



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

FACULTAD CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

CARRERA INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

Proyecto de investigación previo
a la obtención del título de
Ingeniero Agroindustrial

Título de proyecto de investigación:

**Determinación de la concentración óptima de aceite esencial *mentha spicata* L.
(hierbabuena) en la inhibición del *fusarium sp* y *alternaria sp* presentes en dos
variedades de *lycopersicon esculentum m.* (tomate) en Quevedo, 2016.**

Autor:

Alexander Enrique Mendoza Barros

Directora Proyecto de investigación:

Ing. MS.c. Flor Marina Fon Fay Vázquez

Quevedo - Los Ríos - Ecuador

2016



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
Facultad de Ciencias de la Ingeniería
Carrera de Ingeniería Agroindustrial

Teléfonos: (593-05) 2750320 – 2752430 – 2753302
Fax: (593-05) 2753300 – 2753303
e-mail: info@uteq.edu.ec
Página 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, **Alexander Enrique Mendoza Barros**, declaro que la investigación aquí descrita 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 documento, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normatividad institucional vigente.

Alexander Enrique Mendoza Barros

C.C. # 1207083468



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
Facultad de Ciencias de la Ingeniería
Carrera de Ingeniería Agroindustrial

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

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

CASILLAS
Guayaquil: 10672
Quevedo: 73

CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

La suscrita, Ing. MS.c. Flor Marina Fon Fay Vázquez de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que la Egresado Alexander Enrique Mendoza Barros, realizó el proyecto de investigación previo a la obtención del título de Ingeniera Agroindustrial titulado **“Determinación de la concentración óptima de aceite esencial *Mentha spicata* L. (hierbabuena) en la inhibición del *Fusarium sp* y *Alternaria sp* presentes en dos variedades de *Lycopersicon esculentum m.* (tomate) en Quevedo, 2016”**, bajo mi dirección, habiendo cumplido con todas las disposiciones reglamentarias establecidas.

Ing. MS.c. Flor Marina Fon Fay Vázquez
DIRECTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO

Ing. MS.c. Sonia Barzola Miranda

COORDINADORA DE LA CARRERA DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

Mediante el presente cumpla en presentar a usted, el informe del proyecto de investigación cuyo tema es **“DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE ACEITE ESENCIAL *Mentha spicata* L. (HIERBABUENA) EN LA INHIBICIÓN DEL *Fusarium sp* Y *Alternaria sp* PRESENTES EN DOS VARIEDADES DE *Lycopersicon esculentum* M. (TOMATE) EN QUEVEDO, 2016.”** Presentado por el señor **Alexander Enrique Mendoza Barros**, egresado de la carrera de ingeniería Agroindustrial, que fue revisado bajo mi dirección según resolución del concejo directivo de la Facultad de Ciencias de la Ingeniería de sesión extraordinaria toda vez que se ha desarrollado de acuerdo al reglamento general de graduación de pregrado de la Universidad Técnica estatal de Quevedo y cumple con el requerimiento de análisis de **URKUND** el cual avalúa los niveles de originalidad en un 96% y similitud 4%, de trabajo investigativo.

URKUND	
Documento	PROYECTO DE INVESTIGACION DETERMINACION CONCENTRACION OPTIMA DELAE MENTHA SPICATA L APLICADA EN TOMATE.docx (D24154718)
Presentado	2016-12-07 12:38 (-05:00)
Recibido	ffonfay.uteq@analysis.urkund.com
Mensaje	Análisis de plagio Mostrar el mensaje completo 4% de esta aprox. 26 páginas de documentos largos se componen de texto presente en 3 fuentes.

Válido este documento para que el comité académico de la carrera sigan con los trámites pertinentes, de acuerdo a lo que establece el reglamento de grado y títulos de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

Por su atención deseo significar mis agradecimientos.

Cordialmente

ING. MS.c. FLOR MARINA FON FAY VAZQUEZ
DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
Facultad de Ciencias de la Ingeniería
Carrera de Ingeniería Agroindustrial

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

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

CASILLAS
Guayaquil: 10672
Quevedo: 73

CERTIFICADO DE APROBACIÓN POR TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

TÍTULO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

“Determinación de la concentración óptima de aceite esencial *Mentha spicata* L. (hierbabuena) en la inhibición del *Fusarium sp* y *Alternaria sp* presentes en dos variedades de *Lycopersicon esculentum m.* (tomate) en Quevedo, 2016”.

Presentado al Consejo Académico de la Facultad como requisito previo a la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial.

Aprobado por:

Ing. MS.c. Marlene Medina Villacis
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Ing. MS.c. Sonia Barzola Miranda
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. Andrea Cortez Espinoza
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

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 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. MS.c Flor Marina Fon Fay por ser mi guía en la ejecución del proyecto.

A la Sub Decana de mi Facultad Ing. MS.c Marlene Medina por su apoyo incondicional en la realización de este trabajo.

Al PhD. Canchignia Martínez Hayron Fabricio por compartir sus conocimientos y ayudarme en la fase experimental de mi investigación.

A la Ing. MS.c Sonia Barzola por el apoyo brindado en la realización y apoyo del proyecto.

A la Ing. Canchignia Malagon Gina Vanessa por compartir y ayudarme con conocimientos en los laboratorios para mi investigación.

Alexander Mendoza

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico a mi Dios quién supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

A mi familia quienes por ellos soy lo que soy.

Para mis padres por su apoyo, consejos, comprensión, amor, ayuda en los momentos difíciles, y por ayudarme con los recursos necesarios para estudiar. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia, mi coraje para conseguir mis objetivos.

A mis hermanos por estar siempre presentes, acompañándome para poderme realizar. A mi enamorada Ashley Salazar quien ha sido y es una mi motivación, inspiración y felicidad.

Alexander Mendoza

RESUMEN

En esta investigación se realizó la inhibición del *fusarium* y *alternaría* presente en dos variedades de *Lycopersicon esculentum M.* (tomate) donde determinó la concentración óptima de aceite esencial *Mentha spicata L.* Una de las principales causas de descomposición del tomate es en la poscosecha, por la presencia de hongos que se desarrollan, no sólo en la parte superficial al tener varios días expuestos al medio sin ningún tratamiento de conservación. El objetivo de esta investigación es determinar la concentración óptima de aceite esencial de *Mentha spicata L.* en la inhibición del *Fusarium sp* y *Alternaría sp* presente en dos variedades de tomate, dando como resultado un alto potencial antiingico en todas las concentraciones inhibitoria mínima prolongado la vida útil de la materia prima. La investigación se realizó en los laboratorios de Microbiología y Biología Molecular de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Para esto se planteó una investigación en la que intervinieron 12 tratamientos y 3 repeticiones con concentraciones de aceites esenciales de 0,5%, 1,5% y 2,5%. De lo cual se determinó el crecimiento radial y evaluación del porcentaje de inhibición de esporas. Con respecto al análisis estadístico se empleó un diseño de bloques completamente al azar con arreglo factorial A*B*C y 3 repeticiones considerando como factor A (tipos aceites esenciales de *Mentha spicata L.* Extraído en el laboratorio y comercial), factor B (Concentraciones de aceites esenciales de 0,5%, 1,5% y 2,5%) y factor C (hongos fitopatógenos). En la evaluación de los tratamientos para el crecimiento radial no existió diferencia significativa dando como resultado 100% de inhibición. Con respecto a la evaluación de inhibición de crecimiento de esporas, al igual que el crecimiento radial en todos los factores no se encontró diferencia significativa inhibiendo al 100%.

Palabras claves: Fitopatógenos, extracción aceite esencial, crecimiento radial, inhibición de esporas, concentración inhibitoria.

ABSTRACT

Inhibition of *fusarium* and *alternaria* present in two varieties of *Lycopersicon esculentum* M. (tomato) where it determined the optimal concentration of essential oil *Mentha spicata* L. One of the main causes of decomposition of the tomato is in postharvest, for The presence of fungi that develop, not only in the superficial part to have several days exposed to the medium without any conservation treatment. The objective of this investigation is to determine the optimal concentration of essential oil of *Mentha spicata* L. in the inhibition of *Fusarium sp* and *Alternaria sp* present in two tomato varieties, resulting in a high antiphygetic potential in all concentrations inhibitory minimal prolonged life Useful of the raw material. The research was carried out in the laboratories of Microbiology and Molecular Biology of Quevedo State Technical University. For this, an investigation was proposed in which 12 treatments and 3 repetitions with essential oil concentrations of 0.5%, 1.5% and 2.5% were involved. From this, radial growth and percentage of spore inhibition were determined. With respect to the statistical analysis, a completely randomized block design with factorial arrangement A * B * C and 3 replications were used, considering factor A (essential oils types of *Mentha spicata* L. Extracted in the laboratory and commercial), factor B (Concentrations Of essential oils of 0.5%, 1.5% and 2.5%) and factor C (phytopathogenic fungi). In the evaluation of treatments for radial growth there was no significant difference resulting in 100% inhibition. With respect to the evaluation of inhibition of spore growth, as well as radial growth in all factors no significant difference was found inhibiting at 100%.

Key words: Phytopathogens, essential oil extraction, radial growth, inhibition of spores, inhibitory concentration.

TABLA DE CONTENIDO

Portada.....	i
Declaración de autoría y cesión de derechos.....	ii
Certificación de culminación del proyecto de investigación.....	iii
Certificado del reporte de la herramienta de prevención de coincidencia y/o plagio académico.....	iv
Certificado de aprobación por tribunal de sustentación.....	v
Agradecimiento.....	vi
Dedicatoria.....	vii
Resumen.....	viii
Abstract.....	ix
Tabla de contenido.....	x
Índice de tablas.....	xv
Índice de cuadros.....	xv
Índice de figuras.....	xvi
Índice de anexos.....	xvi
Código dublín.....	xvii
Introducción.....	1
CAPITULO I.....	2
1.1. Problema de investigación.....	3
1.1.1. Planteamiento del problema.....	3
1.1.2. Formulación del problema.....	4
1.1.3. Sistematización del problema.....	4
1.2. Objetivos.....	5
1.2.1. Objetivo general.....	5
1.2.2. Objetivos específicos.....	5
1.3. Hipótesis.....	5

1.4.	Justificación.....	6
CAPÍTULO II.....		7
2.1.	Marco conceptual	8
2.1.1.	Aceites esenciales.....	8
2.1.1.1.	Generalidades	8
2.1.1.2.	Clasificación de aceites esenciales	8
2.1.1.3.	Serie de terpenos presentes en los aceites esenciales	8
2.1.1.4.	Antibacterianos y antifúngicos propiedades de los aceites esenciales	9
2.1.2.	Aceite esencial de <i>mentha spicata</i> o <i>piperita l.</i> (hierbabuena).....	9
2.1.2.1.	Valoración nutricional.....	10
2.1.3.	Hidrodestilación	11
2.1.3.1.	Ventajas.....	13
2.1.3.2.	Desventaja	13
2.1.4.	Identificación de hongos	13
2.1.4.1.	Caracteres utilizados.....	13
2.1.4.2.	Reino fungí.....	14
2.1.4.3.	<i>Fusarium sp</i>	14
2.1.4.4.	<i>Alternaria sp</i>	14
2.1.5.	<i>Lycopersicon esculentum mill.</i> (tomate riñón)	15
2.1.5.1.	Generalidades	15
2.1.5.2.	Origen.....	15
2.1.5.3.	Información taxonómica.....	15
2.1.5.4.	Anatomía y fisiología del tomate cultivado	16
2.1.5.5.	Recolección del tomate	17
2.1.6.	Hongos fitopatógenos del tomate.....	17
2.1.6.1.	Estructuras vegetativas	18
2.2.	Marco referencial	19

2.2.1.	Desarrollo de un sistema de extracción de aceites esenciales	19
2.2.2.	Hidrodestilación de aceites esenciales: modelado y caracterización	19
2.2.3.	Aplicación de los aceites esenciales <i>mentha spicata</i> (hierbabuena) y <i>matricaria chamomilla</i> (manzanilla) en la inhibición de hongos en dos variedades de tomate.....	20
2.2.4.	Estandarización de <i>mentha spicata</i> l. Medicamento herbario con actividad antiespasmódica.....	21
2.2.5.	Efecto <i>in vitro</i> de aceites esenciales sobre <i>alternaria solani</i> sorauer.....	21
2.2.6.	Efectividad de aislamientos de <i>trichoderma</i> spp. En el control de la fusariosis del tomate en condiciones <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	22
2.2.7.	Inhibición del crecimiento <i>in vitro</i> de <i>fusarium</i> sp. Aislado de chile habanero (<i>capsicum chinensis</i>) con hongos antagonistas.....	22
2.2.8.	Efecto de cuatro aceites esenciales sobre <i>fusarium</i> spp	23
2.2.9.	Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad fungistática del aceite esencial de mandarina sobre el crecimiento de <i>penicillium</i> sp	23
CAPÍTULO III		25
3.1.	Localización	26
3.1.1.	Ubicación de toma de muestras.....	26
3.1.2.	Ubicación de los aceites esenciales	26
3.1.3.	Ubicación de la investigación.....	26
3.1.3.1.	Ubicación geográfica del cantón quevedo.....	26
3.2.	Tipo de investigación	27
3.3.	Métodos de investigación.....	27
3.3.1.	Método experimental.....	27
3.3.2.	Método deductivo – inductivo.....	27
3.3.3.	Método analítico.....	27
3.4.	Fuentes de recopilación de información.....	28
3.5.	Diseño de la investigación.....	28

3.5.1.	Diseño estadístico de la investigación.....	28
3.6.	Instrumentos de investigación	29
3.7.	Tratamiento de los datos.....	29
3.8.	Recursos humanos y materiales	29
3.8.1.	Extracción de aceite esencial.....	29
3.8.2.	Preparación del medio de cultivo papa dextrosa agar (pda).....	30
3.8.3.	Inhibición con los aceites esencial	30
3.8.4.	Control de crecimiento radial	30
3.8.5.	Control de porcentaje de esporas.....	31
3.9.	Manejo específico del experimento.....	31
3.9.1.	Determinación del rendimiento	31
3.9.2.	Descripción de la extracción de aceite esencial de <i>mentha spicata l</i> por hidrodestilación	31
3.9.3.	Descripción de la inhibición de hongos en <i>lycopersicon esculentum m.</i> (tomate) 32	
CAPÍTULO IV.....		35
4.1.	Resultados	36
4.1.1.	Extracción de aceites esencial de hoja <i>mentha spicata l.</i> (hierbabuena) por hidrodestilación en el laboratorio	36
4.1.2.	Potencial antifúngico del aceite esencial <i>mentha spicata l.</i> (hierbabuena) sobre los hongos <i>fusarium sp</i> y <i>alternaría sp</i> aislados del en <i>lycopersicon esculentum m.</i> (tomate)	36
4.2.	Discusiones.....	42
4.2.1.	Extracción de aceites esencial de hoja <i>mentha spicata l.</i> (hierbabuena) por hidrodestilación en el laboratorio.	42
4.2.2.	Potencial antifúngico del aceite esencial <i>mentha spicata l.</i> (hierbabuena) sobre los hongos <i>fusarium sp</i> y <i>alternaría sp</i> aislados del <i>lycopersicon esculentum m.</i> (tomate).	42
4.2.3.	Comparar el efecto antifúngico de los aceites esenciales <i>mentha spicata l.</i> (hierbabuena) del aceite esencial extraído en el laboratorio con el ae comercial. 43	

4.2.4.	Concentración inhibitoria del aceite esencial <i>mentha spicata l.</i> (hierbabuena) en la inhibición de los hongos <i>fusarium sp</i> y <i>alternaría sp.</i>	44
4.2.5.	Tratamiento de la hipótesis.....	44
CAPÍTULO V		45
5.1.	Conclusiones	46
5.2.	Recomendaciones	46
CAPITULO VI.....		47
6.1.	Bibliografía.....	48
CAPITULO VII.....		52
Anexos.....		52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición Nutricional.....	11
Tabla 2. Valores nutritivos de una porción comestible de 100 gramos de tomates crudos y elaborados.....	16

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Factores de estudios para la inhibición de hongos en <i>Lycopersicon esculentum M.</i> (tomate) que intervienen en el efecto del aceite esencial de <i>Mentha spicata L.</i>	28
Cuadro 2. Combinación de los tratamientos propuestos para la inhibición de hongos en <i>Lycopersicon esculentum M.</i> (tomate).....	29
Cuadro 3. Extracción de aceite esencial de <i>mentha spicata.</i>	29
Cuadro 4. Preparación del medio del cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA).....	30
Cuadro 5. Inhibición con los aceites esenciales.	30
Cuadro 6. Control del crecimiento radial.	30
Cuadro 7. Control de porcentaje de esporas	31
Cuadro 8. Resultados porcentuales obtenidos de las medias de Inhibición del Crecimiento Radial de <i>Fusarium sp.</i>	37
Cuadro 9. Resultados porcentuales obtenidos de las medias de inhibición de germinación de esporas de <i>Fusarium sp.</i>	38
Cuadro 10. Resultados porcentuales obtenidos de las medias de inhibición del crecimiento radial de <i>Alternaría sp.</i>	40
Cuadro 11. Resultados porcentuales obtenidos de las medias de inhibición de germinación de esporas de <i>Alternaría sp.</i>	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Aparato tipo Clevenger, esquema general de hidrodestilación.	12
Fig. 2 Inhibición del crecimiento radial de <i>Fusarium sp.</i>	37
Fig. 3 Inhibición de germinación de esporas del <i>Fusarium sp.</i>	38
Fig. 4 Inhibición del crecimiento radial de <i>Alternaría sp.</i>	40
Fig. 3 Inhibición de germinación de esporas del <i>Alternaría sp.</i>	41

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Diagrama de bloques para la determinación de la concentración óptima de aceite esencial <i>Mentha spicata L.</i> (hierbabuena) en la inhibición de los hongos <i>Fusarium sp</i> Y <i>Alternaría sp</i> presente en dos variedades de <i>Lycopersicon esculentum M.</i> (tomate).	53
ANEXO 2. Total en % de Inhibición del Crecimiento Radial en el potencial antifungico del <i>Fusarium sp.</i>	55
ANEXO 3. Total en % de Inhibición del Crecimiento Radial en el potencial antifungico del <i>Alentaría ssp</i>	56
ANEXO 4. Evaluación total de los tratamientos en el porcentaje de inhibición de esporas del <i>Fusarium ssp</i>	57
ANEXO 5. Evaluación total de los tratamientos en el porcentaje de inhibición de esporas del <i>Alternaria ssp</i>	58
ANEXO 6. Fotos de la fase experimental	59
ANEXO 7. Técnica de laboratorio para crecimiento radial	62
ANEXO 8. Técnica de laboratorio para crecimiento de esporas.	63
ANEXO 9. Certificado de Actividades en el Laboratorio.	65

CÓDIGO DUBLÍN

Título:	“ Determinación de la concentración óptima de aceite esencial <i>Mentha spicata L.</i> (hierbabuena) en la inhibición del <i>Fusarium sp</i> y <i>Alternaría sp</i> presentes en dos variedades de <i>Lycopersicon esculentum m.</i> (tomate) en Quevedo, 2016”				
Autor:	Mendoza Barros Alexander Enrique				
Palabras clave:	Fitopatógenos	Extracción aceite esencial	Crecimiento radial	Germinación de esporas	Concentración inhibitoria
Editorial:	Quevedo: Universidad Técnica Estatal de Quevedo, 2017				
Resumen: (hasta 300 palabras)	<p>Resumen.- En esta investigación se realizó la inhibición del <i>Fusarium</i> y <i>alternaría</i> presente en dos variedades de <i>Lycopersicon esculentum M.</i> (tomate) donde determinó la concentración óptima de aceite esencial <i>Mentha spicata L.</i> El objetivo de esta investigación es determinar la concentración óptima de aceite esencial de <i>Mentha spicata L.</i> en la inhibición del <i>Fusarium sp</i> y <i>Alternaría sp</i> presente en dos variedades de tomate, dando como resultado un alto potencial antifúngico en todas las concentraciones inhibitoria mínima prolongado la vida útil de la materia prima. La investigación se realizó en los laboratorios de Microbiología y Biología Molecular de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo. En la evaluación de los tratamientos para el crecimiento radial no existió diferencia significativa dando como resultado 100% de inhibición. Con respecto a la evaluación de inhibición de crecimiento de esporas, al igual que el crecimiento radial en todos los factores no se encontró diferencia significativa inhibiendo al 100%.</p> <p>Abstract.- In this research the inhibition of <i>Fusarium</i> and <i>alternating</i> present in two varieties of <i>Lycopersicon esculentum M.</i> (tomato) was carried out where it determined the optimal concentration of essential oil <i>Mentha spicata L.</i> The objective of this investigation is to determine the optimum concentration of oil Essential of <i>Mentha spicata L.</i> in the inhibition of <i>Fusarium sp</i> and <i>Alternaria sp</i> present in two varieties of tomato, resulting in a high antiphygetic potential in all inhibitory concentrations, prolonged the useful life of the raw material. The research was carried out in the laboratories of Microbiology and Molecular Biology of Quevedo State Technical University. In the evaluation of treatments for radial growth there was no significant difference resulting in 100% inhibition. With respect to the evaluation of inhibition of spore growth, as well as radial growth in all factors no significant difference was found inhibiting at 100%.</p>				
Descripción:	83 hojas : dimensiones, 29 x 21 cm + CD-ROM 6162				
URI:					

INTRODUCCIÓN

El *Lycopersicon esculentum* M. cuyo nombre común es el tomate; es un fruto susceptible a daños físicos que pueden ocurrir durante la cosecha y en los pasos de manipulación poscosecha, pero en la mayoría de los casos, el deterioro es causado por problemas fitopatológicos causados por hongos y bacterias que se adhieren al producto al exponerse al medio ambiente, sin aplicar técnicas de conservación.

Es uno de los vegetales más consumidos y cultivados en el mundo, generalmente es consumido procesado (salsa, puré, zumo, deshidratado, enlatado). Este alimento prácticamente no posee calorías, por ejemplo 100 gramos de tomate aportan solamente 18 calorías calóricas, pero a su vez es proveedor de minerales beneficiosos para la salud como el potasio y magnesio, también vitaminas como la B1, B2, B5 y la C, además de *licopeno* el cual da la coloración roja al tomate. El licopeno y la Vitamina C son antioxidantes importantes que protegen el organismo del ser humano.

Los hongos *Fusarium sp* y *Alternaria sp* se presentan con gran frecuencia en las plantaciones de tomates y pueden causar pudrición de cuello, raíces y tallo de las plantas y del fruto de tomate, también pueden causar marchitez de la planta. Las diversas enfermedades además de disminuir la producción del tomate obligan al productor a la utilización de fungicidas que aumentan el costo total de la producción que a largo plazo pueden causar problemas al medio ambiente y a los consumidores. Para plantear soluciones viables y factibles a los productores, es necesario realizar nuevas investigaciones que presenten métodos de conservación enfocados en métodos naturales que sean amigables al consumidor.

La importancia de esta investigación es determinar la concentración óptima del aceite esencial de *Mentha spicata* L. (hierbabuena) como inhibidor del *Fusarium sp* y *Alternaria sp*, evaluando el potencial antifúngico para reducir las pérdidas de deterioro que están presente en dos variedades de tomate riñón (fortuna y chonto).

CAPITULO I

CONCEPTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problema de Investigación

1.1.1. Planteamiento del problema

La descomposición del tomate en su mayoría es causada por problemas fitopatológicos causados por hongos y bacterias (pre y pos cosecha), que se manifiesta al verse expuestas a los patógenos del medio ambiente sin ningún tipo de conservante además de otros factores como quemadura de sol, insuficiencia de calcio, daños físicos o daños producidos por bajas temperaturas. También se desarrollan en la fruta que se cosecha en estado rojo (maduración final) en particular en los que han caído de la planta o fueron expuestas al contacto con el suelo de alguna manera.

Estos hongos, en la mayoría de los casos causan la presencia de microorganismos patógenos que pueden modificar el color, sabor, olor y textura de la fruta, es decir sus características organolépticas, generando mala presencia al fruto que impiden la venta al consumidor, además pueden generar problemas en sus propiedades nutritivas es decir eliminación de algunos componentes como vitaminas y minerales. El tiempo de consumo de todo alimento está delimitado por elementos de tipo químico, físico y biológico.

Diagnostico

Los hongos del *Lycopersicon esculentum M.*, causa pudrición de cuello, raíces y tallo de las plantas y del fruto, se requiere una técnica de conservación en post cosecha. Para esto se pretende determinar la concentración óptima de aceite esencial de *Mentha spicata L.* en la inhibición del *Fusarium sp* y *Alternaría sp* presente en dos variedades de tomate.

Propositico

En este trabajo de investigación es determinar la concentración óptima de aceite esencial de *Mentha spicata L.* en la inhibición del *Fusarium sp* y *Alternaría sp* presente en dos variedades de tomate empleando un método de conservación en post cosecha evidenciado el potencial antifúngico.

1.1.2. Formulación del problema

¿La inhibición del *fusarium* y *alternaría* presente en dos variedades de tomate dependerá de la concentración óptima de aceite esencial *Mentha spicata L.*?

1.1.3. Sistematización del problema

No se dispone del requerimiento en estudio de la extracción de aceite esencial de hoja *Mentha spicata L.* (hierbabuena) por hidrodestilación en el laboratorio.

Se desconoce el potencial antifúngico del aceite esencial *Mentha spicata L.* sobre los hongos *Fusarium sp* y *Alternaría sp* aislados del tomate riñón (fortuna y chonto).

Se desconocen los niveles de inhibición fúngica de los aceites esenciales *Mentha spicata L.* extraído en laboratorio y comercial.

No se dispone de la concentración óptima de los aceites esenciales *Mentha spicata L.* extraído en laboratorio y comercial en inhibición de hongos *Fusarium sp* y *Alternaría sp.*

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Determinar la concentración óptima de aceite esencial de *Mentha spicata L.* en la inhibición del *Fusarium sp* y *Alternaría sp* presente en dos variedades de tomate.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Extracción de aceite esencial de hoja *Mentha spicata L.* (hierbabuena) por hidrodestilación en el laboratorio.
- Evaluar el potencial antifúngico del aceite esencial *Mentha spicata L.* (hierbabuena) sobre los hongos *Fusarium sp* y *Alternaría sp* aislados del *Lycopersicon esculentum M.* (tomate).
- Comparar el efecto antifúngico de los aceites esenciales *Mentha spicata L.* (hierbabuena) del aceite esencial extraído en el laboratorio con el AE comercial.
- Establecer la concentración inhibitoria del aceite esencial *Mentha spicata L.* (hierbabuena) en la inhibición de hongos *Fusarium sp* y *Alternaría sp.*

1.3. Hipótesis

La concentración al 0,5 % de aceite esencial de *Mentha spicata L.*, inhibirá a los hongos *Fusarium sp* y *Alternaría sp* aislados del *Lycopersicon esculentum M.* (tomate).

1.4. Justificación

El tomate forma parte integral de las cocinas de todo el mundo tanto por sus beneficios a la salud como su aporte al sabor de las comidas. Es una fuente importante de antioxidantes como el licopeno el cual ayuda a combatir los agentes cancerígenos además contiene ácidos como el ácido cumárico y el ácido clorogénico los cuales ayudan a contrarrestar el efecto de la nicotina en las personas adictas al tabaco.

En la actualidad existen muchos métodos de conservación pero aplicados al producto ya procesados para el consumo masivo, no siendo así aplicados en la conservación del producto en la etapa de poscosecha ocasionando en muchos casos una degradación acelerada del producto por efectos de hongos u otros patógenos. Es por esto que se constantemente se buscan nuevos métodos de conservación especialmente con conciencia ecológica.

Al determinar la concentración óptima de aceite esencial de *Mentha spicata L.* en la inhibición del *Fusarium sp* y *Alternaría sp* presente en dos variedades de tomate, se pretende dar una alternativa de solución viable y factible que ayude al productor a maximizar sus ingresos mejorando la calidad del producto por medio del uso de aceites esenciales como métodos conservantes.

Los datos y resultados de esta investigación serán de gran aporte teórico y práctico para el desarrollo de nuevas investigaciones sobre conservación de alimentos por medio de aceites esenciales ya que se presentaran datos verídicos y comprobables que serán de referencia para una mejor confiabilidad en los resultados de las nuevas investigaciones.

Al realizar la investigación de la concentración óptima de aceites esenciales de *Mentha spicata L.* (Hierbabuena), como inhibidores del *Fusarium sp* y *Alternaría sp* se contribuirá con datos científicos verídicos que aportaran con conocimientos actualizados al desarrollo agroindustrial debido a que los aceites esenciales presentan una gran ventaja para los productores debido su facilidad de acceso tanto material como económico.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA

INVESTIGACIÓN

2.1. Marco Conceptual

2.1.1. Aceites Esenciales

2.1.1.1.Generalidades

Desde la Edad Media, los aceites esenciales se han utilizado ampliamente para bactericida, virucida, fungicida, antiparasitario, insecticida, aplicaciones medicinales y cosméticas, especialmente hoy en día en la industria farmacéutica, sanitaria, cosmética, industrias agrícolas y alimentarias. Debido a la modalidad de la extracción, principalmente por destilación de plantas aromáticas, que contienen una variedad de moléculas volátiles tales como los terpenos y terpenoides, componentes aromáticos fenólicos derivados y componentes alifáticos. [1].

Algunos aceites esenciales de plantas, ampliamente utilizados como fragancias y sabores en las industrias de perfumes y de los alimentos, desde hace mucho tiempo la reputación de repeler insectos. Recientes investigaciones en varios países confirman que algunos aceites esenciales de plantas no sólo repeler insectos, sino que tenga contacto y acciones insecticidas fumigantes contra plagas específicas y acciones fungicidas contra algunos patógenos de plantas importantes [2].

2.1.1.2.Clasificación de aceites esenciales

Los aceites esenciales se encuentran ampliamente distribuidos en diferentes partes de las plantas: en las hojas (albahaca, eucalipto, hierbabuena, mejorana, menta, romero, salvia, otros), en las raíces (jengibre, sándalo, sastrás, entre otros), en el pericarpio del fruto (cítricos como limón, mandarina, naranja, entre otros), en las semillas (anís, comino, otros) en el tallo (canela, entre otros.), en las flores (lavanda, manzanilla, tomillo, rosa, entre otros) o en los frutos (perejil, pimienta, entre otros). Se clasifican basándose en criterios como consistencia y origen [3].

2.1.1.3.Serie de terpenos presentes en los aceites esenciales

Están compuestos por hidrógeno y carbono. Se presentan como polímeros del isopropeno. El isopropeno está formado por cinco carbonos (C₅); es una estructura cíclica. Es la serie más volátil y de menor peso molecular [4].

Los grupos que más se destacan son:

- Los monoterpenos: Es la molécula más pequeña, ya que está formada como máximo por C₁₀ -H₁₅ [4].
- Los sesquiterpenos: Formados por quince carbonos (C₁₅); al aumentar el número de ciclaciones y de modificaciones hace que aparezcan millares de compuestos relacionados con una centena de esqueletos carbonados como el: α -zingibereno, alcohol del pachulí, α -cisbergamoteno, longifoleno, camazuleno, β -cariofleno, nerolidol, carotol, viridiferol, entre otros [4].
- Los diterpenos: Son los que contienen más de veinte carbonos (C₂₀); el más abundante es el esclareol [4].

2.1.1.4. Antibacterianos y antifúngicos propiedades de los aceites esenciales

En los últimos años ha habido un creciente interés en el uso de sustancias naturales, y algunas cuestiones relativas a la seguridad de los compuestos sintéticos han animado a estudios más detallados de los recursos vegetales. Los aceites esenciales, productos olorosos y volátiles del metabolismo secundario de las plantas, tienen una amplia aplicación en la medicina popular, aroma y conservación de alimentos, así como en las industrias de fragancia [5].

Se informan Factores que influyen en la actividad antimicrobiana in vitro de los aceites esenciales y los mecanismos de acción de los aceites esenciales en los microorganismos. Este documento ofrece una visión general sobre las sensibilidades de las bacterias humanas y transmitidas por los alimentos y los hongos hacia los diferentes aceites esenciales y sus constituyentes. Se encontraron Aceites esenciales de especias y hierbas (tomillo, orégano, menta, canela, salvia y clavo) poseer las propiedades antimicrobianas fuertes entre muchos probado [5].

2.1.2. Aceite Esencial de *Mentha spicata* o *piperita* L. (Hierbabuena)

Destilado con vapor de las hojas y flores, el aceite de hierbabuena tiene una esencia aguda refrescante que se reconoce por su contenido de mentol.

La hierbabuena es un tónico general de pronta acción que se usa tradicionalmente como digestivo y remedio para la dispepsia, la náusea el cólico y la flatulencia y como enjuague bucal y refrescante del aliento. Tiene propiedades antiespasmódicas y analgésicas que son muy útiles para aliviar las molestias del embarazo, el dolor de muelas, el dolor de cabeza y el malestar de sinusitis. Despeja la mente y el proceso mental; sus cualidades revivificantes son estupendas para los casos de mareo o desmayo [6].

Sus propiedades analgésicas funcionan bien en masajes para el dolor muscular y la neuralgia. Su uso externo para dolores de la cabeza o de estómago, también es recomendable. La hierbabuena es antiséptica y buen descongestionante de males respiratorios. Se mezcla bien con otros aceites en tratamientos para catarras y gripe, además de que proporciona sus propiedades sudoríficas y su capacidad de atacar el malestar. La hierbabuena es parasiticida y repelente de insectos y tiene fuertes efectos como inhalante además de ser un ingrediente adicional en saunas o baños de vapor [6].

2.1.2.1. Valoración nutricional.

La ración usada en gastronomía para la menta fresca se aproxima a 1 g. Es ésta una cantidad que no justifica el aporte de nutrientes a la ingesta diaria de cualquier persona. No obstante, la menta es una de las plantas más conocidas y utilizadas de entre las plantas medicinales. Sus hojas contienen un aceite esencial cuyo compuesto principal es el mentol. Sus propiedades principales son: antiespasmódica, antiséptica, calma la pared interna del estómago, ayuda a acelerar la digestión y estimula la secreción de la bilis. La menta ayuda a calmar los cólicos o espasmos intestinales, las náuseas y las flatulencias. Es también una buena ayuda contra los parásitos intestinales (vermífugo) y estimula el sistema nervioso. [7]

El aceite esencial es utilizado corrientemente en los dentífricos y baños de boca, también en inhalaciones o pomadas contra la gripe. En uso externo, es repelente de los mosquitos, y mejora el dolor de cabeza en las migrañas y neuralgias de origen dental. Recientes investigaciones han descubierto que tomar dos tazas de té de *Mentha Spicata* al día disminuye los niveles de andrógenos en la sangre, lo cual beneficia a mujeres con hirsutismo leve (exceso de vellos en cara, pecho, abdomen y pubis). [7]

Tabla 1. Composición Nutricional

	Por 100 g de porción comestible	Por ración (1 g)	Recomendaciones día-hombres	Recomendaciones día-mujeres
Energía (Kcal)	43	0	3.000	2.300
Proteínas (g)	3,8	0	54	41
Lípidos totales (g)	0,7	0	100-117	77-89
AG saturados (g)	—	—	23-27	18-20
AG monoinsaturados (g)	—	—	67	51
AG poliinsaturados (g)	—	—	17	13
ω -3 (g)*	—	—	3,3-6,6	2,6-5,1
C18:2 Linoleico (ω -6) (g)	—	—	10	8
Colesterol (mg/1000 kcal)	0	0	<300	<230
Hidratos de carbono (g)	5,3	0,1	375-413	288-316
Fibra (g)	—	—	>35	>25
Agua (g)	86,4	0,9	2.500	2.000
Calcio (mg)	210	2,1	1.000	1.000
Hierro (mg)	9,5	0,1	10	18
Yodo (μ g)	—	—	140	110
Magnesio (mg)	—	—	350	330
Zinc (mg)	—	—	15	15
Sodio (mg)	15	0,2	<2.000	<2.000
Potasio (mg)	260	2,6	3.500	3.500
Fósforo (mg)	75	0,8	700	700
Selenio (μ g)	3	0	70	55
Tiamina (mg)	0,12	0	1,2	0,9
Riboflavina (mg)	0,33	0	1,8	1,4
Equivalentes niacina (mg)	1,1	0	20	15
Vitamina B ₆ (mg)	—	—	1,8	1,6
Folatos (μ g)	110	1,1	400	400
Vitamina B ₁₂ (μ g)	0	0	2	2
Vitamina C (mg)	31	0,3	60	60
Vitamina A: Eq. Retinol (μ g)	123	1,2	1.000	800
Vitamina D (μ g)	0	0	15	15
Vitamina E (mg)	5	—	12	12

Tablas de Composición de Alimentos. Moreiras y col., 2013. (MENTA, HIERBABUENA, FRESCA).

2.1.3. Hidrodestilación

En este método, el material a extraer está completamente sumergido en agua, la cual es calentada hasta ebullición, bien sea a través de fuego directo o a través de algún método de calefacción (chaquetas o serpentines de vapor o resistencias eléctricas). La característica principal de este proceso es el contacto directo entre el agua en ebullición y el material. Es necesario mantener una agitación constante en este proceso, pues se puede generar acumulación de material sólido en el fondo y este degradarse térmicamente, lo que afectará la calidad del extracto obtenido. [8]

También es necesario determinar a través de ensayos de laboratorio si es necesaria la disminución del tamaño de partícula del material a trabajar, lo cual es una de las grandes ventajas de este proceso, ya que permite trabajar tamaños de partícula pequeños sin el inconveniente de la generación de caminos por los cuales, en el caso de la destilación con arrastre de vapor, se pueden generar si el material es muy fino. En este caso, el material se dispersa en el agua y se mantiene disperso bien sea por agitación mecánica o por el mismo movimiento generado por la ebullición del agua. [8]

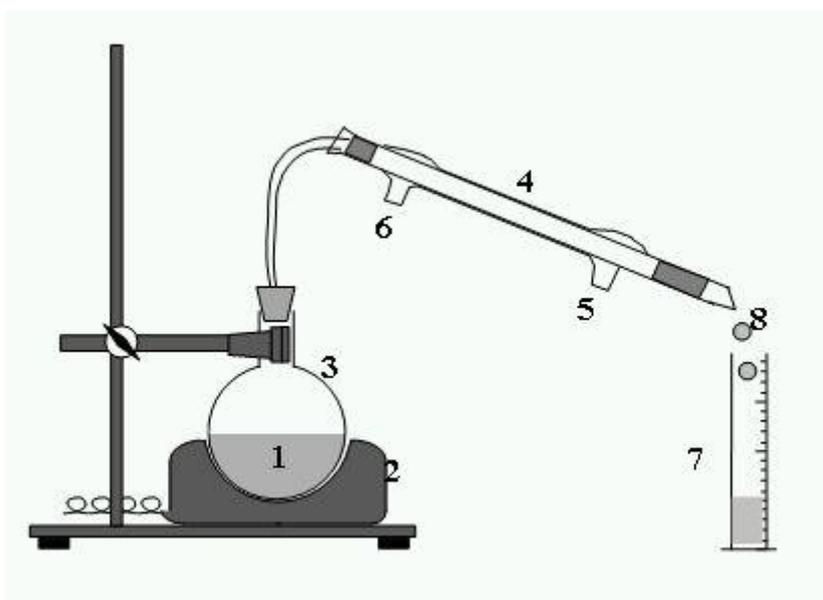


Fig. 1 Aparato tipo Clevenger, esquema general de hidrodestilación.

A nivel laboratorio el montaje es similar al de una destilación simple, donde en el balón de fondo se colocan tanto el agua como el material a destilar, también se puede hacer recirculación del agua condensada junto con el aceite esencial al balón o calderín, teniendo las mismas restricciones con respecto si se es de interés el hidrosol correspondiente. También se recomienda el uso de sistemas Clevenger para este tipo de destilación, para facilitar la operación. [8]

Es uno de los procesos de separación de más fácil montaje a nivel industrial, ya que la cantidad de equipos necesarios es menor en comparación a la destilación con arrastre de vapor. Pero también sufre de desventajas, la primera y más importante es que la calidad del aceite esencial es diferente al obtenido a través del arrastre con vapor, segundo es que la extracción completa no es posible, algunos esteres se hidrolizan parcialmente y los aldehídos tienden a polimerizar. [8]

También requiere de más combustible en proporción a la cantidad de material a extraer. [8]

2.1.3.1. Ventajas

- Fácil montaje a comparación de la destilación con arrastre con vapor.
- Fácil manejo de sustancias con tamaño de partícula pequeño, como por ejemplo, pulverizados. [8]

2.1.3.2. Desventaja

- Algunos componentes de los aceites esenciales como esteres son sensibles a la hidrolisis, algunos monoterpenos y aldehídos pueden polimerizar.
- Compuestos oxigenados como fenoles tienen tendencia a ser solubles en agua, así que no pueden ser recuperados fácilmente.
- Es una operación más lenta que la destilación con arrastre de vapor. [8]

2.1.4. Identificación de hongos

2.1.4.1. Caracteres utilizados

Características como el tipo de esporas y las estructuras que los origina, y la presencia o ausencia de reproducción sexual son utilizadas para definir los principales grupos de los hongos. El estudio de la ontogenia de los anamorfos (fase asexual) y de los teleomorfos (fase sexual) es básica en la identificación, principalmente en lo que se refiere a género y especie. No obstante, pueden utilizarse otros caracteres para complementar o reemplazar a los puramente morfológicos y ayudar a clasificar e identificar este grupo de organismos. Entre ellos destacan el estudio de características fisiológicas (crecimiento a diferentes temperaturas de incubación, asimilación de sustratos), bioquímicas (detección de actividades enzimáticas), del perfil de metabolitos secundarios (micotoxinas) y otras técnicas moleculares como las que se dedican al estudio de los ácidos nucleicos [9].

Los hongos presentan básicamente dos tipos de morfologías: una multicelular denominada filamentosa y otra unicelular denominada levaduriforme. Los hongos filamentosos (miceliares o mohos), representan el crecimiento más típico de los hongos microscópicos [9].

En medios de cultivo sólidos y también sobre cualquier superficie en la que se desarrollen, por ejemplo frutas u otros alimentos, producen colonias algodonosas o pulverulentas que son muy características [9].

2.1.4.2. Reino Fungi

Son organismos eucarióticos, en su mayoría pluricelulares; las células forman generalmente un micelio (masa de filamentos ramificados); todos son heterótrofos y su modo de nutrición es saprófito (descomponedores) o parasitario.

Recientemente se descubrió que algunos son parientes más cercanos de los animales que las plantas. Los hongos tienen una pared celular que constituye de polisacáridos, están formados por largas fibras ramificadas, hifas, integradas por células, las cuales forman el cuerpo principal del hongo o micelio [10].

2.1.4.3. *Fusarium sp*

Fusarium es uno de los más importantes géneros de hongos micotoxigénicos en alimentos y piensos. Casi todas las especies son capaces de producir micotoxinas de los cuales muchos están bajo la regulación internacional. Conocidas micotoxinas de *Fusarium* son las fumonisinas, zearalenona, deoxinivalenol y tricotecenos adicionales [11].

Precisamente, es en la especie *Fusarium oxysporum* donde la mayoría de los taxónomos coinciden ya que, con escasas variaciones, afirman que la sección una de las originalmente creadas por Wollenweber y Reinking (1935) [12].

2.1.4.4. *Alternaria sp*

Alternaria es un género de hongos común que causa daño pre y post-cosecha a los productos agrícolas, incluyendo granos de cereales, frutas y verduras. Además de estropear una amplia variedad de alimentos, varias especies de *Alternaria* son capaces de producir metabolitos secundarios considerados como ambos fitotoxinas, que desempeñan un papel importante en la patogénesis de plantas, y micotoxinas, que pueden ser perjudiciales para los seres humanos y animales [13].

Es un género de hongos ubicuos que incluye sapróbico, endófitos y especies patógenas. Se asocia con una amplia variedad de sustratos, incluyendo semillas, plantas, productos agrícolas, animales, el suelo y la atmósfera. Las especies de *Alternaria* se conocen como patógenos de las plantas graves, causando grandes pérdidas en una amplia gama de cultivos. Debido a los efectos negativos para la salud significativos de *Alternaria* en los seres humanos y su entorno, una correcta identificación y rápida de las especies de *Alternaria* sería de gran valor para los investigadores, los micólogos médicos y el público en general [14].

2.1.5. *Lycopersicon esculentum* Mill. (Tomate Riñón)

2.1.5.1. Generalidades

El tomate es el cultivo hortícola más importante después de la papa. Tomate y los tomates silvestres son nativas de América del Sur occidental y se distribuyen desde el norte de Ecuador, a través de Perú hasta el norte de Chile, en las Islas Galápagos y también en Colombia y Bolivia. El tomate se ha extendido por todo el mundo y ha experimentado una gran diversificación debido a la gran diversidad de usos y su adaptación a diferentes sistemas de cultivo. [15].

2.1.5.2. Origen

La forma ancestral del tomate cultivado se limitaba inicialmente a la zona de Perú - Ecuador. Después de difundirse norte posiblemente como una mala hierba en la época precolombina no fue domesticado extensivamente hasta que llegó a México, y de allí se difundieron las formas cultivadas [16].

2.1.5.3. Información Taxonómica

Falcones (2001), indica que la taxonomía generalmente aceptada es:

- Reino: *Plantae*
- División: *Agiosperma*
- Clase: *Dicotiledóneas*
- Orden: *Solanales (Personatae)*

- Familia: *Solanaceae*
- Tribu: *Solaneae*
- Género: *Lycopersicon*
- Especie: *Esculentum*

2.1.5.4. Anatomía y fisiología del tomate cultivado

El tomate es una planta perenne, de porte arbustiva que se cultiva como anual. Puede desarrollarse de una forma rastrera, semierecta o erecta y su crecimiento es limitado en las variedades determinadas e ilimitadas en las indeterminadas, y puede legar en estas últimas en un año. [17]

Los frutos pueden presentar una morfología y un tamaño bastante diferentes en función de las variedades: más o menos gruesos, aplanados, ligeramente aplanados, redondeados, rectangulares, cilíndricos, elípticos, cordiformes, ovoidales, ovales, en forma de pera, acostillados o lisos [18]

Tabla 2 Valores nutritivos de una porción comestible de 100 gramos de tomates crudos y elaborados

Nutrimiento	Crudo	Enlatado*	Sopa	Jugo
Agua (%)	94	94	69	94
Calorías	19	21	106	19
Proteína	0.7	0.8	1.8	0.8
Grasa (g)	Trazas	Trazas	0.4	Trazas
Hidratos de carbono (g)	4	4	25	4
Calcio (mg)	12	6**	22	7
Fósforo (mg)	24	19	50	18
Hierro (mg)	0.4	0.5	0.8	0.9
Potasio (mg)	222	217	363	227
Vitamina A (U.I)	822	900	1399	798
Tiamina (mg)	0.05	0.05	0.09	0.05
Riboflavina (mg)	0.04	0.03	0.07	0.03
Niacina (mg)	0.7	0.7	1.6	0.8
Ácido ascórbico (mg)	21	17	15	16

(*) Sólidos y líquidos (**) Producto al que no se ha agregado sales de calcio
Fuente: *USDA Home and Garden Bulletin*, N°.72.

2.1.5.5. Recolección del tomate

El tomate se recolecta a mano y se va depositando en cajas, siempre menores de 15Kg. La distribución y recogida de las cajas las puede hacer otro operario, que también las transporte a la nave mediante una carretilla elevadora o transpaleta, existe la posibilidad de que las pequeñas cajas sean apilables y no sea necesario volcarlas en otro contenedor mayor. [19].

Durante las fases de recolección mecanizadas suele ocurrir otro tipo de pérdidas: los daños al producto por golpes. No se aprecian a simple vista, sino que se manifiestan varios días después el suceso [19]. Se pueden clasificar en tres tipos:

- **Golpes o impactos:** de los productos entre sí o con el envase.
- **Compresión:** cuando se comprimen los envases o se llenan demasiado.
- **Abrasión:** daño sobre la piel de los frutos al rozarse contra otros o contra los sistemas de transporte o envases.

Estos daños producen un estrés en el fruto, que acelera su proceso de maduración, por lo que se ablanda y pierde la estructura. Los tejidos dañados generan químicas, que producen mal olor, sabor y apariencia [19].

2.1.6. Hongos fitopatógenos del tomate

Dondequiera que el hombre ha tratado de cultivar tomates que ha tenido que lidiar con numerosas enfermedades. Antes de la introducción de variedades resistentes. El marchitamiento por *Fusarium* fue tal vez el campo de la enfermedad más destructiva de los tomates. Los productores se ven obligados constantemente desde tierra marchitez a campos recientemente talados para el cultivo de tomates [20].

En tomate, los hongos producen por otra parte estructuras especializadas, muy resistente a los elementos desfavorables y perfectamente adaptadas para su conservación. Las más corrientes son las *clamidosporas*, esporas con pared gruesa, que producen por ejemplo *Thielaviopsis basicola*, *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici* y *Fusarium oxysporum f.sp. radicislyopersici*, *Pythium spp.* Los *Pythium*, como los *Phytophthora*, pueden conservarse también en forma de huevos (zoosporas) procedentes de su reproducción sexual [18].

Más visibles, de dimensiones variables y también eficaces para perpetuarlos, los esclerocios, masas micelánicas densas, caracterizan bastante bien la presencia de ciertos hongos sobre y/o dentro de los tejidos vegetales afectados: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia minor*, *Sclerotium rolfsii*, *Botrytis cinérea*, *Rhizoctonia solani* [18].

Se distinguen fácilmente los hongos más bien asociados a las raíces y/o al cuello de los tomates (*Olpidium brassicae*, *Phythium spp.*, ciertos *Phytophthora spp.*, *Fusarium oxysporum f. sp. Radicis-lycopersici*, *Pyrenochatea lycopersici*, *Thielaviopsis basicola*) o a los vasos (*F. oxysporum f. sp. Lycopersici*, *Verticilium dahliae...*), mientras que otras se limitan única o esencialmente a los órganos aéreos (hojas, tallos, frutos, flores) (*Phytophthora infestans*, *Leveillula taurica*, *Oidium neolycopersici*, *Stemphylium spp.*, *Alternaria tomatophila*) [18].

2.1.6.1. Estructuras vegetativas

Plasmodio: Se refiere al cuerpo o soma vegetativo de algunos hongos inferiores, el cual está constituido por una masa multinucleada, sin pared celular. Son escasos los hongos fitopatógenos que poseen soma vegetativo de tipo plasmodial [20].

Micelio: La mayoría de los hongos poseen cuerpo filamentosos provisto de pared celular. . A los filamentos que constituyen el cuerpo o soma vegetativo se les denomina hifas. Al conjunto de hifas se le denomina micelio. Cuando las hifas no presentan septas, el micelio es denominado cenocítico o no tabicado y cuando las presenta el micelio se dice que es tabicado [20].

2.2. Marco referencial

2.2.1. Desarrollo de un sistema de extracción de aceites esenciales

Se construye cada uno de los elementos, para posteriormente ensamblar el sistema y realizar las respectivas pruebas de funcionamiento del equipo. Se prueba el equipo con eucalipto, ciprés y menta, donde se obtiene el volumen de aceite extraído en función de la materia prima procesada. Para saber la calidad de los aceites extraídos se desarrolla la caracterización (índice de refracción, PH y densidad), se utilizaron 5kg de menta para la extracción. [21].

Se expone la relación entre el volumen de aceite esencial extraído por el tiempo, de la cual se anota lo siguiente: Existe un tiempo muerto de extracción, alrededor de los 10 minutos que corresponde al tiempo transcurrido desde la inyección del vapor hasta la aparición del primer condensado de aceite esencial. Se observa que la extracción del aceite es rápida a partir del tiempo muerto hasta los 60 minutos donde se extrae alrededor del 91.6% del total 12 mL de aceite esencial extraído, donde duro todo el proceso 90 minutos para la extracción del aceite esencial de menta. [21].

2.2.2. Hidrodestilación de aceites esenciales: modelado y caracterización

Se procesaron las siguientes 5 plantas aromáticas, representativas de dos matrices herbáceas conocidas: hojas y flores; en un equipo piloto, con diferentes flujos del vapor de agua y diferentes porosidades del lecho vegetal. Obteniéndose exitosamente sus aceites esenciales y caracterizándolos positivamente según la normativa técnica vigente o a estudios previos publicados, mediante GC/MS, refractometría y picnometría donde el rango promedio de la densidad es de 1,0095 g/cm³ de los aceites esenciales de las plantas aromáticas extraídas por hidrodestilación [22].

Las plantas fueron: *Lavandín súper* (*lavandula angustifolia M. x latifolia M.*), con un rendimiento de $1,36 \pm 0,138\%$ g/g, en base húmeda (53% g/g H₂O), en 12 pruebas experimentales, con una carga fija por prueba; usando sus flores y tallos parcialmente cegados. *Romero español* (*rosmarinus officinalis L.*): Con un rendimiento de $1,35 \pm 0,104\%$ g/g, en base húmeda (22,5% g/g H₂O), en 9 pruebas experimentales [22].

Diferentes cargas de planta y usando sus flores y hojas enteras. *Mejorana de España* (*thymus mastichina* L.): Con un rendimiento de $2,73 \pm 0,10\%$ g/g, en base húmeda (11,5% g/g H₂O), en 9 pruebas experimentales, diferentes cargas de planta; usando sus flores, hojas y tallos enteros *Hisopo español* (*hyssopus officinalis* L. ssp. *aristatus* (Godr.) Briq.): Con un rendimiento de $1,63 \pm 0,20\%$ g/g, en base húmeda (11,3% g/g H₂O), en 8 pruebas experimentales, con una carga fija (1 kg) por prueba; usando sus hojas, flores y tallos enteros. *Lavandín abrial* (*lavandula angustifolia* L. x *latifolia* L.): Con un rendimiento de $2,73 \pm 0,10\%$ g/g, en base húmeda (11,5% g/g H₂O), en 9 pruebas experimentales, con diferentes cargas de planta; usando sus flores y tallos enteros. Dos plantas adicionales fueron procesadas y caracterizadas: *hinojo dulce* (*foeniculum vulgare* var. *dulce*) y *siempre viva* (*helichrysum stoechas*). Sin embargo, no han sido consideradas para su modelado fenomenológico [22].

2.2.3. Aplicación de los aceites esenciales *Mentha spicata* (hierbabuena) y *Matricaria chamomilla* (manzanilla) en la inhibición de hongos en dos variedades de tomate

El efecto de los aceites esenciales de *Mentha spicata* (Hierbabuena) y *Matricaria chamomilla* (Manzanilla), en la inhibición de hongos en dos variedades de tomate riñón, con el propósito de adicionar aceites esenciales como método de conservación [23].

Se utilizaron muestras de la variedad de tomate riñón, consiguiendo pequeños ejemplares para la siembra de hongos, en este caso se estudió: *Fusarium* sp., y *Alternaria* sp., para esto se planteó una investigación en la que intervinieron 12 tratamientos y 2 repeticiones con concentraciones de aceites esenciales de 100 μ l, 200 μ l y 400 μ l. De lo cual se determinó el crecimiento radial y evaluación del porcentaje de inhibición de esporas. [23]

En la estimación de los tratamientos para el crecimiento radial se encontró diferencia significativa en el factor A (Variedad de tomate riñón) y en el factor B (Tipos de aceites esenciales), siendo los mejores tratamientos para el factor A, a1 (Tomate chonto), y en factor B b1 (A.E de hierbabuena), mientras que en el factor C (Concentraciones de aceites esenciales), no existió diferencia significativa, siendo el mejor tratamiento, c1 (Concentración de aceite esencial 200 μ l) [23].

Con respecto a la evaluación de inhibición de crecimiento de esporas, existió diferencia significativa entre los tres factores, siendo los mejores tratamientos en el factor A (Variedad de tomate riñón), a1 (Tomate chonto), en el factor B (Tipos de aceites esenciales), b1 (A.E de hierbabuena) y en el factor C (Concentraciones de aceites esenciales) c2 (400 µl) [23].

2.2.4. Estandarización de *mentha spicata* l. medicamento herbario con actividad antiespasmódica

Se utilizaron muestras de *Mentha spicata* L. de 2 procedencias, que fueron secadas de forma natural y artificial, además, se determinaron los parámetros de calidad: porcentaje de materias orgánicas e inorgánicas extrañas, hojas ennegrecidas, tallos, humedad, cenizas totales, sustancias extractivas en agua y en alcohol al 30 % y aceite esencial. Los resultados obtenidos se encontraron dentro de los rangos que se reportan para las drogas vegetales. Se realiza un estudio macromorfológico y micromorfológico, así como el tamizaje fitoquímico. En la identificación del componente mayoritario del aceite esencial se compararon los resultados de la cromatografía en capa delgada y la cromatografía gaseosa. Al mismo tiempo se realizó un estudio de conservación de la droga en condiciones de humedad y temperatura ambiental durante un año. Se concluye que el tiempo óptimo de almacenamiento fue de 8 meses en frascos de vidrio y latas compuestas [24].

2.2.5. Efecto *in vitro* de aceites esenciales sobre *Alternaria solani* Sorauer

Este trabajo tuvo como objetivo determinar la actividad antifúngica *in vitro* de diez aceites esenciales sobre *Alternaria solani* Sorauer, importante patógeno de las solanáceas. Se evaluó el efecto por contacto directo y por exposición a los vapores. Los bioensayos se realizaron según diseño completamente aleatorizado, se utilizó el método de discos de papel inoculados con los aceites, enfrentados a discos del fitopatógeno y se evaluó el crecimiento radial del hongo [25].

Todos los aceites, excepto *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (naranja dulce), inhibieron el crecimiento micelial hasta los 7 días. A los 14 días se observó inhibición total en los tratamientos con los aceites de *Pimpinella anisum* L. (anís), *Ocimum basilicum* L. (albahaca blanca), *Ocimum basilicum* L. variedad genovese (albahaca genovesa) y *Piper auritum* Kunth (caisimón de anís) [25].

Los metabolitos volátiles de los aceites no mostraron efecto fungicida; no obstante se observó inhibición del crecimiento micelial de *A. solani* en los tratamientos con los extractos de *Ruta chalepensis* L. (ruda) y *Piper auritum*. Los resultados abren nuevas perspectivas para el control de este patógeno [25].

2.2.6. Efectividad de aislamientos de *trichoderma* spp. en el control de la fusariosis del tomate en condiciones *in vitro* e *in vivo*

La marchitez vascular, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, es una enfermedad que afecta la zona radical de plantas de tomate y avanza en forma sistémica. En esta investigación se evaluó la efectividad de *Trichoderma* spp. para el control de la fusariosis tanto *in vitro* como *in vivo*. Se usaron diez aislamientos del género *Trichoderma*, es decir, cuatro de *T. harzianum* (B2, C3, I9, J10), cuatro de *T. koningii* (D4, E5, G7, H8), uno de *T. longibrachiatum* (A1) y uno de *T. atroviride* (F6). Asimismo, se utilizaron cinco aislamientos del patógeno colectados en plantaciones de tomate. Para la prueba *in vitro* se colocaron los antagonistas y los patógenos en cultivos duales en platos de Petri, bajo un diseño completamente aleatorizado, y se evaluaron los porcentajes de inhibición de crecimiento y de esporulación. La evaluación *in vivo* se realizó con la aplicación de los aislamientos de *Trichoderma* spp. en plantas de tomate de la variedad Río Grande infectadas con *F. oxysporum* bajo condiciones de umbráculo. Se evaluó la severidad de la enfermedad usando un diseño completamente aleatorizado. Los aislamientos A1, I9, H8 y J10 presentaron los porcentajes más altos de inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, mientras que los aislamientos I9 y J10 correspondientes ambos a la especie *Trichoderma harzianum* fueron los que, en general, presentaron un mejor control al considerar el conjunto de las pruebas *in vitro* e *in vivo* [26].

2.2.7. Inhibición del crecimiento *in vitro* de *Fusarium* sp. aislado de chile habanero (*Capsicum chinensis*) con hongos antagonistas

Las especies de *Fusarium* sp. son agentes causales de enfermedades fúngicas que ocasionan síntomas en raíz, tallo y hoja en diferentes cultivos, incluido chile. Los hongos antagonistas como *Trichoderma* son una alternativa en el control de hongos fitopatógenos, por lo que se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Fusarium* sp. aislado de chile habanero (*Capsicum chinensis* Jacq.) por medio de hongos antagonistas [27].

Para los ensayos se usaron dos cepas de colección *Trichoderma harzianum* denominada *Thitver* y *Trichoderma sp.* cepa H2; tres cepas nativas (L2, P3 y P4), aisladas de muestras de suelo del estado de Yucatán, México, identificadas como pertenecientes al género *Trichoderma*; y la cepa nativa H3, identificada como perteneciente al género *Aspergillus*. La evaluación de actividad antagonica se realizó mediante ensayo de confrontación dual en medio papa-dextrosa-agar (PDA). Todas la cepas de *Trichoderma* inhibieron el crecimiento del hongo fitopatógeno *Fusarium sp.* entre el 40 y el 82 %. Con base al área de inhibición del crecimiento, el antagonista *Trichoderma sp.* cepa H2 causó significativamente mayor porcentaje de inhibición (82,2 %). Las cepas de *Trichoderma* H2, P3 y P4 presentaron la capacidad de crecer sobre el patógeno, lo que mostró un proceso de parasitismo [27].

2.2.8. Efecto de cuatro aceites esenciales sobre *Fusarium spp*

En este trabajo se determinó la actividad antifúngica *in vitro*, de cuatro aceites esenciales, sobre tres aislados de *Fusarium spp.* (F2 y F5 de *Fusarium solani* (Martius) Appel & Wollenweber emend. Snyder & Hansen y F3 de *Fusarium redolens* Wollenweber), patógenos en el cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Cuba [28].

El bioensayo se realizó según un diseño completamente aleatorizado y se utilizó el método de discos de papel de filtro inoculados con los aceites, colocados en contacto directo con los discos de los aislados de *Fusarium*. Se evaluó el crecimiento radial de los hongos hasta las 96 horas [28].

El aceite de *Piper auritum* Kunth (caisimón de anís) provocó total inhibición en el crecimiento de los aislados del fitopatógeno; por su parte, el aceite de *Piper aduncum* subsp. *ossanum* (C. DC.) Saralegui (platanillo de Cuba) demostró poseer alto poder fungistático. El aceite de *Melaleuca quinquenervia* (Cav) S.T. Blake (melaleuca) produjo poca inhibición del crecimiento en los tres aislados, y el de *Citrus sinensis* L. Osbeck (naranja dulce) (a la concentración evaluada) no inhibió ningún aislado, lo que limita el posible uso de estos en la práctica. El aceite de caisimón de anís, resultó ser el más destacado, se recomienda continuar investigando sus propiedades para el control de fitopatógenos [28].

2.2.9. Evaluación in vitro de la actividad fungistática del aceite esencial de

mandarina sobre el crecimiento de *Penicillium sp*

Los hongos *Penicillium digitatum* y *P. italicum* representan mundialmente la principal pérdida económica para el sector citrícola durante la etapa de poscosecha. El uso de fungicidas es cada vez más restringido debido a sus efectos carcinogénicos, teratogénicos, alta residualidad, período largo de degradación, contaminación ambiental y aumento de la resistencia por parte de los patógenos, entre otros. Los compuestos antimicrobianos de origen natural pueden ser una alternativa viable y segura para minimizar las pérdidas por enfermedades que enfrenta el sector. En este trabajo se evaluó y comparó in vitro la actividad antifúngica del aceite comercial de mandarina, timol y carvacrol, a concentraciones de 40 y 50 ppm, usando el método de difusión en agar y pruebas microbiológicas. Todos los compuestos y aceites evaluados presentaron un porcentaje de inhibición entre $50 \pm 100\%$, para ambos hongos, siendo mayor la inhibición en dosis de 50 ppm. Carvacrol presentó mayor actividad antifúngica sobre ambos hongos. *P. digitatum* mostró mayor sensibilidad que *P. italicum* al efecto de los aceites esenciales evaluados. El aceite esencial comercial de mandarina puede ser una alternativa para el control de enfermedades poscosecha causadas por *Penicillium sp.*, en productos vegetales [29].

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Localización

3.1.1. Ubicación de toma de muestras

La materia prima (tomate) utilizada en esta investigación, provenientes de la ciudad de Latacunga expandido en el mercado de la ciudad de Quevedo, lavados y desinfectados con hipoclorito de sodio durante varios minutos, donde se extrajo con un bisturí, el pericarpio para tomar la muestra del mesocarpio y dispensarlas en PDA en cajas Petri, 24 °C por 7 días previamente ubicadas en la para la proliferación de los hongos.

3.1.2. Ubicación de los aceites esenciales

Para ésta investigación se extrajo aceite esencial de *Mentha Spicata L.* en el laboratorio de Biología Molecular ubicado en la Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Además se adquirió de los laboratorios ISABRUK BOTANIK S.A aceite esencial de *Mentha Spicata L.*, empresa ubicada en la ciudad de Ambato, y cuenta con plantas cultivadas orgánicamente para la fabricación de los aceites esenciales.

3.1.3. Ubicación de la investigación

Se investigó en los Laboratorios de Microbiología, Biología Molecular y Cultivo de Tejidos situados en la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, los que cuentan con equipos, reactivos y materiales disponibles para la fase experimental de la investigación.

3.1.3.1. Ubicación Geográfica del Cantón Quevedo

Ubicación Geográfica	
Altitud:	76 msn m
Longitud:	-79.469305
Latitud:	-1.012227
Tº media:	26° C

Fuente: GoogleMaps.com

3.2. Tipo de investigación

Es considerada esta investigación de tipo experimental, por lo que se realizó la investigación sobre determinación de la concentración óptima de aceite esencial *Mentha spicata L.* (hierbabuena) en la inhibición del *Fusarium sp* y *Alternaría sp* presente en dos variedades de *Lycopersicon esculentum M.* (tomate) en Quevedo, donde se pretende dar una alternativa de solución viable y factible que ayude al productor a maximizar sus ingresos, mejorando la calidad del producto o fruto por medio del uso de aceites esenciales como métodos conservantes en el manejo de la poscosecha.

3.3. Métodos de investigación

3.3.1. Método experimental

Se aplicó el método experimental para comprobar los efectos de una intervención específica de los factores de estudio, este método ubica al investigador como pieza fundamental para esta investigación ya que el que efectúa el análisis estadístico se realizó mediante el programa Statgraphics e infostat.

3.3.2. Método deductivo – inductivo

Los resultados obtuvimos del diseño experimental A*B*C y se estableció la concentración óptima de aceite esencial *Mentha spicata L.* en la inhibición del *Fusarium sp* y *Alternaría sp* presente en dos variedades de *Lycopersicon esculentum M.* en Quevedo. Donde se pudo concluir sobre las afirmaciones o negaciones de las hipótesis planteadas.

3.3.3. Método analítico.

Se analizaron todas sus partes para estudiar en forma intensiva cada uno de sus elementos, así como las relaciones entre sí, a todos los resultados obtenidos de la concentración óptima de aceite esencial *Mentha spicata L.* en la inhibición del *Fusarium sp* y *Alternaría sp* presente en dos variedades de *Lycopersicon esculentum M.* en Quevedo.

3.4. Fuentes de recopilación de información.

En el presente estudio se fundamenta en la búsqueda de la investigación científica en: libros, artículos científicos, información electrónica con el fin de aportar con base científica y respaldar este proyecto de investigación con las respectivas bibliografías.

3.5. Diseño de la investigación

3.5.1. Diseño estadístico de la investigación

Factores de estudio

Se evaluó dentro de la investigación 3 factores de estudios en los que concierne al tema se determinan los siguientes:

- Factor A: 2 (aceites esenciales)
- Factor B: 3 (concentraciones)
- Factor C: 2 (hongos fitopatógenos)

Lo que corresponde a 12 tratamientos, con 3 repeticiones da un total de 36 tratamientos en la investigación.

Cuadro 1. Factores de estudios para la inhibición de hongos en *Lycopersicon esculentum* M. (tomate) que intervienen en el efecto del aceite esencial de *Mentha spicata* L

FACTORES DE ESTUDIO	SIMBOLOGÍA	DESCRIPCIÓN
Factor A: Aceites Esenciales	a ₀	A.E Laboratorio
	a ₁	A.E Comercial
Factor B: Concentraciones	b ₀	0,5 %
	b ₁	1,5 %
	b ₂	2,5 %
Factor C: Hongos Fitopatógenos	c ₀	<i>Fusarium sp</i>
	c ₁	<i>Alternaria sp</i>

Elaborado por: Mendoza A. 2016

3.6. Instrumentos de investigación

En la actual investigación se analiza la actividad antifúngica para implantar cuál será el principal tratamiento con mejores características, ya que los datos de cada uno de los tratamientos fueron ingresados en un programa estadístico como es el Statgraphics que permite conocer si es que existe o no diferencia significativa entre cada uno de los factores estudiados.

3.7. Tratamiento de los datos

Cuadro 2. Combinación de los tratamientos propuestos para la inhibición de hongos en *Lycopersicon esculentum M.* (tomate)

TRATAMIENTOS	SIMBOLOGÍA	DESCRIPCIÓN
T1	a ₀ b ₀ c ₀	A.E Comercial + 0,5%+ <i>Fusarium sp</i>
T2	a ₀ b ₁ c ₀	A.E Comercial + 1,5%+ <i>Fusarium sp</i>
T3	a ₀ b ₂ c ₀	A.E Comercial + 2,5%+ <i>Fusarium sp</i>
T4	a ₁ b ₀ c ₀	A.E Laboratorio + 0,5%+ <i>Fusarium sp</i>
T5	a ₁ b ₁ c ₀	A.E Laboratorio + 1,5%+ <i>Fusarium sp</i>
T6	a ₁ b ₂ c ₀	A.E Laboratorio + 2,5%+ <i>Fusarium sp</i>
T7	a ₀ b ₀ c ₁	A.E Comercial + 0,5%+ <i>Alternaría sp</i>
T8	a ₀ b ₁ c ₁	A.E Comercial + 1,5%+ <i>Alternaría sp</i>
T9	a ₀ b ₂ c ₁	A.E Comercial + 2,5%+ <i>Alternaría sp</i>
T10	a ₁ b ₀ c ₁	A.E Laboratorio + 0,5%+ <i>Alternaría sp</i>
T11	a ₁ b ₁ c ₁	A.E Laboratorio + 1,5%+ <i>Alternaría sp</i>
T12	a ₁ b ₂ c ₁	A.E Laboratorio + 2,5%+ <i>Alternaría sp</i>

Elaborado por: Mendoza A. 2016

3.8. Recursos humanos y materiales

3.8.1. Extracción de aceite esencial

Cuadro 3. Extracción de aceite esencial de *mentha spicata*

MATERIALES	EQUIPOS	REACTIVOS
<ul style="list-style-type: none">Hojas de <i>Mentha spicata L.</i>	<ul style="list-style-type: none">Hidrodestilador	<ul style="list-style-type: none">Agua destilada

Elaborado por: Mendoza A. 2016

3.8.2. Preparación del medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA)

Cuadro 4. Preparación del medio del cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA)

MATERIALES	EQUIPOS	REACTIVOS
<ul style="list-style-type: none">• Matraz de Erlenmeyer• Tubos de ensayo• Varilla• Cajas Petri desechables• Espátula• Algodón• Papel aluminio• Marcador indeleble	<ul style="list-style-type: none">• Autoclave• Refrigerador• Microondas• Balanza	<ul style="list-style-type: none">• PDA• Sulfato de Estreptomicina "GM"

Elaborado por: Mendoza A. 2016

3.8.3. Inhibición con los aceites esencial

Cuadro 5. Inhibición con los aceites esenciales

MATERIALES	EQUIPOS	REACTIVOS
<ul style="list-style-type: none">• Cajas Petri de vidrio• Asa de siembra• Marcador indelible• Pipetas pasteur• Algodón• Cinta parafilm• Bisturí• Mechero• Micro pipetas• Puntas estériles	<ul style="list-style-type: none">• Cámara de flujo laminar• Incubadora	<ul style="list-style-type: none">• PDA• Tween 20• Alcohol• A.E Manzanilla• A.E Hierbabuena

Elaborado por: Mendoza A. 2016

3.8.4. Control de crecimiento radial

Cuadro 6. Control del crecimiento radial

MATERIALES	EQUIPOS	REACTIVOS
<ul style="list-style-type: none">• Atomizador• Algodón• Marcador indelible	<ul style="list-style-type: none">• Contador de colonia• Incubadora	<ul style="list-style-type: none">• Alcohol

Elaborado por: Mendoza A. 2016

3.8.5. Control de porcentaje de esporas

Cuadro 7. Control de porcentaje de esporas

MATERIALES	EQUIPOS	REACTIVOS
<ul style="list-style-type: none">• Microtubos eppendorf• Probeta de 10 ml• Marcador indeleble• Pipetas pasteur• Gasa estéril• Mechero• Micro pipetas• Puntas estériles• Vaso de precipitación	<ul style="list-style-type: none">• Contado de Neubauer• Agitador Vórtex• Microscopio	<ul style="list-style-type: none">• Tween 20• Agua destilada• Alcohol

Elaborado por: Mendoza A. 2016

3.9. Manejo específico del experimento

3.9.1. Determinación del rendimiento

El rendimiento de aceite esencial se determinó mediante la expresión:

$$P = \frac{M1}{M2} \times 100\%$$

Donde:

M1: masa final de aceite esencial.

M2: masa inicial de follaje

100 = factor matemático.

3.9.2. Descripción de la extracción de aceite esencial de *Mentha spicata L* por hidrodestilación

- **Recepción:** Se deben garantizar que las condiciones de transporte, no afectan las características fisicoquímicas de *Mentha spicata L*.
- **Pretratamiento de la materia prima (limpieza):** La limpieza la hoja *Mentha spicata L*. consiste en separar materiales como polvo, raíces tallo y otros.

- **Deshidratación:** En el caso de material fresco, es necesario realizar un tratamiento de deshidratación previo hasta alcanzar un porcentaje de humedad óptimo.
- **Reducción de tamaño:** Como el vapor de agua penetra en los tejidos del material vegetal y vaporiza la mayoría de las sustancias volátiles, para asegurar una mayor superficie de contacto y exposición de las glándulas de aceite, se requiere picar y/o moler los vegetales según su consistencia.
- **Extracción hidrodestilación:** Se carga el material vegetal a procesar. De esta etapa se obtiene como subproducto agua aromática del proceso.
- **Condensación:** Al vapor generado en la cámara de extracción, el cual contiene vapor de agua y aceite esencial, se le acondiciona mediante el cambio de fase para iniciar así un proceso de separación.
- **Separación del aceite:** La mayor parte de los componentes de los aceites esenciales son volátiles y relativamente inmiscibles en el agua, característica ésta que permite su separación de la mezcla del destilado. En esta etapa del proceso se obtiene el Aceite Esencial como producto principal y un hidrolato al que se le considera un subproducto.
- **Envasado y Almacenamiento:** Se deben seguir los lineamientos de las buenas prácticas de manufactura para recursos naturales vegetales (BPMRNV).

3.9.3. Descripción de la inhibición de hongos en *Lycopersicon esculentum* M. (tomate)

- **Solución de agar:** Se pesaron 39g de PDA (Potato Dextrosa Agar), en un litro de agua destilada, de lo cual se disuelve poco a poco el PDA (Potato Dextrosa Agar) en el agua procurando que no queden grumos, adicionando Sulfato de Estreptomicina "GM" con alcohol como antibiótico al .5% y diluyéndolo durante varios minutos en el microondas y dejándolo enfriar.
- **PDA esterilizado:** Se distribuyó en varios envases de vidrio para una mejor manipulación y distribución para llevarlo a esterilizar en la autoclave durante tres horas, luego de estar esterilizado se almacena en refrigeración para su conservación.

- **Lavado y desinfectado del *Lycopersicon esculentum* M:** La materia prima se desinfectó con hipoclorito de sodio al 0.1% durante dos minutos y lavando tres veces con agua destilada estéril para retirar residuos del NaClO, secando el tomate con papel toalla estéril.
- **Cámara de flujo laminar esterilizada:** La cámara de flujo laminar se desinfectó con alcohol y algodón antes y después de su uso para evitar cualquier tipo de contaminación al momento de trabajar en ella.
- **Cajas Petri Dispensadas con PDA:** Se colocaron las cajas Petri esterilizadas en la cámara de flujo laminar dispensadas en cada una de ellas 10 ml de PDA, donde se dejó solidificar la solución por varios minutos.
- **Extracción del epicarpio del tomate:** Se escogió la zona del tomate afectada por alguna enfermedad causada por hongo para retirar su epicarpio, con un bisturí, se le hicieron pequeños cortes para colocarlos en las cajas con la solución ya solidificada y con una pinza se ubicaron cinco pedazos pequeños por caja sellándolas con cinta parafilm y rotulando.
- **Incubación de los hongos:** Las piezas de tomate, se almacenaron en la incubadora a 25°C durante siete días, teniendo un control diario, verificando el desarrollo de los hongos.
- **Identificación y repique de los hongos en tubos de ensayo:** Una vez obtenido el desarrollo de los hongos se repicaron en tubos de ensayo con solución de PDA con finalidad de tener un previo aislamiento y desarrollo de los hongos, almacenándolos en la incubadora a 25°C por varios días, luego se tomaron pequeñas muestras de los hongos que fueron identificados en el microscopio.
- **Aislamiento de los hongos:** Identificados los hongos, se tomaron muestras de los tubos de ensayo, que se colocaron en cajas Petri con PDA para un mejor desarrollo, almacenándolos en la incubadora a 25°C.
- **Dispensación de la concentración de aceite esencial en PDA:** Desarrollados los hongos, se prepararon las cajas Petri previamente esterilizadas, donde se colocaron las diferentes concentraciones de los aceites esenciales adjuntando el PDA y tween 20, mezclándolos suavemente hasta tener una solución homogénea, con pipetas pasteur se hicieron pequeños círculos en el área del hongo para ser colocados en las cajas petri, se sellaron las cajas con cinta parafilm y se las rotuló según los respectivos tratamientos.

- **Evaluación del crecimiento radial de los hongos:** Se tomaron mediciones del hongo sembrado durante siete días observando si existió o no la inhibición de los aceites esenciales en *Fusarium sp.* y *Alternaria sp.*

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

- **Evaluación del porcentaje de esporas:** Se tomaron muestras de las cajas petri adicionadas con agua estéril, colocando el líquido en microtubos eppendorff, agitadas en un vórtex, para luego contar las esporas en el contador de Neubauer donde fueron observadas mediante el microscopio.

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

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS

4.1.1. Extracción de aceites esencial de hoja *Mentha spicata* L. (hierbabuena) por hidrodestilación en el laboratorio

A partir de la hoja *Mentha Spicata* L. donde se utilizó 500g se logró la extracción empleando el método de hidrodestilación, una vez en ebullición durante 3 a 4 horas se logra obtener 1,2 mL de aceite esencial de un color incoloro o ligeramente amarillo claro con un aroma cálido, que recuerda a la menta, pero es más dulce. Verificando una Densidad por el método del picnómetro de 0,8731 g/mL. Con un rendimiento de 0,209544 % de extracción total.

4.1.2. Potencial antifúngico del aceite esencial *Mentha spicata* L. (hierbabuena) sobre los hongos *Fusarium sp* y *Alternaria sp* aislados del en *Lycopersicon esculentum* M. (tomate)

Inhibición del crecimiento radial de *Fusarium sp* durante 48 horas, 96 horas y 168 horas de medición

El potencial antifúngico del aceite esencial extraído por hidrodestilación de hojas *Mentha spicata* L. en las primeras 48 horas de medición del crecimiento radial es 100% de inhibición en todas concentraciones al 0,5 %; 1,5 % y 2,5 % sobre el *fusarium sp*. El aceite esencial adquirido en el laboratorio de Isabruk Botanic obtuvo el mismo porcentaje de actividad antifúngica de crecimiento radial con un 100% de inhibición.

En las 96 horas la actividad antifúngica del aceite esencial extraído de hojas de *Mentha Spicata* no mostro diferencia con un 100% de inhibición al igual que el aceite esencial adquirido en el laboratorio de Isabruk Botanic.

Los resultados finales a las 168 horas presentan un porcentaje de inhibición del crecimiento radial de 100% en concentraciones al 0,5 %, 1,5 %, y 2,5 %. Por último, para el aceite esencial comercial se evidencio una actividad antifúngica del crecimiento radial de 100% en sus tres concentraciones como se aprecia en el Cuadro 8

Fusarium sp

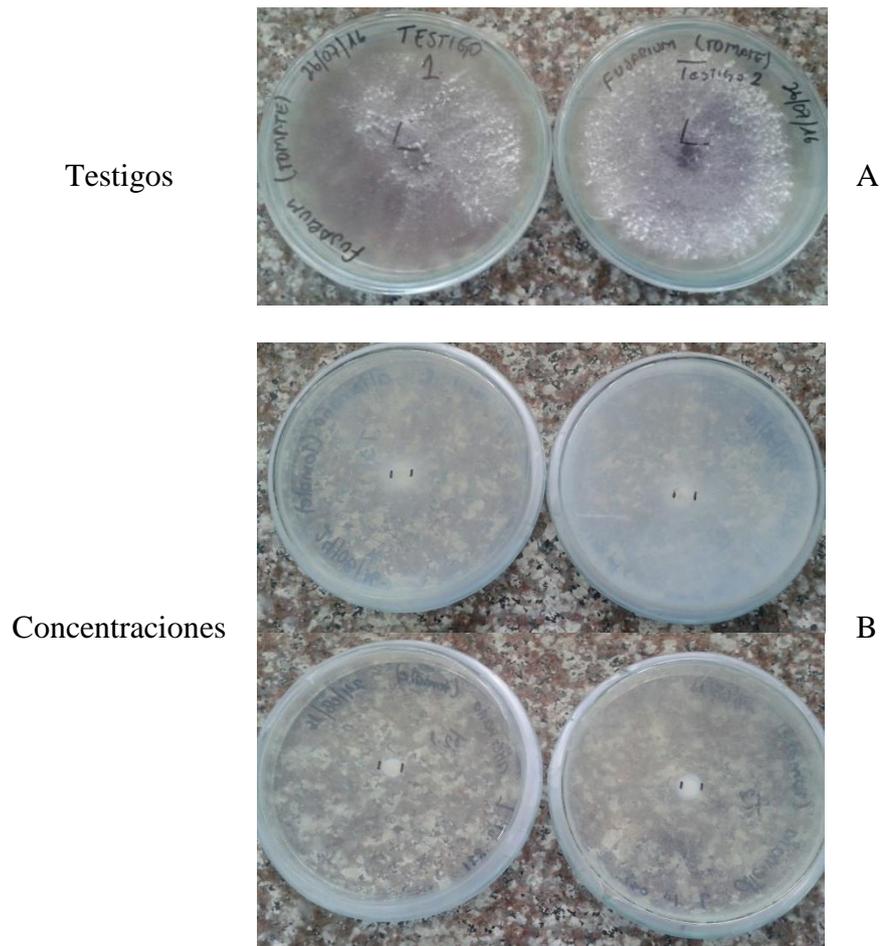


Fig. 2 Inhibición del crecimiento radial de *Fusarium sp*. A). Testigos 1 y 2 en crecimiento radial por 7 días de medición. B). Concentraciones al 0,5%; 1,5% y 2,5% de aceite esencial de *Mentha spicata L* con un porcentaje de 100% de inhibición.

Cuadro 8 Resultados porcentuales obtenidos de las medias de Inhibición del Crecimiento Radial de *Fusarium sp*

Descripción	% de Inhibición Crecimiento Radial para el Testigo		
	48 h	96 h	168 h
AE Laboratorio + 0,5 % + <i>Fusarium sp</i>	100	100	100
AE Laboratorio + 1,5 % + <i>Fusarium sp</i>	100	100	100
AE Laboratorio + 2,5% + <i>Fusarium sp</i>	100	100	100
AE Comercial + 0,5 % + <i>Fusarium sp</i>	100	100	100
AE Comercial + 1,5 % + <i>Fusarium sp</i>	100	100	100
AE Comercial + 2,5 % + <i>Fusarium sp</i>	100	100	100
Testigo (<i>Fusarium sp</i>)	0	0	0

Elaborado por: Mendoza A. 2016

Inhibición de germinación de esporas del *Fusarium sp*, posterior a las 168 horas

El aceite esencial de *Mentha spicata L*, extraído por hidrodestilación de hojas en el laboratorio tanto como el aceite esencial del laboratorio de Isabruk Botanic de inhibió la germinación de Esporas, obteniendo un porcentaje del 100% en sus distintas concentraciones al 0,5 %, 1,5 %, y 2,5 %. Mientras que el control obtuvo un 0% de inhibición, Cuadro 9.

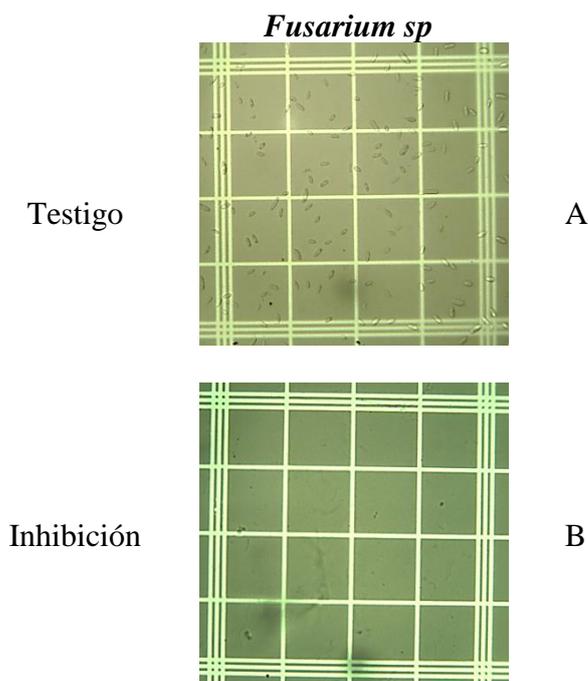


Fig. 3 Inhibición de germinación de esporas del *Fusarium sp*. A). Esporas de control testigo (*fusarium sp*). B). Inhibición de esporas con un porcentaje de 100%

Cuadro 9 Resultados porcentuales obtenidos de las medias de inhibición de germinación de esporas de *Fusarium sp*.

Descripción	% de Inhibición de Esporas
AE Laboratorio + 0,5 % + <i>Fusarium sp</i>	100
AE Laboratorio + 1,5 % + <i>Fusarium sp</i>	100
AE Laboratorio + 2,5% + <i>Fusarium sp</i>	100
AE Comercial + 0,5 % + <i>Fusarium sp</i>	100
AE Comercial + 1,5 % + <i>Fusarium sp</i>	100
AE Comercial + 2,5 % + <i>Fusarium sp</i>	100
Testigo (<i>Fusarium sp</i>)	0

Elaborado por: Mendoza A. 2016

Inhibición del crecimiento radial de *Alternaria sp* durante 48 horas, 96 horas y 168 horas de medición

El potencial antifúngico del aceite esencial extraído por hidrodestilación de hojas *Mentha spicata L.* en las 48 horas de medición del crecimiento radial es 100% de inhibición en todas concentraciones al 0,5 %; 1,5 % y 2,5 % sobre el *Alternaria sp* del *Lycopersicon esculentum M.* (tomate). El aceite esencial comercial obtuvo un porcentaje de actividad antifúngica de crecimiento radial con un 100% de inhibición.

La actividad antifúngica del aceite esencial extraído de hojas de *Mentha Spicata* en las 96 horas no mostró diferencia con un 100% de inhibición al igual que el aceite esencial adquirido en el laboratorio de Isabruk Botanic.

En las 168 horas los resultados finales el aceite esencial extraído presenta un porcentaje de inhibición del crecimiento radial de 100% en concentraciones al 0,5 %, 1,5 %, y 2,5 %. Por último, para el aceite esencial comercial se evidencio una actividad antifúngica del crecimiento radial de 100% en sus tres concentraciones como podemos observar en el Cuadro 10.

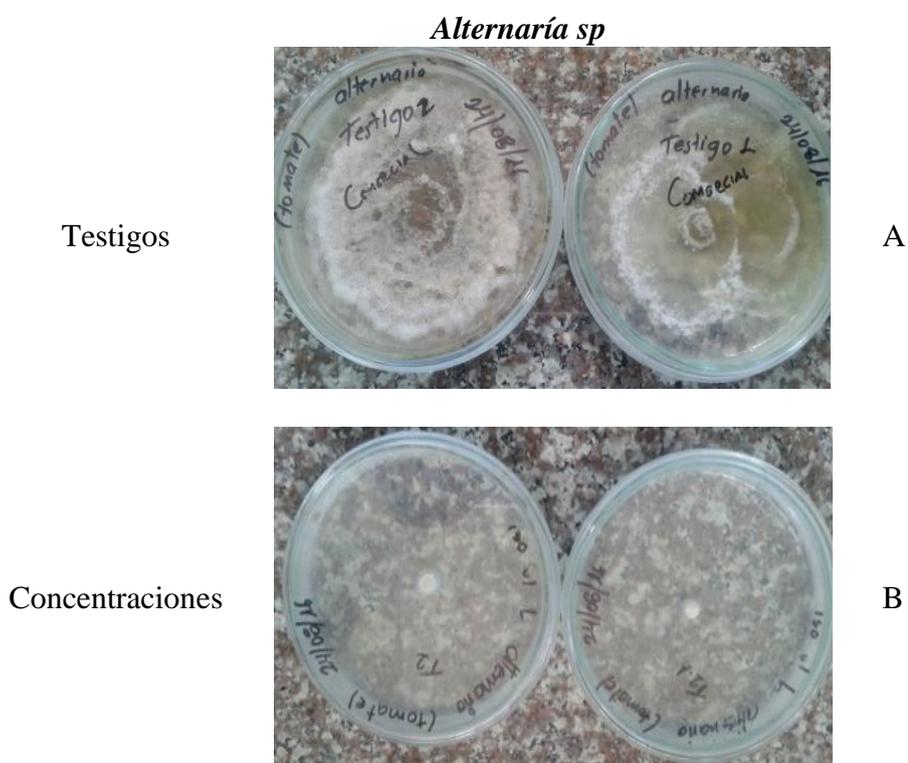




Fig. 4 Inhibición del crecimiento radial de *Alternaria sp.* A). Testigos 1 y 2 en crecimiento radial por 7 días de medición. B). Concentraciones al 0,5%; 1,5% y 2,5% de aceite esencial de *Mentha spicata L* con un porcentaje de 100% de inhibición.

Cuadro 10 Resultados porcentuales obtenidos de las medias de inhibición del crecimiento radial de *Alternaria sp*

Descripción	% de Inhibición Crecimiento Radial para el Testigo		
	48 h	96 h	168 h
AE Laboratorio + 0,5% + <i>Alternaria sp</i>	100	100	100
AE Laboratorio + 1,5% + <i>Alternaria sp</i>	100	100	100
AE Laboratorio + 2,5 % + <i>Alternaria sp</i>	100	100	100
AE Comercial + 0,5% + <i>Alternaria sp</i>	100	100	100
AE Comercial + 1,5 % + <i>Alternaria sp</i>	100	100	100
AE Comercial + 2,5 % + <i>Alternaria sp</i>	100	100	100
Testigo (<i>Alternaria sp</i>)	0	0	0

Elaborado por: Mendoza A. 2016

Inhibición de germinación de esporas del *Alternaria sp*, posterior a las 168 horas

El aceite esencial de *Mentha spicata L*, extraído por hidrodestilación de hojas en el laboratorio tanto como el aceite esencial del laboratorio de Isabruk Botanic de inhibió la germinación de Esporas del *Alternaria sp*, obteniendo un porcentaje del 100% en sus distintas concentraciones al 0,5 %, 1,5 %, y 2,5 %. Mientras que el control obtuvo un 0% de inhibición, Cuadro 11.

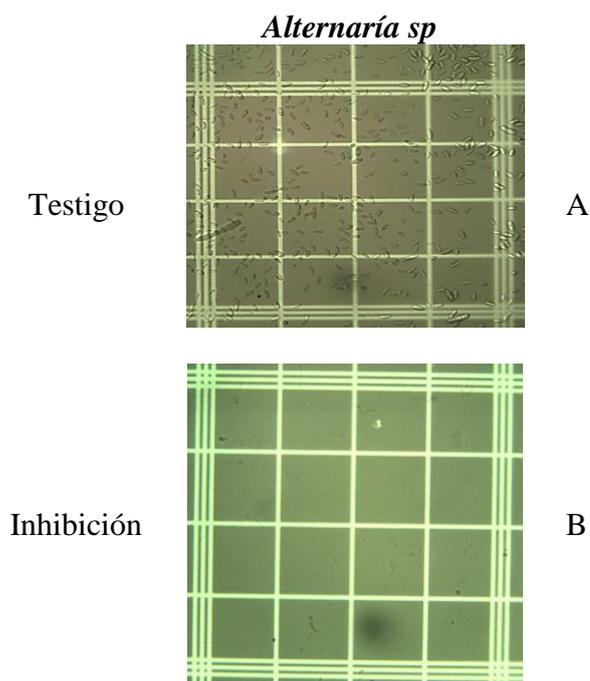


Fig. 3 Inhibición de germinación de esporas del *Alternaría sp*. A). Esporas de control testigo (*Alternaría sp*). B). Inhibición de esporas con un porcentaje de 100%

Cuadro 11 Resultados porcentuales obtenidos de las medias de inhibición de germinación de esporas de *Alternaría sp*.

Descripción	% de Inhibición de Esporas
AE Laboratorio + 0,5% + <i>Alternaría sp</i>	100
AE Laboratorio + 1,5% + <i>Alternaría sp</i>	100
AE Laboratorio + 2,5 % + <i>Alternaría sp</i>	100
AE Comercial + 0,5% + <i>Alternaría sp</i>	100
AE Comercial + 1,5 % + <i>Alternaría sp</i>	100
AE Comercial + 2,5 % + <i>Alternaría sp</i>	100
Testigo (<i>Alternaría sp</i>)	0

Elaborado por: Mendoza A. 2016

4.2. DISCUSIONES

4.2.1. Extracción de aceites esencial de hoja *Mentha spicata* L. (hierbabuena) por hidrodestilación en el laboratorio

La extracción por hidrodestilación a partir 500g materia prima la hoja *Mentha Spicata* L. se evidencia un total 1,2 mL aceite esencial, donde se asemejan con los resultados obtenidos que según [21] en el desarrollo de un sistema de extracción de aceites esenciales donde se utilizó 5 kg de menta a partir del tiempo muerto, hasta los 90 minutos donde se extrae alrededor del 91.6% del total obteniendo 12mL de aceite esencial extraído.

Los resultados a la densidad del aceite esencial de *Mentha spicata* L obtenido por el picnómetro fue de 0,8731 g/mL, aceite esencial con similar respuesta fue logrado por [22] su densidad relativa ($0,8924 \pm 0,0021$) fue medida por picnometría en la hidrodestilación de aceite esencial de 5 plantas aromáticas. El rendimiento de aceite esencial de *Mentha spicata* L de 0,209544 % se encuentra entre los rangos establecidos por [22] usando sus flores, hojas y tallos enteros. Hisopo español (*hyssopus officinalis* L. ssp. *aristatus* (Godr.) Briq.): Con un rendimiento de $1,63 \pm 0,20\%$ g/g.

4.2.2. Potencial antifúngico del aceite esencial *Mentha spicata* L. (hierbabuena) sobre los hongos *Fusarium sp* y *Alternaría sp* aislados del *Lycopersicon esculentum* M. (tomate)

Según los resultados del potencial antifúngico en crecimiento radial del *Fusarium sp* y *Alternaría sp*, el aceite esencial *Mentha spicata* L. (hierbabuena) presentó un valor alto en inhibición para los dos patógenos de 100%. Por la aplicación de aceites esenciales se verificando un alto efectivo inhibitorio con una MIC de 0,5 %, 1,5% y 2,5% para los dos hongos antes descrito. Resultados similares fueron obtenidos por [23] ella demostró que la aplicación de los aceites esenciales *Mentha spicata* (hierbabuena) y *Matricaria chamomilla* (manzanilla) en la inhibición de hongos en dos variedades de tomate el aceite esencial de hierbabuena presentó el valor más alto de 100%, el mismo que se encuentra dentro del rango según [25].

En la investigación según [27], de Inhibición del crecimiento in vitro de *Fusarium sp.* aislado de chile habanero (*Capsicum chinensis*) con hongos antagonistas los testigo usados están en los rangos establecidos por los investigadores.

Las esporas es el mecanismo de propagación del hongo para poder colonizar la planta huésped, al inhibir la germinación de las esporas estamos desarrollando un efecto para combatir de forma efectiva el avance de la enfermedad. El aceite esencial, en la pared celular del hongo estaría causando lisis. Impidiendo que el hongo alcance su ciclo reproductivo para su propagación. Esto se corrobora según los resultados del germinación de Esporas del *Fusarium sp* y *Alternaria sp*, el aceite esencial *Mentha spicata L.* (hierbabuena) presentó un valor alto en potencial antifúngico para los dos hongos de 100% con aplicación del aceite esencial a 0,5%, %, 1,5% y 2,5%. Esto se corrobora con [23] en los resultados de inhibición de esporas el A.E Hierbabuena le dio un porcentaje 99,78% de inhibición. En la investigación según [27], de Inhibición del crecimiento in vitro de *Fusarium sp.* aislado de chile habanero (*Capsicum chinensis*) con hongos antagonistas los testigo usados están en los rangos establecidos por los investigadores.

4.2.3. Comparar el efecto antifúngico de los aceites esenciales *Mentha spicata L.* (hierbabuena) del aceite esencial extraído en el laboratorio con el AE comercial

Según los resultados de la comparación del efecto antifúngico de los aceites esenciales *Mentha spicata L.* (hierbabuena) del aceite esencial extraído en el laboratorio con el AE adquirido en el laboratorio de Isabruk Botanic, el crecimiento radial y esporas del *Fusarium sp* y *Alternaria sp*, el aceite esencial *Mentha spicata L.* (hierbabuena) presentó un valor alto en porcentaje de inhibición para los dos tipos de aceites esenciales con un 100% AE. Laboratorio y 100% AE. Comercial, en la investigación según [29] Evaluación in vitro de la actividad fungistática del aceite esencial de mandarina sobre el crecimiento de *Penicillium sp*, son valores aceptables donde todos los compuestos y aceites evaluados presentaron un porcentaje de inhibición entre $50 \pm 100\%$, ya que los aceites esenciales pueden ser utilizados sobre en cualquier alimento o materia prima y son considerados como sustancias seguras para el consumo humano o animal. También en la investigación según [23] presento un valor de 100% de inhibición utilizando un aceite comercial de *Mentha spicata L.* (hierbabuena).

4.2.4. Concentración inhibitoria del aceite esencial *Mentha spicata* L. (hierbabuena) en la inhibición de los hongos *Fusarium sp* y *Alternaría sp*

En lo que respecta a las concentraciones de aceites esenciales en crecimiento radial y esporas presentó valores altos con un porcentaje de 100% para la inhibición del *Fusarium sp* y *Alternaría sp* en las 3 concentraciones c_0 0,5%; c_1 1,5% y c_2 2,5%, valores aceptables de concentraciones en la acción anti fúngica de los aceites esenciales inhibieron los hongos, según [27] en la investigación del crecimiento in vitro de *Fusarium sp.* aislado de chile habanero (*Capsicum chinensis*) la base de área de inhibición del crecimiento, el antagonista *Trichoderma sp.* cepa H2 causó significativamente mayor porcentaje de inhibición (82,2 %). Según [23] en la aplicación de los aceites esenciales *Mentha spicata* (hierbabuena) y *Matricaria chamomilla* (manzanilla) en la inhibición de hongos en dos variedades de tomate en sus concentraciones c_0 (100 μ L), c_1 (200 μ L), c_2 (400 μ L); la *Mentha spicata* L. (hierbabuena) en la germinación de esporas fue de c_2 (93,08) (400 μ l) siendo el de más alto porcentaje puede ser usada como medicamento por su confiabilidad en el potencial de inhibición según los investigadores [24]

4.2.5. Tratamiento de la hipótesis

La concentración al 0,5 % de aceite esencial de *Mentha spicata* L., si inhibe a los hongos *Fusarium sp* y *Alternaría sp* aislados del en *Lycopersicon esculentum* M. (tomate).

Por lo tanto; la hipótesis presentada se aprueba según los resultados obtenidos en la determinación de la concentración inhibitoria dando un porcentaje al 100% de inhibición de los hongos *Fusarium sp* y *Alternaría sp* en esta investigación.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Para disponer del requerimiento para el estudio de 6 mL de aceite esencial *Mentha spicata L.* se realizaron 5 hidridestilaciones, obteniendo de cada una 1,2 mL de 500g de hojas.
- El potencial antifúngico del aceite esencial *Mentha spicata L.* (hierbabuena) es excelente inhibidor de hongos *Fusarium sp* y *Alternaría sp* aislados del *Lycopersicon esculentum M.* (tomate)
- La comparación del aceite esencial extraído en el laboratorio con el AE comercial de *Mentha spicata L.* (hierbabuena) para efecto antifúngico no mostró diferencia entre estos aceites.
- Las tres concentraciones inhibitoria estudiadas (0,5%; 1,5% y 2,5%) de aceite esencial *Mentha spicata L.* (hierbabuena) inhiben al 100% a los hongos *Fusarium sp* y *Alternaría sp.* aislados de *Lycopersicon esculentum M.* (tomate).

5.2. Recomendaciones

- Implementar equipos de planta piloto para la extracción de aceites esenciales en la Universidad Técnica Estatal de Quevedo.
- En lo que respecta al potencial antifúngico se recomienda el aceite esencial *Mentha Spicata L.* (hierbabuena) es excelente inhibidor de hongos *Fusarium sp* y *Alternaría sp* aislados del *Lycopersicon esculentum M.* (tomate)
- En lo concerniente a la comparación el efecto se recomienda utilizar el aceite esencial *Mentha spicata L.* (hierbabuena) extraído en el laboratorio y el AE comercial ya que tienen la misma inhibición fúngica.
- La concentración inhibitoria al 0,5% de aceite esencial *Mentha spicata L.* se recomienda aplicarla para inhibir a *Fusarium sp* y *Alternaría sp.* por lo que no se encontró diferencia con las demás concentraciones mayores; recomendamos una nueva investigación con menores concentraciones para una mayor exactitud.

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFÍA

6.1. Bibliografía

- [1] F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck y M. Idaomar, «Biological effects of essential oils – A review,» *sciencedirect*, p. 446–475, 29 09 2007.
- [2] M. B. Isman, «Plant essential oils for pest and disease management,» *sciencedirect*, p. 603–608, 30 10 2000.
- [3] M. Rodríguez Álvarez, L. Alcaez Meléndez y S. M. Real Cosío, «Procedimiento para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas,» Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, México, 2012.
- [4] M. D. Márquez Romero, *Plntas Aromáticas*, Buenos Aires: Kier S.A., 2004.
- [5] D. Kalembe y A. Kunicka, «Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils,» *ingentaconnect*, pp. 813-829, 2003.
- [6] P. y K. Damian, *Aromaterapia El olor y la psique*, México: Ediciones Étoile, S.A. de C.V., 1997.
- [7] Á. C. L. C. C. Olga Moreiras, *Tablas de composición de alimentos*, Madrid: Pirámide, 2013.
- [8] «4.2. Hidrodestilación. | CAPÍTULO 4. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN Y CONCENTRACIÓN,» Univercidad Nacional Abieta y a Distancia, 2008. [En línea]. Available:
datateca.unad.edu.co/contenidos/401552/Capitulo_4/42hidrodestilacin.html.
- [9] J. M. S. d. Castillo, *Micotoxinas en Alimentos*, España: Díaz de Santos, 2007.
- [10] V. H. Méndez Estradas y J. Monge Nágera, *COSTA RICA HISTORIA NATURAL*,

San José: EUNED, 2007.

- [11] U. Thrane, «Fusarium,» *sciencedirect*, p. 76–81, 2014.
- [12] V. P. G. Ocaña, «Estudio de la Afinidad de Especies de Caricaceae como Patrones de Babaco y su reacción a *Fusarium oxysporum*,» Quito - Ecuador, 2002.
- [13] A. Patriarca, G. Vaamonde y V. F. Pinto, «*Alternaria*,» *sciencedirect*, p. 54–60, 2014.
- [14] J. H. Woudenberg, J. Z. Groenewald, M. Binder y P. W. Crous, «*Alternaria* redefined,» *sciencedirect*, p. 171–212, 2013.
- [15] F. Nuez y M. J. Díez, «*Solanum lycopersicum* var. *lycopersicum* (Tomato),» *sciencedirect*, pp. 476-480, 11 04 2013.
- [16] J. A. Jenkins, «The origin of the cultivated tomato,» *springer*, pp. 379-392, 10-12 1948.
- [17] F. A. Vallejo Cabrera y E. I. Estrada Salazar, Producción de hortalizas de clima cálido, Cali: Imágenes Gráficas S.A., 2004.
- [18] D. Blancard, Enfermedades del Tomate, Identificar, Conocer y Controlar, Madrid - Mexico: Mundi-Persa, 2011.
- [19] J. M. Roldán, «Recolección, almacenamiento y transporte de flores y hortalizas,» INNOVA Y CUALIFICACIÓN, S.L., ANTEQUERA, Málaga, 2011.
- [20] J. C. Waltterson, «Diseases,» *springer*, pp. 443-484 , 1986.
- [21] P. P. Diego Orlando y Q. C. Fabián Danilo, DESARROLLO DE UN SISTEMA DE EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES, Riobanba: Espoch, 2010.

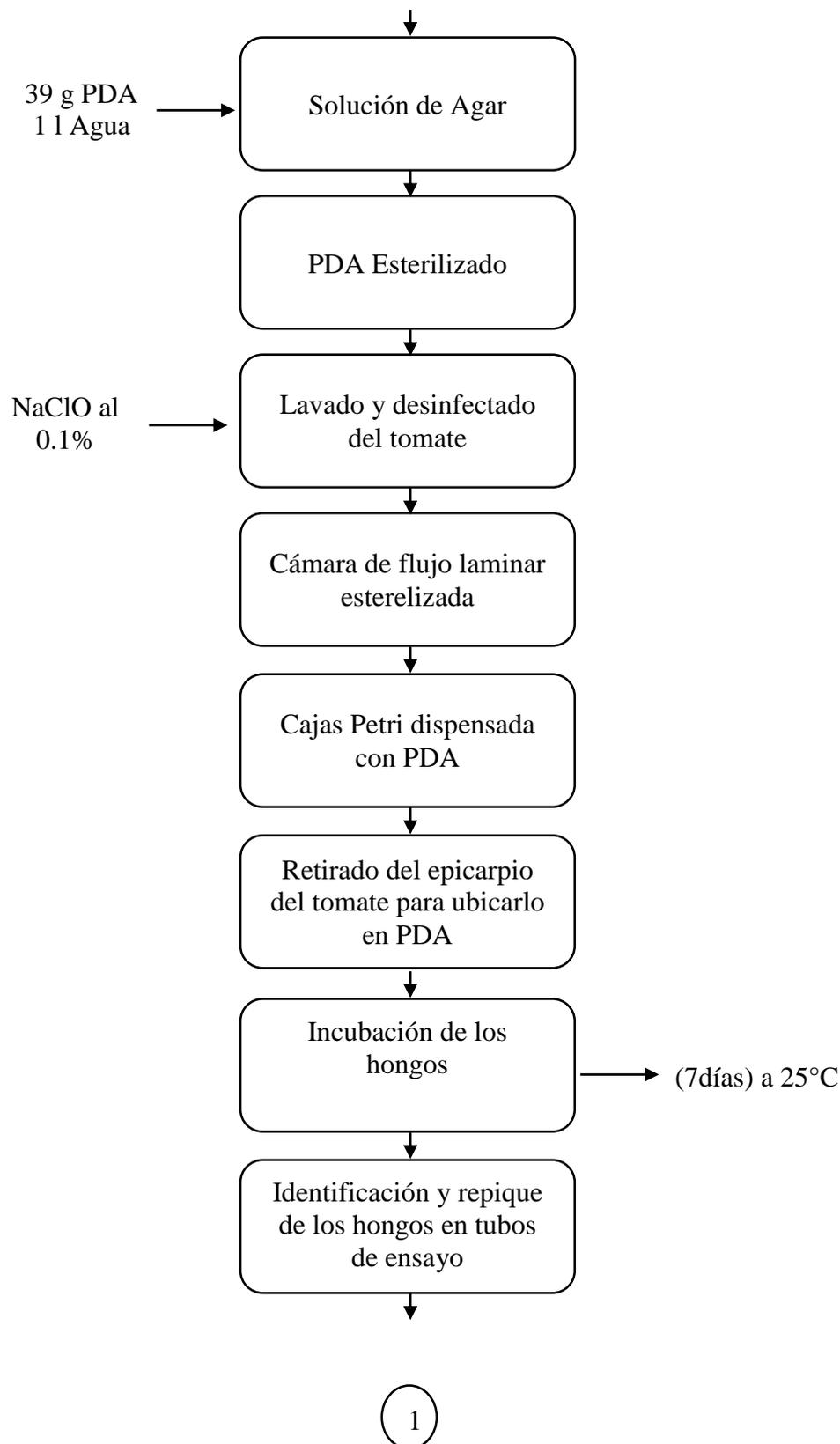
- [22] C. C. Manuel Guillermo, HIDRODESTILACION DE ACEITES ESENCIALES: MODELADO Y CARACTERIZACION, Valladolid: UNIVERSIDAD DE VALLADOLID, 2007.
- [23] M. C. Sabando Varela, APLICACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES *Mentha spicata* (HIERBABUENA) Y *Matricaria chamomilla* (MANZANILLA) EN LA INHIBICIÓN DE HONGOS EN DOS VARIEDADES DE TOMATE, Quevedo, 2015.
- [24] L. I. M. L. I. J. P. T. C. C. Lic. Ester Sánchez, «ESTANDARIZACIÓN DE *Mentha spicata* L. MEDICAMENTO HERBARIO CON ACTIVIDAD ANTIESPASMÓDICA,» 1998. [En línea]. Available: http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol3_1_98/pla06198.htm.
- [25] Y. Duarte, O. Pino, D. Infante, M. Del Carmen, Sánchez Yaima, M. d. C. Travieso y B. Martínez , «scielo.sld.cu,» 04 2013. [En línea]. Available: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522013000100007.
- [26] L. Salazar, N. Sanabria, G. Aponte, M. Alcano, R. Herrera, D. Colmenares, M. Espinoza, L. Alemán y S. Magaña, «www.scielo.org.ve,» 2011. [En línea]. Available: <http://www.scielo.org.ve/pdf/ba/v23n3/art05.pdf>.
- [27] A. Reyes Ramires, J. Cristóbal Alejo, E. Ruiz Sánchez y J. M. Tum Suárez, Inhibición del crecimiento in vitro de *Fusarium* sp. aislado de chile habanero (*Capsicum chinensis*) con hongos antagonistas, Yucatán, 2012.
- [28] Y. Duarte, O. Pino y B. Martínez, «scielo.sld.cu,» 12 2013. [En línea]. Available: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522013000300013.
- [29] R. M. Á. P. J. T. C. P. C. María A. Velásquez1, «Evaluación in vitro de la actividad fungistática del aceite esencial de mandarina sobre el crecimiento de *Penicillium* sp.,» *Scielo*, Junio 2014.

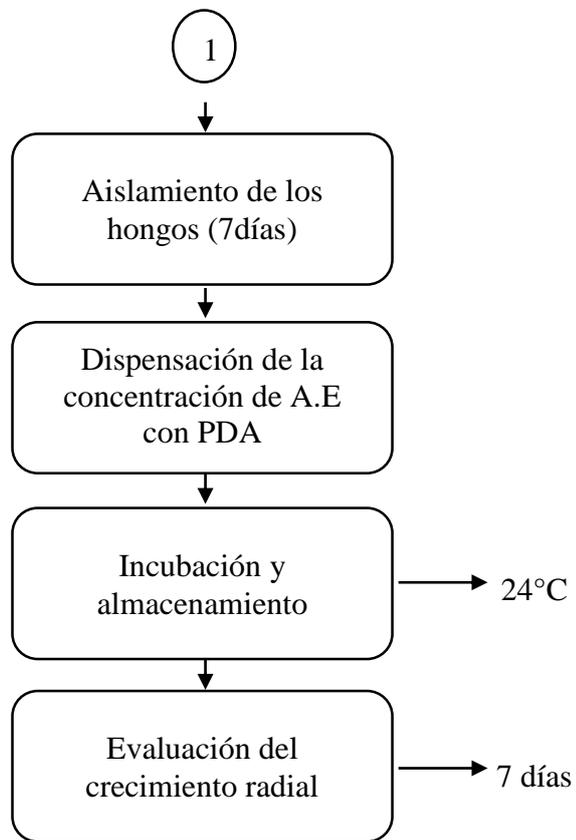
- [30] D. O. Paredes Punina y F. D. Quinatoa Chicaiza, Desarrollo de un sistema de extracción de aceites esenciales, Riobamba: Espoch, 2010.
- [31] Y. Duarte, O. Pino y B. Martínez, «Efecto de cuatro aceites esenciales sobre hongos asociados al manchado del arroz,» vol. 29, nº 1, 2014.

CAPITULO VII

ANEXOS

ANEXO 1. Diagrama de bloques para la determinación de la concentración óptima de aceite esencial *Mentha spicata* L. (hierbabuena) en la inhibición de los hongos *Fusarium sp* Y *Alternaria sp* presente en dos variedades de *Lycopersicon esculentum* M. (tomate).





ANEXO 2. Total en % de Inhibición del Crecimiento Radial en el potencial antifúngico del *Fusarium sp.*

Descripción	Tratamientos	REPETICIONES	% de Inhibición Crecimiento Radial para el Testigo		
			48 h	96 h	168 h
<i>Fusarium sp</i> + AE Laboratorio + 0,5 %	T1	1	100	100	100
	T 1.1	2	100	100	100
	T 1.2	3	100	100	100
<i>Fusarium sp</i> + AE Laboratorio + 1,5 %	T2	1	100	100	100
	T 2.1	2	100	100	100
	T 2.2	3	100	100	100
<i>Fusarium sp</i> + AE Laboratorio + 2,5%	T3	1	100	100	100
	T 3.1	2	100	100	100
	T 3.2	3	100	100	100
<i>Fusarium sp</i> + AE Comercial + 0,5 %	T4	1	100	100	100
	T 4.1	2	100	100	100
	T 4.2	3	100	100	100
<i>Fusarium sp</i> + AE Comercial + 1,5 %	T5	1	100	100	100
	T 5.1	2	100	100	100
	T 5.2	3	100	100	100
<i>Fusarium sp</i> + AE Comercial + 2,5 %	T6	1	100	100	100
	T 6.1	2	100	100	100
	T 6.2	3	100	100	100
Testigo (<i>Fusarium sp</i>)	Test 1 F	1	0	0	0

Elaborado por: Mendoza A. 2016

ANEXO 3. Total en % de Inhibición del Crecimiento Radial en el potencial antifúngico del *Alternaria sp*

Descripción	Tratamientos	REPETICIONES	% de Inhibición Crecimiento Radial para el Testigo		
			48 h	96 h	168 h
<i>Alternaria sp</i> + AE Laboratorio + 0,5%	T1	1	100	100	100
	T 1.1	2	100	100	100
	T 1.2	3	100	100	100
<i>Alternaria sp</i> + AE Laboratorio + 1,5 %	T2	1	100	100	100
	T 2.1	2	100	100	100
	T 2.2	3	100	100	100
<i>Alternaria sp</i> + AE Laboratorio + 2,5 %	T3	1	100	100	100
	T 3.1	2	100	100	100
	T 3.2	3	100	100	100
<i>Alternaria sp</i> + AE Comercial + 0,5%	T4	1	100	100	100
	T 4.1	2	100	100	100
	T 4.2	3	100	100	100
<i>Alternaria sp</i> + AE Comercial + 1,5 %	T5	1	100	100	100
	T 5.1	2	100	100	100
	T 5.2	3	100	100	100
<i>Alternaria sp</i> + AE Comercial + 2,5 %	T6	1	100	100	100
	T 6.1	2	100	100	100
	T 6.2	3	100	100	100
Testigo (<i>Alternaria sp</i>)	Test 1 R	1	0	0	0

Elaborado por: Mendoza A. 2016

ANEXO 4. Evaluación total de los tratamientos en el porcentaje de inhibición de esporas del *Fusarium sp*

Descripción	Tratamientos	REPETICIONES	% de Inhib. de Esp
<i>Fusarium sp</i> + AE Laboratorio + 0,5 %	T1	1	100
	T 1.1	2	100
	T 1.2	3	100
<i>Fusarium sp</i> + AE Laboratorio + 1,5 %	T2	1	100
	T 2.1	2	100
	T 2.2	3	100
<i>Fusarium sp</i> + AE Laboratorio + 2,5%	T3	1	100
	T 3.1	2	100
	T 3.2	3	100
<i>Fusarium sp</i> + AE Comercial + 0,5 %	T4	1	100
	T 4.1	2	100
	T 4.2	3	100
<i>Fusarium sp</i> + AE Comercial + 1,5 %	T5	1	100
	T 5.1	2	100
	T 5.2	3	100
<i>Fusarium sp</i> + AE Comercial + 2,5 %	T6	1	100
	T 6.1	2	100
	T 6.2	3	100
Testigo (<i>Fusarium sp</i>)	Test F	1	0

Elaborado por: Mendoza A. 2016

ANEXO 5. Evaluación total de los tratamientos en el porcentaje de inhibición de esporas del *Alternaria sp*

Descripción	Tratamientos	REPETICIONES	% de Inhib. de Esp
<i>Alternaria sp</i> + AE Laboratorio + 0,5%	T1	1	100
	T 1.1	2	100
	T 1.2	3	100
<i>Alternaria sp</i> + AE Laboratorio + 1,5 %	T2	1	100
	T 2.1	2	100
	T 2.2	3	100
<i>Alternaria sp</i> + AE Laboratorio + 2,5 %	T3	1	100
	T 3.1	2	100
	T 3.2	3	100
<i>Alternaria sp</i> + AE Comercial + 0,5%	T4	1	100
	T 4.1	2	100
	T 4.2	3	100
<i>Alternaria sp</i> + AE Comercial + 1,5 %	T5	1	100
	T 5.1	2	100
	T 5.2	3	100
<i>Alternaria sp</i> + AE Comercial + 2,5 %	T6	1	100
	T 6.1	2	100
	T 6.2	3	100
Testigo (<i>Alternaria sp</i>)	Test 1 R	1	0

Elaborado por: Mendoza A. 2016

ANEXO 6. Fotos de la fase experimental

EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE <i>Mentha Spicata</i> L. (hierbabuena)			
			
Adición de hojas y agua en el balón de destilación	Calentamiento de la manta de calentamiento análoga	Extracción del Aceite Esencial	Aceite esencial extraído

Elaborado por: Mendoza A. 2016

ACEITE ESENCIAL COMERCIAL DE <i>Mentha Spicata</i> L. (hierbabuena)		
		
Información	Presentación	Contenido

Elaborado por: Mendoza A. 2016

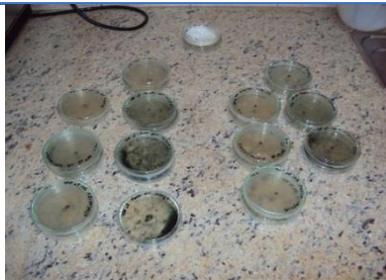
PATÓGENOS DEL <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. (TOMATE)			
			
<i>Fusarium</i> sp., muestra principal		<i>Alternaria</i> sp., muestra principal	

Elaborado por: Mendoza A. 2016

CONCENTRACIONES DE ACEITES ESENCIALES APLICADOS A LOS HONGOS



Aislamiento de los hongos con las concentraciones de 50 μ l, 150 μ l y 250 μ l, de aceites esenciales de *Mentha Spicata L* (Hierbabuena)



Tratamientos

Incubadora

Tratamientos incubados

Elaborado por: Mendoza A. 2016

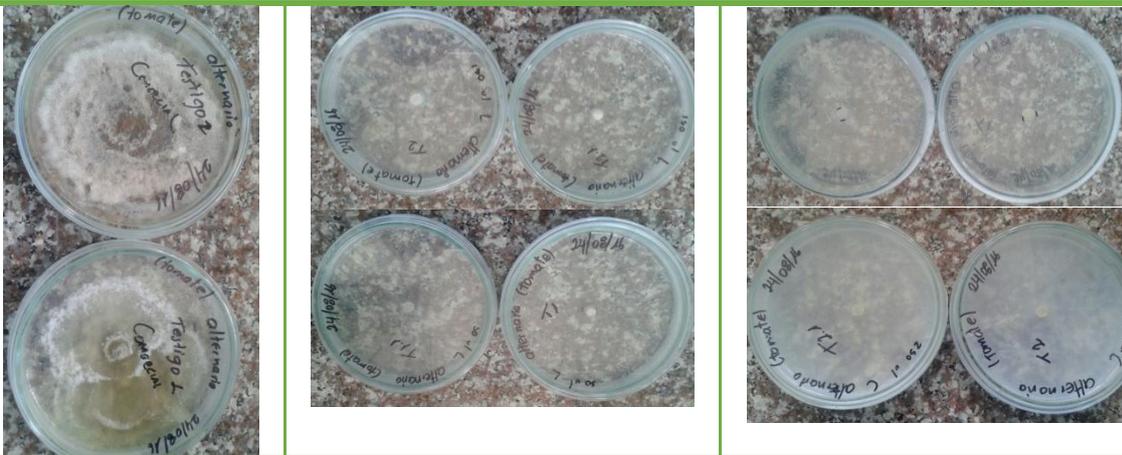
CRECIMIENTO RADIAL DE LOS HONGOS *FUSARIUM SP.*



Testigos de *Fusarium sp.*, con los tratamiento de 0,5%; 1,5% y 2,5% de aceite esencial de Hierbabuena

Elaborado por: Mendoza A. 2016

CRECIMIENTO RADIAL DE LOS HONGOS *ALTERNARIA SP.*



Testigos de *Alternaria sp.*, con los tratamiento de 0,5%; 1,5% y 2,5% de aceite esencial de Hierbabuena

Elaborado por: Mendoza A. 2016

CONTEO DE ESPORAS



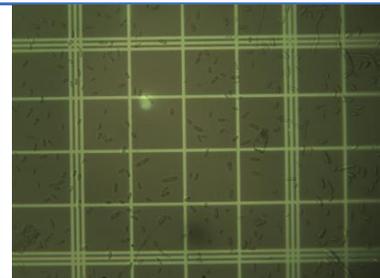
Preparación para el conteo de esporas de los hongos utilizando agua estéril y tween 20



Contador de Neubauer



Conteo de esporas



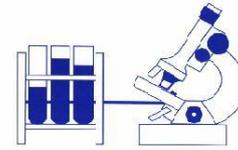
Esporas

Elaborado por: Mendoza A. 2016

ANEXO 7. Técnica de laboratorio para crecimiento radial



LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA TECNICA PARA EL CRECIMIENTO RADIAL



- **OBJETIVO**

- Determinar el crecimiento radial de los hongos durante siete días

- **INSTRUMENTAL**

- Contador de colonia
- Marcador indeleble
- 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).**

- **PROCEDIMIENTO**

- **Paso 1:** Desinfectar las manos y el área de trabajo.
- **Paso 2:** Colocar el contador de colonia en un lugar amplio y estéril.
- **Paso 3:** Colocar las cajas en el contador de colonia y verificar su crecimiento señalando con un marcador.
- **Paso 4:** Se aplica la fórmula correspondiente para verificar el porcentaje de inhibición.

$$T - Tr / T * 100$$

Donde:

T = Testigo

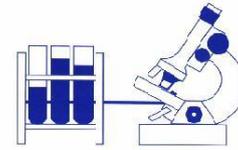
Tr = Tratamiento

ANEXO 8. Técnica de laboratorio para crecimiento de esporas



LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

TECNICA PARA CONTAR ESPORAS



- **OBJETIVO**

- Determinar el número de esporas en los hongos después de los siete días.

- **INSTRUMENTAL**

- Contador de Neubauer
- Microscopio
- Micropipetas
- Puntas estériles
- Pipetas pasteur
- Vaso de precipitación
- Tween 80
- Gasa estéril
- Microtubos eppendorf
- Agitador Vórtex
- Varilla de agitación
- Mechero

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).

- **PROCEDIMIENTO**

- **Paso 1:** Dependiendo del tipo de muestra medir, se ha de habrá de preparar una muestra con una concentración apta para su recuento.
- **Paso 2:** Retirar con cuidado la tapa de la caja petri en donde se encuentran los hongos.
- **Paso 3:** En una probeta de 10 ml colocar agua estéril, para adicionar sobre el hongo.

- **Paso 4:** Con la varilla esparcir el micelio del hongo.
- **Paso 5:** Con la micropipeta absorber el líquido de la caja petri para colocar en el microtubo eppendorf previamente colocado una gasa estéril para evitar filtrar micelio.
- **Paso 6:** Sellar y colocar el microtubo eppendorf en el agitador Vórtex para tener una solución homogénea.
- **Paso 7:** Finalmente la muestra se coloca en el contador de Neubauer para observar en el microscopio la cantidad de esporas obtenidas del hongo.
- **Paso 8:** Para tener el porcentaje de esporas si se realizó el conteo en cuadros grandes se multiplica por 2000 y en cuadros pequeños se multiplica por 50000, aplicando la fórmula del crecimiento radial.

$$T - Tr / T * 100$$

Donde:

T = Testigo

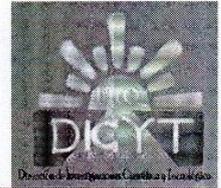
Tr = Tratamiento

ANEXO 9. Certificado de Actividades en el Laboratorio.



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO Coordinación General de Investigación, Desarrollo e Innovación

Km. 1 ½ Vía Quevedo-Santo Domingo de los Tsáchilas
Teléfonos: (593 5) 2757463 Fax: (593 5) 2753303
Quevedo-Los Ríos-Ecuador



Dr. Byron Oviedo Bayas

*COORDINADOR GENERAL DE INVESTIGACIÓN, DESARROLLO E INNOVACIÓN DE LA
UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO (UTEQ).*

CERTIFICO:

*Que el Sr. Alexander Enrique Mendoza Barros con número de identificación 120708346-8 Egresado de la Facultad de Ciencias Ingeniería de la Carrera de Ingeniería Agroindustrial realizó la investigación en el tema titulado "DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE ACEITE ESENCIAL *Mentha spicata* L. (HIERBABUENA) EN LA INHIBICIÓN DE LOS HONGOS *Fusarium sp* Y *Alternaria sp* PRESENTE EN DOS VARIEDADES DE *Lycopersicon esculentum* M. (TOMATE) EN QUEVEDO, 2016", bajo la dirección del Director de Proyecto de Investigación Ing. Flor Marina Fon Fay Vásquez M.Sc, desde el 04 de abril hasta el 11 de noviembre del 2016, en el área de "Biotecnología" Biología Molecular, Microbiología, Cultivo de Tejido.*

Autorizo que el Sr. Alexander Enrique Mendoza Barros hacer uso de la presente certificación en la forma que estimare conveniente a sus intereses personales.

Quevedo, diciembre 07 del 2016

Dr. Byron Oviedo Bayas

*Coordinador General de Investigación, Desarrollo e Innovación
E-mail: boviedo@uteq.edu.ec*

*Universidad Técnica Estatal de Quevedo
Km. 1 ½ vía Quevedo-Santo Domingo de los Tsáchilas, CP. 73
Teléfonos: (593 5) 2757463 Fax: (593 5) 2753303*

