



**UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO**  
**FACULTAD CIENCIAS DE LA INGENIERIA**  
**CARRERA INGENIERIA AGROINDUSTRIAL**

Proyecto de Investigación previo a  
la obtención del título de Ingeniero  
Agroindustrial.

**Título del Proyecto de Investigación:**

Evaluación de la actividad antifúngica de aceites esenciales de hojas y corteza de *citrus limon* (limón sutil) para la inhibición de hongos patógenos presentes en *carica papaya* l. (papaya maradol) y *carica papaya var. solo sunrise* (papaya hawaiana), Quevedo 2016

**Autora:**

Shirley Narcisa Vélez Calderón

**Directora del proyecto de investigación:**

ING. MS.c. Flor Marina Fon Fay Vásquez

**Quevedo - Ecuador**

**2016**



**UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO**

# Facultad Ciencias de la Ingeniería

## Carrera de Ingeniería Agroindustrial

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

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

CASILLAS  
Guayaquil: 10672  
Quevedo: 73

---

### DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

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

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

f. \_\_\_\_\_

**Shirley Narcisa Vélez Calderón**

**C.C. # 1207643899**



**UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO**

# Facultad Ciencias de la Ingeniería

## Carrera de Ingeniería Agroindustrial

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

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

CASILLAS  
Guayaquil: 10672  
Quevedo: 73

---

### CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

La suscrita, **Ing. M.Sc. Flor Marina Fon Fay Vásquez**, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que la Egresada **Shirley Narcisa Vélez Calderón**, realizó la tesis de grado previo a la obtención del título de Ingeniera Agroindustrial titulada: **Evaluación de la actividad antifúngica de aceites esenciales de hojas y corteza de *Citrus limon* (limón sutil) para la inhibición de hongos patógenos presentes en *Carica papaya* L. (papaya maradol) y *Carica papaya* var. *Solo sunrise* (papaya hawaiana), Quevedo 2016**, bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

f. \_\_\_\_\_

**Ing. M.Sc. Flor Marina Fon Fay Vásquez**  
**DIRECTORA DEL PROYECTO DE INVESTGACION**



**UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO**

# Facultad Ciencias de la Ingeniería

## Carrera de Ingeniería Agroindustrial

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

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

CASILLAS  
Guayaquil: 10672  
Quevedo: 73

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

Quevedo, 12 de enero de 2017

**Ing. MSc. Sonia Barzola Miranda**  
**COORDINADORA DE LA CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

Mediante el presente cumpla en presentar a usted, el informe del proyecto cuyo tema es “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE ACEITES ESENCIALES DE HOJAS Y CORTEZA DE *Citrus limon* (LIMÓN SUTIL) PARA LA INHIBICIÓN DE HONGOS PATÓGENOS PRESENTES EN *Carica papaya* L. (PAPAYA MARADOL) Y *Carica papaya* var. *Solo sunrise* (PAPAYA HAWAIANA), QUEVEDO 2016”. presentado por la señorita **Shirley Narcisa Vélez Calderón**, egresada de la carrera de Ingeniería Agroindustrial, que fue revisado bajo mi dirección según resolución del consejo directivo de la Facultad de Ciencias de la Ingeniería de sesión extraordinaria que se ha desarrollado de acuerdo al reglamento general de graduación de pregrado de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo y cumple con el requerimiento de análisis de **URKUND** el cual avalúa los niveles de originalidad en un 95% y similitud 5%, de trabajo investigativo.

**URKUND**

Documento	<a href="#">URKUND Proyecto de investigacion AE citrus limon - Actual.docx (D24905892)</a>
Presentado	2017-01-11 18:32 (-05:00)
Recibido	<a href="mailto:ffonfay.uteq@analysis.orkund.com">ffonfay.uteq@analysis.orkund.com</a>
Mensaje	Evaluación del aceite esencial de limón sutil <a href="#">Mostrar el mensaje completo</a>

5% de esta aprox. 20 páginas de documentos largos se componen de texto presente en 4 fuentes.

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

Por su atención mis más sinceros agradecimientos.

Cordialmente.



ING. FLOR MARINA FON FAY VASQUEZ  
DIRECTORA DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN



**UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO**  
**FACULTAD CIENCIAS DE LA INGENIERIA**  
**CARRERA DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL**

**PROYECTO DE INVESTIGACION:**

**Título:**

“Evaluación de la actividad antifúngica de aceites esenciales de hojas y corteza de *Citrus limon* (limón sutil) para la inhibición de hongos patógenos presentes en *Carica papaya* L. (papaya maradol) y *Carica papaya* var. *Solo sunrise* (papaya hawaiana), Quevedo 2016.”

Presentado a la Comisión Académica como requisito previo a la obtención del título de Ingeniera Agroindustrial.

Aprobado por:

---

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing. M.Sc. Sonia Esther Barzola Miranda

---

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. M.Sc. Ruth Isabel Torres Torres

---

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. M.Sc. Andrea Cristina Cortez Espinoza

QUEVEDO – ECUADOR

2016

## **AGRADECIMIENTO**

*Me llena de dicha agradecerle a Dios quien es motor principal en mi vida, que abre puertas, caminos aun en lo imposible, que me abraza y me hace sentir que está conmigo.*

*A mi directora de proyecto de investigación Ing. Flor Marina Fon Fay que me impartió sus enseñanzas, fue la mentora de este tema de investigativo. Así mismo a todas y cada una de las personas, docentes que compartieron su saber para llevarse a cabo esta investigación así como el Dr. Fabricio Canchignia, Flor Narváez, personal del laboratorio de microbiología, a las nuevas amistades que forme allí, a mis compañeros de tutorías de proyecto de investigación Jessica Daquilema y Alexander Mendoza a todos que en lo mucho o poco estuvieron allí.*

*A mis maestros que me infundieron sus conocimientos en las aulas de clases. A mis compañeros con los que compartí momentos buenos y malos. También a la loable institución que crece y se fortalece día a día para dar lo mejor a sus estudiantes.*

*A mis padres, hermanos, sobrina y personas especiales que guardan un lugar especial e importante en mi corazón.*

*"Mira que te mando que te esfuerces y seas valiente; no temas ni desmayes, porque Jehová tu Dios estará contigo en donde quiera que vayas" (Josué.1:9)*

**Skirley Vélez Calderón**

## **DEDICATORIA**

*Este trabajo de investigación va en honor a Dios que me guía por sendas del bien y misericordia, que no me deja desfallecer, que me brinda oportunidades para superarme cada día, me da la paz necesaria en medio de los problemas o adversidades ya que sin Él no hubiese llegado hasta este preciso momento de mi vida.*

*A mis padres Julio y Brígida por darme el cuidado, amor, apoyo emocional y económico, que me han educado con principios, porque son mi inspiración de querer algo mejor para mi vida y la de ellos.*

*A mi hermana Verónica por su apoyo constante y deseo verme crecer profesionalmente, al igual que mi hermano Cesar que no está físicamente pero aún vive en mis pensamientos y en el Altísimo. A mi sobrina Neus que llena mi casa de alegría, así mismo guarda un lugar especial en mi corazón.*

*A mis tíos y tías que siempre me han sabido brindar dar la mano o un consejo y que me ponen como ejemplo.*

*Y por último pero no menos importante a Stefano, persona especial que guardo en mi corazón y ha sido de gran apoyo en momentos difíciles, me alienta siempre a seguir a Dios y perseguir mis sueños.*

*El que con lágrimas siembra, con regocijo cosecha.  
(Salmos.126:5)*

**Shirley Vélez Calderón**

## RESUMEN

La demanda de productos alimentos GRAS (generalmente considerados como seguro) aumenta cada vez, ya que toda sustancia que se agrega intencionalmente a los alimentos es considerada aditivo alimentario y para conservación de productos frescos después de la cosecha se utilizan químicos que afectan a la salud del consumidor. Es por ello está investigación, una propuesta innovadora con el fin de valorar la actividad antifúngica del aceite esencial obtenido por hidrodestilación de hojas de *Citrus limon* en comparación con uno comercial de corteza en tres niveles de concentraciones frente a hongos patógenos *Fusarium* sp y *Rhizopus stolonifer*, principales microorganismos causantes del deterioro postcosecha, estos fueron aislados e identificados a partir de *Carica papaya* L. y *Carica papaya* var. *Solo sunrise*. El experimento se realizó con la técnica de difusión de PDA más solución de aceite esencial y tween 20 para una homogénea mezcla, se evaluó crecimiento radial en 48, 96 y 168 horas y germinación de esporas se sacaron las medias porcentuales de los datos de la fase experimental se le aplico diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial y prueba de significación Tukey al 95%. Las concentraciones de 100 µl, 200 µl y 300 µl (1, 2 y 3%) de aceite esencial de hojas de *Citrus limon* y 200 µl y 300 µl (2 y 3%) de aceite esencial comercial frente a *R. stolonifer*, inhibió en su totalidad, mientras *Fusarium* sp fue inhibido a partir de concentraciones de 200 µl y 300 µl (2 y 3%) de aceite esencial de hojas de *Citrus limón*, mientras que los demás tratamientos inhibieron en menores cantidades y en algún caso 0%. Se determinó que el aceite esencial que tiene mejores propiedades antifúngicas es el de hojas de *C. limon*.

**Palabras Claves:** Medición Radial, Conteo de Esporas, hidrodestilacion, microorganismos.

## ABSTRACT

The demand for food products GRAS (generally regarded as safe) increases each time, as any substance that is intentionally added to food is considered a food additive and for conservation of fresh produce after harvest are used chemicals that affect the health of the consumer. This is why this research, an innovative proposal in order to assess the antifungal activity of the essential oil obtained by hydrodistillation of Leaves of *Citrus limon* compared with a commercial one of bark on three levels of concentrations in relation to pathogenic fungi *Fusarium sp* and *Rhizopus stolonifer*, main microorganisms that cause postharvest deterioration, these were isolated and identified from *Carica papaya L.* and *Carica papaya var. Solo sunrise*. The experiment was performed with the technique of dissemination of PDA more solution of essential oil and tween 20 for a homogeneous mixture, radial growth was evaluated in 48, 96 and 168 hours and germination of spores were removed the half percentage points of the data of the pilot phase was applied Completely Randomized Design (DCA) with factorial arrangement and significance test Tukey to 95%. The concentrations of 100  $\mu$ l, 200  $\mu$ l and 300  $\mu$ l (1, 2, and 3%) of Essential Oil of *Citrus limon* and 200  $\mu$ l and 300  $\mu$ l (2 and 3%) of essential oil trade with respect to *R. stolonifer*, inhibited in its entirety, while *Fusarium sp* was inhibited at concentrations of 200  $\mu$ l and 300  $\mu$ l (2 and 3%) of Essential Oil of *Citrus limon*, while other treatments inhibited in smaller quantities and in some cases 0%. It was determined that the essential oil that has a better antifungal properties is the leaves of *C. lemon*.

**Keywords:** Radial measurement, Count of spores, hydrodistillation, microorganism.

# TABLA DE CONTENIDO

PORTADA .....	i
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS .....	ii
CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	iii
CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO. ....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
CERTIFICADO DE APROBACIÓN POR TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN.....	v
AGRADECIMIENTO .....	vi
DEDICATORIA.....	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT .....	ix
TABLA DE CONTENIDO .....	x
CODIGO DUBLIN .....	xv
Introducción.....	1
<b>CAPÍTULO I CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>3</b>
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 .....	5
1.2. Objetivos.....	6
1.2.1.Objetivo General.....	6
1.2.2.Objetivos Específicos.....	6
1.3. Justificación .....	7
1.4. Hipótesis .....	7
<b>CAPÍTULO II FUNDAMENTACION TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>8</b>
2.1. Marco conceptual.....	9
2.1.1.Aceites esenciales .....	9
2.1.2.Aceite esencial de corteza .....	11
2.1.3.Extracción de aceite esencial .....	11
2.1.4.Hidrodestilación.....	11
2.1.5.Carica papaya.....	11
2.1.11. Micotoxinas .....	14
2.1.12. Metabolitos Secundarios.....	14

2.1.13. Actividad Antifúngica.....	15
2.1.14. Terpenos.....	15
2.1.15. Monoterpenos y sesquiterpenos .....	15
2.1.16. Limoneno.....	16
2.2. Marco referencial.....	16
2.2.1. Aceites esenciales de cítricos.....	16
2.2.2. Aceites esencial de corteza de limón .....	17
2.2.3. Aceites esenciales de hojas de limón .....	18
2.2.4. Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de <i>Fusarium</i> sp. aislado de papaya ( <i>Carica papaya</i> ).....	18
2.2.5. Actividad antifúngica del aceite esencial de naranja ( <i>Citrus sinensis</i> L.) sobre hongos postcosecha en frutos de lechosa ( <i>Carica papaya</i> L.).....	19
2.2.6. Evaluación preliminar de la actividad fungicida de los aceites esenciales de eucalipto ( <i>Eucalyptus tereticornis</i> , <i>Myrtaceae</i> ) y cáscara de naranja ( <i>Citrus sinensis</i> , <i>Rutaceae</i> ) sobre algunos hongos filamentosos .....	19
2.2.7. Efecto de cuatro aceites esenciales sobre <i>Fusarium</i> sp.....	20
2.2.8. Evaluación in vitro de la actividad fungistática del aceite esencial de mandarina sobre el crecimiento de <i>Penicillium</i> sp.....	20
2.2.9. Antifungal activity of lemon ( <i>Citrus lemon</i> L.), mandarin ( <i>Citrus reticulata</i> L.), grapefruit ( <i>Citrus paradisi</i> L.) and orange ( <i>Citrus sinensis</i> L.) essential oils .....	21
2.2.10. Desarrollo de un envase activo adicionado con aceites esenciales de cítricos para el control de la podredumbre en fresa .....	21
<b>CAPÍTULO III METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>23</b>
3.1. Localización.....	24
3.5. Diseño de la investigación .....	25
3.5.1. Factores de estudio .....	25
3.6. Instrumentos de investigación .....	26
3.7. Tratamiento de los datos .....	26
3.8. Recursos humanos y materiales .....	26
3.8.1. Recursos humanos .....	26
3.8.2. Materiales de laboratorio .....	27
3.9. Manejo específico del experimento. ....	28
<b>CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>31</b>
4.1. Resultados.....	32
4.1.1. Aislamiento e identificación de hongos patógenos presentes en <i>Carica papaya</i> L. y <i>Carica papaya</i> var. <i>Solo Sunrise</i> . .....	32

4.1.2. Concentración inhibitoria de aceite esencial de <i>Citrus limon</i> de hojas obtenido por hidrodestilacion y de aceite comercial de corteza en hongos identificados de <i>Carica papaya</i> L. y <i>Carica papaya</i> var. <i>Solo Sunrise</i> .....	33
4.1.3. Comparar la actividad Antifúngica del aceite esencial de <i>Citrus limon</i> (Limón sutil) de hojas obtenido por hidrodestilacion y de aceite comercial de corteza. .	36
4.2. Discusión. ....	37
4.2.1. Aislamiento e identificación de hongos patógenos presentes en <i>Carica papaya</i> L. y <i>Carica papaya</i> var. <i>Solo Sunrise</i> . ....	37
4.2.2. Concentración inhibitoria de aceite esencial de <i>Citrus limon</i> de hojas obtenido por hidrodestilación y de aceite comercial de corteza en hongos identificados de <i>Carica papaya</i> L. y <i>Carica papaya</i> var. <i>Solo Sunrise</i> .....	38
4.2.3. Comparar la actividad Antifúngica del aceite esencial de <i>Citrus limon</i> (Limón sutil) de hojas obtenido por hidrodestilacion y de aceite comercial de corteza. .	39
<b>CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	41
5.1. Conclusiones.....	42
5.2. Recomendaciones. ....	42
<b>CAPÍTULO VI BIBLIOGRAFIA</b> .....	43
6.1. Bibliografía. ....	44
<b>CAPÍTULO VII ANEXOS</b> .....	48

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadros</b>		<b>Página</b>
Cuadro 1.	Descripción Factores de Estudio.....	25
Cuadro 2.	Combinación de los tratamientos propuestos para la identificación de la actividad antifúngica de aceites esenciales de hojas y corteza de <i>Citrus limon</i> (Limón Sutil) para la inhibición de hongos de papaya .....	26
Cuadro 3.	Materiales, equipo y reactivos para aislamientos de hongos .....	27
Cuadro 4.	Materiales, equipo y reactivos para preparación de PDA.....	27
Cuadro 5.	Materiales, equipo y reactivos para repique de hongos .....	27
Cuadro 6.	Materiales, equipo y reactivos para inhibición de hongos.....	27
Cuadro 7.	Materiales, equipo y reactivos para conteo de esporas .....	28
Cuadro 8.	Medias de inhibición en crecimiento radial entre interacciones .....	34
Cuadro 9.	Medias de inhibición en germinación de esporas entre interacciones .....	35
Cuadro 10.	Medias de inhibición en crecimiento radial entre factores .....	36
Cuadro 11.	Medias de inhibición en germinación de esporas entre factores.....	37

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tablas</b>		<b>Página</b>
Tabla 1.	Partes empleadas en la obtención de aceite esencial.....	10
Tabla 2.	Clasificación de los aceites esenciales.....	10
Tabla 3.	Clasificación de terrenos .....	15
Tabla 4.	Ubicación geográfica.....	24

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figuras</b>		<b>Página</b>
Figura 1.	Estructura del genero <i>Rhizopus</i> .....	13
Figura 2.	Estructura del genero <i>Fusarium sp</i> .....	13
Figura 3.	Monoterpenos y sesquiterpenos.....	16
Figura 4.	Compuestos del aceite esencial de corteza de limón.....	17

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexos</b>	<b>Página</b>
Anexo 1. Crecimiento radial de los tratamientos .....	48
Anexo 2. Crecimiento radial de los testigos .....	50
Anexo 3. Germinación de esporas en tratamientos .....	50
Anexo 4. Germinación de esporas en testigos .....	51
Anexo 5. Porcentaje de inhibición radial en tratamientos .....	51
Anexo 6. Porcentaje de inhibición radial en testigos.....	51
Anexo 7. Porcentaje de inhibición de esporas en testigos.....	52
Anexo 8. Porcentaje de inhibición de esporas en tratamientos .....	52
Anexo 9. Diagrama de flujo del proceso de obtención de aceite esencial de hojas Citrus limon. ....	53
Anexo 10. Diagrama de flujo del proceso de inhibición de hongos ( <i>Fusarium sp</i> y <i>R. stolonifer</i> ) aislados de dos variedades de papaya.....	54
Anexo 11. Fotos de la Fase experimental.....	55
Anexo 12. Cuadro de Varianzas para porcentaje en crecimiento radial y esporas (Statgraphics) .....	62
Anexo 13. Pruebas de significación Tukey (Statgraphics e InfoStat) y gráficos (InfoStat) para porcentaje en crecimiento radial y esporas.....	64
Anexo 14. Técnicas de Laboratorio.....	74
Anexo 15. Certificado de laboratorio .....	78

## CODIGO DUBLIN

Título:	Evaluación de la actividad antifúngica de aceites esenciales de hojas y corteza de <i>Citrus limon</i> (limón sutil) para la inhibición de hongos patógenos presentes en <i>Carica papaya</i> L. (papaya maradol) y <i>Carica papaya</i> var. <i>Solo sunrise</i> (papaya hawaiana), Quevedo 2016			
Autor:	Vélez Calderón Shirley Narcisa			
Palabras clave:	Medición Radial	Conteo de Esporas	Hidrodestilación	Microorganismos
Fecha de publicación:				
Editorial:	Quevedo: UTEQ 2016			
Resumen: (hasta 300 palabras)	<p>Resumen.- La demanda de productos alimentos GRAS (generalmente considerados como seguro) aumenta cada vez, ya que toda sustancia que se agrega intencionalmente a los alimentos es considerada aditivo alimentario y para conservación de productos frescos después de la cosecha se utilizan químicos que afectan a la salud del consumidor. Es por ello esta investigación, una propuesta innovadora con el fin de valorar la actividad antifúngica del aceite esencial obtenido por hidrodestilación de hojas de <i>Citrus limon</i> en comparación con uno comercial de corteza en tres niveles de concentraciones frente a hongos patógenos <i>Fusarium</i> sp y <i>Rhizopus stolonifer</i>, principales microorganismos causantes del deterioro postcosecha, estos fueron aislados e identificados a partir de <i>Carica papaya</i> L. y <i>Carica papaya</i> var. <i>Solo sunrise</i>. El experimento se realizó con la técnica de difusión de PDA más solución de aceite esencial y tween 20 para una homogénea mezcla, se evaluó crecimiento radial en 48, 96 y 168 horas y germinación de esporas se sacaron las medias porcentuales de los datos de la fase experimental se le aplicó diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial y prueba de significación Tukey al 95%. Las concentraciones de 100 µl, 200 µl y 300 µl (1, 2 y 3%) de aceite esencial de hojas de <i>Citrus limon</i> y 200 µl y 300 µl (2 y 3%) de aceite esencial comercial frente a <i>R. stolonifer</i>, inhibió en su totalidad, mientras <i>Fusarium</i> sp fue inhibido a partir de concentraciones de 200 µl y 300 µl (2 y 3%) de aceite esencial de hojas de <i>Citrus limón</i>, mientras que los demás tratamientos inhibieron en menores cantidades y en algún caso 0%. Se determinó que el aceite esencial que tiene mejores propiedades antifúngicas es el de hojas de <i>C. limon</i>.</p>			
Descripción:	Hojas : dimensiones, 29 x 21 cm + CD-ROM 6162			
URI:				

## Introducción

Los productos alimenticios son perecederos por naturaleza y requieren protección contra el deterioro durante su preparación, almacenamiento y distribución para darles tiempo de conservación deseado. La demanda de productos mínimamente procesados, preparados fácilmente, y listos para comer alimentos frescos, la globalización del comercio de alimentos, y la distribución de procesamiento centralizado plantean desafíos importantes para la seguridad alimentaria y de calidad [1].

La papaya es un fruto climatérico, cuya maduración ocurre rápidamente poco después de la cosecha, caracterizándose por ser una fruta muy perecedera [2]

Los hongos son los principales patógenos que están asociados con las pudriciones postcosecha de frutas y hortalizas durante el transporte, el almacenamiento y la comercialización, estas pudriciones causadas en postcosecha reducen la vida útil y afectan negativamente el valor comercial de las frutas, además generan pérdidas económicas por causa de los hongos, éstos son capaces de producir micotoxinas y metabolitos secundarios que tienen efectos adversos en humanos y animales [3].

Los recubrimientos pueden funcionar como vehículos de una amplia gama de aditivos alimentarios, incluidos compuestos antimicrobianos con el fin de proporcionar atributos superiores, tales como el control de microorganismos. Los aceites esenciales son algunos de los aditivos naturales. Existe una amplia evidencia de que los aceites esenciales extraídos de diferentes especies de plantas presentan inhibición contra hongos y bacterias [4].

Existe una creciente preocupación por el nivel de residuos de plaguicidas en los alimentos. Esta preocupación busca otras soluciones a los pesticidas sintéticos. Recientemente ha habido un interés considerable en la lista de compuestos GRAS (generalmente considerado como seguro). Unos ejemplos de compuestos GRAS son de plantas de origen natural biológicamente activos. Generalmente se asume estos extractos de plantas que son más aceptables y menos peligrosos que los compuestos sintéticos. Esto significa que los aceites esenciales que son materiales de calidad alimentaria registrados, se podrían utilizar como alternativa anti-hongos y anti-bacterianos como tratamientos para los productos frescos. [5].

Las plantas pueden producir aceite esencial para muchos y diversos fines; por un lado protegen a la planta de plagas, enfermedades e inclusive de la invasión de otras plantas, para atraer insectos y aves (polinizantes) [6]. Estas cualidades de protección y atracción, se ven reflejadas en propiedades: antiinflamatorias, antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes, anticancerígenas así también propiedades antisépticas, antidepresivas y afrodisíacas, entre otras, presentes en mayor o menor grado en la totalidad de los aceites [7].

Los aceites esenciales cubren un amplio espectro de actividades, según [8] ‘son productos vegetales constituidos generalmente por alcaloides, flavonoides, isoflavonoides, taninos, cumarinas, glicósidos, terpenos, fenilpropanos y ácidos orgánicos’.

El propósito de esta investigación es probar el potencial antifúngico de los aceite esencial de hojas y corteza de *Citrus limon* (Limón sutil) obtenidos mediante hidrodestilación en el laboratorio de biotecnología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo y adquirida en la empresa *ISABRUBOTANIK S.A* de la ciudad de Ambato aplicados para la inhibición hongos presentes en la papayas.

Para ello se realizó la identificación de hongos patógenos presentes en *Carica papaya* L. (Papaya Maradol) y *Carica papaya* var. *Solo Sunrise* (Papaya Hawaiana), determinación de la concentración óptima de aceite esencial de hojas y cortezas de *Citrus limon* (Limón sutil) para la inhibición de hongos aislados de dos variedades de papaya *Carica papaya* L. (Papaya Maradol) y *Carica papaya* var. *Solo Sunrise* (Papaya Hawaiana) y comparación la actividad Antifúngica del aceite esencial *Citrus limon* (Limón sutil) de hojas obtenido de la hidrodestilacion y corteza de origen comercial.

**CAPÍTULO I**  
**CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN**

## **1.1. Problema de investigación**

### **1.1.1. Planteamiento del problema**

Los frutos de papaya al ser climatéricos son altamente perecederos y susceptibles al ataque de microorganismos patógenos, que causan grandes pérdidas en poscosecha [9].

Los hongos más comúnmente encontrados en papayas son *Rhizopus*, *Cladosporium sp.* y *Fusarium sp.* Una vez dentro del fruto el hongo penetra la semilla, la cual se seca y oscurece. Toda la cavidad es colonizada por el hongo y la pulpa adyacente a ésta. El tejido infectado se observa acuoso al principio, pero en las etapas finales de la infección toma un color negro y apariencia firme. Los frutos infectados se amarillan y maduran prematuramente [10].

Actualmente, se están buscando nuevas alternativas para controlar la presencia de hongos contaminantes de alimentos así como de las toxinas que ellos puedan producir, empleando compuestos de orígenes naturales que sean inofensivos tanto para el hombre como para el ambiente y que posean propiedades antifúngicas.

### **Diagnóstico**

Los géneros *Fusarium*, *Rhizopus* son en su mayoría los responsables de las alteraciones en frutas y hortalizas, que afectan el aspecto físico, características organolépticas y dificultad de conservación, también se le suma que estos microorganismos son causantes de alergias e intoxicaciones en los consumidores, debido a que producen estructuras especializadas que se depositan sobre el producto, penetran, invaden y eventualmente colonizan masivamente el tejido para causar daño y posteriormente segregar sustancias, como consecuencia de su metabolismo secundario.

### **Pronóstico**

Los aceites esenciales de *Citrus limon* de hojas obtenido por hidrodestilación y de aceite comercial de corteza inhibe a *Fusarium sp.* y *Rhizopus stolonifer* tanto en crecimiento radial y germinación de esporas.

### **1.1.2. Formulación del problema**

¿Se desconoce la actividad antifúngica de aceite esencial de hojas y corteza de *Citrus limon* (limón sutil) en la inhibición de hongos patógenos presentes en papayas?

### **1.1.3. Sistematización del problema**

Se requiere identificar los hongos patógenos presentes en *Carica papaya* L. (Papaya Maradol) y *Carica papaya* var. *Solo Sunrise* (Papaya Hawaiana).

No se conoce la concentración óptima de aceite esencial de *Citrus limon* (Limón sutil) de hojas obtenido por hidrodestilación y de aceite comercial de corteza para la inhibición de hongos aislados de papaya.

Se desconoce la actividad Antifúngica del aceite esencial de *Citrus limon* (Limón sutil) de hojas obtenido por hidrodestilación y aceite comercial de corteza.

## **1.2. Objetivos**

### **1.2.1. Objetivo General**

Evaluar la actividad antifúngica de aceites esenciales de hojas y corteza de *Citrus limon* (limón sutil) para la inhibición de hongos patógenos presentes en *Carica papaya L.* (papaya maradol) y *Carica papaya var. Solo sunrise* (papaya hawaiana).

### **1.2.2. Objetivos Específicos**

1. Identificar los hongos patógenos presentes en *Carica papaya L.* (Papaya Maradol) y *Carica papaya var. Solo Sunrise* (Papaya Hawaiana).
2. Determinar la concentración inhibitoria de aceite esencial de *Citrus limon* (Limón sutil) de hojas obtenido por hidrodestilacion y de aceite comercial de corteza en hongos identificados de *Carica papaya L.* y *Carica papaya var. Solo Sunrise*.
3. Comparar la actividad Antifúngica del aceite esencial de *Citrus limon* (Limón sutil) de hojas obtenido por hidrodestilacion y de aceite comercial de corteza.

### **1.3. Justificación**

El propósito de la Investigación es el uso de aceites esenciales para inhibir hongos patógenos presentes en las papayas con el fin alargar la vida útil de frutas ya que diversas enfermedades fitopatógenas causan la podredumbre y acorta su vida de anaquel del mismo.

Los aceites esenciales de plantas aromáticas como lo es el limón se producen en la zona es una ventaja ya que aparte de ser utilizadas en otras necesidades diarias del hombre sirve como propuesta a darle otro valor en la producción agroindustrial.

Con la obtención de estos aceites esenciales se disponer de un compuesto natural que actué como antifúngico en alimentos frescos para alargar la vida útil del alimento que no afecte la salud del consumidor y en la industria disponer de una materia prima de calidad libre de microorganismos.

### **1.4. Hipótesis**

Los hongos patógenos presentes en papaya serán inhibidos por el Aceite esencial de *Citrus limon* (Limón sutil) de hojas y de corteza en tres niveles de concentración.

**CAPÍTULO II**  
**FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN**

## 2.1. Marco conceptual

### 2.1.1. Aceites esenciales

Los aceites esenciales son mezclas de sustancias obtenidas de plantas, que presentan como características principales su compleja composición química y su carácter fuertemente aromático [11].

Son una mezcla de componentes volátiles, producto del metabolismo secundario de las plantas. Las esencias son mezclas más o menos complejas en cuya composición entra una porción de hidrocarburos de la serie polimetilénica del grupo de los terpenos que responden la fórmula  $(C_5H_8)_n$  (monoterpenos,  $n = 2$ ; sesquiterpenos,  $n = 3$ ; diterpenos,  $n = 4$ ; etc.) junto con otros compuestos casi siempre oxigenados (alcoholes, éteres, ésteres, aldehídos y compuestos fenólicos) que son los que transmiten a los aceites esenciales el aroma que las caracteriza [12].

**Tabla 1.** Partes empleadas en la obtención de aceite esencial

<b>Aceite Esencial</b>	<b>Parte de la Planta utilizada</b>
Ciprés, jara	Ramas
Lavanda, lavandin	Sumidades floridas
Menta, hierba limón, eneldo	Planta entera
Geranio, Petitgrain	Hojas
Neroli, rosa, ylang	Flores
Limón, naranja, mandarina	Flavedo (capa externa del fruto)
Romero, tomillo, ajedrea, mejorana	Planta entera con flor
Melisa	Planta fresca
Abeto de Siberia	Acículas
Manzanilla	Flor seca
Canela	Corteza
Cedro	Madera
Lima	Fruto entero
Clavo	Botones florales
Vetiver	Raíz
Mostaza	Semillas

Fuente: Ortuño, (2006)

**Tabla 2.** Clasificación de los aceites esenciales

<b>Criterio</b>	<b>Clasificación</b>	<b>Ejemplos</b>
<b>Consistencia</b>	<i>Fluidos</i>	Líquidos muy volátiles a temperatura ambiente: esencias de menta, salvia, limón, albahaca, etc.
	<i>Bálsamos</i>	De consistencia espesa, poco volátiles y propensos a polimerizarse: bálsamo de copaiba, bálsamo de Perú, etc.
	<i>Oleorresinas</i>	Líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas: caucho, gutapercha, oleorresina de páprika, etc.
<b>Origen</b>	<i>Naturales</i>	Se obtienen directamente de la planta y no se someten posteriormente a ninguna modificación física o química: esencias de plantas aromáticas y flores. Se obtienen a través de los procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno de sus componentes principales, o son la mezcla de varias esencias naturales, por ejemplo, esencia de anís enriquecida con anetol.
	<i>Artificiales</i>	
	<i>Sintéticas</i>	Mezclas de diversos productos químicos obtenidos sintéticamente.
<b>Naturaleza Química de los componentes Mayoritarios</b>	<i>Monoterpenoides</i>	Esencias de albahaca, salvia, menta, etc.
	<i>Sesquiterpenoides</i>	Esencias de ciprés, copaiba, jengibre, etc.
	<i>Compuestos oxigenados</i>	Esencias de geranio, jazmín, lavanda, ylang, etc.

Fuente: Pavas y Vega (2005)

### **2.1.2. Aceite esencial de corteza**

Se denomina "aceite esencial o esencia natural de limón" al producto volátil obtenido del epicarpio fresco del fruto, por expresión o raspado, se lo obtiene generalmente por destilación al vapor, se trata de un líquido de color amarillo pálido a verde amarillento, posee un aroma fresco que recuerda a la cáscara madura del fruto, tiene una densidad relativa a 20/20 °C es de 0,850 a 0,859 entre sus características esta que es volátil, soluble en alcohol o éter y poco soluble en agua, el principal constituyente químico del aceite esencial de limón, es el limoneno que representa algo más del 60 % [13].

### **2.1.3. Extracción de aceite esencial**

Los aceites esenciales se pueden extraer de las muestras vegetales mediante varios métodos como son: expresión, destilación con vapor de agua, extracción con solventes volátiles, enfleurage y con fluidos supercríticos. El material vegetal es exprimido para liberar el aceite y este es recolectado y filtrado. Este método es utilizado para el caso de las esencia de cítricos [14].

### **2.1.4. Hidrodestilación**

Es el método en el cual el material vegetal es cargado sobre una rejilla; sin embargo en este caso, el agua adicionada, siempre está en contacto con dicho material; luego se deja en presencia de calor hasta el punto de ebullición, el vapor penetra los tejidos de la planta y disuelve una parte del aceite esencial presente en las estructuras contenedoras. Esta solución acuosa se difunde a través de las membranas de las células y el aceite se vaporiza inmediatamente desde la superficie; el proceso continúa hasta que se remueve todo el aceite contenido en las glándulas de la planta [15].

### **2.1.5. Carica papaya**

El papayo (*Carica papaya* L.) es una especie dicotiledónea de pequeñas plantas semileñosas tropicales apreciada por sus palatables frutos semejantes al melón, pertenece a la familia Caricaceae la que comprende a los siguientes géneros: *Carica*, *Cylicomorpha*, *Jacaratia* y *Jarilla*. *Carica* incluye alrededor de 21 especies todas nativas de América tropical [16].

El fruto de la papaya es una baya ovoide, cuya forma varía de casi esférica a oblonga o periforme. Posee una cavidad cuyo tamaño puede ser pequeña o mayor que la mitad del diámetro del fruto. Esta cavidad contiene las semillas que pueden ser muy numerosas o prácticamente no existir. La pulpa es de color amarillo anaranjado o rojizo, succulenta y aromática, de sabor agradable y dulce [17].

### **2.1.6. Microorganismos**

Son organismos muy pequeños, no visibles a simple vista, de tamaño microscópico, dotados de individualidad, con una organización biológica elemental. Corresponden a organismos tales como bacterias, hongos y levaduras, es decir procariotas y eucariotas que midan menos de una décima de milímetro [18].

### **2.1.7. Hongos**

Organismos presentes en la naturaleza que al depositarse en un alimento son capaces de alterar sus características organolépticas. Existen hongos unicelulares como las levaduras y pluricelulares como los mohos. Algunos en la elaboración de alimentos y otros pueden causar el deterioro de los mismos [19].

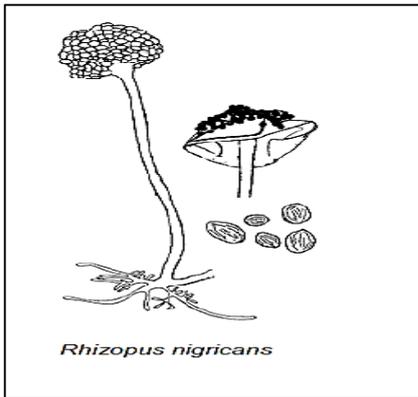
### **2.1.8. Mohos**

El término moho se suele aplicar para designar a ciertos hongos filamentosos multicelulares cuyo crecimiento en la superficie de los alimentos se suele reconocer fácilmente por su aspecto aterciopelado o algodonoso, a veces pigmentado. Generalmente todo alimento enmohecido se considera no apto para el consumo. La identificación y clasificación de los mohos se basa en observaciones macroscópicas y microscópicas [20].

### **2.1.9. *Rhizopus stolonifer***

Descripción morfológica: Hongo filamentosos que presenta esporangióforos sin ramificar (de hasta 2 mm x 20  $\mu$ m), de color pardo oscuro que nacen de un nudo de rizoides bien desarrollados. Esporangios esféricos negros (de hasta 275  $\mu$ m de diámetro) con columela. Esporangiosporas negras de 8 a 15  $\mu$ m. Abundantes rizoides y zigosporas esféricas de pared gruesa, desnuda (de hasta 200  $\mu$ m de diámetro) y clamidosporas ausentes.

**Figura 1.** Estructura del genero *Rhizopus*

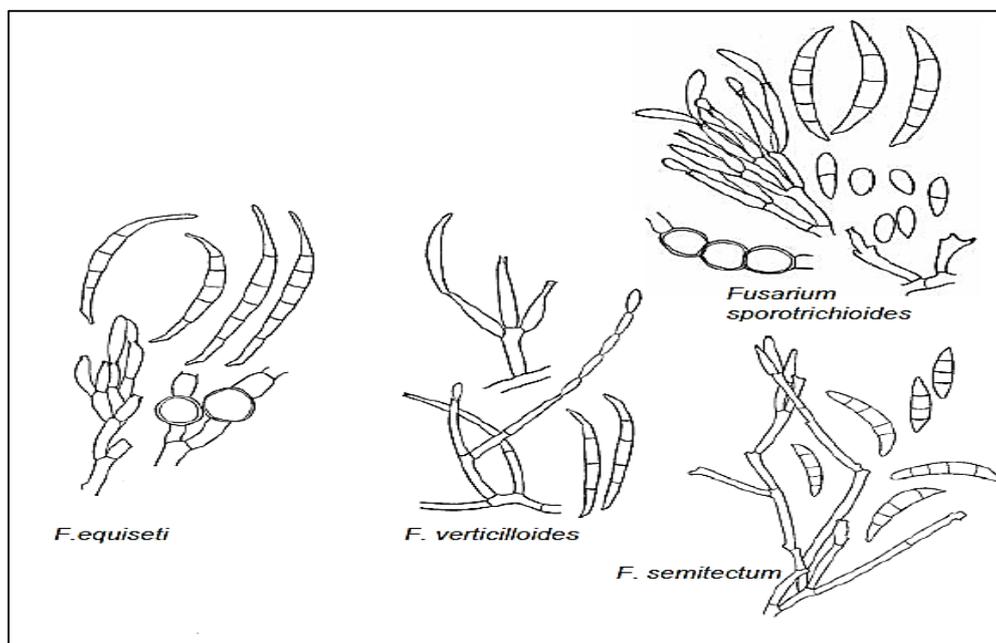


Colonias de crecimiento rápido (cubren prácticamente toda la superficie de la placa en tres días a 25 °C) de aspecto consistente, con denso micelio aéreo, algodonosas, al principio blancas, después gris oscuras (micelio rojizo, grisáceo o marrón). Se reconoce fácilmente por sus espolones hialinos o parduzcos, sus rizoides numerosos y pardos y sus esporangios negros y lustrosos (brillantes) [21].

### 2.1.10. *Fusarium sp*

Descripción mmorfológicas: Al microscopio, la fiálide es generalmente fina, con forma de botella; simple o ramificada; cortas o largas; monofialídica (que emergen esporas de un poro de la fiálide) o polifialídica (de varios poros). Los macroconidios presentan forma de medialuna, hialinos y septados. Para su correcta clasificación es importante el largo, ancho, curvatura, septos, agrupaciones mucoides (esporodoquios) y detalles de las células de los extremos (célula apical y pie). Los microconidios, ausentes en algunas especies, poseen variadas formas (fusiformes, ovales, clavadas, entre otras), agrupaciones (estructuras mucoides llamadas “falsas cabezas”), en cadenas largas o cortas; todas observables a la lupa (40x).

**Figura 2.** Estructura del genero *Fusarium sp*



Por último, pueden observarse las clamidosporas características con doble pared gruesa, lisa o rugosa; de manera aislada, en pareja o en grupo. Existen distintos medios que permiten su crecimiento; entre ellos, agar papa dextrosa (PDA), agar Sabouraud, agar Clavel (CLA), agar de Spezieller Nährstoff-farmer (SNA) y agar avena. Los agares PDA y Sabouraud permiten observar el diámetro de la colonia, morfología y pigmento (café, rojo, violeta, naranja, gris, blanco) difusible al medio, mientras que el agar CLA, permite observar el desarrollo de cadenas de microconidios y morfología en detalle de macroconidios [22].

### **2.1.11. Micotoxinas**

Son sustancias venenosas producidas por algunos hongos que se encuentran mayormente en las siembras de granos y en nueces, pero también pueden ser encontradas en el apio, jugo de uvas, manzanas y en otras frutas y vegetales. Existen muchos de ellos y científicos continuamente descubren hongos nuevos. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, por sus siglas en inglés) estima que un 25% de las cosechas a nivel mundial son afectadas por las micotoxinas, de las cuales las aflatoxinas son las más notorias [23].

Son compuestos ubicuos que difieren en sus propiedades químicas, biológicas y toxicológicas. Una micotoxicosis primaria se produce al consumir vegetales contaminados, y secundaria al ingerir carne o leche de animales que comieron forrajes con micotoxinas [24].

### **2.1.12. Metabolitos Secundarios**

Son utilizados como mecanismos de defensa de las plantas contra depredadores: microorganismos, insectos y herbívoros. Algunas plantas de las que se explotan su esencia (terpenoides), pigmentos (quinonas y taninos), su sabor (terpenoide capseisina del pimentón dulce) en donde se han encontrado que poseen propiedades medicinales. Algunas de las hierbas y especias que se utilizan para dar sazón a los alimentos también contienen compuestos con usos medicinales [25].

### 2.1.13. Actividad Antifúngica

Engloba cualquier sustancia capaz de producir una alteración tal de las estructuras de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, bien directa o indirectamente, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del huésped [26].

### 2.1.14. Terpenos

Estos compuestos son las sustancias más abundantes en el mundo de los productos naturales y están formadas por varias unidades isoprenicas, cuyo número sirve como criterio para la clasificación de los terpenos [12]:

**Tabla 3.** Clasificación de terpenos

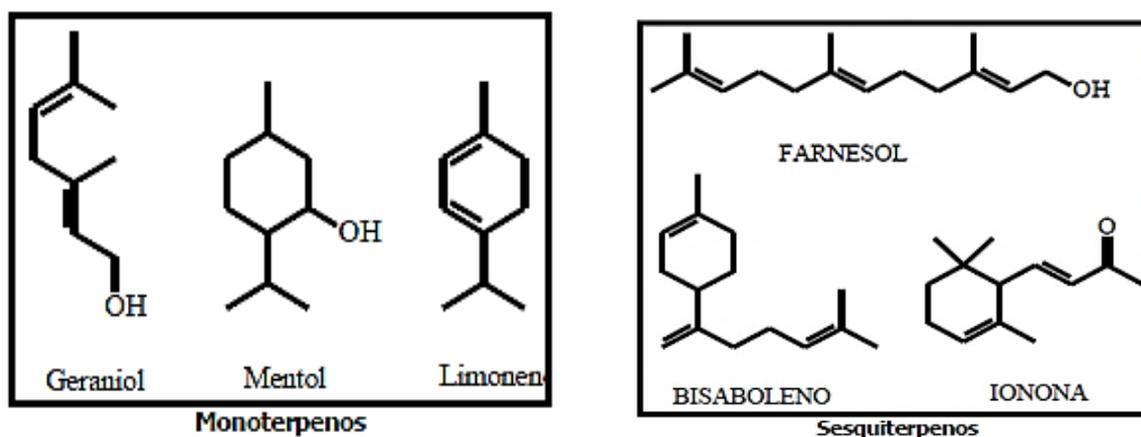
<b>Nombre</b>	<b>Unidades isoprenicas</b>	<b>Nº de átomos de carbono</b>
Monoterpenos	2	C <sub>10</sub>
Sesquiterpenos	3	C <sub>15</sub>
Diterpenos	4	C <sub>20</sub>
Sesterterpenos	5	C <sub>25</sub>
Triterpenos	6	C <sub>30</sub>
Carotenoides	8	C <sub>40</sub>
Resinoides	n	(C <sub>5</sub> ) <sub>n</sub>

Fuente: Pavas y Vega (2005)

### 2.1.15. Monoterpenos y sesquiterpenos

Son terpenos de 10 y 15 átomos de carbonos derivados biosintéticamente de geranilpirofosfato (GPP) y farnesilpirofosfato (FPP) respectivamente. La Figura muestra ejemplos de monoterpenos y sesquiterpenos naturales. De acuerdo con su estructura se les clasifica según el número de ciclos como acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, etc [14].

**Figura 3.** Monoterpenos y sesquiterpenos



Fuente: Martínez, A (2003)

### 2.1.16. Limoneno

El limoneno  $C_{10}H_{16}$  es un monoterpeno ópticamente activo, es empleado como solvente en champús y jabones para mascotas, como disolvente en la elaboración de pinturas, y ha sido empleado como ingrediente activo de formulaciones pesticidas [15].

## 2.2. Marco referencial

### 2.2.1. Aceites esenciales de cítricos

Los AE de los cítricos (mandarina, limón, naranja y lima) tienen una demanda alta, principalmente en la industria de alimentos, farmacéutica y de cosméticos, son utilizados en la preparación de aromatizantes, saborizantes, desinfectantes ambientales y en procesos de síntesis química. Los AE de cítricos pueden ser extraídos mediante prensado en frío, hidrodestilación, fluidos supercríticos e hidrodifusión con microondas y gravedad entre otros [27].

Los aceites esenciales de cítricos pueden ser una adecuada alternativa al uso de conservantes químicos en la industria de alimentos, al verificar la actividad antifúngica de aceites esenciales de limón, pomelo y naranjo dulce sobre los principales hongos causantes de pérdidas en los alimentos (*Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Penicillium chrysogenum* y *P. verrucosum*) [28].

### 2.2.2. Aceites esencial de corteza de limón

El aceite de limón, contiene aproximadamente 2 % de sustancias no volátiles en su mayoría en la forma de Coumarince, alrededor de 18 alcoholes, 16 aldehídos, 11 ésteres, 3 cetonas, 4 ácidos, y 23 hidrocarburos. Los componentes mayoritarios del aceite esencial obtenido por prensado de la cáscara son:

---

63 % limoneno (Monoterpeno monocíclico)

12 % beta-pineno (Monoterpeno Bicíclico)

9 % gama-terpineno (Monoterpeno monocíclico)

---

#### Otros componentes cualitativamente importantes son:

---

1,5 % geranial (aldehído)

1,0 % neral (limón) (aldehído)

0,5 % neril acetato (frutal, floral, rosa)

0,4 % geranil acetato (frutal, floral, rosa)

0,2 % citronelal (fuerte, cítrico, verde)

0,2 % linalol (brillante, lavanda) (monoterpeno acíclico)

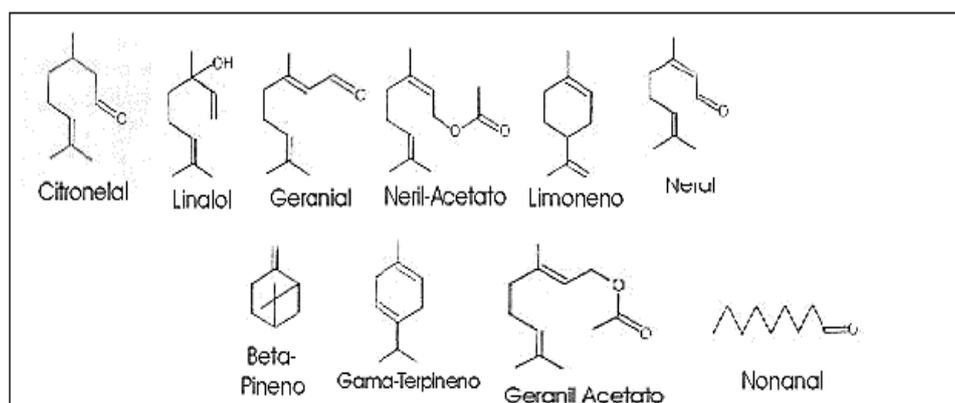
0,1 % nonanal (fuerte)

---

Fuente: Cerutti & Neumayer (2004).

Los hidrocarburos de terpenos, los cuales constituyen la mayor parte del aceite son insolubles en agua y susceptibles a oxidaciones. Para producir un aceite estable y soluble se llevan a cabo operaciones de extracción, concentración y deterpenización [29].

**Figura 4.** Compuestos del aceite esencial de corteza de limón



Fuente: Cerutti & Neumayer (2004).

### 2.2.3. Aceites esenciales de hojas de limón

Los aceites esenciales de hojas de cítricos aislados "Pant Limón-1" tiene al limoneno (38,2% respectivamente) como el principal constituyente, y otros en menor porcentaje como se detalla a continuación [30]:

---

38 % limoneno
15 % geranial
10 % neral
8 % linalool

---

**Otros componentes cualitativamente importantes son:**

---

3,5 % neral
3,2 % 6-methyl-hept-5-en-2-one
3,0 % alfa terpineol
3,0 % geraniol
1,8 % oxido linalool
1,4 % citronellol
0,8 % linalool
0,2 % alfa- pinene
0,1 % Beta-terpineol
0,1 % citronellal

---

Fuente: Kumar, B, Pant, Gupta, & Brophy (2015)

### 2.2.4. Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium* sp. aislado de papaya (*Carica papaya*)

El efecto antifúngico de aceites esenciales y sus compuestos fue investigado en bioensayos de inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium* sp. Durante ocho días de incubación se midió el diámetro de la colonia y se determinó la tasa de crecimiento micelial. En general, el mejor efecto antifúngico fue observado con el aceite de *Thymus vulgaris*, el cual presentó una total inhibición a 200, 250 y 300 µg/ml. Los aceites de *Cinnamomum zeylanicum*, *Syzygium aromaticum* y *Teloxys ambrosioides*, exhibieron una inhibición del crecimiento micelial dependiente de la dosis al incrementarla de 100 a 300 µg/ml. Mientras

que los aceites de *Allium sativum*, *Citrus aurantifolia*, *Ruta chalepensis*, *Mentha piperita* y *Eucalyptus globulus* tuvieron actividad antifúngica baja en las diferentes concentraciones probadas. Todos los compuestos con excepción del cineol tuvieron un efecto fungicida o fungistático [31].

### **2.2.5. Actividad antifúngica del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis* L.) sobre hongos postcosecha en frutos de lechosa (*Carica papaya* L.)**

Los hongos postcosecha causan pudriciones que afectan la calidad de los frutos de lechosa (*Carica papaya* L.). Actualmente los aceites esenciales son considerados una alternativa a los fungicidas químicos para controlar estos hongos. En este estudio se evaluó la actividad antifúngica del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis* L.) sobre los hongos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Penicillium indicum*, *Fusarium solani*, *Rhizopus stolonifer* y *Aspergillus flavus*, en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) en un diseño completamente al azar. Los resultados mostraron que existe un efecto inhibitor del aceite esencial de naranja (AEN) en el crecimiento micelial de los hongos *in vitro*, superior al 80% a concentración de AE de 1%, y 100% de inhibición a concentraciones de 2,5% y 5% de AE ( $p < 0,05$ ). Al ser utilizado como recubrimiento de los frutos, a concentraciones de 2,5% y 5%, disminuye la presencia de lesiones en los mismos, sin diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), con igual comportamiento en efectividad *in vitro* e *in vivo*. El AEN puede ser una alternativa factible, para el control natural y eficaz de hongos postcosecha, causantes de grandes pérdidas en frutas para exportación y consumo [3].

### **2.2.6. Evaluación preliminar de la actividad fungicida de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus tereticornis*, *Myrtaceae*) y cáscara de naranja (*Citrus sinensis*, *Rutaceae*) sobre algunos hongos filamentosos**

Se evaluó la actividad antifúngica de los aceites esenciales de *Eucalyptus sp* (*Myrtaceae*) y cascara de naranja, *Citrus sinensis* (*Rutaceae*) a diferentes concentraciones frente a los modelos biológicos: *Trichoderma harzianum*, *Absidia sp* y *Fusarium oxysporum*, hongo que es considerado como un patógeno importante de humanos y plantas. El aceite esencial de eucalipto inhibió completamente el crecimiento de este hongo a 3000 ppm, mostrando mayor potencial inhibitorio que el fungicida comercial Dithane empleado a 10000 ppm. Los hongos *Absidia sp* y *Trichoderma harzianum* resultaron ser más susceptibles a los

componentes del aceite y su crecimiento fue inhibido por completo a 1000 ppm. El aceite esencial de cascara de naranja fue menos efectivo y solamente mostro actividad fungicida sobre el hongo *Trichoderma harzianum* a 11000 ppm [32].

### **2.2.7. Efecto de cuatro aceites esenciales sobre *Fusarium sp***

En este trabajo se determinó la actividad antifúngica *in vitro*, de cuatro aceites esenciales, sobre tres aislados de *Fusarium sp.* (F2 y F5 de *Fusarium solani* (Martius) Appel & Wollenweber emend. Snyder & Hansen y F3 de *Fusarium redolens* Wollenweber), patógenos en el cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Cuba. El bioensayo se realizó según un diseño completamente aleatorizado y se utilizó el método de discos de papel de filtro inoculados con los aceites, colocados en contacto directo con los discos de los aislados de *Fusarium*. Se evaluó el crecimiento radial de los hongos hasta las 96 horas. El aceite de *Piper auritum* Kunth (caisimón de anís) provocó total inhibición en el crecimiento de los aislados del fitopatógeno; por su parte, el aceite de *Piper aduncum* subsp. *ossanum* (C. DC.) Saralegui (platanillo de Cuba) demostró poseer alto poder fungistático. El aceite de *Melaleuca quinquenervia* (Cav) S.T. Blake (melaleuca) produjo poca inhibición del crecimiento en los tres aislados, y el de *Citrus sinensis* L. Osbeck (naranja dulce) (a la concentración evaluada) no inhibió ningún aislado, lo que limita el posible uso de estos en la práctica. El aceite de caisimón de anís, resultó ser el más destacado, se recomienda continuar investigando sus propiedades para el control de fitopatógenos [33].

### **2.2.8. Evaluación *in vitro* de la actividad fungistática del aceite esencial de mandarina sobre el crecimiento de *Penicillium sp***

En este trabajo se evaluó y comparo *in vitro* la actividad antifúngica del aceite comercial de mandarina, timol y carvacrol, a concentraciones de 40 y 50 ppm, usando el método de difusión en agar y pruebas microbiológicas. Todos los compuestos y aceites evaluados presentaron un porcentaje de inhibición entre 50% y 100%, para ambos hongos, siendo mayor la inhibición en dosis de 50 ppm. Caracol presento mayor actividad antifúngica sobre ambos hongos. *P. digitatum* mostro mayor sensibilidad que *P. italicum* al efecto de los aceites esenciales evaluados. El aceite esencial comercial de mandarina puede ser una

alternativa para el control de enfermedades poscosecha causadas por *Penicillium* sp., en productos vegetales [28].

### **2.2.9. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils**

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de los aceites esenciales de limón (*Citrus lemon* L.), mandarina (*Citrus reticulata* L.) Pomelo (*Citrus paradisi* L.) y naranja (*Citrus sinensis* L.) en el crecimiento de mohos comúnmente asociados con el deterioro de los alimentos: *Aspergillus Niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium chrysogenum* y *Penicillium verrucosum*, utilizando el método de dilución en agar. Todos los aceites mostraron Antifúngica contra todos los moldes. El aceite esencial de naranja fue el más eficaz contra *A. niger*, el aceite esencial de mandarina fue más Eficaz para reducir el crecimiento de *Aspergillus flavus* mientras que el pomelo fue el mejor inhibidor de los moldes *P. chrysogenum* y *P. verrucosum*. Los aceites esenciales de cítricos podrían considerarse alternativas adecuadas a los aditivos químicos para uso en la industria alimentaria [34].

### **2.2.10. Desarrollo de un envase activo adicionado con aceites esenciales de cítricos para el control de la podredumbre en fresa**

Por lo que el objetivo de este trabajo fue desarrollar un envase activo adicionado con aceites esenciales de cítricos (naranja, limon y toronja) para controlar el hongo *Botrytis cinérea* en la fresa y alargar su vida útil. Fresas de la variedad Camarosa fueron empleadas, así como cítricos (naranja, limon y toronja) para la obtención de aceites esenciales por hidrodestilacion. Para establecer el efecto antifúngico de los aceites esenciales se realizaron pruebas *in vitro* empleando tres concentraciones (9000, 10000 y 11000 ppm) seleccionando el aceite que tuvo mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Botrytis cinerea*. Posteriormente se desarrollaron dos prototipos de envases conteniendo el aceite esencial de cítricos como principio activo; uno en forma de barniz y otro en esferas de gel. Se realizaron pruebas *in vivo* en fresas almacenadas en los dos prototipos de envases activos y se evaluaron los parámetros de calidad: firmeza, pérdida de peso, índice de decaimiento y color. La concentración de 11000 ppm del aceite de limon presento inhibición del hongo del 24 - 28% a los 10 días de incubación. Las pruebas *in vitro* de los

envases activos registraron una inhibición del hongo del 98.2% para los prototipos elaborados como esferas y 13.92% para el prototipo aplicado como barniz. En las pruebas *in vivo*, el efecto de los envases sobre el control de la enfermedad en la fresa fue significativo, ya que hubo menos pérdida de peso de los frutos y presentaron menor incidencia de la enfermedad llegando a ser de alrededor de 3%. Se concluye que los envases activos desarrollados en esta investigación fueron una buena alternativa para el control de la podredumbre gris y conservación de la fresa [39].

**CAPÍTULO III**  
**METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

### 3.1. Localización

Este estudio se realizó en el laboratorio de Microbiología y Biotecnología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Campus Universitario “Ing. Manuel Haz” Km 1,5 Vía Sto. Domingo, utilizando los materiales y equipos que allí se disponen.

Tabla 4. Ubicación geográfica

Geodésica	
Altitud:	115, 328 m.s.n.m
Longitud:	79° 28' 10,4542" W
Latitud:	01° 00' 44,1169" S

**Fuente:** IGM (Instituto Geográfico Militar).

#### 3.1.1. Obtención de materiales para la investigación

Para ésta investigación se utilizó aceite esencial *Citrus limon* de corteza, procedentes de la casa comercial *ISABRUBOTANIK S.A* de la ciudad de Ambato Provincia de Tungurahua, y aceite esencial *Citrus limon* de hojas obtenido del hidrodestilador en el laboratorio de Biotecnología área de biología molecular de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, la materia prima utilizada para obtención de dichos aceites provienen de cultivos orgánicos.

La *Carica papaya* L utilizadas para aislamiento de hongos y las hojas *Citrus limon* para hidrodestilar se la tomo de una pequeña finca situada en el Recinto la Ercilia perteneciente al Cantón Ventanas, mientras que la *Carica papaya* var. *Solo sunrise* fue tomada del mercado del Cantón Quevedo proveniente de la Ciudad de Buena Fe.

### 3.2. Tipo de investigación

Es de tipo experimental ya que busca evaluar la influencia aceites de *Citrus limon* de hojas y corteza frente a la inhibición de hongos patógenos la cual determinada una acción y posterior a ello tiene una demostración o efecto, se manifiesta mediante un resultado.

### 3.3. Métodos de investigación

**Método científico:** utiliza como pauta un modelo a seguir que orienta la investigación o sea la recopilación de la información secundaria previamente recolectada.

**Método de observación:** es de carácter directa se realizaron mediciones por este método como lo es radiales, identificación de hongos y conteo de esporas guiados por la recopilación de información de un protocolo claro en garantía de que estos resultados son veraces al aplicar este método.

**Método inductivo - deductivo:** es probabilístico ya que demuestra matemáticamente en este caso mediante diseño estadístico como es Statgraphics e InfoStat si el pronóstico de la investigación es acertado o no.

**Método analítico y síntesis:** estable relación entre la los microorganismos patógenos identificados (causa) y la actividad antifúngica que ejerce los aceites esenciales (efecto) o sea el objeto de la investigación

### 3.4. Fuentes de recopilación de información

La información recolectada para la investigación se la obtuvo de fuentes secundarias como: revistas científicas, libros etc. y de fuente primaria los datos obtenidos en la fase experimental de la investigación.

### 3.5. Diseño de la investigación

#### 3.5.1. Factores de estudio

Los factores de estudio que interviene en la investigación corresponden a lo siguiente:

**Cuadro 1:** Descripción Factores de Estudio para la Identificación de la actividad antifúngica de aceites esenciales de hojas y corteza de *Citrus limon* (limón sutil) para la inhibición de hongos de papaya

Factores	Simbología	Descripción
<b>A: Hongos Patógenos</b>	a <sub>0</sub>	Papaya Maradol
	a <sub>1</sub>	Papaya Hawaiana
<b>B: Aceite Esencial</b>	b <sub>0</sub>	Hojas
	b <sub>1</sub>	Cortezas (comercial)
	c <sub>0</sub>	1 %
<b>C: Concentraciones</b>	c <sub>1</sub>	2 %
	c <sub>2</sub>	3 %

Elaborado por: Vélez, S. 2016

### 3.6. Instrumentos de investigación

En esta investigación se evalúa el porcentaje de inhibición micelial o radial y germinación de esporas mediante fórmulas ya establecidas, luego estos datos se los introdujo en un programa estadístico en la que se obtuvo las medias porcentuales en el que se determina si existe o no diferencias significativas.

### 3.7. Tratamiento de los datos

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

**Cuadro 2:** Combinación de los tratamientos propuestos para la Identificación de la actividad antifúngica de aceites esenciales de hojas y corteza de *Citrus limon* (limón sutil) para la inhibición de hongos de papaya

TRATAMIENTO	SIMBOLOGÍA	DESCRIPCIÓN
T1	a <sub>0</sub> b <sub>0</sub> c <sub>0</sub>	Hongos Papaya Maradol + AE Hojas + 1 %
T2	a <sub>0</sub> b <sub>0</sub> c <sub>1</sub>	Hongos Papaya Maradol + AE Hojas + 2 %
T3	a <sub>0</sub> b <sub>0</sub> c <sub>2</sub>	Hongos Papaya Maradol + AE Hojas + 3 %
T4	a <sub>0</sub> b <sub>1</sub> c <sub>0</sub>	Hongos Papaya Maradol + Corteza comercial + 1 %
T5	a <sub>0</sub> b <sub>1</sub> c <sub>1</sub>	Hongos Papaya Maradol +Corteza comercial + 2 %
T6	a <sub>0</sub> b <sub>1</sub> c <sub>2</sub>	Hongos Papaya Maradol +Corteza comercial + 3 %
T7	a <sub>1</sub> b <sub>0</sub> c <sub>0</sub>	Hongos Papaya Hawaiana + AE Hojas + 1 %
T8	a <sub>1</sub> b <sub>0</sub> c <sub>1</sub>	Hongos Papaya Hawaiana + AE Hojas + 2 %
T9	a <sub>1</sub> b <sub>0</sub> c <sub>2</sub>	Hongos Papaya Hawaiana + AE Hojas + 3 %
T10	a <sub>1</sub> b <sub>1</sub> c <sub>0</sub>	Hongos Papaya Hawaiana +Corteza comercial +1 %
T11	a <sub>1</sub> b <sub>1</sub> c <sub>1</sub>	Hongos Papaya Hawaiana +Corteza comercial + 2 %
T12	a <sub>1</sub> b <sub>1</sub> c <sub>2</sub>	Hongos Papaya Hawaiana +Corteza comercial + 3 %

Elaborado por: Vélez, S. 2016

### 3.8. Recursos humanos y materiales

#### 3.8.1. Recursos humanos

Tutor de proyecto de investigación

Jefe de laboratorio de Microbiología

Jefe de laboratorio de Biología Molecular

### 3.8.2. Materiales de laboratorio

**Cuadro 2.** Materiales, equipo y reactivos para aislamientos de hongos

<b>Aislamiento hongos de <i>Carica papaya</i> L y <i>Carica papaya</i> var. <i>Solo surinse</i></b>		
Materiales	Equipos	Reactivos
Algodón	Cámara de	PDA (Papa Dextrosa Agar) con
Bisturí	aislamiento laminar	antibiótico (Sulfato de Estreptomicina
Cajas Petri	Incubadora	y Cloranfenicol “GM”) al 1 %.
Cinta Parafilm		Alcohol
Marcador indeleble		Agua esterilizada
Mechero		Hipoclorito al 3 %
Papel toalla		
Pinzas de disección		
Probeta 100 mL		

**Elaborado por:** Vélez, S. 2016

**Cuadro 3.** Materiales, equipo y reactivos para preparación de PDA

<b>PDA (Papa Dextrosa Agar)</b>		
Materiales	Equipos	Reactivos
Algodón	Autoclave	PDA (Papa Dextrosa Agar)
Matraz Erlenmeyer 1000 mL	Balanza	Sulfato de Estreptomicina y
Marcador indelible	Microondas	Cloranfenicol “GM”
Micropipeta de 100 µL a	Refrigerador	Agua destilada
1000 µL		Alcohol
Papel aluminio		
Varilla de vidrio		

**Elaborado por:** Vélez, S. 2016

**Cuadro 4.** Materiales, equipo y reactivos para repique de hongos

<b>Repique de hongos</b>		
Materiales	Equipos	Otros
Algodón	Cámara de aislamiento	Hongo madres por identificar
Asa	laminar	Alcohol
Cajas Petri	Incubadora	
Gradilla	Refrigerador	
Marcador indeleble		
Mechero		
Tubos de ensayo		

**Elaborado por:** Vélez, S. 2016

**Cuadro 5.** Materiales, equipo y reactivos para inhibición de hongos

<b>Inhibición de hongos</b>		
Materiales	Equipos	Reactivos
Algodón	Cámara de flujo laminar	PDA (Papa Dextrosa Agar)
Asa	Incubadora	Sulfato de Estreptomicina y
Cajas Petri	Contador de colonias	Cloranfenicol “GM”
Calibrador de Vernier		Alcohol
Cinta Parafilm		Agua destilada
Marcador indelible		Aceite esencial de hojas y
Matraz Erlenmeyer 100 mL		corteza de limón
Mechero		Solución de TWEEN 20
Micropipeta de 100 µL a 1000 µL		
Pipetas Pasteur esterilizadas		
Probeta de 100 mL		

**Elaborado por:** Vélez, S. 2016

**Cuadro 6.** Materiales, equipo y reactivos para conteo de esporas

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

**Elaborado por:** Vélez, S. 2016

### 3.9. Manejo específico del experimento

#### ➤ Obtención de los aceites esenciales

El aceite esencial de corteza de limón se lo adquirió en casa comercial *ISABRUBOTANIK S.A*, mientras que por método de hidrodestilación se obtuvo el aceite esencial de hojas el proceso que se llevó acabo colocando en el equipo hidrodestilador 2000 g de la muestra y 4000 mL de agua a temperatura de 90 °C hasta que llegue al punto de ebullición luego se le baja a 70 °C por 4 horas para la separación de agua y aceite se utilizó éter etílico y sulfato de sodio, conservando los aceites en frascos ámbar protegidos de la luz en refrigeración a 4 °C este protocolo es similar al del autor [35].

### ➤ **Preparación del PDA (Papa Dextrosa Agar)**

Para la preparación del PDA (Papa Dextrosa Agar) se realizó de acuerdo a la técnica del (Anexo N°14) utilizando 39g de PDA disolviendo en 400mL de agua se mantuvo en el microondas durante 10 minutos esperando que se disuelva completamente se agregan 600mL de agua quedando de un color claro, se debe evitar que se derrame en el microondas ya que se pierde la concentración, cuando estuvo completamente disuelto se esterilizó por tres horas en el autoclave para su conservación se lo mantuvo en refrigeración, luego para su utilización se aplicó antibióticos (Sulfato de Estreptomicina "GM" y Cloranfenicol Succinato "GM") [35].

### ➤ **Desinfección de la papaya**

La papaya se lavó con agua eliminando cualquier residuo de tierra y micelio de algún hongo que se halla desarrollado; luego se desinfectó con una solución de hipoclorito de sodio al 3% durante 2 minutos se enjuagó tres veces con agua esterilizada para eliminar los residuos de cloro ya que si no se realiza los hongos no se desarrollan; posteriormente se secó con papel toalla esterilizado [35].

### ➤ **Aislamiento de los hongos**

El aislamiento de los hongos se utilizó la técnica del (Anexo N° 14) realizándose en la cámara de aislamiento laminar previamente desinfectada con alcohol, retirando el epicarpio con el bisturí esterilizado cortando pequeños fragmentos de mesocarpio de la papaya, con la pinza esterilizada se siembra cinco porciones fracciones de papaya en la caja Petri dispensada con PDA (Papa Dextrosa Agar) rotulando y sellando con cinta Parafilm para dejar en la incubadora por 7 días a 26°C; cuando el hongo se desarrolló completamente se mantuvo en refrigeración ya que es la muestra madre [35].

### ➤ **Repique de hongos aislados**

El hongo se aísla en la cámara laminar cerca del mechero se abre la caja petri del hongo madre con el asa se quitó una parte del hongo sembrándolo en el centro de los tubos de ensayo con PDA (Papa Dextrosa Agar) tipo pico flauta se dejaron en la incubadora a 26°C por 5 días; posteriormente para conocer el tiempo de desarrollo del hongos se sembró en cajas Petri y se esperó hasta que el hongo cubrió totalmente la caja; el *Rhizopus stolonifer* se desarrolló en 2 días mientras que el *Fusarium sp* en 4 días en el caso de tubos de ensayos ya que en cajas petri fue distinto [35].

### ➤ **Proceso de Inhibición radial de hongos**

Para la inhibición de los hongos (*Rhizopus stolonifer sp* y *Fusarium sp*) se dejaron dos testigo para comparar con los tratamientos evaluando el porcentaje de inhibición de el aceite esencial de limón obtenidos de la corteza y hojas; se utilizaron concentraciones de 1%,2% y 3% disueltos en una solución de Tween 20 y PDA dispensado en cajas Petri, se sembró los hongos dejándolos en la incubadora a 26°C; se realizó un control del desarrollo de los hongos durante 7 días midiendo el crecimiento radial con el calibrador Vernaut y el contador de colonias; para calcular el % de inhibición del crecimiento radial de los hongos se utilizó la siguiente fórmula: [35]

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

### ➤ **Proceso de Inhibición de esporas**

Para el conteo de esporas se aplicó la técnica (Anexo N°14); donde se empleó 10mL de agua esterilizada en la caja Petri donde se desarrolló el hongo con una varilla se raspó el micelio filtrandose en microtubos eppendorf, se aplicó una gota de la solución de TWEEN 20 y se agitó por 10 segundos, en la cámara de Neubauer se cubrió con el líquido obtenido y se cubrió con un cubreobjeto situándolo en el microscopio Olympus CX21 observando las esporas con el lente 10 contándolas con el contador de esporas; para calcular el porcentaje de inhibición de las esporas se aplicó la siguiente fórmula: [35]

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

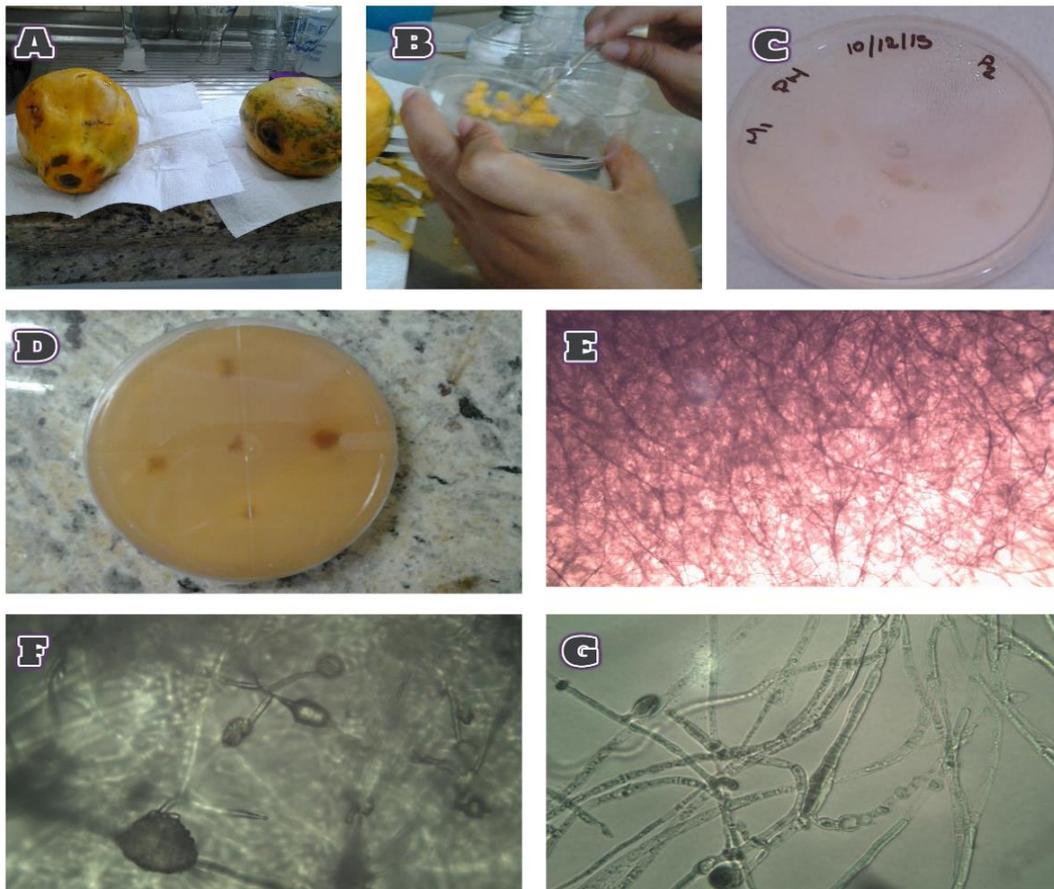
**CAPÍTULO IV**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 4.1. Resultados

### 4.1.1. Aislamiento e identificación de hongos patógenos presentes en *Carica papaya* L. y *Carica papaya* var. *Solo Sunrise*

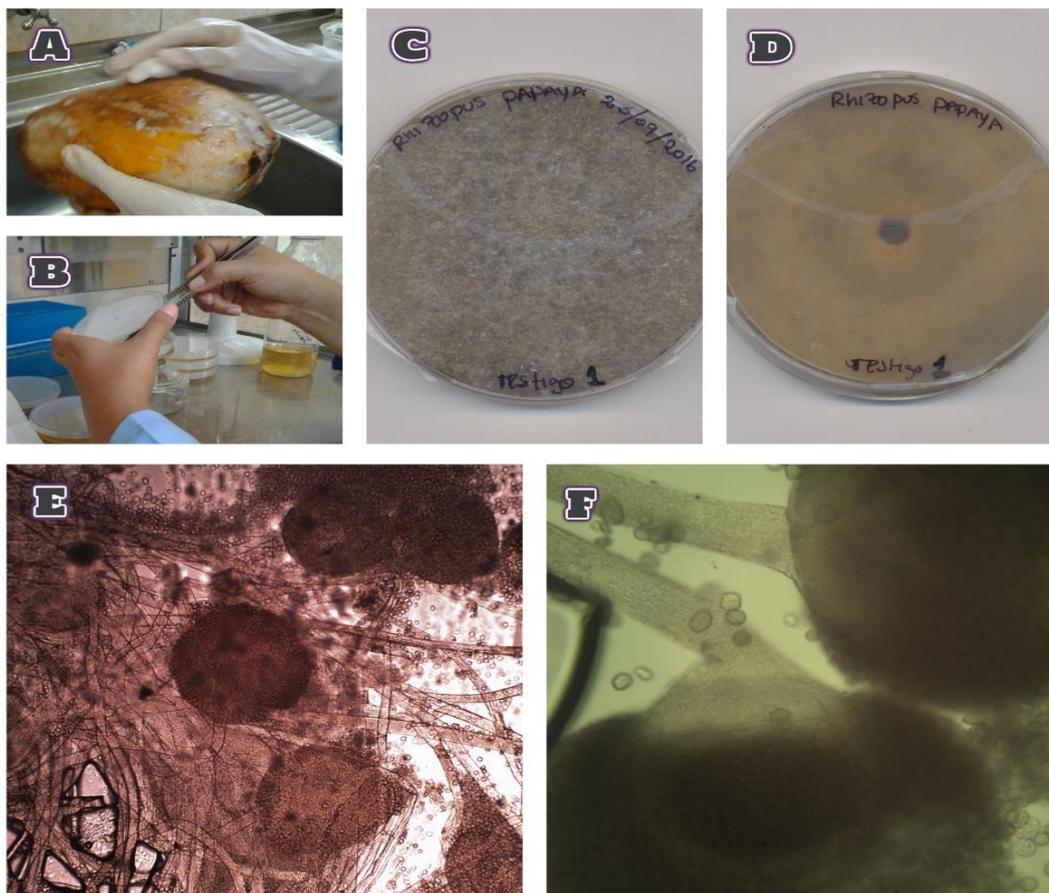
Se realizó el aislamiento a partir de frutos infectados identificando a *Fusarium* sp de *Carica papaya* L. y *Rhizopus stolonifer* en *Carica papaya* var. *Solo Sunrise*. Se tomó pequeñas partes de muestra de papaya para incubación en PDA a 26°C.

*Fusarium* sp: macroscópicamente se evidencio una colonia con vellosidades o lanosidad blanca, su tonalidad varía de durazno, crema a pardo rojizo, crece de 5,5 a 6,5 en 7 días. Su microscopia expone micelio ramificado, cuerpo fructífero en forma rugosa, y clamidosporas de doble pared gruesa, lisa o rugosa (Figura 1), según el autor [36] este género corresponde al orden microbiológico de los Hypocreales y familia Nectriaceae.



**Figura 1.** Aislamiento e identificación de *Fusarium* sp. en *Carica papaya* L. A, Papaya infectada. B, Muestras tomadas de Papaya. C, cultivo de *Fusarium* sp. a los 7 días de incubación a 27°C (anterior). D, cultivo de *Fusarium* sp. a los 7 días de incubación a 27°C (posterior). E, micelio. F, cuerpo fructífero. G, clamidosporas características con doble pared gruesa. **Elaborado por:** Vélez, S. 2016

*Rhizopus stolonifer*: macroscópicamente se observó micelio blanco cambiando a gris, en 3 días cubre la caja Petri en su totalidad. Su microscopía muestra micelio aseptado y esporangioforo con columela (Figura 2), según el autor [37] el orden microbiológico al que pertenece este género es al de Mucorales.



**Figura 2. Aislamiento e identificación de *R. stolonifer* en *Carica papaya* var. Solo Sunrise.**  
 A, Papaya infectada. B, siembra de muestra. C, cultivo de *R. stolonifer* a los 7 días de incubación a 27°C (anterior). D, cultivo de *R. stolonifer* a los 7 días de incubación a 27°C (posterior). E, micelio aseptado. F, esporangioforo. **Elaborado por:** Vélez, S. 2016

#### **4.1.2. Concentración inhibitoria de aceite esencial de *Citrus limon* de hojas obtenido por hidrodestilación y de aceite comercial de corteza en hongos identificados de *Carica papaya* L. y *Carica papaya* var. Solo Sunrise**

La evaluación del porcentaje de inhibición crecimiento radial, dada por siembra del contenido patógeno más concentración de aceite esencial *Citrus limon* se observó que el tratamiento más bajo en actividad antifúngica fue a0b1c0 es decir aceite esencial comercial a concentración de 1% frente a *Fusarium sp*, valoración en 48 horas, mientras que para 96 y

168 horas presentan similitud ya que su valor más bajo fue  $a_1b_1c_0$  aceite esencial comercial a concentración de 1% frente a *Rhizopus stolonifer*.

Las medias de inhibición más altas fueron para  $a_0b_0c_2$ ,  $a_0b_0c_1$  como lo es aceite esencial de hojas a concentración de 2% y 3% frente a *Fusarium sp*,  $a_1b_0c_0$ ,  $a_1b_0c_1$ ,  $a_1b_0c_2$  es decir aceite esencial de hojas a concentración de 1%, 2% y 3% frente a *Rhizopus stolonifer* y  $a_1b_1c_1$ ,  $a_1b_1c_2$  como lo es aceite esencial comercial a concentración de 2% y 3% frente a *Rhizopus stolonifer*, resultados para estimación de 48, 96 y 168 horas, existiendo diferencia significativa respecto a los valores más bajos.

Los demás tratamientos presentan valores medios, medios altos y medios bajos, resultados que se expresan juntos a los demás tratamientos de medias porcentuales para inhibición de crecimiento micelial estos se evaluaron mediante InfoStat con prueba de significación tukey, como se muestra a continuación.

**Cuadro 8.** Medias de inhibición en crecimiento radial entre interacciones

Descripción	Simbología	% de inhibición crecimiento radial		
		48	96	168
AE Hojas 1%, <i>Fusarium sp</i>	$a_0b_0c_0$	88,5 ± 0,58 d	95 ± 0,43 e	95 ± 0,33 e
AE Hojas 2%, <i>Fusarium sp</i>	$a_0b_0c_1$	100 ± 0,58 e	100 ± 0,43 f	100 ± 0,33 f
AE Hojas 3% <i>Fusarium sp</i>	$a_0b_0c_2$	100 ± 0,58 e	100 ± 0,43 f	100 ± 0,33 f
AE Corteza comercial 1%, <i>Fusarium sp</i>	$a_0b_1c_0$	53 ± 0,58 a	39,5 ± 0,43 b	15,5 ± 0,33 b
AE Corteza comercial 2%, <i>Fusarium sp</i>	$a_0b_1c_1$	75 ± 0,58 c	59 ± 0,43 c	37 ± 0,33 c
AE Corteza comercial 3%, <i>Fusarium sp</i>	$a_0b_1c_2$	77,5 ± 0,58 c	68 ± 0,43 d	55 ± 0,33 d
AE Hojas al 1 %, <i>R. Stolonifer</i>	$a_1b_0c_0$	100 ± 0,58 e	100 ± 0,43 f	100 ± 0,33 f
AE Hojas al 2%, <i>R. Stolonifer</i>	$a_1b_0c_1$	100 ± 0,58 e	100 ± 0,43 f	100 ± 0,33 f
AE Hojas al 3%, <i>R. Stolonifer</i>	$a_1b_0c_2$	100 ± 0,58 e	100 ± 0,43 f	100 ± 0,33 f
AE Corteza comercial 1%, <i>R. Stolonifer</i>	$a_1b_1c_0$	61,5 ± 0,58 b	0 ± 0,43 a	0 ± 0,33 a
AE Corteza comercial 2%, <i>R. Stolonifer</i>	$a_1b_1c_1$	100 ± 0,58 c	100 ± 0,43 f	100 ± 0,33 f
AE Corteza comercial 3%, <i>R. Stolonifer</i>	$a_1b_1c_2$	100 ± 0,58 c	100 ± 0,43 f	100 ± 0,33 f

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) Tukey

**Elaborado por:** Vélez, S. 2016

El arreglo factorial para el porcentaje de inhibición de esporas, determina que el valores más bajos fueron para el tratamiento  $a_0b_1c_0$  es decir aceite esencial comercial al 1% frente a *Fusarium sp.*

Mientras que los valores más altos fueron para  $a_0b_0c_1$ ,  $a_0b_0c_2$  tal como lo es aceite esencial de hojas al 2% y 3% frente a *Fusarium sp.*,  $a_1b_0c_0$ ,  $a_1b_0c_1$ ,  $a_1b_0c_2$  es decir aceite esencial de hojas a concentración de 1%, 2% y 3% frente a *Rhizopus stolonifer* y  $a_1b_1c_1$ ,  $a_1b_1c_2$  como lo es aceite esencial comercial a concentración de 2% y 3% frente a *Rhizopus stolonifer*, por lo tanto existe diferencia significativa respecto a los valores más bajos.

Se evidencia valores medios para los demás tratamientos a continuación se muestra los porcentajes de inhibición de esporas con arreglo factorial es decir interacciones de los tratamientos.

**Cuadro 9.** Medias de inhibición en germinación de esporas entre interacciones

Descripción	Simbología	% de inhibición esporas	
AE Hojas 1%, <i>Fusarium sp</i>	$a_0b_0c_0$	$91 \pm 0,62$	d
AE Hojas 2%, <i>Fusarium sp</i>	$a_0b_0c_1$	$100 \pm 0,62$	e
AE Hojas 3% <i>Fusarium sp</i>	$a_0b_0c_2$	$100 \pm 0,62$	e
AE Corteza comercial 1%, <i>Fusarium sp</i>	$a_0b_1c_0$	$78 \pm 0,62$	a
AE Corteza comercial 2%, <i>Fusarium sp</i>	$a_0b_1c_1$	$84,5 \pm 0,62$	bc
AE Corteza comercial 3%, <i>Fusarium sp</i>	$a_0b_1c_2$	$87,5 \pm 0,62$	cd
AE Hojas al 1 %, <i>R. Stolonifer</i>	$a_1b_0c_0$	$100 \pm 0,62$	e
AE Hojas al 2%, <i>R. Stolonifer</i>	$a_1b_0c_1$	$100 \pm 0,62$	e
AE Hojas al 3%, <i>R. Stolonifer</i>	$a_1b_0c_2$	$100 \pm 0,62$	e
AE Corteza comercial 1%, <i>R. Stolonifer</i>	$a_1b_1c_0$	$83 \pm 0,62$	b
AE Corteza comercial 2%, <i>R. Stolonifer</i>	$a_1b_1c_1$	$100 \pm 0,62$	e
AE Corteza comercial 3%, <i>R. Stolonifer</i>	$a_1b_1c_2$	$100 \pm 0,62$	e

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) Tukey

**Elaborado por:** Vélez, S. 2016

### 4.1.3. Comparar la actividad Antifúngica del aceite esencial de *Citrus limon* (Limón sutil) de hojas obtenido por hidrodestilacion y de aceite comercial de corteza

La comparación porcentual de medias entre factores indica la actividad antifúngica de los dos aceites esenciales evaluados para inhibición radial muestra que: Factor A su nivel más bajo es a<sub>0</sub> lo que expresa que *Fusarium sp* reporto más resistencia frente a los aceites esenciales, no así a<sub>1</sub> *R. stolonifer* que expresa diferencia significativa.

El Factor B demuestra que b<sub>0</sub>, aceite esencial de *C. limon* hojas obtenido por hidrodestilacion tiene mayor potencial antifúngico que b<sub>1</sub>, aceite esencial de *C. limon* de corteza comercial es por ello que este último presenta el nivel mas bajo.

Mientras que el Factor C su valor más bajo es c<sub>0</sub> concentración al 1% de aceite se observa que no inhibió significativamente, no así para c<sub>1</sub> y c<sub>2</sub> concentración al 2% y 3% de aceite que presento mayor viabilidad en inhibición de esporas y crecimiento micelial a 48 horas, entretanto el nivel más alto en este factor para 96 y 168 horas es c<sub>2</sub> concentración al 3% de aceite esencial.

**Cuadro 10.** Medias de inhibición en crecimiento radial entre factores

Factores	Simbología	% de inhibición crecimiento radial		
		48 h	96 h	168 h
A	a <sub>0</sub> <i>Fusarium sp</i>	82,3333 ± 0,228 a	76,9167 ± 0,176 a	67,0833 ± 0,136 a
	a <sub>1</sub> <i>R. stolonifer</i>	93,5833 ± 0,228 b	83,3333 ± 0,176 b	83,3333 ± 0,136 b
B	b <sub>0</sub> <i>C. limon</i> (hojas)	98,0833 ± 0,228 b	99,1667 ± 0,176 b	99,1667 ± 0,136 b
	b <sub>1</sub> <i>C. limon</i> (corteza)	77,8333 ± 0,228 a	61,0833 ± 0,176 a	51,25 ± 0,136 a
C	c <sub>0</sub> 1%	75,75 ± 0,279 a	58,625 ± 0,216 a	52,625 ± 0,167 a
	c <sub>1</sub> 2%	93,75 ± 0,279 b	89,75 ± 0,216 b	84,25 ± 0,167 b
	c <sub>2</sub> 3%	94,375 ± 0,279 b	92,0 ± 0,216 c	88,75 ± 0,167 c

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05) Tukey

Elaborado por: Vélez, S. 2016

Las medias entre factores con respecto a la inhibición de esporas demuestra que: Factor A su nivel más bajo fue a<sub>0</sub> que corresponde a *Fusarium sp* el cual demuestra que es un patógeno resistente ante los aceites esenciales en estudio, mientras que a<sub>1</sub> como es *R. stolonifer* expresa menos resistencia fúngica.

En el caso del Factor B se prueba que el valor más bajo es para el nivel b<sub>1</sub> que pertenece al aceite esencial de corteza es decir el comercial, probando así que el aceite esencial de hojas b<sub>0</sub> tiene mayor potencial antifúngico al cual le corresponde el valor más alto.

Entretanto para el Factor C el cual tiene tres niveles, el más bajo es c<sub>0</sub> como lo es concentración al 1% mientras que las más altas son c<sub>1</sub> y c<sub>2</sub> al que les corresponden las concentraciones de 2% y 3% la cual comprueba que el contenido de aceite esencial si influye en la determinación del potencial antifúngico.

**Cuadro 11.** Medias de inhibición en germinación de esporas entre factores

Factores	Simbología	% de inhibición esporas
A	a <sub>0</sub> <i>Fusarium sp</i>	90,1667 ± 0,251 a
	a <sub>1</sub> <i>R. stolonifer</i>	97,1667 ± 0,251 b
B	b <sub>0</sub> <i>C. limon</i> (hojas)	98,5 ± 0,251 b
	b <sub>1</sub> <i>C. limon</i> (corteza)	88,8333 ± 0,251 a
C	c <sub>0</sub> 1%	88 ± 0,307 a
	c <sub>1</sub> 2%	96,125 ± 0,307 b
	c <sub>2</sub> 3%	96,875 ± 0,307 b

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) Tukey

Elaborado por: Vélez, S. 2016

## 4.2. Discusión

### 4.2.1. Aislamiento e identificación de hongos patógenos presentes en *Carica papaya* L. y *Carica papaya* var. *Solo Sunrise*

Se recolecto frutos de papaya infectados, en el presentaba pudrición seca y oscura en *Carica papaya* L. y pudrición suave y tambien acuosa en *Carica papaya* var. *Solo Sunrise* coincide con lo expresa el autor [38] que *Rhizopus stolonifer* causa ese tipo de

podredumbre acuosa que cubre con un micelio aéreo de color blanco grisáceo. Así también se corrobora lo que expresa el autor [10] Una vez dentro del fruto el hongo penetra la semilla, la cual se seca y oscurece la pulpa adyacente a ésta. Estos dos hongos invaden a los frutos a través de heridas son las de mayor incidencia en papaya.

Tras la siembra directa de muestra de papaya PDA e incubación se pudo observar el crecimiento de dos hongos diferente encontrados respectivamente en dichos frutos, mediante su forma macroscópica y microscópica es decir su morfología como ya se lo manifestó en resultados se corrobora lo que dice el autor [21] en su trabajo Hongos Actinomicetos para la revista de Micología en la que habla sobre el *R. stolonifer* y el autor [22] en su aporte Genero *Fusarium* para el programa de Microbiología y Micología.

#### **4.2.2. Concentración inhibitoria de aceite esencial de *Citrus limon* de hojas obtenido por hidrodestilación y de aceite comercial de corteza en hongos identificados de *Carica papaya* L. y *Carica papaya* var. *Solo Sunrise***

Los tratamientos expresados en la tabla de media de porcentaje de inhibición radial y esporas registran actividad antifungica del 100% en *Fusarium sp* a concentraciones de 2% y 3% en aceite de hojas de *C. limon*, mientras que 1% y valoración de esporas que tiene un porcentaje mayor de 80% relación al parámetro estudiado de 48, 96, 168 horas, lo que se demuestra según el trabajo de [3] titulado, Actividad antifúngica del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis* L.) sobre hongos postcosecha en frutos de lechosa (*Carica papaya* L.) en el que se obtiene actividad antifungica arriba del 80%.

Mientras que el mismo *Fusarium sp* a concentraciones de 1%, 2% y 3% en aceite esencial comercial de *C. limon*, presenta niveles bajos en especial para 48 y 168 horas de evaluación en crecimiento micelial e inhibición de esporas lo que corrobora el estudio del autor [31] con el tema Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium sp* aislado de papaya (*Carica papaya*) en el cual tuvo inhibición baja del crecimiento micelial.

Para *R. stolonifer* evaluado a concentraciones de 1%, 2% y 3% en aceite esencial de hojas de *C. limon*, se evidencia total inhibición radial y de esporas para cada uno de las variables evaluadas demostrando así lo que dice el autor [34] en su trabajo Antifungal activity of

lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils, en el que los aceites esenciales cítricos son considerados como excelentes inhibidores fúngicos y una opción para aditivo alimentario.

*R. stolonifer* y estimación de aceite esencial comercial en concentración 1% y 2% se evidencio inhibición micelial tanto en 48, 96 y 168 horas e inhibición de esporas, demostrando así lo que presenta [28] en su artículo Evaluación *in vitro* de la actividad fungistática del aceite esencial de mandarina sobre el crecimiento de *Penicillium* sp, en el que relata que el aceite esencial comercial puede ser una alternativa para el control de enfermedades postcosecha, mientras no así la concentración de 100 µl que para los parámetro de medición radial en 96 y 168 horas no presento actividad antifúngica, como corrobora [33], con el tema Efecto de cuatro aceites esenciales sobre *Fusarium* spp., en el caso de 48 hora se demuestra valores medios bajos en actividad no así en la inhibición de esporas verificando lo expresado por [39] en su trabajo Desarrollo de un envase activo adicionado con aceites esenciales de cítricos para el control de la podredumbre en fresa en el que sus resultados expresan índices bajos en actividad antifúngica.

#### **4.2.3. Comparar la actividad Antifúngica del aceite esencial de *Citrus limon* (Limón sutil) de hojas obtenido por hidrodestilacion y de aceite comercial de corteza**

Se evaluó la actividad antifúngica de aceites esenciales de hojas y comercial ósea  $b_0$  y  $b_1$  las medias reflejan mayor potencial antifúngico en  $b_0$ , así también en concentraciones la mayor actividad antifungica la obtuvo 2% y 3% en parámetros de 48, 96 y 168 horas en inhibición radial y esporas, se toma como referencia a [32] en su artículo Evaluación preliminar de la actividad fungicida de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus tereticornis*, Myrtaceae) y cáscara de naranja (*Citrus sinensis*, Rutaceae) sobre algunos hongos filamentosos, en el argumenta que el aceite esencial de cáscara fue menos efectivo y solamente mostró actividad fungicida sobre cierto hongo a la dosis más elevada que utilizaron. Mientras que en la actividad antifungica frente a hongos patógenos en papaya demuestra que el *Fusarium* presenta resistencia a los componentes como se evidencia en otros trabajos como el de [33], en Efecto de cuatro aceites esenciales sobre *Fusarium* spp.

### **4.3. Tratamiento de hipótesis**

Mediante los resultados expresados se determina que el aceite esencial *C. limon* hojas hidrodestilado es un excelente inhibidor de hongos en concentraciones de 1%, 2% y 3% en *R. stolonifer* y *Fusarium sp*, mientras de que el aceite esencial de corteza comercial hizo efecto contra *R. stolonifer* en 2%, 3% y en 1% solo para inhibición de esporas, en *Fusarium sp* se expresa valores medios altos por ello se afirma la hipótesis “los hongos patógenos presentes en papaya son inhibidos por el Aceite esencial de *Citrus limon* (Limón sutil) de hojas y de corteza en sus niveles de concentración”.

**CAPÍTULO V**  
**CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## 5.1. Conclusiones

Se pudo identificar hongos aislados de papaya del orden micológico Hypocreales así también Mucolares de los géneros *Fusarium* sp y *Rhizopus stolonifer* respectivamente mediante la macroscopia y microscopia es decir características morfológicas.

Que *Fusarium* sp presenta menos índice de inhibición tanto para crecimiento radial y germinación de esporas no así para *R. stolonifer* que es más sensible a los compuestos de los aceites esenciales.

El aceite esencial de hojas de *C. limon* tiene mayor actividad antifúngica respecto al aceite esencial de corteza comercial frente a los parámetros de evaluación.

Al nivel de concentración la que mayor potencial antifúngico se determina que es al 3% de los aceites esenciales en estudio.

## 5.2. Recomendaciones

Se debería realizar una secuenciación enzimática del DNA llamada identificación molecular que es la determina la identificación de hongos a nivel de especie.

Probar los aceites esenciales de hojas y comercial de *Citrus limon* frente a otros hongos quizás sea probable que muestren propiedades inhibitorias.

Determinar concentraciones mínimas inhibitorias para el aceite esencial de hojas de *Citrus limon* mientras para el aceites esencial de corteza ósea el comercial probar el concentraciones más elevadas.

Estos aceites esenciales en estudio de *C. limon* son una alternativa innovadora para la aplicación sobre frutas frescas y alargar vida de anaquel de la misma así también como aditivo alimentario.

**CAPÍTULO VI**  
**BIBLIOGRAFIA**

## 6.1. Bibliografía

- [1] A. Lucera, C. Costa, A. Conte y M. A. D. Nobile, «Food applications of natural antimicrobial compounds,» *Front Microbiol*, vol. 3, nº 287, p. 13, 2012.
- [2] A. Almeida Castro, P. J. Reis y S. D. Santos, «Estudio de la conservación de la papaya (*Carica papaya* L.) asociado a la aplicación de películas comestibles,» *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, vol. 2, nº 1, pp. 49-60, 2011.
- [3] C. Guédez, L. Cañizaleza, L. Avendaño, C. Castilloa, R. Olivar, Y. Méndez y L. Sánchez, «Actividad antifúngica del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis* L.) sobre hongos postcosecha en frutos de lechosa (*Carica papaya* L.),» *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, vol. 34, pp. 81-85, 2014.
- [4] G. L. M. Ramos, S. B. Baños, N. L. L. Barrera, M. E. Bosquez, T. I. Alia y C. M. Estrada, «Antimicrobial Compounds Added in Edible Coatings for Use in Horticultural Products.,» *Revista Mexicana de Fitopatología*, vol. 28, nº 1, pp. 44-57, 2010.
- [5] J. Jobling, «Essential Oils: A new idea for postharvest disease control.,» *Good Fruit and Vegetables*, vol. 11, nº 3, p. 50, Agosto 2000.
- [6] J. Martínez, B. Sulbarán de Ferrer, G. Ojeda de Rodríguez, A. Ferrer y R. Nava, «Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina,» *Facultad de Agronomía*, vol. 20, nº 4, pp. 502-512, 2003.
- [7] I. Segovia, L. Suárez, A. Castro, S. Suárez y J. Ruiz., «Composición química del aceite esencial de *Tagetes elliptica* SMITH “chincho” y actividades antioxidante, antibacteriana y antifúngica,» *Revista de Ciencia e Investigación UNMSM*, vol. 13, nº 2, pp. 82-87, 2010.
- [8] R.-J. Bejarano-Rodríguez y S.-J. Centeno-Briceño, «Extracto de *Citrus limon* para el control de aflatoxinas y hongos aflatoxigénicos en alimentos concentrados para pollos de engorde producidos en Venezuela,» *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, vol. 29, pp. 57-61, 2009.
- [9] B. E. Barrera, L. M. Gil, P. C. M. García, R. D. L. Durango y G. J. H. Gil, «Empleo de un Recubrimiento Formulado con Propóleos para el Manejo Poscosecha de Frutos de Papaya (*Carica papaya* L. cv. Hawaiana),» *SciELO - Rev.Fac.Nal.Agr.*, vol. 65, nº 1, pp. 6497-6506, 2012.
- [10] W. Almodóvar, «Enfermedades mas comunes de la papaya,» *Clinica al Dia*, p. 4, Julio 2000.

- [11] M. S. Ortuño, Manual Practico de Aceites esenciales, aromas y perfumes, vol. 1, AIYANA, 2006, pp. 1-152.
- [12] E. Pavas y A. Vega, «Evaluación a escala de planta piloto del proceso industrial para la obtención de aceite esencial de cardamomo, bajo la filosofía “cero emisiones”,» *Cuadernos de Investigacion*, n° 30, pp. 1-38, Mayo 2005.
- [13] B. J. Borbor, P. L. Cadena y C. M. Mejia, Proyecto de exportación de aceite esencial de limón con destino a los países miembros del nafta: una alternativa para competir con el tlc, 2009, p. 11.
- [14] A. Martínez, Aceites esenciales, Medellín: Universidad de Antioquia, 2003, p. 34.
- [15] L. Torres Torres, Estudio de la hidrodestilación del aceite esencial de Lippia alba (mill.) N.E.Br., en un destilador a escala piloto, Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, 2011.
- [16] P. H. Pulido Camposeco, “Determinaciones cuantitativas y frecuencia sexual en la descendencia de una planta segregante de carica papaya l. “, Xalapa Enriquez: Universidad Veracruzana, 2012.
- [17] FAO, Manual de manejo postcosecha de frutas tropicales (Papaya, piña, plátano, cítricos), 2000.
- [18] F. Andino Rugama y Y. Castillo, Curso Microbiología de los alimentos: Un enfoque practico para la inocuidad alimentaria, Esteli: Universidad Nacional de Ingeniería UNI - Norte, 2010.
- [19] FAO, Educacion en la alimentacion y nutricion para la enseñanza basica, Santiago, 2003, pp. 1-140.
- [20] A. Camacho, M. Giles, A. Ortigón, M. Palao, B. Serrano y O. Velázquez, Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos, UNAM, 2009, pp. 1-12.
- [21] J. Pontón, M. D. Moragues, J. Gené, J. Guarro y G. Quindós, Hongos y actinomicetos alergénicos, vol. 1, Bilbao, País Vasco: Revista Iberoamericana de Micología, 2002, pp. 1-45.
- [22] C. Tapia y J. Amaro, «Género Fusarium,» *Rev Chilena Infectol*, vol. 31, n° 1, pp. 85-86, 2014.
- [23] USDA - Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Información sobre inocuidad de alimentos, Servicio de Inocuidad e Inspección de los Alimentos, 2011, pp. 1-6.
- [24] L. Carrillo, M. Audisio, N. Bejarano, S. E. Gómez Molina, G. Ancasi y M. R. Benítez Ahrendts, Manual de Microbiologia de los alimentos, San Salvador de Jujuy:

Asociación Cooperadora de la Facultad de Ciencias Agrarias, 2007.

- [25] T. Arif, J. D. Bhosale, K. Naresh, T. K. Mandal, B. R. S, G. S. Lavekar y R. Dabur, Natural products – antifungal agents derived from plants, vol. 11, Maharashtra, Jalgaon 425 001: Journal of Asian Natural Products Research, 2009, pp. 621-638.
- [26] B. S. Gregorí Valdés, Estructura y actividad de los antifúngicos, vol. 39, San Miguel del Padrón, La Habana: Rev Cubana Farm, 2005.
- [27] C. Navarrete, J. Gil, D. Durango y C. Garcia, «Extracción y caracterización del aceite esencial de manarina obtenido de residuos agroindustriales,» *Scielo - Dyna*, vol. 77, nº 162, pp. 85-92, 2008.
- [28] M. Velásquez, R. Álvarez, P. Tamayo y C. Carvalho, «Evaluación in vitro de la actividad fungistática del aceite esencial de mandarina sobre el crecimiento de *Penicillium* sp,» *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, pp. 7 - 14, 2014.
- [29] M. Cerutti y F. Neumayer, «Introducción a la obtención de aceite esencial de limon,» *Dialnet-INVENIO*, vol. 7, nº 12, pp. 149-155, Junio 2004.
- [30] U. Kumar, R. B, A. K. Pant, C. Gupta y J. J. Brophy, Volatile constituents of the distilled leaf and peel oils of Citrus limon Burm cv. “Pant Lemon-1”, vol. 4, New York: New York University, 2015, pp. 643-644.
- [31] L. Barrera y L. Garcia, «Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium* sp. aislado de papaya (*Carica papaya*),» *Revista Científica UDO Agrícola*, vol. 8, pp. 33-41, 2008.
- [32] A. Alzate N, K. López V, A. Marín H y W. Murillo A, Evaluación preliminar de la actividad fungicida de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus tereticornis*, Myrtaceae) y cáscara de naranja (*Citrus sinensis*, Rutaceae) sobre algunos hongos filamentosos, vol. 1, Tumbaga: Revista Dialnet, 2009, pp. 59-71.
- [33] Y. Duarte, O. Pino y B. Martínez, Efecto de cuatro aceites esenciales sobre *Fusarium* spp., vol. 28, San José de las Lajas, Mayabeque: Rev. Protección Veg., 2013, pp. 232-235.
- [34] M. V. Martos, N. Y. Ruiz, L. J. Fernández y Á. J. Pérez, Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils, vol. 19, Ctra Beniél, km 3.2, E-03312 , Orihuela (Alicante): ScienceDirect, 2008, pp. 1130-1138.
- [35] B. F. Narvaez, Valoración de los aceites esenciales de *Citrus sinensis* (naranja) y *Citrus nobilis* (mandarina) como inhibidores de microorganismos en la conservación de alimentos, Quevedo: Universidad Técnica Estatal de Quevedo, 2015.
- [36] J. Guarro, «Enfermedades infecciosas y microbiología clínica - Taxonomía y

biología de los hongos causantes de infección en humanos,» *ELSEVIER*, vol. 30, n° 1, Enero 2012.

- [37] B. Forbes, D. Sham y A. Weissfeld, Bailey y Scott; *Diagnostico microbiologico*, 12va ed., Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana, 2009, p. 1160.
- [38] M. L. Suárez-Quiroz, I. Mendoza-Bautista, J. A. Monroy-Rivera, J. de la Cruz-Medina, O. Angulo-Guerrero y O. González-Ríos, «Aislamiento, identificación y sensibilidad a antifúngicos de hongos fitopatógenos de papaya cv. Maradol (Carica papaya l.),» *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, vol. vol. 14, n° 2, pp. 115-124, 2013.
- [39] G. Y. Alarcón, M. M. A. Trejo, S. A. Corrales y P. S. Bustamante, «Desarrollo de un envase activo adicionado con aceites esenciales de cítricos para el control de la podredumbre en fresa,» *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, vol. 16, n° 2, pp. 222-227, 2015.

**CAPÍTULO VII**  
**ANEXOS**

### Anexo 1. Crecimiento radial de los tratamientos

N°	Tratamientos	TIEMPO (Horas)													
		24 H		48H		72H		96H		120H		144H		168H	
		R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
1	a0b0c0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3
2	a0b0c1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	a0b0c2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	a0b1c0	0,2	0,2	0,9	0,8	1,5	1,4	2,4	2,3	3,2	3	4,3	3,8	5,3	4,8
5	a0b1c1	0,2	0,2	0,5	0,4	1,1	1	1,7	1,5	2,3	2,1	3	2,8	3,9	3,6
6	a0b1c2	0,2	0,2	0,4	0,4	0,7	0,6	1,3	1,2	2	1,6	2,4	2,3	2,7	2,6
7	a1b0c0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	a1b0c1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	a1b0c2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	a1b1c0	0	0	2,5	2,3	7	6,5	8,4	8,4	8,4	8,4	8,4	8,4	8,4	8,4
11	a1b1c1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	a1b1c2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Elaborado por: Vélez, S. 2016

## Anexo 2. Crecimiento radial de los testigos

N°	Genero	TIEMPO (Horas)													
		24 H		48H		72H		96H		120H		144H		168H	
		R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
1	Testigo <i>Fusarium sp</i>	0,7	0,6	1,9	1,7	2,9	2,6	4,1	3,7	4,6	4,5	5,7	5	6,2	5,7

Elaborado por: Vélez, S. 2016

N°	Genero	TIEMPO (Horas)													
		24 H		48H		72H		96H		120H		144H		168H	
		R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
2	Testigo <i>Rhizopus stolonifer</i>	2,6	2,5	6,4	6,1	8,4	8,4	8,4	8,4	8,4	8,4	8,4	8,4	8,4	8,4

Elaborado por: Vélez, S. 2016

## Anexo 3. Germinación de esporas en tratamientos

N°	Tratamientos	Promedio		Conidias / ml		Conidias Totales	
		R1	R2	R1	R2	R1	R2
1	a <sub>0</sub> b <sub>0</sub> c <sub>0</sub>	229	221	57350	55200	573500	552000
2	a <sub>0</sub> b <sub>0</sub> c <sub>1</sub>	0	0	0	0	0	0
3	a <sub>0</sub> b <sub>0</sub> c <sub>2</sub>	0	0	0	0	0	0
4	a <sub>0</sub> b <sub>1</sub> c <sub>0</sub>	551	536	137850	133900	1378500	1339000
5	a <sub>0</sub> b <sub>1</sub> c <sub>1</sub>	427	358	106800	89600	1068000	896000
6	a <sub>0</sub> b <sub>1</sub> c <sub>2</sub>	333	300	83250	75100	832500	751000
7	a <sub>1</sub> b <sub>0</sub> c <sub>0</sub>	0	0	0	0	0	0
8	a <sub>1</sub> b <sub>0</sub> c <sub>1</sub>	0	0	0	0	0	0
9	a <sub>1</sub> b <sub>0</sub> c <sub>2</sub>	0	0	0	0	0	0
10	a <sub>1</sub> b <sub>1</sub> c <sub>0</sub>	390	348	97550	87000	975500	870000
11	a <sub>1</sub> b <sub>1</sub> c <sub>1</sub>	0	0	0	0	0	0
12	a <sub>1</sub> b <sub>1</sub> c <sub>2</sub>	0	0	0	0	0	0

Elaborado por: Vélez, S. 2016

#### Anexo 4. Germinación de esporas en testigos

N°	Genero	Promedio		Conidias / ml		Conidia Total	
		R1	R2	R1	R2	R1	R2
1	Testigo <i>Fusarium sp</i>	2823	2259	705750	564850	7057500	5648500
2	Testigo <i>R. stolonifer</i>	2340	2082	584950	520450	5849500	5204500

Elaborado por: Vélez, S. 2016

#### Anexo 5. Porcentaje de inhibición radial en tratamientos

N°	Tratamientos	% Inhibición Radial					
		48h		96h		198h	
		R1	R2	R1	R2	R1	R2
1	a <sub>0</sub> b <sub>0</sub> c <sub>0</sub>	89	88	95	95	95	95
2	a <sub>0</sub> b <sub>0</sub> c <sub>1</sub>	100	100	100	100	100	100
3	a <sub>0</sub> b <sub>0</sub> c <sub>2</sub>	100	100	100	100	100	100
4	a <sub>0</sub> b <sub>1</sub> c <sub>0</sub>	53	53	41	38	15	16
5	a <sub>0</sub> b <sub>1</sub> c <sub>1</sub>	74	76	59	59	37	37
6	a <sub>0</sub> b <sub>1</sub> c <sub>2</sub>	79	76	68	68	56	54
7	a <sub>1</sub> b <sub>0</sub> c <sub>0</sub>	100	100	100	100	100	100
8	a <sub>1</sub> b <sub>0</sub> c <sub>1</sub>	100	100	100	100	100	100
9	a <sub>1</sub> b <sub>0</sub> c <sub>2</sub>	100	100	100	100	100	100
10	a <sub>1</sub> b <sub>1</sub> c <sub>0</sub>	61	62	0	0	0	0
11	a <sub>1</sub> b <sub>1</sub> c <sub>1</sub>	100	100	100	100	100	100
12	a <sub>1</sub> b <sub>1</sub> c <sub>2</sub>	100	100	100	100	100	100

Elaborado por: Vélez, S. 2016

#### Anexo 6. Porcentaje de inhibición radial en testigos

N°	Genero	% Inhibición radial					
		48h		96h		198h	
		R1	R2	R1	R2	R1	R2
1	Testigo <i>Fusarium sp</i>	0	0	0	0	0	0
2	Testigo <i>R. stolonifer</i>	0	0	0	0	0	0

Elaborado por: Vélez, S. 2016

## Anexo 7. Porcentaje de inhibición de esporas en testigos

N°	Tratamientos	% Inhibición Esporas	
		R1	R2
1	a <sub>0</sub> b <sub>0</sub> c <sub>0</sub>	92	90
2	a <sub>0</sub> b <sub>0</sub> c <sub>1</sub>	100	100
3	a <sub>0</sub> b <sub>0</sub> c <sub>2</sub>	100	100
4	a <sub>0</sub> b <sub>1</sub> c <sub>0</sub>	80	76
5	a <sub>0</sub> b <sub>1</sub> c <sub>1</sub>	85	84
6	a <sub>0</sub> b <sub>1</sub> c <sub>2</sub>	88	87
7	a <sub>1</sub> b <sub>0</sub> c <sub>0</sub>	100	100
8	a <sub>1</sub> b <sub>0</sub> c <sub>1</sub>	100	100
9	a <sub>1</sub> b <sub>0</sub> c <sub>2</sub>	100	100
10	a <sub>1</sub> b <sub>1</sub> c <sub>0</sub>	83	83
11	a <sub>1</sub> b <sub>1</sub> c <sub>1</sub>	100	100
12	a <sub>1</sub> b <sub>1</sub> c <sub>2</sub>	100	100

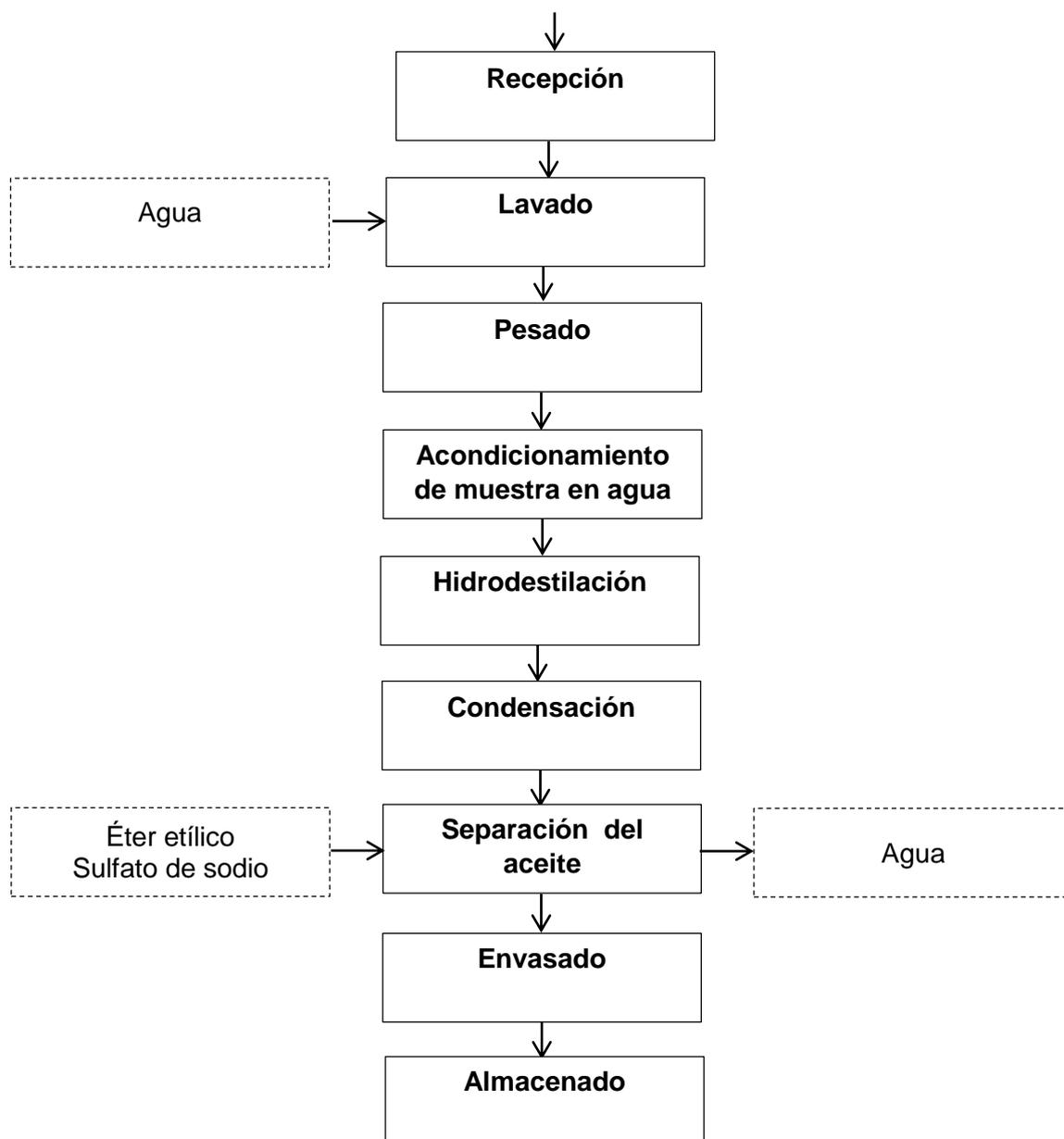
Elaborado por: Vélez, S. 2016

## Anexo 8. Porcentaje de inhibición de esporas en tratamientos

N°	Genero	% Inhibición Esporas	
		R1	R2
1	Testigo <i>Fusarium sp</i>	0	0
2	Testigo <i>R. stolonifer</i>	0	0

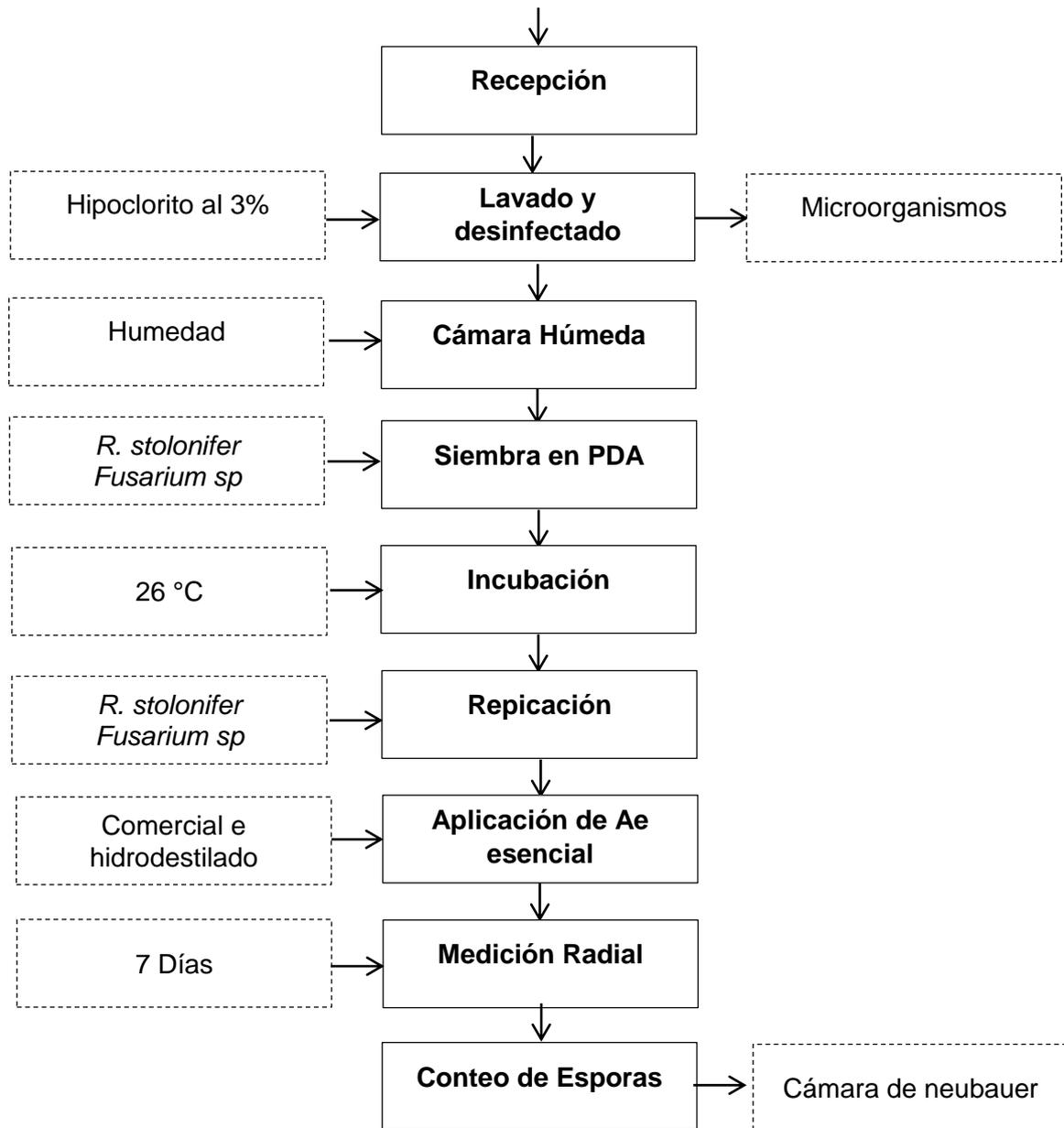
Elaborado por: Vélez, S. 2016

**Anexo 9. Diagrama de flujo del proceso de obtención de aceite esencial de hojas *Citrus limon*.**



Elaborado por: Vélez, S. 2016

**Anexo 10. Diagrama de flujo del proceso de inhibición de hongos (*Fusarium sp* y *R. stolonifer*) aislados de dos variedades de papaya.**



Elaborado por: Vélez, S. 2016

## Anexo 11. Fotos de la Fase experimental

### Obtención de los aceites esenciales comercial e hidrodestilado



Lavado de hojas de limón



Escurredo



Pesado



Adición de agua a la muestra



Hidrodestilación



Ae Comercial e hidrodestilado

### Preparación de PDA (Papa Dextrosa Agar) y adición de antibióticos



Adición de PDA en agua



Disolución



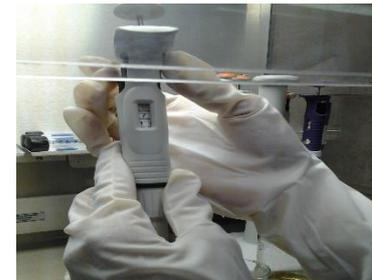
Material ya disuelto



Preparación para esterilizar



Disolución de antibiótico



Agregar antibiótico al PDA

## Preparación de hipoclorito al 3% y desinfección de *Carica papaya L* y var. Solo sunrise



Agua estéril



Cloro



Desinfección C.



Desinfección Var.

## Aislamiento de hongos de *Carica papaya L* y var. Solo sunrise



Muestra papaya 1



Muestra papaya 2

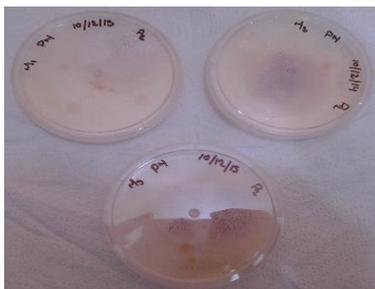


PDA para siembra

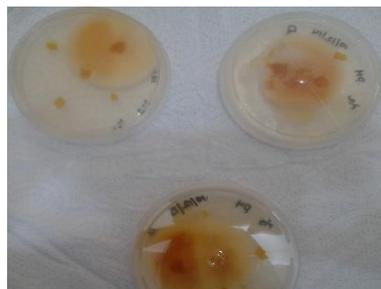


Siembra de muestra

## Identificación de hongos de papaya



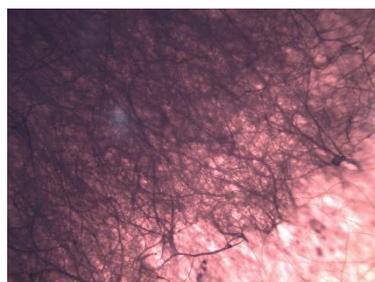
Hongo Madre 1 (Anverso)



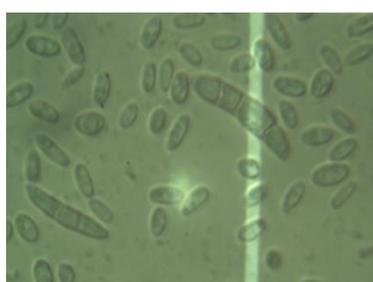
Hongo Madre 1 (Reverso)



Clamidosporas



Micelio



Macro y micro conidios (Determinación: *Fusarium sp*)

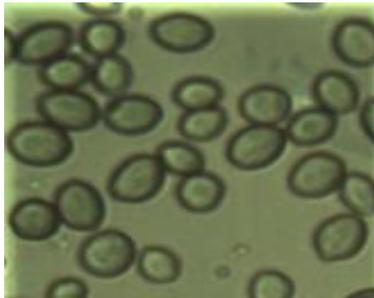




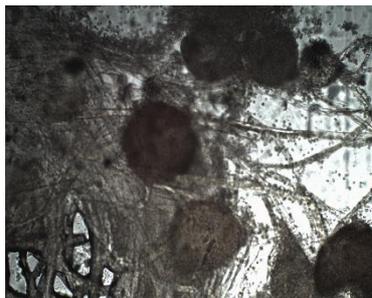
Hongo Madre 2 (Anverso)



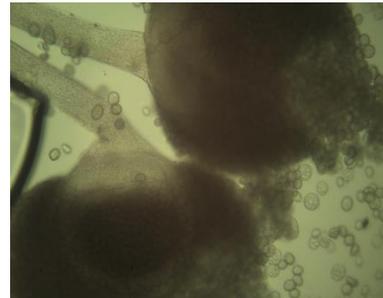
Hongo Madre 2 (Reverso)



Esporas

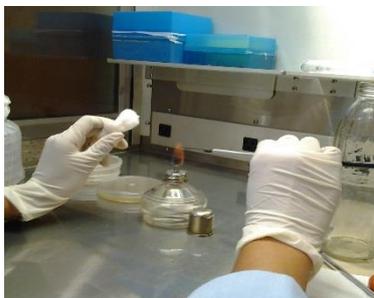


Micelio aseptado



Rhizopus stolonifer

### Repiques de hongos (*Fusarium sp* y *Rhizopus stolonifer*)



Siembra de muestras



Muestra *Fusarium sp*



Muestra *R. stolonifer*

### Preparación de Tween 20



Tween 80



Tween 80 más agua



Mezcla y esterilización

## Aplicación de Aceites esenciales comercial e hidrodestilado de *C.*



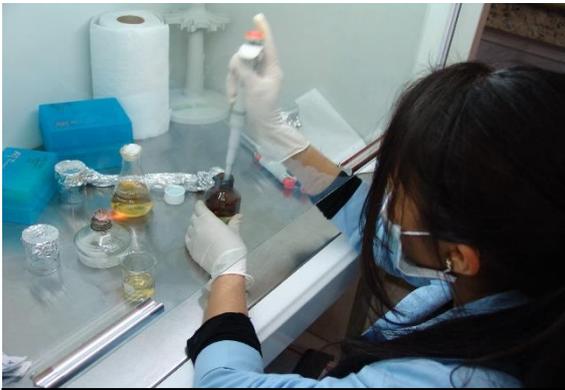
PDA



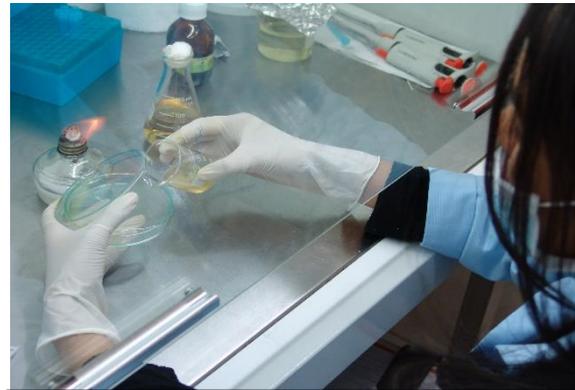
Adición de Tween 20



Aplicación de Ae comercial



Aplicación de Ae hidrodestilado



PDA + Tween 20+ Ae



Discos para siembra (*R. stolonifer*)



Siembra (*R. stolonifer*)

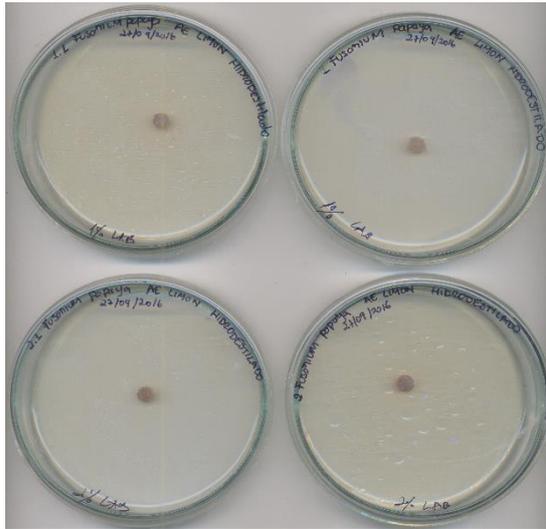


Discos para siembra (*Fusarium sp*)

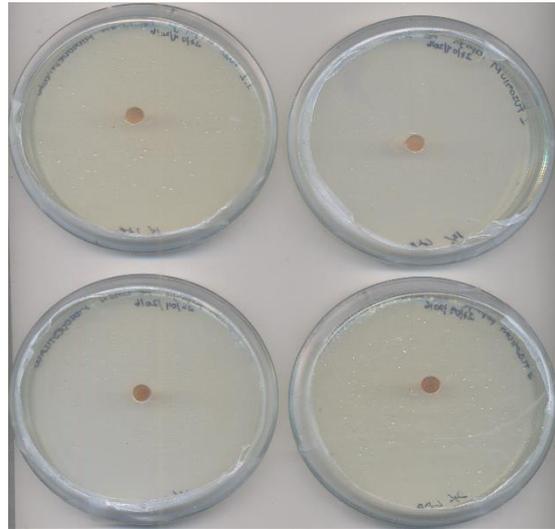


Siembra (*Fusarium sp*)

**Crecimiento radial de *Fusarium sp* (aceite esencial de hojas de *C. limon*)**



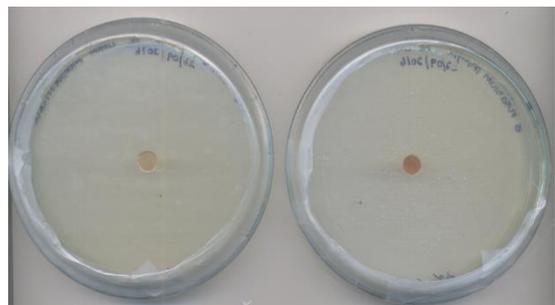
**100µL (1%) y 200µL (2%) Anverso**



**100µL (1%) y 200µL (2%) Reverso**

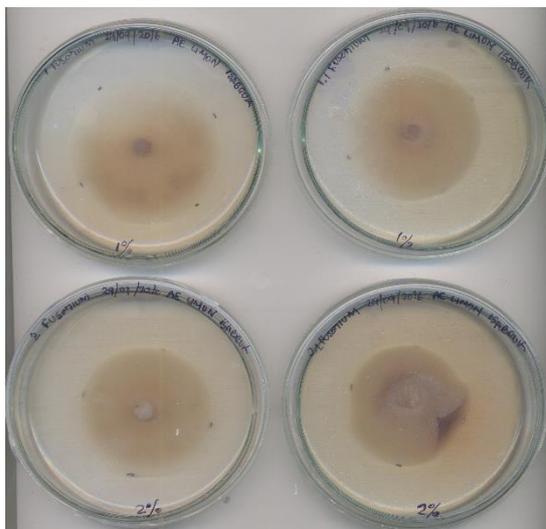


**300µL (3%) Anverso**

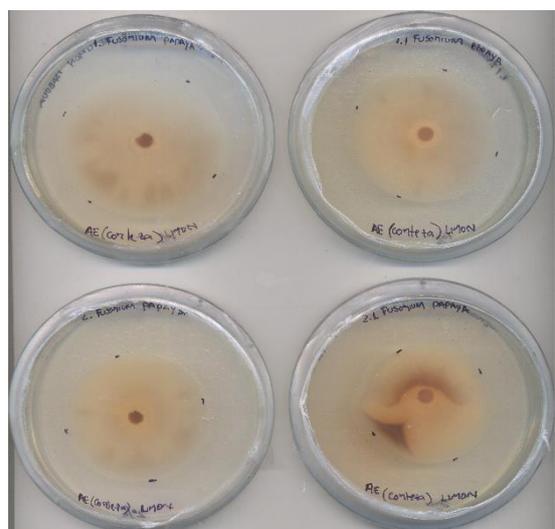


**300µL (3%) Anverso**

**Crecimiento radial de *Fusarium sp* (aceite esencial comercial de *C. limon*)**



**100µL (1%) y 200µL (2%) Anverso**



**100µL (1%) y 200µL (2%) Reverso**

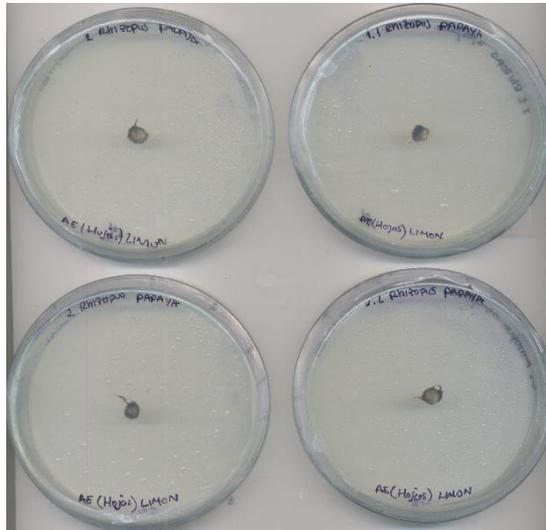


**300µL (3%) Anverso**

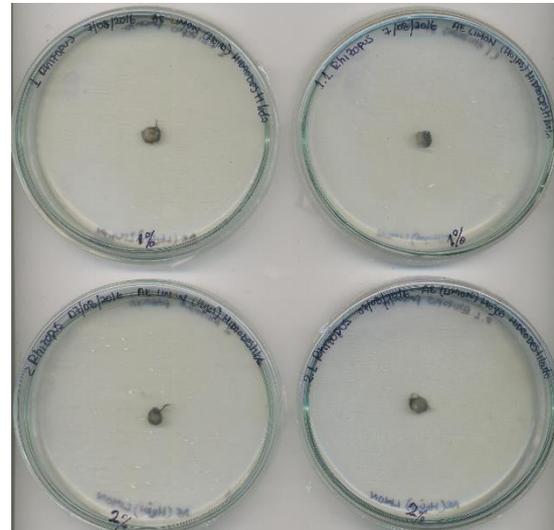


**300µL (3%) Anverso**

**Crecimiento radial de *R. stolonifer* (aceite esencial de hojas de *C. limon*)**



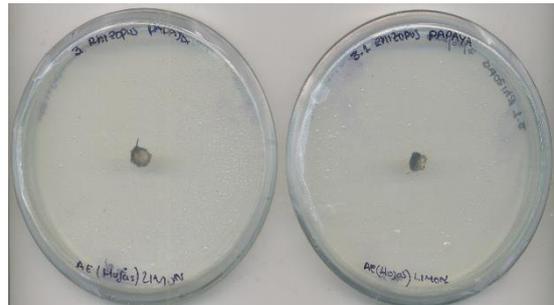
**100µL (1%) y 200µL (2%) Anverso**



**100µL (1%) y 200µL (2%) Reverso**

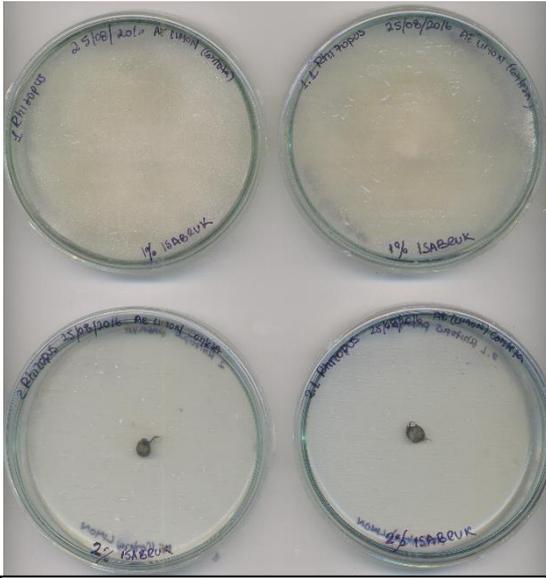


**300µL (3%) Anverso**

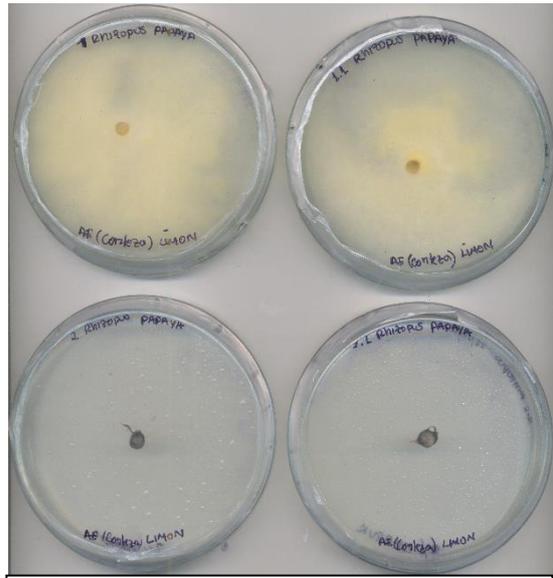


**300µL (3%) Reverso**

**Crecimiento radial de *R. stolonifer* (aceite esencial comercial de *C. limon*)**



**100µL (1%) y 200µL (2%) Anverso**



**100µL (1%) y 200µL (2%) Anverso**

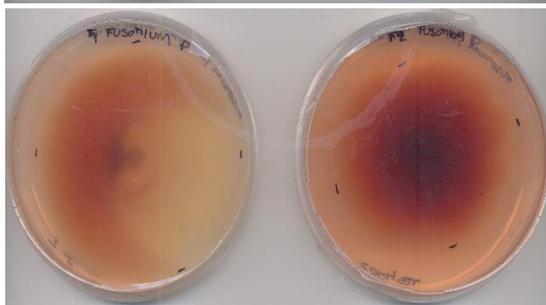
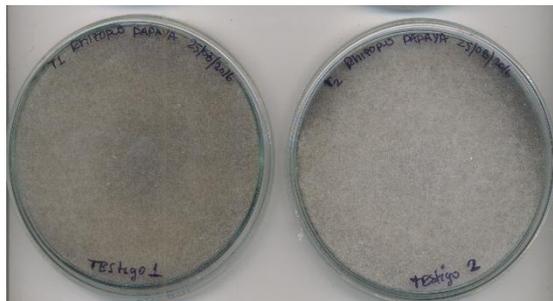
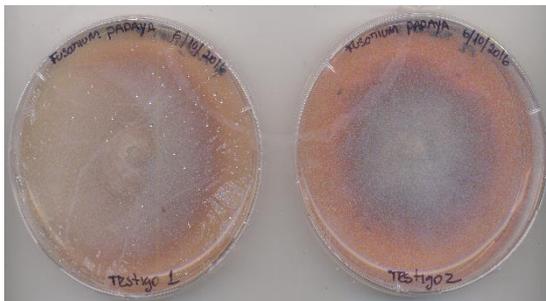


**300µL (3%) Anverso**



**300µL (3%) Anverso**

**Testigos (*Fusarium sp* y *R. stolonifer*)**



## Anexo 12. Cuadro de Varianzas para porcentaje en crecimiento radial y esporas (Statgraphics)

**Cuadro 1. Análisis de Varianza para % de Inhibición crecimiento radial 48 horas**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
COVARIABLES					
Repeticiones	0,0416667	1	0,0416667	0,06	0,8088
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Hongos Patógenos	759,375	1	759,375	1119,97	0,0000
B:Ac. Esencial	2460,38	1	2460,38	3628,71	0,0000
C:Concentraciones	1790,08	2	895,042	1320,06	0,0000
INTERACCIONES					
AB	330,042	1	330,042	486,77	0,0000
AC	6,25	2	3,125	4,61	0,0352
BC	843,25	2	421,625	621,84	0,0000
ABC	240,083	2	120,042	177,04	0,0000
RESIDUOS	7,45833	11	0,67803		
TOTAL (CORREGIDO)	6436,96	23			

Elaborado por: Vélez, S. 2016

**Cuadro 2. Análisis de Varianza para % de Inhibición en crecimiento radial 96 horas**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
COVARIABLES					
Repeticiones	0,375	1	0,375	1,00	0,3388
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Hongos Patógenos	247,042	1	247,042	658,78	0,0000
B:Ac. Esencial	8702,04	1	8702,04	23205,44	0,0000
C:Concentraciones	5567,25	2	2783,63	7423,00	0,0000
INTERACCIONES					
AB	135,375	1	135,375	361,00	0,0000
AC	1700,58	2	850,292	2267,44	0,0000
BC	4740,58	2	2370,29	6320,78	0,0000
ABC	2207,25	2	1103,63	2943,00	0,0000
RESIDUOS	4,125	11	0,375		
TOTAL (CORREGIDO)	23304,6	23			

Elaborado por: Vélez, S. 2016

**Cuadro 3. Análisis de Varianza para % de Inhibición en crecimiento radial 168 horas**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
COVARIABLES					
Repeticiones	0,0416667	1	0,0416667	0,19	0,6742
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Hongos Patógenos	1584,38	1	1584,38	7089,41	0,0000
B:Ac. Esencial	13776,0	1	13776,0	61641,95	0,0000
C:Concentraciones	6201,08	2	3100,54	13873,61	0,0000
INTERACCIONES					
AB	1276,04	1	1276,04	5709,75	0,0000
AC	1467,75	2	733,875	3283,78	0,0000
BC	5331,08	2	2665,54	11927,17	0,0000
ABC	1931,08	2	965,542	4320,39	0,0000
RESIDUOS	2,45833	11	0,223485		
TOTAL (CORREGIDO)	31570,0	23			

Elaborado por: Vélez, S. 2016

**Cuadro 4. Análisis de Varianza para % de Inhibición de esporas**

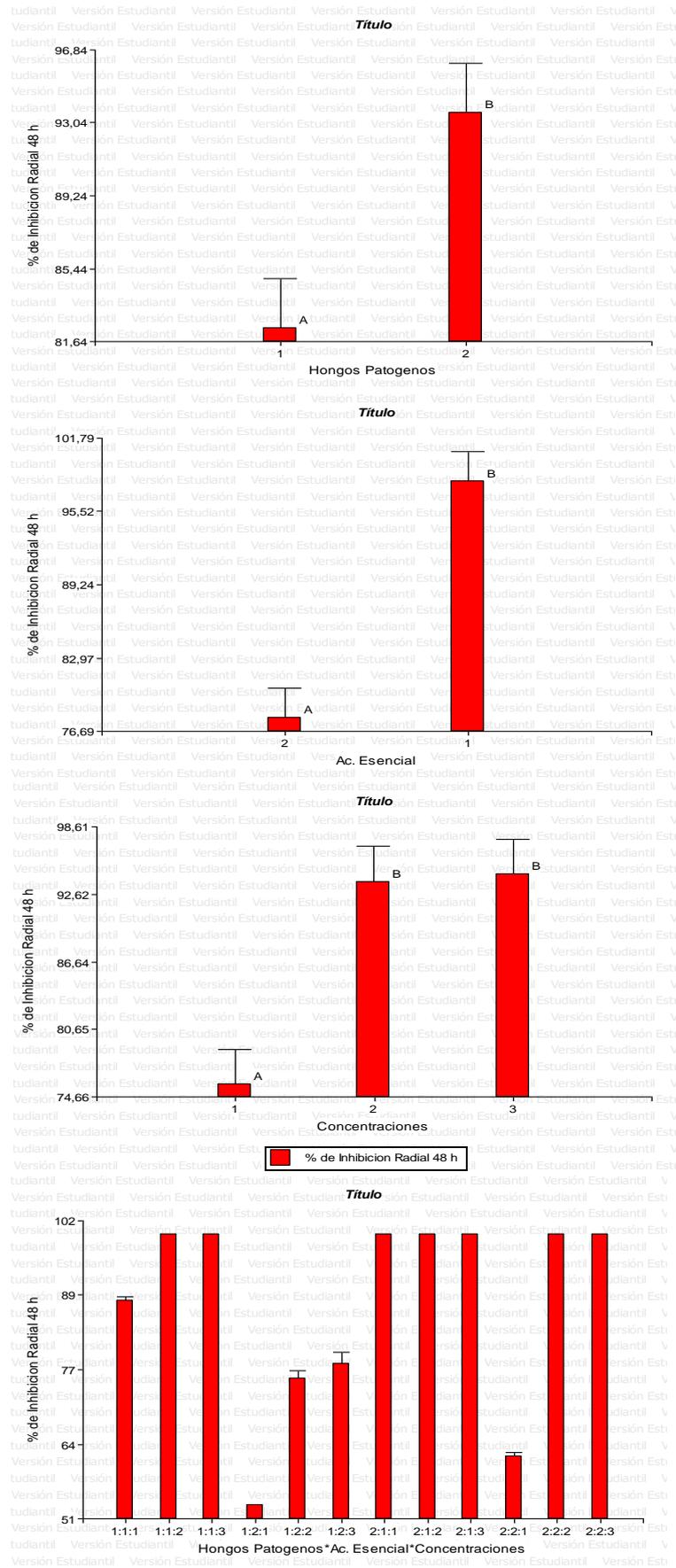
<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
COVARIABLES					
Repeticiones	2,66667	1	2,66667	3,52	0,0874
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Hongos Patógenos	294,0	1	294,0	388,08	0,0000
B:Ac. Esencial	560,667	1	560,667	740,08	0,0000
C:Concentraciones	387,583	2	193,792	255,80	0,0000
INTERACCIONES					
AB	96,0	1	96,0	126,72	0,0000
AC	2,25	2	1,125	1,48	0,2686
BC	87,5833	2	43,7917	57,80	0,0000
ABC	110,25	2	55,125	72,76	0,0000
RESIDUOS	8,33333	11	0,757576		
TOTAL (CORREGIDO)	1549,33	23			

Elaborado por: Vélez, S. 2016

## Anexo 13. Pruebas de significación Tukey (Statgraphics e InfoStat) y gráficos (InfoStat) para porcentaje en crecimiento radial y esporas

% de inhibición radial en 48 horas																																																		
<p><b>Factor A</b></p> <p>Pruebas de Múltiple Rangos para % DE INHIBICION en Hongos patógenos</p> <p>Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Hongos Patógenos</th> <th>Casos</th> <th>Media LS</th> <th>Sigma LS</th> <th>Grupos Homogéneos</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>12</td> <td>82,3333</td> <td>0,228218</td> <td>×</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>12</td> <td>93,5833</td> <td>0,228218</td> <td>×</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Contraste</th> <th>Sig.</th> <th>Diferencia</th> <th>+/- Límites</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1 - 2</td> <td>*</td> <td>-11,25</td> <td>0,70321</td> </tr> </tbody> </table> <p>* indica una diferencia significativa.</p>		Hongos Patógenos	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos	1	12	82,3333	0,228218	×	2	12	93,5833	0,228218	×	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites	1 - 2	*	-11,25	0,70321	<p><b>Factor B</b></p> <p>Pruebas de Múltiple Rangos para % DE INHIBICION de Aceites Esenciales</p> <p>Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Ac. Esencial</th> <th>Casos</th> <th>Media LS</th> <th>Sigma LS</th> <th>Grupos Homogéneos</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2</td> <td>12</td> <td>77,8333</td> <td>0,228218</td> <td>×</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>12</td> <td>98,0833</td> <td>0,228218</td> <td>×</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Contraste</th> <th>Sig.</th> <th>Diferencia</th> <th>+/- Límites</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1 - 2</td> <td>*</td> <td>20,25</td> <td>0,70321</td> </tr> </tbody> </table> <p>* indica una diferencia significativa.</p>			Ac. Esencial	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos	2	12	77,8333	0,228218	×	1	12	98,0833	0,228218	×	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites	1 - 2	*	20,25	0,70321
Hongos Patógenos	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos																																														
1	12	82,3333	0,228218	×																																														
2	12	93,5833	0,228218	×																																														
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites																																															
1 - 2	*	-11,25	0,70321																																															
Ac. Esencial	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos																																														
2	12	77,8333	0,228218	×																																														
1	12	98,0833	0,228218	×																																														
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites																																															
1 - 2	*	20,25	0,70321																																															
<p><b>Factor C</b></p> <p>Pruebas de Múltiple Rangos para % DE INHIBICION por concentraciones de Aceite Esencial</p> <p>Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Concentraciones</th> <th>Casos</th> <th>Media LS</th> <th>Sigma LS</th> <th>Grupos Homogéneos</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>8</td> <td>75,75</td> <td>0,279508</td> <td>×</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>8</td> <td>93,75</td> <td>0,279508</td> <td>×</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>8</td> <td>94,375</td> <td>0,279508</td> <td>×</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Contraste</th> <th>Sig.</th> <th>Diferencia</th> <th>+/- Límites</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1 - 2</td> <td>*</td> <td>-18,0</td> <td>1,05746</td> </tr> <tr> <td>1 - 3</td> <td>*</td> <td>-18,625</td> <td>1,05746</td> </tr> <tr> <td>2 - 3</td> <td></td> <td>-0,625</td> <td>1,05746</td> </tr> </tbody> </table> <p>* indica una diferencia significativa.</p>		Concentraciones	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos	1	8	75,75	0,279508	×	2	8	93,75	0,279508	×	3	8	94,375	0,279508	×	Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites	1 - 2	*	-18,0	1,05746	1 - 3	*	-18,625	1,05746	2 - 3		-0,625	1,05746	<p><b>Gráfico de Medias</b></p> <p>Gráfico de Medias de tukey para cada una de las repeticiones en % DE INHIBICION RADIAL</p> <p>Medias y 95,0% de Tukey HSD</p>												
Concentraciones	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos																																														
1	8	75,75	0,279508	×																																														
2	8	93,75	0,279508	×																																														
3	8	94,375	0,279508	×																																														
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites																																															
1 - 2	*	-18,0	1,05746																																															
1 - 3	*	-18,625	1,05746																																															
2 - 3		-0,625	1,05746																																															

Elaborado por: Vélez, S. 2016



Elaborado por: Vélez, S. 2016

% de inhibición radial en 96 horas

**Factor A**

Pruebas de Múltiple Rangos para % DE INHIBICION en Hongos patógenos

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Hongos Patógenos	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1	12	76,9167	0,176777	X
2	12	83,3333	0,176777	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
1 - 2	*	-6,41667	0,550248

\* indica una diferencia significativa.

**Factor B**

Pruebas de Múltiple Rangos para % DE INHIBICION de Aceites Esenciales

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Ac. Esencial	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
2	12	61,0833	0,176777	X
1	12	99,1667	0,176777	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
1 - 2	*	38,0833	0,550248

\* indica una diferencia significativa.

**Factor C**

Pruebas de Múltiple Rangos para % DE INHIBICION por concentraciones de Aceite Esencial

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Concentraciones	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1	8	58,625	0,216506	X
2	8	89,75	0,216506	X
3	8	92,0	0,216506	X

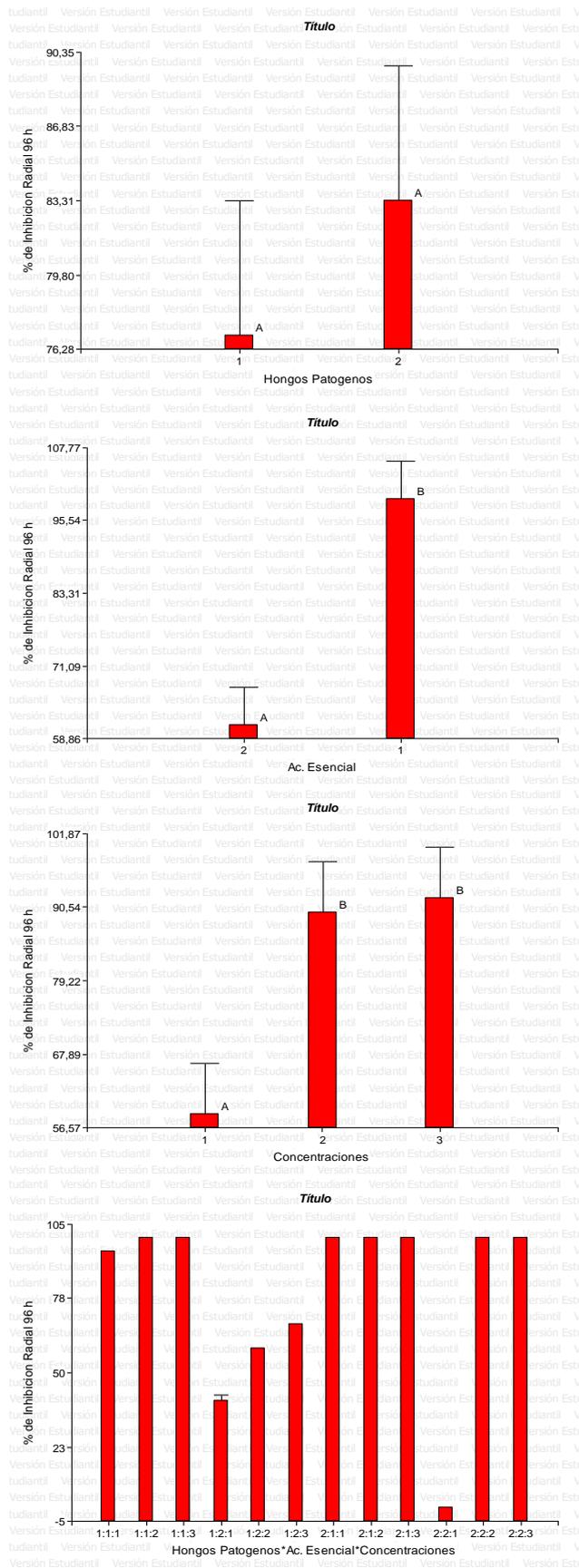
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
1 - 2	*	-31,125	0,82863
1 - 3	*	-33,375	0,82863
2 - 3	*	-2,25	0,82863

\* indica una diferencia significativa.

**Gráfico de Medias**

Gráfico de Medias de tukey para cada una de las repeticiones en % DE INHIBICION RADIAL

Elaborado por: Vélez, S. 2016



Elaborado por: Vélez, S. 2016

% de inhibición radial en 168 horas

**Factor A**

Pruebas de Múltiple Rangos para % DE INHIBICION en Hongos patógenos

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Hongos Patógenos	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1	12	67,0833	0,136469	×
2	12	83,3333	0,136469	×

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
1 - 2	*	-16,25	0,424782

\* indica una diferencia significativa.

**Factor B**

Pruebas de Múltiple Rangos para % DE INHIBICION de Aceites Esenciales

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Ac. Esencial	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
2	12	51,25	0,136469	×
1	12	99,1667	0,136469	×

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
1 - 2	*	47,9167	0,424782

\* indica una diferencia significativa.

**Factor C**

Pruebas de Múltiple Rangos para % DE INHIBICION por concentraciones de Aceite Esencial

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Concentraciones	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1	8	52,625	0,167139	×
2	8	84,25	0,167139	×
3	8	88,75	0,167139	×

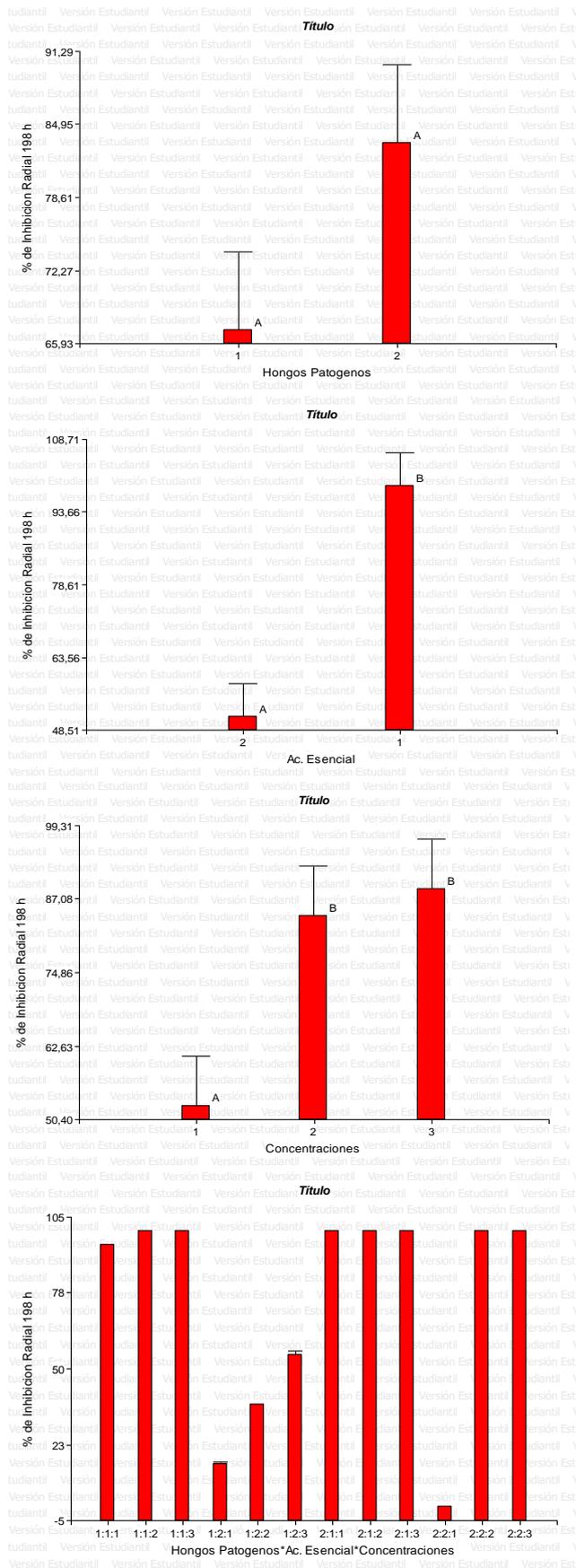
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
1 - 2	*	-31,625	0,639689
1 - 3	*	-36,125	0,639689
2 - 3	*	-4,5	0,639689

\* indica una diferencia significativa.

**Gráfico de Medias**

Gráfico de Medias de tukey para cada una de las repeticiones en % DE INHIBICION RADIAL

Elaborado por: Vélez, S. 2016



Elaborado por: Vélez, S. 2016

**% de inhibición de Esporas**

**Factor A**

**Pruebas de Múltiple Rangos para % DE INHIBICION en Hongos patógenos**

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Hongos Patógenos	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1	12	90,1667	0,251259	×
2	12	97,1667	0,251259	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
1 - 2	*	-7,0	0,782088

\* indica una diferencia significativa.

**Factor B**

**Pruebas de Múltiple Rangos para % DE INHIBICION de Aceites Esenciales**

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Ac. Esencial	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
2	12	88,8333	0,251259	×
1	12	98,5	0,251259	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
1 - 2	*	9,66667	0,782088

\* indica una diferencia significativa.

**Factor C**

**Pruebas de Múltiple Rangos para % DE INHIBICION por concentraciones de Aceite Esencial**

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

Concentraciones	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1	8	88,0	0,307729	×
2	8	96,125	0,307729	x
3	8	96,875	0,307729	x

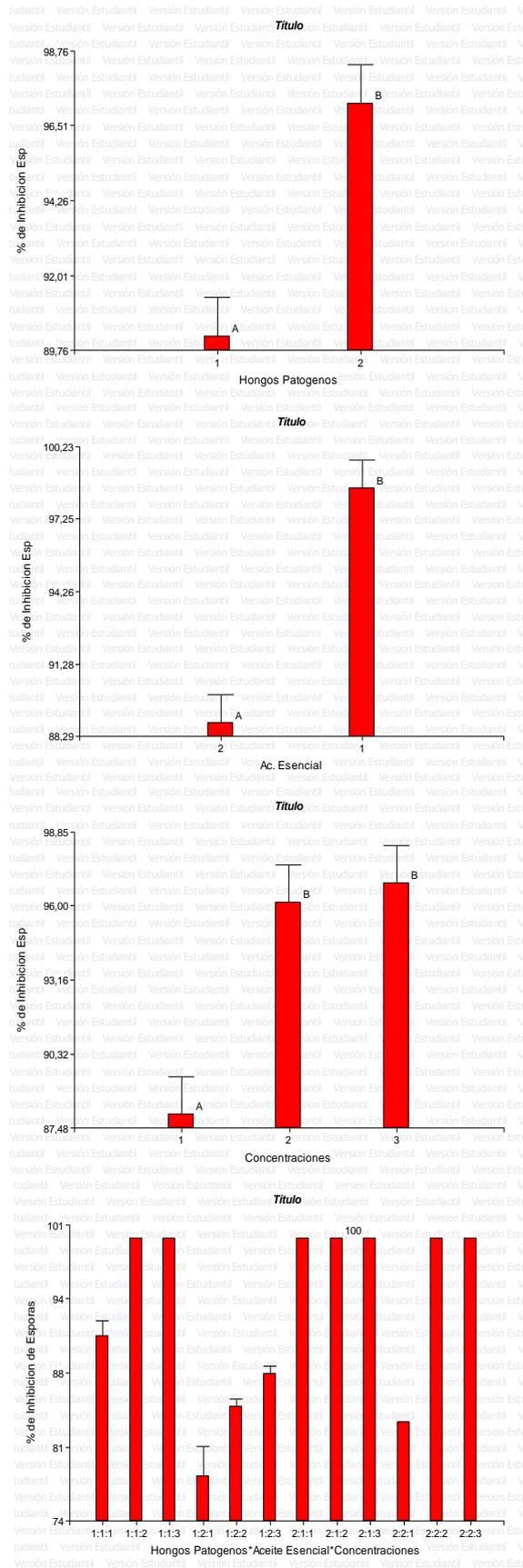
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
1 - 2	*	-8,125	1,17776
1 - 3	*	-8,875	1,17776
2 - 3		-0,75	1,17776

\* indica una diferencia significativa.

**Gráfico de Medias**

Gráfico de Medias de tukey para cada una de las repeticiones en % DE INHIBICION ESPORAS

**Elaborado por:** Vélez, S. 2016



Elaborado por: Vélez, S. 2016

## Arreglo factorial para porcentaje de germinacion de esporas

INFOSTAT

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,51611

Error: 0,7576 gl: 11

Hongos	Ac.	Concentraciones	Medias	n	E.E.					
Patógenos	Esencial									
1	2	1	78	2	0,62	A				
2	2	1	83	2	0,62		B			
1	2	2	84,5	2	0,62		B	C		
1	2	3	87,5	2	0,62			C	D	
1	1	1	91	2	0,62				D	
2	1	3	100	2	0,62					E
2	2	2	100	2	0,62					E
2	2	3	100	2	0,62					E
1	1	3	100	2	0,62					E
1	1	2	100	2	0,62					E
2	1	1	100	2	0,62					E
2	1	2	100	2	0,62					E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Elaborado por: Vélez, S. 2016

## Arreglo factorial para porcentaje de crecimiento radial 48h

INFOSTAT

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,32640

Error: 0,6780 gl: 11

Hongos	Patógenos	Ac. Esencial	Concentraciones	Medias	n	E.E.				
1		2	1	53	2	0,58	A			
2		2	1	61,5	2	0,58		B		
1		2	2	75	2	0,58			C	
1		2	3	77,5	2	0,58			C	
1		1	1	88,5	2	0,58				D
2		1	3	100	2	0,58				E
2		2	2	100	2	0,58				E
2		2	3	100	2	0,58				E
1		1	3	100	2	0,58				E
1		1	2	100	2	0,58				E
2		1	1	100	2	0,58				E
2		1	2	100	2	0,58				E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Elaborado por: Vélez, S. 2016

## Arreglo factorial para porcentaje de crecimiento radial 96h

INFOSTAT

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,47381

Error: 0,3750 gl: 11

Hongos Patógenos	Ac. Esencial	Concentraciones	Medias	n	E.E.	
2	2	1	0	2	0,43	A
1	2	1	39,5	2	0,43	B
1	2	2	59	2	0,43	C
1	2	3	68	2	0,43	D
1	1	1	95	2	0,43	E
2	1	3	100	2	0,43	F
2	2	2	100	2	0,43	F
2	2	3	100	2	0,43	F
1	1	3	100	2	0,43	F
1	1	2	100	2	0,43	F
2	1	1	100	2	0,43	F
2	1	2	100	2	0,43	F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Elaborado por: Vélez, S. 2016

## Arreglo factorial para porcentaje de crecimiento radial 168h

INFOSTAT

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,90974

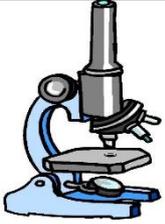
Error: 0,2235 gl: 11

Hongos Patógenos	Ac. Esencial	Concentraciones	Medias	n	E.E.	
2	2	1	0	2	0,33	A
1	2	1	15,5	2	0,33	B
1	2	2	37	2	0,33	C
1	2	3	55	2	0,33	D
1	1	1	95	2	0,33	E
2	2	3	100	2	0,33	F
1	1	3	100	2	0,33	F
2	2	2	100	2	0,33	F
1	1	2	100	2	0,33	F
2	1	1	100	2	0,33	F
2	1	2	100	2	0,33	F
2	1	3	100	2	0,33	F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Elaborado por: Vélez, S. 2016

## Anexo 14. Técnicas de Laboratorio

	<p><b>Universidad Técnica Estatal de Quevedo</b> <i>Laboratorio de Microbiología</i> <b>Técnicas de aislamiento de hongos</b></p>	
---	---	---

- **OBJETIVO**

- Aislar y sembrar los hongos en placas Petri utilizando correctamente sus respectivos agares y caldos de cultivo, en distintos métodos de aislamientos.

- **INSTRUMENTAL**

- Cámara de flujo laminar
- Bisturí
- Cajas petri,
- Hipoclorito de sodio al 3%
- Toallas de papel
- Mechero
- Marcador
- Incubadora
- Medio de cultivo PDA
- Pinzas
- Muestra vegetal con síntomas

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

- **PREPARACIÓN DE LA MUESTRA**

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

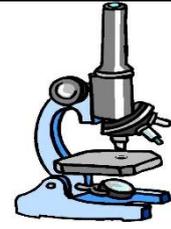
Esterilizar la cámara de flujo laminar previo a la ubicación de los materiales, para evitar algún tipo de contaminación y las muestras deben estar ubicadas en tubos de ensayos.

- **PROCEDIMIENTO**

- **Paso 1:** Cortar varios trozos del tejido enfermo utilizando un bisturí estéril.
- **Paso 2:** Desinfectar los trozos de muestra en una caja petri de 60 mm que contenga una solución de hipoclorito de sodio al 3%, durante 3 minutos. Enjuagar luego los trozos desinfectados con agua destilada estéril en otra caja petri, vertiendo el agua sobre la muestra con una pipeta estéril.
- **Paso 3:** Colocar los trozos lavados sobre toallas de papel estériles durante 10 minutos para que se sequen.
- **Paso 4:** Cuando los trozos estén secos, tomarlos con una pinza estéril y ‘sembrarlos’ en una caja petri que contenga el medio de cultivo PDA. Hacer lo mismo con las demás cajas (para multiplicar las muestras). Incubar las cajas a 24 °C durante 7 días, tiempo en que el hongo producirá masas de conidias y micelio.



**Universidad Técnica Estatal de Quevedo**  
*Laboratorio de Microbiología*  
**Técnica para Medición Radial**



- **OBJETIVO**

- Determinar el crecimiento radial de los hongos durante siete días

- **INSTRUMENTAL**

- Contador de colonia
- Marcador indeleble
- Incubadora

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

- **PROCEDIMIENTO**

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

$$T - Tr / T * 100$$

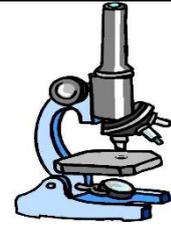
**Donde:**

T = Testigo

Tr = Tratamiento



**Universidad Técnica Estatal de Quevedo**  
*Laboratorio de Microbiología*  
**Técnica para Medición Radial**



- **OBJETIVO**

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

- **INSTRUMENTAL**

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

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

- **PROCEDIMIENTO**

- **Paso 1:** Dependiendo del tipo de muestra medir, se ha de habrá de preparar una muestra con una concentración apta para su recuento.
- **Paso 2:** Retirar con cuidado la tapa de la caja petri en donde se encuentran los hongos.

- **Paso 3:** En una probeta de 10 ml colocar agua estéril, para adicionar sobre el hongo.
- **Paso 4:** Con la varilla esparcir el micelio del hongo.
- **Paso 5:** Con la micropipeta absorber el líquido de la caja petri para colocar en el microtubo eppendorf previamente colocado una gasa estéril para evitar filtrar micelio.
- **Paso 6:** Sellar y colocar el microtubo eppendorf en el agitador Vórtex para tener una solución homogénea.
- **Paso 7:** Finalmente la muestra se coloca en el contador de Neubauer para observar en el microscopio la cantidad de esporas obtenidas del hongo.
- **Paso 8:** Para tener el porcentaje de esporas si se realizó el conteo en cuadros grandes se multiplica por 2000 y en cuadros pequeños se multiplica por 50000, aplicando la fórmula del crecimiento radial. También se puede aplicar las fórmulas:
- $\text{Conidias /ml} = \# \text{ de Conidias contadas} * 25000 * \text{ml depositado en cámara de neubauer}$
- $\text{Conidias total} = (\text{conidias /ml}) * \text{volumen de suspensión original}$
- $\% \text{ de Inh. Esp} = (\text{Numero Esporas Test} - \text{Numero Esporas Trat}) / (\text{Numero Esporas Test}) * 100$

## Anexo 15. Certificado de laboratorio



**UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO**

**Coordinación General de Investigación, Desarrollo e Innovación**

Km. 1 ½ Vía Quevedo-Santo Domingo de los Tsáchilas

Teléfonos: (593 5) 2757463 Fax: (593 5) 2753303

Quevedo-Los Ríos-Ecuador



*Dr. Byron Oviedo Bayas*

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

**CERTIFICO:**

*Que la Srta. Shirley Narcisca Vélez Calderón con número de identificación 120764389-9 Egresada de la Facultad de Ciencias Ingeniería de la Carrera de Ingeniería Agroindustrial realizó la investigación en el tema titulado "EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-FÚNGICA DE ACEITES ESENCIALES DE HOJAS Y CORTEZA DE Citrus limon (LIMÓN SUTIL) PARA LA INHIBICIÓN DE HONGOS PATÓGENOS PRESENTES EN Carica papaya L. (PAPAYA MARADOL) Y Carica papaya var. Solo sunrise (PAPAYA HAWAIANA), QUEVEDO 2016", bajo la dirección del Director de Proyecto de Investigación Ing. Flor Marina Fon Fay Vásquez M.Sc, desde el 04 de diciembre del 2015 hasta el 02 de diciembre del 2016, en el área de "Biotecnología" Biología Molecular, Microbiología, Cultivo de Tejido.*

*Autorizo la Srta. Shirley Narcisca Vélez Calderón hacer uso de la presente certificación en la forma que estimare conveniente a sus intereses personales.*

Quevedo, diciembre 13 del 2016



*Dr. Byron Oviedo Bayas*

Coordinador General de Investigación, Desarrollo e Innovación

E-mail: boviedo@uteq.edu.ec

Universidad Técnica Estatal de Quevedo

Km. 1 ½ vía Quevedo-Santo Domingo de los Tsáchilas, C.P. 73

Teléfonos: (593 5) 2757463 Fax: (593 5) 2753303

