecuador
Km. 1.5 vía a Quito

CASILLAS
Guayaquil: 10672
Quevedo: 73

CERTIFICACIÓN

Yo, **Ing. M.Sc. Flor Marina Fon Fay Vásquez**, docente de la Facultad de Ciencias de la Ingeniería de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifico que he revisado la tesis de grado de la Egresada **FLOR JAJAIRA NARVÁEZ BAQUE** con CC N°. 120528584-2 previo a la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial, titulada **"VALORACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Citrus sinensis* (NARANJA) Y *Citrus nobilis* (MANDARINA) COMO INHIBIDORES DE MICROORGANISMOS EN LA CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS"**, habiendo cumplido con la redacción y corrección ortográfica que se ha indicado.

Ing. M.Sc. Flor Marina Fon Fay Vásquez
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

UNIVERSIDAD TECNICA ESTATAL DE QUEVEDO
Facultad de Ciencias de la Ingeniería
Escuela de Ingeniería para el Desarrollo Agroindustrial

Teléfonos: (593-05) 2750320 – 2752430 – 2753302
Fax: (593-05) 2753300 – 2753303
e-mail: info@uteq.edu.ec
Pàgina web: www.uteq.edu.ec

Quevedo – Los Ríos – Ecuador
Km. 1.5 vía a Quito

CASILLAS
Guayaquil: 10672
Quevedo: 73

CERTIFICACIÓN

PROF. JUAN ALEJANDRO NEIRA MOSQUERA, DOCENTE INVESTIGADOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA INGENIERIA CERTIFICA:

Luego de revisado el trabajo de Tesis de grado **"VALORACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Citrus sinensis* (NARANJA) Y *Citrus nobilis* (MANDARINA) COMO INHIBIDORES DE MICROORGANISMOS EN LA CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS"**. Previo a la obtención del título Ingeniero Agroindustrial de la autoría de la Srta.: NARVÁEZ BAQUE FLOR JAJAIRA, informo que este trabajo de investigación cumple con los criterios mínimos de investigación exigidos, por lo que en calidad de PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE TESIS considero que el trabajo puede ser presentado para la sustentación respectiva.

Atentamente.

Juan Alejandro Neira Mosquera Ph.D.

PRESIDENTE DE TRIBUNAL DE TESIS

UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA PARA EL DESARROLLO AGROINDUSTRIAL
CARRERA: INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

Tesis de grado presenta al Honorable Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias de la Ingeniería Previo a la Obtención del Título de:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

Título de tesis:

"VALORACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Citrus sinensis* (NARANJA) Y *Citrus nobilis* (MANDARINA) COMO INHIBIDORES DE MICROORGANISMOS EN LA CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS"

Aprobado:

_____

Juan Alejandro Neira Mosquera Ph.D.

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE TESIS

_____

Sungey Naynee Sánchez LLaguno Ph.D.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

_____

Ing. Msc. Flor Marina Fon Fay Vásquez

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

QUEVEDO – ECUADOR

2015

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios Todopoderoso por la vida que me ha dado y sus bendiciones derramadas sobre mí, al darme sabiduría para elegir el mejor camino motivándome día a día a ser un mejor ser humano.

A mis amados padres Niza Baque y Olivo Narváez por su gran amor, comprensión y fortaleza ya que nunca se dan por vencidos y luchan día a día por darme la mejor de todas las herencias que los padres pueden dar a sus hijos.

A mi hermano Jaime Narváez y mi cuñada Rosa Tumbaco que me permitieron estar en su hogar durante estos cinco años de estudio; a Silvana por ser más que mi hermana mi amiga por la confianza y paciencia que ha tenido ayudándome en la recolección de las hojas de naranja y mandarina; a Edgar y Ricardo por su apoyo y consejos.

A mis incondicionales cómplices Yuli Franco y Mary Sabando quienes me han soportado durante estos años y me han brindado su amistad sin límites.

A la Universidad Técnica Estatal de Quevedo en particular a mi querida Facultad de Ciencias de la Ingeniería por sus docentes ya que son calidad de persona que compartieron sus conocimientos con los estudiantes en las aulas de clases.

A mi directora de tesis Ing. M.Sc. Sonnia Barzola por ser mi guía en la ejecución del proyecto.

Al PhD. Juan Neira Mosquera y su esposa PhD. Sungey Sánchez LLaguno por su apoyo incondicional en la realización de este trabajo.

A la Ing. Malena Martínez por compartir sus conocimientos y ayudarme en la fase experimental de mi investigación.

A la Ing. Flor Marina FonFay por el apoyo brindado en la realización del proyecto.

Flor Jajaira Narváez Baque

DEDICATORIA

A Dios por su amor y derroche de bendiciones en mi vida y la de mi familia porque a pesar de las pruebas siempre me ha demostrado su inmenso amor.

A mis amados padres Niza Baque y Olivo Narváez por la confianza que depositaron en mí, por ser mi luz y guía en este difícil camino.

A mis hermanos que siempre estuvieron apoyándome con sus consejos y confianza animándome día a día a alcanzar mis metas.

A quienes siempre estuvieron a mi lado ayudándome en estos años y mucho más en la realización de este trabajo mis mejores y grandes amigas Yuli Franco y Mary Sabando.

A mis queridos compañeros de clases quienes a pesar de los acuerdos y desacuerdos compartimos momentos maravillosos siempre los llevaré guardados en mi corazón.

Flor Jajaira Narváez Baque

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO

Portada	I
Declaración de autoría y cesión de derecho	II
Certificado de directora de Tesis	III
Tribunal de Tesis	VIII
Agradecimiento	IX
Dedicatoria	X
Índice de Contenido	XI
Índice de Cuadros	XIII
Índice de Tablas	XIV
Índice de Anexos	XV
Resumen	XVI
Abstract	XVII

ÍNDICE DE CONTENIDO

CAPÍTULO I ***1***

1. MARCO CONTEXTUAL DE LA INVESTIGACIÓN ***2***

1.1. Introducción 2
1.1.1. Antecedentes 2
1.1.2. Problematización 3
1.1.3. Justificación 4
1.1.4. Objetivos 6
1.1.5. Hipótesis 7

CAPÍTULO II ***8***

2. MARCO TEÓRICO ***9***

2.1. Aceites esenciales ***9***
2.1.1. Generalidades 9
2.1.2. Obtención de los aceites esenciales 9
2.1.3. Propiedad antifúngica 10

2.2. Aceites esenciales de cítricos 11

2.3. Aceite esencial de Naranja 12
2.3.1. Aceite esencial de la corteza de los frutos de naranja 12

2.4. Aceite esencial de la corteza de los frutos de mandarina 13

2.5. Microorganismos 14
2.5.1. Hongos 14

2.6. *Carica papaya* (Papaya) 14
2.6.1. Hongos en la papaya 15
2.6.2. *Colletotrichum gloeosporioides* 16
2.6.3. Rhizopus stolonifer 17

CAPÍTULO III ***19***

3. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN ***20***

3.1. Materiales y equipos 20

3.2. Metodología 22

3.3. Ubicación 23

3.4. Diseño de investigación 23

3.5. Diseño experimental 25
3.5.1. Características del experimento 25
3.5.2. Análisis Estadísticos 25
3.5.3. Identificación de la materia prima 25
3.5.4. Variables a evaluarse 26

3.6. Manejo específico del experimento 26

CAPÍTULO IV ***29***

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN ***30***

4.1. Resultados 30
4.2. Discusión 41
CAPÍTULO V 45
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 46
5.1. Conclusiones 46
5.2. Recomendaciones 50
CAPÍTULO VI 51
6. BIBLIOGRAFÍA 52
6.1. Literatura citada 52
6.1.1. Lincografía: 57
CAPÍTULO VII 59
7. ANEXO 60

Índice de Cuadros

Pág

CUADRO N° 1: Descripción Factores de Estudio para la Valoración de los aceites esenciales de naranja y mandarina en la inhibición de hongos de papaya. ***24***

CUADRO N° 2: Combinación de los tratamientos propuestos para la Valoración de los aceites esenciales de naranja y mandarina en la inhibición de hongos de papaya. ***24***

CUADRO N° 3: Esquema del análisis de varianza ***25***

CUADRO N° 4: Análisis de Varianza del porcentaje de inhibición del crecimiento radial del Rhizopus stolonifer ***31***

CUADRO N° 5: Análisis de Varianza del porcentaje de inhibición de esporas del Rhizopus stolonifer ***32***

CUADRO N° 6: Análisis de Varianza de porcentaje de inhibición del crecimiento radial del Colletotrichum gloeosporioides ***33***

CUADRO N° 7 Análisis de Varianza de porcentaje de inhibición de esporas del Colletotrichum gloeosporioides ***34***

CUADRO N°8 Prueba de Tukey por Interacción A*B*C (Aceites esenciales* Origen de los aceites * concentraciones) ***40***

Índice de Tablas

		Pág
Tabla N°1:	Cantidad relativa (%) e identificación de los compuestos volátiles, aislados de las cáscaras de naranja por destilación con vapor	***12***
Tabla N°2:	Análisis de cromatografía de gases acoplada con Espectometría de masa para la identificación y cuantificación de constituyente del aceite esencial de concha de mandarina	***13***

Índice de Gráficos

		Pág
GRÁFICO N° 1:	Muestra las diferencias de medias del Factor A mediante la Prueba de Tukey (p<0,05), la cual determina DS entre AE de *Citrus sinensis* (*Naranja*) y *Citrus nobilis* (*Mandarina*). *R.stolonifer* (DS)	***34***
GRÁFICO N° 2:	Muestra las diferencias de medias del Factor A mediante la Prueba de Tukey (p<0,05), la cual determina DS entre AE de *Citrus sinensis* (*Naranja*) y *Citrus nobilis* (*Mandarina*). *C.gloeosporioides* (DS)	***35***
GRÁFICO N° 3:	Muestra las diferencias de medias del Factor B mediante la Prueba de Tukey (p<0,05), la cual determina DS entre AE de la corteza de los frutos y hojas. *R.stolonifer* (DS)	***36***
GRÁFICO N° 4:	Muestra las diferencias de medias del Factor B mediante la Prueba de Tukey (p<0,05), la cual determina DS entre AE de la corteza de los frutos y hojas. *C.gloeosporioides* (DS)	***37***
GRÁFICO N° 5:	Muestra las diferencias de medias del Factor C mediante la Prueba de Tukey (p<0,05), la cual determina DS entre las concentraciones de AE que se aplicaron 1%, 2%, 4%. *R.stolonifer* (DS)	***38***

GRÁFICO N° 6: Muestra las diferencias de medias del Factor C mediante la Prueba de Tukey (p<0,05), la cual determina DS entre las concentraciones de AE que se aplicaron 1%, 2%, 4%. *C.gloeosporioides* (DS) ***39***

Índice de Anexos

		Pág
Anexo N°1:	Crecimiento radial del *Rhizopus stolonifer*	**60**
Anexo N°2:	Crecimiento radial del *Colletotrichum gloeosporioides*	**61**
Anexo N°3:	Crecimiento radial de los testigos	**62**
Anexo N°4:	Número de esporas de los testigos	**62**
Anexo N°5:	Número de esporas de los hongos	**63**
Anexo N°6:	Porcentajes de inhibición radial y de esporas	**64**
Anexo N°7:	Diagrama de bloque del proceso de inhibición de hongos (*Rhizopus stolonifer sp y Colletotrichum gloeosporioides*) aislados de papaya	**65**
Anexo N°8:	Fotos de la fase experimental	**66**
Anexo N°9:	Pruebas de significación Tukey en el programa Statgraphics	**71**
Anexo N°10:	Técnica de aislamiento de hongos	**75**
Anexo N°11	Certificados de laboratorios	**79**
Anexo N° 12	Certificado de URKUND	**81**

RESUMEN

En esta investigación se valoró los aceites esenciales de naranja *(Citrus sinensis)* y mandarina *(Citrus nobilis)* como inhibidores de los hongos (*Rhizopus stolonifer y Colletotrichum gloeosporioides*) aislados de papaya evaluando el porcentaje de inhibición del crecimiento radial y de esporas mediante reproducción *In Vitro*.

Los aceites extraídos de las cortezas de los frutos de naranja y mandarina se adquirieron del laboratorio ISABRUBOTANIC S.A de la ciudad de Ambato mientras que los aceites de las hojas se realizó la extracción aplicando el método de hidrodestilación en el Laboratorio de Química Básica de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, el aislamiento e inhibición de los hongos se realizó en el laboratorio de Microbiología; para el modelo experimental empleado se requirió de 12 tratamientos con 2 repeticiones. Se evaluaron durante siete días el crecimiento radial y posteriormente se realizó el conteo de esporas en la cámara de NEUBAUER, para observar la diferencia entre los niveles de los tratamientos en estudio se efectuó un análisis estadístico con un arreglo factorial de bloques AxBxC con 2 repeticiones considerando como Factor A: Aceites esenciales (Naranja y Mandarina), Factor B: Origen de los aceites esenciales (Hojas y Corteza de los frutos), Factor C: Concentraciones (1%, 2% y 4%); para el análisis de datos se empleó el paquete estadístico StatGraphics, para la separación de medias de los niveles de los tratamientos se realizó la prueba de significación Tukey ($p < 0,05$).

Los resultados obtenidos revelaron que existió diferencia significativa entre los factores A, B y C tanto en el porcentaje de inhibición radial y de esporas por lo que se recomienda por el Factor A (Aceite esencial de *Citrus sinensis*), Factor B (Aceite esencial de hojas) y Factor C (4% de concentración de aceite) ya que inhibieron el crecimiento radial y de esporas del *Rhizopus stolonifer* y *Colletorichum gloeosporioides*.

Palabras claves: Aceites esenciales, papaya, inhibición, crecimiento radial, *Rhizopus stolonifer* y *Colletorichum gloeosporioides***.**

SUMMARY

In this investigation the essential oils of orange (Citrus sinensis) and tangerine (Citrus nobilis) as inhibitors of fungi (Rhizopus stolonifer and Colletotrichum gloeosporioides) isolated from papaya evaluating the percentage of inhibition of radial growth and spore by reproduction was assessed *In Vitro*.

Oils extracted from the bark of fruit and mandarin orange laboratory acquired ISABRUBOTANIC S.A. de Ambato while oils leaves extraction was performed using the method of hydrodistillation in Basic Chemistry Laboratory of the Universidad Técnbica Estatal de Quevedo, isolation and inhibition of fungi was performed in the laboratory of Microbiology; for the experimental model used is required 12 treatments with 2 repetitions. Radial growth were evaluated for seven days and then the spore count was performed in a Neubauer chamber to observe the difference between the levels of the treatments under study statistical analysis was performed with a block factorial arrangement with 2 repetitions considering AxBxC as Factor A: Essential oils (orange and tangerine), Factor B: Origin of essential oils (leaves and bark of the fruit), Factor C: concentrations (1%, 2% and 4%); for data analysis Statgraphics statistical package was used for the separation of means of treatments levels of significance Tukey test ($p < 0.05$) was performed.

The results revealed significant difference between factors A, B and C in both the percentage of radial inhibition and spore therefore recommended by Factor A (essential oil Citrus sinensis), Factor B (essential oil leaves) and Factor C (4% concentration of oil) they inhibited since radial and spores of Rhizopus stolonifer and Colletorichum gloeosporioides growth.

Keywords: Essential oils, papaya, inhibition, radial growth, Rhizopus stolonifer and Colletorichum gloeosporioides.

CAPÍTULO I

1. MARCO CONTEXTUAL DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Introducción

1.1.1. Antecedentes

Los cítricos se caracterizan fundamentalmente por sus frutos grandes que contienen cantidades abundantes de ácido cítrico, el cual les proporciona el característico sabor ácido, demás todos los miembros del género *Citrus* contienen otros componentes que les otorgan aromas muy profundos, (Rueda, Mancilla, & Parada, 2007).

En los frutos de naranja y mandarina se obtiene aceite esencial principalmente de las cortezas, este proyecto muestra una alternativa para la utilización de los aceites esenciales extraídos de la corteza de los frutos y hojas dándoles un aporte científico evaluando su actividad inhibitoria de microorganismos (hongos).

Los hongos postcosecha causan pudriciones que afectan a calidad de los frutos de lechosa (*Carica papaya L*), actualmente los aceites esenciales son considerados una alternativa a los fungicidas químicos para controlas estos hongos, (Guédez, y otros, 2014).

En frutos de papaya el *Rhizopus stolonifer* produce una frecuente y severa enfermedad postcosecha, el hongo invade a los frutos a través de heridas y de manera rápida pudre los frutos, (Suárez Quiroz, Mendoza Bautista , Monroy Rivera, De la Cruz Medina, Ángulo Guerrero, & Gónzalez Ríos, 2013). Es un agente causal de la enfermedad conocida como pudrición blanda, la cual ocasiona grandes pérdidas económicas, (Plascencia Tenorio, y otros, 2012).

Colletotrichum gloeosporioides es un hongo que causa la enfermedad de la antracnosis en plantas frutales tropicales, lo que resulta en daños y perjuicios de las plantas frutales, bajo rendimiento y calidad de los frutos, el uso de fungicidas químicos es común para la gestión de esta enfermedad, sino que también resulta en el desarrollo de resistencia a los hongos a los productos químicos, (Prapassom, Piyarat, Paweena, & Angsuman, 2012).

En esta investigación se utilizó aceites esenciales extraídos de la corteza de los frutos y hojas de naranja y mandarina; a nivel de laboratorio se aisló los hongos ***Rhizopus stolonifer*** y ***Colletotrichum gloeosporioides*** que causan problemas en la postcosecha de frutos de papaya, se aplicó diferentes concentraciones de aceites esenciales evaluando el porcentaje de inhibición del crecimiento radial y número de esporas, la importancia de estas variables es que el aceite puede inhibir el crecimiento del micelio pero no el de las esporas ya que quedan agrupadas esperando un medio óptimo para su desarrollo.

1.1.2. Problematización

1.1.2.1. Diagnóstico.

En el cantón Valencia de la provincia de Los Ríos se produce distintas variedades de frutas como la papaya que son afectadas por diferentes microorganismos disminuyendo su vida útil.

Para controlar las pudriciones postcosechas se emplean fungicidas químicos, lo cual ha traído como consecuencia un riesgo potencial para la salud humana y de manera adicional el desarrollo de resistencia de los patógenos a dichos productos, (Plascencia Tenorio, y otros, 2012). Estas medidas empiezan a erradicarse abriendo paso a alternativas naturales, (Robles Martínez, 2009).

Las hojas de los árboles no son aprovechadas, las cortezas de los frutos son desechadas en los vertederos de basura y muy pocos lo utilizan como abono de plantas debido al desconocimiento de los usos que se le pueden dar.

Actualmente se han realizado diferentes estudios para inhibir la actividad de los microorganismos como los hongos que son los causantes de los problemas postcosecha en cultivos con fines industriales para exportación como es el caso de la papaya mediante diferentes concentraciones de extractos de plantas esto hace importante la búsqueda en nuestro medio de productos de origen vegetal que no ejerzan efectos secundarios en los productos alimenticios, por ello la importancia de conocer la concentración de aceite esencial que puede

inhibir a los hongos ***(Rhizopus stolonifer*** y ***Colletotrichum gloeosporioides)*** aislados de papaya.

1.1.2.2. Formulación del problema.

¿La falta de información de las propiedades inhibidoras de los aceites esenciales de *Citrus sinensis (*naranja*)* y *Citrus nobilis (*mandarina*)* limitan su aplicación en la conservación de frutas?

1.1.2.3. Sistematización del problema

Existe desconocimiento de la actividad inhibitoria de microorganismos del aceite esencial de las hojas de naranjas y mandarina ya que en la mayoría de investigaciones se ha estudiado la actividad inhibitoria del aceite esencial extraído de la corteza de los frutos de estos cítricos pero no de las hojas. Además es importante conocer las diferencias entre los aceites obtenidos de corteza, frente a los extraídos a partir de las hojas.

Por otro lado, se desconoce la concentración óptima del aceite esencial en la inhibición de hongos aislados de la papaya.

1.1.3. Justificación

En la actualidad el país se encuentra expuesto a muchos cambios entre los cuales se destaca el apoyo a la investigación para conocer las propiedades que tienen las diferentes plantas como los aceites esenciales y aplicarlos en la inhibición de microorganismos que afectan la vida útil de las frutas.

Las frutas tropicales como la papaya tiene gran importancia económica por su alto valor nutritivo, propiedades sensoriales y medicinales, características que han contribuido a incrementar su cultivo, siendo una fruta susceptible al manejo postcosecha por lo que requiere cuidados para evitar pérdidas y mermas de un alto costo económico, (Suárez Quiroz, Mendoza Bautista , Monroy Rivera, De la Cruz Medina, Ángulo Guerrero, & Gónzalez Ríos, 2013).

Las plantas están compuestas por hojas, tallos, raíces, flores y frutos en el caso de los cítricos de la naranja y mandarina se extraen tres aceites

esenciales: esencia de naranja o mandarina, que se obtiene de la cáscara del fruto, se usa sobre todo como agente aromatizante; petigrain, que se obtiene de las hojas y ramillas, se usa en perfumería; y esencia de neroli; extraída de las flores, usada como aromatizante y en perfumería, (Márquez, 2003).

Los aceites esenciales de los cítricos (mandarina, limón, naranja y lima) tienen una alta demanda, principalmente en la industria de los alimentos, farmacéutica y de cosméticos; siendo utilizados en la preparación de aromatizantes, saborizantes, desinfectantes ambientales y como antimicrobianos, (Alvarez Quintero, 2012).

La importancia de esta investigación está en dar valor agregado a las hojas y cortezas de los frutos de la naranja y mandarina obteniendo aceite esencial que inhiba el crecimiento radial y de esporas de los hongos **(*Rhizopus stolonifer*** y ***Colletotrichum gloeosporioides)*** aislado papaya.

1.1.4. Objetivos

1.1.4.1. Objetivo general.

- Valorar los aceites esenciales de *Citrus sinensis* (naranja) y *Citrus nobilis* (mandarina) como inhibidores de los hongos (*Rhizopus stolonifer y Colletotrichum gloeosporioides*) aislados de papaya.

1.1.4.2. Objetivos específicos

- Establecer diferencias entre los aceites esenciales de naranja y mandarina en la inhibición de hongos (*Rhizopus stolonifer y Colletotrichum gloeosporioides*) aislados de papaya.

- Evaluar la actividad inhibitoria de los aceites esenciales de naranja y mandarina considerando su diferencia entre hojas y corteza de los frutos.

- Establecer la concentración óptima de los aceites esenciales para la inhibición de hongos (*Rhizopus stolonifer y Colletotrichum gloeosporioides*) aislados de papaya.

1.1.5. Hipótesis

Hipótesis nula

H_o: Los aceites esenciales de naranja y mandarina no influyen en la inhibición de hongos (*Rhizopus stolonifer y Colletotrichum gloeosporioides)* aislados de papaya.

H_o: Los aceites esenciales de las hojas y corteza de los frutos de naranja y mandarina no influyen en la actividad inhibitoria de microorganismos (hongos).

H_o: El porcentaje de concentración de aceite esencial de naranja y mandarina no influye en la inhibición de hongos (*Rhizopus stolonifer y Colletotrichum gloeosporioides)*.

Hipótesis alternativa

H_a: Los aceites esenciales de naranja y mandarina influyen en la inhibición de hongos (*Rhizopus stolonifer y Colletotrichum gloeosporioides*) aislados de papaya.

H_a: Los aceites esenciales de las hojas y corteza de los frutos de la naranja y mandarina influyen en la actividad inhibitoria de microorganismos (hongos).

H_a: El porcentaje de concentración de aceite esencial de naranja y mandarina influye en la inhibición de hongos (*Rhizopus stolonifer y Colletotrichum gloeosporioides)*.

1.1.6. Variables de estudio

- ✓ Porcentaje de inhibición radial
- ✓ Porcentaje de inhibición de esporas

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Aceites esenciales

2.1.1. Generalidades

Los aceites esenciales son considerados metabolitos secundarios producidos en alguna parte de la planta (hojas, flores, cáscaras, etc.), que pueden contener, dependiendo de la parte y tipo de planta utilizada, algunos de los siguientes compuestos: monoterpenos, a-pineno, limoneno y timol, entre muchos otros; su mecanismo de acción se asocia con la capacidad de interactuar con el citoplasma de la membrana de los patógenos, su modo de acción parece estar estrechamente relacionada con la solubilidad de cada compuesto, los compuestos volátiles de plantas pueden inhibir o estimular el crecimiento del hongo y/o la formación y germinación de las esporas, (Ronquillo De Jesús, 2007).

El aceite esencial es la pequeña porción de materia vegetal que imparte a la planta el olor y sabor que la caracteriza, se utilizan principalmente como fuentes de los aromas y sabores usados en la industria alimentaria, (Sánchez & Pérez, 2009). La principal ventaja de los aceites esenciales es que pueden ser utilizados sobre cualquier alimento y normalmente son considerados como sustancias seguras para el consumo humano, (Velásquez, Álvarez, Tamayo, & Carvalho, 2014).

2.1.2. Obtención de los aceites esenciales

La calidad del aceite depende de factores que influyen sobre la composición como las condiciones geobotánicas del medio (clima, altitud, tipo de suelo, cantidad de lluvias, etcétera.), edad de la planta y estado fenológico, método de cultivo (uso de fertilizantes, abono, pesticidas, otros químicos, etcétera.), época de recolección, modo de manejo y almacenamiento del material vegetal (fresco, seco, fermentado, etcétera.) y método de obtención del aceite (destilación,

maceración, prensado, extracción con solventes, extracción con fluidos supercríticos, etcétera), (Cerón & Cardona, 2011).

2.1.2.1. Hidrodestilación.

Se denomina hidrodestilación a la destilación de las flores u otras partes de la planta por medio del vapor de agua, en donde dicho vapor se encarga de arrastrar el aceite esencial presente en la parte sometida al proceso, los aceites esenciales poseen un punto de ebullición superior al del agua, pero en la mezcla de aceite esencial más agua presenta un punto de ebullición inferior y por esto puede ser destilada; al pasar por el condensador los vapores se enfrían, se condensan y se transforman en un líquido formado por dos fases inmiscibles, (Contreras Puentes & Ruiz Pérez, 2012):

Fase orgánica: Es la parte que contiene el aceite esencial, (Contreras Puentes & Ruiz Pérez, 2012).

Fase acuosa: La cual contiene cierta cantidad de esencia, (Contreras Puentes & Ruiz Pérez, 2012).

2.1.3. Propiedad antifúngica

Una de las alternativas que se han estudiado con resultados prometedores, se basa en el hecho que las plantas elaboran metabolitos secundarios, con la finalidad de disminuir el ataque de parásitos y depredadores naturales, muchos de estos compuestos se caracterizan por ser inocuos para el ser humano, y se consideran como “funcidas naturales”. (Landero Valenzuela, Nieto Ángel , Téliz Ortiz, Alatorre Rosas, Orozco Santos, & Ortiz García, 2013). Por lo que se incrementó el interés de su aplicación para el manejo de enfermedades en campo y poscosecha, debido al efecto que exhiben sobre los fitopatógenos, (Duarte, Pino, & Martínez, 2013).

El tiempo y las condiciones en que se encuentre almacenado el aceite esencial influyen debido a que este es muy sensible a la luz y a las altas temperaturas por lo que dichos factores pueden intervenir en el poder inhibitorio del aceite,

(Guerra, Soto, Medina, Ojeda, & Peña, 2014). Además, la actividad de los aceites esenciales contra mohos también puede ser evaluada por el control de la inhibición de la esporulación y la producción de toxinas; en este sentido, se puede resumir que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales depende principalmente de tres características hidrófilo o hidrófobo, sus componentes químicos y el tipo de microorganismos al que debe atacar, (Reyes-Jurado, Palou, & López-Malo, 2012).

2.2. Aceites esenciales de cítricos

Los cítricos tienen un alto interés nutricional debido a la gran variedad de sustancias de interés dietético (aromas, flavonoides, vitaminas, pectinas, etc.) que contienen las diferentes partes que lo componen, (Sánchez & Pérez, 2009). Los compuestos principales pertenecen a la familia de los mono y sesquiterpenos, ambos grupos de sustancias encuentran su origen biogenético en la condensación de Isopentenilpirofosfato(IPP) con dimetilalilpirofosfato (DMAPP), gracias a la articulación de un complejo enzimático es posible obtener mezclas de buen número de componentes y abundantes isómeros, con amplia variabilidad funcional y estructural, (Alvarez Quintero, 2012).

Los aceites esenciales de cítricos pueden ser una adecuada alternativa al uso de conservantes químicos en la industria de alimentos, al verificar la actividad antifúngica de aceites esenciales de limón, pomelo y naranjo dulce sobre los principales hongos causantes de pérdidas en los alimentos (*Aspergillus niger, A. flavus, Penicillium chrysogenum y P. verrucosum*), (Velásquez, Álvarez, Tamayo, & Carvalho, 2014).

Los aceites esenciales de cítricos son insolubles en agua, pero se hacen más solubles cuando se emplean en bajas concentraciones usando alcohol como disolvente, (Yánez Rueda, Lugo Mancilla, & Parada Parada, 2007). La aplicación de aceites esenciales de mandarina, cidra, limón y lima, aumentaron la vida útil de ensalada de frutas y redujeron la carga microbiana, sin alterar las características sensoriales del producto, (Rodríguez Sauceda, 2011).

2.3. Aceite esencial de Naranja

El aceite esencial de naranja se encuentra principalmente en sacos de forma ovalada en el flavedo o en la porción anaranjada de la cáscara y actúa como una barrera toxica natural para muchos microorganismos e insectos, (Cerón & Cardona, 2011). El aceite de Naranja Valencia es considerado como el de mayor calidad dentro de los aceites de naranja, como así también lo son dentro de su grupo el aceite de Limón Italiano y el de Mandarinas Verdes, (Montti, Visciglio, Raviol, Subovich, & Munitz, 2013).

2.3.1. Aceite esencial de la corteza de frutos de naranja

En la corteza de naranja los componentes más importantes son de naturaleza terpénica (en su mayoría monoterpenos y aldehídos); el componente más abundante es el limoneno, con contenidos que varían entre 76 y 94,5%, el linalol también se encuentra a una elevada concentración al igual que el mirceno, otro monoterpeno carbonilo encontrado es la carvona, producto de oxidación en condiciones ácidas del limoneno, al igual que el α-terpineol y el valenceno presente en la cera cuticular, entre los aldehídos se encuentra el octanal, decanal y nonanal, cuya concentración generalmente aumenta con el estado de madurez [6-8], (Durán, Luz, Montes, & Peláez, 2012).

Tabla N°1: Cantidad relativa (%) e identificación de los compuestos volátiles, aislados de las cáscaras de naranja por destilación con vapor

Tiempo de retención	Nombre compuesto	Cantidad relativa (%)
5,212	α- Pineno	0,532
7,187	β- felandreno	0,492
8,109	β- mirceno	1,753
9,238	D-Limoneno	90,967
10,794	γ- terpinoleno	1,649
12,564	Octanal	0,199
18,030	Decanal	0,230
19,197	Linalol	1,267
19,534	Octanol	0,532
Compuestos no identificados		2,379

Fuente: (Cerón & Cardona, 2011).

(Sharma & Tripathi, 2008), evaluaron la actividad anti fúngica de aceites esenciales extraídos a partir del epicarpio de naranjo dulce (Citrus sinensis (L.) Osbeck) sobre crecimiento de Aspergillus niger (L.) Van Tieghem, y encontraron una reducción o inhibición total proporcional a la dosis aplicada.

Son muchos los factores que influyen en la composición de aceites esenciales, denominada quimiotipo, entre ellos los más importantes son el origen, la especie y el órgano de la planta, (Velásquez, Álvarez, Tamayo, & Carvalho, 2014).

2.4. Aceite esencial de la corteza de los frutos de mandarina

El aceite esencial obtenido de la cáscara de esta fruta es de color amarillo dorado de olor dulce y delicado. Entre sus propiegades generales se encuentra su capacidad antiviral, calmante, diurético, estimulante y revitalizador, (Márquez, 2003).

Tabla N°2: Análisis de cromatografía de gases acoplada con Espectometría de masa para la identificación y cuantificación de constituyente del aceite esencial de concha de mandarina

Compuesto	Composición Másica (%)
α pineno	2,18
α Cubebeno	4,66
Limoneno	66,5
Careno	2,19
Cetonas	5,19
α Felandreno	4,74
Linalool	2,46
Otros alcoholes	3,82
Otros terpenos	2,80
Otros hidrocarburos y aldehídos	6,26

Fuente: (Márquez, 2003)**.**

2.5. Microorganismos

2.5.1. Hongos

Los hongos son organismos microscópicos del reino Fungi que viven en las plantas y en los animales, nadie sabe cuántas especies de hongos existen, pero se estima que están dentro del rango de diez mil, o talvés 300,000 o más; la gran mayoría son organismos filamentosos (como hilachas) y la producción de esporas es característica del reino Fungi en general. Estas esporas pueden ser transportadas por aire, agua o insectos, (USDA, 2010).

La mayoría de los hongos viven libres en el suelo o en el agua y obtienen su energía por respiración o fermentación de materiales orgánicos solubles presentes en estos ambientes; el aire no es un medio en el que pueden desarrollarse los microorganismos pero es el portador de aerosoles biológicos como polvo, gotitas de agua y otros, que pueden estar cargados de los diversos grupos de microorganismos, (López Tevez & Torres, 2006).

2.5.1.1. Efecto de hongos en la salud humana.

Uno de los efectos más importantes de los ataques de hongos sobre la parte comestible de la papaya es la inducción a la micotoxocosis: es decir, enfermedades de animales y del hombre ocasionadas por el consumo de alimentos invadidos por hongos que producen sustancias tóxicas denominadas micotoxinas, la ingestión de alimentos que contienen micotoxinas, pueden producir efectos graves, tanto en el hombre como animales; estas sustancias pueden ocasionar enfermedades graves a nivel hepático, renal, del aparato circulatorio y de los órganos hematopoyéticos, aun cuando sean ingeridos en dosis pequeñas, (Rodríguez Lacherre & Veneros Terrones, 2011).

2.6. *Carica papaya* (Papaya)

Es un *Caricaceae* propia de clima templado a cálido, ampliamente conocida y se cultiva casi en todos los países de regiones tropicales y subtropicales de

América, la principal característica de la parte comestible, los frutos de “papaya” es su gran valor nutritivo; caracterizándose por un adecuado balance de compuestos orgánicos e inorgánicos: 100g de la parte comestible contiene en promedio 39 Kcal de energía, 88,8% de agua, 8.90g de carbohidratos, 24,0mg de Ca, 15,0mg de P, 10,0mg Mg, 3,1mg de Fe, 3,0mg de Na, 257,0mg de K, 61,8mg de vitamina C, 38,0mg de ácido fólico, 284,0 U.I de vitamina A, (Rodríguez Lacherre & Veneros Terrones, 2011).

Después de cosechados, los frutos pasan por una serie de transformaciones endógenas resultantes del metabolismo celular, el aumento de los azúcares solubles, de agua libre y de las pectinas es acompañado por la reducción de alguno componentes fenólicos y protopectínicos, que tornan los frutos más sensibles al daño mecánico y al a taque de diversos microorganismos, principalmente de hongos causantes de pudrición, (L, Mendoza Bautista, Monroy Rivera, De la Cruz Medina, Angulo Guerrero, & Gonzáles Ríos, 2013).

2.6.1. Hongos en la papaya

La antracnosis es una limitante de la vida útil de los frutos de papaya, es causada principalmente por *Colletotrichum gloeosporioides* (Santamaría Basulto, Díaz Plaza, Gutiérrez Alonso, Santamaría Férnandez, & Larqué-Saavedra, 2011). La enfermedad se manifiesta en cualquier etapa de desarrollo del fruto, con mayor intensidad en los frutos maduros y las flores, el hongo se disemina por el viento y penetra principalmente por heridas, ya sea las causadas por insectos, por la cicatriz que queda al desprenderse una hoja o por el roce con las frutas, (Lugo de Cumare & Fuguet de Alvarado, 2004).

En frutos de papaya produce una frecuente y severa enfermedad postcosecha, el hongo *Rhizopus stolonifer* invade a los frutos a través de heridas y de manera rápida pudre los frutos, cuando el hongo rompe la cutícula de la papaya llegando hasta las semillas, el fruto enfermo se cubre con un micelio aéreo de color blanco grisáceo de textura áspera, (Suárez Quiroz, Mendoza Bautista , Monroy Rivera, De la Cruz Medina, Ángulo Guerrero, & Gónzalez Ríos, 2013).

2.6.2. *Colletotrichum gloeosporioides*

Es un hongo fitopatógeno que causa pérdidas considerables en frutales tropicales, principalmente por producir tizones foliares y pudrición de frutos en postcosecha, (Ruiz Sánchez, Mejía Bautista, Alejo, Valencia Botín, & Reyes Ramírez, 2014); presenta colonias con abundante micelio blanco al principio en el medio de cultivo APD, pero luego se tornan grisáceas a oscuras con la edad, con masas de esporas o conidios color rosado a salmón principalmente en el centro de la colonia, conidios cilíndricos, con extremos obtusos a redondeados, hialinos, sin septos y uninucleados, (Pineda, Principal, Barrios, Milla , Solano, & Gil, 2010).

2.6.2.1. Inhibición de *C. gloeosporioides*.

En papaya (*Carica papaya L*) durante el almacenamiento los extractos de acetato de etilo de *Lantana cámara* resultado en el más alto de inhibición (con zona de inhibición de 35,3 mm) y mostraron niveles de inhibición de la germinación de esporas, que alcanzó el 88,7%, el 85,8%, el 85,1% y el 84,6% fueron registrados por el control por extractos de *Lantana camara, viburnoides Lantana, Echinops sp*. y *Ruta chalepensis*, (Ademe, Ayalew, & Woldetsadik, 2013).

El mejor efecto fungicida observado en el crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Rhizopus stolonifer sp* se obtuvo con el aceite esencial de tomillo a concentraciones de 8µl, (Ronquillo De Jesús, 2007).

La inhibición del crecimiento estuvo alrededor del 30%, las diluciones del propóleos al 15%, 20% y 30% estadísticamente no presentaron diferencias significativas entre sí, por lo cual resultaron similares en su efecto, (Pineda, Principal, Barrios, Milla , Solano, & Gil, 2010).

En lo mostrado por (Silva, Pereira, & Nakano, 2011); inicialmente la inhibición micelial se puede observar que las concentraciones de 100 y 200 mg obtuvo los mejores resultados con la inhibición de 58 y 61%, pero no 100% después de 7 días de incubación, de modo que ningún efecto fungicida aceite *Neem*,

sólo efecto fungistático y la inducción de hongo sólo a una concentración de 200g para formar apresório.

Los extractos de ajo (*Allium sativum*) (10 y 15 %) y canela (*Cinnamomum zeylanicum*) (0,0050; 0,0100; 0,0150 %) mostraron efecto fungicida para supresión de crecimiento micelial (100 %), inhibición de germinación (100 %) y esporulación del hongo (100 %), considerándose estos extractos como los más promisorios para inhibir el desarrollo del hongo in vitro, (Landero Valenzuela, Nieto Ángel , Téliz Ortiz, Alatorre Rosas, Orozco Santos, & Ortiz García, 2013).

2.6.3. Rhizopus stolonifer

Es un agente causal de la enfermedad conocida como pudrición blanda, la cual ocasiona grandes pérdidas económicas, puede crecer y desarrollarse a temperaturas que van desde los 10°C hasta los 33°C y humedades relativas variables se ve seriamente afectado por temperaturas menores a los 5°C, es un hongo que se encuentra como saprofito sobre pedazos de fruta o cualquier material orgánico, su micelio es aéreo se puede reproducir sexual y asexualmente por medio de dos estructuras morfológicamente similares, el resultado de esta fusión es la formación de una zigospora, la cual tiene paredes gruesas que le dan resistencia para poder mantenerse latentes en el suelo por varios meses soportando condiciones de escases de agua y altas temperturas hasta que encuentra la condiciones necesarias para desarrollarse, (Plascencia Tenorio, y otros, 2012).

2.6.3.1. Inhibición del *R.stolonifer.*

En la investigación de (Guédez, y otros, 2014), la actividad antifúngica del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis L*) sobre los hongos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Penicillium indicum*, *Fusarium solani*, *Rhizopus stolonifer* y *Aspergillus flavus*; los resultados mostraron que existe un efecto inhibidor del aceite esencial de naranja (AEN) en el crecimiento micelial de los hongos *in vitro*, superior al 80% a concentraciones de AE de 1% y 100% de inhibición a concentraciones de 2,5% y 5% de AE ($p<0,05$).

En la investigación de (Tzortzakis & Economakis, 2007) menciona que: la producción de esporas de hongos inhibió hasta el 70% a 25 ppm de concentración de aceite de hierba de limón en comparación con las placas equivalentes almacenados en el aire ambiente.

Los extractos acetónicos tuvieron un efecto inhibitorio de 2 a 22%. Los extractos metanólicos tuvieron un efecto inhibitorio significativo a dosis de 5 y 10 mg/mL sobre los aislados de Cuautla (18 y 62%) y San Carlos (14 y 76%), respectivamente en el aislado de Yautepec se presentó un mayor efecto a las tres dosis ensayadas con una inhibición del crecimiento micelial de 46 a 94%, (Barrera Necha & Bautista Baños, 2008).

Los extractos hidroalcohólico y diclorometánico mostraron variaciones en su comportamiento y no lograron inhibir completamente la formación de esporas, a pesar de presentar valores por arriba del 88%; el extracto metanólico de las semillas de *Swietenia humilis* contiene diversos limonoides conocidos como humilinoides, a los que se les puede atribuir el efecto fungicida (esporocida), (Angulo Escalante, Armenta Reyes, García Estrada, Carrillo Fasio, Salazar Villa, & Valdéz Torres, 2009).

Entre los tratamientos naturales, a los tres y cinco días de simulación de puesta en venta, se obtuvo el mayor porcentaje de inhibición micelial con el propóleo, alrededor de un 50%, (Perera González, y otros, 2011).

CAPÍTULO III

3. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Materiales y equipos

La presente investigación se realizó en los laboratorios de: Química Básica, Biotecnología y Microbiología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, utilizando los materiales y equipos.

3.1.1. Materiales de laboratorio

PDA (Papa Dextrosa Agar)

Materiales	Equipos	Reactivos
• Matraz Erlenmeyer 1000mL • Marcador indelible • Papel aluminio • Varilla de vidrio • Envases de vidrio	• Microondas • Refrigerador • Autoclave • Balanza	• PDA (Papa Dextrosa Agar) • Sulfato de Estreptomicina"GM" • Alcohol • Agua destilada

Elaborado por: Narváez, F. 2015.

Aislamiento hongos de *Carica papaya*

Materiales	Equipos	Reactivos
• Cajas Petri • Probeta 100 mL • Marcador indeleble • Algodón • Papel toalla • Bisturí • Pinzas de disección • Cinta Parafilm • Mechero	• Cámara de aislamiento laminar • Incubadora	• PDA (Papa Dextrosa Agar) con antibiótico (Sulfato de Estreptomicina"GM") al 1%. • Alcohol • Agua esterilizada • Hipoclorito al 3%

Elaborado por: Narváez, F. 2015.

Repique de hongos

Materiales	Equipos	Otros
• Tubos de ensayo • Cajas Petri • Gradilla • Marcador indeleble • Algodón • Asa • Mechero	• Cámara de aislamiento laminar • Refrigerador • Incubadora	• Hongo madre de *Rhizopus stolonifer* • Hongo madre de *Colletotrichum gloeosporioides* • Alcohol

Elaborado por: Narváez, F. 2015.

Inhibición de hongos

Materiales	Equipos	Reactivos
• Matraz Erlenmeyer 100mL • Probeta de 100 mL • Cajas Petri • Marcador indelible • Algodón • Mechero • Asa • Micropipeta de 100 µL a 1000µL • Cinta Parafilm • Pipetas Pasteur esterilizadas • Calibrador de Vernier	• Cámara de flujo laminar • Incubadora • Contador de colonias	• PDA (Papa Dextrosa Agar) • Sulfato de Estreptomicina"GM" • Alcohol • Agua destilada • Solución de TWEEN 20 • Aceite esencial de hojas y corteza de frutos de mandarina • Aceite esencial de hojas y corteza de los frutos de naranja

Elaborado por: Narváez, F. 2015.

Conteo de esporas

Materiales	Equipos	Reactivos
• Probeta de 10mL • Varilla de vidrio • Gasa • Microtubos eppendorf • Micropipeta de 10µL a 100µL • Marcador indeleble • Mechero • Papel toalla	• Microscopio Olympus CX21 • Agitador Vortex • Cámara de recuento Neubauer • Contador de Esporas	• Solución de TWEEN 20 • Agua esterilizada • Alcohol

Elaborado por: Narváez, F. 2015.

3.2. Metodología

Los aceites esenciales extraídos de las corteza de los frutos de naranja y mandarina se adquirieron en el Laboratorio ISABRUBOTANIC S.A., mientras que los aceites de las hojas se obtuvieron en el Laboratorio de Química Básica aplicando el método de hidrodestilación; para el aislamiento de los hongos de la papaya se preparó el sustrato de PDA (Papa Dextrosa Agar) con el 1% antibiótico para evitar el desarrollo de bacterias, para su conservación se lo guardó en refrigeración; en el aislamiento de los hongos se adquirió las papayas de la variedad Maradol y se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 3% durante 2 min, posteriormente se secó con papel toalla esterilizada, en la cámara de aislamiento laminar previamente desinfectada con alcohol, se retiró el epicarpio de la fruta con el bisturí cortando una muestra del mesocarpio y se colocó en las cajas petri dispensadas con PDA, dejándolas en la incubadora a una temperatura de 24°C por 3 días para el desarrollo de los hongos, una vez desarrollados se repicaron en tubos de ensayo con PDA tipo pico flauta tomando muestras para su identificación que para el *Rhizopus stolonifer* se realizó en el microscopio Motic BA310 en el lente EF-N Plan 4/0,10 mientras que el *Colletotrichum gloeosporioides* se observó en el microscopio UNICO con el lente SP 10/0,25, cuando se desarrollaron en los tubos de ensayo se sembraron en cajas Petri dejándolos en incubadora a la temperatura antes mencionada durante 7 días para evaluar su crecimiento; finalmente se aplicó las diferentes concentraciones de los aceites esenciales de la corteza de los frutos y de las hojas de naranja y mandarina para evaluar su actividad inhibitoria controlando diariamente durante 7 días el crecimiento radial con el calibrador de Vernout en el contador de colonias, después se realizó el conteo de esporas colocando 10mL de agua esterilizada en la caja petri donde se desarrolló el hongo con una varilla se raspó el micelio y se filtró en los microtubos eppendorf con gasa esterilizada, se aplicó un gota de la solución de TWEEN 20 y se agitó, el conteo se realizó en una cámara de recuento NEUBAUER en el microscopio Olympus CX21 con el lente 10, contado las esporas utilizando el contador de esporas.

Para establecer diferencias entre los niveles de los tratamientos en estudio incluyen dos tipos de aceites esenciales con diferentes orígenes y concentraciones en su aplicación como inhibidores de hongos de papaya, el primer y segundo factor presentan 2 niveles mientras que el tercer factor presentó tres niveles, se realizaron dos repeticiones por cada tratamiento.

Para el análisis de datos se empleó el paquete estadístico StatsGraphics Centurión de la Universidad de Massachusetts, se calcularon las medias y desviaciones estándar de las lecturas en consideración. Se aplicó ADEVA (Análisis de varianza) con un nivel de significancia de 0.05% se realizó prueba de significancia con TUKEY para la comparación de medios.

3.3. Ubicación

Para la realización de este estudio se utilizó materiales y equipos disponibles en el Laboratorio de Química Básica, Biotecnología y Microbiología la Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

Ubicación geográfica

Altitud:	120 m.s.n.m
Longitudes:	79º 28’ 30” Oeste
Latitud:	1º 6’ S
Tº media:	24.8

Fuente: IGM (Instituto Geográfico Militar).

3.4. Diseño de investigación

3.4.1. Factores de estudio

Los factores de estudio que intervinieron en esta investigación fueron los siguientes:

Cuadro N° 1: Descripción Factores de Estudio para la Valoración de los aceites esenciales de naranja y mandarina en la inhibición de hongos de papaya.

Factores	Simbología	Descripción
A: Aceites esenciales	a_0 a_1	Naranja Mandarina
B: Origen del aceite	b_0 b_1	Hojas Corteza del fruto
C: Concentraciones	c_0 c_1 c_2	1 % 2 % 4 %

Elaborado por: Narváez, F. 2015.

3.4.2. Tratamientos

Se aplicó un diseño completamente al azar (DCA) en un arreglo factorial A*B*C, dando lugar al siguiente cuadro de tratamientos:

Cuadro N° 2: Combinación de los tratamientos propuestos para la Valoración de los aceites esenciales de naranja y mandarina en la inhibición de hongos aislados de papaya.

TRATAMIENTO	SIMBOLOGÍA	DESCRIPCIÓN
T1	$a_0b_0c_0$	Naranja, Hojas, 1 %
T2	$a_0b_0c_1$	Naranja, Hojas, 2%
T3	$a_0b_0c_2$	Naranja, Hojas, 4 %
T4	$a_0b_1c_0$	Naranja, Corteza del fruto, 1%
T5	$a_0b_1c_1$	Naranja, Corteza del fruto, 2%
T6	$a_0b_1c_2$	Naranja, Corteza del fruto, 4 %
T7	$a_1b_0c_0$	Mandarina, Hojas, 1 %
T8	$a_1b_0c_1$	Mandarina, Hojas, 2 %
T9	$a_1b_0c_2$	Mandarina, Hojas, 4 %
T10	$a_1b_1c_0$	Mandarina, Corteza del fruto, 1 %
T11	$a_1b_1c_1$	Mandarina, Corteza del fruto, 2 %
T12	$a_1b_1c_2$	Mandarina, Corteza del fruto, 4 %

Elaborado por: Narváez, F. (2015)

3.5. Diseño experimental

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar, con dos repeticiones con arreglo factorial A x B x C, donde A representó el aceite esencial, B origen del aceite esencial y C concentraciones, dando como resultado un total de 12 tratamientos.

3.5.1. Características del experimento

Número de tratamientos: 12
Número de repeticiones: 2
Unidades experimentales: 24

3.5.2. Análisis Estadísticos

Cuadro N° 1: Esquema Del Análisis De Varianza

Fuente de Variación	Grados de Libertad
Factor A:Aceites Esenciales	1
Factor B:Origen de Aceite esencial	1
Factor C:Concentraciones	2
REPETICIONES	1
INTERACCIONES	
A*B	1
A*C	2
B*C	2
A*B*C	2
ERROR EXPERIMENTAL	11
TOTAL	23

Elaborado por: Narváez, F. 2015

3.5.3. Identificación de la materia prima

Recolección: Las papayas de la variedad Maradol, se adquirió en el Cantón Valencia de la provincia de Los Ríos.

Reconocimiento: Las papayas utilizadas en esta investigación presentaron un nivel de descomposición siendo visible la agresión de hongos.

3.5.4. Variables a evaluarse

- Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los hongos (***Rhizopus stolonifer sp y Colletotrichum gloeosporioides***).

- Porcentaje de inhibición de esporas de los hongos (***Rhizopus stolonifer sp y Colletotrichum gloeosporioides***).

3.6. Manejo específico del experimento

Para la inhibición de los hongos (***Rhizopus stolonifer sp y Colletotrichum gloeosporioides***) aislados de papaya aplicando aceites esenciales de la corteza de los frutos y hojas de naranja y mandarina se utilizaron técnicas del Laboratorio de Química Básica y Microbiología.

- **Obtención de los aceites esenciales**

Los aceites esenciales extraídos de la corteza de los frutos de naranja y mandarina se adquirieron del laboratorio ISABRUBOTANIC.S.A. de la ciudad de Ambato mientras que para los aceites de las hojas se realizó la extracción por medio del método de hidrodestilación en el laboratorio de Química Básica en el balón de asiento plano se colocó 70g de muestra y 500mL de agua ubicándolo en la manta de calentamiento y armando el equipo con la trampa de Clevenger y el refrigerante, dejando la muestra por 3 horas a 70°C, para la separación del aceite esencial del agua se utilizó éter etílico y sulfato de sodio, conservando los aceites en frascos ámbar protegidos de la luz en refrigeración a 4 °C.

- **Preparación del PDA (Papa Dextrosa Agar)**

Para la preparación del PDA (Papa Dextrosa Agar) se realizó de acuerdo a la técnica del (Anexo N°10) utilizando 39g de PDA disolviendo en 400mL de agua se mantuvo en el microondas durante 10 minutos esperando que se disuelva completamente se agregan 600mL de agua quedando de un color claro, se

debe evitar que se derrame en el microondas ya que se pierde la concentración, cuando estuvo completamente disuelto se aplicó el 1% del antibiótico (Sulfato de Estreptomicina ”GM”) y se esterilizó por tres horas en el autoclave para su conservación se lo mantuvo en refrigeración.

- **Desinfección de la papaya**

La papaya se lavó con agua eliminando cualquier residuo de tierra y micelio de algún hongo que se halla desarrollado; luego se desinfectó con una solución de hipoclorito de sodio al 3% durante 2 minutos se enjuagó tres veces con agua esterilizada para eliminar los residuos de cloro ya que si no se realiza los hongos no se desarrollan; posteriormente se secó con papel toalla esterilizado.

- **Aislamiento de los hongos**

El aislamiento de los hongos se utilizó la técnica del (Anexo N° 9) realizándose en la cámara de aislamiento laminar previamente desinfectada con alcohol, retirando el epicarpio con el bisturí esterilizado cortando pequeños fragmentos de mesocarpio de la papaya, con la pinza esterilizada se siembra cinco fracciones de papaya en la caja petri dispensada con PDA (Papa Dextrosa Agar) rotulando y sellando con cinta Parafilm para dejar en la incubadora por 7 días a 24°C; cuando el hongo se desarrolló completamente se mantuvo en refrigeración ya que fue la muestra madre.

- **Repique de hongos aislados**

El hongo se aíslo en la cámara laminar cerca del mechero se abre la caja petri del hongo madre con el asa se quitó una parte del hongo sembrándolo en el centro de los tubos de ensayo con PDA (Papa Dextrosa Agar) tipo pico flauta se dejaron en la incubadora a 24°C por 5 días; posteriormente para conocer el tiempo de desarrollo del hongos se sembró en cajas Petri y se esperó hasta que el hongo cubrió totalmente la caja; el *Rhizopus stolonifer* se desarrolló en 2 días mientras que el *Colletotrichum gloeosporioides* en 7 días .

- **Proceso de Inhibición de hongos**

Para la inhibición de los hongos (***Rhizopus stolonifer sp y Colletotrichum gloeosporioides***) se dejaron dos testigo para comparar con los tratamientos evaluando el porcentaje de inhibición de los aceites esenciales de la naranja y mandarina obtenidos de la corteza de los frutos y hojas; se utilizaron concentraciones de 4%,2% y 1% disueltos en una solución de Tween 20 y PDA dispensado en cajas Petri, se sembró los hongos dejándolos en la incubadora a 24°C; se realizó un control del desarrollo de los hongos durante 7 días midiendo el crecimiento radial con el calibrador Vernaut y el contador de colonias; para calcular el % de inhibición del crecimiento radial de los hongos se utilizó la siguiente fórmula:

$$\%\ de\ Inhibición = \frac{Crecimiento\ micelial\ testigo - Crecimiento\ micelial\ tratamiento}{Crecimiento\ micelial\ testigo} * 100$$

- **Conteo de esporas**

Para el conteo de esporas se aplicó la técnica (Anexo N°10); donde se empleó 10mL de agua esterilizada en la caja Petri donde se desarrolló el hongo con una varilla se raspó el micelio filtrandose en microtubos eppendorf, se aplicó una gota de la solución de TWEEN 20 y se agitó por 10 segundos, en la cámara de Neubauer se cubrió con el líquido obtenido y se cubrió con un cubreobjeto situándolo en el microscopio Olympus CX21 observando las esporas con el lente 10 contándolas con el contador de esporas; para calcular el porcentaje de inhibición de las esporas se aplicó la siguiente fórmula:

$$\%\ de\ Inhibición = \frac{Número\ de\ esporas\ testigo - Número\ de\ esporas\ tratamiento}{Número\ de\ esporas\ testigo} * 100$$

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

4.1.1. Análisis de Varianza para las variables a estudiar

En el anexo N° 5 se reportan los datos del porcentaje de inhibición del crecimiento radial y esporas del *Rhizopus stolonifer* y *Colletotrichum gloeosporioides*.

CUADRO N° 4: Análisis de Varianza del porcentaje de inhibición del crecimiento radial del *Rhizopus stolonifer*

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Aceites Esenciales	3680,88	1	3680,88	72,46	0,0000
B:Origen de Aceite esencial	3680,88	1	3680,88	72,46	0,0000
C:Porcentaje de dilución	2472,4	2	1236,2	24,34	0,0001
D:REPETICIONES	54,3338	1	54,3338	1,07	0,3232
INTERACCIONES					
AB	3680,88	1	3680,88	72,46	0,0000
AC	2472,4	2	1236,2	24,34	0,0001
BC	2472,4	2	1236,2	24,34	0,0001
ABC	2472,4	2	1236,2	24,34	0,0001
RESIDUOS	558,783	11	50,7985		
TOTAL (CORREGIDO)	21545,4	23			

($P < 0.05$)

Elaborado por: Narváez, F. 2015

El cuadro N°4 indica el análisis de varianza (ADEVA) para el porcentaje de inhibición del crecimiento radial del *Rhizopus stolonifer*: existió diferencia significativa en el Factor A (Aceites esenciales), Factor B (Origen de los aceites esenciales), Factor C (Concentraciones), en las interacciones A*B, A*C, B*C y A*B*C; mientras que en las repeticiones no se observó diferencia significativa esto indica que existió normalidad en la toma de datos del experimento, por lo que es recomendable proseguir con la investigación.

CUADRO N° 5: Análisis de Varianza del porcentaje de inhibición de esporas del *Rhizopus stolonifer*

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
EFECTOS PRINCIPALES					
A:ACEITES ESENCIALES	495,133	1	495,133	49855,06	0,0000
B:ORIGEN DE ACEITES	1298,45	1	1298,45	130741,54	0,0000
C: CONCENTRACIONES	130,923	2	65,4616	6591,35	0,0000
D:REPETICIONES	0,00260417	1	0,00260417	0,26	0,6187
INTERACCIONES					
AB	486,45	1	486,45	48980,83	0,0000
AC	262,995	2	131,498	13240,54	0,0000
BC	134,919	2	67,4596	6792,53	0,0000
ABC	271,788	2	135,894	13683,21	0,0000
RESIDUOS	0,109246	11	0,00993144		
TOTAL (CORREGIDO)	3080,77	23			

($P < 0.05$)

Elaborado por: Narváez, F. 2015

El cuadro N°5 indica el análisis de varianza (ADEVA) para el porcentaje de inhibición del número de esporas del *Rhizopus stolonifer*: existió diferencia significativa en el Factor A (Aceites esenciales), Factor B (Origen de los aceites esenciales), Factor C (concentraciones), en las interacciones A*B, A*C, B*C y A*B*C; mientras que en las repeticiones no se observó diferencia significativa esto indica que existió normalidad en la toma de datos del experimento, por lo que es recomendable proseguir con la investigación.

CUADRO N° 6: Análisis de Varianza de porcentaje de inhibición del crecimiento radial del *Colletotrichum gloeosporioides*

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
EFECTOS PRINCIPALES					
A:ACEITES ESENCIALES	851,923	1	851,923	71,32	0,0000
B:ORIGEN DE ACEITE ESENCIAL	851,923	1	851,923	71,32	0,0000
C:PORCENTAJE DE DILUCION	563,261	2	281,631	23,58	0,0001
D:REPETICIONES	4,7082	1	4,7082	0,39	0,5429
INTERACCIONES					
AB	851,923	1	851,923	71,32	0,0000
AC	563,261	2	281,631	23,58	0,0001
BC	563,261	2	281,631	23,58	0,0001
ABC	563,261	2	281,631	23,58	0,0001
RESIDUOS	131,389	11	11,9445		
TOTAL (CORREGIDO)	4944,91	23			

($P < 0.05$)

Elaborado por: Narváez, F. 2015

El cuadro N°6 indica el análisis de varianza (ADEVA) para el porcentaje de inhibición del crecimiento radial del *Colletotrichum gloeosporioides*: existió diferencia significativa en el Factor A (Aceites esenciales), Factor B (Origen de los aceites esenciales), Factor C (concentraciones), en las interacciones A*B, A*C, B*C y A*B*C; mientras que en las repeticiones no se observó diferencia significativa esto indica que existió normalidad en la toma de datos del experimento, por lo que es recomendable proseguir con la investigación.

CUADRO N° 7: Análisis de Varianza del porcentaje de inhibición de esporas del *Colletotrichum gloeosporioides*

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
EFECTOS PRINCIPALES					
A:ACEITES ESENCIALES	5864,38	1	5864,38	127490,64	0,0000
B:ORIGEN DEL ACEITE	7128,4	1	7128,4	154970,24	0,0000
C: CONCENTRACIONES	159,823	2	79,9116	1737,27	0,0000
D:REPETICIONES	0,0840167	1	0,0840167	1,83	0,2037
INTERACCIONES					
AB	5864,38	1	5864,38	127490,64	0,0000
AC	238,085	2	119,043	2587,97	0,0000
BC	159,823	2	79,9116	1737,27	0,0000
ABC	238,085	2	119,043	2587,97	0,0000
RESIDUOS	0,505983	11	0,0459985		
TOTAL (CORREGIDO)	19653,6	23			

($P < 0.05$)

Elaborado por: Narváez, F. 2015

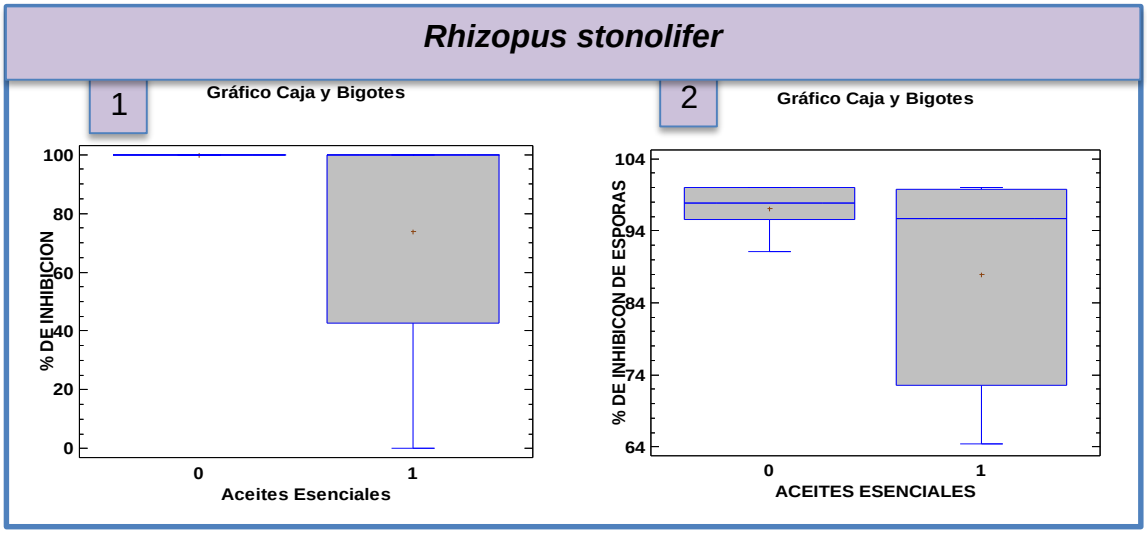
El cuadro N°7 del análisis de varianza (ADEVA) para el porcentaje de inhibición del número de esporas del *Colletotrichum gloeosporioides*: existió diferencia significativa en el Factor A (Aceites esenciales), Factor B (Origen de los aceites esenciales), Factor C (concentraciones), en las interacciones A*B, A*C, B*C y A*B*C; mientras que en las repeticiones no se observó diferencia significativa esto indica que existió normalidad en la toma de datos del experimento, por lo que es recomendable proseguir con la investigación.

4.1.2. Resultados con relación a los factores de estudio (prueba de significación Tukey)

En el anexo N° 7 se reportan los cuadros de las diferencias de medias de los niveles del Factor A, B y C mediante la Prueba de Tukey ($p<0,05$) del porcentaje de inhibición del crecimiento radial y esporas del *Rhizopus stolonifer* y *Colletotrichum gloeosporioides*.

4.1.2.1. Resultados con relación al Factor A (Aceites esenciales).

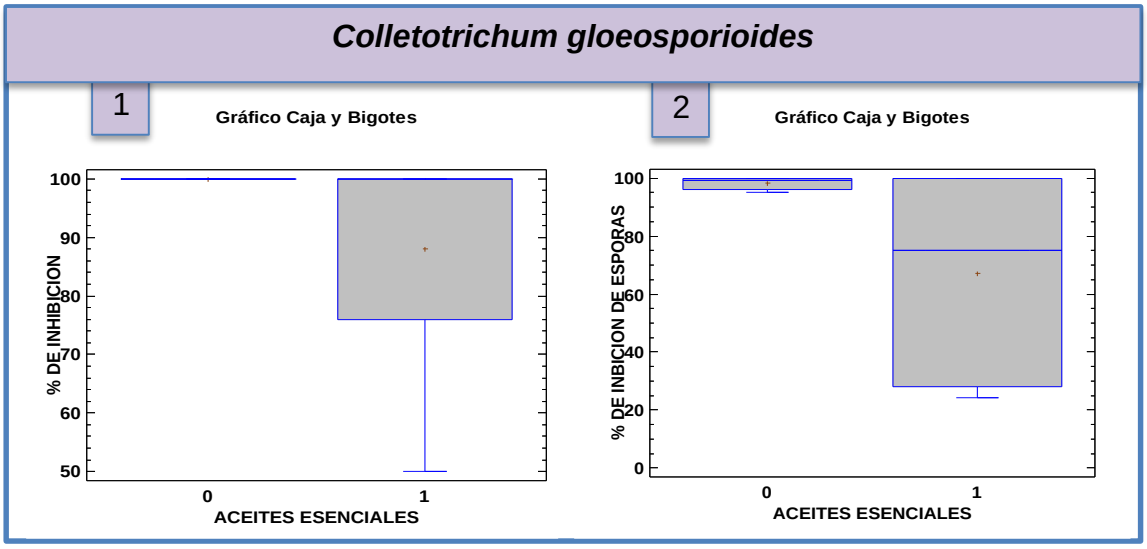
GRÁFICO N° 1: Muestra las diferencias de medias de los niveles del Factor A mediante la Prueba de Tukey ($p<0,05$); a_0 *Citrus sinensis* (*Naranja*) y a_1 *Citrus nobilis* (*Mandarina*); *R.stolonifer,* 1- Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (a_1=75,23% y a_0=100%), 2- Porcentaje de inhibición del número de esporas (a_1=87,98% y a_0=97,06%).



Elaborado por: Narváez, F. 2015

El grafico N°1 indica los valores de Tukey ($p<0.05$) para la separación de medias de los dos niveles del Factor A, se encontró diferencia significativa en: porcentaje de inhibición del crecimiento radial del *Rhizopus stolonifer* presentando un el valor más alto (100%) a_0 (*Citrus sinensis*) mientras que en el porcentaje de inhibición del número de esporas el valor más alto fue (97,06%) a_0 (*Citrus sinensis*).

GRÁFICO N° 2: Muestra las diferencias de medias de los niveles del Factor A mediante la Prueba de Tukey ($p<0,05$); a_0 *Citrus sinensis* (*Naranja*) y a_1 *Citrus nobilis* (*Mandarina*); *C.gloeosporioides*, 1-Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (a_1= 80,91% y a_0=100%), 2-Porcentaje de inhibición del número de esporas (a_1 =67,13% y a_0 =98,39%).

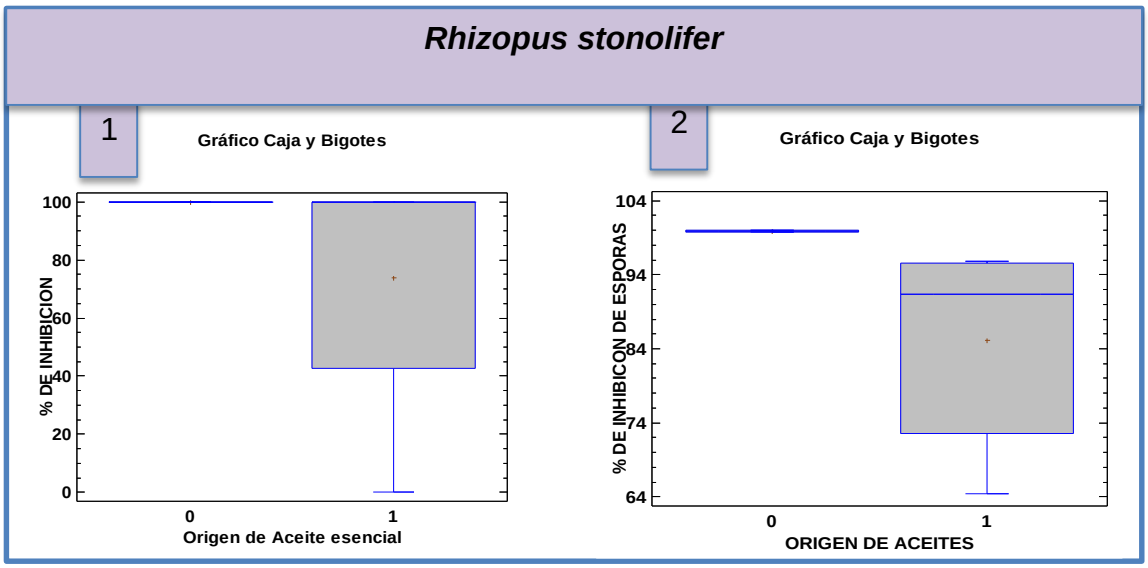


Elaborado por: Narváez, F. 2015

El grafico N°2 indica los valores de Tukey ($p<0.05$) para la separación de medias de los dos niveles del Factor A, se encontró diferencia significativa en: porcentaje de inhibición del crecimiento radial del *Colletotrichum gloeosporioides* presentando un valor más alto (100%) a_0 (*Citrus sinensis*) mientras que en el porcentaje de inhibición del número de esporas el valor más alto (98,39%) a_0 (*Citrus sinensis*).

4.1.2.2. Resultados con relación al Factor B (Origen de los aceites).

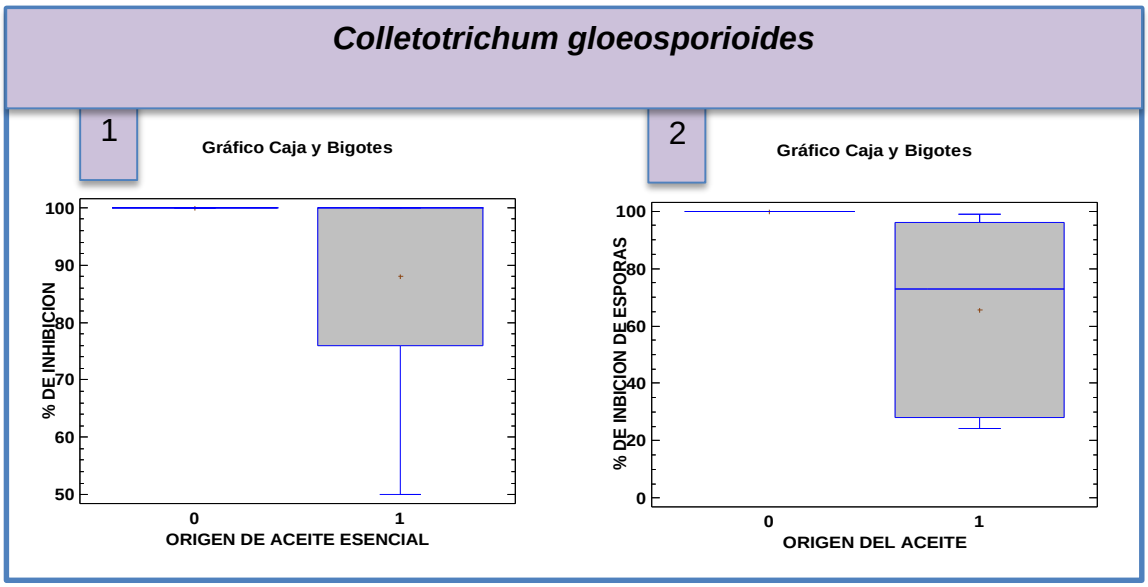
GRÁFICO N° 3: Muestra las diferencias de medias del Factor B mediante la Prueba de Tukey ($p<0,05$), la cual determina DS entre AE de la corteza de los frutos y hojas; *R.stolonifer* 1-Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (b_1=75,23% y b_0=100%), 2- Porcentaje de inhibición del número de esporas (b_1=85,16% y b_0=99,88%).



Elaborado por: Narváez, F. 2015

El grafico N°3 indica los valores de Tukey ($p<0.05$) para la separación de medias de los dos niveles del Factor B, se encontró diferencia significativa en: porcentaje de inhibición del crecimiento radial del *Rhizopus stolonifer* presentó un valor alto (100%) b_0 (Aceite esencial de las hojas) mientras que en el porcentaje de inhibición del número de esporas el valor más alto fue (99,88%) b_0 (Aceite esencial de las hojas).

GRÁFICO N° 4: Muestra las diferencias de medias del Factor B mediante la Prueba de Tukey (p<0,05), la cual determina DS entre AE de la corteza de los frutos y hojas; *C.gloeosporioides,* 1-Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (b_1= 88,08% y b_0=100%), 2-Porcentaje de inhibición del número de esporas (b_1 =65,53% y b_0 =100%).

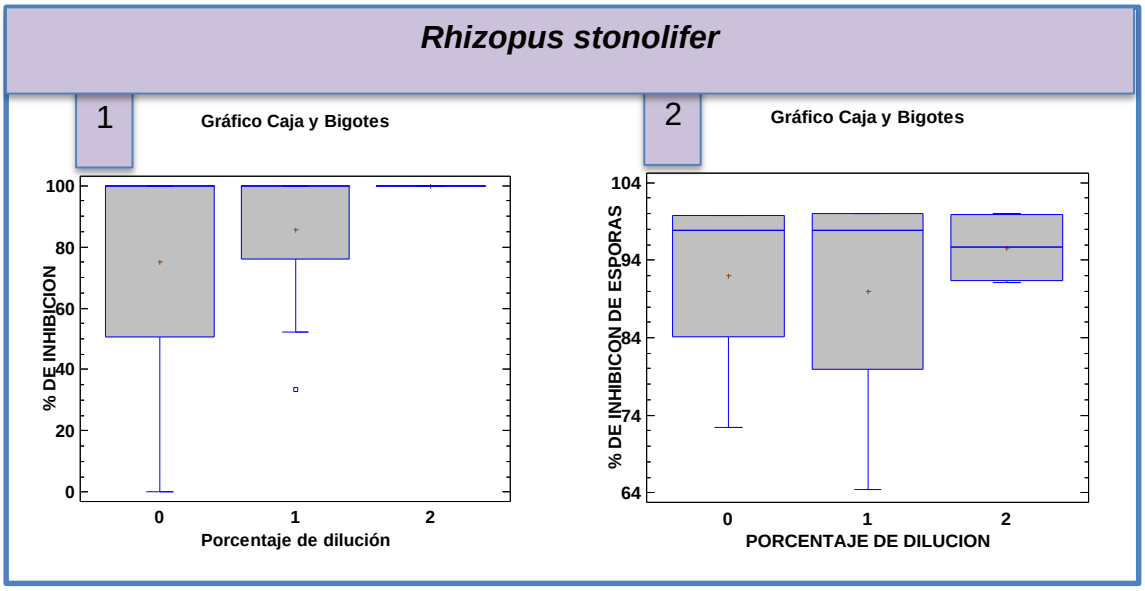


Elaborado por: Narváez, F. 2015

El grafico N°4 indica los valores de Tukey (p<0.05) para la separación de medias de los dos niveles del Factor B, se encontró diferencia significativa en: porcentaje de inhibición del crecimiento radial del *Colletotrichum gloeosporioides* presentando el valor más alto (100%) b_0 (Aceite esencial de las hojas) mientras que en el porcentaje de inhibición del número de esporas el mayor valor fue (100%) b_0 (Aceite esencial de las hojas).

4.1.2.3. Resultados con relación al Factor C (concentraciones).

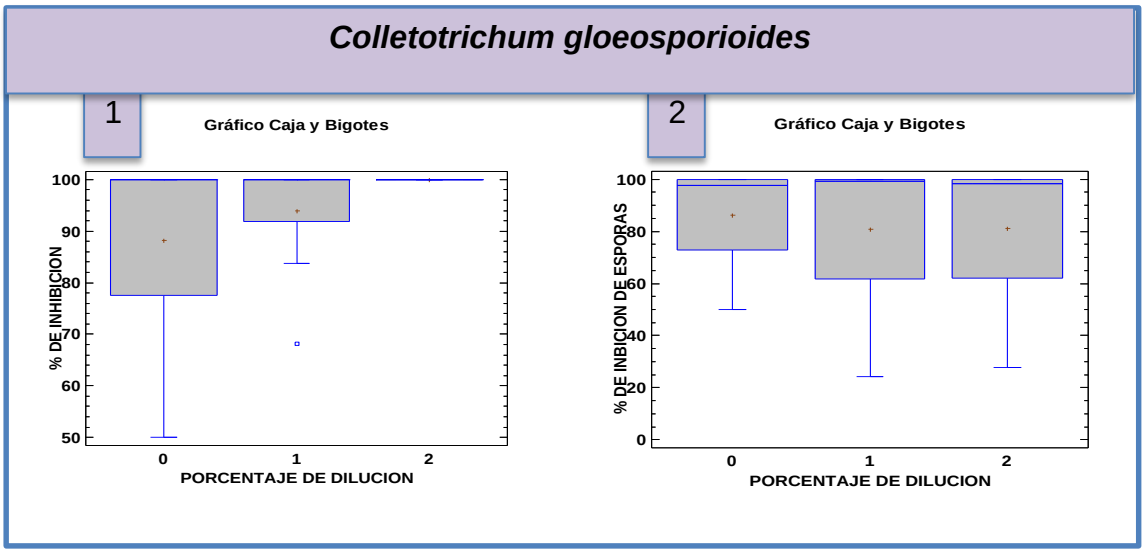
GRÁFICO N° 5: Muestra las diferencias de medias del Factor C mediante la Prueba de Tukey ($p<0,05$), la cual determina DS entre las concentraciones de AE que se aplicaron 1%, 2%, 4%; *R.stolonifer*; 1-Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (c_0=75,13%, c_1=87,70% y c_2=100%); 2-Porcentaje de inhibición del número de esporas (c_1=89,99%, c_0=91,95% y c_2=95,62%).



Elaborado por: Narváez, F. 2015

El grafico N°5 indica los valores de Tukey ($p<0.05$) para la separación de medias de los dos niveles del Factor C, se encontró diferencia significativa en: porcentaje de inhibición del crecimiento radial del *Rhizopus* presentando el valor más alto (100%) c_2 (4%) mientras que en el porcentaje de inhibición del número de esporas del el valor más alto (95,62%) c_2 (4%).

GRÁFICO N° 6: Muestra las diferencias de medias del Factor C mediante la Prueba de Tukey ($p<0,05$), la cual determina DS entre las concentraciones de AE que se aplicaron 1%, 2%, 4%; C. gloeosporioides, 1.- Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (c_0= 88,13%, c_1=93,99% y c_2=100%), 2.-Porcentaje de inhibición del número de esporas (c_1 =80,81%, c_2=81,06% y c_0 =86,41%).



Elaborado por: Narváez, F. 2015

El grafico N°6 indica los valores de Tukey ($p<0.05$) para la separación de medias de los dos niveles del Factor C, se encontró diferencia significativa en: porcentaje de inhibición del crecimiento radial del *Colletotrichum gloeosporioides* presentando el valor más alto (100%) c_2 (4%) mientras que en el porcentaje de inhibición del número de esporas el valor más alto (86,41%) c_2 (4%).

4.1.2.4. Resultados con respecto a la Interacción A*B*C.

CUADRO N° 8 Prueba de Tukey por Interacción A*B*C (Aceites esenciales* Origen de los aceites * concentraciones)

Factor A*B*C			% de Inhibición de Crecimiento Radial		% de Inhibición de número de esporas	
			Rhizopus stolonifer	***Colletotrichum gloeosporioides***	***Rhizopus stolonifer***	***Colletotrichum gloeosporioides***
a_0	b_0	c_0	C	C	E	G
a_0	b_0	c_1	C	C	E	G
a_0	b_0	c_2	C	C	E	G
a_0	b_1	c_0	C	C	D	D
a_0	b_1	c_1	C	C	D	F
a_0	b_1	c_2	C	C	C	E
a_1	b_0	c_0	C	C	E	G
a_1	b_0	c_1	C	C	E	G
a_1	b_0	c_2	C	C	E	G
a_1	b_1	c_0	A	A	B	C
a_1	b_1	c_1	B	B	A	A
a_1	b_1	c_2	C	C	C	B

Elaborado por: Narváez, F. 2015

El cuadro N°8 indica los valores de Tukey ($p<0.05$), se encontró diferencia significativa en el porcentaje de inhibición radial del *Rhizopus stolonifer y Colletotrichum gloeosporioides* el valor más alto se presentó en **$a_0b_0c_0$** (*Citrus sinensis, Hojas, 1%)*, **$a_0b_0c_1$** *(Citrus sinensis*, Hojas, 2%), **$a_0b_0c_2$** (*Citrus sinensis*, Hojas, 4 %), **$a_0b_1c_0$** (*Citrus sinensis*, Corteza de los frutos, 1%), **$a_0b_1c_1$** (*Citrus sinensis* , Corteza de los frutos, 2%), **$a_0b_1c_2$** (*Citrus sinensis*, Corteza de los frutos, 4 %), **$a_1b_0c_0$** (*Citrus nobilis*, Hojas, 1%), **$a_1b_0c_1$** (*Citrus nobilis*, Hojas, 2 %), **$a_1b_0c_2$** (*Citrus nobilis* , Hojas, 4%) y **$a_1b_1c_2$** (*Citrus nobilis* , Corteza de los frutos, 4 %) con (100%); en el porcentaje de inhibición de esporas del *Rhizopus stolonifer* el mayor valor fue en, **$a_0b_0c_0$** (*Citrus sinensis, Hojas, 1%),* **$a_0b_0c_1$** *(Citrus sinensis*, Hojas, 2%), **$a_0b_0c_2$** (*Citrus sinensis*, Hojas, 4%), **$a_1b_0c_0$** (*Citrus nobilis*, Hojas, 1%), **$a_1b_0c_1$** (*Citrus nobilis* , Hojas, 2%), **$a_1b_0c_2$** (*Citrus nobilis* ,

Hojas, 4%), con (100%) mientras que en el porcentaje de inhibición del número de esporas del *Colletorichum* el mayor valor se presentó en **$a_0b_0c_0$** (*Citrus sinensis, Hojas, 1%)*, **$a_0b_0c_1$** *(Citrus sinensis*, Hojas, 2%), **$a_0b_0c_2$** (*Citrus sinensis*, Hojas, 4%), **$a_1b_0c_0$** (*Citrus nobilis*, Hojas, 1%), **$a_1b_0c_1$** (*Citrus nobilis* , Hojas, 2%), **$a_1b_0c_2$** (*Citrus nobilis* , Hojas, 4%) con (100%).

4.2. Discusión

4.2.1. Discusión de Resultados

4.2.1.1. Discusión de Resultados con respecto a los aceites esenciales (Factor A).

En lo referente a los resultados del Factor A (*Citrus sinensis* y *Citrus nobilis)* en porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *R.stolonifer* presentó 75,23% (a_1) a 100% (a_0) los cuales coinciden con lo reportado por (Guédez, Cañizalez, Avendaño, Scorza, Castillo, Olivar, Méndez y Sánchez) en su investigación titulada: Actividad antifúngica del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis* L.) sobre hongos postcosecha en frutos de lechosa (*Carica papaya* L.) (2014) (100%); mientras que en el porcentaje de inhibición de esporas del *R.stolonifer* mostró 87,98% (a_1) a 97,06% (a_0) valores que son superiores a los mencionados en el trabajo de (Perera, Pérez, Hernández, Lobo, López, Puerta & Torres) en su investigación titulada: Evaluación de la eficacia de fungicidas naturales y químicos en el control de enfermedades postcosecha sobre distintas variedades de papaya (II) (2011) (50%).

En el porcentaje de inhibición del crecimiento radial del *C.gloeosporioides* reveló 80,91% (a_1) a 100% (a_0) siendo superior al obtenido por (Pineda, Principal, Barrios, Milla , Solano, & Gil) en su estudio titulado: Propiedad fungistática *in vitro* de propóleos sobre tres aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* (2010) (30%); mientras que en el porcentaje de inhibición de esporas se observaron valores de 67,13% (a_1) a 98,39 (a_0) que son inferiores al reportado por (Landero Valenzuela, Nieto Ángel, Téliz Ortiz, Alatorre Rosas,

Orozco Santos, & Ortiz García) en su investigación titulada: Potencial antifúngico de extractos de cuatro especies vegetales sobre el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* en papaya (*Carica papaya*) en poscosecha (2013) (100%).

4.2.1.2. Discusión de Resultados con respecto al origen de los aceites esenciales (Factor B).

Al respecto de los resultados del Factor B (Hojas y corteza de los frutos) en porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *R.stolonifer* presentó 75,23% (b_1) a 100% (b_0) los cuales son superiores a los reportados por (Barrera Necha & Bautista Baños) en su investigación titulada: Actividad Antifúngica de Polvos, Extractos y Fracciones de *Cestrum nocturnum L* sobre el Crecimiento Micelial de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill (2008) (94%); en el porcentaje de inhibición de esporas del *R.stolonifer* presentó 85,16% (b_1) a 99,88% (b_0) siendo superiores al logrado por (Angulo Escalante, Armenta Reyes, García Estrada, Carrillo Fasio, Salazar Villa, & Valdéz Torres) en su investigación titulada: Extractos de Semilla de *Swietenia humilis* Zucc con Actividad Antifúngica en *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. (2009) (88%).

En porcentaje de inhibición del crecimiento radial el *C. gloeosporioides* reveló 88,08% (b_1) a 100% (b_0) coincidiendo con obtenido por (Prapassom, Piyarat, Paweena, & Angsuman) en su investigación titulada: Efecto de Extracto crudo de hojas contra Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Sacc (2012) (100%); mientras que en el porcentaje de inhibición del esporas del *C. gloeosporioides* presentó 65,53% (b_1) a 100%(b_0) siendo este último superior al reportado por (Ademe, Ayalew, & Woldetsadik) en su investigación titulada: Evaluación de la actividad antifúngica de extractos de plantas contra la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) de la papaya (2014) (88,7%).

4.2.1.3. Discusión de Resultados con respecto a las concentraciones (Factor C).

En lo relativo a los resultados del Factor C (1%, 2% y 4% equivalentes a 100µL, 200µL y 400µL) en porcentaje de inhibición del crecimiento radial de

R.stolonifer presentó 75,13% (c_0) a 100% (c_2) los cuales coinciden con el alcanzado por (Ronquillo De Jesús) en su estudio titulado: Evaluación del potencial antimicrobiano de películas comestibles con aceites esenciales *in vitro* e *in situ* (2007) (100%); en el porcentaje de inhibición de esporas del *R.stolonifer* se observó 89,99% (c_1) a 95,62% (c_2) siendo valores superiores a los obtenido por (Tzortzakis & Economakis) en su investigación titulada: Actividad antifúngica del aceite esencial de Lemongrass (*Cymbopogon citratus L.)* contra hongos patógenos de postcosecha (2007) (70%);

En el porcentaje de inhibición del crecimiento radial el *C.gloeosporioides* reveló 88,13% (c_0) a 100% (c_2) los cuales coinciden con lo reportado por (Guédez, Cañizalez, Avendaño, Scorza, Castillo, Olivar, Méndez y Sánchez) en su investigación titulada: Actividad antifúngica del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis* L.) sobre hongos postcosecha en frutos de lechosa (*Carica papaya* L.) (2014) (100%); mientras que en el porcentaje de inhibición de esporas presentó 80,81%(c_1) a 86,41%(c_0) siendo valores superiores a expuesto por (Silva, Pereira, & Nakano) en su investigación titulada: Inhibición del crecimiento micelial y la germinación *Colletotrichum gloeosporioides* aplicando aceite de neem (*Azadirachta indica*) (2011) (61%).

4.2.1.4. Discusión de resultados con respecto a Los aceites esenciales*Origen*Concentraciones (Factor A*B*C).

En lo referente a los resultados de las interacciones (A*B*C) en porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *R.stolonifer* presentó 0,56% $\mathbf{a_1b_1c_0}$ (*Citrus nobilis*, Corteza de los frutos, 1 %) a 100% presentado en $\mathbf{a_0b_0c_0}$ (*Citrus sinensis, Hojas, 1%)*, $\mathbf{a_0b_0c_1}$ *(Citrus sinensis*, Hojas, 2%), $\mathbf{a_0b_0c_2}$ (*Citrus sinensis*, Hojas, 4%), $\mathbf{a_0b_1c_0}$ (*Citrus sinensis*, Corteza de los frutos, 1%), $\mathbf{a_0b_1c_1}$ (*Citrus sinensis* , Corteza de los frutos, 2%), $\mathbf{a_0b_1c_2}$ (*Citrus sinensis*, Corteza de los frutos, 4%), $\mathbf{a_1b_0c_0}$ (*Citrus nobilis*, Hojas, 1%), $\mathbf{a_1b_0c_1}$ (*Citrus nobilis*, Hojas, 2%), $\mathbf{a_1b_0c_2}$ (*Citrus nobilis* , Hojas, 4 %) y $\mathbf{a_1b_1c_2}$ (*Citrus nobilis*, Corteza de los frutos, 4%) los cuales coinciden con (100%) que fue reportado por (Ronquillo De Jesús) en su estudio titulado: Evaluación del potencial antimicrobiano de películas comestibles con aceites esenciales *in vitro* e *in situ* (2007) (100%); en

el porcentaje de inhibición de esporas del *R.stolonifer* se observó 64,38% $\mathbf{a_1b_1c_1}$ (*Citrus nobilis*, Corteza de los frutos, 2%) a $\mathbf{a_0b_0c_1}$ *(Citrus sinensis*, Hojas, 2%), $\mathbf{a_1b_0c_1}$ (*Citrus nobilis*, Hojas, 2%), $\mathbf{a_0b_0c_2}$ (*Citrus sinensis*, Hojas, 4%) con (100%) y $\mathbf{a_1b_0c_2}$ (*Citrus nobilis*, Hojas, 4%), $\mathbf{a_0b_0c_0}$ (*Citrus sinensis, Hojas, 1%),* $\mathbf{a_1b_0c_0}$ (*Citrus nobilis*, Hojas, 1%) con (99,76%) siendo valores superiores al obtenido por (Tzortzakis & Economakis) en su investigación titulada: Actividad antifúngica del aceite esencial de Lemongrass (*Cymbopogon citratus L.)* contra hongos patógenos de postcosecha (2007) (70%).

En el porcentaje de inhibición del crecimiento radial el *C.gloeosporioides* reveló 52,54% $\mathbf{a_1b_1c_0}$ (*Citrus nobilis*, Corteza de los frutos, 1%) a 100% presentado en $\mathbf{a_0b_0c_0}$ (*Citrus sinensis, Hojas, 1%)*, $\mathbf{a_0b_0c_1}$ *(Citrus sinensis*, Hojas, 2%), $\mathbf{a_0b_0c_2}$ (*Citrus sinensis*, Hojas, 4%), $\mathbf{a_0b_1c_0}$ (*Citrus sinensis*, Corteza de los frutos, 1%), $\mathbf{a_0b_1c_1}$ (*Citrus sinensis* , Corteza de los frutos, 2%), $\mathbf{a_0b_1c_2}$ (*Citrus sinensis*, Corteza de los frutos, 4%), $\mathbf{a_1b_0c_0}$ (*Citrus nobilis*, Hojas, 1%), $\mathbf{a_1b_0c_1}$ (*Citrus nobilis*, Hojas, 2%), $\mathbf{a_1b_0c_2}$ (*Citrus nobilis* , Hojas, 4%) y $\mathbf{a_1b_1c_2}$ (*Citrus nobilis*, Corteza de los frutos, 4%) siendo valores superiores a los reportados por (Pineda, Principal, Barrios, Milla , Solano, & Gil) en su estudio titulado: Propiedad fungistática *in vitro* de propóleos sobre tres aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* (2010) (30%); mientras que en porcentaje de inhibición esporas del *C. gloeosporioides* presentó 24,49% $\mathbf{a_1b_1c_1}$ (*Citrus nobilis* , Corteza de los frutos, 2%) a 100%(a_0) correspondiente a $\mathbf{a_0b_0c_0}$ (*Citrus sinensis, Hojas, 1%)*, $\mathbf{a_0b_0c_1}$ *(Citrus sinensis*, Hojas, 2%), $\mathbf{a_0b_0c_2}$ (*Citrus sinensis*, Hojas, 4%), $\mathbf{a_1b_0c_0}$ (*Citrus nobilis*, Hojas, 1 %), $\mathbf{a_1b_0c_1}$ (*Citrus nobilis* , Hojas, 2%), $\mathbf{a_1b_0c_2}$ (*Citrus nobilis* , Hojas, 4%) siendo inferior con lo expuesto por (Silva, Pereira, & Nakano) en su investigación titulada: Inhibición del crecimiento micelial y la germinación *Colletotrichum gloeosporioides* aplicando aceite de neem (*Azadirachta indica*) (2011) (61%).

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

5.1.1. De los aceites esenciales (Factor A)

- Con respecto al hongo *R.stolonifer* en el porcentaje de inhibición del crecimiento radial: existió diferencia significativa, se acepta la hipótesis alternativa y se concluye que el valor más alto presentó el nivel a_0 (100%) (*Citrus sinensis*) frente a_1 (75,23%) (*Citrus nobilis*) los cuales coinciden con (Guédez, y otros, 2014); en el porcentaje de inhibición de esporas también existió diferencia significativa por lo que se acepta la hipótesis alternativa concluyendo que el valor más alto presentado *fue* el nivel a_0 (97,06%) frente al nivel a_1 (87,98%) los cuales son inferiores a los reportados por (Perera González, y otros, 2011).

- Con respecto al hongo *C.gloeosporioides* en el porcentaje de inhibición del crecimiento radial: existió diferencia significativa, se acepta la hipótesis alternativa y se concluye que su valor superior fue a_0 (100%) (*Citrus sinensis*) frente a a_1 (80,91%) (*Citrus nobilis*) siendo superiores a los de (Pineda, Principal, Barrios, Milla , Solano, & Gil, 2010); con respecto al porcentaje de inhibición de espora: existió diferencia significativa, se acepta la hipótesis alternativa y se concluye que el mayor valor fue a_0 (98,39%) (*Citrus sinensis*) frente a_1 (67,13%) (*Citrus nobilis*) los que son inferiores a los reportados por (Landero Valenzuela, Nieto Ángel , Téliz Ortiz, Alatorre Rosas, Orozco Santos, & Ortiz García, 2013).

5.1.2. Del origen de los aceites esenciales (Factor B)

- Con respecto al hongo *R.stolonifer* en el porcentaje de inhibición del crecimiento radial: existió diferencia significativa, se acepta la hipótesis alternativa y se concluye que el valor más alto fue b_0 (100%) (*Hojas*) frente a b_1 (75,23%) (*Corteza de los frutos*) los cuales son superiores a los reportados por (Barrera Necha & Bautista Baños, 2008); en el porcentaje de inhibición de esporas existió diferencia significativa por lo que se acepta la hipótesis alternativa concluyendo que el valor más alto presentó en el nivel b_0 (99,88%) (*Hojas*) frente a b_1 (85,16%) (*Corteza de los frutos*) los cuales son inferiores a los reportados por (Angulo Escalante, Armenta Reyes, García Estrada, Carrillo Fasio, Salazar Villa, & Valdéz Torres, 2009).

- Con respecto al hongo *C.gloeosporioides* en el porcentaje de inhibición del crecimiento radial: existió diferencia significativa, se acepta la hipótesis alternativa y se concluye que el valor más alto fue b_0 (100%) (*Hojas*) frente a b_1 (88,08%) (*Corteza de los frutos*) coincidiendo con (Prapassom, Piyarat, Paweena, & Angsuman, 2012); con respecto al porcentaje de inhibición de espora: existió diferencia significativa, se acepta la hipótesis alternativa y se concluye que el valor más alto presentó b_0 (100%) (*Hojas*) frente a b_1 (65,53%) (*Corteza de los frutos*) siendo el mayor valor más alto que el expuesto por (Ademe, Ayalew, & Woldetsadik, 2013).

5.1.3. De las concentraciones de los aceites esenciales (Factor C)

- Con respecto al hongo *R.stolonifer* en el porcentaje de inhibición del crecimiento radial: existió diferencia significativa, se acepta la hipótesis alternativa y se concluye que el valor más alto presentó c_2 (100%) (*4%*) frente a c_0 (75,13%) (*1%*) los que coinciden a los alcanzados por (Ronquillo De Jesús, 2007); con respecto al porcentaje de inhibición de espora: existió diferencia significativa, se acepta la hipótesis alternativa y se concluye que el valor más alto fue

el nivel c_2 (95,62%) (*4%*) frente a c_1 (89,99%) (*2%*) los cuales son superiores a los reportados por (Tzortzakis & Economakis, 2007).

- Con respecto al hongo *C.gloeosporioides* en el porcentaje de inhibición del crecimiento radial: existió diferencia significativa, se acepta la hipótesis alternativa y se concluye que el valor más alto fue c_2 (100%) (*4%*) frente a c_0 (88,13%) (*1%*) coincidiendo con (Guédez, y otros, 2014); con respecto al porcentaje de inhibición de espora: existió diferencia significativa, se acepta la hipótesis alternativa y se concluye el mayor fue c_0 (86,41%) (*1%*) frente a c_1 (80,81%) siendo valores superiores a los expuesto por (Silva, Pereira, & Nakano, 2011).

5.1.4. De las interacciones de los aceites esenciales*Origen*Concentraciones (Factor A*B*C)

- Con respecto al hongo *R.stolonifer* en el porcentaje de inhibición del crecimiento radial: existió diferencia significativa, se acepta la hipótesis alternativa y se concluye que el valor más alto fue 100% mostrado en $\mathbf{a_0b_0c_0}$ (*Citrus sinensis, Hojas, 1%)*, $\mathbf{a_0b_0c_1}$ *(Citrus sinensis*, Hojas, 2%), $\mathbf{a_0b_0c_2}$ (*Citrus sinensis*, Hojas, 4 %), $\mathbf{a_0b_1c_0}$ (*Citrus sinensis* , Corteza de los frutos, 1%), $\mathbf{a_0b_1c_1}$ (*Citrus sinensis* , Corteza de los frutos, 2%), $\mathbf{a_0b_1c_2}$ (*Citrus sinensis* , Corteza de los frutos, 4 %), $\mathbf{a_1b_0c_0}$ (*Citrus nobilis*, Hojas, 1 %), $\mathbf{a_1b_0c_1}$ (*Citrus nobilis* , Hojas, 2 %), $\mathbf{a_1b_0c_2}$ (*Citrus nobilis* , Hojas, 4 %) y $\mathbf{a_1b_1c_2}$ (*Citrus nobilis* , Corteza de los frutos, 4 %) frente a 0,56% lo presentó el nivel $\mathbf{a_1b_1c_0}$ (*Citrus nobilis*, Corteza de los frutos, 1 %) los que coinciden con los reportados por (Ronquillo De Jesús, 2007); en lo referente al porcentaje de inhibición de espora: existió diferencia significativa, se acepta la hipótesis alternativa y se concluye que el valor más alto presentado en *R.stolonifer* fue (100%) presentado en los niveles $\mathbf{a_1b_0c_2}$ (*Citrus nobilis* , Hojas, 4 %), $\mathbf{a_0b_0c_0}$ (*Citrus sinensis, Hojas, 1%),* $\mathbf{a_1b_0c_0}$ (*Citrus nobilis*, Hojas, 1 %) frente a 64,38% $\mathbf{a_1b_1c_1}$

(*Citrus nobilis* , Corteza de los frutos, 2%) valores que fueron superiores a los obtenidos por (Tzortzakis & Economakis, 2007).

- Con respecto al hongo *C.gloeosporioides* en el porcentaje de inhibición del crecimiento radial: existió diferencia significativa, se acepta la hipótesis alternativa y se concluye que el mayor valor fue 100% se presentó en **$a_0b_0c_0$** (*Citrus sinensis, Hojas, 1%)*, **$a_0b_0c_1$** *(Citrus sinensis*, Hojas, 2%), **$a_0b_0c_2$** (*Citrus sinensis*, Hojas, 4 %), **$a_0b_1c_0$** (*Citrus sinensis* , Corteza de los frutos, 1%), **$a_0b_1c_1$** (*Citrus sinensis* , Corteza de los frutos, 2%), **$a_0b_1c_2$** (*Citrus sinensis* , Corteza de los frutos, 4 %), **$a_1b_0c_0$** (*Citrus nobilis*, Hojas, 1 %), **$a_1b_0c_1$** (*Citrus nobilis* , Hojas, 2 %), **$a_1b_0c_2$** (*Citrus nobilis* , Hojas, 4 %) y **$a_1b_1c_2$** (*Citrus nobilis* , Corteza de los frutos, 4 %) frente a 52,54% correspondiente al nivel **$a_1b_1c_0$** (*Citrus nobilis*, Corteza de los frutos, 1 %) coincidiendo con (Pineda, Principal, Barrios, Milla , Solano, & Gil, 2010); con respecto al porcentaje de inhibición de espora: existió diferencia significativa, se acepta la hipótesis alternativa y se concluye que el valor más alto fue (100%) correspondiente a **$a_0b_0c_0$** (*Citrus sinensis, Hojas, 1%)*, **$a_0b_0c_1$** *(Citrus sinensis*, Hojas, 2%), **$a_0b_0c_2$** (*Citrus sinensis*, Hojas, 4 %), **$a_1b_0c_0$** (*Citrus nobilis*, Hojas, 1 %), **$a_1b_0c_1$** (*Citrus nobilis* , Hojas, 2 %), **$a_1b_0c_2$** (*Citrus nobilis* , Hojas, 4 %) frente a 24,49% en el nivel **$a_1b_1c_1$** (*Citrus nobilis* , Corteza de los frutos, 2%) coincidiendo con (Alvarado Hernández, 2009).

5.2. Recomendaciones

5.2.1. De los aceites esenciales (Factor A)

- En lo referente al porcentaje de inhibición del crecimiento radial y esporas de los hongos *Rhizopus stolonifer* y *Colletotrichum gloeosporioides* se recomienda el aceite esencial de *Citrus sinensis* (Naranja).

5.1.1. Del origen del aceite (Factor B)

- En cuanto al origen del aceite esencial en la inhibición del crecimiento radial y de esporas del *Rhizopus stolonifer* y *Colletotrichum gloeosporioides* se recomienda el aceite esencial extraído de las hojas de los cítricos en estudio.

5.1.2. De las concentraciones de aceite esencial (Factor C)

- En lo relacionado a las concentraciones de aceite esencial aplicado para disminuir el crecimiento radial y número de esporas de los hongos *Rhizopus stolonifer* y *Colletotrichum gloeosporioides* se recomienda el empleo de la concentración (4%).

5.1.3. De la Interacción A*B*C (Aceites esenciales * Origen del aceite * Concentraciones)

- De acuerdo a las interacciones A*B*C en relación al porcentaje de inhibición del crecimiento radial y número de esporas del *Rhizopus stolonifer* y *Colletotrichum gloeosporioides* se recomienda **$a_0b_0c_0$** (*Citrus sinensis, Hojas, 1%)*, **$a_0b_0c_1$** *(Citrus sinensis*, Hojas, 2%), **$a_0b_0c_2$** (*Citrus sinensis*, Hojas, 4 %), **$a_1b_0c_0$** (*Citrus nobilis*, Hojas, 1 %), **$a_1b_0c_1$** (*Citrus nobilis* , Hojas, 2 %), **$a_1b_0c_2$** (*Citrus nobilis* , Hojas, 4 %).

CAPÍTULO VI

6. BIBLIOGRAFÍA

6.1. Literatura citada

Ademe, A., Ayalew, A., & Woldetsadik, K. (2013). Evaluation of Antifungal Activity of Plant Extracts against Papaya Anthracnose (Colletotrichum gloeosporioides). *Plant Pathology & Microbiology, 4*(10).

Alvarado Hernández, A. (2009). *Efecto Antifúngico IN VITRO e IN SITU del Quitosano y Aceites esenciales sobre Rhizopus slonifer (Ehrenb.:Fr)Vuill.* Maestría en Ciencias en Manejo Agroecológico en Plagas y Enfermedades, Instituto Politécnico Nacional, Centro de Desarrollo de Producto Bióticos, Yautepec-Morelos.

Alvarez Quintero, R. (2012). *Formulación de un recubriento comestible para frutas cítricas, estudio de su impacto mediante aproximación metabolómica y evaluación de la calidad poscosecha.* Memoria de Tesis Doctoral, Universidad de Antioquía, Facultad de Química Farmaceútica, Medellín-Colombia.

Angulo Escalante, M., Armenta Reyes, E., García Estrada, R., Carrillo Fasio, J., Salazar Villa, E., & Valdéz Torres, J. (2009). Extractos de Semilla de Swietenia humilis Zucc. con Actividad Antifúngica en Rhizopus stolonifer (Ehrenb.:Fr.) Vuill. *Revista Mexican de Fitopatología, 27*(2), 84-92.

Ávalos García, A., & Pérez-Urria Carriel, E. (2009). Metabolismo secundario de las plantas. *REDICA (Biología)*, 119 - 145.

Baños Guevara, P., Zabaleta Mejía, E., Colinas León, M., Luna Romero, I., & Gutiérrez Alonso, J. (2004). Control biológico de Colletotrichum Gloeosporioides [(Penz.) Penz. y Sacc] en papaya Maradol Roja (Carica papaya L) y Fisiología Postcosecha de frutos infectados. *Revista Mexicana de Fitopatología, 22*(2), 198-205.

Barrera Bello , E., Gil Loaiza, M., García Pajón, C., Durango Restrepo, D., & Gil González, J. (2012). Empleo de un Recubrimiento Formulado con

Propóleos para el Manejo Poscosecha de Frutos de Papaya (Carica papaya L. cv. Hawaiana). *UNAL, 65*(1), 6497-6506.

Barrera Necha, L., & Bautista Baños, S. (2008). Actividad Antifúngica de Polvos, Extractos y Fracciones de Cestrum nocturnum L. Sobre el Crecimiento Micelial de Rhizopus stolonifer (Ehrenb.:Fr.) Vuill. *Revista Mexicana de FITOPATOLOGIA, 26*(1), 27-31.

Contreras Puentes, E., & Ruiz Pérez, J. (2012). *Estudio comparativo de dos métodos de extracción para el aceite esencial presente en la cáscara de pomelo (Citrus maxima).* Tesis de grado para obtar el título de Ingeniero Químico , Universidad de Cartagena, Facultad de Ingeniería, Cartagena - Colombia.

Guédez, C., Cañizalez, L., Avendaño, L., Scorza, J., Castillo, C., Olivar, R., y otros. (2014). Actividad antifúngica del aceite esencial de naranja (Citrus sinensis L.) sobre hongos postcosecha en frutos de lechosa (Carica papaya L.). *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 81-85.

Hernández Lauzardo, A., Bautista Baños, S., & Velásquez del Valle, M. (2007). Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. *Recista Fitotécnia Mexicana, 30*(2), 119-123.

Hernádez, R., Fernández,C.,& Baptista,L.(2010).Metodología de la investigación. McGrawHill.

Landero Valenzuela, N., Nieto Ángel , D., Téliz Ortiz, D., Alatorre Rosas, R., Orozco Santos, M., & Ortiz García, C. (2013). Potencial antifúngico de extractos de cuatro especies vegetales sobre el crecimiento de Colletotrichum gloeosporioides en papaya (Carica papaya) en poscosecha. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos.*, 047-062.

Lota, M., De Roca, D., Tomi, F., & Casanova, J. (01 de 2000). Chemical variability of peel and leaf essential oils of mandarins from Citrus reticulata Blanco. *ScienceDirect, 28*(1), 61-78.

Lugo de Cumare, Z., & Fuguet de Alvarado, R. (2004). Antracnosis en frutos de lechosa (Carica papaya L.)del tipo Maradol causada por Colletotrichum gloeosporioides Pentz en el estado Falcón. *Rev.Fac.Agron.(LUZ)*, 207-2012.

Márquez, L. d. (2003). *Extracción del aceite esencial de mandarina (Citrus reticulata) utilizando dioxido de carbono en condición supercrítica como solvente.* Trabajo especial de Grado, Universidad Central de Venezuela, Caracas - Venezuela.

Montti, M., Visciglio, S., Raviol, F., Subovich, G., & Munitz, M. (11 de 2013). Incidencia de la carga inicial de pesticidas en frutas sobre los niveles residuales en aceites esenciales cítricos. *UNER, XXIV*(47), 187 - 218.

Perera González, S., Pérez Hernández, E., Hernández Hernández, J., Lobo Rodrigo, G., López Cepero, J., Puerta, M., y otros. (2011). Evaluación de la eficacia de fungicidas naturales y químicos en el control de enfermedades postcosecha sobre distintas variedades de papaya (ii).

Pineda, J., Principal, J., Barrios, C., Milla , D., Solano, Y., & Gil, E. (2010). Propiedad fungistática in vitro de propóleos sobre tres aislamientos de Colletotrichum gloeosporioides. *Bioline.org, 28*(1), 83-91.

Plascencia Tenorio, R., Olalde Portugal, V., Mena Violante, H., Ceja Torres, L., Venegas González, J., Oyoque Salcedo, G., y otros. (2012). Antagonismo in vitro de aislados bacterianos de fresa comercial y silvestre VS. Botrytis cinerea Y Rhizopus stolonifer. *RA Ximhai, 8*(3), 103-110.

Prapassom, B., Piyarat, N., Paweena, R., & Angsuman, C. (2012). Effect of Crude Leaf Extract on Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Sacc. *Hindawi, 2012*, 6.

Robles Martínez, L. (2009). *Efecto del quitosano en la función mitocondrial del Rhizopus stolonifer.* Tesis para obtener el grado de maestra en Ciencias Quimicobiológicas, Instituto Politécnico Nacional, Mexico.

Rodríguez Lacherre, M., & Veneros Terrones, R. (2011). Control biológico de Trichoderma harzianum RIFAI sobre hongos patógenos de frutos posrcosecha de Carica papaya procedente de zonas de distribución del distrito Trujillo (Perú). *Revista de la Facultad de Ciencias Biológicas*.

Rodríguez Sauceda, E. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai, 7*(1), 153-170.

Ronquillo De Jesús, E. (2007). *Evaluación del potencial antimicrobiano de películas comestibles con aceites esenciales in vitro e in situ.* Posgrado en Biotecnología, Especialización en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, División CBS, Unidad Iztapalapa, Mexico D.F.

Ruiz Sánchez, E., Mejía Bautista, M., Alejo, J., Valencia Botín, J., & Reyes Ramírez, A. (2014). Actividad antagónica de filtrados de "Bacillus subtilis" contra "Colletotrichum gloeosporioides" (Penz.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 5*(7), 1325-1332.

Sanchez, M. F. (2006). Manual práctico de aceites esenciles, aromas y perfumes. *Aivana*.

Santamaría Basulto, F., Díaz Plaza, R., Gutiérrez Alonso, O., Santamaría Férnandez, J., & Larqué-Saavedra, A. (2011). Control de dos especies de "colletotrichum" causantes de antracnosis en frutos de papaya maradol. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 2*(5), 631-643.

Sharma, N., & Tripathi, A. (2008). Effects of Citrus sinensis (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of Aspergillus niger (L.) Van Tieghem. *Science Direct*, 337-344.

Silva, R., Pereira, R., & Nakano, M. (2011). Inibição do crescimento micelial e germinação de Colletotrichum gloeosporioides NA SERINGUEIRA PELO ÓLEO DE NEEM (Azadirachta indica). *Dialnet, 8*(1), 295-303.

Sistema Nacional de Vigilancia y Monitoreo de Plagas - SENASA. (2010). *Rhizopus slonifer.*

Stashenko, E. (2009). *Aceite Esenciales.* Bucaramanga-Santander, Colombia.

Suárez Quiroz, M., Mendoza Bautista , I., Monroy Rivera, J., De la Cruz Medina, J., Ángulo Guerrero, O., & Gónzalez Ríos, O. (2013). Aislamiento, identificación y sensibilidad a antifúngicos de hongos fitopatógenos de papaya CV. Maradol (Carica papaya L.). *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, 14*(2), 115-124.

Suárez, H., Pardo, S., & Cortés, M. (2008). Calidad físico-química y atributos sensoriales de filetes de sajados biopreservados de cachama, empacados al vacío bajo refrigeración. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 330-339.

Tzortzakis, N., & Economakis, C. (2007). Antifungal activity of lemongrass(Cypopogon citratus L.) essential oil against key postharvest pathogens. Elseiver Ltd.

Velásquez, M., Álvarez, R., Tamayo, P., & Carvalho, C. (2014). Evaluación in vitro de la actividad fungistática del aceite esencial de mandarina sobre el crecimiento de Penicillium sp. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 7 - 14.

6.1.1. Lincografía:

Cerón, I., & Cardona, C. (2011). Recuperado el 19 de 11 de 2014, de httppublicaciones.eafit.edu.coindex.phpingcienciaarticleview401401

Dickman, M. (01 de 1993). *dialnet.unirioja.es.* Recuperado el 26 de 04 de 2015, de http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3579724

Duarte, Y., Pino, O., & Martínez, B. (2013). *Revista Cubana Plant Med.* Recuperado el 03 de 11 de 2014, de Scielo: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522013000300013&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1010-2752.

Durán, R., Luz, A., Montes, C., & Peláez, C. (31 de 08 de 2012). *Alimentos Hoy.* Recuperado el 05 de 01 de 2015, de Revista de la Asociación Colombiana de Ciencia y Tecnología de Alimentos: httpwww.alimentoshoy.acta.org.coindex.phphoyarticleview122116

Guerra, L., Soto, L., Medina, G., Ojeda, R., & Peña, J. (2014). *Produción Científica Luz.* Recuperado el 21 de 12 de 2014, de http://www.produccioncientificaluz.orgindex.phpagronomiaarticleview1901118992

Herrera Álvarez, M. L. (30 de 06 de 2013). *Agua, Salud y Vida*. Recuperado el 12 de 11 de 2014, de http://agua-saludvida.blogspot.com/2013/06/el-aceite-esencial-de-naranja-y-sus-usos.htmL

L, M., Mendoza Bautista, I., Monroy Rivera, J., De la Cruz Medina, J., Angulo Guerrero, O., & Gonzáles Ríos, O. (2013). *Redalyc.* Recuperado el 14 de 01 de 2015, de Revista Iberoamericana de Tecnología: httpwww.redalyc.orgpdf81381329290004.pdf

López Tevez, L., & Torres, C. (2006). *Biologia.edu.* Recuperado el 14 de 01 de 2015, de httpwww.biologia.edu.armicrogeneraltp12.pdf

Reyes-Jurado, F., Palou, E., & López-Malo, A. (2012). *UDELAP.* Recuperado el 11 de 11 de 14, de httpwww.udlap.mxwptsiafilesNo6-Vol-1TSIA-6(1)-Reyes-Jurado-et-al-2012.pdf

Sánchez, C., & Pérez, Á. (2009). *Scholar google.* Recuperado el 15 de 01 de 2015, de httpscholar.google.esscholar_urlurl=http%3A%2F%2Fwww.eduonline.ua.es%2Fjornadas2010%2Fcomunicaciones%2F424.pdf&hl=es&sa=T&oi=ggp&ct=res&cd=19&ei=FiO4VPmeJcS70AH8hYCIBQ&scisig=AAGBfm1rGKI9OQq9CIFCVMnG4LG246DSLg&nossl=1&ws=1360x

USDA. (03 de 2010). *Servicio de Inocuidad e Inspección de los Alimentos .* Recuperado el 14 de 01 de 2015, de httpwww.fsis.usda.govwpswcmconnect03e22c03-8062-4ca1-a8c2-fe94bafc0222Molds_Are_They_Dangerous_SP.pdfMOD=AJPERES

Velásquez, M., Alvarez, R., Tamayo, P., & Carvalho, C. (2014 de 01 de 2014). *Revista CORPOICA.* Recuperado el 05 de 01 de 2015, de httpwww.corpoica.org.coSitioWebArchivosRevistaArticulo1_REVISTACORPOICAVol15No1-2014.pdf

Wanda I, A. (07 de 2000). Recuperado el 09 de 01 de 2015, de httpwww.uprm.eduagriculturaseaclinicaclidiaENPapaya.pdf

Yánez Rueda, X., Lugo Mancilla, L., & Parada Parada, Y. (2007). *Redalyc*. Recuperado el 16 de 11 de 2014, de http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90350101

CAPÍTULO VII

7. ANEXO

ANEXO N° 1: CRECIMIENTO RADIAL DEL *Rhizopus stolonifer*

N°	Tratamientos	TIEMPO (Horas)													
		24 H		**48H**		**72H**		**96H**		**120H**		**144H**		**168H**	
		R1	**R2**	**R1**	**R2**	**R1**	**R2**	**R1**	**R2**	**R1**	**R2**	**R1**	**R2**	**R1**	**R2**
1	$a_0b_0c_0$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	$a_0b_0c_1$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	$a_0b_0c_2$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	$a_0b_1c_0$	1/1,1	0	0	0,8/0,9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	$a_0b_1c_1$	1,4/1,1	1,1/1,1	0	1,9/1,9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	$a_0b_1c_2$	1,2/1,3	1/1,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	$a_1b_0c_0$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	$a_1b_0c_1$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	$a_1b_0c_2$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	$a_1b_1c_0$	1,0/1,0	0	0	0	1,9/1,9	1,8/0,8	4,9/3,5	3,4/2,6	6,6/5,4	6,5/5,7	8,4/8,2	8,6/7,2	9,0/9,0	9/8,8
11	$a_1b_1c_1$	1,1/0,7	0,7/0,6	0	0	0	0	0	0	1,1/1,1	0	4,8/3,3	1,8/1,7	6,7/5,3	2,9/2,8
12	$a_1b_1c_2$	1/0,9	1/1,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Elaborado por: Narváez, F. 2015

ANEXO N° 2: CRECIMIENTO RADIAL DEL *Colletotrichum gloeosporioides*

N°	Tratamientos	TIEMPO (Horas)													
		24 H		**48H**		**72H**		**96H**		**120H**		**144H**		**168H**	
		R1	**R2**	**R1**	**R2**	**R1**	**R2**	**R1**	**R2**	**R1**	**R2**	**R1**	**R2**	**R1**	**R2**
1	$a_0b_0c_0$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	$a_0b_0c_1$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	$a_0b_0c_2$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	$a_0b_1c_0$	0	0	0	0	0	0,8/0,8	0	0	0	1,3/1,2	0	0	0	0
5	$a_0b_1c_1$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	$a_0b_1c_2$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	$a_1b_0c_0$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	$a_1b_0c_1$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	$a_1b_0c_2$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	$a_1b_1c_0$	0	0	0	0	0	0	1,6/1,5	1,3/1,2	2,2/2,1	1,9/1,7	2,9/2,7	2,5/2,5	3,5/3,3	3,1/3,1
11	$a_1b_1c_1$	0	0	0	0	0	0	0	0,8/0,7	0,7/0,7	0,9/0,9	0	1,8/1,4	1,1/1,1	2,3/2,1
12	$a_1b_1c_2$	0	0	0	0,8/0,9	0	1/0,9	0	0	0	0	0	0	0	0

Elaborado por: Narváez, F. 2015

ANEXO 3. CRECIMIENTO RADIAL DE LOS TESTIGOS

Testigo Del *R.Stolonifer*	TIEMPO (Horas)													
	24 H		**48H**		**72H**		**96H**		**120H**		**144H**		**168H**	
	R1	**R2**	**R1**	**R2**	**R1**	**R2**	**R1**	**R1**	**R2**	**R1**	**R2**	**R1**	**R2**	**R1**
	5,7/4,9	3,9/3,7	9/9	9/9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Elaborado por: Narváez, F. 2015

Testigo del *C.gloeosporioides*	TIEMPO (Horas)													
	24 H		**48H**		**72H**		**96H**		**120H**		**144H**		**168H**	
	R1	**R2**	**R1**	**R2**	**R1**	**R2**	**R1**	**R1**	**R2**	**R1**	**R2**	**R1**	**R2**	**R1**
	1,1/1,1	1,1/1,1	2,1/2	2,2/2,1	3,1/3,1	3,2/3,2	4,1/4	4,1/4,1	5/5	5,1/5,1	6/6	6/6	6,8/6,8	6,9/6,9

Elaborado por: Narváez, F. 2015

ANEXO 4. NÚMERO DE ESPORAS DE LOS TESTIGOS

Testigo	*Rhizopus slonifer*		*Colletotrichum gloeosporioides*	
	R1	**R2**	**R1**	**R2**
	12775000	10550000	5650000	17600000

Elaborado por: Narváez, F. 2015

ANEXO N° 5: NÚMERO DE ESPORAS DE LOS HONGOS

N°	Tratamientos	*Rhizopus slonifer*		*Colletotrichum gloeosporioides*	
		R1	**R2**	**R1**	**R3**
1	$a_0b_0c_0$	25000	25000	0	0
2	$a_0b_0c_1$	0	0	0	0
3	$a_0b_0c_2$	0	0	0	0
4	$a_0b_1c_0$	525000	550000	275000	250000
5	$a_0b_1c_1$	550000	575000	66666	70000
6	$a_0b_1c_2$	1133333	1100000	200000	225000
7	$a_1b_0c_0$	25000	25000	0	0
8	$a_1b_0c_1$	0	0	0	0
9	$a_1b_0c_2$	25000	25000	0	0
10	$a_1b_1c_0$	3525000	3500000	2816666,67	2800000
11	$a_1b_1c_1$	4550000	4550000	4283333	4250000
12	$a_1b_1c_2$	1100000	1075000	4083333	4050000

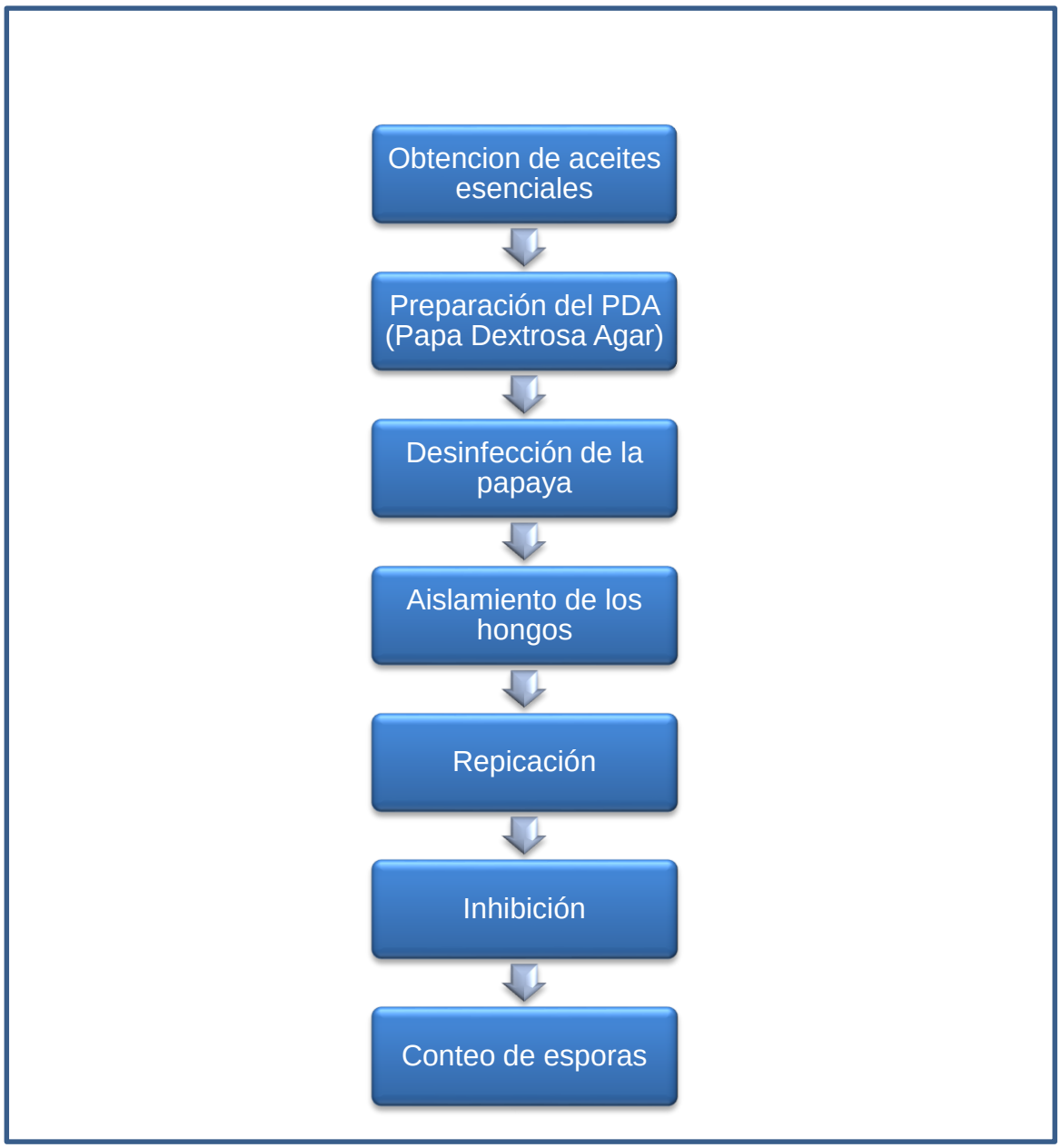
Elaborado por: Narváez, F. 2015

ANEXO N° 6: PORCENTAJES DE INHIBICIÓN RADIAL Y DE ESPORAS

Factor A*B*C			% de Inhibición de Crecimiento Radial				% de Inhibición de número de esporas			
			Rhizopus slonifer		***Colletotrichum gloeosporioides***		***Rhizopus slonifer***		***Colletotrichum gloeosporioides***	
			R1	***R2***	***R1***	***R2***	***R1***	***R2***	***R1***	***R2***
a_0	b_0	c_0	100	100	100	100	99,76	99,76	100	100
a_0	b_0	c_1	100	100	100	100	100	100	100	100
a_0	b_0	c_2	100	100	100	100	100	100	100	100
a_0	b_1	c_0	100	100	100	100	95,89	95,69	95,13	95,58
a_0	b_1	c_1	100	100	100	100	95,69	95,5	98,82	98,76
a_0	b_1	c_2	100	100	100	100	91,13	91,39	96,46	96,02
a_1	b_0	c_0	100	100	100	100	99,76	99,76	100	100
a_1	b_0	c_1	100	100	100	100	100	100	100	100
a_1	b_0	c_2	100	100	100	100	99,76	99,76	100	100
a_1	b_1	c_0	0	1,11	50	55,07	72,41	72,6	50,15	50,44
a_1	b_1	c_1	33,33	68,33	83,82	68,12	64,38	64,38	24,19	24,78
a_1	b_1	c_2	100	100	100	100	91,39	91,59	27,73	28,32

Elaborado por: Narváez, F. 2015

ANEXO N°7. Diagrama de bloques del proceso de inhibición de hongos (*Rhizopus stolonifer sp y Colletotrichum gloeosporioides*) aislados de papaya.



Elaborado por: Narváez, F. 2015

ANEXO N° 8: FOTOS DE LA FASE EXPERIMENTAL

Obtención de los aceites esenciales

Hojas de naranja

Hojas de mandarina

Extracción

Aceites esenciales

Preparación del PDA (Papa Dextrosa Agar)

Materiales

Dilución

PDA

Esterilización

Desinfección de la papaya (*Carica papaya*)

Lavado

Desinfección

Lavado agua estéril

Secado

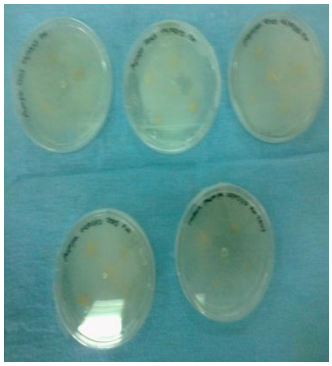
Elaborado por: Narváez, F. 2015

Aislamiento de los hongos

Acondicionamiento

Toma de muestra

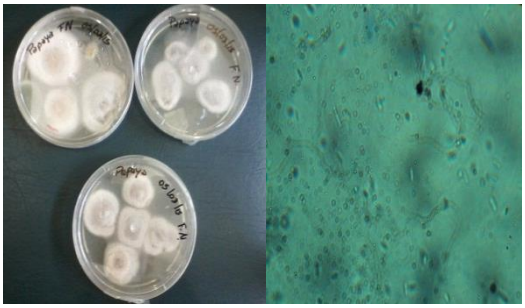
Siembra



Muestras en PDA

Identificación de hongos

Rhizopus slonifer



C. gloeosporioides

Repique de hongos

Muestra del hongo

Siembra

Crecimiento del *R.stolonifer*

Elaborado por: Narváez, F. 2015

Aplicación de los aceites esenciales

Materiales

PDA

TWEEN 20

Aceites esenciales

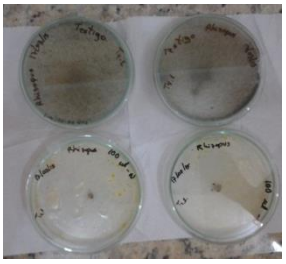
Control del crecimiento radial

Visualización del crecimiento

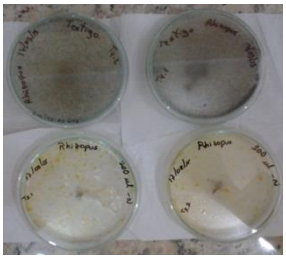
Medición

Toma de datos

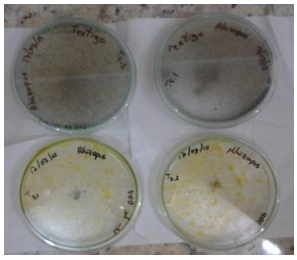
Crecimiento radial del *R.stolonifer (con aceite esencial de la corteza de los frutos de naranja)*



100µL (1%)

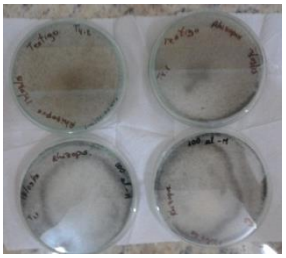


200µL (2%)

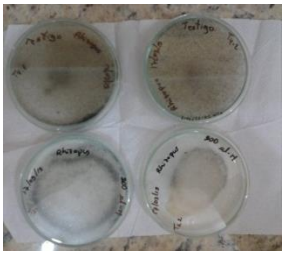


400µL (4%)

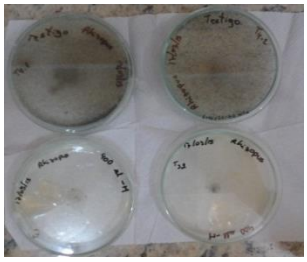
Crecimiento radial del *R.stolonifer (con aceite esencial de la corteza de los frutos de mandarina)*



100µL (1%)



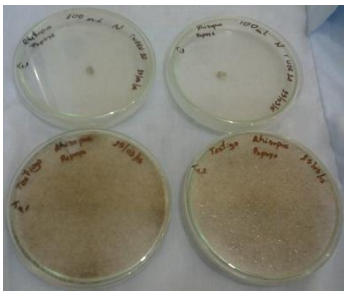
200µL (2%)



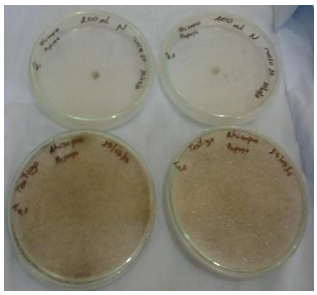
400µL (4%)

Elaborado por: Narváez, F. 2015

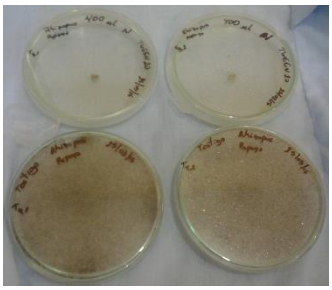
Crecimiento radial del *R.stolonifer* (con aceite esencial de las hojas de la naranja)



100µL (1%)

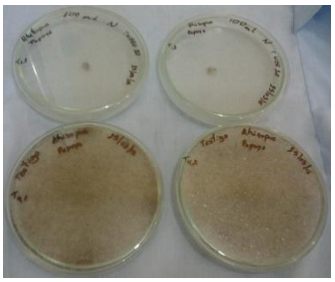


200µL (2%)

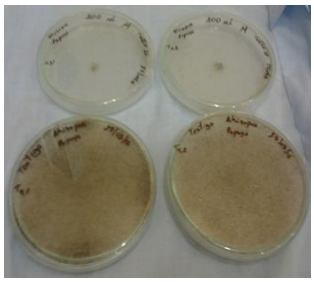


400µL (4%)

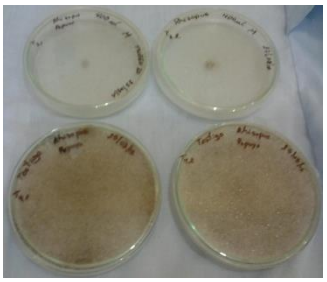
Crecimiento radial del *R.stolonifer* (con aceite esencial de las hojas de la mandarina)



100µL (1%)

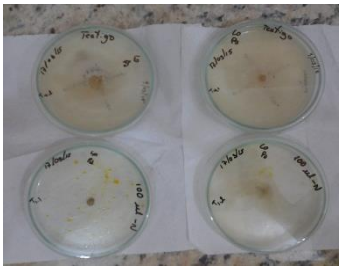


200µL (2%)

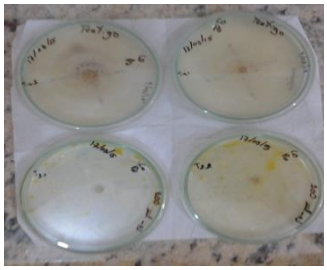


400µL (4%)

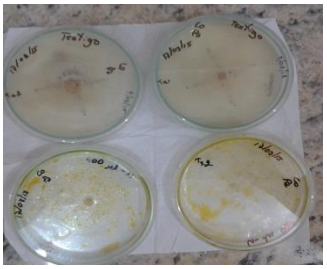
Crecimiento radial del *C. gloeosporioides (con aceite esencial de la corteza de los frutos de naranja)*



100µL (1%)



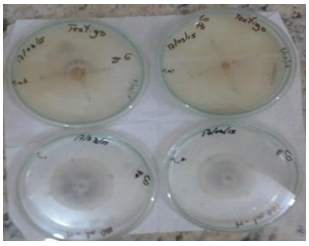
200µL (2%)



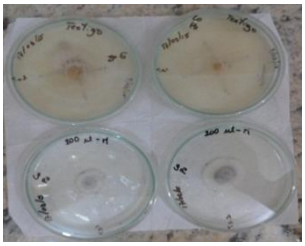
400µL (4%)

Elaborado por: Narváez, F. 2015

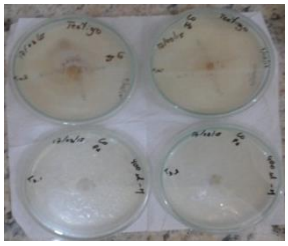
Crecimiento radial del *C. gloeosporioides (con aceite esencial de la corteza de los frutos de mandarina)*



100µL (1%)

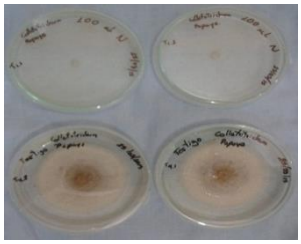


200µL (2%)

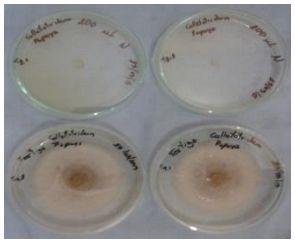


400µL (4%)

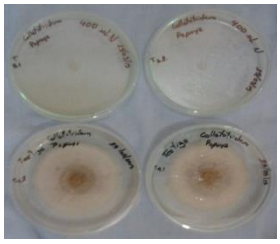
Crecimiento radial del *C. gloeosporioides* (con aceite esencial de las hojas de la naranja)



100µL (1%)

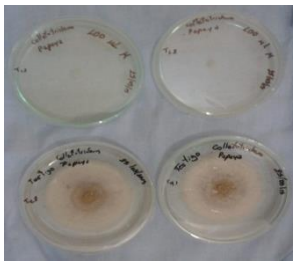


200µL (2%)

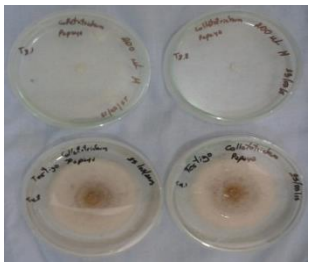


400µL (4%)

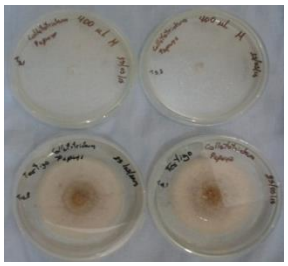
Crecimiento radial del *C. gloeosporioides* (con aceite esencial de las hojas de la mandarina)



100µL (1%)



200µL (2%)

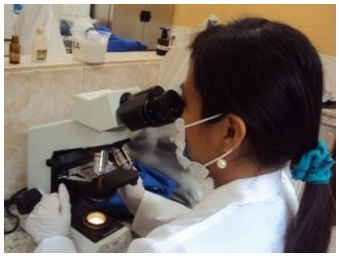


400µL (4%)

Conteo de esporas

Agua destilada

Rapado de micelio



Observación de esporas

Elaborado por: Narváez, F. 2015

Anexo 9. Pruebas de Significación Tukey en el Programa Statgraphics

R.stolonifer (% de inhibición radial)

Factor A (Aceites esenciales)

Pruebas de Múltiple Rangos para % DE INHIBICION por Aceites esenciale

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Aceites Esenciales	*Casos*	*Media LS*	*Sigma LS*	*Grupos Homogéneos*
2	12	75,23	1,109	X
1	12	100,0	1,109	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
1 - 2	*	26,1111	3,45197

* indica una diferencia significativa.

Factor B (Origen)

Pruebas de Múltiple Rangos para % DE INHIBICION por Origen de Aceite esencial

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Origen de Aceite esencial	*Casos*	*Media LS*	*Sigma LS*	*Grupos Homogéneos*
2	12	75,23	1,109	X
1	12	100,0	1,109	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
1 - 2	*	26,1111	3,45197

* indica una diferencia significativa.

Factor C (Concentraciones)

Pruebas de Múltiple Rangos para % DE INHIBICION por Porcentaje de dilución

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Porcentaje de dilución	*Casos*	*Media*	*Sigma*	*Grupos Homogéneos*
1	8	75,1389	1,35825	X
2	8	87,70	1,35825	X
3	8	100,0	1,35825	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
1 - 2	*	-10,5556	5,19839
1 - 3	*	-24,8611	5,19839
2 - 3	*	-14,3056	5,19839

* indica una diferencia significativa.

Repeticiones

Pruebas de Múltiple Rangos para % DE INHIBICION por REPETICIONES

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

REPETICIONES	*Casos*	*Media LS*	*Sigma LS*	*Grupos Homogéneos*
1	12	86,1111	1,109	X
2	12	87,7778	1,109	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
1 - 2		-1,66667	3,45197

* indica una diferencia significativa.

Elaborado por: Narváez, F. 2015

R.stolonifer (% de inhibición de esporas)

Factor A (Aceites esenciales)

Pruebas de Múltiple Rangos para % DE INHIBICON DE ESPORAS por ACEITES ESENCIALES

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

ACEITES ESENCIALES	*Casos*	*Media LS*	*Sigma LS*	*Grupos Homogéneos*
2	12	87,9825	0,0287684	X
1	12	97,0667	0,0287684	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
1 - 2	*	9,08417	0,0895465

* indica una diferencia significativa.

Factor B (Origen)

Pruebas de Múltiple Rangos para % DE INHIBICON DE ESPORAS por ORIGEN DE ACEITES

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

ORIGEN DE ACEITES	*Casos*	*Media LS*	*Sigma LS*	*Grupos Homogéneos*
2	12	85,1692	0,0287684	X
1	12	99,88	0,0287684	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
1 - 2	*	14,7108	0,0895465

* indica una diferencia significativa.

Factor C (Concentraciones)

Pruebas de Múltiple Rangos para % DE INHIBICON DE ESPORAS por PORCENTAJE DE DILUCION

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

PORCENTAJE DE DILUCION	*Casos*	*Media LS*	*Sigma LS*	*Grupos Homogéneos*
2	8	89,9925	0,0352339	X
1	8	91,9537	0,0352339	X
3	8	95,6275	0,0352339	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
1 - 2	*	1,96125	0,13485
1 - 3	*	-3,67375	0,13485
2 - 3	*	-5,635	0,13485

* indica una diferencia significativa.

Repeticiones

Pruebas de Múltiple Rangos para % DE INHIBICON DE ESPORAS por REPETICIONES

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

REPETICIONES	*Casos*	*Media LS*	*Sigma LS*	*Grupos Homogéneos*
1	12	92,5142	0,0287684	X
2	12	92,535	0,0287684	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
1 - 2		-0,0208333	0,0895465

* indica una diferencia significativa.

Elaborado por: Narváez, F. 2015

C. gloeosporioides (% de inhibición radial)

Factor A (Aceites esenciales)

Pruebas de Múltiple Rangos para % DE INHIBICION por ACEITES ESENCIALES

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

ACEITES ESENCIALES	*Casos*	*Media LS*	*Sigma LS*	*Grupos Homogéneos*
2	12	88,0842	0,997684	X
1	12	100,0	0,997684	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
1 - 2	*	11,9158	3,10546

* indica una diferencia significativa.

Factor B (Origen)

Pruebas de Múltiple Rangos para % DE INHIBICION por ORIGEN DE ACEITE ESENCIAL

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

ORIGEN DE ACEITE ESENCIAL	*Casos*	*Media LS*	*Sigma LS*	*Grupos Homogéneos*
2	12	88,0842	0,997684	X
1	12	100,0	0,997684	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
1 - 2	*	11,9158	3,10546

* indica una diferencia significativa.

Factor C (Concentraciones)

Pruebas de Múltiple Rangos para % DE INHIBICION por PORCENTAJE DE DILUCION

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

PORCENTAJE DE DILUCION	*Casos*	*Media LS*	*Sigma LS*	*Grupos Homogéneos*
1	8	88,1338	1,22191	X
2	8	93,9925	1,22191	X
3	8	100,0	1,22191	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
1 - 2	*	-5,85875	4,67658
1 - 3	*	-11,8662	4,67658
2 - 3	*	-6,0075	4,67658

* indica una diferencia significativa.

Repeticiones

Pruebas de Múltiple Rangos para % DE INHIBICION por REPETICIONES

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

REPETICIONES	*Casos*	*Media LS*	*Sigma LS*	*Grupos Homogéneos*
2	12	93,5992	0,997684	X
1	12	94,485	0,997684	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
1 - 2		0,885833	3,10546

* indica una diferencia significativa.

Elaborado por: Narváez, F. 2015

C. gloeosporioides (% de inhibición de esporas)

Factor A (Aceites esenciales)

Pruebas de Múltiple Rangos para % DE INBICION DE ESPORAS por ACEITES ESENCIALES

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

ACEITES ESENCIALES	*Casos*	*Media LS*	*Sigma LS*	*Grupos Homogéneos*
2	12	67,1342	0,0619129	X
1	12	98,3975	0,0619129	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
1 - 2	*	31,2633	0,192714

* indica una diferencia significativa.

Factor B (Origen)

Pruebas de Múltiple Rangos para % DE INBICION DE ESPORAS por ORIGEN DEL ACEITE

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

ORIGEN DEL ACEITE	*Casos*	*Media LS*	*Sigma LS*	*Grupos Homogéneos*
2	12	65,5317	0,0619129	X
1	12	100,0	0,0619129	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
1 - 2	*	34,4683	0,192714

* indica una diferencia significativa.

Factor C(Concentraciones)

Pruebas de Múltiple Rangos para % DE INBICION DE ESPORAS por PORCENTAJE DE DILUCION

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

PORCENTAJE DE DILUCION	*Casos*	*Media LS*	*Sigma LS*	*Grupos Homogéneos*
2	8	80,8187	0,0758275	X
3	8	81,0662	0,0758275	X
1	8	86,4125	0,0758275	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
1 - 2	*	5,59375	0,290213
1 - 3	*	5,34625	0,290213
2 - 3		-0,2475	0,290213

* indica una diferencia significativa.

Repeticiones

Pruebas de Múltiple Rangos para % DE INBICION DE ESPORAS por REPETICIONES

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

REPETICIONES	*Casos*	*Media LS*	*Sigma LS*	*Grupos Homogéneos*
1	12	82,7067	0,0619129	X
2	12	82,825	0,0619129	X

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
1 - 2		-0,118333	0,192714

* indica una diferencia significativa.

Elaborado por: Narváez, F. 2015

Anexo 10. Técnica de aislamiento de hongos

	Universidad Técnica Estatal de Quevedo **Laboratorio de Microbiología** **Técnica de aislamiento de hongos**	

Preparación del medio de cultivo PDA

Las siglas PDA corresponden a los componentes del medio: papa, dextrosa y agar. Este medio se usa para aislar el patógeno.

Materiales

– PDA deshidratado 39 g/litro

– Agua destilada estéril 1 litro

– Frascos erlenmeyer de 1000 mL

– Cajas petri

Preparación

– Se pesan los ingredientes, se colocan en un recipiente grande, que puede ser un vaso de precipitado, y se les agrega el agua, se deja en el microondas por 10 min hasta que esté totalmente disuelto; esta solución se envasa en dos frascos erlenmeyer (500 mL en cada uno).

– Los frascos erlenmeyer con el medio de cultivo PDA se esterilizan en autoclave, el proceso total de esterilización es de 2 horas.

– El medio esterilizado se deja enfriar hasta que pueda manipularse y se vierte luego en cajas petri, a razón de 10 mL por caja, se sellan con cinta parafilm y se guardan en el refrigerador.

Aislamientos de hongos

1. En el medio de cultivo PDA

Materiales

– Cámara de flujo laminar

– Tijeras

– Cajas petri, de 60 y 100 mm

– Agua destilada estéril

– Hipoclorito de sodio al 3%

– Medio de cultivo PDA (servido en cajas petri)

– Muestra de tejido infectado, con síntomas típicos de antracnosis

– Toallas de papel

– Mechero

– Marcador, punta fina

– Pinzas

– Incubadora

Nota: Todos los procedimientos se deben ejecutar dentro de la cámara de flujo laminar; además, deben cumplirse todas las condiciones de asepsia y esterilidad que se exigen en un laboratorio. En otras palabras, se aplican siempre las buenas prácticas microbiológicas (BPM).

Pasos del proceso

- **Paso 1**

Cortar trozos pequeños del tejido enfermo de la muestra que presente lesiones típicas y bien desarrolladas, utilizando una tijera estéril.

- **Paso 2**

Desinfectar, durante 2 minutos con una solución de hipoclorito de sodio al 3%, enjuagar luego varias veces con agua destilada estéril.

- **Paso 3**

Secar sobre toallas de papel estériles durante 10 minutos para que se sequen.

- **Paso 4**

Cuando la muestra esté seca, con el bisturí cortar pedazos de tejido y con una pinza estéril y 'sembrarlos' en una caja petri (cinco por caja) que contenga el medio de cultivo PDA. Hacer lo mismo con las demás muestras. Incubar las cajas a 24 °C durante 7 días.

▪ **Paso 5**

Si en la muestra que se 'sembró' en el medio de cultivo había microorganismos contaminantes, el hongo tratará de crecer en un área de la caja Petri donde no estén presentes los contaminantes o donde su presencia sea mínima. Purificar entonces el aislamiento del patógeno tomando partes del hongo en esas áreas y transfiriéndolas a una nueva caja petri que tenga medio de cultivo PDA.

▪ **Paso 6**

Pasados los 7 días, el hongo habrá producido acérvulos; estas estructuras reproductivas albergan una gran cantidad de conidias, algunas de las cuales se tomarán para hacer aislamientos monospóricos.

2. Repique de hongos

La pureza genética de un aislamiento de hongos se garantiza si se parte de una sola conidia para hacer el aislamiento. En una muestra de tejido enfermo puede haber una mezcla de cepas del patógeno.

A partir del crecimiento en medio de cultivo

PDA

En este proceso se aplica la metodología indicada en los pasos siguientes:

▪ **Paso 1**

Observar, con un estereoscopio, el tejido enfermo que fue 'sembrado' en el medio de cultivo PDA de una caja petri (Paso 4, anterior). Identificar en él los acérvulos bien desarrollados de color salmón en cuyo interior están los conidióforos y las conidias; éstas son liberadas fácilmente al entrar el agua en contacto con el acérvulo.

▪ **Paso 2**

Tocar, con un alfiler (asa) flameado, la masa de conidias del acérvulo elegido, para que varias de ellas queden adheridas a la punta del alfiler.

- **Paso 3**

Sembrar en el centro de un tubo de ensayo tipo pico de flauta. Esta operación exige el uso de instrumentos estériles: se debe flamear antes de cada uso para no contaminar el medio.

▪ **Paso 4**

Incubar las cajas petri del paso anterior a 20 °C durante 24 horas. Pasado ese tiempo, las conidias empiezan a germinar y estarán listas para ser transferidas individualmente.

▪ **Paso 5**

Enfocar las conidias germinadas con un estereoscopio. Elegir una y sacarla con un alfiler previamente flameado para transferirla a una caja petri que tenga medio de cultivo PDA; incubar luego la caja con la conidia a 24 °C. La conidia se desarrolla en ese medio, el cual después de 12 días (depende del hongo) queda totalmente cubierto por las estructuras del hongo.

Conteo de esporas

▪ **Paso 1**

Agregar agua destilada estéril a los incrementos del hongo en las cajas petri del paso anterior, y raspar luego la superficie del medio con una espátula estéril para desprender las conidias. Obtenida así la suspensión de conidias, filtrarla en una gasa estéril para separar las partículas como restos de agar y micelio, y recoger en un vaso estéril mediano (o en una caja petri estéril grande) el filtrado con las conidias.

▪ **Paso 1**

Colocar aproximadamente 1µL en la cámara de NEUBAUER.

▪ **Paso 2**

Contar, empleando el microscopio, las conidias observadas en la cuadrícula central del hemacitómetro (los cuatro cuadros de las esquinas y el cuadro central). El número de conidias contadas se multiplica por 50.000 (cuadros pequeños) y 2.000 (cuadros grandes).

Bibliografía:

Castellanos, G., Jara, C., & Mosquera, G. (2009). *Manejo del hongo en el laboratorio*. Centro Internacional de Agricultura Tropical.

Anexo 11. CERTIFICADOS DE LABORATORIOS

UNIVERSIDAD TECNICA ESTATAL DE QUEVEDO

LABORATORIOS BASICOS

MICROBIOLOGIA – BIOLOGIA – QUIMICA – LABORATORIO CLINICO BASICO

Dirección: Km. 1.5 vía Santo Domingo de los Tsáchilas
Teléfonos: (593-05) 2750320 – 2752430 – 2753302 Fax: (593-05) 2753300 – 2753303
Página web: www.uteq.edu.ec e-mail: info@uteq.edu.ec
CASILLAS: Guayaquil 10672 Quevedo: 73
Quevedo – Los Rios – Ecuador

LCDO. JUAN EMILIO HERRERA QUIMI, COORDINADOR DE LOS LABORATORIOS BASICOS ENCARGADO DE LA UNIVERSIDAD TECNICA ESTATAL DE QUEVEDO.

A petición de la interesada, me permito extender el presente:

CERTIFICADO DE ACTIVIDADES EN LABORATORIO

A favor de la Srta. **NARVAEZ BAQUE FLOR JAJAIRA**, portadora de la cedula de ciudadanía No.120528584-2, quien realizó actividades prácticas investigativas en el Laboratorio de Microbiología, durante el mes de marzo de 2015. Durante este tiempo efectuó EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES EN HOJAS DE NARANJA Y MANDARINA, MEDIANTE HIDRODESTILACIÒN, como parte de su tesis denominada: "VALORACIÒN DE LOS ACEITES ESENCIALES DE CITRUS SINENSIS (NARANJA) Y CITRUS NOBILIS (MANDARINA) COMO INHIBIDORES DE MICROORGANISMOS EN LA CONSERVACIÒN DE ALIMENTOS".

La Srta. Narváez Baque Flor Jajaira, durante su estancia en el laboratorio demostró ser una persona respetuosa, responsable y honrada, capaz de cumplir con las normas del laboratorio y funciones encomendadas.

Me permito hacer notorio y ratificar lo manifestado en el presente **CERTIFICADO DE ACTIVIDADES EN LABORATORIO**, para que la Srta. Narváez Baque Flor Jajaira pueda presentarlo o adjuntarlo en los trámites que convenga a sus intereses ante entidades públicas o particulares que así lo exigen y hasta donde la ley se lo permita.

Atentamente,

Lcdo. Juan Herrera Quimì
COORDINADOR DE LABORATORIOS BASICOS (E)

Quevedo, 9 de abril de 2015

Jefe de los Laboratorios Básicos Ing. Samir Zambrano Montes - Móvil 082718373 - E. Mail s.zambranom@yahoo.com
Técnico de Laboratorios Básico y Clínico, Lic. Juan Herrera Quimi - Móvil 093450014- E. Mail Juan_herrera59@hotmail.com
Asistente de Laboratorios Básicos Egdo. José Vargas Sánchez – Móvil 080090263 – E. Mail jovase18@yahoo.com

UTEQ .edu.ec
UNIVERSIDAD TECNICA ESTATAL DE QUEVEDO
ACREDITADA

Quevedo, 09 de abril del 2015

CERTIFICO

Por medio de la presente certifico que la **Srta. Narváez Baque Flor Jajaira** con CI. 120528584-2 realizo el proceso de aislamiento, repique, siembra e identificación de hongos de papaya aplicando aceites esenciales de naranja y mandarina evaluando su crecimiento radial y su crecimiento de esporas con la TESIS TITULADA: **Valoración de los aceites esenciales de Citrus senensis (Naranja) y citrus nobilis (Mandarina) como inhibidores de microorganismos en la conservación de alimentos**, mencionado proceso lo realizo en nuestra área de Biotecnología **LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA.**

Autorizo a la **Srta. Narváez Baque Flor Jajaira** Cruz puede hacer uso de este documento para sus respectivos trámites.

ATENTAMENTE

Dr. José Enrique Nieto Rodríguez
COORDINADOR GENERAL DE INVESTIGACION, DESARROLLO E INNOVACION

Anexo 12. CERTIFICADO DE URKUND

UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
Facultad de Ciencias de la Ingeniería
Escuela de Ingeniería para el Desarrollo Agroindustrial

Teléfonos: (593-05) 2750320 – 2752430 – 2753302
Fax: (593-05) 2753300 – 2753303
e-mail: info@uteq.edu.ec
Pàgina web: www.uteq.edu.ec

Quevedo – Los Ríos – Ecuador
Km. 1.5 vía a Quito

CASILLAS
Guayaquil: 10672
Quevedo: 73

Quevedo, 22 de junio de 2015

CERTIFICACIÓN

PROF. SONNIA ESTHER BARZOLA MIRANDA, DOCENTE DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA INGENIERIA CERTIFICA:

En calidad de Directora de la Tesis de Grado **"VALORACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Citrus sinensis* (NARANJA) Y *Citrus nobilis* (MANDARINA) COMO INHIBIDORES DE MICROORGANISMOS EN LA CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS".** Previo a la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial de la autoría de la Señorita: **FLOR JAJAIRA NARVÁEZ BAQUE,** informo que este trabajo de investigación luego de ser ingresado al sistema anti plagio URKUND, reportó un porcentaje del 8%, para lo cual adjunto a continuación el reporte respectivo.

URKUND

Document	TESIS FLOR NARVAEZ.docx (D14867118)
Submitted	2015-06-18 18:03 (-05:00)
Submitted by	florjbaq.narvaez@uteq.edu.ec
Receiver	sbarzola.uteq@analysis.urkund.com
Message	TESIS FLOR NARVAEZ Show full message
	8% of this approx. 30 pages long document consists of text present in 7 sources.

Atentamente;

Ing. M.Sc. SONNIA ESTHER BARZOLA MIRANDA
DIRECTORA DE TESIS