



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y FORESTALES
CARRERA DE AGRONOMÍA

Trabajo de Integración Curricular
previo a la obtención del Grado
Académico de Ingeniero
Agrónomo.

Proyecto de Investigación:

“ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO Y ANTIFÚNGICO DEL ACEITE ESENCIAL DE
(*Citrus sinensis*) VARIEDAD VALENCIA EN ESTADO VERDE Y MADURO”

Autor:

Juan Carlos Molina Noboa

Director del Proyecto de Investigación:

Ing. Pablo Cesar Ramos Corrales, PhD.

Quevedo – Los Ríos –Ecuador

2023



DECLARACIÓN DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, **Juan Carlos Molina Noboa**, declaro que la investigación 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 documento, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normatividad institucional vigente.

Juan Carlos Molina Noboa

C.C: 1206242602



CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

El suscrito, **Ing. Pablo Cesar Ramos Corrales, PhD.** Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que la estudiante **Juan Carlos Molina Noboa**, realizó el proyecto de investigación titulado “**Análisis cromatográfico y antifúngico del aceite esencial de (*Citrus sinensis*) variedad Valencia en estado verde y maduro.**”, previo a la obtención del Grado Académico de Ingeniero Agrónomo, bajo mi dirección, habiendo cumplido con todas las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

Ing. Pablo Cesar Ramos Corrales, PhD.

DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN



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

El suscrito, **Ing. Pablo Cesar Ramos Corrales PhD.**, mediante el presente cumpla en presentar a usted, el informe de proyecto de Investigación titulado “**Análisis cromatográfico y antifúngico del aceite esencial de (*Citrus sinensis*) variedad Valencia en estado verde y maduro**” Presentado por el estudiante **Juan Carlos Molina Noboa**, egresado de la Carrera de Agronomía, que fue revisado bajo mi dirección según resolución del Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, que se ha desarrollado de acuerdo al Reglamento de la Unidad de Integración Curricular de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo y cumple con el requerimiento de análisis de URKUND el cual avala los niveles de originalidad en un 98% y similitud 2%, del trabajo investigativo. Valido este documento para que el estudiante siga con los trámites pertinentes, de acuerdo como lo establece el Reglamento.

Document Information

Analyzed document	Tesis_Molina_Revisado_Mayra_08-11-23 (Corregido).docx (D178678442)
Submitted	2023-11-13 17:49:00
Submitted by	Angel Virgilio Cedeño Moreira
Submitter email	acedenom@uteq.edu.ec
Similarity	2%
Analysis address	acedenom.uteq@analysis.orkund.com

Ing. Pablo Cesar Ramos Corrales PhD.

DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y FORESTALES
CARRERA DE AGRONOMÍA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título:

“Análisis cromatográfico y antifúngico del aceite esencial de (*Citrus sinensis*) variedad Valencia en estado verde y maduro.”

Presentado al Consejo Directivo de la Facultad como requisito previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo.

Aprobado por:

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing. Silvia Gicela Saucedo Aguiar, PhD.

INTEGRANTE DEL TRIBUNAL

Ing. Milton Fernando Cabezas Guerrero, PhD

INTEGRANTE DEL TRIBUNAL

Ing. Cesar Cristobal Varas Maenza Msc.

QUEVEDO – LOS RÍOS - ECUADOR

2023

AGRADECIMIENTO

Le doy mi total agradecimiento en primer lugar a Dios, por mantenerme con salud, gracias a mis padres por ayudarme, apoyarme y luchar conmigo para seguir adelante, de esta manera me brindan fuerzas para no rendirme y seguir con mis estudios que ya en poco tiempo terminaré.

Agradezco al doctor Pablo Ramos por haberme permitido llevar a cabo una investigación demostrando ser un excelente docente, proporcionando información esencial para comprender, en términos generales, un resumen conciso de la carrera, centrada en cuestiones relacionadas con la química y los minerales presentes en el suelo, entre otros temas.

Le agradezco a los responsables del laboratorio, Ing. Ángel Cedeño Moreira MSc. y el Ing., Erick García Intriago, que me ayudaron con muchas cosas como el procedimiento de cada paso que tiene que cumplirse para la elaboración de mi estudio y el desarrollo de mi tesis.

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a mis padres, por haberme motivado a ser Ingeniero agrónomo el cual no me arrepiento ya que mi gusto al campo es muy inmenso, me da mucha pena saber que me graduare y mi padre no estará conmigo ya que por cosas de la vida él tuvo que partir a otra vida y él era la persona que más ganas tenía de verme incorporar como profesional, para él era un orgullo que sus dos hijos sean personas estudiadas y salir adelante para que nadie nos discrimine.

Le dedico todo esto a mi madre, quien ha sido el amor de mi vida por ayudarme siempre.

Juan Carlos Molina Noboa

RESUMEN

La naranja Valencia es conocida por su sabor dulce y jugosidad, lo que la hace relevante en la industria alimentaria y farmacéutica. Por lo que esta investigación se enfocó en analizar cromatográfica y antifúngicamente el aceite esencial de (*Citrus sinensis*) variedad Valencia en estado verde y maduro. Para llevar a cabo esta investigación, se utilizó cromatografía de gas acoplada a masas mediante un equipo Perkin Elmer Clarus 500. En cuanto a la preparación de las cepas de los hongos, se promovió su crecimiento en medios de cultivo de V8 previamente disperso el AEs. Luego de analizar cromatográfica y antifúngicamente el aceite esencial de la variedad de naranja Valencia (*Citrus sinensis*) en estado verde y maduro, reveló la presencia de 39 compuestos químicos en el aceite esencial, destacando el mirceno, limoneno y linalol. Se confirma un aumento de limoneno y mirceno con la maduración de la naranja, mientras que, el linalol es reducido. El grupo funcional preponderante, acertado mediante cromatografía, en los Aceites Esenciales (AEs) presentes en el estado verde y maduro de la naranja valencia, corresponde al grupo Alquenos, con una incidencia del 46,2%. Se encuentra que los aceites esenciales afectan significativamente la velocidad de crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae* y *Phytophthora palmivora*. En términos de porcentaje de inhibición el aceite verde al 100% muestra una inhibición del 24,82% en *L. theobromae* y una inhibición del 56,08% en *P. palmivora*. En cuanto al porcentaje de esporulación, se observa una reducción de la esporulación con el uso de aceite verde al 50% en *L. theobromae* y aceite maduro al 50% en *P. palmivora*. Los hallazgos más destacados de esta investigación revelaron que el aceite esencial de naranja Valencia posee propiedades notables para inhibir tanto el crecimiento como la esporulación de dos fitopatógenos importantes, *P. palmivora* y *L. theobromae*, en un entorno in vitro.

Palabras clave: Limoneno, Inhibición, Antifúngica

ABSTRACT

The Valencia orange is known for its sweet flavor and juiciness, which makes it relevant in the food and pharmaceutical industries. Therefore, this research focused on chromatographically and antifungally analyzing the essential oil of (*Citrus sinensis*) Valencia variety in a green and ripe state. To carry out this research, mass-coupled gas chromatography was used using a Perkin Elmer Clarus 500 equipment. Regarding the preparation of the fungal strains, their growth was promoted in V8 culture media previously dispersed with the EO. After chromatographically and antifungally analyzing the essential oil of the Valencia orange variety (*Citrus sinensis*) in a green and ripe state, it revealed the presence of 39 chemical compounds in the essential oil, highlighting myrcene, limonene and linalool. An increase in limonene and myrcene is confirmed with the ripening of the orange, while linalool is reduced. The predominant functional group, determined by chromatography, in the Essential Oils (EOs) present in the green and ripe state of the Valencia orange, corresponds to the Alkenes group, with an incidence of 46.2%. Essential oils are found to significantly affect the growth rate of *Lasiodiplodia theobromae* and *Phytophthora palmivora*. In terms of percentage inhibition, 100% green oil shows 24.82% inhibition on *L. theobromae* and 56.08% inhibition on *P. palmivora*. Regarding the percentage of sporulation, a reduction in sporulation is observed with the use of 50% green oil in *L. theobromae* and 50% mature oil in *P. palmivora*. The salient findings of this research revealed that Valencia orange essential oil possesses remarkable properties to inhibit both the growth and sporulation of two important phytopathogens, *P. palmivora* and *L. theobromae*, in an in vitro environment.

Keywords: Limonene, Inhibition, Antifungal

TABLA DE CONTENIDO

PORTADA	i
DECLARACIÓN DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS	ii
CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	iii
REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO	iv
CERTIFICADO DE APROBACIÓN POR TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN	¡Error!
Marcador no definido.	
AGRADECIMIENTO	vi
DEDICATORIA.....	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
TABLA DE CONTENIDO	x
CODIGO DÚBLIN.....	xvi
Introducción.....	1
CAPÍTULO I. <u>CONCEPTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN</u>	
1.1. Problema de investigación	4
1.1.1. Planteamiento del problema.....	4
1.1.2. Formulación del problema	4
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
CAPÍTULO II. <u>FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN</u>	
2.1. Marco conceptual.....	9
2.1.1. La naranja.....	9
2.1.2. Los aceites esenciales.....	9
2.1.3. <i>Phytophthora palmivora</i>	9
2.1.4. <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	9
2.2. Marco referencial	10
2.2.1. Origen.....	10
2.2.2. El cultivo de naranja.....	10

2.2.3.	Taxonomía	10
2.2.4.	Morfología	11
2.2.5.	Naranja valencia (<i>Citrus x sinensis</i>).....	11
2.2.6.	Enfermedades en el cultivo de naranja.....	12
2.2.6.1.	<i>Phytophthora palmivora</i>	12
2.2.6.2.	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	12
2.2.7.	Los aceites esenciales.....	13
2.2.7.1.	Aceites esenciales de cítricos.....	13
2.2.7.2.	Actividad antimicrobiana.....	13
2.2.7.3.	Actividad antioxidante.....	13
2.2.7.4.	Actividad antifúngica.....	14
2.3.	Revisión histórica del tema en estudio.....	14
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN		
3.1.	Localización	17
3.2.	Tipo de investigación	17
3.3.	Métodos de investigación.....	17
3.4.	Fuentes de recopilación de la información.....	18
3.4.1.	Fuente primaria	18
3.4.2.	Fuente secundaria.....	18
3.5.	Diseño de la investigación	18
3.5.1.	Factores de estudio.....	18
3.5.2.	Tratamientos.....	18
3.5.3.	Diseño experimental.....	19
3.6.	Instrumentos de investigación.....	20
3.6.1.	Manejo del experimento.....	20
3.6.1.2.	Extracción de Aceite Esencial.....	20
3.6.1.3.	Análisis cromatógrafo del aceite esencial de (<i>Citrus sinensis</i>) en estado verde y maduro	21
3.6.1.4.	Aislamiento de <i>P. palmivora</i>	21
3.6.1.5.	Actividad antifúngica de <i>Citrus sinensis</i> frente a <i>Phytophthora palmivora</i> y <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	22
3.6.2.	Variables evaluadas.....	22
3.6.2.2.	Velocidad de crecimiento de <i>P. palmivora</i> y <i>L. theobromae</i> (cm).....	23
3.6.2.3.	Porcentaje de inhibición (%).....	23

3.6.2.4. Porcentaje de esporulación (%).....	23
3.7. Tratamiento de los datos	24
3.8. Recursos humanos y materiales.....	24
3.8.1. Recursos humanos.....	24
3.8.3. Equipos.....	25
3.8.4. Material biológico	25
3.8.5. Materiales de oficina	26
CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1. Resultados	28
4.1.1. Análisis cromatográfico de gas (CG).....	28
4.1.1.2. Compuestos mayoritarios.....	30
4.1.1.3. Compuestos volátiles según su grupo funcional.	31
4.1.1.4. Porcentaje de monoterpenos, sesquiterpenos y no terpénicos.....	32
4.1.2. Velocidad de crecimiento <i>P. palmivora</i> y <i>L. theobromae</i> (cm).....	32
4.1.3. Porcentaje de inhibición (%).....	39
4.1.4. Porcentaje de esporulación (%).....	40
4.2. Discusión.....	42
CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	
5.1. Conclusiones	46
5.2. Recomendaciones.....	47
CAPÍTULO VI BIBLIOGRAFÍA	
6.1. Bibliografía	49
CAPITULO VII. ANEXOS	
7.1. Anexos	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Clasificación taxonómica de la naranja.....	11
Tabla 2	Tratamiento de los datos.....	19
Tabla 3	Esquema del análisis de varianza.....	20
Tabla 4	Compuestos volátiles presentes en el AEs verde y maduro.....	28
Tabla 5	Compuestos mayoritarios presentes en el AEs de naranja valencia con sus respectivos estándares (base de datos del CG).....	31
Tabla 6	Porcentaje de compuestos volátiles según su grupo funcional presentes en el AEs de naranja valencia.....	31
Tabla 7	Porcentaje de monoterpenos, sesquiterpenos y no terpenicos.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Velocidad de crecimiento de <i>L. theobromae</i> y <i>P. palmivora</i> a las 24 horas después de inoculados los AEs.....	33
Figura 2 Velocidad de crecimiento de <i>L. theobromae</i> y <i>P. palmivora</i> a las 48 horas después de inoculados los AEs.....	34
Figura 3 Velocidad de crecimiento de <i>L. theobromae</i> y <i>P. palmivora</i> a las 72 horas después de inoculados los AEs.....	35
Figura 4 Velocidad de crecimiento de <i>L. theobromae</i> y <i>P. palmivora</i> a las 96 horas después de inoculados los AEs.....	36
Figura 5 Velocidad de crecimiento de <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	37
Figura 6 Velocidad de crecimiento de <i>Phytophthora palmivora</i>	38
Figura 7 Porcentaje de inhibición de <i>L. theobromae</i> y <i>P. palmivora</i> a las 96 horas después de inoculados los AEs.....	39
Figura 8 Porcentaje de esporulación de <i>L. theobromae</i> 96 horas después de inoculados los AEs.....	40
Figura 9 Porcentaje de esporulación de <i>P. palmivora</i> 96 horas después de inoculados los AEs.....	41

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Extracción de aceite esencial de naranja valencia.....	56
Anexo 2. Llenado de cajas petri con medio de cultivo V8.....	56
Anexo 3. Análisis de varianza Velocidad de crecimiento a las 24 horas.....	56
Anexo 4. Análisis de varianza Velocidad de crecimiento a las 48 horas.....	57
Anexo 5. Análisis de varianza Velocidad de crecimiento a las 72 horas.....	58
Anexo 6. Análisis de varianza Velocidad de crecimiento a las 96 horas.....	58
Anexo 7. Análisis de varianza porcentaje de inhibición.....	59
Anexo 8. Análisis de varianza porcentaje de esporulación en <i>L. theobromae</i>	59
Anexo 9. Análisis de varianza porcentaje de esporulación en <i>P. palmivora</i>	60

CÓDIGO DÚBLIN

Título:	“Análisis cromatográfico y antifúngico del aceite esencial de (<i>Citrus sinensis</i>) variedad Valencia en estado verde y maduro.”		
Autor:	<u>Molina Noboa Juan Carlos</u>		
Palabras clave:	Limoneno	Inhibición	Antifungica
Fecha de publicación:			
Editorial:	Quevedo: UTEQ, 2023		
Resumen:	<p>La naranja Valencia es conocida por su sabor dulce y jugosidad, lo que la hace relevante en la industria alimentaria y farmacéutica. Por lo que esta investigación se enfocó en analizar cromatográficamente y antifúngicamente el aceite esencial de (<i>Citrus sinensis</i>) variedad Valencia en estado verde y maduro. Para llevar a cabo esta investigación, se utilizó cromatografía de gas acoplada a masas mediante un equipo Perkin Elmer Clarus 500. En cuanto a la preparación de las cepas de los hongos, se promovió su crecimiento en medios de cultivo de V8 previamente disperso el AEs.....</p>		
Abstract:	<p>The Valencia orange is known for its sweet flavor and juiciness, which makes it relevant in the food and pharmaceutical industries. Therefore, this research focused on chromatographically and antifungally analyzing the essential oil of (<i>Citrus sinensis</i>) Valencia variety in a green and ripe state. To carry out this research, mass-coupled gas chromatography was used using a Perkin Elmer Clarus 500 equipment. Regarding the preparation of the fungal strains, their growth was promoted in V8 culture media previously dispersed with the EO.....</p>		
Descripción:	77 hojas: dimensiones, 29 x 21 cm + CD-ROM 6162		
Url:			

Introducción

La naranja es una de las frutas más consumidas en el mundo, debido a su sabor agradable, aroma y propiedades nutricionales. Además, sus componentes bioactivos, como los aceites esenciales, tienen propiedades terapéuticas y funcionales que han sido objeto de numerosos estudios científicos. Entre las variedades de naranja, la *Citrus sinensis* variedad 'Valencia' es una de las más apreciadas por su sabor dulce y jugosidad (Lara et. al, 2013).

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

Debido a sus múltiples propiedades, se ha llegado a extraer el aceite esencial de naranja el cual ha sido ampliamente utilizado a nivel mundial a lo largo de la historia. Sus usos más comunes se han dirigido a la industria farmacéutica, perfumería, medicina tradicional y como saborizante y aromatizante en el ámbito culinario. Tiene compuestos aromáticos y de aceites esenciales con constituyentes biológicos que poseen propiedades insecticidas, nematocidas, fungistáticas y antimicrobiana (Cardoso y Sosa, 2012).

Las propiedades antimicrobianas de especies vegetales han sido reconocidas, por sus usos desde tiempos ancestrales para la preservación de alimentos y en medicina. Actualmente existe un renovado interés en el estudio de aceites esenciales ya que se buscan alternativas de origen natural para la preservación de alimentos, lucha contra plagas agrícolas y por los problemas que implica la resistencia de microorganismos a controles químicos y por el creciente rechazo de la sociedad al uso de compuestos químicos como aditivos de alimentos y pesticidas (Suhr y Nielsen, 2003).

Los aceites esenciales son responsables de los mecanismos de defensa de las plantas ante el ataque de microorganismos fitopatógenos. Los componentes mayoritarios de los aceites esenciales, conocidos como terpenoides, actúan en el metabolismo vegetal como antibióticos, y se producen en respuesta al ataque de microorganismos. Además, estas biomoléculas pueden actuar como fitoalexinas y compuestos anti alimentarios, que defienden a la planta del ataque de herbívoros (Kende, 2000).

Para llevar a cabo este proyecto, se realizaron extracciones de los aceites esenciales de las naranjas 'Valencia' en estado verde y maduro, seguidas de análisis cromatográficos para determinar su perfil químico y comparar su composición. Asimismo, se llevaron a cabo ensayos antifúngicos in vitro para evaluar la actividad de los aceites esenciales contra algunos hongos patógenos de importancia agrícola y médica.

En definitiva, este proyecto tuvo como objetivo en llevar a cabo un análisis cromatográfico exhaustivo y realizar una evaluación rigurosa de las propiedades antifúngicas inherentes al aceite esencial extraído de la variedad Valencia de *Citrus sinensis* en sus estados de madurez, tanto en su fase verde como en su fase madura. Este enfoque integral permitió un examen detallado de las posibles variaciones en la composición química y la actividad antifúngica de este aceite esencial

CAPÍTULO I
CONCEPTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problema de investigación

1.1.1. Planteamiento del problema

Phytophthora palmivora y *Lasiodiplodia theobromae* son hongos patógenos que ha cobrado importancia en varios países de América Latina, especialmente en Ecuador, causando principalmente la muerte de árboles y pudrición de frutos como en el cultivo de cacao que son de importancia económica para nuestro país.

La mayoría de los agricultores optan por usar fungicidas para controlar y evitar la propagación de *P. palmivora* y *L. theobromae*, esto ha elevado el costo de producción, gran daño al ambiente y a la salud humana. El uso de aceites esenciales para el control e inhibición de hongos fitopatógenos puede ser considerada como alternativa para su manejo.

Diagnóstico

Los hongos *Phytophthora palmivora* y *Lasiodiplodia theobromae*, son los principales causantes de las enfermedades que afectan al cultivo de cacao. La mayoría de los agricultores optan por el uso de fungicidas afectando a la planta y generando resistencia de los hongos fitopatógenos al producto. Una alternativa para el manejo de hongos perjudiciales en los cultivos agrícolas es el uso de aceites esenciales de especies vegetales. El aceite esencial de la naranja contiene altas concentraciones de limoneno el cual ayuda a repeler o mantener controlado al hongo para que no afecte a la mazorca de cacao.

Pronóstico

Se prevé que utilizando los aceites esenciales extraídos de la naranja Valencia permita determinar el potencial de estos para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos comunes, lo que podría abrir nuevas oportunidades para su uso en aplicaciones agrícolas.

1.1.2. Formulación del problema

¿Cuáles de las concentraciones del aceite esencial que tienen un efecto inhibitorio contra *Phytophthora palmivora* y *Lasiodiplodia theobromae*?

1.1.3. Sistematización del problema

¿Cuál es el efecto de diferentes concentraciones de aceite esenciales en los hongos fitopatógenos *Phytophthora palmivora* y *Lasiodiplodia theobromae*?

¿Cómo cuantificar los terpenos del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis*) en estado verde y maduro?

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Analizar cromatográfica y antifúngicamente el aceite esencial de (*Citrus sinensis*) variedad Valencia en estado verde y maduro.

1.2.2. Objetivos específicos

- Cuantificar cromatográficamente los terpenos del aceite esencial de (*Citrus sinensis*) en estado verde y maduro.
- Evaluar la actividad antifúngica del aceite esencial (verde y maduro) de (*Citrus sinensis*) frente a *Phytophthora palmivora* y *Lasiodiplodia theobromae*.

1.3. Justificación

La presencia cada vez más extendida de hongos fitopatógenos, como *Phytophthora palmivora* y *Lasiodiplodia theobromae*, en las prácticas agrícolas de América Latina, incluido Ecuador, ha generado consecuencias significativas en el entorno ambiental. Este fenómeno se atribuye en gran medida al uso extensivo de fungicidas químicos, los cuales, aunque eficaces en el control de patógenos, plantean riesgos considerables para la salud humana y provocan impactos negativos en la biodiversidad y la calidad del suelo.

La necesidad urgente de encontrar alternativas viables y respetuosas con el medio ambiente para hacer frente a esta problemática ha llevado al reconocimiento de los aceites esenciales como agentes fungicidas prometedores. Estos compuestos naturales presentan ventajas notables, como su efectividad probada en la inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos, costos relativamente bajos y un impacto ambiental mínimo en comparación con los fungicidas químicos convencionales.

Este estudio propone una contribución significativa al campo del manejo fitosanitario al enfocarse en la aplicación de aceites esenciales como una estrategia innovadora para controlar los patógenos en la producción de cacao en Ecuador. Al centrarse en este cultivo específico, se aborda una preocupación crítica para la economía agrícola del país y se ofrece una solución potencialmente transferible a otros sectores agrícolas afectados por problemas similares.

Además de los beneficios directos en términos de control de patógenos, la adopción de métodos basados en aceites esenciales fomenta la sostenibilidad en la agricultura. La incorporación de estas alternativas no solo preserva la salud del suelo y la biodiversidad, sino que también reduce la dependencia de productos químicos sintéticos, promoviendo así la salud ambiental a largo plazo. Al mismo tiempo, la promoción de prácticas agrícolas más sostenibles contribuye a la protección del bienestar humano al minimizar la exposición a sustancias químicas potencialmente perjudiciales presentes en los fungicidas convencionales.

Por lo tanto, este estudio no solo aborda la problemática inmediata de la proliferación de hongos fitopatógenos en la agricultura ecuatoriana, sino que también ofrece una perspectiva

a largo plazo al impulsar el desarrollo de estrategias de manejo fitosanitario que sean eficaces, económicamente viables y respetuosas con el medio ambiente

CAPÍTULO II
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Marco conceptual

2.1.1. La naranja

La superficie de plantaciones de naranja en el Ecuador es de 55.953 hectáreas con una producción anual de unas 42.000 toneladas, de las cuales la provincia de Bolívar (2.650 hectáreas) tiene la mayor producción, representando el 65,56% de la producción total del país (Montalvan, et. al, 2022).

2.1.2. Los aceites esenciales

Diversos estudios fitoquímicos de los Aceites esenciales (AEs), muestran diversas acciones farmacológicas especialmente como inhibidores del crecimiento de variado número de grupos fúngicos, que causan afecciones en humanos y en cultivos de interés agrícola. Varios compuestos de AEs son muy eficaces para inhibir el crecimiento del micelio y los esclerocios son los medios de reproducción de los hongos (de Menezes et. al, 2020).

2.1.3. *Phytophthora palmivora*

Es una de las enfermedades más importantes que afecta al cultivo de *Theobroma cacao* L. Las mayores pérdidas por este patógeno en el cacao resultan de la infección de los frutos en los que aparecen lesiones necróticas, pero las semillas también pueden verse afectadas, dejándolas sin valor comercial. En los tallos se forman canchales debajo de la corteza que reducen el vigor del árbol (Hernández et. al, 2023).

2.1.4. *Lasiodiplodia theobromae*

Es un hongo necrotrófico que causa serios daños a varios cultivos económicamente importantes a nivel mundial y es considerado un patógeno peligroso que puede causar la muerte de las plantas (Moreira et. al, 2021). Es responsable de causar más de 500 enfermedades de las plantas, incluida la pudrición de la fruta, la pudrición de la raíz, la pudrición del cuello, la pudrición del extremo del tallo, la muerte regresiva, el cancro y la necrosis de la hoja (Huda et. al, 2022).

2.2. Marco referencial

2.2.1. Origen

Las naranjas proceden del sur de China y del sur del Himalaya, donde ha sido cultivado durante unos 4000 años, aunque la información escrita más antigua data de 2700 años. Se cree que Alejandro Magno las introdujo en Oriente. Los árabes las plantaron en el norte de África y España en el siglo X, donde se asentaron gracias al templado clima del Mediterráneo. Cristóbal Colón las trajo a las Américas, donde se cultivan ampliamente en Brasil, México, California y Argentina debido al clima templado y húmedo (Déu, 2016).

2.2.2. El cultivo de naranja

Las naranjas son el fruto del naranjo dulce, perteneciente a la familia Rutaceae. Esta familia incluye más de 1600 especies. En su mayoría frutas cítricas. Es un miembro importante de una familia de 20 frutas, todo comestible rico en vitamina C flavonoides y aceites esenciales (Arcadia, 2009).

Las principales regiones productoras de cítricos en el mundo están ubicadas en lo que se conoce como los cinturones citrícolas. En el caso de la naranja, en las regiones subtropicales se produce el 85% de la producción mundial, estando entre sus principales productores, Brasil (29%), Estados Unidos (11%), México (7%), India (6%) y China (5%) (Orduz y Garzón. 2012).

La producción de naranja de Ecuador es uno de los 25 cultivos más importantes del país, ya que la planta puede producir hasta 15.000 naranjas por año si se maneja bien el cultivo (Monteros et. al, 2015). Ecuador cuenta con 55.953 hectáreas de cultivo de naranja, de las cuales 10.639 hectáreas pertenecen a la provincia de Bolívar y 2.650 hectáreas al Cantón de Caluma (Medrano, 2008).

2.2.3. Taxonomía

En la tabla 1 podemos ver la taxonomía de la naranja:

Tabla 1

Clasificación taxonómica de la naranja

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Sapindales
Familia	Rutaceae
Género	<i>Citrus</i>
Especie	<i>Citrus sinensis</i> L.

Fuente: (Zambrano, 2014)

Elaboración: Autor

2.2.4. Morfología

Vásconez (2015), presenta las características morfológicas de la naranja.

- **Porte:** Altura de (3-5 m) la copa compacta frondosa, redonda. Tronco de corteza lisa y de color verde.
- **Hojas:** Firmes verdes oscuras brillantes lanceoladas y olorosas.
- **Flores:** Blancas, aromáticas de unos dos centímetros de diámetro.
- **Fruto:** Esférico de (7-8 cm), diámetro de superficie rugosa de color naranja intenso y pulpa ácida y amarga.

2.2.5. Naranja valencia (*Citrus x sinensis*).

Este tipo de naranja es el más demandado a nivel mundial, por lo que es una de las variedades más cultivadas en el Ecuador. Las naranjas con esta designación son de tamaño mediano y tienen una textura gruesa y coriácea. Cada vaina contiene de cuatro a seis semillas por frutos, con un alto contenido de jugo y una superficie rugosa y lisa. Este tipo de naranja tolera y se adapta mejor al cambio climático (Armas, 2012).

2.2.6. Enfermedades en el cultivo de naranja

Las enfermedades criptogámicas de mayor importancia en los cítricos, se encuentran: *Phytophthora* spp., *Mycosphaerella citri* y *Lasiodiplodia theobromae*. estos patógenos provocan lesiones y pudrición del tallo, manchas necróticas en hojas, pudrición de frutos y raíces, disminuyen el vigor y la producción del árbol hasta la muerte (Saenz et. al, 2019).

2.2.6.1. *Phytophthora palmivora*.

Es un patógeno cosmopolita con una amplia gama de huéspedes, incluidos cultivos muy importantes para la economía como el cacao, la papaya, la pimienta negra, el caucho, el coco y los cítricos. Los primeros informes que fueron publicados sobre esta enfermedad en este cultivo fueron en 1909 por Von Faber y por Maublanc (Widmer, 2014).

La presencia de *Phytophthora* en países tropicales corresponde principalmente a las siguientes especies: *P. capsici*, *P. citrophthora*, *P. megakarya*, *P. hevea* y *P. palmivora* donde esta última es más frecuente y agresiva. La similitud de las enfermedades hace que su identificación a nivel patológico sea poco confiable para diferentes especies, siendo la identificación correcta crucial para el monitoreo y manejo de patógenos (Cedeño et. al, 2020).

2.2.6.2. *Lasiodiplodia theobromae*.

Es un hongo fitopatógeno, propio del suelo, responsable de causar un gran número de enfermedades tanto en campo como en almacenamiento en más de 280 especies de plantas, incluyendo cultivos, frutas y árboles en plantación (Contreras, Espejo y Ruiz, 2015).

Lasiodiplodia theobromae es saprófita, pero se considera un patógeno latente, apareciendo como endófito en tejidos vegetales sanos, convirtiéndose en patógeno cuando el huésped está debilitado o estresado. Afecta a árboles frutales como mango, aguacate, papaya, plátano, rambután, lichi, uva, guanábana, marañón, cítricos, durazno y longan, entre otras especies, causando pérdidas económicas en diferentes etapas de producción (Picos et. al, 2015).

2.2.7. Los aceites esenciales

Los aceites esenciales son mezclas homogéneas de compuestos orgánicos que consisten principalmente en terpenoides. Tienen una cosa en común, que es que producen una variedad de aromas agradables. En condiciones ambientales, son líquidos menos densos, en algunos casos incluso transparentes (Contreras y Ruíz, 2012).

Los aceites esenciales son mezclas de varios químicos biosintetizados por las plantas que les dan a algunas flores su aroma característico, árboles, semillas y ciertos extractos animales. Son muy aromáticos, no grasos (así no se estropean), volátiles pues se evaporan rápidamente, y ligeros. Son insolubles en agua, ligeramente solubles en vinagres y solubles en alcohol, grasas, ceras y aceites vegetales (Gutiérrez, 2008).

2.2.7.1. Aceites esenciales de cítricos.

El aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis* L.) presenta un alto contenido de monoterpenos cuyo componente mayoritario es el limoneno (90%-96%), y otros monoterpenos oxigenados como linalol (1%-2%) y cineol (1%), que se encuentran en menor proporción. Todos estos componentes han demostrado actividad inhibitoria de crecimiento en diferentes hongos postcosecha (Guédez et. al, 2014).

2.2.7.2. Actividad antimicrobiana.

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se encuentra relacionada con la composición química (Al-Jabri y Hossain, 2018). Algunas de las aplicaciones en cuanto a inhibición microbiana a partir de aceites esenciales, han demostrado eficacia frente a varios patógenos comunes en la industria alimentaria, dentro de los cuales se encuentran: *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *S. aureus*, *Campylobacter*, *Enterococcus faecalis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*, y otros (Chen, Lee y Chang, 2016).

2.2.7.3. Actividad antioxidante.

Tienen varios modos de acción como antioxidante, tales como la prevención de la iniciación de la cadena, eliminadores de radicales libres, agentes reductores, la terminación de

peróxidos, la prevención de la continuación de abstracción de hidrógeno, así como desactivadores de la formación de oxígeno singlete y la unión de catalizadores de iones de metal de transición (Tongnuanchan y Soottawat, 2014).

2.2.7.4. Actividad antifúngica.

Hay reportes que muestran las propiedades antimicrobianas, antioxidantes y bio-reguladoras de los aceites esenciales y por lo tanto pueden ideales para el uso como fungicidas. Su estatus aprobado por la Food and drug administration (FDA) y su amplia disponibilidad han facilitado la rápida comercialización de plaguicidas basados en estos aceites (Sivakumar y Bautista, 2014).

2.3. Revisión histórica del tema en estudio

Se cree que la naranja es originaria de Asia, posiblemente de China o la India. Los árabes introducen la naranja en España durante su ocupación del país. Los navegantes portugueses introducen la naranja en Europa occidental. Los conquistadores españoles introducen la naranja en América. El cultivo de naranjas se extiende por todo el mundo, especialmente en los climas cálidos y subtropicales (Stampella, 2015).

Duarte et. al (2013), menciona en su investigación Efecto *in vitro* de aceites esenciales sobre *Alternaria solani* Sorauer donde, todos los aceites, excepto *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (naranja dulce), inhibieron el crecimiento micelial hasta los 7 días. Además, evidenciaron que el efecto inhibitor sobre la velocidad de crecimiento fue diferente para cada aceite, aunque existió una tendencia a que la mayor acción biológica se manifieste durante los primeros 4 días de exposición.

Gómez (2014) en su investigación titulada, actividad antifúngica del aceite esencial de cáscara de naranja (*Citrus aurantium* L.) frente al hongo *Fusarium semitectum*. El aceite esencial al 8%, presentó mayor actividad antifúngica, respecto a las demás concentraciones, con halo de inhibición de 0,61 mm; inferior al control utilizado, al cual no se le incorporó nada de aceite esencial y presentó 11,22 mm, siendo estadísticamente significativo ($p < 0,05$).

En la investigación de Peralta et al (2021), que tuvo como objetivo evaluar el efecto inhibitorio in vitro del aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill.) y cáscara de naranja (*Citrus sinensis* (Linn.) Osbeck.) sobre *Fusarium* spp. Concluyéndose que a los siete días de evaluación el tratamiento E3= (Eucalipto al 50%) tuvo menor crecimiento de la colonia de *Fusarium* spp., con 43.7 mm. promedio del área radial de la placa Petri y el tratamiento C1= (Cáscara de naranja al 0%) tuvo un crecimiento menor de la colonia de *Fusarium* spp., con 58.4 mm en promedio del área radial de la placa Petri.

Además, la investigación de Scalvenzi et.al (2016), donde evaluó el efecto de los aceites esenciales de *Citrus limon* y *Cymbopogon citratus*, procedentes de la Amazonía ecuatoriana, sobre el crecimiento in vitro de los hongos fitopatógenos *Rhizopus stolonifer* (ATCC 6227), *Aspergillus oryzae* (ATCC 10124), *Cladosporium cladosporioides* (ATCC 16022), *Fusarium solani* (ATCC 36031), *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora* sp. De acuerdo a los resultados obtenidos, el aceite esencial de *C. citratus* resultó ser promisorio para el control in vitro de hongos fitopatógenos, mientras el aceite de *C. limon* mostró datos interesantes solo para dos de las especies investigadas.

CAPÍTULO III
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Localización

El proyecto de Investigación se desarrolló en los Laboratorios de Microbiología, Biología y Bioquímica en el Campus Universitario “La María”. Esta finca es parte de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, ubicada en el Km 7 ½ vía Quevedo – El Empalme, cantón Mocache, Provincia de Los Ríos, con coordenadas geográficas 1°04'49" de latitud Sur y 79° 32'42" de longitud Oeste, a una altura de 66 m s.n.m.

3.2. Tipo de investigación

La investigación se llevó a cabo realizando de forma exploratoria – experimental, extrayendo aceite esencial de la cáscara de naranja (*Citrus sinensis*) en dos estados diferentes de maduración “verde y maduro” para medir su efecto contra los hongos *Phytophthora palmivora* y *Lasiodiplodia theobromae* y poder contrarrestar el crecimiento de estos hongos.

3.3. Métodos de investigación

La investigación se realizó con la aplicación del método inductivo, deductivo y analítico.

- **Inductivo:** Este método permitió realizar un estudio desde el aspecto particular hasta lo general, de esta forma obtendremos variables que brinden respuestas al análisis de los aceites esenciales de la cáscara de (*Citrus sinensis*) en cuanto a su actividad como fitofungicidas agrícolas.
- **Deductivo:** La utilización de este método fue necesario para brindar respuesta a la identificación de los efectos específicos que pueda generar la aplicación del aceite esencial de (*Citrus sinensis*) ante los agentes fitopatógenos.
- **Analítico:** Se aplicó para el análisis de los datos obtenidos en la evaluación de las variables de respuesta ante la aplicación del aceite esencial (*Citrus sinensis*) ante los agentes fitopatógenos y en base a esto se procederá a elaborar los resultados.

3.4. Fuentes de recopilación de la información

3.4.1. Fuente primaria

Para esta investigación se utilizó la fuente primaria para la evaluación de las variables a través de la observación directa, lo que permitió obtener respuestas ante la evaluación de la actividad antagónica de los aceites esenciales de la naranja Valencia sobre la inhibición micelial de hongos fitopatógenos como *P. palmivora* y *L. theobromae*.

3.4.2. Fuente secundaria

Se empleó la fuente secundaria haciendo uso de artículos científicos, tesis, revistas, libros y demás material bibliográfico relacionado con el tema de la investigación para el desarrollo de la estructura de la misma.

3.5. Diseño de la investigación

3.5.1. Factores de estudio

Factor A: Hongo (*Phytophthora palmivora* y *Lasiodiplodia theobromae*).

Factor B: Concentración (50 %; 100 %)

Factor C: Tipo (verde; maduro)

3.5.2. Tratamientos

Se realizarán 12 tratamientos conformados por aceites esenciales en dos concentraciones y dos etapas de maduración, que serán sometidos a hongos fitopatógenos (*Phytophthora palmivora* y *Lasiodiplodia theobromae*.) (Tabla 2).

Tabla 2*Tratamiento de los datos*

Número	Concentración	Aceite	Hongo
1	50%	VERDE	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
2	50%	VERDE	<i>Phytophthora palmivora</i>
3	50%	MADURO	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
4	50%	MADURO	<i>Phytophthora palmivora</i>
5	100%	VERDE	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
6	100%	VERDE	<i>Phytophthora palmivora</i>
7	100%	MADURO	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
8	100%	MADURO	<i>Phytophthora palmivora</i>
9	0%	VERDE	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
10	0%	VERDE	<i>Phytophthora palmivora</i>
11	0%	MADURO	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
12	0%	MADURO	<i>Phytophthora palmivora</i>

Elaboración: Autor**3.5.3. Diseño experimental**

Se empleará un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial AxBxC. Todos los factores contarán con 2 niveles. Factor A (*Phytophthora palmivora* y *Lasiodiplodia theobromae*.), factor B (50 %; 100 %), factor C (verde; maduro) adicionalmente se emplearán 3 repeticiones con 2 unidades experimentales cada una y un método de comparación de Tukey a nivel de 0.05.

En la Tabla 3 se presenta el diseño del análisis de varianza utilizado como estrategia metodológica para la ejecución de los experimentos en el marco de esta investigación.

Tabla 3*Esquema del análisis de varianza*

Fuente de variación	Grados de libertad
Tratamientos	11
Factor A	1
Factor B	1
Factor C	1
Interacción (A*B*C)	1
Error	24
Total	35

Elaboración: Autor

3.6. Instrumentos de investigación

3.6.1. Manejo del experimento

3.6.1.1. Recolección de naranja Valencia.

La recolección de las naranjas se realizó en la parroquia el Guayacán del cantón Quevedo en plantas que tenían frutas maduras y verdes que son necesarias para llevar a cabo los experimentos. Posteriormente se trasladaron al laboratorio de biología y microbiología de la UTEQ.

3.6.1.2. Extracción de Aceite Esencial.

Para la extracción del AEs se utilizó el método de decantación que consiste en comenzar con una muestra de AEs de naranja Valencia que contiene dos o más fases inmiscibles o una fase líquida con partículas sólidas en suspensión. La muestra se coloca en un recipiente adecuado, como un embudo de decantación o un recipiente de precipitados, y se permite que repose durante un tiempo suficiente para que las fases se separen debido a sus diferencias de densidad. Durante este tiempo, las partículas sólidas pueden asentarse en el fondo del recipiente si están presentes.

Con cuidado, se vierte lentamente la fase superior o el líquido menos denso en otro recipiente, separándolo de la fase inferior o del líquido más denso que queda atrás. Es importante hacerlo de manera suave y controlada para evitar mezclar las fases nuevamente. La fase separada se recoge en recipientes separados. En el caso de una mezcla líquida-líquida, las fases se pueden recoger en frascos separados. En el caso de una mezcla líquido-sólido, la fase líquida se puede verter con cuidado, y los sólidos restantes en el fondo se pueden separar posteriormente por filtración u otros métodos.

3.6.1.3. *Análisis cromatógrafo del aceite esencial de (Citrus sinensis) en estado verde y maduro.*

El AEs se analizó por cromatografía de gas acoplada a masa marca Perkin Elmer Clarus 500, columnas capilares de sílice fundida: un grupo polar (A) recubierto con polietileno glicol MW 20.000, conectado a un detector FID y un no polar (B) recubiertas con fenil-95% de metil 5% silicona conectado a un detector FID y un detector de masas cuadrípolar, temperatura del horno 90 ° C, y luego a 3 ° / min a 225 ° C (15 min), temperatura del detector FID y del inyector 255 ° C y 275 ° C respectivamente, móvil fase helio 1,87 ml / min y el volumen de inyección de 0,5 ul.

Los compuestos se identificaron por sus tasas de retención en ambas columnas, en comparación con los de la literatura, y la comparación de sus espectros de masas y las bases de datos existentes. Este análisis se realizó en los laboratorios de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires - Argentina, con el especialista en aceites esenciales Dr. Arnaldo Bandoni.

3.6.1.4. *Aislamiento de P. palmivora.*

El aislamiento de este fitopatógeno se llevó a cabo a través de la identificación de una mazorca que presentaba síntomas de infección por *Phytophthora palmivora* en una plantación comercial ubicada en el recinto "Los Naranjos" del cantón Mocache. La muestra fue posteriormente identificada, etiquetada y transportada a las instalaciones de los laboratorios de Biología y Microbiología de la UTEQ.

Para minimizar la presencia de contaminantes externos que pudieran interferir con el proceso de aislamiento, la muestra fue sometida a un lavado exhaustivo con agua y posteriormente se procedió a su secado al ambiente.

Se preparó un medio de cultivo utilizando una formulación de agar V8 enriquecido con jugo de tomate, el cual fue esterilizado adecuadamente antes de ser vertido en placas de Petri previamente esterilizadas. A continuación, se realizó un corte horizontal en la parte de la mazorca que mostraba síntomas y un corte interno para extraer una porción del área necrótica, que fue luego inoculada en las placas de Petri con el medio de cultivo preparado. Las placas de Petri se incubaron a una temperatura de 28 °C durante un período de 48 horas con el propósito de observar y evaluar el crecimiento colonial resultante.

3.6.1.5. Actividad antifúngica de *Citrus sinensis* frente a *Phytophthora palmivora* y *Lasiodiplodia theobromae*.

Para la evaluación del efecto antifúngico de los aceites esenciales de *Citrus sinensis* se empleó la metodología descrita en la investigación de Lozoya et al. (2005). Las cepas de los hongos se dejaron crecer en medios de cultivo de V8. Los incrementos se obtuvieron en caldo nutritivo de estos mismos medios, primero en agitación, en frascos Erlenmeyer de 75 ml colocados en un agitador incubador horizontal a 160 rpm a 28 °C en oscuridad por 72 h.

Se realizó una investigación de dos cepas de los patógenos (*Phytophthora palmivora*, *Lasiodiplodia theobromae*) en cultivo de agar (bactoragar) con la mezcla de V8 para realizar el medio de cultivo, se ubicó el tubo en la incubadora por 4 días hasta que el hongo tenga un crecimiento micelial bastante elevado, luego se procede aplicar los diferentes porcentajes de aceites esencial para ver el porcentaje de inhibición, el cual nos demostrara que método de aceite esencial es más eficaz contra esos patógenos.

3.6.2. Variables evaluadas

3.6.2.1. Cuantificación de terpenos.

Una vez obtenidos los resultados de la cromatografía de gas, se procedió meticulosamente a la clasificación de los compuestos químicos resultantes de dicha evaluación. Este proceso de

clasificación se llevó a cabo con base en criterios específicos, entre los cuales se incluyeron el grupo funcional de cada compuesto, así como la consideración de los compuestos mayoritarios y los compuestos volátiles presentes en el Aceite Esencial (AEs) de naranja valencia en sus estados de madurez: verde y maduro.

3.6.2.2. Velocidad de crecimiento de *P. palmivora* y *L. theobromae* (cm).

Una vez sembrado el patógeno en medio de cultivo V8 para *P. palmivora* y *L. theobromae* con las diferentes concentraciones de los extractos vegetales, se llevaron a cabo mediciones del diámetro de la colonia utilizando un calibrador de vernier a las 24, 48, 72 y 96 horas después de la incubación, tiempo en el cual el hongo invadió completamente la caja.

3.6.2.3. Porcentaje de inhibición (%).

Este se calculó como halo de inhibición, entre las colonias de fitopatógenos *P. palmivora* y *L. theobromae*, se midió con un calibrador de vernier desde el centro hacia los puntos cardinales de la caja Petri a las 96 horas después de la incubación.

3.6.2.4. Porcentaje de esporulación (%).

A cada caja de Petri con colonia fungosa se agregaron 10ml de agua destilada estéril y mediante agitación y posterior raspado de la colonia se recupera la suspensión, se toman dos alícuotas depositándolas en el área de conteo de la cámara de Neubauer.

El resultado de la esporulación se expresa en conidias/ml así:

$$N = \frac{N.1000 * D}{V}$$

Donde:

N: Numero de conidias/ml.

N.1000: Número total de conidias contadas.

V: Volumen de la muestra

D: Factor de dilución

3.7. Tratamiento de los datos

El análisis estadístico de los resultados obtenidos de las variables de estudio, se realizó mediante un análisis de varianza (DCA) con arreglo factorial A*B*C, para determinar diferencia significativa, se aplicó la prueba de significancia de Tukey 5% ejecutada en el software estadístico InfoStat (2020e).

3.8. Recursos humanos y materiales

3.8.1. Recursos humanos

- Docente tutor: Ing. Pablo Ramos Corrales PhD.
- Estudiante: Juan Carlos Molina Noboa

3.8.2. Recursos materiales

Agua destilada

Alcohol 75%

Bisturí

Botellas esterilizables de 500 ml

Cajas Petri

Cloro

Cubreobjetos

Embudos simples de vidrio

Frascos Chopp de vidrio (500 ml)

Fundas de polipropileno

Gasa estéril

Guantes Quirúrgicos

Juego de Micro-pipetas (0.2-10 μ l, 2- 0 μ l, 20-200 μ l y 100-1000 μ l)

Jugo de vegetales V8

Papel Parafilm

Papel Toalla

Piseta de 500 ml

Portaobjetos

Puntas amarillas de micro-pipeta (200 μ l)
Puntas Blancas de micro-pipeta (10 μ l)
Tijeras Quirúrgicas
Tubos de Eppendorf (1.5 ml)
Tubos Falcon (15ml)
Vasos de precipitación (50 ml, 250 ml y 500ml)

3.8.3. *Equipos*

Agitador
Autoclave
Balanza de 0.001 g
Cámara de flujo Laminar
Centrífuga
Destilador de agua
Estufa
Incubadora
Microscopio
Nevera
Vórtex

3.8.4. *Material biológico*

- ✓ Aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis*) variedad Valencia, obtenido en el laboratorio de Química y Bioquímica de la UTEQ.
- ✓ Cepa de *Phytophthora Palmivora* aislada de una plantación ubicada en el recinto “Los naranjos” del cantón Mocache.
- ✓ Cepa de *Lasiodiplodia theobromae* perteneciente al banco de cepas del laboratorio de Biología y Microbiología de la UTEQ.

3.8.5. *Materiales de oficina*

Computador

Cuaderno

Lapicero

Pendrive

CAPÍTULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

4.1.1. Análisis cromatográfico de gas (CG)

4.1.1.1. Compuestos volátiles presentes en el Aceite Esencial de naranja en estado verde y maduro.

Después de llevar a cabo un análisis cromatográfico del aceite esencial de la naranja Valencia en sus estados verde y maduro (Tabla 4), se identificaron un total de 39 compuestos químicos. Entre estos compuestos, se destacan el mirceno, el limoneno y el linalol debido a sus niveles porcentuales significativamente superiores en comparación con los otros compuestos identificados.

Tabla 4

Porcentaje de Compuestos volátiles presentes en el AEs de naranja en estado verde y maduro

Número	Estandares			Naranja "valencia"		Compuesto
	Naranja	Pomelo.	Mandarina.	AEs. V.	AEs. M.	
1	-	-	-	Tr	Tr	Heptanal
2	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Alfa Tuyeno
3	0,6	0,7	0,5	0,5	0,5	Alfa Pineno
4	0,1	0,3	Tr	Tr	Tr	Beta Pineno
5	0,3	0,5	0,3	0,3	0,4	Sabineno
6	2	2	2	1,8	1,9	Mirceno
7	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Alfa Felandreno
8	94,7	93,7	92,4	92,1	93,3	Limoneno
9	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	1,8-Cineol
10	Tr	0,1	Tr	Tr	Tr	Trans-Beta Ocimeno
11	0,3	0,3	2,6	Tr	Tr	Gamma Terpineno
12	0,1	0,1	0,2	0,4	0,1	Para Cimeno
13	-	0,3	-	-	-	Octanal
14	0,2	0,1	0,2	0,5	0,6	Terpinoleno
15	-	-	-	0,1	0,1	Nonanal

16	Tr	-	-	Tr	Tr	Acetato Octilo
17	Tr	Tr	Tr	0,1	0,1	Oxilimoneno Cis
18	Tr	Tr	Tr	0,1	Tr	Oxilimoneno Trans
19	-	Tr	Tr	-	-	Cis Hidrato Sabineno
20	Tr	Tr	Tr	0,1	Tr	Citronelal
21	0,2	0,2	0,1	0,5	0,5	Decanal
22	-	-	-	Tr	Tr	Mentona
23	-	-	-	Tr	Tr	Isomentona
24	Tr	0,1	Tr	0,1	Tr	Alfa Copaeno
25	0,3	0,1	0,1	0,9	0,6	Linalol
26	-	Tr	Tr	-	-	Trans Hidrato Sabineno
27	-	-	-	-	-	Timol Metil Éter
28	-	-	-	-	-	Terpinen-4-Ol
29	-	0,2	Tr	Tr	Tr	Beta Cariofileno
30	0,1	-	-	Tr	Tr	Octanol
31	Tr	Tr	Tr	0,1	Tr	Trans P-Menta-2,8-Dien-1-Ol
32	-	-	-	-	-	Cis Beta Farneseno
33	-	Tr	-	-	-	Alfa Humuleno
34	Tr	-	-	-	-	Acetato Citronelilo
35	0,1	0,1	Tr	0,2	0,1	Alfa Terpeneol
36	Tr	-	-	0,1	0,1	Dodecanal
37	-	0,1	-	Tr	Tr	Germacreno D
38	-	-	0,1	0	Tr	Valenceno
39	-	-	-	0,2	0,1	Neral
40	-	Tr	Tr	-	-	Acetato Nerilo
41	-	0,1	-	0,2	0,1	Geranial
42	Tr	Tr	0,1	0,1	0,1	Carvona
43	Tr	-	-	-	-	E,E, Alfa Farneseno
44	Tr	-	-	-	-	Decanol
45	-	-	-	Tr	-	Undecanal
46	Tr	0,1	-	Tr	Tr	Delta Cadineno
47	Tr	-	0,2	-	-	Acetato Geranilo
48	Tr	-	-	-	-	Citronelol

49	-	-	-	Tr	Tr	Aldehido Perilla
50	-	-	-	Tr	Tr	E Carveol
51	-	-	-	-	-	Germacreno B
52	-	-	-	-	-	Oxicariofileno
53	-	-	0,2	-	-	Antranilato De Dimetilo
54	-	-	-	-	-	Timol
55	-	-	-	-	-	Carvacrol
56	-	-	-	Tr	Tr	Beta Sinensal
57	-	-	-	0,1	Tr	Alfa Sinensal
58	-	-	-	-	-	Beta Sinensal
59	Tr	-	-	-	-	Nootketona

Nota: AEs.V (Aceites esenciales Verde), AEs.M (Aceites esenciales Maduro), Tr (Trazas), no detectado (-).

Elaboración: Autor

4.1.1.2. Compuestos mayoritarios.

Se observó un aumento progresivo del contenido de limoneno en el AEs maduro de naranja valencia con 93,3% en comparación con su contraparte en estado verde de 92,1%. Esta tendencia ascendente en el contenido de limoneno se correlaciona con el proceso de maduración, demostrando un incremento proporcional a dicho proceso. Dicha relación se establece mediante una comparación con los estándares de aceite de naranja (Tabla 5).

Es importante notar que los valores de limoneno y mirceno manifiestan un aumento concomitante a medida que progresa el estado de maduración. Por el contrario, el linalol exhibe una disminución en su concentración a lo largo del mismo proceso. Sin embargo, es relevante destacar que, a pesar de esta disminución en linalol, los niveles absolutos de limoneno y mirceno superan a los presentes en los estándares establecidos.

Tabla 5

Compuestos mayoritarios presentes en el AEs de naranja valencia con sus respectivos estándares (base de datos del CG)

Número	Naranja	Pomelo	Mandarina	AEs. Verde	AEs. Maduro	Compuesto
8	94,7	93,7	92,4	92,1	93,3	Limoneno
6	2	2	2	1,8	1,9	Mirceno
25	0,3	0,1	0,1	0,9	0,6	Linalol

Nota: AEs.V (Aceites esenciales Verde), AEs.M (Aceites esenciales Maduro), CG (Cromatógrafo de Gas).

Elaboración: Autor

4.1.1.3. Compuestos volátiles según su grupo funcional.

El grupo funcional preponderante, acertado mediante cromatografía, en los AEs presentes en el estado verde y maduro de la naranja valencia, corresponde al grupo Alquenos, con una incidencia del 46,2%. Subsiguientemente, se observa la presencia de aldehídos, exhibiendo una proporción del 28,2%, mientras que el grupo funcional éster se encuentra en una proporción minoritaria, representando tan solo el 2,6% de los componentes identificados (Tabla 6)

Tabla 6

Porcentaje de compuestos volátiles según su grupo funcional presentes en el AEs de naranja valencia

Grupo funcional	Número de compuestos volátiles	Porcentaje de compuestos volátiles
Alcohol	6	15,4 %
Aldehído	11	28,2 %
Cetona	3	7,7 %
Ester	1	2,6 %
Alqueno	18	46,2 %
Total	39	100%

Elaboración: Autor

4.1.1.4. Porcentaje de monoterpenos, sesquiterpenos y no terpénicos.

Los compuestos monoterpenoides predominan en mayor proporción, representando un 66,7 % en contraste con los sesquiterpenoides, que constituyen un 17,9 % de la composición. En menor medida, se encuentran presentes los compuestos no terpenoides, con una representación del 12,8% (Tabla 7).

Tabla 7

Porcentaje de monoterpenos, sesquiterpenos y no terpenicos

Terpeno	Cantidad	Porcentaje
Monoterpenos	26	66,7 %
Sesquiterpeno	7	17,9 %
No terpenicos	5	12,8 %
Total	39	100%

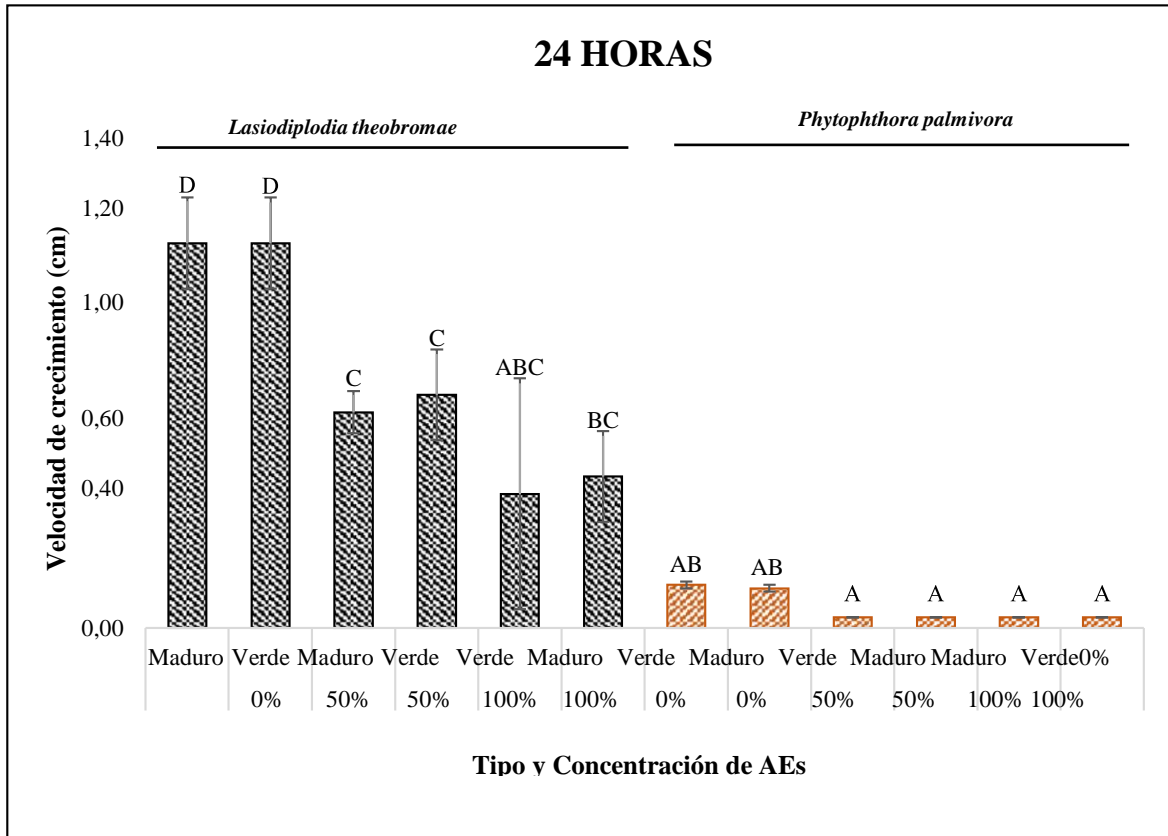
Elaboración: Autor

4.1.2. Velocidad de crecimiento *P. palmivora* y *L. theobromae* (cm).

Los resultados del estudio revelaron que la velocidad de crecimiento de los patógenos *L. theobromae* y *P. palmivora* después de 24 horas de la inoculación con aceites esenciales se vio afectada significativamente. En el caso del aceite esencial verde, se obtuvieron valores promedios notablemente más bajos, siendo la medida más reducida de 0,38 cm de diámetro de la colonia para *L. theobromae*. En contraste, los testigos sin adición de aceites evidenciaron un crecimiento exponencial con una longitud de 1,10 cm. En cuanto a los tratamientos empleados para *P. palmivora*, se observó que las concentraciones tanto del 100% como del 50% de los aceites esenciales verde y maduro generaron una inhibición parcial del crecimiento colonial del patógeno (Figura 1).

Figura 1

Velocidad de crecimiento de L. theobromae y P. palmivora a las 24 horas después de inoculados los AEs

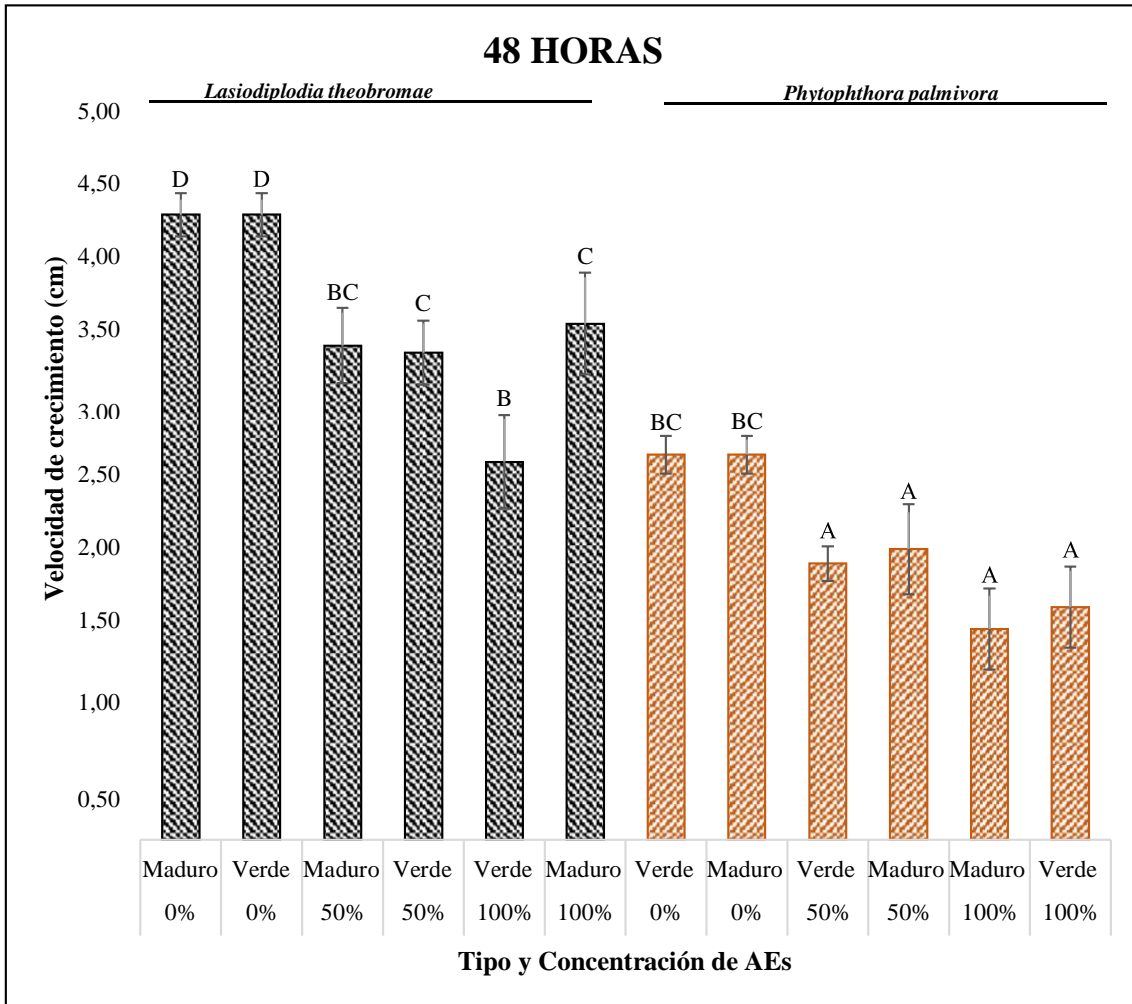


NOTA: Las barras de error indican \pm DE; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Tukey).

A las 48 horas posteriores a la inoculación de los aceites esenciales, se observó un impacto significativo en la velocidad de crecimiento de los patógenos. Para *L. theobromae*, el aceite esencial verde al 100% demostró la mayor capacidad inhibitoria, con un crecimiento de solo 2,60 cm, en contraste con los tratamientos de control sin aceites esenciales que presentaron un crecimiento de 4,30 cm. En el caso de *P. palmivora*, los tratamientos que contenían aceites esenciales en concentraciones del 50% y del 100% también mostraron efectos inhibitorios, con un crecimiento entre 2 y 1,45 cm, en comparación con los tratamientos de control que alcanzaron 2,65 cm (Figura 2).

Figura 2

Velocidad de crecimiento de *L. theobromae* y *P. palmivora* a las 48 horas después de inoculados los AEs

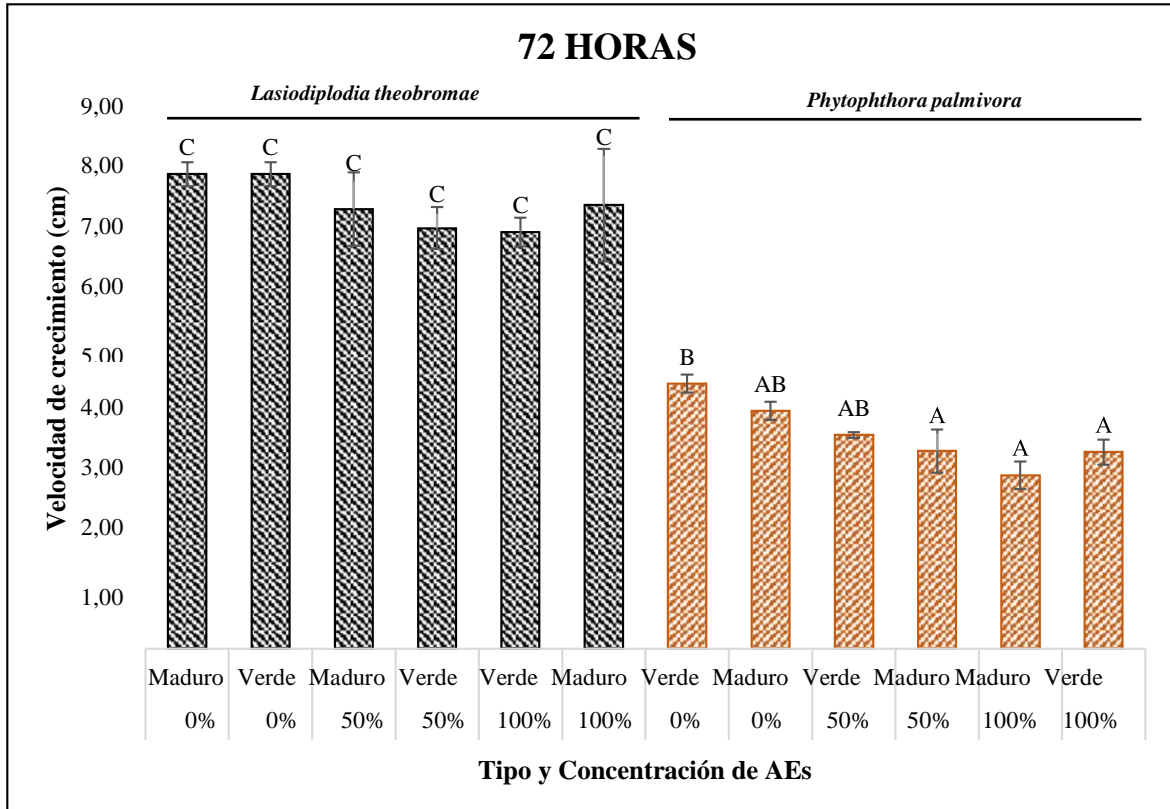


NOTA: Las barras de error indican \pm DE; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Tukey).

A las 72 horas después de la inoculación de los aceites esenciales, se observaron resultados destacados en relación con el crecimiento de los patógenos *Lasiodiplodia theobromae* y *Phytophthora palmivora*. En el caso de *L. theobromae*, el aceite esencial verde al 100% demostró la mayor capacidad inhibitoria, con un crecimiento reducido a 6,92 cm, en comparación con los tratamientos de control sin inoculación de aceites esenciales, que presentaron un crecimiento de 7,88 cm. Por otro lado, para el patógeno *P. palmivora*, se encontró que el aceite esencial maduro al 100% generó una inhibición significativa en el crecimiento, alcanzando solo 2,88 cm, mientras que, los tratamientos sin inoculación de aceites esenciales obtuvieron longitudes de 4,40 cm y 3,95 cm, respectivamente (Figura 3).

Figura 3

Velocidad de crecimiento de L. theobromae y P. palmivora a las 72 horas después de inoculados los AEs



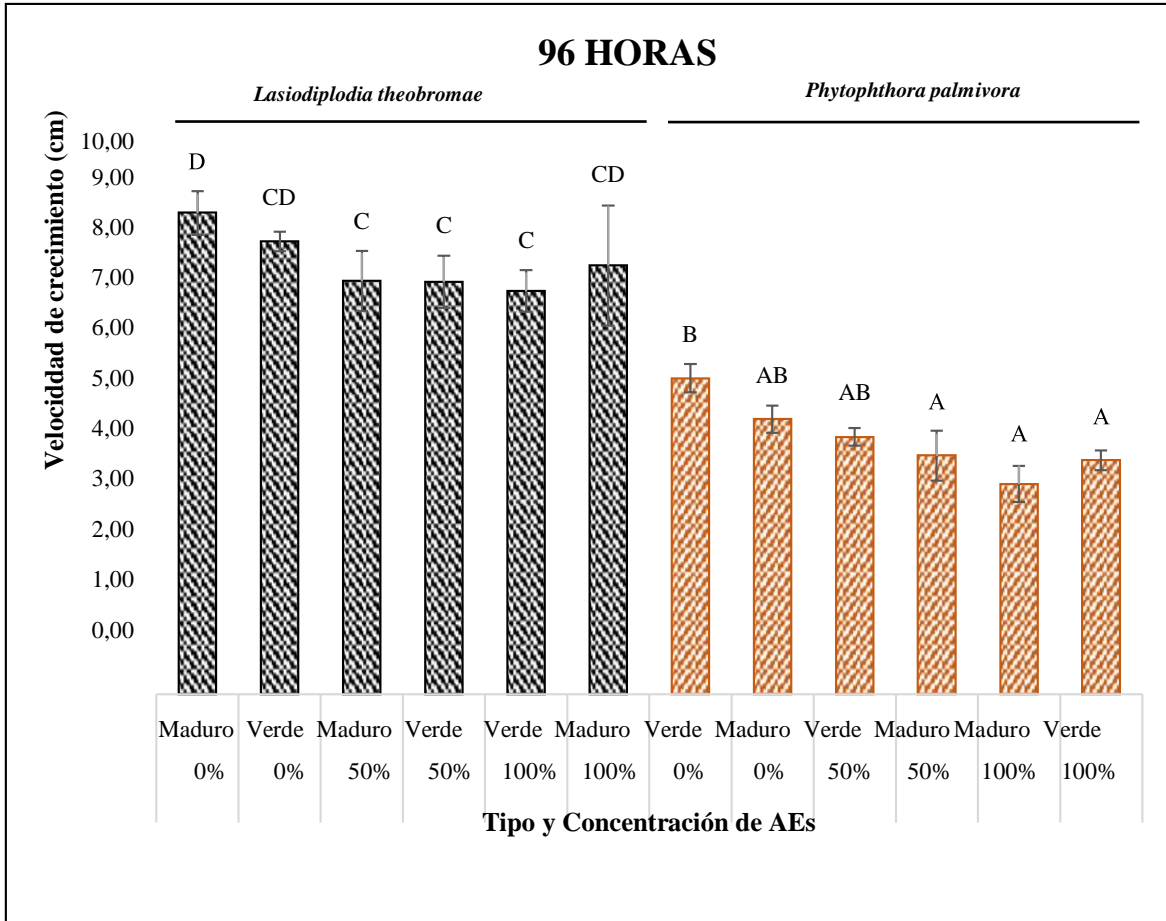
NOTA: Las barras de error indican \pm DE; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Tukey).

A las 96 horas posteriores a la inoculación, se observaron diferencias significativas en la velocidad de crecimiento de los patógenos estudiados. En el caso de *Lasiodiplodia theobromae*, el aceite esencial verde al 100% mostró un efecto inhibitorio destacado, con un crecimiento reducido a 7,38 cm. En contraste, el tratamiento de control sin aceite esencial presentó un crecimiento más extenso, alcanzando longitudes de 8,29 cm y 8,82 cm, con este último cubriendo por completo la caja Petri.

En relación con *P. palmivora*, el aceite esencial maduro 100% también demostró un efecto inhibitorio significativo, con un crecimiento de solo 3,85 cm, mientras que los tratamientos de control obtuvieron longitudes de 5,03 cm y 5,78 cm, respectivamente (Figura 4).

Figura 4

Velocidad de crecimiento de L. theobromae y P. palmivora a las 96 horas después de inoculados los AEs



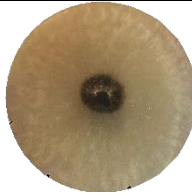


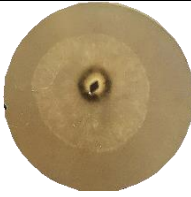
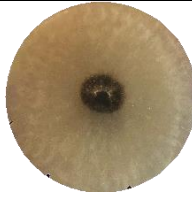



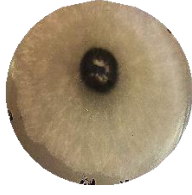



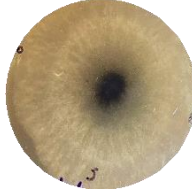


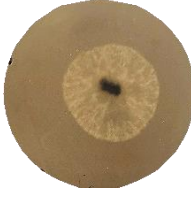



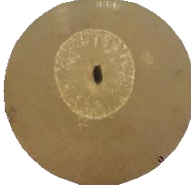




NOTA: Las barras de error indican \pm DE; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Tukey).

Los registros fotográficos documentando la velocidad de crecimiento de *L. theobromae* revelan una tasa de crecimiento completa en el transcurso de 72 horas luego de la inoculación de los aceites esenciales. Se observa que, a las 96 horas, se alcanza el punto máximo de crecimiento, acompañado de un cambio en la coloración, que evoluciona de un tono grisáceo a una tonalidad marrón. Estos hallazgos sustentan que *L. theobromae* presenta una tolerancia a los aceites esenciales de naranja (*Citrus sinensis*) (Figura 5).

Figura 5

Velocidad de crecimiento de L. theobromae en la parte superior se muestran el tipo de aceite, las concentraciones y las horas de evaluación

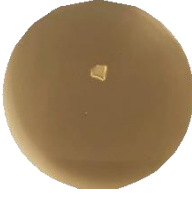




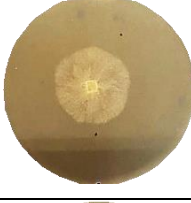


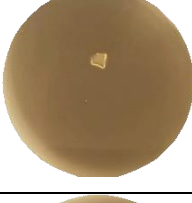



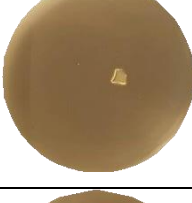
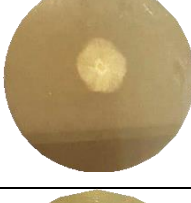
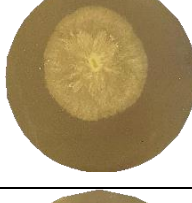
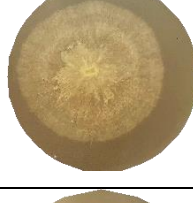
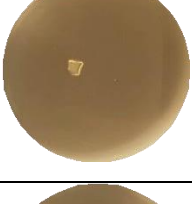
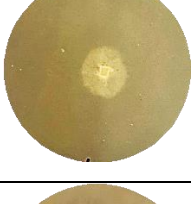
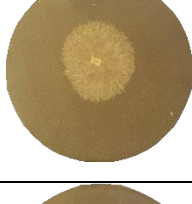
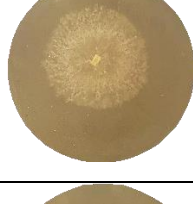
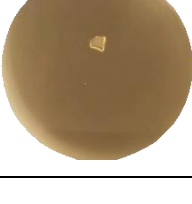
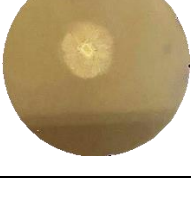


Tipo	Concentración	Horas			
		24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
Verde	0%				
Maduro	0%				
Verde	50%				
Maduro	50%				
Verde	100%				
Maduro	100%				

La velocidad de desarrollo de *P. palmivora* a las 24 horas posteriores a la inoculación de los aceites esenciales muestra ausencia de crecimiento, sin embargo, a las 48 horas se observa un ligero crecimiento y a las 96 horas existe un incremento de su crecimiento de manera

atenuada. Este patrón de respuesta sugiere que *P. palmivora* presenta una leve resistencia frente a la aplicación de aceites esenciales derivados de naranja (*Citrus sinensis*) (Figura 6).

Figura 6

Velocidad de crecimiento de P. palmivora, en la parte superior se muestran el tipo de aceite, las concentraciones y las horas de evaluación

Tipo	Concentración	Horas			
		24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
Verde	0%				
Maduro	0%				
Verde	50%				
Maduro	50%				
Verde	100%				
Maduro	100%				

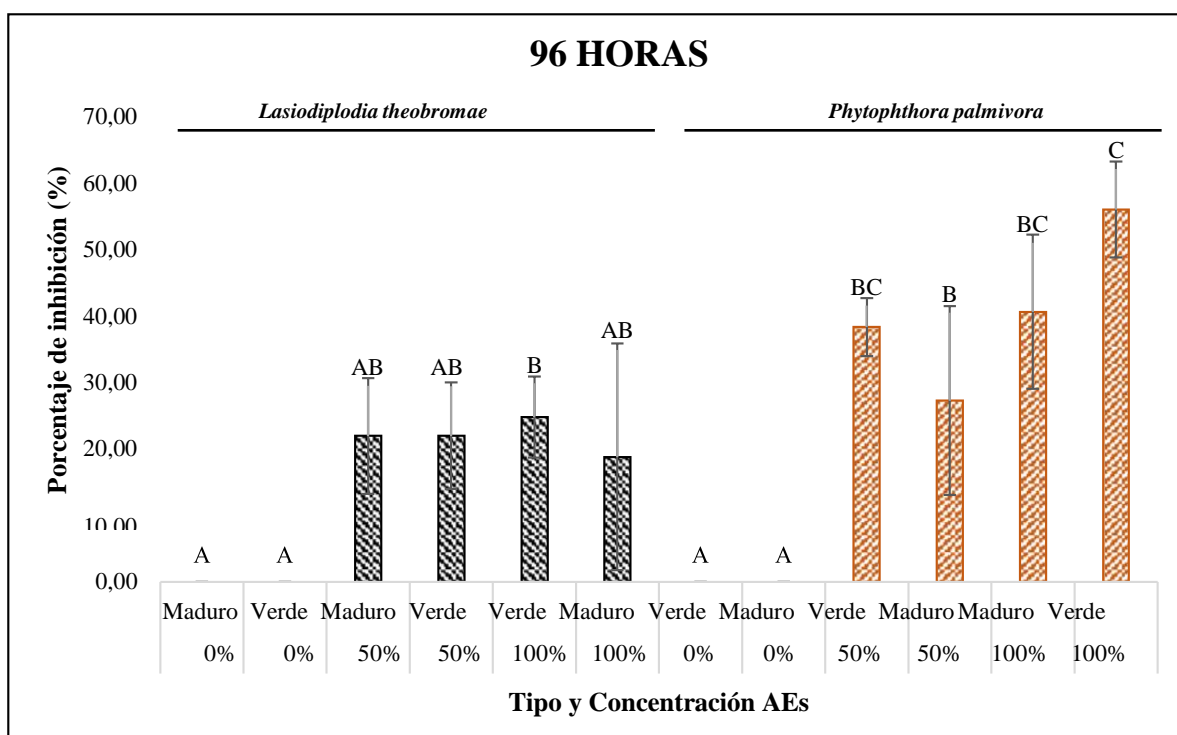
4.1.3. Porcentaje de inhibición (%)

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la variable del porcentaje de inhibición en relación con el tipo y la concentración de aceites esenciales (AEs), así como los patógenos evaluados. Tras un período de 96 horas desde la inoculación de los aceites esenciales, se registró una inhibición del 24,82 % en *L. theobromae* al aplicar el aceite esencial verde con una concentración del 100 %. En contraste, los tratamientos control no manifestaron efecto inhibitorio.

En relación a *P. palmivora*, es relevante destacar que la aplicación del aceite esencial verde a una concentración del 100 % resultó en una inhibición significativa, presentando un promedio de inhibición del 56,08 %. En contraste, los tratamientos de control, que no fueron sometidos a la aplicación de aceites esenciales, no manifestaron ningún efecto inhibitorio sobre el crecimiento del patógeno (Figura 7).

Figura 7

Porcentaje de inhibición de L. theobromae y P. palmivora a las 96 horas después de inoculados los AEs



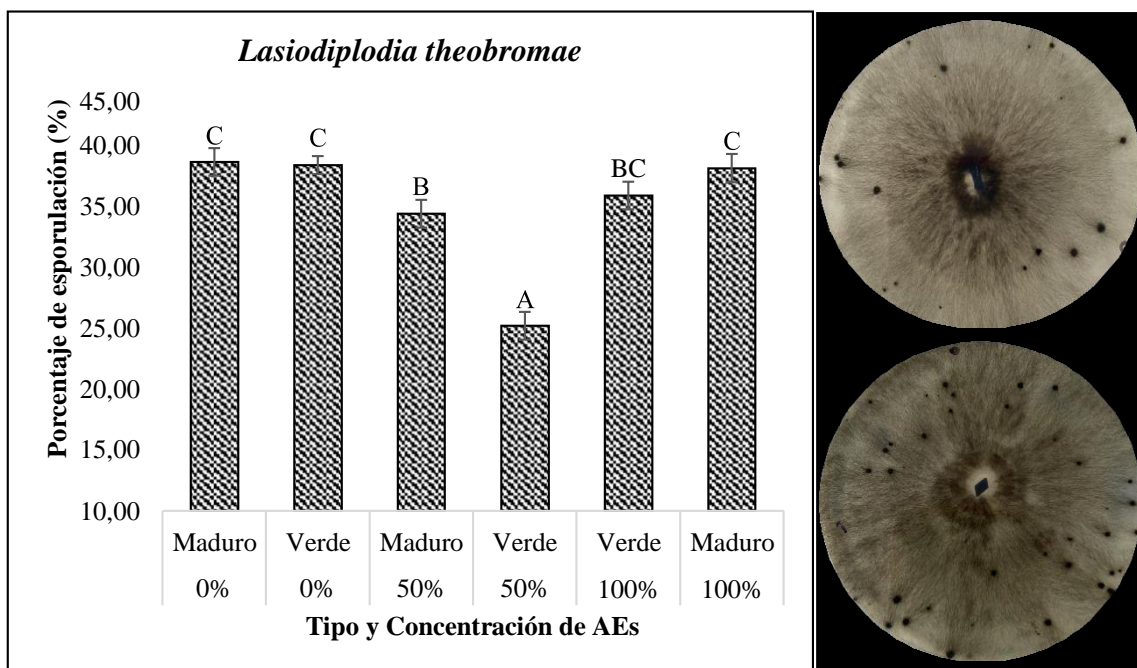
NOTA: Las barras de error indican \pm DE; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Tukey).

4.1.4. Porcentaje de esporulación (%)

La variable de porcentaje de esporulación en relación con *Lasiodiplodia theobromae*, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tipos y concentraciones de aceites esenciales. Dentro de este contexto, resalta que el aceite esencial verde al 50 % demostró ser particularmente eficaz al reducir la esporulación, alcanzando un valor de 20,33 %. No obstante, los tratamientos de control, que no incluyeron la aplicación de aceite esencial, presentaron niveles de esporulación más elevados, registrando valores de 38 % y 38,33 %, respectivamente (Figura 8).

Figura 8

Porcentaje de esporulación de *L. theobromae* 96 horas después de inoculados los AEs



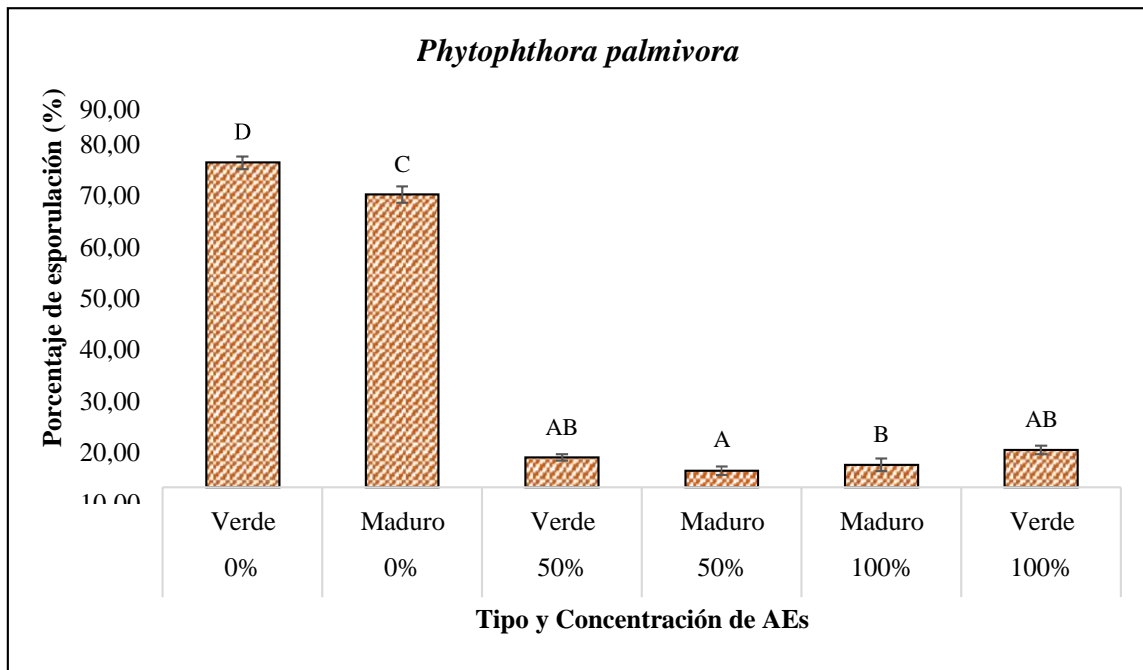
NOTA: Las barras de error indican \pm DE; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Tukey).

Se constataron diferencias estadísticamente significativas en relación con la variable del porcentaje de esporulación, considerando los distintos tipos y concentraciones de aceites esenciales para *P. palmivora*. En este contexto, destaca que el aceite esencial maduro, aplicado a una concentración del 50 %, registrando 4,00 %, efectuando inhibición de esporulación. En contraste, los tratamientos de control, que no incluyeron la aplicación de

aceite esencial, presentaron niveles más elevados de esporulación, reportando valores de 70,33 % y 78,00 %, respectivamente (Figura 9).

Figura 9

Porcentaje de esporulación de P. palmivora 96 horas después de inoculados los AEs



NOTA: Las barras de error indican \pm DE; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Tukey).

4.2. Discusión

El mirceno es un terpeno que se encuentra comúnmente en los aceites esenciales de cítricos. Su presencia en niveles superiores en el estado maduro de la naranja Valencia sugiere que podría estar relacionado con la maduración de la fruta o la liberación de su aroma característico durante esta fase (Tovar et al., 2019; Tolentino, 2022). El mirceno también se ha asociado con propiedades aromáticas y terapéuticas, por lo que estos resultados pueden ser valiosos tanto desde el punto de vista culinario como en la industria de los aceites esenciales (Giovannoni, 2021).

Por otro lado, el limoneno es un compuesto ampliamente conocido en los aceites esenciales cítricos, conocido por su aroma fresco y cítrico (Castañeda, 2022). Su presencia en niveles significativamente más altos en el estado maduro de la naranja “Valencia” podría explicar la intensificación del aroma a medida que la fruta madura. El limoneno también se ha investigado por sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes, lo que añade un valor adicional a la identificación de este compuesto en el aceite esencial.

Por último, el linalol ha demostrado actividad antimicrobiana contra una amplia gama de microorganismos, incluyendo bacterias grampositivas y gramnegativas, así como hongos (Guo et al., 2021). Esto lo convierte en un compuesto versátil para combatir diferentes tipos de infecciones y problemas relacionados con microorganismos (Zhong et al., 2021). El linalol también ha demostrado ser eficaz contra una variedad de hongos, incluyendo levaduras y mohos. Puede afectar la integridad de las membranas celulares de los hongos, lo que lleva a la muerte celular y la inhibición de su crecimiento (Mączka et al., 2022).

En el estudio de la variable del porcentaje de inhibición en función del tipo y la concentración de los aceites esenciales evaluados. Esto sugiere que la elección del tipo de aceite esencial y su concentración son factores críticos en la efectividad del tratamiento para inhibir el crecimiento de patógenos en las plantas. Según Boyacı et al. (2019), esta variabilidad en la respuesta a diferentes AEs subraya la necesidad de una evaluación detallada y específica para cada patógeno y tipo de AE antes de aplicar estos tratamientos en entornos agrícolas.

A las 96 horas posteriores a la inoculación, en la velocidad de crecimiento de los patógenos estudiados. *L. theobromae*, mostró un efecto inhibitorio con aceite verde al 100%, con un crecimiento reducido de 7,38 cm. Estos resultados coinciden con lo descrito por Duarte et al. (2022) quien señala que el aceite verde al 100% redujo significativamente el crecimiento de *L. theobromae* en experimentos similares, lo que respalda nuestros hallazgos. Sin embargo, Contreras et al. (2015) señala resultados contradictorios, sugiriendo que el aceite verde al 100% tenía un efecto mínimo en la inhibición del crecimiento de este patógeno. Estas discrepancias pueden deberse a diferencias en las cepas específicas de *L. theobromae* utilizadas, las condiciones experimentales o las metodologías de los estudios.

La comparación con los tratamientos de control es esencial para contextualizar nuestros resultados. Los tratamientos de control, que no incluyeron la aplicación de aceite esencial, presentaron de esporulación más altos, con valores de 70,33% y 78,00%. Esto subraya la importancia de la aplicación de aceite esencial como una estrategia efectiva para reducir la esporulación del patógeno y, potencialmente, mitigar los daños causados por la enfermedad en cultivos agrícolas.

Según Hurtado et al. (2015) es crucial destacar que la efectividad de los aceites esenciales puede depender de varios factores, como la especie de *Phytophthora*, la concentración exacta del aceite esencial y las condiciones ambientales. Además, es importante evaluar el impacto a largo plazo de la aplicación de aceites esenciales en la salud de las plantas y el ecosistema circundante.

Investigaciones llevadas a cabo por Uscátegui, (2013); Hurtado et al., (2015), determinaron que los aceites esenciales, incluido el aceite esencial de naranja, contienen una variedad de compuestos químicos volátiles que pueden tener propiedades antimicrobianas. Uno de los grupos de compuestos más importantes en los aceites esenciales son los terpenoides, como el limoneno y el citral, que se encuentran en el aceite esencial de naranja. Estos compuestos pueden interferir con la membrana celular de *Phytophthora*, afectando su integridad y permeabilidad, lo que puede llevar a la inhibición del crecimiento.

Algunos componentes de los aceites esenciales pueden interferir con los procesos metabólicos esenciales para el crecimiento y la reproducción de *Phytophthora*. Por ejemplo,

ciertos compuestos pueden inhibir enzimas específicas que son cruciales para la síntesis de componentes celulares, como lípidos y proteínas (Andrade et al., 2022). Los aceites esenciales también pueden afectar los sistemas de señalización celular de *Phytophthora*. Pueden interferir con la comunicación química entre las células del patógeno o con la percepción de señales ambientales, lo que puede llevar a una interrupción en su crecimiento y desarrollo (Delgado, 2019; Monreal, 2022).

CAPÍTULO V
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- El aceite esencial de naranja Valencia en sus estados verde y maduro reveló la presencia de 39 compuestos químicos distintos. Entre estos compuestos, el mirceno, el limoneno y el linalol emergen como destacados debido a sus niveles porcentuales más altos en comparación con otros compuestos identificados en el aceite esencial.
- El aceite esencial de naranja Valencia tiene el potencial *in vitro* de inhibir el crecimiento y la esporulación de *P. palmivora* y *L. theobromae*, fitopatógenos importantes. Esto indica que los aceites esenciales poseen potencial para ser usados como una alternativa en el manejo de enfermedades causadas por estos fitopatógenos presentes en el campo agrícola.

5.2. Recomendaciones

- Considerando la abundancia de compuestos beneficiosos como el mirceno, el limoneno y el linalol en el aceite esencial de naranja Valencia, se recomienda explorar y desarrollar productos y formulaciones que capitalicen estas sustancias para la implementación práctica en la agricultura.
- Se recomienda llevar a cabo investigaciones adicionales y estudios de campo para evaluar la eficacia de los aceites esenciales de naranja en situaciones agrícolas reales. Estos estudios deberían abordar aspectos como las dosis óptimas, métodos de aplicación y su impacto en la salud de las plantas y el medio ambiente.

CAPÍTULO VI
BIBLIOGRAFÍA

6.1. Bibliografía

Arcadia L. (2009). Destilación Alcohólica. Instituto Universitario de Tecnología en Administración Industrial.

Andrade P., Urrieta J., Landero N., Reyes H., Sampayo S., y Luna A. (2022). Potential of essential oils in the control of *Phytophthora cinnamomi* Rands and *Fusarium* sp. in vitro in *Cinnamomum verum*. Terra Latinoamericana, 40.

Armas A. (2012). Diseño de una Planta Modular para la Elaboración de Licor de Naranja en el Cantón Caluma. Escuela Superior Politécnica Del Litoral.

Al-Jabri, N y Hossain, M (2018). Composición química y potencia antimicrobiana del aceite esencial de limón cultivado localmente contra cepas bacterianas seleccionadas. Diariode la Universidad King Saud-Science, 30 (1), 14-20.

Boyacı D., Iorio G., Sozbilen G., Alkan D., Trabattoni S., Pucillo, F., ... y Yemenicioğlu, A. (2019). Development of flexible antimicrobial zein coatings with essential oils for the inhibition of critical pathogens on the surface of whole fruits: Test of coatings on inoculated melons. Food Packaging and Shelf Life, 20, 100316.

Castañeda C. (2022). Epóxido de limoneno: una fuente renovable para la obtención de carbonatos cíclicos.

Contreras S., Espejo M., y Ruiz, J. (2015). Actividad antifúngica del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* sobre el crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae* en condiciones de laboratorio. REBIOL, 35(2), 47-52.

Cedeño Moreira Á., Romero R., Auhing J., Mendoza A., Abasolo F., y Canchignia H., (2020). Caracterización de *Phytophthora* spp. y aplicación de rizobacterias con potencial en biocontrol de la enfermedad de la mazorca negra en *Theobroma cacao* variedad CCN-51. Scientia Agropecuaria, 11(4), 503-512.

Cardoso G., y Sosa M. 2012. Propiedades de aceites esenciales de albahaca y sus aplicaciones en los alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 26-1.

Contreras S, Espejo M y Ruiz, J (2015). Actividad antifúngica del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* sobre el crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae* en condiciones de laboratorio. *REBIOL* , 35 (2), 47-52.

Contreras E., Ruiz J. (2012). Estudio Comparativo de dos Métodos de Extracción para el Aceite Esencial presente en la Cáscara de Pomelo (*Citrus maxima*). (Tesis para optar por el grado de ingeniero). Universidad de Cartagena, España.

de Menezes A., de Oliveira J., da Cruz, R., da Silva, A., de Sousa, W., y de Souza C. (2020). Evaluación química, fisicoquímica y actividad antifúngica de los aceites esenciales de *Bauhinia variegata* L. (Fabaceae). *Revista Cubana de Farmacia*, 53(3), 1-17.

Delgado L. (2019). Evaluación in vitro de los aceites esenciales de naranja (*Citrus sinensis* L.) y limón (*Citrus latifolia*), frente a *Sclerotinia* sp., agente causal del moho blanco en lehua (Doctoral dissertation).

Duarte C., Tomalá C., y Flores N. (2022). Valoración de la actividad antifúngica in vitro de dos aceites esenciales para la inhibición del crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae* patógeno de banano y cacao post cosecha (Doctoral dissertation, ESPOL. FCNM).

Déu, S. (20 de 12 de 2016). Guía metabólica. Obtenido de <https://www.guiametabolica.org/consejo/naranja-fruta-invierno-llenavitamina-c>

Duarte Y., Pino O., Infante D., Sánchez Y., Travieso M., y Martínez B. (2013). Efecto in vitro de aceites esenciales sobre *Alternaria solani* Sorauer. *Revista de Protección Vegetal*, 28(1), 54-59.

Gómez K. (2014). Actividad antifúngica del aceite esencial de cáscara de naranja (*Citrus aurantium* L.) frente al hongo (*Fusarium semitectum*).

Gutiérrez M. (2008). Caracterización e identificación de componentes del aceite esencial de cedrón (*Aloysia triphylla*). (Tesis de maestría). Universidad Nacional Agraria la Molina. Perú.

Guédez C., Cañizalez L., Avendaño L., Scorza J., Castillo C., Olivar R., ... y Sánchez L. (2014). Actividad antifúngica del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis* L.) sobre hongos postcosecha en frutos de lechosa (*Carica papaya* L.). Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 34(2), 81-87.

Giovannoni S. (2021). Desarrollo de métodos de análisis de terpenos y compuestos terpenoides por cromatografía (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).

Guo F., Chen Q., Liang Q., Zhang M., Chen W., Chen H., ... y Chen W. (2021). Antimicrobial activity and proposed action mechanism of linalool against *Pseudomonas fluorescens*. Frontiers in Microbiology, 12, 562094.

Hurtado A., Pantoja D., y Santacruz L. (2015). Actividad inhibitoria del aceite esencial de *Lippia origanoides* HBK sobre el crecimiento de *Phytophthora infestans*. Acta Agronómica, 64(2), 116-124.

Hernández A., Miguelez Y., Acebo Y., de la Osa, A., y Casanova, M. (2023). A practical guide to isolation of fluorescent *Pseudomonas* antagonistic to *Phytophthora palmivora* (Butler) in *Theobroma cacao* L. Physiological and Molecular Plant Pathology, 102061.

Huda A., Mohamed N., Zakaria, L., Leong, Y., y Mohd, M. (2022). *Lasiodiplodia theobromae* as a causal pathogen of leaf blight, stem canker, and podrot of *Theobroma cacao* in Malaysia. Scientific Reports, 12(1), 8966.

Lin, P., Lee, J., y Chang, I. (2016). Essential oils from Taiwan: Chemical composition and antibacterial activity against *Escherichia coli*. Journal of food and drug analysis, 24(3), 464-470.

Mączka W., Duda A., Grabarczyk M., y Wińska K. (2022). Natural compounds in the battle against microorganisms—Linalool. Molecules, 27(20), 6928.

Monreal L. (2022). Evaluación de la actividad antibacteriana de derivados de naftoquinona, extracto etanólico y aceite esencial de *Melissa officinalis* contra *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Cmm. Repositorio Nacional CONACYT.

Medrano A. (15 de Agosto de 2008). El Universo. Obtenido de El Universo: <https://www.eluniverso.com/2008/08/15/0001/12/15E6378B8F44487B80EC226114F14606.html>

Monteros A., Sumba E., y Salvador S. (2015). Productividad agrícola en el Ecuador. Dirección de Análisis y Procesamiento de la Información, Coordinación General del Sistema de Información Nacional, 3.

Moreira A., Cedeño Á., Canchignia F., y Garcés F. (2021). *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon y Maul [(sin.) *Botryodiplodiatheobromae* Pat] en el cultivo de cacao: síntomas, ciclo biológico y estrategias de manejo. *Scientia Agropecuaria*, 12(4), 653-662.

Montalvan, E., Solorzano, M., Navarrete, E., y Osorio, B. (2022). Producción y comercialización de naranja (*Citrus sinensis* L.): Caso cantón Caluma, provincia de Bolívar, Ecuador. *Ciencia y Tecnología*, 15(2), 1-6.

Kende H. (2000). Bioquímica y biología molecular de las plantas. *Ciencia*, 290 (5492), 719-719.

Lara E., Osorio P., Jiménez A., y Bautista S. (2013). Contenido nutricional, propiedades funcionales y conservación de flores comestibles: Revisión. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 63(3), 197-208.

Lugo L, Parada D, Yáñez X. Estudio del aceite esencial de la cáscara de la naranja dulce (*Citrus sinensis*, variedad Valenciana) cultivada en Labateca (Norte de Santander, Colombia) Pamplona, Colombia: Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas; 2007.

Orduz J., y Garzón D. (2012). Alternancia de la producción y comportamiento fenológico de la naranja 'Valencia' (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) en el trópico bajo húmedo de Colombia. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 13(2), 136-144.

Peralta V., Apaza S., Quiróz E., y Ancota R. (2021). Efecto inhibitorio in vitro del aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill.) y cáscara de naranja (*Citrus sinensis* Linn. Osbeck.) sobre *Fusarium* spp. En Puno. Dominio de las Ciencias, 7(1), 268-284.

Picos P., García R., León J., Sañudo A., y Allende R. (2015). *Lasiodiplodia theobromae* en cultivos agrícolas de México: Taxonomía, hospedantes, diversidad y control. Revista mexicana de fitopatología, 33(1), 54-74.

Stampella P. (2015). Historia local de naranja amarga (*Citrus × Aurantium* L., Rutaceae) del viejo mundo asilvestrada en el corredor de las antiguas misiones jesuíticas de la provincia de Misiones (Argentina) (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).

Sáenz C., Hernández E., Estrada B., Poot W., Delgado R., y Herrera, R. (2019). Principales enfermedades en cítricos. Revista mexicana de ciencias agrícolas, 10(7), 1653-1665.

Suhr K., y Nielsen P. (2003). Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. Journal of Applied Microbiology, 94(4), 665-674.

Sivakumar D., Bautista S. 2014. A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. Crop Protection, 64, 27-37

Tolentino I. (2022). Fotopolimerização tiol-eno do mirceno em massa, solução e miniemulsão.

Tovar V., Cepeda L., Rubio A., y Galindo A. (2019). Estudio de la polimerización en emulsión empleando mirceno como monómero natural. Revista Iberoamericana de Polímeros, 20(4), 146-155.

Tongnuanchan P., Soottawat B. (2014). Essential oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *Journal of Food Science* 9 (7): 1750-3841. doi: 10.1111/1750-3841.12492

Uscátegui Y. (2013). Bioactividad de hidrosoles, aceites esenciales y mezclas de extractos de especies vegetales para el control de *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora infestans* y *Fusarium oxysporum* en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) (Master's thesis, Universidad de La Sabana).

Vásconez C. (2015). Comprobación del efecto laxante del extracto Hidroalcohólico del Mesocarpo del fruto de la naranja agria (*Citrus aurantium*) en ratones (Bachelor's thesis, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo).

Widmer T. (2014). *Phytophthora palmivora*. Forest *Phytophthoras*, 4(1). doi:10.5399/osu/fp.4.1.3557

Zambrano R. (2014). Conservación de zumo de naranja (*Citrus sinensis*) utilizando dosis de miel de abeja y canela como conservante natural (Tesis de Grado). Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, Manta, Ecuador.

Zhong W., Tang P., Liu T., Zhao T., Guo J., y Gao Z. (2021). Linalool nanoemulsion preparation, characterization and antimicrobial activity against *Aeromonas hydrophila*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(20), 11003.

CAPÍTULO VII
ANEXOS

7.1. Anexos

Anexo 1. Extracción de aceite esencial de naranja valencia.



Anexo 2. Llenado de cajas Petri con medio de cultivo V8.



Anexo 3. Análisis de varianza Velocidad de crecimiento a las 24 horas.

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
DATA	36	0,94	0,9	32,91

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	5,42	13	0,42	25,54	<0,0001
HONGO	3,89	1	3,89	238,37	<0,0001
CONCENTRACION	0,96	2	0,48	29,48	<0,0001
TIPO	2,50E-05	1	2,50E-05	1,50E-03	0,9691
REPETICION	3,00E-03	2	1,50E-03	0,09	0,9123
HONGO*CONCENTRACION	0,56	2	0,28	17,03	<0,0001
HONGO*TIPO	2,50E-05	1	2,50E-05	0,03	0,9691
CONCENTRACION*TIPO	3,80E-03	2	1,90E-03	0,12	0,8906
HONGO*CONCENTRACION*TIPO	3,80E-03	2	1,90E-03	0,12	0,8906
Error	0,36	22	0,02		
Total	5,77	35			

Anexo 4. Análisis de varianza Velocidad de crecimiento a las 48 horas.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
DATA	36	0,99	0,99	10,17

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	108,87	13	8,37	261,25	<0,0001
HONGO	104,41	1	104,41	3257,4	<0,0001
CONCENTRACION	2,48	2	1,24	38,69	<0,0001
TIPO	0,01	1	0,01	0,18	0,6793
REP	0,07	2	0,03	1,08	0,3578
HONGO*CONCENTRACION	1,79	2	0,9	27,99	<0,0001
HONGO*TIPO	0,01	1	0,01	0,18	0,6793
CONCENTRACION*TIPO	0,05	2	0,02	0,76	0,4794
HONGO*CONCENTRACION*TIPO	0,05	2	0,02	0,76	0,4794
Error	0,71	22	0,03		
Total	109,57	35			

Anexo 5. Análisis de varianza Velocidad de crecimiento a las 72 horas.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
DATA	36	0,98	0,97	6,58

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	140,02	13	10,77	83	<0,0001
HONGO	132,25	1	132,25	1019,14	<0,0001
CONCENTRACION	5,76	2	2,88	22,19	<0,0001
TIPO	0,05	1	0,05	0,36	0,5537
REP	0,68	2	0,34	2,63	0,0943
HONGO*CONCENTRACION	0,25	2	0,12	0,95	0,4037
HONGO*TIPO	0,3	1	0,3	2,33	0,1411
CONCENTRACION*TIPO	0,63	2	0,31	2,42	0,1124
HONGO*CONCENTRACION*TIPO	0,11	2	0,05	0,42	0,6649
Error	2,85	22	0,13		
Total	142,88	35			

Anexo 6. Análisis de varianza Velocidad de crecimiento a las 96 horas.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
DATA	36	0,97	0,95	6,48

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	107,24	13	8,25	49,69	<0,0001
HONGO	94,38	1	94,38	568,53	<0,0001
CONCENTRACION	8,83	2	4,42	26,6	<0,0001
TIPO	0,03	1	0,03	0,17	0,6835
REP	1,52	2	0,76	4,57	0,022
HONGO*CONCENTRACION	0,46	2	0,23	1,39	0,2689
HONGO*TIPO	0,7	1	0,7	4,23	0,0517
CONCENTRACION*TIPO	0,7	2	0,35	2,11	0,1445
HONGO*CONCENTRACION*TIPO	0,62	2	0,31	1,87	0,1776
Error	3,65	22	0,17		
Total	110,9	35			

Anexo 7. Análisis de varianza porcentaje de inhibición.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
PORCENTAJE		36	0,9	0,84	37,4

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	11613,5	13	893,35	14,72	<0,0001
HONGO	1369	1	1369	22,55	0,0001
CONCENTRACION	8165,17	2	4082,58	67,25	<0,0001
TIPO	25	1	25	0,41	0,5277
REP	417,17	2	208,58	3,44	0,0503
HONGO*CONCENTRACION	1068,5	2	534,25	8,8	0,0016
HONGO*TIPO	1	1	1	0,02	0,899
CONCENTRACION*TIPO	396,5	2	198,25	3,27	0,0573
HONGO*CONCENTRACION*TIPO	171,17	2	85,58	1,41	0,2654
Error	1335,5	22	60,7		
Total	12949	35			

Anexo 8. Análisis de varianza porcentaje de esporulación en *L. theobromae*.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
DATA	18	0,97	0,95	4,4

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	712,39	7	101,77	46,49	<0,0001
CONCENTRACION	467,11	2	233,56	106,7	<0,0001
TIPO	122,72	1	122,72	56,07	<0,0001
REP	3,44	2	1,72	0,79	0,4816
CONCENTRACION*TIPO	119,11	2	59,56	27,21	0,0001
Error	21,89	10	2,19		
Total	734,28	17			

Anexo 9. Análisis de varianza porcentaje de esporulación en *P. palmivora*.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
DATA		18	1	1	5,04

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	18514,93	7	2644,99	1241,46	<0,0001
CONCENTRACION	18390,36	2	9195,18	4315,86	<0,0001
TIPO	105,13	1	105,13	49,34	<0,0001
REP	1,19	2	0,6	0,28	0,7613
CONCENTRACION*TIPO	18,25	2	9,13	4,28	0,0453
Error	21,31	10	2,13		
Total	18536,24	17			