



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA INDUSTRIA Y PRODUCCIÓN
CARRERA DE AGROINDUSTRIA

Proyecto de Investigación previo la
obtención del Grado Académico de
Ingeniera Agroindustrial

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

“EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DE LOS ACEITES
ESENCIALES DE NARANJA (*Citrus sinensis*) EN DOS ESTADOS DE
MADUREZ SOBRE EL HONGO *Lasiodiplodia theobromae* *IN VITRO*”

Autora

María De Los Ángeles López Ortega

DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Qco. Loguard Smith Rojas Uribe, M.Sc.

QUEVEDO – LOS RÍOS – ECUADOR

2025



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, **MARÍA DE LOS ÁNGELES LÓPEZ ORTEGA**, 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.

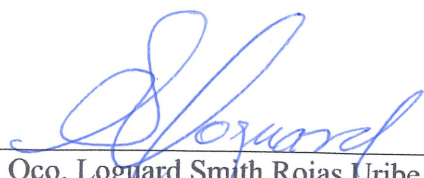
María López

María de Los Ángeles López Ortega
C.C. # 0941370439
Autora



CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

El suscrito, **QCO. LOGUARD SMITH ROJAS URIBE, M.Sc.**, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que la estudiante **MARÍA DE LOS ÁNGELES LÓPEZ ORTEGA** con CI: 0941370439, realizó el Proyecto de Investigación de grado titulado **“EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE NARANJA (*Citrus sinensis*) EN DOS ESTADOS DE MADUREZ SOBRE EL HONGO *Lasiodiplodia theobromae* IN VITRO”**, previo a la obtención del título de **Ingeniera Agroindustrial**, bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.



Qco. Loguard Smith Rojas Uribe, M.Sc.
Director del Proyecto de Investigación

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

El suscrito **Qco. Loguard Smith Rojas Uribe, M.Sc.**, mediante el presente cumpla en presentar a usted, el informe de proyecto de investigación titulado **“EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE NARANJA (*Citrus sinensis*) EN DOS ESTADOS DE MADUREZ SOBRE EL HONGO *Lasiodiplodia theobromae* IN VITRO”** presentado por la estudiante **MARÍA DE LOS ÁNGELES LÓPEZ ORTEGA**, egresado de la carrera de Agroindustria, que fue revisado bajo mi dirección según resolución del Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias de la Industria y Producción, que se ha desarrollado de acuerdo al Reglamento de la Unidad de Integración Curricular de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo y cumple con el requerimiento de análisis de COMPILATIO el cual avala un nivel de similitud de 5%. Valido este documento para que el estudiante siga con los trámites pertinentes, de acuerdo como lo establece el reglamento.

CERTIFICADO DE ANÁLISIS
mayor

EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE NARANJA (Citrus sinensis)

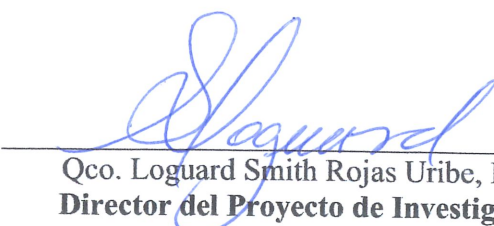
5%
Textos sospechosos

4. Similitudes
9% coincidencias entre palabras
9% entre las frases mencionadas
8% idiomas no reconocidos (ignorado)

Nombre del documento: EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE NARANJA (Citrus sinensis).docx
ID del documento: 4a13e2d247dbaed42cc5ed88fc0555b621747af
Tamaño del documento original: 5,58 MB

Depositante: LOGUARD SMITH ROJAS URIBE
Fecha de depósito: 14/5/2025
Tipo de carga: interfase
Fecha de fin de análisis: 14/5/2025

Número de palabras: 19,247
Número de caracteres: 129,707


Qco. Loguard Smith Rojas Uribe, M.Sc.
Director del Proyecto de Investigación



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA INDUSTRIA Y PRODUCCIÓN
CARRERA DE AGROINDUSTRIA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título:

**EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE
NARANJA (*Citrus sinensis*) EN DOS ESTADOS DE MADUREZ SOBRE EL HONGO
Lasiodiplodia theobromae IN VITRO**

Presentado al Consejo Directivo como requisito previo a la obtención del título de Ingeniera Agroindustrial.

Aprobado por:

Presidente del Tribunal

Ing. Wiston Javier Morales Rodríguez, M.Sc.

Miembro del Tribunal

Ing. Azucena Elizabeth Bernal Gutiérrez, M.Sc.

Miembro del Tribunal

Dr. Luis Alberto Egas Astudillo, PhD

Quevedo – Los Ríos – Ecuador

2025

AGRADECIMIENTOS

Primero y, ante todo, agradezco a Dios, quien ha sido mi fortaleza y mi guía en cada etapa de este camino. Su amor infinito y sus bendiciones me han dado la capacidad de superar cada obstáculo y encontrar propósito en cada paso. Este logro es una muestra de su fidelidad en mi vida.

A mi mamá y mi papá, por su amor incondicional, su ejemplo de esfuerzo y dedicación, y por enseñarme a perseverar incluso en los momentos más difíciles. A mi esposo, por ser mi compañero de vida, por su paciencia infinita y su apoyo inquebrantable que me ha sostenido en los momentos más desafiantes.

A mi familia, quienes han sido el pilar fundamental en mi formación personal y profesional.

A mi tutor, el Ing. Loguard Rojas, expreso mi más sincero agradecimiento por su orientación y compromiso durante este proceso. Su paciencia, sus consejos y su confianza en mi trabajo fueron una guía invaluable para alcanzar este objetivo.

A los docentes de laboratorio, el Ing. Ángel e Ing. Erick, quienes siempre estuvieron prestos a ayudar, compartiendo no solo su conocimiento, sino también su tiempo y experiencia, haciendo de cada momento de aprendizaje una experiencia enriquecedora. Su dedicación y apoyo marcaron una diferencia significativa en mi desarrollo académico.

A mis compañeras de universidad que ya han culminado su carrera, pero que no dudaron en brindarme su ayuda cuando más lo necesité. Su apoyo desinteresado, sus consejos y su ánimo en los momentos difíciles me motivaron a seguir adelante.

Finalmente, agradezco a todas aquellas personas que, de una u otra forma, contribuyeron a que este sueño se hiciera realidad. Este trabajo no solo refleja mi esfuerzo, sino también el apoyo y la inspiración que recibí de cada uno de ustedes.

María de Los Ángeles López Ortega

DEDICATORIA

A mi mamá y a mi papá, por su amor incondicional, sus enseñanzas y su apoyo constante en cada paso de mi vida. Sus valores y ejemplo han sido mi guía para superar cada desafío.

A mi esposo, por ser mi compañero en este camino, por su paciencia, comprensión y por creer en mí incluso cuando yo dudaba. Tu presencia me da fuerzas para seguir adelante.

A mi hermano, por su inspiración, su cariño y su ejemplo de perseverancia.

A ustedes, les dedico este logro que también es suyo, porque sin su respaldo y amor, este sueño no habría sido posible.

María de Los Ángeles López Ortega

RESUMEN

Los aceites esenciales obtenidos a partir de la cáscara de naranja variedad Valencia (*Citrus sinensis*) en estados de madurez: inmadura y madura se evaluaron como agentes antifúngicos frente al hongo fitopatógeno *Lasiodiplodia theobromae*, causante de importantes pérdidas postcosecha. El estudio tuvo como objetivo determinar la composición química y evaluar la eficacia inhibitoria del crecimiento micelial *in vitro* del patógeno. El aceite esencial se obtuvo mediante hidrodestilación, cuantificando su rendimiento y analizando su composición química por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). La actividad antifúngica se evaluó mediante la técnica de alimentos envenenados, probando concentraciones de 25 %, 50 %, 75 % y 100 % del aceite esencial. Se realizó un seguimiento del crecimiento micelial durante 72 horas, tiempo en que el hongo normalmente cubre completamente la superficie del medio agarizado. Los resultados mostraron diferencias en composición química según el grado de madurez; la cáscara inmadura presentó mayor rendimiento (2.21 mL) y concentración de limoneno respecto a la madura (1.81 mL). En términos de inhibición micelial, se observó una actividad significativa únicamente con el aceite al 100 % durante las primeras 24 horas en ambos estados de madurez, aunque el efecto inhibitorio fue temporal y disminuyó considerablemente hacia las 72 horas. No se detectó inhibición significativa a concentraciones inferiores al 100 %. Estos resultados concuerdan con estudios previos que reportan limitada eficacia antifúngica de aceites esenciales cítricos frente a *L. theobromae*. Se concluye que, aunque el aceite esencial de naranja mostró inicialmente cierta actividad antifúngica, esta fue insuficiente para mantener inhibido el crecimiento del patógeno en períodos prolongados, destacando la necesidad de altas concentraciones para lograr efectos apreciables frente a este hongo específico.

Palabras clave: Fitopatógeno, inhibición, micelio, patógeno.

ABSTRACT

Essential oils extracted from the peel of green and ripe Valencia oranges (*Citrus sinensis*) were evaluated as antifungal agents against the phytopathogenic fungus *Lasiodiplodia theobromae*, which causes significant post-harvest losses. The aim of the study was to determine the chemical composition and evaluate the inhibitory effect on the mycelial growth of the pathogen *in vitro*. The essential oil was obtained by hydrodistillation, its yield quantified and its chemical composition analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). Antifungal activity was assessed using the poisoned food technique, testing concentrations of 25%, 50%, 75% and 100% of the essential oil. Mycelial growth was observed for 72 hours, i.e. the time during which the fungus normally completely covers the surface of the agar medium. The results showed differences in chemical composition depending on the degree of ripeness; the green bark had a higher yield (2.21 mL) and limonene concentration than the ripe bark (1.81 mL). With regard to mycelium inhibition, significant activity was observed only at 100% oil during the first 24 hours at both stages of ripeness, although the inhibitory effect was transient and decreased significantly after 72 hours. No significant inhibition was observed at concentrations below 100%. These results are consistent with previous studies reporting limited antifungal activity of citrus essential oils against *L. theobromae*. It is concluded that although orange essential oil showed some initial antifungal activity, this was not sufficient to inhibit the growth of the pathogen over a prolonged period of time, indicating that high concentrations are required to obtain a significant effect against this specific fungus.

Keywords: Phytopathogen, inhibition, mycelium, pathogen.

TABLA DE CONTENIDO

Declaración de autoría y cesión de derechos	ii
Certificación de Culminación del Proyecto de Investigación	iii
Reporte de la herramienta de prevención de coincidencia y/o plagio académico	iv
Certificación de aprobación por Tribunal de Sustentación	v
Agradecimientos.....	vi
Dedicatoria.....	vii
Resumen	viii
Abstract.....	ix
Tabla de contenido.....	x
Índice de tablas	xiv
Índice de figuras	xv
Índice de anexos	xvi
Código Dublín	xvii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I. CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	3
1.1. Problema de investigación.....	4
1.1.1. Planteamiento del problema	4
1.1.2. Formulación del problema.....	5
1.1.3. Sistematización del problema.....	6
1.2. Objetivos.....	6
1.2.1. Objetivo general.....	6
1.2.2. Objetivos específicos.....	6
1.3. Justificación.....	7
CAPÍTULO II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN	8
2.1. Marco conceptual	9
2.1.1. Aceite esencial.....	9

2.1.2.	<i>Fitopatígeno</i>	9
2.1.3.	<i>Sanidad vegetal</i>	9
2.1.4.	<i>Efecto antagonista</i>	10
2.1.5.	<i>Destilación por arrastre de vapor</i>	10
2.1.6.	<i>Inhibición del crecimiento micelial</i>	10
2.1.7.	<i>Crecimiento micelial</i>	10
2.1.8.	<i>Estado de madurez</i>	11
2.2.	<i>Marco referencial</i>	11
2.2.1.	<i>Principales especies vegetales utilizadas para extraer aceites esenciales</i>	11
2.2.2.	<i>Aceite esencial de naranja</i>	13
2.2.2.1.	<i>Composición del aceite esencial de naranja</i>	14
2.2.2.2.	<i>Propiedades del aceite esencial de naranja</i>	14
2.2.2.3.	<i>Usos del aceite esencial de naranja</i>	15
2.2.2.4.	<i>Uso del aceite esencial de naranja para el control de fitopatógenos</i>	16
2.2.3.	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	18
2.2.3.1.	<i>Morfología</i>	19
2.2.3.2.	<i>Distribución geográfica</i>	19
2.2.3.3.	<i>Ciclo de vida</i>	20
2.2.3.4.	<i>Síntomas causados en especies agrícolas y forestales</i>	20
2.2.4.	<i>Antecedentes investigativos</i>	21
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN		24
3.1.	<i>Localización de la investigación</i>	25
3.2.	<i>Tipo de investigación</i>	25
3.3.	<i>Métodos de investigación</i>	25
3.3.1.	<i>Método inductivo</i>	25
3.3.2.	<i>Método deductivo</i>	25
3.3.3.	<i>Método analítico</i>	26

3.4.	Fuentes de recopilación de la información	26
3.4.1.	<i>Fuentes primarias</i>	26
3.4.2.	<i>Fuentes secundarias</i>	26
3.5.	Diseño de la investigación	26
3.5.1.	<i>Factores estudiados</i>	26
3.5.2.	<i>Tratamientos evaluados</i>	27
3.5.3.	<i>Diseño experimental</i>	27
3.6.	Instrumentos de investigación	28
3.6.1.	<i>Manejo del experimento</i>	28
3.6.1.1.	<i>Preparación del aceite esencial</i>	28
3.6.1.2.	<i>Preparación del medio de cultivo y cultivo del hongo</i>	29
3.6.2.	<i>Variables evaluadas</i>	31
3.6.2.1.	<i>Caracterización del aceite esencial obtenido</i>	31
3.6.2.2.	<i>Cantidad de aceite esencial obtenido</i>	31
3.6.2.3.	<i>Diámetro del micelio (mm)</i>	31
3.6.2.4.	<i>Crecimiento micelial</i>	31
3.6.2.5.	<i>Tasa de crecimiento (mm día⁻¹)</i>	32
3.6.2.6.	<i>Inhibición del crecimiento micelial</i>	32
3.7.	Tratamiento de los datos	32
3.8.	Recursos humanos y materiales	33
3.8.1.	<i>Recursos humanos</i>	33
3.8.2.	<i>Recursos materiales</i>	33
3.8.2.1.	<i>Materiales y equipos de oficina</i>	33
3.8.2.2.	<i>Materiales y equipos de laboratorio</i>	34
	CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
4.1.	Resultados	36

4.1.1.	<i>Composición cromatográfica de aceites esenciales de cáscara de naranja Valencia</i>	36
4.1.2.	<i>Composición química del aceite esencial de cáscara inmadura</i>	37
4.1.3.	<i>Composición química del aceite esencial de cáscara madura</i>	37
4.1.4.	<i>Cantidad de aceite esencial obtenido (mL)</i>	40
4.1.5.	<i>Diámetro del micelio (mm)</i>	41
4.1.6.	<i>Crecimiento micelial</i>	43
4.1.7.	<i>Inhibición del crecimiento micelial</i>	44
4.1.8.	<i>Análisis de correlación</i>	47
4.1.8.1.	<i>Correlación entre el diámetro del hongo (mm) y el tiempo (días) para los diferentes tratamientos</i>	47
4.1.8.2.	<i>Correlación entre las concentraciones de aceite esencial y parámetros de crecimiento del hongo</i>	49
4.2.	<i>Discusión</i>	50
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		55
5.1.	<i>Conclusiones</i>	56
5.2.	<i>Recomendaciones</i>	57
CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFÍA		58
6.1.	<i>Bibliografía</i>	59
CAPÍTULO VII. ANEXOS		66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Clasificación taxonómica del hongo <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	18
Tabla 2.	Descripción de los tratamientos evaluados en la investigación.....	27
Tabla 3.	Descripción del análisis de varianza utilizado en la investigación.....	28
Tabla 4.	Comparación de los componentes volátiles principales en cáscaras inmaduras y maduras de naranja	39
Tabla 5.	Rendimiento de aceite esencial obtenido en cáscara de naranja en dos estados de madurez.....	41
Tabla 6.	Diámetro del micelio de <i>L. theobromae</i> durante 72 horas de incubación en respuesta a la aplicación de tres concentraciones de aceite esencial obtenidos de dos estados de madurez de naranja.	43
Tabla 7.	Crecimiento micelial y tasa de crecimiento de <i>L. theobromae</i> durante 72 horas de incubación en respuesta a la aplicación de tres concentraciones de aceite esencial obtenidos de dos estados de madurez de naranja.....	44
Tabla 8.	Inhibición del crecimiento micelial de <i>L. theobromae</i> durante 72 horas de incubación en respuesta a la aplicación de tres concentraciones de aceite esencial obtenidos de dos estados de madurez de naranja.....	46
Tabla 9.	Resultados del análisis de correlación entre las concentraciones de aceite esencial y parámetros de crecimiento micelial de <i>L. theobromae</i>	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Diagrama del proceso de extracción del aceite esencial de naranja utilizado en la investigación	30
Figura 2.	Cromatograma del aceite esencia de cascara de naranja inmadura y madura ..	36
Figura 3.	Cantidad total de aceite esencial obtenido de la cáscara de naranja en dos estados de madurez.....	39
Figura 4.	Cantidad total de aceite esencial obtenido de la cáscara de naranja en dos estados de madurez.....	40
Figura 5.	Análisis de correlación entre el tiempo de evaluación y el diámetro del micelio de <i>L. theobromae</i> en función de los tratamientos evaluados	48

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Reporte de laboratorio del análisis de cromatografía realizado al aceite esencial obtenido.....	67
Anexo 2.	Selección de naranjas para la utilización en la extracción de aceite esencial de su cáscara.....	73
Anexo 3.	Pesado de frutos de naranja inmadura y maduros utilizados como materia prima.....	73
Anexo 4.	Pesado de cáscara de naranjas inmadura y madura utilizadas como materia prima para la extracción de aceite esencial	74
Anexo 5.	Deshidratación de cáscaras de naranja en la estufa.....	74
Anexo 6.	Pesado de cáscaras de naranja luego del proceso de deshidratación.....	75
Anexo 7.	Destilación por arrastre de vapor con una trampa Clevenger para obtener el aceite esencial.....	75
Anexo 8.	Obtención del aceite esencial más hidrolatos que se eliminan luego de la centrifugación.....	76
Anexo 9.	Dilución de los aceites esenciales con dimetil sulfóxido con sus respectivas concentraciones	76
Anexo 10.	Llenado de las cajas Petri con el PDA para luego proceder a adicionar los aceites esenciales con el hongo <i>Lasioidiplodia thebromae</i>	77
Anexo 11.	Colocación de los aceites con sus respectivas concentraciones	77
Anexo 12.	Aislamiento de <i>Lasioidiplodia thebromae</i> para su utilización en el ensayo <i>in vitro</i>	78
Anexo 13.	Evaluación y registro de datos del crecimiento micelial de <i>Lasioidiplodia thebromae</i>	78
Anexo 14.	Evolución del diámetro micelial de <i>Lasioidiplodia thebromae</i> en respuesta a los diferentes tratamientos evaluados	79

CÓDIGO DUBLÍN

Título:	EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE NARANJA (<i>Citrus sinensis</i>) EN DOS ESTADOS DE MADUREZ SOBRE EL HONGO <i>Lasiodiplodia theobromae</i> <i>IN VITRO</i>			
Autor:	MARÍA DE LOS ÁNGELES LÓPEZ ORTEGA			
Palabras clave:	fitopatógeno	inhibición	micelio	patógeno
Fecha de publicación:	Mayo, 2025			
Editorial:	Universidad Técnica Estatal de Quevedo			
Resumen:	Los aceites esenciales obtenidos a partir de la cáscara de naranja variedad Valencia (<i>Citrus sinensis</i>) en estados de madurez: inmadura y madura se evaluaron como agentes antifúngicos frente al hongo fitopatógeno <i>Lasiodiplodia theobromae</i>, causante de importantes pérdidas postcosecha. El estudio tuvo como objetivo determinar la composición química y evaluar la eficacia inhibitoria del crecimiento micelial <i>in vitro</i> del patógeno. El aceite esencial se obtuvo mediante hidrodestilación, cuantificando su rendimiento y analizando su composición química por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). La actividad antifúngica se evaluó mediante la técnica de alimentos envenenados, probando concentraciones de 25 %, 50 %, 75 % y 100 % del aceite esencial. Se realizó un seguimiento del crecimiento micelial durante 72 horas, tiempo en que el hongo normalmente cubre completamente la superficie del medio agarizado. Los resultados mostraron diferencias en composición química según el grado de madurez; la cáscara inmadura presentó mayor rendimiento (2.21 mL) y concentración de limoneno respecto a la madura (1.81 mL). En términos de inhibición micelial, se observó una actividad significativa únicamente con el aceite al 100 % durante las primeras 24 horas en ambos estados de madurez, aunque el efecto inhibitorio fue temporal y disminuyó considerablemente hacia las 72 horas. No se detectó inhibición significativa a concentraciones inferiores al 100 %. Estos resultados concuerdan con estudios previos que reportan limitada eficacia antifúngica de aceites esenciales cítricos frente a <i>L. theobromae</i>. Se concluye que, aunque el aceite esencial de naranja mostró inicialmente cierta actividad antifúngica, esta fue insuficiente para mantener inhibido el crecimiento del patógeno en períodos prolongados, destacando la necesidad de altas concentraciones para lograr efectos apreciables frente a este hongo específico.			
Abstract	Essential oils obtained from Valencia orange peel (<i>Citrus sinensis</i>) in unripe and ripe stages of ripeness were evaluated as antifungal agents against the phytopathogenic fungus <i>Lasiodiplodia theobromae</i>, which causes significant post-harvest losses. The study aimed to determine the chemical composition and evaluate the inhibitory efficacy of the pathogen's <i>in vitro</i> mycelial growth. The essential oil was obtained by hydrodistillation, quantifying its yield and analyzing its chemical composition by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Antifungal activity was evaluated using the food poisoning technique, testing concentrations of 25%, 50%, 75%, and 100% of the essential oil. Mycelial growth was monitored for 72 hours, a time during which the fungus normally completely covers the surface of the agar medium. The results showed differences in chemical composition depending on the degree of ripeness; The immature peel showed a higher yield (2.21 mL) and limonene concentration than the mature peel (1.81 mL). In terms of mycelial inhibition, significant activity was observed only with 100% oil during the first 24 hours at both maturity stages, although the inhibitory effect was temporary and decreased considerably by 72 hours. No significant inhibition was detected at concentrations lower than 100%. These results are consistent with previous studies reporting limited antifungal efficacy of citrus essential oils against <i>L. theobromae</i>. It is concluded that, although orange essential oil initially showed some antifungal activity, this was insufficient to inhibit the growth of the pathogen for prolonged periods, highlighting the need for high concentrations to achieve appreciable effects against this specific fungus.			
Descripción:				
Url				

INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales son compuestos volátiles naturales que se extraen de diversas partes de las plantas, como flores, hojas, raíces y cáscaras. Estos aceites contienen una variedad de compuestos bioactivos que les confieren propiedades únicas, como las antifúngicas, antibacterianas y antioxidantes. Debido a estas propiedades, los aceites esenciales han sido objeto de investigaciones en varios campos, como la medicina, la cosmética y la agricultura (Chaverri, Morales, & Cicció, 2022). En el ámbito agrícola, su potencial para controlar plagas y enfermedades ha sido particularmente relevante, ya que ofrecen una alternativa más sostenible y menos agresiva que los pesticidas químicos. De esta manera, los aceites esenciales se perfilan como una opción eficaz y ecológica en el manejo de enfermedades fúngicas que afectan a cultivos agrícolas (Taípe-Pardo *et al.*, 2023).

Dentro de los aceites esenciales más estudiados se encuentra el aceite de naranja (*Citrus sinensis*), que se extrae principalmente de la cáscara de la fruta. Este aceite se destaca por su alto contenido en limoneno, un compuesto que posee notables propiedades antifúngicas, antibacterianas y antioxidantes (Urrunaga-Ormachea *et al.*, 2022). De hecho, se ha demostrado que el aceite de naranja tiene un gran potencial para controlar enfermedades fúngicas que afectan a diferentes cultivos agrícolas, lo que lo convierte en una alternativa atractiva frente a los métodos convencionales (Babarinde *et al.*, 2021). Sin embargo, la composición química del aceite de naranja varía según el estado de madurez de la fruta, lo que puede influir en la efectividad de su actividad antimicrobiana. Por lo tanto, es necesario estudiar cómo estos cambios en la composición del aceite pueden afectar su capacidad para controlar hongos como *Lasiodiplodia theobromae* (Salvatore, Nicoletti, & Andolfi, 2022).

El hongo *Lasiodiplodia theobromae* es un patógeno que afecta principalmente a cultivos tropicales y subtropicales, donde genera una serie de problemas fitopatológicos. Este hongo es responsable de la pudrición de frutos y la descomposición de tejidos, lo que ocasiona pérdidas significativas en la producción agrícola (Dong *et al.*, 2020). Este hongo representa una amenaza directa para la calidad y cantidad de la cosecha, lo que reduce su viabilidad comercial. La propagación de este patógeno afecta negativamente la rentabilidad de los cultivos y, por ende, se requiere de métodos efectivos para su control (Troncozo-Correa, 2023). En este sentido, el desarrollo de estrategias más ecológicas, como el uso de aceites esenciales, puede ofrecer una solución eficiente frente a la proliferación de este hongo.

Por lo tanto, los aceites esenciales derivados de la naranja podrían representar una alternativa viable para el control de *Lasiodiplodia theobromae*. La eficacia del aceite de naranja está estrechamente vinculada con su composición química, la cual varía según el grado de madurez de la fruta. A medida que la fruta madura, los compuestos bioactivos del aceite pueden cambiar, lo que influye en su capacidad para inhibir el crecimiento del hongo. Esta variabilidad en la composición química hace necesario evaluar cómo los diferentes estados de madurez de la naranja afectan las propiedades antifúngicas del aceite. Aunque algunos estudios han abordado la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, aún hay una falta de investigación sobre el comportamiento específico del aceite de naranja frente a *L. theobromae*. Por esta razón, la presente investigación busca llenar este vacío, evaluando la efectividad del aceite esencial de naranja en función del grado de madurez de la fruta en el control de este patógeno.

CAPÍTULO I

CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problema de investigación

1.1.1. Planteamiento del problema

Las enfermedades fúngicas representan una de las principales amenazas para los cultivos agrícolas, especialmente en regiones tropicales y subtropicales. *Lasiodiplodia theobromae*, uno de los patógenos más comunes, causa pudrición de frutos y descomposición de tejidos en diversas especies, lo que afecta la calidad y cantidad de la cosecha (Soledad & Guerrero, 2022). Este hongo impacta directamente la viabilidad comercial, resultando en pérdidas económicas significativas. A pesar de que los pesticidas químicos se utilizan para controlar este patógeno, su aplicación constante genera riesgos tanto para la salud humana como para el medio ambiente (Segura, Rodríguez, & Chico, 2015). Sin embargo, la efectividad de alternativas naturales como los aceites esenciales, específicamente el aceite de naranja (*Citrus sinensis*), no ha sido evaluada en detalle frente a *L. theobromae*. (Salvatore, Nicoletti, & Andolfi, 2022). A pesar de que existen estudios sobre las propiedades antimicrobianas de estos aceites, no se han realizado investigaciones exhaustivas sobre su efectividad en el control de este hongo, especialmente en relación con las variaciones en la composición química del aceite dependiendo del estado de madurez de la fruta (Valle-de la Paz *et al.*, 2019).

El aceite esencial de naranja contiene compuestos bioactivos como el limoneno, los cuales podrían tener efectos inhibitorios sobre el crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae*. No obstante, la composición de este aceite varía conforme la fruta madura, lo que indica que su actividad antimicrobiana podría cambiar según el grado de madurez de la naranja (Samandari, Taheri, & Tarighi, 2024). A pesar de la existencia de estudios sobre las propiedades antimicrobianas de aceites esenciales, se carece de investigaciones específicas que exploren cómo el estado de madurez de la fruta influye en la capacidad del aceite esencial de naranja para controlar este hongo. La falta de estudios que aborden este aspecto justifica la necesidad de realizar una investigación enfocada en evaluar el efecto del aceite esencial de naranja en diferentes estados de madurez sobre *Lasiodiplodia theobromae*.

Diagnóstico

La presencia de *Lasiodiplodia theobromae* en cultivos de cacao genera serias dificultades para los productores, ya que este hongo es responsable de la pudrición de los frutos y la descomposición de los tejidos vegetales, lo que afecta la calidad y la cantidad de la cosecha. Este patógeno reduce la viabilidad comercial del cacao, resultando en pérdidas económicas significativas. Aunque el control de *L. theobromae* se ha logrado principalmente mediante el uso de pesticidas, su aplicación masiva conlleva riesgos ambientales y de salud. A pesar de la investigación sobre el uso de aceites esenciales como alternativa, no se ha evaluado en profundidad la efectividad del aceite esencial de naranja frente a este hongo, especialmente considerando las variaciones en su composición química según el estado de madurez de la fruta.

Pronóstico

Si no se estudia y aborda adecuadamente la enfermedad conocida como muerte regresiva (*Lasiodiplodia theobromae*) en el cultivo de cacao, esta seguirá representando una amenaza significativa para los cultivos agrícolas en regiones tropicales y subtropicales, causando graves pérdidas económicas. La dependencia de pesticidas químicos podría intensificarse, incrementando los riesgos ambientales y fomentando la resistencia del patógeno. Sin alternativas naturales como el aceite esencial de naranja, cuya efectividad depende del grado de madurez de la fruta, los agricultores carecerán de herramientas sostenibles para controlar la enfermedad. Esto no solo afectará la calidad de las cosechas, sino también la viabilidad comercial, limitando las oportunidades de los productores en mercados competitivos y sostenibles.

1.1.2. Formulación del problema

¿Cuál es el efecto inhibitorio del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis*) en distintos estados de madurez sobre el hongo *Lasiodiplodia theobromae* en condiciones *in vitro*?

1.1.3. Sistematización del problema

¿Cómo varía la composición del aceite esencial extraído de la cáscara de naranja (*Citrus sinensis*) en dos estados de madurez, analizado mediante cromatografía de gases (CG)?

¿Cuál es la concentración del extracto de aceite esencial de naranja en diferentes estados de madurez que resulta en la máxima inhibición del crecimiento del hongo *Lasiodiplodia theobromae* en condiciones *in vitro*?

¿Cuál es la relación entre el tiempo de evaluación y el diámetro del micelio de *L. theobromae* en función de los diferentes tratamientos evaluados?

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Evaluar el efecto inhibitorio del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis*) en diferentes estados de madurez sobre el hongo *Lasiodiplodia theobromae* a nivel *in vitro*.

1.2.2. Objetivos específicos

Analizar el aceite esencial extraído de la cáscara de la naranja (*Citrus sinensis*) en dos estados de madurez por cromatografía de gases (CG).

Establecer la concentración del extracto del aceite esencial de naranja en diferentes estados de madurez que resulte en la máxima inhibición del crecimiento del hongo *Lasiodiplodia theobromae* en condiciones *in vitro*.

Determinar la relación entre el tiempo de evaluación y el diámetro del micelio de *L. theobromae* en función de los diferentes tratamientos evaluados.

1.3. Justificación

La investigación se justifica ante la necesidad de encontrar alternativas naturales y sostenibles al uso de pesticidas químicos en la agricultura, especialmente en el control de *Lasiodiplodia theobromae*, un hongo que afecta de manera significativa a los cultivos de cacao y otras especies. El uso excesivo de pesticidas ha generado preocupaciones sobre su impacto ambiental y los riesgos para la salud humana, lo que hace imprescindible explorar soluciones más amigables con el medio ambiente. Los aceites esenciales, como el de naranja, han demostrado propiedades antimicrobianas en diversos estudios, pero aún no se ha evaluado su efectividad frente a este patógeno en particular. Además, la composición química del aceite esencial de naranja cambia según el grado de madurez de la fruta, lo que podría influir en su capacidad para controlar el hongo.

Los beneficiarios directos de esta investigación son los productores agrícolas, especialmente los de cacao, que se verían beneficiados por el uso de un tratamiento más natural y menos perjudicial para el ecosistema. Además, los resultados de este estudio podrían contribuir a la reducción de costos relacionados con el uso de pesticidas químicos y al fomento de prácticas agrícolas más sostenibles. Los hallazgos también servirán para desarrollar estrategias de manejo más efectivas y menos dependientes de productos químicos, mejorando la rentabilidad de los cultivos al mismo tiempo que se promueve la conservación del medio ambiente. De este modo, los resultados obtenidos serán útiles tanto para los agricultores como para la comunidad científica interesada en el uso de aceites esenciales en el control biológico de patógenos agrícolas.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Marco conceptual

2.1.1. Aceite esencial

Un aceite esencial es un compuesto natural volátil extraído de diferentes partes de las plantas, como flores, hojas, frutos, raíces y cortezas, a través de procesos como la destilación por arrastre de vapor o la expresión en frío. Se caracteriza por contener mezclas complejas de sustancias químicas, como terpenos, alcoholes, ésteres y cetonas, que le confieren aromas distintivos y propiedades bioactivas. Los aceites esenciales desempeñan un papel importante en la planta, ya sea como mecanismo de defensa contra patógenos y herbívoros o como atrayente para polinizadores (Martínez-López, 2018).

2.1.2. Fitopatógeno

Un fitopatógeno es cualquier organismo que causa enfermedades en las plantas, incluyendo hongos, bacterias, virus, nematodos y otros microorganismos. Estos agentes invaden los tejidos vegetales, afectando funciones esenciales como la fotosíntesis, el transporte de nutrientes y el crecimiento. Pueden ingresar a las plantas a través de heridas, estomas o directamente mediante la producción de enzimas que degradan las barreras de defensa. Los fitopatógenos generan síntomas como manchas, necrosis, marchitez y podredumbre, lo que resulta en pérdidas significativas de calidad y cantidad en los cultivos agrícolas (Valle-de la Paz *et al.*, 2019).

2.1.3. Sanidad vegetal

La sanidad vegetal se refiere al conjunto de prácticas, medidas y políticas destinadas a proteger y mantener la salud de las plantas cultivadas, naturales o silvestres, frente a amenazas como plagas, enfermedades y malezas. Su objetivo principal es prevenir y controlar el daño causado por agentes fitopatógenos, insectos y otros organismos perjudiciales que pueden afectar el crecimiento, la producción y la calidad de los cultivos. Estas acciones son fundamentales para garantizar la seguridad alimentaria, la sostenibilidad agrícola y la conservación del medio ambiente (Martínez-López, 2018).

2.1.4. Efecto antagonista

El efecto antagonista de un aceite esencial contra un fitopatógeno es su capacidad para inhibir o reducir su crecimiento, ya sea alterando su membrana celular, interfiriendo en su metabolismo o bloqueando enzimas esenciales. Este efecto puede ser fungicida o bactericida, dependiendo de la composición química del aceite. Además, algunos aceites esenciales compiten con el fitopatógeno por recursos o estimulan defensas en la planta, lo que contribuye a su control de manera natural y sostenible (Herrera-Plasencia *et al.*, 2019).

2.1.5. Destilación por arrastre de vapor

La destilación por arrastre de vapor es un método de separación utilizado para extraer compuestos volátiles de una mezcla, especialmente aceites esenciales de plantas, mediante vapor de agua. En este proceso, el vapor pasa a través del material vegetal, arrastrando los compuestos volátiles sin descomponerlos. Luego, la mezcla de vapor y sustancias volátiles se condensa en un sistema de enfriamiento, obteniendo así una fase acuosa y otra oleosa, donde se separa el aceite esencial. Es una técnica eficiente y ampliamente usada en la industria (Briones & Guerrero, 2019).

2.1.6. Inhibición del crecimiento micelial

La inhibición del crecimiento micelial es el proceso mediante el cual se reduce o detiene la expansión del micelio de un hongo, impidiendo su desarrollo y reproducción. Esto puede lograrse mediante agentes antifúngicos, compuestos naturales como aceites esenciales o microorganismos antagonistas. La inhibición puede ocurrir por alteración en la permeabilidad de la membrana celular, interferencia en la síntesis de la pared celular o afectación de procesos metabólicos esenciales, lo que limita la propagación del fitopatógeno (Velarde-Negrete *et al.*, 2024).

2.1.7. Crecimiento micelial

El crecimiento micelial es el proceso mediante el cual el micelio de un hongo se expande y desarrolla, formando una red de filamentos llamados hifas. Este crecimiento ocurre mediante la elongación y ramificación de las hifas, permitiendo al hongo colonizar su entorno y

obtener nutrientes. Factores como la temperatura, la humedad, el pH y la disponibilidad de sustratos influyen en su desarrollo. Es fundamental en la reproducción y supervivencia de los hongos, tanto en ambientes naturales como en cultivos agrícolas (Yang et al, 2019).

2.1.8. Estado de madurez

El estado de madurez de una fruta es la etapa en su desarrollo en la que alcanza características óptimas para su consumo o procesamiento. Se determina por cambios en color, textura, sabor, contenido de azúcares y firmeza. Existen diferentes tipos de madurez, como la madurez fisiológica, cuando la fruta ha completado su desarrollo, y la madurez de consumo, cuando presenta las mejores condiciones organolépticas. Factores como la especie, las condiciones climáticas y el manejo postcosecha influyen en su maduración (Ramos-Cruz *et al.*, 2023).

2.2. Marco referencial

2.2.1. Principales especies vegetales utilizadas para extraer aceites esenciales

Los aceites esenciales se extraen de diversas especies vegetales, y cada una de ellas ofrece propiedades y beneficios particulares. Entre las principales especies utilizadas para la obtención de estos aceites se encuentran plantas como la lavanda, el romero, la menta, el eucalipto, la manzanilla y el árbol de té, entre otras. Estas especies son conocidas por sus compuestos volátiles que tienen aplicaciones tanto terapéuticas como cosméticas, y se extraen principalmente mediante procesos como la destilación por vapor o la expresión en frío (Zhu *et al.*, 2020).

La lavanda es una de las plantas más conocidas y utilizadas para la extracción de aceites esenciales. Su aceite tiene propiedades relajantes y calmantes, lo que lo convierte en una opción popular en aromaterapia. Además, se emplea en productos cosméticos debido a sus propiedades antiinflamatorias y antimicrobianas. El aceite esencial de lavanda se extrae principalmente de las flores, y su aroma suave lo hace ideal para la elaboración de ambientadores, cremas y aceites de masaje (Mitropoulou *et al.*, 2020). Por otro lado, el romero es otro aceite esencial ampliamente utilizado, conocido por sus efectos estimulantes y analgésicos. El aceite de romero se obtiene de las hojas de la planta y es apreciado por su

capacidad para mejorar la circulación, aliviar dolores musculares y mejorar la concentración (Alves, Setzer, & Da Silva, 2019).

La menta, especialmente la menta piperita, es otra planta cuya esencia se utiliza en una amplia variedad de productos. Su aceite esencial tiene un aroma fresco y vigorizante, siendo muy utilizado para aliviar problemas digestivos y respiratorios. Este aceite se extrae principalmente de las hojas de la planta, y su acción refrescante también lo hace muy popular en cosméticos y productos para el cuidado personal (Mendoza & Ordinola, 2022). El eucalipto, por su parte, es conocido por sus propiedades expectorantes y antisépticas. El aceite esencial de eucalipto se obtiene de las hojas de esta planta y se utiliza ampliamente en la medicina natural para tratar resfriados, problemas respiratorios y dolores musculares. Su fuerte aroma fresco y penetrante también lo hace eficaz en productos para la limpieza del hogar (Laura-Ticona *et al.*, 2024).

La manzanilla, con sus suaves flores amarillas, es otra especie cuya esencia se utiliza para obtener aceites esenciales con propiedades calmantes y antiinflamatorias. El aceite esencial de manzanilla es particularmente útil en el tratamiento de la piel, ya que ayuda a calmar irritaciones y a promover la cicatrización de heridas menores. Además, se utiliza en infusiones para aliviar dolores estomacales y tensiones nerviosas (Cedeño-Cevallos *et al.*, 2023). Otra planta destacada es el árbol de té, cuyo aceite esencial es ampliamente reconocido por sus propiedades antimicrobianas y antifúngicas. Este aceite, extraído de las hojas del árbol de té, se usa en productos para el cuidado de la piel, especialmente para combatir el acné y las infecciones cutáneas. Sus propiedades antisépticas lo convierten en un aliado en la medicina natural y en la fabricación de productos de higiene personal (Briones & Guerrero, 2019).

El incienso es una especie que también se utiliza en la producción de aceites esenciales, cuyo aroma es conocido por sus efectos relajantes y espirituales. El aceite esencial de incienso se obtiene de la resina del árbol *Boswellia*, y es utilizado en la práctica de la meditación y la aromaterapia. Además de sus beneficios emocionales y psicológicos, el incienso también tiene propiedades antiinflamatorias y antioxidantes que lo hacen útil en la elaboración de productos cosméticos y medicinales (Velarde-Negrete *et al.*, 2024).

La rosa, especialmente en su variedad de rosa mosqueta, es otra planta utilizada para la extracción de aceites esenciales. El aceite de rosa mosqueta es famoso por sus propiedades regeneradoras de la piel, ya que favorece la reparación celular y combate los signos de envejecimiento. Se obtiene principalmente de las semillas de la rosa mosqueta y es muy apreciado en la industria cosmética por su capacidad para mejorar la elasticidad y apariencia de la piel (Montalván *et al.*, 2023). Otra especie que no puede faltar en la lista es el jazmín, cuyos aceites esenciales se extraen de sus flores y tienen propiedades calmantes y relajantes. El aceite esencial de jazmín es popular en perfumería debido a su aroma dulce y floral, y se usa también en productos para el cuidado de la piel por sus propiedades hidratantes (Laura-Ticona *et al.*, 2024).

Además de estas especies, existen otras como la albahaca, el clavo de olor, el cilantro y la salvia, que también se emplean para la obtención de aceites esenciales con diversas aplicaciones. La albahaca, por ejemplo, se utiliza principalmente por sus propiedades antiinflamatorias y antiespasmódicas, mientras que el clavo de olor es conocido por sus efectos analgésicos y antimicrobianos. El aceite esencial de cilantro tiene propiedades digestivas, mientras que la salvia es útil en el tratamiento de trastornos respiratorios y hormonales (Briones & Guerrero, 2019).

El aceite esencial de naranja, extraído de la cáscara de la fruta, también es ampliamente utilizado, especialmente por sus efectos revitalizantes y estimulantes. Su aroma fresco y cítrico lo convierte en una opción popular en productos de limpieza, cosméticos y aromaterapia (Huaman-López *et al.*, 2024).

2.2.2. Aceite esencial de naranja

El aceite esencial de naranja es un extracto natural obtenido principalmente de la cáscara del fruto del naranjo dulce (*Citrus sinensis*) mediante un proceso de prensado en frío. Se caracteriza por su aroma cítrico y fresco, ampliamente utilizado en las industrias cosmética, alimentaria, farmacéutica y de limpieza. Su composición química está dominada por el limoneno, un monoterpeno con propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antiinflamatorias. Además, se emplea en aromaterapia por sus efectos relajantes y energizantes, ayudando a reducir el estrés y mejorar el estado de ánimo (Agarwal *et al.*, 2022).

2.2.2.1. Composición del aceite esencial de naranja

El aceite esencial de naranja contiene una mezcla compleja de compuestos químicos que le confieren sus propiedades aromáticas, terapéuticas y funcionales. Su componente principal es el limoneno, un monoterpeno que representa entre el 85 % y el 95 % de su composición y es responsable de su característico aroma cítrico. Además del limoneno, se encuentran otros monoterpenos como el mirceno y el α -pineno, que contribuyen a sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Cid-Samamed *et al.*, 2022).

La presencia de aldehídos como el citral y el octanal potencia su capacidad antimicrobiana, mientras que los ésteres como el acetato de linalilo le aportan un efecto relajante cuando se emplea en aromaterapia. Dentro de su composición también se encuentran compuestos oxigenados como el linalool y el geraniol, que influyen en sus propiedades antiinflamatorias y calmantes. Algunos flavonoides y cumarinas están presentes en pequeñas concentraciones y pueden generar fotosensibilidad en la piel cuando se expone a la luz solar después de su aplicación (Dehghan *et al.*, 2020). Factores como la variedad de la naranja, las condiciones de cultivo y el método de extracción influyen en la proporción de estos compuestos, determinando así las propiedades específicas del aceite esencial. La combinación de estos elementos lo hace útil en múltiples aplicaciones, desde la cosmética hasta la industria alimentaria, sin perder su valor terapéutico (Farahmandfar *et al.*, 2019).

2.2.2.2. Propiedades del aceite esencial de naranja

El aceite esencial de naranja es conocido por sus múltiples propiedades que benefician tanto la salud física como emocional. Entre sus principales características se destacan sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antimicrobianas, que lo convierten en un aliado para combatir diversos problemas de salud. Por su capacidad antioxidante, el aceite ayuda a neutralizar los radicales libres, reduciendo el envejecimiento celular y protegiendo al cuerpo de los efectos del estrés oxidativo. Además, tiene efectos antiinflamatorios que pueden aliviar dolores musculares y articulares, así como reducir la inflamación general (Lamine *et al.*, 2019).

En el ámbito emocional, el aceite esencial de naranja es popular en aromaterapia por su capacidad para mejorar el estado de ánimo. Su aroma refrescante y afrutado tiene un efecto

calmante sobre el sistema nervioso, ayudando a reducir los niveles de estrés y ansiedad. Además, es útil para combatir la fatiga mental y física, promoviendo un estado general de relajación y bienestar (Savic *et al.*, 2022).

En cuanto a la piel, el aceite esencial de naranja es utilizado en productos cosméticos gracias a sus propiedades revitalizantes. Ayuda a mejorar la apariencia de la piel, promoviendo una mayor luminosidad y favoreciendo la regeneración celular. También tiene un efecto limpiador, lo que lo convierte en un ingrediente útil en productos de higiene personal. Además, sus propiedades digestivas estimulan la producción de jugos gástricos, mejorando el proceso digestivo y ayudando a combatir problemas leves de digestión (Agarwal *et al.*, 2022).

2.2.2.3. Usos del aceite esencial de naranja

El aceite esencial de naranja se emplea en diversas industrias debido a su composición química y sus múltiples propiedades beneficiosas. En el ámbito cosmético, se utiliza en la formulación de cremas, lociones, jabones y productos capilares, ya que ayuda a equilibrar la producción de grasa en la piel y el cuero cabelludo, además de aportar hidratación y un aroma agradable. Su capacidad antioxidante lo convierte en un ingrediente popular en tratamientos antienvjecimiento, mientras que su acción antimicrobiana contribuye a mejorar afecciones cutáneas como el acné o la irritación (Durmus *et al.*, 2023).

En la industria farmacéutica, se incorpora en formulaciones destinadas a aliviar el estrés, el insomnio y los trastornos digestivos, debido a su efecto relajante y carminativo. Su uso en aromaterapia ha ganado popularidad, ya que su fragancia fresca y dulce favorece la sensación de bienestar, reduce la ansiedad y mejora el estado de ánimo. Difusores, velas aromáticas y aceites de masaje suelen contenerlo para potenciar la relajación y aliviar tensiones musculares (Savic *et al.*, 2022).

Dentro de la industria alimentaria, se emplea como saborizante natural en la producción de bebidas, confitería y productos de panadería. Su alto contenido de limoneno no solo proporciona un aroma cítrico característico, sino que también actúa como conservante natural debido a sus propiedades antimicrobianas. En la limpieza del hogar, forma parte de la composición de productos ecológicos, ya que posee propiedades desengrasantes y

desinfectantes, eliminando bacterias y hongos sin necesidad de compuestos químicos agresivos (González *et al.*, 2021).

2.2.2.4. Uso del aceite esencial de naranja para el control de fitopatógenos

El aceite esencial de naranja ha mostrado un notable potencial en el control de fitopatógenos debido a sus propiedades antimicrobianas y antifúngicas. Su composición química, rica en limoneno, un terpeno que tiene efectos bactericidas y fungicidas, es uno de los factores clave en su capacidad para combatir diversas especies patógenas que afectan a las plantas (Li *et al.*, 2018). A través de estudios recientes, se ha comprobado que este aceite esencial es eficaz frente a hongos, bacterias y virus que causan enfermedades en cultivos agrícolas. Al ser de origen natural, el aceite de naranja es una opción sostenible frente a los productos químicos tradicionales, ofreciendo una alternativa menos agresiva para el medio ambiente y la salud humana (Babarinde *et al.*, 2021).

El mecanismo de acción del aceite esencial de naranja contra los fitopatógenos se basa principalmente en la inhibición de las actividades metabólicas de los microorganismos. El limoneno, compuesto principal del aceite, penetra en las membranas celulares de los patógenos, alterando su integridad y causando la liberación de contenido intracelular (Cid-Samamed *et al.*, 2022). Además, puede interferir con las rutas biosintéticas que los patógenos necesitan para su crecimiento y reproducción, lo que lleva a la muerte celular de los mismos. Esta acción antimicrobiana no se limita a la acción directa sobre los microorganismos, sino que también puede inducir respuestas de defensa en las plantas, activando sus mecanismos de inmunidad (Dehghan *et al.*, 2020).

Además de su acción directa sobre los patógenos, el aceite esencial de naranja también posee propiedades antioxidantes, lo que contribuye a reducir el daño celular causado por la proliferación de agentes patógenos. Los antioxidantes presentes en el aceite pueden neutralizar los radicales libres generados durante la interacción entre las plantas y los fitopatógenos, reduciendo el estrés oxidativo y mejorando la salud general de las plantas afectadas (Farahmandfar *et al.*, 2019).

Una de las principales ventajas del aceite esencial de naranja es su naturaleza ecológica. Al ser una opción natural, su uso no implica los riesgos asociados con los pesticidas químicos,

tales como la resistencia de los patógenos, la contaminación del suelo y el agua, y los efectos negativos sobre organismos no objetivo, como insectos polinizadores y fauna benéfica (Savic *et al.*, 2022). Este tipo de tratamiento también reduce los residuos tóxicos en los productos agrícolas, lo que beneficia tanto a los consumidores como a los agricultores, especialmente en el contexto de la agricultura sostenible (Durmus *et al.*, 2023).

El uso de aceite esencial de naranja también presenta beneficios económicos, ya que, al ser una alternativa natural, reduce la dependencia de productos químicos costosos y puede mejorar la rentabilidad a largo plazo de los cultivos. Además, su uso tiene un impacto menor en la biodiversidad de los agroecosistemas, promoviendo un ambiente más saludable para el crecimiento de las plantas y la fauna circundante. El aceite puede ser fácilmente incorporado en programas de manejo integrado de plagas (MIP), proporcionando un control más equilibrado de los patógenos (González *et al.*, 2021).

Sin embargo, su uso no está exento de desventajas. En primer lugar, su efectividad puede variar dependiendo de la concentración utilizada, las condiciones ambientales y el tipo de patógeno. En algunos casos, puede ser necesario aplicar el aceite esencial en combinaciones con otros tratamientos para obtener los resultados deseados. Además, el costo del aceite esencial de naranja, especialmente cuando se obtiene a través de métodos de producción sostenible, puede ser relativamente alto, lo que limita su accesibilidad para algunos agricultores, especialmente en grandes cantidades (Babarinde *et al.*, 2021).

Otra limitación es la posible fitotoxicidad en ciertas especies vegetales si no se utiliza adecuadamente. Aunque el aceite esencial de naranja es generalmente considerado seguro para la mayoría de las plantas, su aplicación excesiva o en concentraciones muy altas puede provocar daño en las hojas, tallos o raíces. Es recomendable realizar pruebas en pequeñas áreas antes de su aplicación generalizada para asegurarse de que no cause efectos negativos en los cultivos (Stegmayer *et al.*, 2021).

El manejo de las condiciones climáticas también es un factor a tener en cuenta. El aceite esencial de naranja puede perder eficacia en condiciones de alta humedad o temperaturas extremas, lo que limita su uso en algunas zonas agrícolas. Además, dado que su acción es más suave que la de los pesticidas químicos, puede no ser adecuado para cultivos que

enfrentan infecciones severas o altamente resistentes, donde se requieren tratamientos más agresivos (García-Mateos *et al.*, 2023).

Por último, a pesar de ser un recurso natural, el aceite esencial de naranja debe usarse con precaución, ya que la sobreexplotación de los recursos naturales, como los cítricos de donde se extrae el aceite, podría tener efectos negativos en la biodiversidad y el ecosistema. Es importante que su producción y uso sean gestionados de manera sostenible para evitar impactos negativos a largo plazo (Durán-Aguirre *et al.*, 2020).

2.2.3. *Lasiodiplodia theobromae*

Lasiodiplodia theobromae es un hongo cosmopolita que pertenece al género *Lasiodiplodia*. Este hongo afecta una amplia variedad de hospederos, incluidos monocotiledóneas, dicotiledóneas y gimnospermas, con mayor prevalencia en zonas tropicales y subtropicales. Los síntomas de la infección varían e incluyen muerte descendente de las plantas, cáncer, gomosis, tizón de hojas y pudrición de raíces en especies maderables y cultivos. Como saprófito, *L. theobromae* actúa como un patógeno latente, siendo detectable en tejidos sanos como endófito, pero se vuelve activo en plantas debilitadas o estresadas (Dong *et al.*, 2020).

En el cacao, *Lasiodiplodia theobromae* puede sobrevivir en el suelo o en restos vegetales en estructuras reproductoras, y su movilidad depende de varios factores hasta llegar a los tejidos vegetales, donde se mantiene en forma endófito. Los síntomas que causa en el cacao incluyen la muerte de ramillas jóvenes, pudrición y momificación de frutos, y en casos graves, puede provocar la muerte regresiva de la planta (García-Gallirgos, 2021). En la Tabla 1, se presenta la clasificación taxonómica del hongo *Lasiodiplodia theobromae*.

Tabla 1.
Clasificación taxonómica del hongo Lasiodiplodia theobromae

Taxonomía	Clasificación
Reino	Hongos
División	Ascomicota
Clase	Dothideomycetes
Orden	Botryosphaeriales
Familia	Botryosphaeriaceae
Género	Lasiodiplodia
Especie	<i>theobromae</i>

Fuente: Troncozo-Correa (2023)

2.2.3.1. Morfología

El género *Lasiodiplodia* se distingue de otros géneros cercanos por la presencia de picnidios, paráfisis y estriaciones longitudinales en los conidios maduros. La morfología de su ascocarpo es de color café oscuro a negro, con una pared gruesa de color café oscuro y capas internas hialinas, alcanzando un diámetro de 250-400 μm (Dong *et al.*, 2020).

El asca es bitunicada, con estípite, y está formada por 8 esporas, que tienen una longitud de 90-120 μm . Las ascosporas son biseriadas, hialinas, sin septos, con dimensiones de 30-35 x 11-14 μm . El conidiomata es estromático, puede ser simple o agregado, y cuando madura en el hospedero, adquiere un color café oscuro (Huaman-Pilco *et al.*, 2024). Es unilocular, con una pared gruesa o delgada de color marrón, y puede alcanzar hasta 5 mm de ancho, con un ostiolo central, único y papillado. Las paráfisis son hialinas, cilíndricas, tabicadas, y generalmente ramificadas con extremos redondeados, alcanzando hasta 55 μm de largo y 3-4 μm de ancho (Serrato-Díaz *et al.*, 2020).

2.2.3.2. Distribución geográfica

La dispersión del hongo, al igual que otros miembros de la familia Botryosphaeriaceae, es facilitada por el movimiento de material vegetal infectado mediado por los seres humanos, lo que ha permitido su expansión a nivel global (Yang *et al.*, 2019). Actualmente, se encuentra ampliamente distribuido, con mayor concentración en las regiones tropicales y subtropicales. El patógeno fue identificado por primera vez en Camerún en 1895, donde causaba pudrición en las mazorcas de cacao. Posteriormente, se ha reportado en varios países como India, Samoa Occidental, Bangladesh y Filipinas (Yang *et al.*, 2021).

L. theobromae tiene un rango de más de 500 especies hospederas, lo que contribuye a su amplia distribución. En Sudamérica, se ha detectado en cultivos de importancia agrícola como aguacate en Perú y Cuba, mango en Brasil, Perú y Cuba, cítricos en Chile, México y Cuba, papaya en Brasil, vid en Perú y teca en Brasil (Moreira-Morrillo *et al.*, 2021). En cuanto al cacao, ha sido aislado de tejidos afectados en países como Venezuela, Cuba y México, aunque no se ha demostrado su patogenicidad en este cultivo. En Ecuador, hasta la fecha, solo se ha reportado en árboles de *Tectona grandis* (Sudha *et al.*, 2019).

2.2.3.3. Ciclo de vida

Lasiodiplodia theobromae es un fitopatógeno capaz de sobrevivir en el suelo y en los restos de cultivos, principalmente en forma de picnidios, esclerocios y/o clamidósporas, que sirven como estructuras de resistencia en los tejidos infectados y en el suelo. El hongo puede persistir como saprófito en hojas, frutos infectados y fragmentos de ramas caídas, además de en forma de clamidosporas (Sathya *et al.*, 2017). Las esporas contenidas en los picnidios se liberan al ambiente cuando las condiciones son óptimas (con una temperatura mínima de 15 °C, óptima de 28 °C y máxima de 40 °C), dispersándose a través del viento, la lluvia, herramientas y mediante insectos de la familia Miridae, como *Helopeltis theobromae*, *H. ammonli* y *H. theobromae*. Estas condiciones propician la rápida infección de nuevas plantas, lo que puede generar brotes significativos en áreas agrícolas (Troncozo-Correa, 2023).

Una vez que el hongo infecta la planta, se pueden observar lesiones en frutos, brotes y ramillas jóvenes, lo que provoca daños importantes en el rendimiento de las mazorcas, especialmente en variedades de cacao susceptibles. Las lesiones pueden expandirse rápidamente, afectando la salud general de la planta y disminuyendo considerablemente la calidad y cantidad de la cosecha. En casos graves, la infección puede llevar a la muerte de las plantas jóvenes (García-Gallirgos, 2021).

2.2.3.4. Síntomas causados en especies agrícolas y forestales

Lasiodiplodia theobromae causa una variedad de daños en cultivos agrícolas y forestales, especialmente en aquellos que están bajo condiciones de estrés o debilitados. En plantas de cacao, el hongo afecta principalmente las ramas jóvenes, los brotes y las mazorcas, produciendo lesiones que pueden avanzar rápidamente. Estas lesiones se caracterizan por la presencia de pudrición y momificación de los frutos, lo que reduce considerablemente la calidad de la cosecha (Bautista-Cruz *et al.*, 2019). En casos graves, la infección puede resultar en la muerte regresiva de la planta, afectando severamente la productividad de las fincas de cacao. Los síntomas incluyen la aparición de manchas oscuras en los frutos y la necrosis de las ramas y hojas, lo que disminuye la capacidad de la planta para realizar fotosíntesis y, por lo tanto, su crecimiento y desarrollo (Berraf-Tebbal *et al.*, 2020).

En cultivos como el mango, aguacate y papaya, *L. theobromae* también provoca la caída prematura de frutos, necrosis en las ramas y muerte regresiva de la planta. Las lesiones en los frutos suelen comenzar como manchas oscuras que se expanden rápidamente, afectando la calidad y reduciendo el rendimiento. Este hongo puede persistir en restos vegetales y en el suelo, facilitando su dispersión y provocando brotes recurrentes en la siguiente cosecha (Sudha *et al.*, 2019).

En cultivos forestales, como las plantaciones de teca y otras especies maderables, *L. theobromae* puede causar la muerte de ramas y, eventualmente, de toda la planta, especialmente cuando las condiciones ambientales favorecen el desarrollo del hongo. Este patógeno también puede afectar a otras especies de importancia comercial, generando pérdidas económicas significativas en la industria agrícola y forestal (Troncozo-Correa, 2023).

2.2.4. Antecedentes investigativos

Se ha demostrado que el D-limoneno, el principal componente del aceite esencial de naranja, tiene efectos anti proliferativos y promueve la apoptosis. Las frambuesas recubiertas con CMC y aceite esencial mostraron un 30% menos de decaimiento en comparación con aquellas sin el aceite. Además, estos recubrimientos con aceite esencial mostraron una mayor capacidad para inhibir el crecimiento microbiano en comparación con los recubrimientos sin aceite esencial. Los resultados son similares a los obtenidos en estudios con fresas recubiertas con quitosano, donde al final del almacenamiento, las fresas sin recubrimiento presentaron un daño moderado del 42 %, mientras que las fresas recubiertas mostraron daño en un intervalo de 16 a 20 %. Esto sugiere que los recubrimientos ayudan a prevenir la incidencia de podredumbre gris (Trejo, 2015)

Se descubrió que los aceites esenciales de limón (*Citrus limon* L.), naranja (*Citrus sinensis* L.) y bergamota (*Citrus bergamia*) son efectivos para controlar patógenos en frutos. Esta eficacia se debe a que los aceites cítricos contienen terpenos como el limoneno (92.52 a 97.3 %) y β -pineno (1.37 a 1.82 %), que han demostrado tener propiedades antimicrobianas, inhibiendo el crecimiento de diversos patógenos fúngicos y bacterianos en los cultivos tratados. En particular, el limoneno es el componente principal del aceite esencial de limón, representando entre el 72.5 y el 76.4 %, seguido de β -pineno con un 11.6 – 18.7 %. Además,

se identificó que tres monoterpenos (timol, (S)-limoneno y 1.8-cineol) tienen propiedades antifúngicas efectivas, al inhibir el crecimiento micelial de hongos como *Rhizoctonia solani*, *F. oxysporum*, *P. digitatum* y *A. niger*. También se reportó que los aceites esenciales de limón tienen actividad antifúngica contra hongos como *F. oxysporum* y *Glomerella cingulata*, que causan enfermedades en frutos. La aplicación de estos aceites esenciales no solo reduce la incidencia de estas enfermedades, sino que también puede prolongar la vida útil de los productos agrícolas, ofreciéndose como una alternativa a los fungicidas sintéticos (Guedez, 2014).

El GC-MS permitió caracterizar químicamente a los aceites esenciales de hojas de *O. quixos* y *P. aduncum* procedentes de la Amazonía ecuatoriana y evaluar su efecto antifúngico *IN VITRO*, contra hongos fitopatógenos. Los resultados evidenciaron excelente propiedad antifúngica del aceite de *O. quixos* frente a *A. oryzae*, *C. cladosporioides*, *F. solani*, *M. roleri*, *Phytophthora* sp. y *R. stolonifer*. El aceite esencial de *P. aduncum* mostró una interesante actividad inhibitoria especialmente frente a *F. solani* y *Phytophthora* sp. Estos resultados evidencian a las dos especies, *O. quixos* y *P. aduncum*, como plantas promisorias para el control biológico de hongos fitopatógenos. La presente investigación sienta las bases para posteriores estudios de actividad antifúngica in vivo (Scalvenzi, 2016).

El análisis mediante GC-MS permitió caracterizar químicamente los aceites esenciales de las hojas de *O. quixos* y *P. aduncum*, provenientes de la Amazonía ecuatoriana, y evaluar su efecto antifúngico *IN VITRO* contra hongos fitopatógenos. Los resultados mostraron una excelente propiedad antifúngica del aceite de *O. quixos* contra hongos como *A. oryzae*, *C. cladosporioides*, *F. solani*, *M. roleri*, *Phytophthora* sp. y *R. stolonifer*. Por otro lado, el aceite esencial de *P. aduncum* mostró una actividad inhibidora notable, especialmente contra *F. solani* y *Phytophthora* sp. Estos hallazgos destacan a *O. quixos* y *P. aduncum* como plantas prometedoras para el control biológico de hongos fitopatógenos. La investigación proporciona una base sólida para futuros estudios sobre la actividad antifúngica *IN VITRO* (Narváez, 2017).

Por otro lado, se reportó que el extracto de *Artemisa* sp. puede inhibir completamente el crecimiento micelial de *Phytophthora cactorum*, *P. capsici*, *P. cinnamomi* y *P. mirabilis*, y reducir el crecimiento de *P. infestans* en un 60 %, a una dosis de 100 ppm. La cromatografía de gases reveló que el aceite de clavo contiene principalmente alilbenceno eugenol, con una concentración del 94 %. Este compuesto actúa interrumpiendo la actividad citoplasmática

de la membrana, aumentando su permeabilidad no específica. Estos tratamientos se presentan como agentes potenciales para incluir en programas de manejo de la tristeza del aguacate causada por *P. cinnamomi*. Los compuestos y metabolitos secundarios de diversas especies botánicas juegan un papel crucial en su resistencia contra plagas. Así, las investigaciones sobre las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales son fundamentales para descubrir nuevos agentes para el control orgánico de fitopatógenos (Ochoa, 2020).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Localización de la investigación

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología del Campus “La María” de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), ubicada en km 7.5 de la vía a Quevedo-El Empalme, en la provincia de Los Ríos, entre las coordenadas geográficas 1°04'53" latitud Sur y 79°30'07" longitud Oeste, a una altitud de 66 m.s.n.m.

El sitio experimental presenta un clima tropical húmedo, con una temperatura media anual de 24.9 °C. La precipitación media anual es de 2295.1 mm, y la humedad relativa media alcanza un 84.0%. Además, la heliofanía en el área, que se refiere a las horas de sol por año, es de 894.0 horas.

3.2. Tipo de investigación

La investigación realizada fue de tipo experimental y exploratoria. Se considera de tipo experimental, puesto que se tuvo la manipulación de diferentes tratamientos y se midió su efecto en las variables de respuesta en estudio. Por otra parte, se atribuye carácter exploratorio, debido a que, a la actualidad, no existen precedentes de investigaciones similares en el área de influencia de la investigación.

3.3. Métodos de investigación

3.3.1. Método inductivo

Se aplicó el método inductivo, partiendo de lo particular a lo general para la identificación y selección de las variables de respuesta a fin de alcanzar los objetivos de la investigación. Posteriormente, esto aportó al desarrollo de conclusiones generales a partir de los datos particulares del estudio realizado.

3.3.2. Método deductivo

El método deductivo, partió de lo general a lo particular, posibilitando la determinación del efecto específico causado por los estados de madurez en la producción de aceite esencial, así como de los tratamientos sobre las diferentes variables de respuesta.

3.3.3. Método analítico

Mediante la aplicación de este método se logró el respectivo análisis e interpretación de los resultados obtenidos en la evaluación de las diferentes variables de respuesta para la posterior generación de resultados alineados a los objetivos de la investigación.

3.4. Fuentes de recopilación de la información

3.4.1. Fuentes primarias

La fuente primaria de información utilizada en la investigación, corresponde a toda aquella generada por medio de la observación directa a través de las diferentes variables de respuesta.

3.4.2. Fuentes secundarias

Se complementó la información de campo, con aquella obtenidas de fuentes secundarias como libros, artículos científicos y tesis, de manera que se pudo fundamentar y contrastar los resultados obtenidos en el presente estudio.

3.5. Diseño de la investigación

3.5.1. Factores estudiados

Se estudiaron dos factores, el primero correspondiente a los estados de madurez de la naranja, y el segundo representado por las concentraciones del aceite esencial, tal como se describen a continuación:

Factor A: Estados de madurez

E1: Naranja inmadura

E2: Naranja madura

Factor B: Concentraciones de aceite esencial

C0: 0%

C1: 50%

C2: 75%

C3: 100%

3.5.2. Tratamientos evaluados

Se estudiaron ocho tratamientos, correspondientes a las interacciones entre los dos factores en estudio. La descripción de los tratamientos evaluados se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2.

Descripción de los tratamientos evaluados en la investigación

Tratamientos	Código	Estado de madurez	Concentración
T1	E1C0	Naranja inmadura	0%
T2	E1C1	Naranja inmadura	50%
T3	E1C2	Naranja inmadura	75%
T4	E1C3	Naranja inmadura	100%
T5	E2C0	Naranja madura	0%
T6	E2C1	Naranja madura	50%
T7	E2C2	Naranja madura	75%
T8	E2C3	Naranja madura	100%

3.5.3. Diseño experimental

Por las características del experimento, se utilizó un diseño factorial 2x4 en 3 repeticiones. Se consideró como primer factor a los estados de madurez de la naranja utilizada como materia prima para obtener el aceite esencial y como segundo factor a las concentraciones de aceite esencial obtenido. La unidad experimental estuvo conformada por una caja Petri por cada una. El esquema del análisis de varianza (ANOVA) utilizado en la investigación se presenta en la Tabla 3.

Tabla 3.*Descripción del análisis de varianza utilizado en la investigación*

Fuentes de variación	Fórmula	Grados de libertad
Estados de madurez (A)	$a - 1$	1
Concentraciones (B)	$b - 1$	3
Interacciones (AxB)	$(a - 1)(b - 1)$	3
Error	$(a * b)(r - 1)$	16
Total	$(r*a*b) - 1$	23

El modelo matemático lineal utilizado en el diseño experimental aplicado fue el que se describe a continuación:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Dónde:

Y_{ijk} : Observación de la respuesta del tratamiento con el i-ésimo nivel de A y del j-ésimo nivel de B y la repetición k-ésima

μ : Media general

α_i : Efecto del i-ésimo nivel del factor A

β_j : Efecto del j-ésimo nivel del factor B

$(\alpha\beta)_{ij}$: Efecto de la interacción del i-ésimo nivel del factor A y el j-ésimo

ε_{ijk} : Error aleatorio asociado a la observación Y_{ijk} , asumido como $\varepsilon_{ijk} \sim N(0, \sigma^2)$

3.6. Instrumentos de investigación

3.6.1. Manejo del experimento

3.6.1.1. Preparación del aceite esencial

Se realizó la preparación del aceite esencial a través de un proceso que incluyó la extracción del aceite de la cáscara de naranjas en dos estados de madurez: inmadura y madura, utilizando la técnica de destilación por arrastre de vapor. Las naranjas fueron recolectadas en estos dos estados de madurez en cultivos locales de Quevedo, Los Ríos. Posteriormente, se lavaron con agua potable para eliminar cualquier residuo superficial. Luego, se pelaron utilizando cuchillos esterilizados y se sometieron a destilación por arrastre de vapor para extraer el aceite esencial. El producto obtenido se almacenó en frascos de vidrio oscuro a

una temperatura de 4 °C hasta su utilización en los experimentos de acuerdo a lo descrito por Briones & Guerrero (2019).

Los aceites esenciales extraídos se analizaron mediante cromatografía de gases (CG) para identificar y cuantificar sus componentes principales, como limoneno, cineol y linalol. Para ello, se diluyó una alícuota de cada muestra en un solvente apropiado, como hexano o metanol, en una proporción de 1:100. Las muestras diluidas fueron filtradas a través de un filtro de jeringa de 0.45 µm antes del análisis. En el proceso cromatográfico se empleó un cromatógrafo de gases equipado con un detector de ionización de llama o un detector de espectrometría de masas, utilizando una columna capilar adecuada para la separación de terpenos. Las condiciones cromatográficas establecidas incluyeron una temperatura del inyector de 250 °C, una temperatura del detector de 280 °C, un programa de temperatura del horno de 60 °C (mantenido durante 2 minutos) con un incremento de 4 °C por minuto hasta alcanzar 240 °C, mantenido durante 5 minutos, un flujo constante de helio de 1 mL/min, un volumen de inyección de 1 µL y un modo de inyección Split con una relación de 1:50 (Distefano *et al.*, 2022).

Para la identificación y cuantificación de los componentes principales se utilizaron estándares de n-alcenos (C8 - C20) para calcular los índices de retención de Kovats. Los componentes fueron identificados comparando sus índices de retención y espectros de masas con bases de datos estándar como NIST y Wiley, así como con literatura científica. La cuantificación se realizó mediante el método de normalización de áreas. Finalmente, se compararon los perfiles cromatográficos de los aceites esenciales extraídos de naranjas inmaduras y maduras, identificando y cuantificando los componentes principales en cada muestra, con un enfoque particular en limoneno, cineol y linalol (Urrunaga-Ormachea *et al.*, 2022).

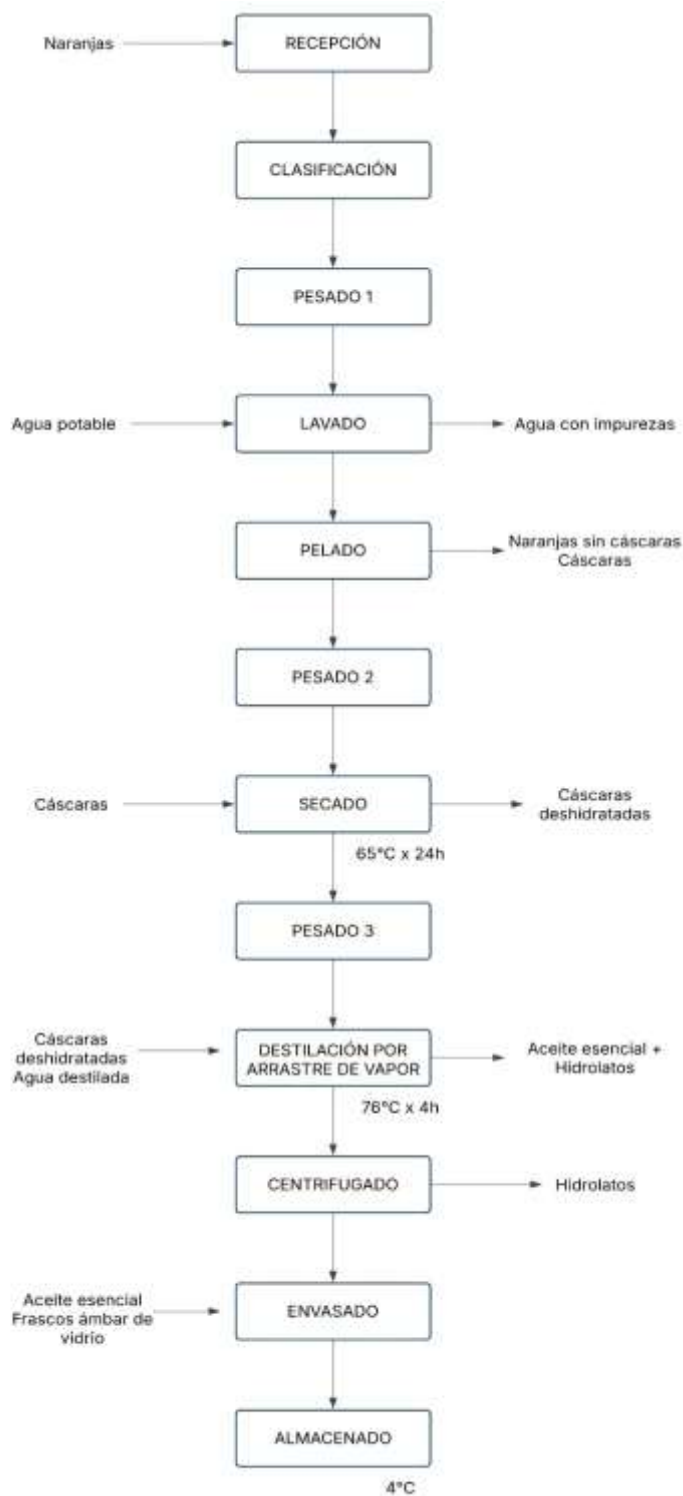
3.6.1.2. Preparación del medio de cultivo y cultivo del hongo

Se preparó el medio Papa Dextrosa Agar (PDA) siguiendo las instrucciones del fabricante y se esterilizó en un autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Una vez esterilizado, el medio fue vertido en placas Petri y se dejó solidificar. Posteriormente, el hongo *Lasiodiplodia theobromae* fue inoculado en las placas Petri con PDA y se incubó a una temperatura de 28

°C durante 7 días. Durante este periodo, se registró el crecimiento micelial y la producción de picnidios (Farahmandfar *et al.*, 2019).

Figura 1.

Diagrama del proceso de extracción del aceite esencial de naranja utilizado en la investigación



3.6.2. Variables evaluadas

3.6.2.1. Caracterización del aceite esencial obtenido

Para la caracterización de los compuestos del aceite esencial obtenido de la cáscara de naranja en diferentes estados de madurez, se tomó una muestra de 10 mL de cada uno, y se envió para su análisis al laboratorio de Química Analítica de la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL).

3.6.2.2. Cantidad de aceite esencial obtenido

La cantidad de aceite esencial obtenido por cada estado de madurez de la cáscara de naranja se estableció mediante el registro del volumen total obtenido por cada 300 g de materia prima. Luego se estableció el promedio de acuerdo a cada uno de los estados de madurez, y se expresó el volumen en mL.

3.6.2.3. Diámetro del micelio (mm)

La medición del diámetro micelial de *Lasiodiplodia theobromae* se realizó utilizando un calibrador digital, tomando dos mediciones perpendiculares del crecimiento del micelio en cada caja Petri y se calculó el promedio de ambas. Las mediciones se efectuaron cada 24 horas durante tres días, y se expresó el promedio de acuerdo a cada tratamiento expresado en milímetros en cada una de las evaluaciones, siguiendo la metodología descrita por Oliveira-Da Silva *et al.* (2017).

3.6.2.4. Crecimiento micelial

El crecimiento micelial experimentado por el hongo entre la primera y la última evaluación, se estableció mediante la diferencia entre el diámetro micelial registrado en éstas, aplicando la siguiente fórmula:

$$CM = DM_f - DM_i$$

Dónde:

CM: Crecimiento micelial (mm)

DM_f: Diámetro micelial en la evaluación final (mm)

DM_i: Diámetro micelial en la evaluación inicial (mm)

3.6.2.5. Tasa de crecimiento (mm día⁻¹)

Se determinó la tasa de crecimiento experimentada por el hongo en cada uno de los tratamientos, mediante el cociente entre el crecimiento del micelio al cabo de 72 horas y el número de días transcurridos (tres días), utilizando la fórmula descrita por Roggero-Luque *et al.* (2022):

$$TC = \frac{CM}{TE}$$

Dónde:

TC: Tasa de crecimiento (mm día⁻¹)

CM: Crecimiento del micelio (mm)

TE: Tiempo de evaluación(días)

3.6.2.6. Inhibición del crecimiento micelial

Con base a los valores del diámetro micelial registrado en cada una de las tres evaluaciones, se determinó la inhibición del crecimiento micelial (ICM), utilizando la fórmula descrita por Arce-Araya *et al.* (2019):

$$ICM = \frac{DMC - DMT}{DMC} * 100$$

Dónde:

ICM: Inhibición del crecimiento micelial (%)

DMC: Diámetro del micelio en el tratamiento control (mm)

DMT: Diámetro del micelio en el tratamiento (mm)

3.7. Tratamiento de los datos

Los datos obtenidos de la evaluación de las variables de respuesta, fueron analizados mediante el test de normalidad de Shapiro-Wilk (1965). Una vez comprobada la distribución

normal de los datos, se procedió a realizar el respectivo análisis de varianza (ANOVA) a las variables de respuesta. Las variables que presentaron coeficientes de variación superiores al 20%, fueron sometidas a la transformación de datos mediante $\sqrt{x + 0.5}$, a fin de disminuir la dispersión de los mismos. Posteriormente, se aplicó la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) para la comparación de las medias de los niveles de los factores e interacciones en estudio.

Adicionalmente, se hicieron análisis de correlación de Pearson entre las horas transcurridas y el diámetro micelial del hongo (mm) en respuesta a cada uno de los diferentes tratamientos evaluados, a fin de identificar la variación generada por la aplicación de los mismos. Por otra parte, también se hizo un análisis de correlación entre las concentraciones de aceite esencial y parámetros de crecimiento micelial de *L. theobromae*.

3.8. Recursos humanos y materiales

3.8.1. Recursos humanos

- Estudiante Responsable del Proyecto de Investigación (María De Los Ángeles López Ortega)
- Docente Tutor del Proyecto de Investigación (Qco. Loguard Smith Rojas Uribe, M.Sc.)

3.8.2. Recursos materiales

3.8.2.1. Materiales y equipos de oficina

- Computador
- Equipo de imagen y video
- Impresora
- Libreta de campo
- Paquete Office
- Software de análisis de datos

3.8.2.2. *Materiales y equipos de laboratorio*

- Aceite esencial de naranja
- Agua destilada
- Autoclave
- Balanza analítica
- Cajas de Petri
- Cámara de flujo laminar
- Centrífuga
- Cuchillos esterilizados
- Destilador por arrastre de vapor
- Etanol 70 %
- Frascos de vidrio oscuro
- Gafas de seguridad
- Gradillas
- Guantes desechables
- Incubadora
- Mascarillas
- Mechero Bunsen
- Medio Papa Dextrosa Agar (PDA)
- Microscopio estereoscópico
- Naranjas
- Papel aluminio
- pHmetro
- Pipetas
- Placas Petri
- Puntas de pipeta
- Refrigerador
- Soportes para tubos
- Tubos de ensayo

CAPÍTULO IV

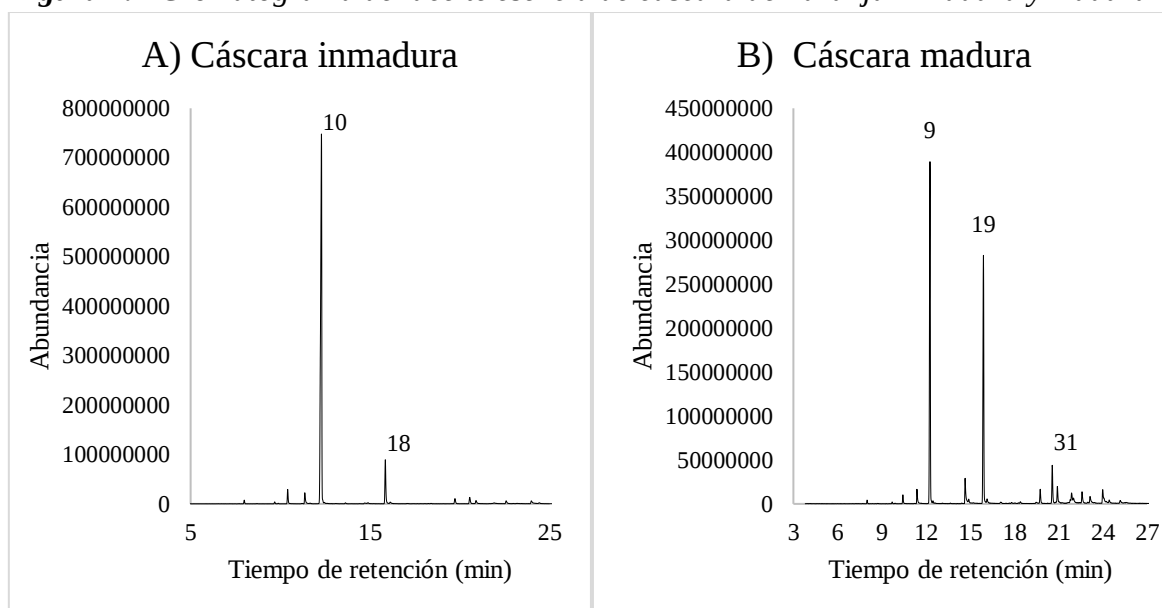
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

4.1.1. Composición cromatográfica de aceites esenciales de cáscara de naranja Valencia

Las muestras de aceites esenciales extraídas de cáscaras de naranja variedad Valencia (*Citrus sinensis*) en estado inmaduro (CIM) y maduro (CM) fueron sometidas a un ensayo de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) con el objetivo de determinar su perfil químico volátil. El análisis se realizó utilizando una columna capilar HP-5MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm), bajo condiciones de inyección en modo splitless y con helio como gas portador a un flujo constante de 1 mL/min. La temperatura del horno se programó con un incremento inicial desde 60 °C, sostenido por 2 minutos, seguido de un aumento de 3 °C/min hasta alcanzar 240 °C. La temperatura del inyector fue de 250 °C y la del detector de 280 °C. El análisis permitió obtener los cromatogramas correspondientes a cada muestra, los cuales se presentan en la Figura 2A para la cáscara inmadura (CIM) y en la Figura 2B para la cáscara madura (CM), evidenciando diferencias significativas en la intensidad relativa de los compuestos volátiles detectados entre ambos estados de maduración.

Figura 2. Cromatograma del aceite esencia de cascara de naranja inmadura y madura



4.1.2. Composición química del aceite esencial de cáscara inmadura

El análisis mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) del aceite esencial extraído de cáscaras de naranja Valencia en estado inmaduro (CIM) reveló un perfil químico caracterizado por un claro predominio de monoterpenos hidrocarburos, con una concentración sobresaliente de d-limoneno (79.7%), que constituye la base aromática principal del aceite. Esta elevada proporción se encuentra dentro del rango reportado para aceites de naranja dulce, aunque ligeramente inferior al valor típico de 85–95% observado en aceites obtenidos por expresión en frío.

Destaca también la presencia notable de linalool (7.4%), un alcohol monoterpénico oxigenado con propiedades aromáticas florales y reconocida actividad biológica. Su concentración es considerablemente mayor al promedio habitual (<3%) en aceites esenciales de naranja, lo que sugiere que el método de extracción utilizado (posiblemente destilación por arrastre de vapor) o la inmadurez fisiológica del fruto favorecieron la liberación de alcoholes monoterpénicos. Otros componentes significativos incluyen β -mirceno (2.2%), octanal (2.0%) y α -terpineol (1.3%), que junto con terpinen-4-ol (1.0%), los isómeros del citral —geranial (0.96%) y neral (0.68%)— y decanal (0.66%) completan el perfil volátil más relevante. El contenido de aldehídos alifáticos como octanal y decanal contribuye con notas cítricas intensas.

Finalmente, también se identificaron compuestos menores como α -pineno (0.5%), sabineno, β -pineno, γ -terpineno y ocimenos, todos en concentraciones inferiores al 0.5%, en concordancia con el perfil habitual de aceites cítricos. En conjunto, el aceite de CV mostró un contenido total de monoterpenos hidrocarburos superior al 90%, mientras que los compuestos oxigenados, aunque minoritarios en proporción global, destacan por su diversidad y concentración superior a lo común, aportando un perfil químico y funcionalmente versátil.

4.1.3. Composición química del aceite esencial de cáscara madura

El aceite esencial extraído de cáscara de naranja Valencia en estado maduro (CM) presentó un perfil químico marcadamente distinto al observado en el estado inmaduro (CIM), evidenciando transformaciones químicas atribuibles al proceso de maduración y/o

extracción. Aunque el d-limoneno continúa siendo el compuesto predominante, su concentración descendió drásticamente a 38.6%, revelando una significativa reducción de la fracción hidrocarbonada y una transformación hacia compuestos más oxigenados.

El componente más destacado tras el limoneno fue el linalool, que alcanzó un valor de 29.3%, situándose en niveles excepcionalmente altos comparados con el estándar reportado en la literatura (<5%). Este cambio sugiere una transformación oxidativa sustancial del limoneno o la liberación de compuestos previamente conjugados en la matriz vegetal. A este le siguen otros monoterpenos oxigenados como α -terpineol (4.5%), geranial (1.75%), neral (1.53%) y geraniol (1.38%), todos con funciones conocidas en la defensa vegetal y con importantes aplicaciones terapéuticas.

Los aldehídos alifáticos como decanal (2.04%), nonanal (0.78%) y octanal (1.69%) también se encontraron en mayores proporciones que en la muestra inmaduro, lo que sugiere una mayor actividad oxidativa sobre cadenas terpénicas más largas. Asimismo, la concentración de terpinen-4-ol se incrementó a 1.72%, indicando una posible oxidación secundaria de monoterpenos.

En contraste con el estado inmaduro, los monoterpenos hidrocarburos menores disminuyeron de forma generalizada: β -mirceno (~0.9%), α -pineno (~0.3%), sabineno (~0.16%) y otros por debajo del 0.1%. Esta caída en los hidrocarburos, junto con el aumento de compuestos oxigenados, sugiere una progresiva degradación o bioconversión durante la maduración.

Finalmente, se detectaron sesquiterpenos en trazas —como (E)-cariofileno (0.2%), α -copaeno (0.06%) y β -copaeno (0.04%)— ausentes en el estado inmaduro. Esto podría deberse a que la reducción de limoneno permitió su detección, o bien a una síntesis inducida por la maduración avanzada. En conjunto, el aceite de CM representa un cambio químico profundo con respecto a la muestra inmadura, con un enriquecimiento en compuestos oxigenados y mayor diversidad funcional, lo que amplía su potencial en aplicaciones terapéuticas, cosméticas y alimentarias.

A continuación, se presentan los compuestos más representativos identificados en los aceites esenciales extraídos de cáscaras de naranja variedad Valencia en dos estados de maduración:

inmaduro (CIM) y maduro (CM). Para la identificación de los compuestos volátiles, se empleó una curva de hidrocarburos mediante la inyección de una mezcla estándar de alcanos lineales (C9–C22), lo que permitió determinar con precisión los índices de retención (RI) y facilitar la comparación con bibliografía especializada.

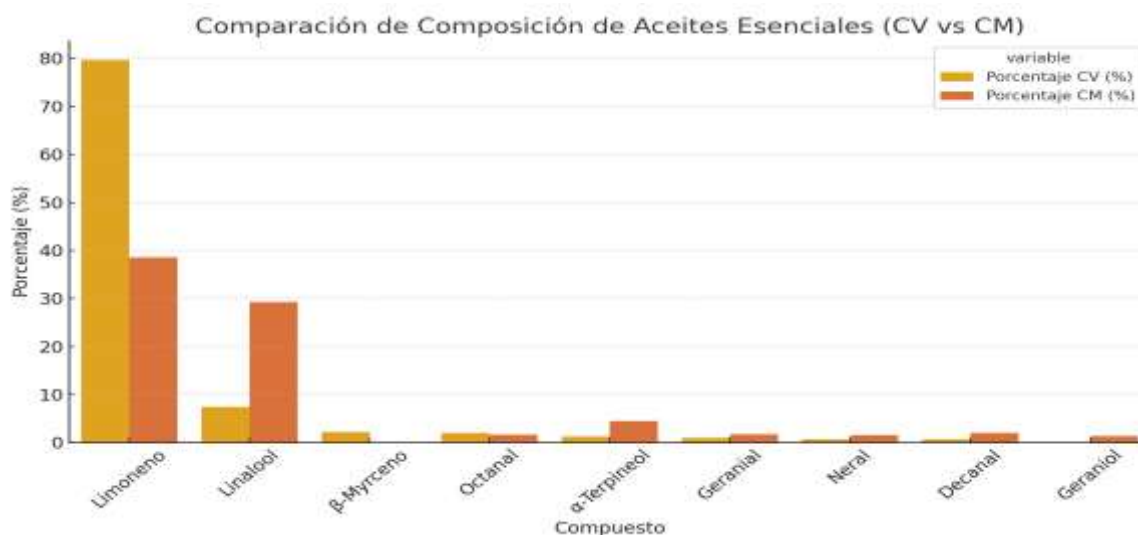
Tabla 4.

Comparación de los componentes volátiles principales en cáscaras inmaduras y maduras de naranja

Compuestos	Contenido (%)	
	Cáscara inmadura	Cáscara madura
Limoneno	79.70	38.60
Linalool	7.40	29.30
β -Myrceno	2.20	0.00
Octanal	2.00	1.69
α -Terpineol	1.30	4.50
Geranial	0.96	1.75
Neral	0.68	1.53
Decanal	0.66	2.04
Geraniol	0.00	1.38

En la Figura 3 siguiente se visualiza claramente la variación en la abundancia relativa de los compuestos seleccionados entre los dos estados de maduración. Se observa una reducción significativa del limoneno en la muestra madura (CM), con un incremento marcado de alcoholes como linalool y α -terpineol, así como aldehídos como geranial y decanal.

Figura 3. *Cantidad total de aceite esencial obtenido de la cáscara de naranja en dos estados de madurez*

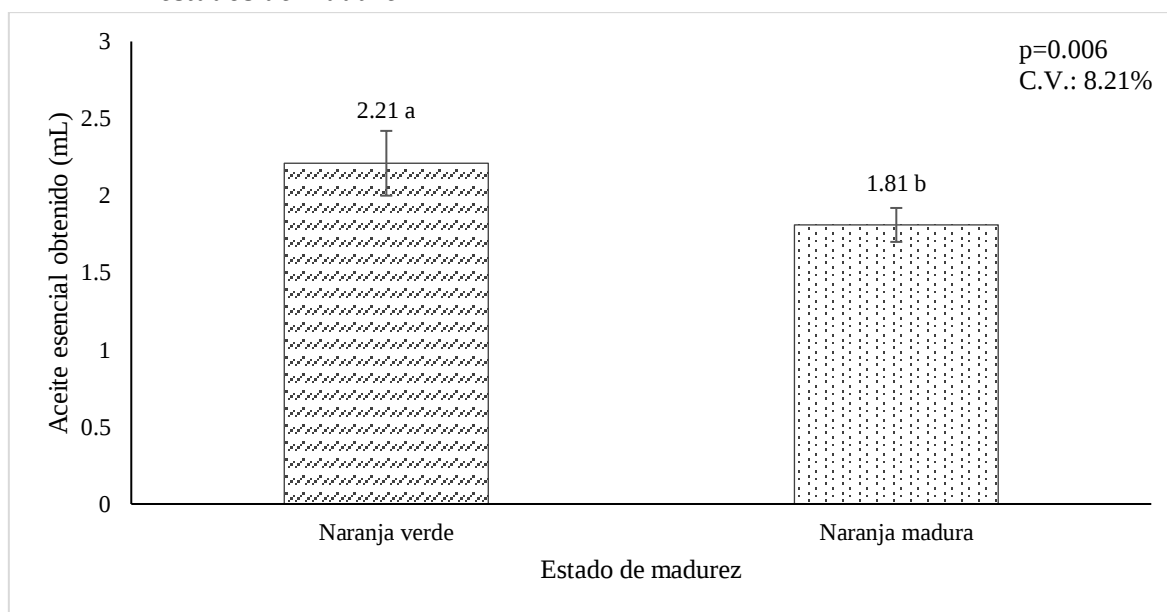


4.1.4. Cantidad de aceite esencial obtenido (mL)

En la Figura 4, se presentan los promedios de la cantidad total de aceite esencial obtenido de 300 g de cáscara de naranja en dos estados de madurez. De acuerdo al análisis de varianza, los tratamientos evaluados presentaron alta significancia estadística ($p < 0.0001$), con un coeficiente de variación de 8.21%.

La cantidad de aceite esencial obtenidos de la cáscara de naranja, varió significativamente en función del estado de madurez de dicho fruto. Se obtuvo mayor cantidad de aceite esencial al utilizar cáscara de naranja inmadura, con un promedio de 2.21 mL, mostrando diferencias significativas respecto a los 1.81 mL obtenidos al utilizarse cáscara de naranja madura.

Figura 4. Cantidad total de aceite esencial obtenido de la cáscara de naranja en dos estados de madurez



Nota: Promedios con la misma letra no difieren estadísticamente según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Barras de error representan la desviación estándar de cada tratamiento.

La Tabla 5 muestra el rendimiento de aceite esencial obtenido a partir de la cáscara de naranja en dos estados de madurez. Se observa que la cáscara de la naranja inmadura presentó un mayor rendimiento de aceite esencial (0.76%) en comparación con la naranja madura (0.65%), a pesar de que la cantidad de cáscara utilizada fue ligeramente mayor en el primer caso (291.43 g frente a 276.14 g). Asimismo, el volumen de aceite obtenido fue superior en la naranja inmadura (2.21 mL) en comparación con la naranja madura (1.81 mL),

lo que sugiere que el estado de madurez influye en la extracción del aceite esencial, favoreciendo una mayor recuperación en frutos menos maduros.

Tabla 5.

Rendimiento de aceite esencial obtenido en cáscara de naranja en dos estados de madurez

Estados de madurez	Cantidad de cáscara (g)	Aceite esencial obtenido (mL)	Rendimiento (%)
Naranja inmadura	291.43	2.21	0.76
Naranja madura	276.14	1.81	0.65

4.1.5. Diámetro del micelio (mm)

Los promedios del diámetro del micelio de *L. theobromae* durante 72 horas de incubación en respuesta a la aplicación de tres concentraciones de aceite esencial obtenidos de dos estados de madurez de naranja, se presentan en la Tabla 6. El análisis varianza puso en evidencia que los estados de madurez de la naranja no difieren entre sí en cuanto al diámetro del micelio a las 24 ($p=0.2428$), 48 ($p=0.2095$) y 72 horas ($p=0.2751$), mientras que las concentraciones evaluadas alcanzaron el 99% de significancia estadística para las dos primeras evaluaciones ($p<0.0001$), y el 95% de significancia estadística para la evaluación a las 72 horas ($p=0.0185$). Por su parte, para las interacciones, únicamente en la evaluación a las 24 horas, se evidenció alta significancia estadística ($p=0.0073$). Los coeficientes de variación oscilaron entre 12.19 y 22.92%.

Los estados de madurez no presentaron diferencias significativas entre sí en las tres evaluaciones realizadas, con promedios entre 3.02 y 3.10 mm de diámetro micelial a las 24 horas de incubación, mientras que, para las 48 y 72 horas, los promedios variaron de 16.81 a 19.97 mm y de 33.93 a 37.38 mm, respectivamente.

En las tres evaluaciones realizadas, la comparación entre las concentraciones, reflejó que se obtuvo mayor diámetro del micelio en C0: 0 % (Control), con valores de 7.92, 31.21 y 41.00 mm, a las 24, 48 y 72 horas, respectivamente. En la primera evaluación, la concentración de mayor promedio mostró diferencias significativas por encima de las restantes, cuyos promedios oscilaron entre 0.00 y 3.58 mm. Por su parte, en la segunda evaluación, C0: 0 %, no difirió significativamente de C1: 50 % (21.42 mm), y, si superó significativamente a C2:

75 % (16.14 mm) y C3: 100% (4.79 mm). Para la tercera evaluación, C0: 0 %, no difirió significativamente de C1: 50 % (39.17 mm) y C2: 75 % (38.75 mm), y superó significativamente a C3: 100% (23.71 mm). Cabe indicar que, en las tres evaluaciones descritas, los valores más bajos del diámetro del micelio, correspondió a C3: 100%.

En lo correspondiente a las interacciones, a las 24 horas, E1C0: Naranja inmadura + 0%, registró mayor diámetro del micelio, con 8.17 mm, en ausencia de diferencias significativas respecto a E2C0: Naranja madura + 0%, cuyo promedio fue de 7.67 mm. Las mencionadas interacciones, mostraron diferencias significativas por encima de las demás, cuyos promedios oscilaron entre 0.00 y 3.90 mm. En esta evaluación, las interacciones E1C2: Naranja inmadura + 75%, E1C3: Naranja inmadura + 100 % y E2C3: Naranja madura + 100%, no presentaron crecimiento del micelio.

A las 48 horas de incubación, E1C0: Naranja inmadura + 0%, presentó mayor diámetro del micelio, con 32.67 mm, en ausencia de diferencias significativas respecto a E1C1: Naranja inmadura + 50%, E2C0: Naranja madura + 0%, E2C1: Naranja madura + 50% y E2C2: Naranja madura + 75%, que registraron promedios entre 20.83 y 29.75 mm, y, superando significativamente a E1C3: Naranja inmadura + 100 %, E2C3: Naranja madura + 100%, E1C2: Naranja inmadura + 75%, cuyos valores oscilaron entre 2.92 y 9.67 mm. El menor diámetro del micelio a las 48 horas se registró en E1C3: Naranja inmadura + 100 %. Para la tercera evaluación (72 horas), las interacciones evaluadas no presentaron diferencias significativas entre sí, con promedios que fluctuaron entre 18.42 y 41.43%.

Tabla 6.

Diámetro del micelio de L. theobromae durante 72 horas de incubación en respuesta a la aplicación de tres concentraciones de aceite esencial obtenidos de dos estados de madurez de naranja.

Tratamientos	Diámetro micelial de <i>L. theobromae</i>		
	24 horas	48 horas	72 horas
Estado de madurez	p=0.2428	p=0.2095	p=0.2751
E1: Naranja inmadura	3.02 a	16.81 a	33.93 a
E2: Naranja madura	3.10 a	19.97 a	37.38 a
Concentraciones	p<0.0001	p<0.0001	p=0.0185
C0: 0 %	7.92 a	31.21 a	41.00 a
C1: 50 %	3.58 b	21.42 ab	39.17 a
C2: 75 %	0.75 c	16.14 b	38.75 ab
C3: 100%	0.00 d	4.79 c	23.71 b
Interacciones	p=0.0073	p=0.2896	p=0.4768
E1C0: Naranja inmadura + 0%	8.17 a	32.67 a	40.57 a
E1C1: Naranja inmadura + 50%	3.90 b	22.00 abc	39.08 a
E1C2: Naranja inmadura + 75%	0.00 d	9.67 bcd	37.67 a
E1C3: Naranja inmadura + 100 %	0.00 d	2.92 d	18.42 a
E2C0: Naranja madura + 0%	7.67 a	29.75 ab	41.43 a
E2C1: Naranja madura + 50%	3.25 bc	20.83 abc	39.25 a
E2C2: Naranja madura + 75%	1.50 c	22.61 abc	39.83 a
E2C3: Naranja madura + 100%	0.00 d	6.67 cd	29.00 a
Promedio	3.06	18.39	35.66
Coefficiente de variación (%)	12.19	22.92	17.72

Nota: Promedios con la misma letra en cada grupo de datos, no difieren estadísticamente según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Datos transformados con $\sqrt{x + 0.5}$

4.1.6. Crecimiento micelial

En la Tabla 7, se presentan los promedios del crecimiento micelial y tasa de crecimiento de *L. theobromae* durante 72 horas de incubación en respuesta a la aplicación de tres concentraciones de aceite esencial obtenidos de dos estados de madurez de naranja. Con base al análisis de varianza se pudo apreciar que, ninguna de las fuentes de variación presentó significancia estadística tanto para el crecimiento micelial, así como para la tasa de crecimiento ($p > 0.05$), con coeficientes de variación de 18.54 y 16.84%, respectivamente.

En lo correspondiente a los estados de madurez, éstos no presentaron diferencias significativas entre sí, con valores entre 30.92 y 34.28 mm de crecimiento micelial, y de 10.31 a 11.43 mm día⁻¹ de tasa de crecimiento. Por su parte, para las concentraciones

evaluadas, se evidenció una tendencia similar, de manera que no existieron diferencias significativas entre éstas, con promedios de crecimiento micelial entre 23.71 y 38.00 mm, y tasas de crecimiento que fluctuaron entre 7.90 y 12.67 mm día⁻¹. Por su parte, las interacciones no registraron diferencias significativas entre sí, con promedios de crecimiento micelial que oscilaron entre 18.42 y 38.33 mm, y tasas de crecimiento que variaron entre 6.14 y 12.78 mm día⁻¹.

Tabla 7.

Crecimiento micelial y tasa de crecimiento de L. theobromae durante 72 horas de incubación en respuesta a la aplicación de tres concentraciones de aceite esencial obtenidos de dos estados de madurez de naranja.

Tratamientos	Crecimiento micelial (mm)	Tasa de crecimiento (mm día ⁻¹)
Estado de madurez	p=0.7299	P=0.2809
E1: Naranja inmadura	30.92 a	10.31 a
E2: Naranja madura	34.28 a	11.43 a
Concentraciones	p=0.0577	p=0.0512
C0: 0 %	33.08 a	11.03 a
C1: 50 %	35.59 a	11.86 a
C2: 75 %	38.00 a	12.67 a
C3: 100%	23.71 a	7.90 a
Interacciones	p=0.4785	p=0.4918
E1C0: Naranja inmadura + 0%	32.40 a	10.80 a
E1C1: Naranja inmadura + 50%	35.18 a	11.73 a
E1C2: Naranja inmadura + 75%	37.67 a	12.56 a
E1C3: Naranja inmadura + 100 %	18.42 a	6.14 a
E2C0: Naranja madura + 0%	33.77 a	11.26 a
E2C1: Naranja madura + 50%	36.00 a	12.00 a
E2C2: Naranja madura + 75%	38.33 a	12.78 a
E2C3: Naranja madura + 100%	29.00 a	9.67 a
Promedio	32.60	10.87
Coefficiente de variación (%)	18.54	16.84

Nota: Promedios con la misma letra en cada grupo de datos, no difieren estadísticamente según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Datos transformados con $\sqrt{x + 0.5}$

4.1.7. Inhibición del crecimiento micelial

Los promedios del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *L. theobromae* durante 72 horas de incubación, en respuesta a la aplicación de tres concentraciones de aceite

esencial obtenidos de dos estados de madurez de naranja se presentan en la Tabla 8. De acuerdo al análisis de varianza, los estados de madurez e interacciones, no alcanzaron el nivel de significancia estadística ($p>0.05$), mientras que las concentraciones presentaron alta significancia estadística en las tres evaluaciones realizadas ($p<0.01$). Los coeficientes de variación oscilaron entre 11.19 y 70.01%.

Los estados de madurez no presentaron diferencias significativas entre sí en ninguna de las tres evaluaciones (24, 48 y 72 horas), con valores de inhibición del crecimiento micelial similares en ambas condiciones, con E1: Naranja inmadura, se registraron promedios de 63.03, 48.60 y 16.11%, mientras que con E2: Naranja madura, éstos fueron de 58.96, 31.97 y 9.70%, respectivamente.

A las 24 horas de incubación, se registró mayor inhibición del crecimiento micelial con C3: 100%, con un 100.00% de inhibición, en ausencia de diferencias significativas respecto a C2: 75 % (89.95% de inhibición), y con marcadas diferencias significativas por encima de C1: 50 % (54.03%) y C0:0% (0.00 %). Para las 48 horas, se evidenció una tendencia similar, con mayor inhibición del crecimiento micelial en C3: 100% (83.96%), sin diferir estadísticamente de C2: 75 % (46.64%), y superando significativamente a C1: 50 % (30.55%) y C0: 0% (0.00%). Por su parte, en la evaluación realizada a las 72 horas incubación, C3: 100% (41.75 de inhibición del crecimiento micelial), presentó diferencias significativas respecto a las demás concentraciones que presentaron valores entre 0.00 y 5.44%, correspondiendo el menor promedio a C0:0%.

En lo correspondiente a las interacciones, a las 24 horas, E1C2: Naranja inmadura + 75%, E1C3: Naranja inmadura + 100 % y E2C3: Naranja madura + 100%, presentaron un 100.00% de inhibición del crecimiento micelial, en ausencia de diferencias significativas respecto de E2C2: Naranja madura + 75% (79.89%), y, superiores estadísticamente a las demás interacciones cuyos valores fluctuaron entre 0.00 y 55.95% de inhibición de crecimiento. Por otra parte, a las 48 horas, se registró mayor promedio en E1C3: Naranja inmadura + 100 % (91.55%), en ausencia de diferencias significativas con E2C1: Naranja madura + 50%, E1C1: Naranja inmadura + 50%, E1C2: Naranja inmadura + 75% y E2C3: Naranja madura + 100%, cuyos valores estuvieron entre 22.61 y 70.66%, y con diferencias significativas por encima de las demás interacciones que presentaron promedios entre 0.00 y 22.61%.

En la evaluación realizada a las 72 horas, E1C3: Naranja inmadura + 100 %, que registró mayor inhibición del crecimiento micelial, con 53.77%, no presentó diferencias significativas por encima de las demás interacciones (3.62 – 29.72%), a excepción de E1C0: Naranja inmadura + 0% y E2C0: Naranja madura + 0%, que se ubicaron significativamente por debajo, con un 0.00%, cada una.

Tabla 8.

Inhibición del crecimiento micelial de L. theobromae durante 72 horas de incubación en respuesta a la aplicación de tres concentraciones de aceite esencial obtenidos de dos estados de madurez de naranja.

Tratamientos	Inhibición del crecimiento micelial (%)		
	24 horas	48 horas	72 horas
Estado de madurez	p=0.4416	p=0.0503	p=0.6004
E1: Naranja inmadura	63.03 a	48.60 a	16.11 a
E2: Naranja madura	58.96 a	31.97 a	9.70 a
Concentraciones	p<0.0001	p<0.0001	p=0.0023
C0: 0 %	0.00 c	0.00 c	0.00 b
C1: 50 %	54.03 b	30.55 b	4.44 b
C2: 75 %	89.95 a	46.64 ab	5.44 b
C3: 100%	100.00 a	83.96 a	41.75 a
Interacciones	p=0.5186	p=0.1889	p=0.8171
E1C0: Naranja inmadura + 0%	0.00 c	0.00 c	0.00 b
E1C1: Naranja inmadura + 50%	52.11 b	32.20 ab	3.62 ab
E1C2: Naranja inmadura + 75%	100.00 a	70.66 ab	7.06 ab
E1C3: Naranja inmadura + 100 %	100.00 a	91.55 a	53.77 a
E2C0: Naranja madura + 0%	0.00 c	0.00 c	0.00 b
E2C1: Naranja madura + 50%	55.95 b	28.90 abc	5.26 ab
E2C2: Naranja madura + 75%	79.89 ab	22.61 bc	3.83 ab
E2C3: Naranja madura + 100%	100.00 a	76.37 ab	29.72 ab
Promedio	60.99	40.29	12.91
Coeficiente de variación (%)	11.19	31.2	70.01

Nota: Promedios con la misma letra en cada grupo de datos, no difieren estadísticamente según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Datos transformados con $\sqrt{x + 0.5}$

4.1.8. Análisis de correlación

4.1.8.1. Correlación entre el diámetro del hongo (mm) y el tiempo (días) para los diferentes tratamientos

En la Figura 5, se presentan los resultados del análisis de correlación entre el tiempo de evaluación y el diámetro del micelio de *L. theobromae* en función de los tratamientos evaluados. Los coeficientes de correlación están por encima de 0.93 en todos los casos, lo que indica que el crecimiento del hongo sigue un patrón predecible a lo largo de los tres días de evaluación.

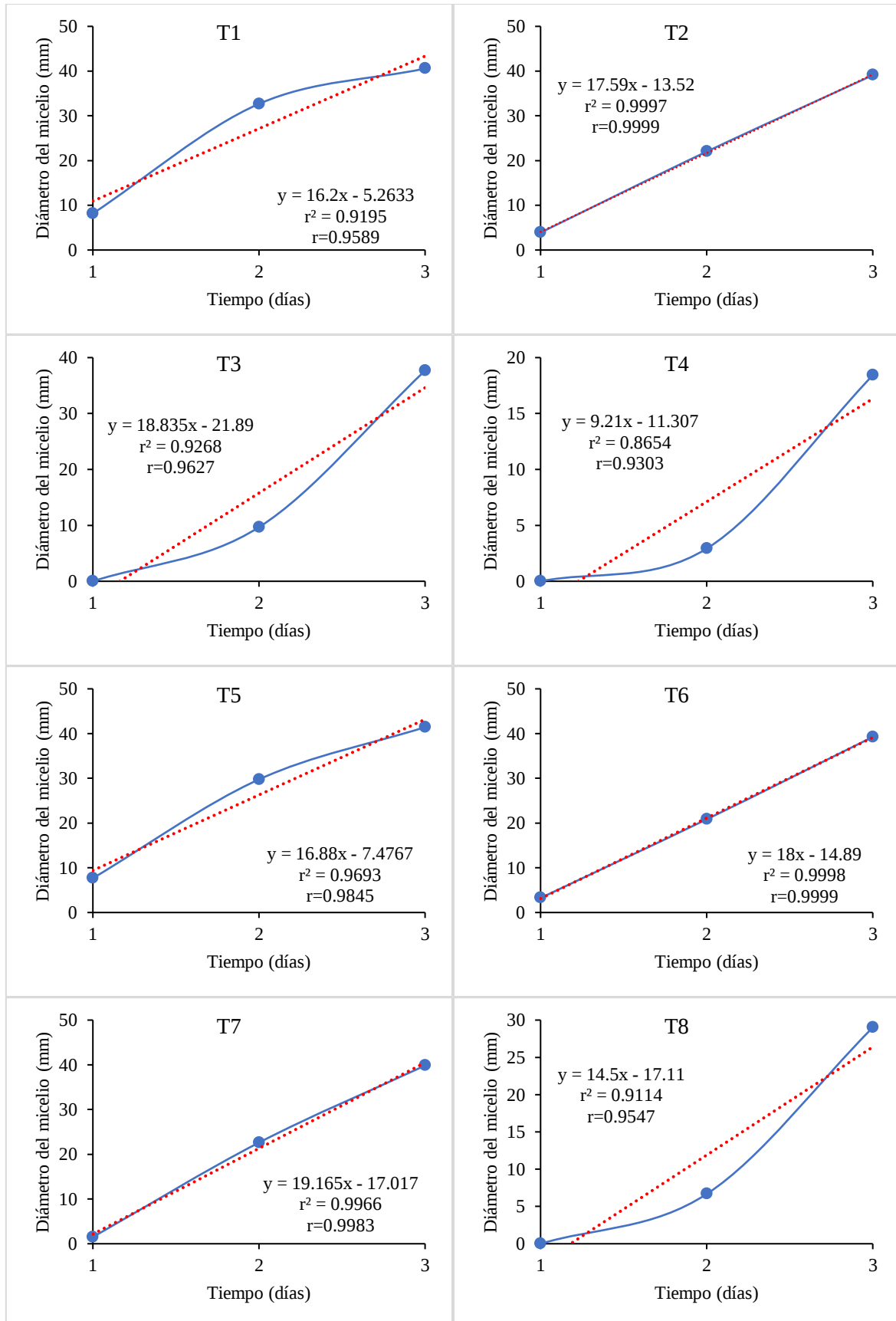
En particular, los tratamientos T2 (E1C1) y T6 (E2C1) presentan valores de correlación cercanos a 1 (0.9999), reflejando una asociación prácticamente perfecta entre las variables. Además, el coeficiente de determinación de estos tratamientos es de 0.9997 y 0.9998, respectivamente, lo que sugiere que casi la totalidad de la variabilidad en el diámetro del hongo se explica por el tiempo transcurrido.

Los tratamientos T5 (E2C0) y T7 (E2C2) también exhiben una relación muy alta con coeficientes de correlación de 0.9845 y 0.9983, respectivamente, y coeficientes de determinación superiores a 0.96. Esto indica un ajuste muy preciso del crecimiento del hongo con el tiempo.

Por otro lado, los tratamientos T4 (E1C3) y T8 (E2C3) presentan los valores más bajos de correlación (0.9303 y 0.9547, respectivamente), aunque siguen siendo altos. En estos casos, el coeficiente de determinación también es menor en comparación con los otros tratamientos, lo que sugiere una ligera dispersión de los datos en relación con la tendencia general.

Figura 5.

Análisis de correlación entre el tiempo de evaluación y el diámetro del micelio de L. theobromae en función de los tratamientos evaluados



4.1.8.2. Correlación entre las concentraciones de aceite esencial y parámetros de crecimiento del hongo

Los resultados del análisis de correlación presentados en la Tabla 9, muestran que existe una relación negativa fuerte entre las concentraciones de aceite esencial y el diámetro del micelio en las primeras 24 horas ($r = -0.9571$), lo que indica que a medida que aumenta la concentración de aceite esencial, el crecimiento del micelio disminuye. Esta correlación disminuye a las 48 horas ($r = -0.8415$) y sigue reduciéndose a las 72 horas ($r = -0.5453$), aunque la relación sigue siendo negativa, sugiriendo que el efecto inhibidor disminuye con el tiempo.

En cuanto a la tasa de crecimiento, se observa una correlación positiva en las primeras 24 horas ($r = 0.9563$), lo que implica que mayores concentraciones de aceite esencial favorecen la tasa de crecimiento del micelio en este intervalo, aunque esta relación se debilita a las 48 horas ($r = 0.8071$) y a las 72 horas ($r = 0.5349$). Finalmente, en cuanto a la inhibición del crecimiento micelial, la correlación con las concentraciones de aceite esencial es más débil en las primeras 24 horas ($r = -0.2577$), pero se incrementa notablemente a las 48 horas ($r = -0.9563$), y se mantiene fuerte a las 72 horas ($r = -0.5349$), sugiriendo que el aceite esencial tiene un efecto inhibidor creciente a medida que pasa el tiempo.

Tabla 9.

Resultados del análisis de correlación entre las concentraciones de aceite esencial y parámetros de crecimiento micelial de L. theobromae

Coeficientes	Diámetro del micelio			Tasa crec.	Inhibición de crecimiento micelial		
	24 h	48 h	72 h		24 h	48 h	72 h
r^2	0.9161	0.7081	0.2974	0.0664	0.9145	0.6514	0.2861
r	-0.9571	-0.8415	-0.5453	-0.2577	0.9563	0.8071	0.5349

4.2. Discusión

En la muestra correspondiente a la cáscara inmadura (CIM), el d-limoneno fue, como es común en los cítricos, el componente mayoritario con un 79.7 % del total. Este resultado es coherente con lo reportado por El Hachlafi *et al.* (2024), quienes destacan al limoneno como el constituyente principal del aceite esencial de *Citrus sinensis*, con valores alrededor del 70–90 %, dependiendo del origen y el método de extracción empleado. Sin embargo, la muestra madura (CM) mostró una marcada disminución de este compuesto, con apenas un 38.6 %, lo que sugiere que durante la maduración y el proceso de extracción se han generado modificaciones estructurales, muy probablemente debidas a la oxidación térmica inducida por la hidrodestilación.

Esta disminución del limoneno fue acompañada por un aumento significativo de compuestos oxigenados, particularmente linalool (29.3 %), seguido de α -terpineol (4.5 %), geraniol (1.38 %), y aldehídos como geranial, neral y decanal. Cabe destacar que el linalool rara vez excede el 5 % en aceites esenciales de naranja obtenidos por otros métodos como la expresión en frío (El Hachlafi *et al.*, 2024; Njoroge *et al.*, 2005), lo que evidencia que la hidrodestilación, al someter a la muestra a temperaturas elevadas y en presencia de agua, promueve reacciones como la hidrólisis de precursores no volátiles (glucósidos terpénicos) o incluso la oxidación parcial del limoneno, dando lugar a alcoholes y aldehídos funcionalmente activos.

Esta observación es consistente con lo reportado por Geraci *et al.* (2021), quienes también observaron mayores proporciones de compuestos oxigenados en aceites de naranja dulce extraídos por hidrodestilación en comparación con otros métodos. Estos compuestos oxigenados no solo modifican el perfil organoléptico del aceite, haciéndolo más floral y menos cítrico, sino que también tienen importantes implicaciones funcionales. Por ejemplo, el linalool, α -terpineol y el citral (geranial + neral) son reconocidos por su potencial antimicrobiano, calmante y antiinflamatorio.

Por otro lado, la aparición de sesquiterpenos en la muestra madura, aunque en concentraciones bajas, podría estar relacionada tanto con la reducción relativa del limoneno (lo que permite que estos compuestos de mayor peso molecular sean detectados más claramente en el cromatograma) como con la activación de rutas biosintéticas secundarias durante la maduración avanzada del fruto. Esta tendencia también fue discutida en el estudio

de Njoroge *et al.* (2005), donde se encontró que algunas variedades y etapas fenológicas permiten la presencia de trazas sesquiterpénicas que suelen pasar desapercibidas en muestras con contenido masivo de limoneno.

El perfil composicional más complejo del aceite de la cáscara madura también permite suponer un mayor potencial bioactivo, como lo señalan diversos autores. En especial, El Hachlafi *et al.* (2024) demostraron que el aceite esencial rico en limoneno, acompañado de compuestos oxigenados como el linalool, exhibe potentes propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, al reducir significativamente los niveles de mediadores inflamatorios como NO y PGE₂ en células RAW 264.7. Sin embargo, también es importante considerar que este tipo de aceites, al tener una fracción oxigenada más elevada, pueden presentar mayor susceptibilidad a la oxidación durante el almacenamiento, lo que implica la necesidad de condiciones controladas para preservar sus propiedades funcionales.

Las diferencias en la composición de los compuestos volátiles entre las cáscaras inmadura y madura pueden explicarse por los cambios bioquímicos que ocurren durante la maduración de la fruta. De acuerdo con Sánchez *et al.* (2019), durante este proceso, las enzimas y los metabolitos vegetales experimentan transformaciones que modifican los perfiles de aceites esenciales, lo que influye en las propiedades sensoriales de la cáscara. El aumento de linalool en la cáscara madura puede estar relacionado con una mayor expresión de terpenos que generan aromas más suaves y florales, un cambio que se ha observado en estudios de frutas en maduración (González *et al.*, 2018). En contraste, el limoneno en la cáscara inmadura, de acuerdo con González *et al.* (2018), podría tener un papel en la protección contra plagas, dado su carácter antimicrobiano y su mayor concentración en etapas tempranas de la maduración.

Los resultados indican que la cáscara de naranja inmadura es más rica en aceite esencial que la de naranja madura, lo que puede explicarse por diferencias en la composición química y en la cantidad de compuestos volátiles presentes en el fruto en distintas etapas de madurez. Según Bunse *et al.* (2022), en frutas inmaduras, los aceites esenciales suelen estar más concentrados debido a la mayor actividad metabólica y la presencia de precursores de compuestos volátiles. Por otro lado, cuando el fruto maduro, parte de estos compuestos se transforman o se volatilizan, reduciendo la cantidad de aceite esencial disponible (Córdova, Guillén, & Tuesta, 2020).

Este fenómeno ha sido reportado en diversos estudios sobre la extracción de aceites esenciales de cítricos, que señalan que la recolección en fases de madurez temprana maximiza la cantidad de aceite obtenido (Herrera-Plasencia *et al.*, 2019; Ogunjinmi *et al.*, 2019; Singh *et al.*, 2021). González & Véliz (2020), evidenciaron una mayor producción de aceite esencial de mango en frutos pintones en comparación con frutos maduros, con valores de 0.427 y 0.303% de aceite esencial en 200 g de cáscara de mango, respectivamente. Esto se debe porque durante el proceso de maduración se va desarrollando su olor característico el cual da lugar a la emisión de volátiles, que van aumentando hasta llegar a su madurez organoléptica (Distefano *et al.*, 2022).

La ausencia de diferencias significativas en el diámetro del micelio entre los estados de madurez de la naranja sugiere que la composición química del aceite esencial es similar en ambas etapas en términos de compuestos antifúngicos efectivos. Investigaciones previas, como las de Gómez *et al.* (2018), han señalado que los aceites esenciales de cítricos presentan variaciones en su perfil químico durante la maduración, pero la actividad antifúngica puede mantenerse estable si los principales compuestos bioactivos, como los monoterpenos y fenilpropanoides, están presentes en concentraciones suficientes en ambos estados.

Las diferencias significativas entre las concentraciones evaluadas confirman que la efectividad del aceite esencial está directamente relacionada con su concentración. Resultados similares han sido reportados por Pérez *et al.* (2020), quienes evidenciaron que la inhibición del crecimiento micelial de hongos fitopatógenos aumenta con la concentración de aceites esenciales ricos en limoneno y linalool. La disminución progresiva del diámetro del micelio a medida que la concentración de aceite aumenta sugiere un mecanismo de acción dosis-dependiente, en el que los compuestos antifúngicos afectan la permeabilidad de la membrana celular del hongo y su metabolismo primario.

En cuanto a las interacciones, la mayor inhibición del crecimiento micelial en concentraciones elevadas del aceite esencial, independientemente del estado de madurez, coincide con los hallazgos de Rodríguez *et al.* (2019), quienes observaron que los efectos antifúngicos se maximizan cuando la exposición a los compuestos activos es prolongada. La falta de diferencias significativas en la última evaluación sugiere una adaptación del hongo a los compuestos o una disminución en la eficacia del aceite con el tiempo.

El crecimiento micelial y la tasa de crecimiento de *L. theobromae* no mostraron diferencias significativas entre los estados de madurez de la naranja, lo que sugiere que la composición química del aceite esencial en estos estadios no influyó en el desarrollo del hongo. Investigaciones previas, como las de Rodríguez *et al.* (2020), han señalado que la variabilidad en la composición de los aceites esenciales puede afectar la actividad antifúngica, pero en este caso, la similitud en los promedios indica que los compuestos activos presentes en ambos estados de madurez no ejercieron un efecto diferencial sobre el micelio.

En cuanto a las concentraciones evaluadas, aunque se observó una tendencia a la reducción del crecimiento micelial y la tasa de crecimiento con el aumento de la concentración del aceite esencial, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Algunos estudios, como los de Gómez *et al.* (2019), han reportado que los aceites esenciales pueden generar efectos fungistáticos a concentraciones bajas y fungicidas a concentraciones altas, sin embargo, la ausencia de significancia en este caso podría estar relacionada con la tolerancia del hongo a los compuestos activos o con la volatilización del aceite durante la incubación.

Las interacciones entre los estados de madurez y las concentraciones no presentaron diferencias significativas, lo que respalda la idea de que la combinación de estos factores no alteró el comportamiento del micelio. Investigaciones como las de Pérez y Morales (2021) han señalado que la efectividad de los aceites esenciales puede depender de su sinergia con otros compuestos bioactivos, lo que podría explicar la variabilidad observada en los resultados.

Los estados de madurez no influyeron significativamente en la inhibición del crecimiento micelial en ninguna de las evaluaciones, lo que sugiere que la composición química del aceite esencial no varió lo suficiente entre los dos estados para generar diferencias marcadas. Investigaciones previas han señalado que la madurez de los frutos puede modificar la concentración de compuestos bioactivos, pero en este caso, la presencia de metabolitos secundarios con efecto antifúngico parece mantenerse estable en ambos estados (Santos *et al.*, 2020). Sin embargo, la ligera mayor inhibición observada en la naranja inmadura podría atribuirse a una mayor concentración de limoneno y otros terpenos en frutos inmaduros, como lo reporta Pino *et al.* (2018).

Las concentraciones de aceite esencial presentaron diferencias estadísticamente significativas, con un efecto inhibitorio claro a medida que se incrementaba la dosis. Este comportamiento es consistente con estudios que destacan la actividad antifúngica de los aceites esenciales en función de su concentración (Martínez *et al.*, 2021). La menor eficacia a las 72 horas podría deberse a la volatilización de compuestos activos o la capacidad adaptativa del hongo frente a la exposición prolongada, como lo sugieren García y Rodríguez (2019).

Las interacciones mostraron que el mayor efecto inhibitorio se produjo con la combinación de naranja inmadura y la concentración más alta, lo que refuerza la hipótesis de que los aceites esenciales de frutos en maduración temprana poseen mayor actividad biológica. Sin embargo, la ausencia de diferencias significativas entre ciertas combinaciones refleja la complejidad de la interacción entre los compuestos activos y el hongo, como lo mencionan Torres *et al.* (2022).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

La variación en la composición de compuestos volátiles y el rendimiento del aceite esencial entre las cáscaras inmadura y madura, donde la cáscara inmadura presenta mayores concentraciones de limoneno y un mayor rendimiento de aceite esencial (2.21 mL frente a 1.81 mL en la cáscara madura), evidencia cómo el estado de madurez impacta tanto las propiedades sensoriales como las funcionales de las cáscaras de naranja.

La concentración del 100 % del aceite esencial inhibió completamente el crecimiento micelial de *Lasiodiplodia theobromae* a las 24 horas, mientras que a las 48 y 72 horas la inhibición fue mayor en la naranja inmadura (91.55 % y 53.77 %) que en la madura (76.37 % y 29.72 %).

El crecimiento micelial de *Lasiodiplodia theobromae* se redujo considerablemente en las primeras 24 horas con la aplicación del aceite esencial, mientras que su efecto inhibidor disminuyó progresivamente a las 48 y 72 horas en ambos estados de madurez, evidenciando una mayor eficacia en las primeras horas de exposición.

5.2. Recomendaciones

Evaluar métodos que maximicen el rendimiento del aceite esencial en la cáscara de naranja inmadura, lo que permitirá obtener una mayor cantidad del compuesto y mejorar su aplicación en estudios posteriores sobre sus propiedades antifúngicas.

Analizar el efecto inhibitor de concentraciones inferiores al 100 % del aceite esencial para determinar la dosis mínima efectiva contra *L. theobromae*, reduciendo costos y evitando un uso excesivo del extracto sin comprometer su capacidad antifúngica en condiciones de laboratorio.

Realizar estudios con tiempos de observación superiores a 72 horas para determinar si la actividad antifúngica del aceite esencial se mantiene, disminuye progresivamente o pierde efectividad a largo plazo, lo que permitirá establecer su viabilidad en aplicaciones prácticas.

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFÍA

6.1. Bibliografía

- Agarwal, P., Sebghatollahi, Z., Kamal, M., Dhyani, A., Shrivastava, A., Singh, K., . . . Baek, K. (2022). Citrus essential oils in aromatherapy: Therapeutic effects and mechanisms. *Antioxidants* 11(12), e2374.
- Alves, S., Setzer, W., & Da Silva, K. (2019). The chemistry and biological activities of *Peperomia pellucida* (Piperaceae): A critical review. *Journal of Ethnopharmacology*, 232, 90-102.
- Arce-Araya, C., Varela-Benavides, I., & Torres-Portuguez, S. (2019). Inhibición del crecimiento micelial de hongos asociados a antracnosis en ñame (*Dioscorea alata*). *Agronomía Mesoamericana*, 30(2), 381-393.
- Babarinde, S., Kemabonta, K., Olatunde, O., Ojutiku, E., & Adeniyi, A. (2021). Composition and toxicity of rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.) rind essential oil against red flour beetle. *Acta Ecologica Sinica* 41(4), 325-331.
- Bautista-Cruz, M., Almaguer-Vargas, G., Leyva-Mir, S., Colinas-León, M., Correia, K., Camacho-Tapia, M., . . . Tovar-Pedraza, J. (2019). Phylogeny, distribution, and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with cankers and dieback symptoms of Persian lime in Mexico. *Plant Disease*, 103, 1156-1165.
- Berraf-Tebbal, A., Mahamedi, A., Aigoun-Mouhous, W., Špetík, M., Čechová, J., Pokluda, R., . . . Alves, A. (2020). *Lasiodiplodia mitidjana* sp. nov. and other Botryosphaeriaceae species causing branch canker and dieback of *Citrus sinensis* in Algeria. *PloS ONE*, 15, e0232448.
- Briones, H., & Guerrero, D. (2019). Extracción de aceites esenciales de mandarina (*Citrus reticulata*) y palo santo (*Bursera graveolens*) por el método de arrastre de vapor. *Científica INGENIAR: Ingeniería, Tecnología e Investigación*, 2(3), 14-23.
- Bunse, M., Daniels, R., Gründemann, C., Heilmann, J., Kammerer, D., Keusgen, M., . . . Wink, M. (2022). Essential oils as multicomponent mixtures and their potential for human health and well-being. *Frontiers in Pharmacology*, 13, e956541.
- Cedeño-Cevallos, J., Navarrete-Alcívar, M., Sánchez-Mendoza, V., & Moreira-Mendoza, C. (2023). Eficacia en la extracción de aceite a partir de especies vegetales. *Revista Colón Ciencias, Tecnología y Negocios*, 10(2), 1-16.
- Chaverri, C., Morales, C., & Cicció, J. (2022). Aceites esenciales, fenología e interacciones bióticas de la planta invasora *Crassocephalum crepidioides* (Asteraceae) en Costa Rica. *Cuadernos de Investigación UNED*, 14(2), 19-43.

- Cid-Samamed, A., Rakmai, J., Mejuto, J., Simal-Gandara, J., & Astray, G. (2022). Cyclodextrins inclusion complex: Preparation methods, analytical techniques and food industry applications. *Food Chemistry*, 384, e132467.
- Córdova, C., Guillén, J., & Tuesta, T. (2020). Extracción por microondas libre de solvente del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis*), y el efecto de las condiciones de proceso en su rendimiento, composición y actividad antimicrobiana. *Revista Chilena de Nutrición*, 47(6), 965-974.
- Dehghan, B., Esmaeilzadeh, R., & Raftani, Z. (2020). Nanoencapsulation of orange peel essential oil in native gums (*Lepidium sativum* and *Lepidium perfoliatum*): Improving oxidative stability of soybean oil. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(11), e14889.
- Distefano, M., Mauro, R., Page, D., Giuffrida, F., Bertin, N., & Leonardi, C. (2022). Aroma volatiles in tomato fruits: The role of genetic, preharvest and postharvest factors. *Agronomy*, 12(2), e376.
- Dong, W., Doilom, M., Hyde, K., Phillips, A., Yan, K., & To-anun, C. (2020). Pathogenicity of five Botryosphaeriaceae species isolated from *Tectona grandis* (teak): the pathogenic potential of *Lasiodiplodia* species. *Asian Journal of Mycology*, 3, 399-407.
- Durán-Aguirre, C., Pratissoli, D., Carvalho, J., Pacheco, A., Araujo, L., & Bolsoni, H. (2020). Actividad insecticida de aceites esenciales sobre *Helicoverpa armígera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Idesia (Arica)*, 38(4), 59-64.
- Durmus, M., Ozogul, Y., Ozyurt, G., Úcar, Y., Riza, A., Yazgan, H., . . . Özogul, F. (2023). Effects of citrus essential oils on the oxidative stability of microencapsulated fish oil by spray-drying. *Frontiers in Nutrition*, 9, e978130.
- El Hachlafi, N., Elbouzidi, A., Batbat, A., Taibi, M., Jeddi, M., Addi, M., ... & Fikri-Benbrahim, K. (2024). Chemical composition and assessment of the anti-inflammatory, antioxidant, cytotoxic and skin enzyme inhibitory activities of *Citrus sinensis* Osbeck essential oil and its major compound limonene. *Pharmaceuticals*, 17(1652), e32
- Farahmandfar, R., Tirgarian, B., Dehghan, B., & Nemati, A. (2019). Comparison of different drying methods on bitter orange (*Citrus aurantium* L.) peel waste: Changes in physical (density and color) and essential oil (yield, composition, antioxidant and antibacterial) properties of powders. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(7), 862-875.

- García-Gallirgos, V. (2021). Evaluación de la viabilidad de bio formulaciones a base de PGPRs y sus efectos en plantaciones de Theobroma cacao L. CCN51. *Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Quevedo - Ecuador*. 89 p.
- García-Mateos, M., Corrales-García, J., Cornejo-Vivar, T., & Hernández-Ramos, L. (2023). Recubrimiento biodegradable antifúngico a base de quitosano y aceite esencial de cítricos para la conservación de papaya (*Carica papaya* L.) en poscosecha. *CienciaUAT*, 17(2), 165-180.
- Geraci, A., Di Stefano, V., Di Martino, E., Schillaci, D., & Ruberto, G. (2021). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from peel, leaf and flower of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. *Natural Product Research*, 35(4), 595–599
- González, A., Carpena, M., García, P., Mejuto, J., Prieto, M., & Simal, J. (2021). Main applications of cyclodextrins in the food industry as the compounds of choice to form host-guest complexes. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), e1339.
- González, Y., & Véliz, M. (2020). Extracción y caracterización del aceite esencial de mango obtenido de residuos agroindustriales. *Tecnología Química*, 40(3), 488-501.
- Herrera-Plasencia, P., Garcia-Rupaya, C., & Delgado-Cotrino, L. (2019). Eficacia disolvente y citotoxicidad del aceite de cáscara de limón (*Citrus limon*). *Revista Estomatológica Herediana*, 29(3), 196-202.
- Huaman-López, M., Villanueva-Quejia, E., & Nolasco-Cama, D. (2024). Encapsulación por inclusión molecular del aceite esencial de naranja: Efecto del método de secado en las características físicas, químicas, estructurales y estabilidad. *Scientia Agropecuaria*, 15(1), 33-43.
- Huaman-Pilco, J., Huaman-Pilco, Á., Hernández-Díaz, E., Oliva-Cruz, S., & Díaz-Valderrama, J. (2024). Dieback and pod rot caused by *Lasiodiplodia theobromae* and *L. iraniensis* in native accessions of cacao (*Theobroma cacao*) from Amazonas, Peru. *Indian Phytopathology*, 77(3), 693-703.
- Lamine, M., Rahali, F., Hammami, M., & Mliki, A. (2019). Correlative metabolite profiling approach to understand antioxidant and antimicrobial activities from citrus essential oils. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(8), 2615–2623.
- Laura-Ticona, J., Chambi-Rodríguez, A., & Coaquira-Quispe, J. (2024). Efecto antimicrobiano *in vitro* de aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus labill*) y muña (*Minthostachys mollis*). *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 26(1), 36-45.
- Li, D., Wu, H., Huang, W., Guo, L., & Dou, H. (2018). Microcapsule of sweet orange essential oil encapsulated in beta-cyclodextrin Improves the release behaviors in

- vitro* and *in vivo*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 120(9), e1700521.
- Martínez-López, E. (2018). Extractos vegetales para el manejo de plagas y enfermedades en jitomate (*Solanum lycopersicum*) y fresa (*Fragaria ananassa* Duch.). *Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes - México*. 140 p.
- Mendoza, G., & Ordinola, A. (2022). El extracto de *Mentha piperita* incrementa la supervivencia del camarón *Litopenaeus vannamei* infectado experimentalmente con *Vibrio* spp. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 33(3), e21178.
- Mitropoulou, G., Sidira, M., Skitsa, M., Tsochantaridis, I., Pappa, A., Dimtsoudis, C., . . . Kourkoutas, Y. (2020). Assessment of the antimicrobial, antioxidant, and antiproliferative potential of *Sideritis raeseri* subsp. *raeseri* essential oil. *Foods*, 9(7), e860.
- Montalván, M., Malagón, O., Cumbicus, N., Tanitana, F., & Gilardoni, G. (2023). Análisis químico de aceites esenciales amazónicos de una comunidad Shuar ecuatoriana. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida*, 38(2), 33-45.
- Moreira-Morrillo, A., Cedeño-Moreira, Á., Canchignia-Martínez, F., & Garcés-Fiallos, F. (2021). *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maul [(sin.) *Botryodiplodia theobromae* Pat] en el cultivo de cacao: síntomas, ciclo biológico y estrategias de manejo. *Scientia Agropecuaria*, 12(4), 653-662.
- Njoroge, S. M., Koaze, H., Karanja, P. N., & Sawamura, M. (2005). Essential oil composition and aroma quality of three cultivars of Kenyan sweet oranges (*Citrus sinensis* Osbeck). *Flavour and Fragrance Journal*, 20(1), 80–85
- Ogunjinmi, O., Olawore, N., & Maharaj, V. (2019). Chemical Examination of Essential Oil from Stem, Roots and Fruit Peels of Nigerian *Citrus jambhiri*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 22(6), 1614-1621.
- Oliveira-Da Silva, F., Terumi-Itako, A., & Tolentino-Júnior, J. (2017). Mycelial growth assessment by digital image analysis in R software environment. *Idesia (Arica)*, 35(1), 7-10.
- Ramos-Cruz, C., Pérez-Evangelista, E., Martínez-Medina, J., Acosta-Díaz, E., & Almeyda-León, I. (2023). Calidad de frutos de cultivares de naranja temprana en Nuevo León. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 14(1), 75-84.
- Roggero-Luque, J., Rugolo, M., & Barroetaveña, C. (2022). Evaluación de residuos lignocelulósicos de la Patagonia argentina para el cultivo del hongo comestible *Lentinula edodes* (Basidiomycota). *Bonplandia*, 31(2), 115-128.

- Salvatore, M., Nicoletti, R., & Andolfi, A. (2022). Essential oils in citrus fruit ripening and postharvest quality. *Horticulturae*, 2022; 8(5): e396.
- Samandari, N., Taheri, P., & Tarighi, S. (2024). Antifungal and antivirulence effects of *Citrus sinensis* essential oil on *Alternaria* pathogens in orange. *Journal of Plant Pathology*, 106, 1153-1171.
- Samithri, Y. A. S., Karunanayake, K. O. L. C., & Kulasinghe, A. A. (2020). *In vitro* study of selected essential oils against *Colletotrichum* sp. and *Lasiodiplodia* sp. causing postharvest diseases in papaya. *Ceylon Journal of Science*, 49(Special Issue), 389–396.
- Sathya, K., Parthasarathy, S., Thiribhuvanamala, G., & Prabakar, K. (2017). Morphological and molecular variability of *Lasiodiplodia theobromae* causing stem end rot of mango Tamil Nadu, India. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 5(6), 1024-1031.
- Savic, I., Savic, I., Milovanovic, M., Zerajic, S., & Gajic, D. (2022). Optimization of ultrasound-assisted extraction and encapsulation of antioxidants from orange peels in alginate-chitosan microparticles. *Antioxidants*, 11(2), e297.
- Segura, S., Rodríguez, M., & Chico, J. (2015). Actividad antifúngica del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* sobre el crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae* en condiciones de laboratorio. *REBIOL* 35(2):47-52.
- Serrato-Díaz, L., Mariño, Y., Guadalupe, I., Bayman, P., & Goenaga, R. (2020). First report of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* and *Colletotrichum siamense* causing cacao pod rot, and first report of *C. tropicale* causing cacao pod rot in Puerto Rico. *Plant Disease*, 104(2), e592.
- Shapiro, S., & Wilk, M. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52(3): 591-611.
- Singh, B., Singh, J., Kaur, A., & Yadav, M. (2021). Insights into the chemical composition and bioactivities of citrus peel essential oils. *Food Research International*, 143, e110231.
- Soledad, M., & Guerrero, A. (2022). Efecto antifúngico del extracto acuoso de *Plantago major* L. “llantén” (Plantaginaceae) en *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl. *Arnaldoa*, 29(3), 401-414.
- Stegmayer, M., Fernández, L., Álvarez, N., Olivella, L., Gutiérrez, H., Favaro, M., & Derita, M. (2021). Aceites esenciales provenientes de plantas nativas para el control de

- hongos fitopatógenos que afectan a frutales. *Fave, Sección Ciencias Agrarias*, 20(1), 317-329.
- Sudha, A., Kavitha, P., Senthilkumar, M., & Rajesh, M. (2019). Effective approach to identify a potential phyto extract on *Lasiodiplodia theobromae* in coconut. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, SP2, 880-883.
- Taípe-Pardo, F., Huaraca-Aparco, R., Merino-Quispe, I., Flores-Pacheco, N., Agreda-Cerna, H., & Quispe-Chipana, S. (2023). Compuestos bioactivos y actividad antioxidante de aceites esenciales en hojas de plantas medicinales. *Alfa Revista de Investigación en Ciencias Agronómicas y Veterinaria*, 7(21), 547-559.
- Trejo, V. (2015). Extracción de aceite esencial de eucalipto y su aplicación como agente antifúngico en un envase activo para conservación de frambuesa. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 16, 228-233.
- Troncozo-Correa, J. (2023). Evaluación de un compuesto bioactivo altamente diluido para el control de *Lasiodiplodia theobromae* en plántulas de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Quevedo - Ecuador*. 97 p.
- Urrunaga-Ormachea, M., Del Carpio-Jiménez, C., Gutierrez-Chaveza, R., & Tomaylla-Cruz, C. (2022). Propiedades fisicoquímicas, composición química y actividad antioxidante del aceite esencial de *Citrus jambhiri* (Limón rugoso). *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 88(3), 277-288.
- Valle-de la Paz, M., Guillén-Sánchez, D., Gijón-Hernández, A., Alía-Tejacal, I., & López-Martínez, V. (2019). Species of *Lasiodiplodia* in lima 'Persa' (*Citrus latifolia* Tanaka) in Morelos, México. *Revista Bio Ciencias*, 6, 595.
- Velarde-Negrete, J., Escobar-Hinojosa, M., Moya-Pucho, V., Espinoza-Antezana, M., Veizaga-Orellana, D., & Balderrama-Canaza, K. (2024). Actividad antibacteriana *in vitro* del extracto y aceite esencial de hojas de Muña. *Gaceta Médica Boliviana*, 47(1), 14-19.
- Yang, Y., Di Zeng, G., Zhang, Y., Xue, R., & Hu, Y. (2019). Molecular and biochemical characterization of carbendazim-resistant *Botryodiplodia theobromae* field isolates. *Plant Disease*, 103(8), 2076-2082.
- Yang, Y., Dong, G., Wang, M., Xian, X., Wang, J., & Liang, X. (2021). Multifungicide resistance profiles and biocontrol in *Lasiodiplodia theobromae* from mango fields. *Crop Protection*, 145, e105611.

Zhu, J., Yan, J., Wu, G., & Jiang, J. (2020). Comparative antioxidant, anticancer and antimicrobial activities of essential oils from Semen Platycladi by different extraction methods. *Industrial Crops and Products*, 146, e112206.

CAPÍTULO VII

ANEXOS

Anexo 1. Reporte de laboratorio del análisis de cromatografía realizado al aceite esencial obtenido



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
LABORATORIO DE CROMATOGRAFÍA

PROFORMA: LAB-QA-2025-003

ENTREGA DE RESULTADOS	
FECHA	16 de abril del 2025
ENSAYO REALIZADO	Análisis en GC/MS
MUESTRAS	Aceite esencial CM y CV
EQUIPO	GC THERMO SCIENTIFIC-TRACE 1300
DETECTOR	ESPECTRÓMETRO DE MASAS SIMPLE CUADRUPOLO ISQ 7000 Condiciones de operación: Energía de ionización: 70 eV; tasa de escaneo: 0.2 scan/s; rango de masas: 40-400 amu; Temperatura de trampa: 230°C; Temperatura de línea de transferencia: 230°C; tiempo de espera de encendido del detector: 3.00 min.
COLUMNA	TR-5MS; Medidas: 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor/Columna apolar
MÉTODO CROMATOGRÁFICO	Temperatura del inyector: 230°C; Modo de inyección: Split, Split 100, volumen de inyección: 1 µl; Programa térmico: Temperatura del horno 50°C durante 3 minutos, con una rampa de temperatura de 3°C/min hasta 230°C durante 3 minutos. Tiempo total de corrida: 66 minutos.
OBSERVACIONES:	Se realizó análisis cualitativo y semicuantitativo

ANÁLISIS SEMICUANTITATIVO DE ACEITES ESENCIALES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

CURVA DE HIDROCARBUROS:

Se inyectó una mezcla de alcanos (C9-C22) para la determinación de los índices de retención:

TR (min)	IRL	ECUACIÓN
6,634	900	$y = 24,606x + 736,76$
10,698	1000	$y = 21,51x + 769,89$
15,347	1100	$y = 21,075x + 776,56$
20,092	1200	$y = 21,734x + 763,31$
24,693	1300	$y = 22,738x + 738,54$
29,091	1400	$y = 23,964x + 702,88$
33,264	1500	$y = 25,278x + 659,15$
37,220	1600	$y = 26,66x + 607,73$
40,971	1700	$y = 28,082x + 549,45$
44,532	1800	$y = 29,429x + 489,46$
47,930	1900	$y = 30,921x + 417,93$
51,164	2000	$y = 32,383x + 343,13$
54,252	2100	$y = 33,829x + 264,68$
57,208	2200	$y = 35,298x + 180,66$
60,041	2300	

TR: Tiempo de retención; IRL: Índice de retención lineal

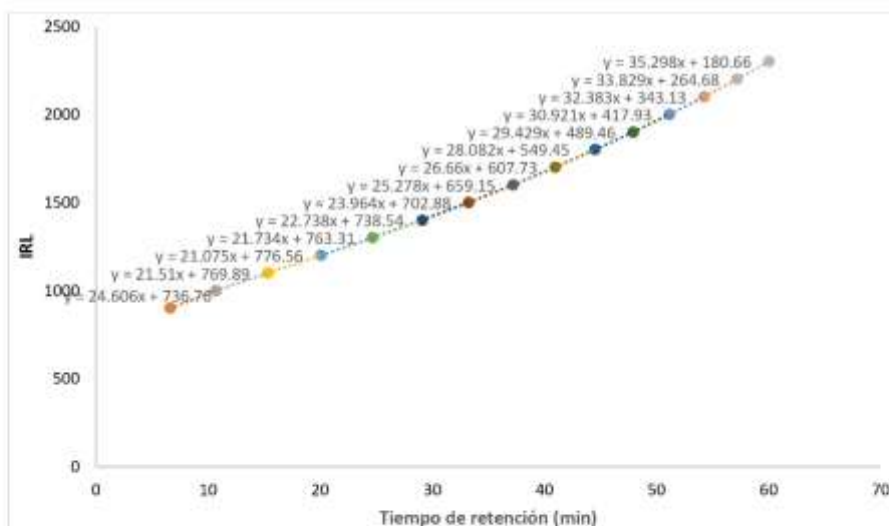


Figura 1. Curva de hidrocarburos.

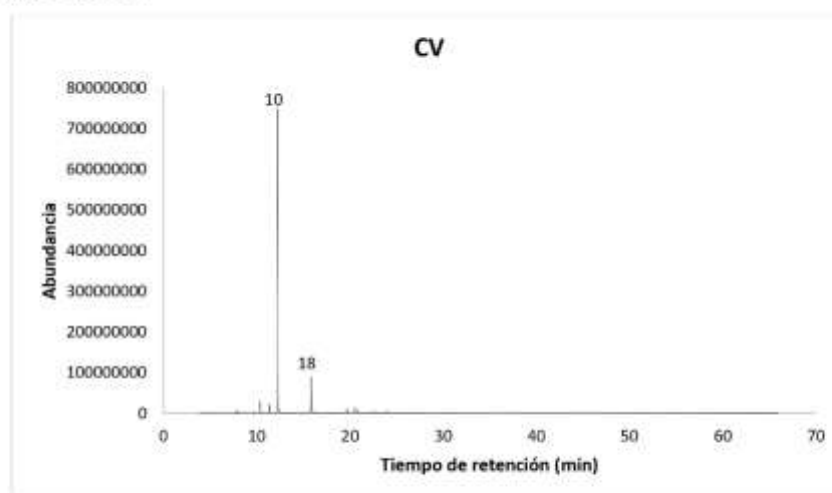
RESULTADOS:

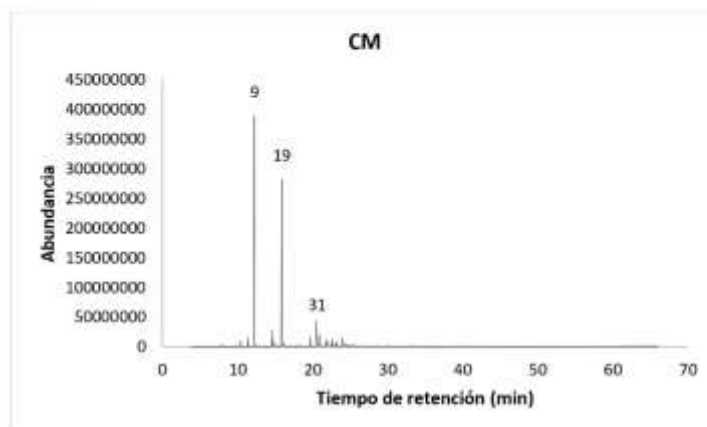
MUESTRA CV								
N°	TR (min)	IRC	IR Literatura ^a	COMPUESTO	%	%	PROMEDIO %	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
1	7,70	926	924	Thujene <α->	0,03	0,03	0,03	0,01
2	7,99	933	932	Pinene <α->	0,51	0,51	0,51	0,01
3	8,69	951	946	Camphene	0,04	0,04	0,04	0,01
4	9,68	975	969	Sabinene	0,28	0,28	0,28	0,01
5	9,88	980	974	Pinene <β->	0,07	0,07	0,07	0,01
6	10,41	993	988	Myrcene	2,16	2,19	2,18	0,02
7	11,21	1011	1002	Phellandrene <α->	0,07	0,08	0,07	0,01
8	11,36	1014	998	Octanal <n->	2,00	1,99	2,00	0,01
9	11,66	1021	1007	Sylvestrene <iso->	0,14	0,14	0,14	0,01
10	12,29	1034	1024	Limonene	79,67	79,81	79,74	0,07
11	12,36	1036	1025	Sylvestrene	0,46	0,42	0,44	0,02
12	12,45	1038	1026	Cineole <1,8->	0,25	0,19	0,22	0,03
13	12,60	1041	1032	Ocimene <(Z)-β->	0,10	0,03	0,07	0,03
14	13,09	1051	1044	Ocimene <(E)-β->	0,05	0,05	0,05	0,01
15	13,63	1063	1054	Terpinene <γ->	0,16	0,16	0,16	0,01
16	14,69	1086	1063	Octanol <n->	0,22	0,22	0,22	0,01
17	14,88	1090	1086	Terpinolene	0,23	0,23	0,23	0,01
18	15,85	1111	1095	Linalool	7,33	7,42	7,37	0,04
19	16,12	1116	1100	Nonanal <n->	0,45	0,50	0,47	0,03
20	17,08	1136	1119	Mentha-2,8-dien-1-ol <trans-p->	0,07	0,07	0,07	0,01
21	18,03	1156	-	ND (PM 154)	0,02	0,02	0,02	0,01
22	18,25	1161	1141	Camphor	0,05	0,05	0,05	0,01
23	18,40	1164	1148	Citronellal	0,08	0,08	0,08	0,01
24	19,73	1192	1174	Terpinen-4-ol	1,02	1,03	1,03	0,01
25	20,24	1203	1187	Mentha-1(7),8-dien-2-ol <trans-p->	0,02	0,02	0,02	0,01
26	20,55	1210	1186	Terpineol <α->	1,27	1,28	1,27	0,01
27	20,90	1218	1201	Decanal <n->	0,67	0,66	0,66	0,01
28	21,80	1237	1215	Carveol <trans->	0,04	0,04	0,04	0,01
29	21,92	1240	1227	Nerol	0,27	0,27	0,27	0,01
30	22,58	1254	1235	Neral	0,68	0,69	0,68	0,01
31	22,98	1263	1239	Carvone	0,04	0,04	0,04	0,01
32	23,17	1267	1249	Geraniol	0,10	0,10	0,10	0,01
33	23,98	1285	1264	Geranial	0,98	0,94	0,96	0,02
34	24,42	1294	1269	Perilla aldehyde	0,31	0,25	0,28	0,03
35	25,23	1312	1294	Perilla alcohol	0,06	0,07	0,06	0,01
TOTAL							99,93	
TR: Tiempo de retención; IRC: Índice de retención calculado; IR: Índice de retención; ^a Adams, 2007; ND: No determinado; PM: Peso molecular.								

CM								
N°	TR (min)	IRC	IR Literatura*	COMPUESTOS	%	%	PROMEDIO %	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
1	8,00	934	932	Pinene <α->	0,31	0,31	0,31	0,01
2	8,72	951	946	Camphene	0,03	0,03	0,03	0,01
3	9,70	976	969	Sabinene	0,16	0,16	0,16	0,01
4	9,91	981	974	Pinene <β->	0,05	0,05	0,05	0,01
5	10,43	993	988	Myrcene	0,91	0,89	0,90	0,01
6	11,24	1012	1002	Phellandrene <α->	0,04	0,04	0,04	0,01
7	11,38	1015	998	Octanal <n->	1,68	1,69	1,69	0,01
8	11,68	1021	1007	Sylvestrene <iso->	0,09	0,09	0,09	0,01
9	12,27	1034	1024	Limonene	38,68	38,47	38,58	0,11
10	12,37	1036	1025	Sylvestrene	0,26	0,28	0,27	0,01
11	12,47	1038	1026	Cineole <1,8->	0,34	0,33	0,33	0,01
12	12,61	1041	1032	Ocimene <(Z)-β->	0,11	0,10	0,11	0,01
13	13,11	1052	1044	Ocimene <(E)-β->	0,06	0,06	0,06	0,01
14	13,65	1064	1054	Terpinene <γ->	0,06	0,06	0,06	0,01
15	14,41	1080	1067	Linalool oxide <cis-> (furanoid)	0,07	0,07	0,07	0,01
16	14,65	1085	1063	Octanol <n->	3,83	3,91	3,87	0,04
17	14,90	1090	1086	Terpinolene	0,30	0,31	0,30	0,01
18	15,21	1097	1084	Linalool oxide <trans-> (furanoid)	0,12	0,10	0,11	0,01
19	15,90	1112	1095	Linalool	29,25	29,64	29,45	0,20
20	16,14	1117	1100	Nonanal <n->	0,78	0,83	0,81	0,03
21	17,08	1137	1119	Mentha-2,8-dien-1-ol <trans-p->	0,26	0,24	0,25	0,01
22	17,44	1144	1132	Limonene oxide <cis-> (Me vs. IPP)	0,04	0,04	0,04	0,01
23	17,66	1149	1137	Limonene oxide <trans-> (Me vs. IPP)	0,04	0,05	0,05	0,01
24	17,81	1152	1133	Mentha-2,8-dien-1-ol <cis-p->	0,14	0,12	0,13	0,01
25	18,04	1157	1140	ND (PM 154)	0,08	0,06	0,07	0,01
26	18,26	1161	1141	Camphor	0,07	0,08	0,08	0,01
27	18,40	1164	1148	Citronellal	0,25	0,26	0,25	0,01
28	19,47	1187	1165	Nonanol <n->	0,28	0,29	0,28	0,01
29	19,75	1193	1174	Terpinen-4-ol	1,72	1,77	1,74	0,03
30	20,25	1203	1187	Mentha-1(7),8-dien-2-ol <trans-p->	0,03	0,03	0,03	0,01
31	20,57	1210	1186	Terpineol <α->	4,47	4,31	4,39	0,08
32	20,83	1216	-	ND (PM 152)	0,22	0,08	0,15	0,07
33	20,91	1218	1201	Decanal <n->	2,04	1,92	1,98	0,06
34	21,03	1220	-	ND (PM 152)	0,23	0,12	0,18	0,05
35	21,24	1225	-	ND (PM 152)	0,12	0,07	0,10	0,03
36	21,66	1234	-	ND (PM 152)	0,19	0,19	0,19	0,01
37	21,79	1237	1215	Carveol <trans->	0,41	0,39	0,40	0,01
38	21,88	1239	1227	Nerol	1,55	1,57	1,56	0,01
39	22,01	1242	1223	Citronellol	0,92	0,94	0,93	0,01
40	22,31	1248	1226	Carveol <cis->	0,03	0,04	0,04	0,01
41	22,44	1251	1227	Mentha-1(7),8-dien-2-ol <cis-p->	0,07	0,06	0,06	0,01
42	22,59	1254	1235	Neral	1,53	1,54	1,53	0,01
43	22,99	1263	1239	Carvone	0,11	0,12	0,11	0,01

44	23,13	1266	1249	Geraniol	1,38	1,43	1,40	0,02
45	23,45	1273	1249	Piperitone	0,06	0,05	0,05	0,01
46	23,99	1285	1264	Geranial	1,75	1,79	1,77	0,02
47	24,08	1287	-	ND (PM 152)	1,02	1,01	1,01	0,01
48	24,24	1290	-	ND (PM 152)	0,08	0,09	0,09	0,01
49	24,43	1294	1269	Perilla aldehyde	0,60	0,54	0,57	0,03
50	25,18	1311	1294	Perilla alcohol	0,57	0,56	0,57	0,01
51	25,46	1317	-	ND (PM 154)	0,11	0,01	0,06	0,05
52	25,57	1320	-	ND (PM 154)	0,29	0,35	0,32	0,03
53	27,21	1357	-	ND (PM 154)	0,05	0,05	0,05	0,01
54	28,16	1379	1374	Copaene <α>	0,05	0,07	0,06	0,01
55	28,72	1392	-	ND (PM 204)	0,07	0,04	0,05	0,01
56	29,99	1422	1408	Dodecanal	0,14	0,14	0,14	0,01
57	30,11	1424	1417	Caryophyllene <(E)>	0,20	0,20	0,20	0,01
58	30,55	1435	1430	Copaene<β>	0,04	0,03	0,04	0,01
TOTAL							98,21	
TR: Tiempo de retención; IRC: Índice de retención calculado; IR: Índice de retención; *Adams, 2007; ND: No determinado; PM: Peso molecular.								

CROMATOGRAMA:





BIBLIOGRAFÍA:

- Adams, R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th ed., Allured Publishing Corporation, 2007.

Bq. Mayra Montalván
RESPONSABLE LABORATORIO DE CROMATOGRFÍA
DEPARTAMENTO DE QUIMICA - UTPL

Anexo 2. Selección de naranjas para la utilización en la extracción de aceite esencial de su cáscara



Anexo 3. Pesado de frutos de naranja inmadura y maduros utilizados como materia prima



Anexo 4. Pesado de cáscara de naranjas inmadura y madura utilizadas como materia prima para la extracción de aceite esencial



Anexo 5. Deshidratación de cáscaras de naranja en la estufa



Anexo 6. Pesado de cáscaras de naranja luego del proceso de deshidratación



Anexo 7. Destilación por arrastre de vapor con una trampa Clevenger para obtener el aceite esencial



Anexo 8. Obtención del aceite esencial más hidrolatos que se eliminan luego de la centrifugación



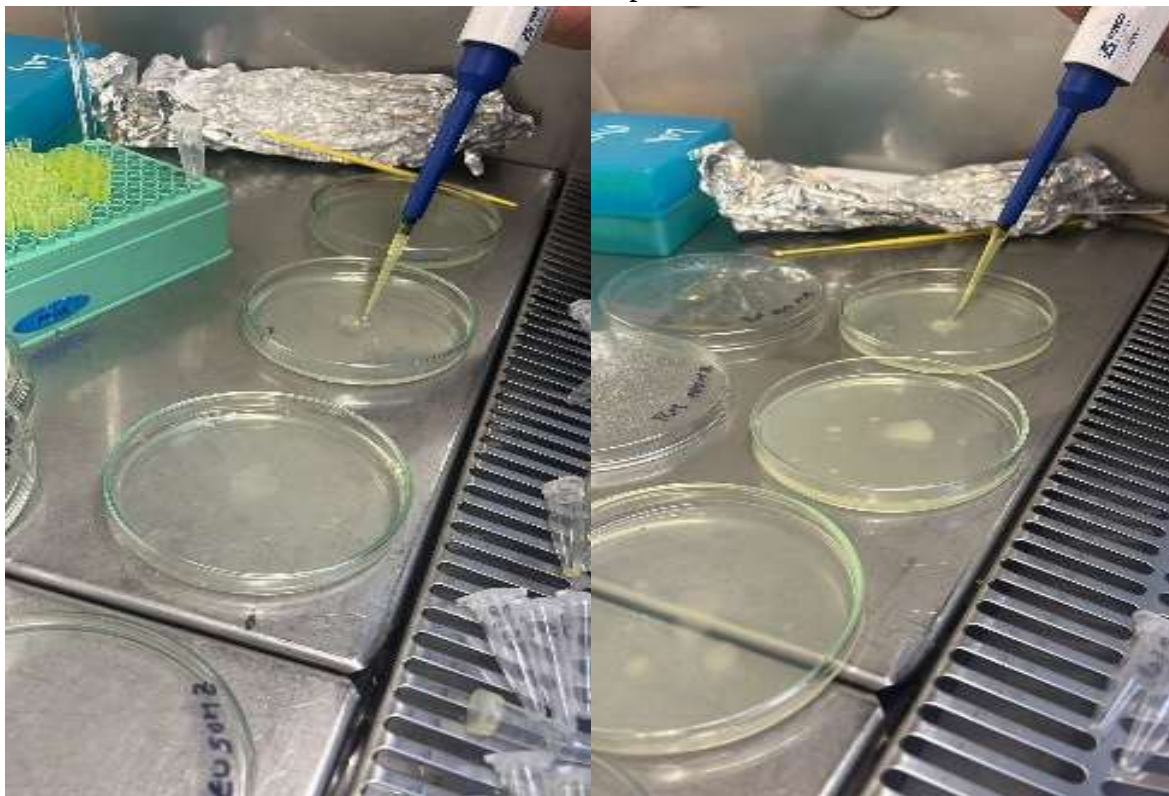
Anexo 9. Dilución de los aceites esenciales con dimetil sulfóxido con sus respectivas concentraciones



Anexo 10. Llenado de las cajas Petri con el PDA para luego proceder a adicionar los aceites esenciales con el hongo *Lasiodiplodia thebromae*



Anexo 11. Colocación de los aceites con sus respectivas concentraciones



Anexo 12. Aislamiento de *Lasiodiplodia thebromae* para su utilización en el ensayo *in vitro*.



Anexo 13. Evaluación y registro de datos del crecimiento micelial de *Lasiodiplodia thebromae*



Anexo 14. Evolución del diámetro micelial de *Lasiodiplodia thebromae* en respuesta a los diferentes tratamientos evaluados

