



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA**

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Tema: Evaluación *in vitro* del efecto antifúngico del aceite de hierba Luisa (*Cymbopogon citratus*) microencapsulado frente a *Cladosporium fulvum* Cooke

Trabajo de Titulación, Modalidad Proyectos de Investigación, previo la obtención del Título de Ingeniero Biotecnólogo, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Steven Rodrigo Núñez Cazares

Tutor: Dr Irvin Ricardo Tubón Usca

Ambato – Ecuador

Septiembre - 2023

APROBACIÓN DEL TUTOR

Dr. Irvin Ricardo Tubón Usca

CERTIFICA

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación bajo la Modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que corresponde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 24 de Julio del 2023

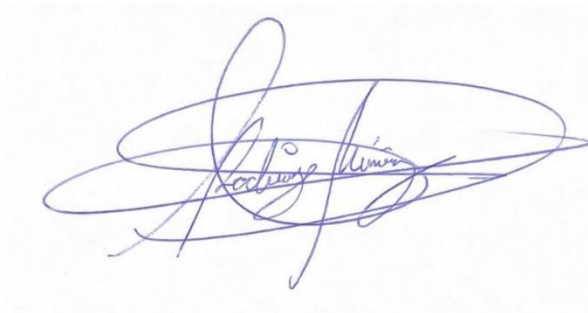
Dr. Irvin Ricardo Tubón Usca

C.I. 0604250357

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Steven Rodrigo Núñez Cazares, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero Biotecnólogo, son absolutamente originales, auténticos y personas; a excepción de las citas.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Steven Rodríguez Núñez', enclosed within a large, stylized blue oval scribble.

Steven Rodrigo Núñez Cazares

C.I. 1804899274

AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este trabajo de titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi trabajo, con fines de difusión pública, además aprobamos la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Steven Rodrigo Núñez Cazares

C.I. 1804899274

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para consistencia firman:

Presidente del tribunal

MSc. Ruth Narcisa Pérez Salinas

1802726628

MSc. María Daniela Garcés Moncayo

1803571585

Ambato, 25 de agosto 2023

DEDICATORIA

A mi Abba Dios

Desde el vientre de mi mami, donde todos me menospreciaron ya me amó y me bendijo con su Santo Espíritu, soy su hijo que me ama y siempre estará en mi vida.

A mis padres

Guadalupe e Iván, que han sido esas guías en el transcurso de mi vida, instruyéndome y enseñándome desde que era niño hasta ahora que ya soy adulto, aquí les presento el fruto de sus esfuerzos.

A mi hermano

Bryan, mi mejor amigo, gracias por tu paciencia y amor al tratar de entenderme en los momentos más difíciles que hemos atravesado.

A mis ángeles

Mi vida entera ÑAÑUN Rolando y MAMITA Marietta, que siempre estuvieron para mí en todo momento, me guiaron y enseñaron lo que más valoro en esta vida, que es esa pasión por el servicio a Dios, aquí les presento el fruto de sus oraciones.

AGRADECIMIENTO

Gracias a mis Padres que, por sus incontables sacrificios, me pudieron dar la educación que ahora conlleva, y ser el hombre que ahora Soy, Dios me los guarde y proteja siempre.

A mi tutor Dr. Irvin Ricardo Tubón Usca, por su ayuda en cada paso del desarrollo de mi tesis, su inmensa amistad que lo caracteriza a cualquier parte que vaya.

A mi guía Ph. D. Orestes López por su apoyo cada paso del desarrollo de mi tesis, su instrucción temprana y esa humildad que le caracteriza.

Al Ing. Michel Leiva Mora Dr.C. por gran corazón, amabilidad, su instrucción temprana, paciencia, confianza, su gran corazón y a ese espíritu de seguir avanzado.

Al Ing Cristian Galarza, por apoyarme e instruirme en los momentos mas desolados de mi vida y ser esa mano de apoyo y guía en esos momentos donde necesitaba.

A mis amigos, Charly, Diego, Erick, Grace, Jonathan, José Luis, Marcelo, Nicole, Nicolas, Santiago, gracias por estar en esos momentos cuando todo se me venía encima y sus consejos daban alivio a mi corazón.

A la Universidad Técnica de Ambato y los docentes de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología quienes han aportado grandemente en mi desarrollo profesional.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	iii
DERECHOS DE AUTOR.....	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS	viii
Índice de tablas	xi
Índice de figuras	xii
RESUMEN EJECUTIVO	xiii
ABSTRACT	xiv
CAPITULO I.- MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Antecedentes Investigativos.....	1
1.1.1. Descripción de la planta de tomate riñón (Lycopersicon esculentum)	1
1.1.2. Moho de la hoja de tomate riñón (Cladosporium fulvum Cooke)	1
1.1.3. Aislamiento en medios de cultivos	2
1.1.4. Identificación morfológica.....	2
1.1.5. Hierba Luisa (C. citratus).....	3
1.1.5.1. Taxonomía	3
1.1.5.2. Uso tradicional	4
1.1.5.3. Aceite esencial de Hierba luisa	4
1.1.5.4. Actividad antifúngica.....	5
1.1.5.5. Composición	5
1.1.6. Microencapsulación	5
1.1.6.1. Importancia	5

1.2.	Objetivos	6
1.2.1.	General.....	6
1.2.2.	Específicos	6
1.3.	Hipótesis	6
1.3.1.	Hipótesis Alternativa.....	6
1.3.2.	Hipótesis Nula.....	6
CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA.....		7
1.1.	Materiales, equipos y reactivos	7
1.1.1.	Material experimental	7
1.1.2.	Equipos de laboratorio	7
1.1.3.	Materiales de laboratorio	8
1.2.	Métodos.....	9
1.2.1.	Microencapsulación del aceite esencial de hierba luisa mediante secado por aspersión	9
1.2.2.	Evaluación de la eficiencia de microencapsulación mediante FT-IR	9
1.2.3.	Evaluación del efecto antifúngico del microencapsulado del aceite esencial de hierba Luisa sobre el crecimiento micelial de <i>C. fulvum</i>	9
1.2.4.	Describir las características de las colonias de los aislados monospóricos de <i>C. fulvum</i> en medio de cultivo PDA.....	10
1.2.5.	Caracterizar morfológicamente los aislados monospóricos de mediante microcultivos y su observación bajo microscopio clínico	11
1.2.6.	Análisis estadístico.....	11
CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		11
3.1.	Análisis y discusión de los resultados.....	11
3.1.1.	Microencapsulación del aceite esencial de hierba luisa (<i>C. citratus</i>)	11
3.1.2.	Eficiencia cualitativa de la microencapsulación mediante (FT-IR)	13
3.1.3.	Efecto antifúngico del microencapsulado del aceite esencial de Hierba Luisa sobre el crecimiento micelial de <i>C. fulvum</i>	15

3.1.4.	Características de las colonias de los aislados monospóricos de <i>C. fulvum</i>	18
3.1.5.	Características morfológicas de los aislados monospóricos en microcultivos y su observación bajo microscopio óptico	20
3.2.	Verificación de hipótesis.....	21
CAPITULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		21
4.1.	Conclusiones	21
4.2.	Recomendaciones.....	22
MATERIALES DE REFERENCIA		23
	Referencias bibliográficas.....	23
	Anexos	27

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de la planta de Hierba Luisa (<i>C. citratus</i>)	4
Tabla 2. <i>Composición del aceite esencial de hierba luisa (C. citratus)</i>	5
Tabla 3. Porcentaje de la Inhibición del crecimiento micelial en relación con sus tratamientos (Control positivo, control negativo y diferencias de concentraciones con microencapsulado).	15

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta de hierba Luisa (<i>C. citratus</i>)	3
Figura 2. Espectros infrarrojos FT-IR del aceite de hierba Luisa (<i>C. citratus</i>) y la presencia de sus grupos funcionales	13
Figura 3. Espectroscopía infrarroja FT-IR de Hierba Luisa (<i>C. citratus</i>) antes y después de su microencapsulación y la mezcla polimérica.	14
Figura 4. Diagrama de la influencia de diferentes concentraciones del aceite esencial microencapsulado de (<i>C. citrus</i>) con relación al crecimiento micelial de <i>C. fulvum</i> . 17	17
Figura 5. Características de las colonias de (<i>C. fulvum</i>) en relación con los tratamientos experimentales.....	18
Figura 6. Características morfológicas de los aislados monospóricos de (<i>C. fulvum</i>) en microcultivos en relación con los tratamientos experimentales bajo microscopio	20

RESUMEN EJECUTIVO

La planta de hierba Luisa (*Cymbopogon citratus*) dispone de hojas que son muy aromáticas y alargadas. Es la principal productora de aceites esenciales los cuales permiten llevar a cabo funciones de protección ante patógenos. Debido a sus propiedades tranquilizante, antibacteriana y antifúngica es utilizada tanto en el ámbito agrícola, alimenticio y medicinal.

El presente estudio se enfocó en evaluar el efecto antifúngico del aceite esencial de hierba Luisa (*C. citratus*) microencapsulado frente al patógeno *Cladosporium fulvum* Cooke. Para ello, se desarrolló una metodología *in vitro* utilizando diferentes concentraciones del aceite microencapsulado y se compararon con un grupo control. Los resultados obtenidos revelaron que la concentración del aceite de hierba Luisa microencapsulado al 40 por ciento mostró un 18,79 por ciento de inhibición, no así la concentración al 20 por ciento que presentó un 9,87 por ciento de efecto antifúngico sobre *C. fulvum*. Demostrando así que el aceite esencial de hierba luisa microencapsulado posee capacidad para combatir el desarrollo del patógeno. Además, se realizó un análisis de las características morfológicas de las colonias tratadas, donde se evidenció una marcada alteración en la textura y el color, sugiriendo un impacto directo del aceite en las estructuras fúngicas.

Los resultados obtenidos sugieren que el aceite esencial de hierba Luisa (*C. citratus*) microencapsulado es una alternativa prometedora para el control biológico de *C. fulvum* en proyectos agrícolas sustentables.

Palabras claves: Microencapsulación, aceite esencial, *Cladosporium fulvum*, patógeno.

ABSTRACT

The lemon verbena plant (*Cymbopogon citratus*) has leaves that are very aromatic and elongated. It is the main producer of essential oils which allow it to carry out protective functions against pathogens. Due to its tranquilizing, antibacterial and antifungal properties, it is used in agriculture, food and medicine.

The present study focused on evaluating the antifungal effect of microencapsulated lemon verbena (*C. citratus*) essential oil against the pathogen *Cladosporium fulvum* Cooke. For this purpose, an in vitro methodology was developed using different concentrations of the microencapsulated oil and compared with a control group. The results obtained revealed that the 40 percent concentration of the microencapsulated lemon verbena oil showed an 18.79 percent inhibition, while the 20 percent concentration showed a 9.87 percent antifungal effect on *C. fulvum*. Thus demonstrating that the microencapsulated lemon verbena essential oil has the capacity to combat the development of the pathogen. In addition, an analysis of the morphological characteristics of the treated colonies was carried out, where a marked alteration in texture and color was evidenced, suggesting a direct impact of the oil on the fungal structures.

The results obtained suggest that microencapsulated lemon verbena (*C. citratus*) essential oil is a promising alternative for the biological control of *C. fulvum* in sustainable agricultural projects.

Key words: Microencapsulation, essential oil, *Cladosporium fulvum*, pathogen.

CAPITULO I.- MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes Investigativos

1.1.1. Descripción de la planta de tomate riñón (*Lycopersicon esculentum*)

El tomate riñón (*Lycopersicon esculentum*) se ha convertido en uno de los principales cultivos dentro del Ecuador, en la actualidad se producen alrededor de 55 550 toneladas métricas en aproximadamente 1 834 hectáreas. Enfocándose en las provincias de Imbabura, Cotopaxi, Carchi, Tungurahua, Azuay y Chimborazo. Alcanzado un 75,35 % de producción; mientras que, en la región costera se obtiene un 24,65 % (Cacoango, 2018).

El cultivo de tomate riñón al ser uno de los más importantes y parte de la dieta alimentaria, es uno de los cultivos en la zona centro del país, con mayor aplicación de plaguicidas, esta actividad genera resistencia en las plagas lo que aumenta significativamente los niveles máximos de residuos (LMR). Esta situación causa daños importantes tanto en el equilibrio ambiental como la salud humana (Castillo & Castillo, 2021). En este contexto, la principal problemática a tratar es el uso inadecuado de los fungicidas y las consecuencias que esto conlleva.

1.1.2. Moho de la hoja de tomate riñón (*Cladosporium fulvum* Cooke)

Uno de los principales patógenos que afecta los cultivos de tomate riñón es el *C. fulvum*, este presenta características como coloración oscura o grisácea en las hojas de la planta de tomate (Castillo & Castillo, 2021). El medio que favorece al crecimiento del patógeno dispone de temperaturas comprendidas entre 20 y 25°C. Ocasionalmente se presentan el primero micelio en hojas jóvenes de los cultivos de tomate riñón (Mesa et al., 2019).

Para el control del patógeno el agricultor utiliza grandes cantidades de plaguicidas. Otras alternativas biotecnológicas permiten elaborar productos a partir de extractos y aceites esenciales, mismos que son obtenidos a partir de especies vegetales. Por lo que, en el presente trabajo se busca estudiar el aceite esencial de hierba Luisa

(*C. citratus*), el cual es usado de manera antibacteriana y antifúngica (Estrella et al., 2022). Las plantas son las principales productoras de compuestos químicos como terpenos y fenoles; además de compuestos nitrogenados como alcaloides y azufrados, los cuales permiten llevar a cabo funciones de protección ante patógenos gracias a su actividad antifúngica (Coello, 2022).

1.1.3. Aislamiento en medios de cultivos

Jácome (2022), señaló que los porcentajes más factibles de aumento en cuanto a la esporulación y crecimiento micelial se generaron a través de la utilización de medios de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA), con un rango de temperatura entre 20 y 25 °C, logrando diferenciar los aislados con respecto a su crecimiento.

En el crecimiento y desarrollo de los micelios de manera *in vitro* se puede utilizar varios medios de cultivo, los cuales proporcionar nutrientes necesarios al hongo para un óptimo crecimiento, particularmente se generan medios de cultivos solidos con agente gelificante para proporcionar consistencia al medio (Romero-Estévez et al., 2020).

1.1.4. Identificación morfológica

En condiciones *in vitro* la identificación de los micelios se puede observar mediante el microscopio óptico. Senasica, (2019) menciona que para la identificación morfológica de (*C. fulvum*) se debe preparar fragmentos de 0,2 mm de diámetros, posteriormente realizar montajes permanentes o temporales, se realiza la medición de cada una de las estructuras del hongo, finalmente se compara las dimensiones y se establece la especie y el género con respecto a su morfología.

La característica principal de la morfología es identificar las estructuras microscópicas. Medina (2011) afirmó que las hifas crecen por alargamiento de su ápice (crecimiento polarizado) denominando al conjunto de eso micelio. Las hijas

pueden ser continuas y alternativas donde pueden estar divididas por tabiques o septos simples o complejos. El desarrollo de los micelios genera pseudetejidos que dan origen a las estructuras portadoras de esporas o estructuras somáticas macroscópicas.

1.1.5. Hierba Luisa (*C. citratus*)

Cymbopogon citratus al ser una de las plantas herbácea, aromática y robusta de la zona tropical del sureste de India y Asia, pertenece a la familia “Poaceae (Gramineae)” comúnmente llamada “hierba Luisa”. Sus flores se agrupan en espiguillas de 30-60 cm de longitud formando racimos. Las hojas son muy aromáticas y alargadas, ásperas, de color verde claro, su formación brota desde el suelo generando matas densas. Las flores están agrupadas en espigas y se ven dobladas al igual que las hojas (Chamba, 2015).



Figura 1. *Planta de hierba Luisa (*C. citratus*)*

Fuente: (Chamba, 2015).

1.1.5.1. Taxonomía

A continuación, en la Tabla 1 se muestra la taxonomía de la planta de hierba Luisa (*C. citratus*).

Tabla 1. *Taxonomía de la planta de hierba Luisa (C. citratus).*

Clasificación	Características
Reino	<i>Cormobionta</i>
División	Magnoliophyta
Clase	Liliatae (Liliopsida)
Familia	POACEAE (Gramíneas)
Orden	Cyperales
Género	<i>Cymbopogon</i> Spreng
Especie	<i>citratus</i> Stapf

Fuente: (Chamba, 2015).

1.1.5.2. Uso tradicional

La planta de hierba Luisa (*C. citratus*) presenta diferentes usos, tanto en el ámbito alimenticio, social, medicinal entre otros. Meza & Vargas (2013) manifestaron que la hierba Luisa en infusión la usaron para controlar la histeria, nerviosismo y opresión del corazón. Las hojas frescas tienen un ligero sabor y aroma a cítrico, el cual brinda propiedades saborizantes en las ensaladas, postres y jaleas. Por otro lado Chamba (2015) expresó que dicha planta se ha utilizado por mucho tiempo en forma de infusión debido a sus propiedades: anticatarral, tranquilizante, antibacteriana y antifúngica.

1.1.5.3. Aceite esencial de Hierba luisa

El aceite esencial de la planta de hierba Luisa destilado tiene una fragancia peculiar a limón, pero en menor cantidad que al toronjil (Meza & Vargas, 2013). Su proporción es de 0,25 a 0,35%, el cual está presente en las hojas (Chamba, 2015).

1.1.5.4. Actividad antifúngica

El aceite esencial de hierba Luisa tiene diferentes actividades de inhibición de bacterias Coello, (2022), expresó que la planta de hierba Luisa es la principal productora de aceites esenciales los cuales permiten llevar a cabo funciones de protección ante patógenos gracias a su actividad antifúngica.

1.1.5.5. Composición

A continuación, en la Tabla 2 se muestra la composición del aceite esencial de la planta de hierba Luisa (*C. citratus*).

Tabla 2. *Composición del aceite esencial de hierba Luisa (C. citratus)*

Componente	Porcentaje
Z-Citral (Neral)	31.15%
E-Citral (Geranial)	43.37%
Limoneno	15.59%
Geraniol	4.74%
Linalool	1.10%
Acetato de geranilo	0.64%

Fuente: (Meza & Vargas, 2013).

1.1.6. Microencapsulación

1.1.6.1. Importancia

El proceso de microencapsulación estabiliza el aceite esencial para que no se degrade por factores ambientales, mejorando la estabilidad en los compuestos y alargando su vida útil (Ruiz Garay & Saavedra Rotta, 2017). De igual forma, la microencapsulación de aceites ha venido tomando protagonismo debido a la sensibilidad de su estructura química. Esto con la finalidad de aprovechar sus diferentes funciones biológicas como antioxidantes, antiproliferantes, antiinflamatorias, antifúngicas, entre otras (Mesa et al., 2019).

La microencapsulación del aceite de hierba Luisa (*C. citratus*) mediante secado por aspersión desarrolla un gran interés en la actualidad debido a los beneficios que le puede traer al ser humano. Tomando en cuenta su gran aplicabilidad, tanto en la industria alimentaria como colorante natural, como en la industria agrónoma con su alto potencial antioxidante, antitumoral y antifúngico (Silva et al., 2014).

1.2.Objetivos

1.2.1. General

Evaluar el efecto antifúngico *in vitro* del aceite de hierba luisa (*C. citratus*) microencapsulado frente a *C. fulvum*”

1.2.2. Específicos

- Microencapsular mediante secado por aspersión el aceite esencial de hierba luisa (*C. citratus*).
- Evaluar la eficiencia de la microencapsulación mediante espectrofotometría infrarroja de la transformada de Fourier.
- Evaluar la actividad antifúngica *in vitro* del aceite microencapsulado frente a *C. fulvum*

1.3.Hipótesis

1.3.1. Hipótesis Alternativa

El microencapsulado de hierba luisa (*C. citratus*) tiene actividad antifúngica frente a *Cladosporium fulvum* Cooke

1.3.2. Hipótesis Nula

El microencapsulado de hierba luisa (*C. citratus*) no tiene actividad antifúngica frente a *Cladosporium fulvum* Cooke

CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA

1.1. Materiales, equipos y reactivos

1.1.1. Material experimental

Aislados monospóricos de *C. fulvum* procedentes de La Unidad Operativa de Investigación en Ciencias Agropecuarias (UODIDE- ICAP).

1.1.2. Equipos de laboratorio

- Mini sprar dryver (Buchi B-290).
- Espectro infrarrojo (FTIR).

- Cabina de flujo laminar.
- Incubadora.
- Autoclave.
- Refrigerador.
- Cámara fotográfica.

1.1.3. Materiales de laboratorio

Los materiales usados en el presente trabajo de investigación fueron:

- Matraz Erlenmeyer de 100 ml.
- Probetas de 10 y 50 ml.
- Pipetas de 1 y 5 ml.
- Botellas de vidrio ámbar de 50 y 100 ml.
- Bisturí.
- Alcohol al 70 %.
- Aguja de inoculación.
- Mechero Bunsen.
- Tijeras.
- Cajas Petri (90mm).
- Medio de cultivo PDA (TM MEDIA).
- Papel aluminio.
- Cubre objeto.
- Porta objeto.
- Agua destilada.
- Parafilm.

1.2.Métodos

1.2.1. Microencapsulación del aceite esencial de hierba Luisa mediante secado por aspersión

El aceite esencial de hierba Luisa (*C. citratus*) se obtuvo de manera comercial de la empresa “D’SANPI”, la microencapsulación se preparó partiendo de una solución de goma arábica, maltodextrina con agua destilada, esto se realizó en una plancha de calentamiento la cual estuvo agitada constantemente a una temperatura de 45 °C. A continuación, se adicionó la fase oleosa (aceite esencial de hierba Luisa) manteniendo la agitación y se homogenizó a 20 000 min⁻¹ durante 5 min (Calle, 2020). Esta emulsión se alimentó en un mini Spray Dryer BUCHI-B290, en una carga 20:80 aceite esencial:polímeros. Y, se emplearon las siguientes condiciones: temperatura de entrada de 150 °C y de salida de 90 °C, un flujo de aire de atomización de 500 L/h, flujo de secado del 60 m³/h y flujo de alimentación (Kandansamy & Somasundaram, 2012).

1.2.2. Evaluación de la eficiencia de microencapsulación mediante FT-IR

Se compararon las bandas de los espectros del aceite esencial de hierba Luisa, con la mezcla de polímeros (maltodextrina y goma arábica) y el microencapsulado en un intervalo de frecuencias entre 550 y 4000 cm⁻¹ (Calle, 2020).

1.2.3. Evaluación del efecto antifúngico del microencapsulado del aceite esencial de hierba Luisa sobre el crecimiento micelial de *C. fulvum*

En primera instancia se reactivó el patógeno *C. fulvum*, en condiciones de laboratorio, posteriormente el microencapsulado del aceite esencial de la hierba Luisa se mezcló con el medio PDA estéril, en diferentes concentraciones (20-30-40) % a una concentración al 2 %, donde se contrastó con el fungicida comercial “GALANT y se dispensó en placas Petri. Posteriormente a la gelificación del medio, se colocó en el centro de cada placa un disco de micelio de 1 mm de diámetro, tomado del cultivo puro de *C. fulvum* utilizando un instrumento comúnmente llamado “sacabocado”, el cual sirve para obtener muestras bacteriológicas de algunas superficies, utilizando un

método de siembra donde se enfocó en el raspado de los conidios para que no exista variaciones en la inhibición del crecimiento (Jácome, 2022).

Se registraron y almacenaron las medidas del radio de la colonia de todos los tratamientos a partir del séptimo día de a verse iniciado el ensayo, con una frecuencia de 24 horas dentro de 7 a 10 días, hasta que el crecimiento en el tratamiento testigo (0 % de inhibición) cubra la caja Petri (Jácome, 2022). Finalmente, con los promedios de los datos obtenidos, se calcularon los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial (ICM) mediante la siguiente formula:

$$ICM (\%) = \frac{\overline{R_C} - \overline{R_{T1}}}{R_C} \cdot 100$$

Donde:

% ICM= Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial

Rc= Radio del crecimiento micelial del control (0%)

RT= Radio del crecimiento micelial por cada tratamiento

(Jácome, 2022).

1.2.4. Describir las características de las colonias de los aislados monospóricos de *C. fulvum* en medio de cultivo PDA

Para realizar la caracterización cultural se tomaron en cuenta caracteres morfológicos tanto cualitativos como cuantitativos. A continuación, se observó el color tanto del verso como anverso y reverso de la colonia, al igual que la forma, textura, borde, elevación y si presentó o no pigmentación. Es necesario tomar en cuenta si hay presencia de líquido de transpiración, si la colonia tiene pliegues o rupturas (Jácome, 2022).

1.2.5. Caracterizar morfológicamente los aislados monospóricos de mediante microcultivos y su observación bajo microscopio clínico

Se comenzó con una técnica de microcultivo, el cual permite observar estructuras microscópicas de los hongos filamentosos (Jácome, 2022) . En un contenedor de plástico se colocó el papel filtro en el fondo, previamente humedecido; posteriormente se introdujo, dentro de este, un vidrio-fusible que sirvió como soporte para el portaobjetos. A continuación, se dispersó un cuarto de medio de cultivo en los portaobjetos y se dejó reposar por unos minutos hasta que le medio de cultivo se condense. Y, se procedió a sembrar los hongos en el portaobjetos para la visualización de hifas con ayuda del microscopio electrónico (Jácome, 2022).

1.2.6. Análisis estadístico

Se evaluó la presencia (dimensión en mm) o ausencia del halo de inhibición del crecimiento del hongo. Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA), posterior a su obtención se evaluó una razón F significativa donde se utilizó un análisis de comparaciones múltiples de Tukey ($p \leq 0,05$) (Calle, 2020).

CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de los resultados

3.1.1. Microencapsulación del aceite esencial de hierba luisa (*C. citratus*)

La microencapsulación es un proceso en el cual sustancias activas se aíslan con la finalidad de generar productos de forma de cápsulas de un tamaño micrométrico (Núñez, 2022), estas microesferas se liberan de manera controlada bajo condiciones específicas. En la técnica de microencapsulación por secado por aspersión, se alcanzó

como resultado un polvo establecido por partículas en forma de microesferas, dicha técnica recubre el aceite esencial de hierba Luisa, en el interior de una matriz polimérica, la cual protege y mejora su vida útil (Telenchana, 2019).

La matriz polimérica influye en la eficiencia del proceso, por lo cual es fundamental escoger los polímeros a microencapsular. Para la microencapsulación se utilizó una relación 20:80 con respecto al aceite esencial y polímero, dicha proporción de carga del aceite es más eficaz puesto que Gharsallaoui et al. (2007) menciona que el componente vegetal extraído deber ser directamente proporcional en relación 1:4 con su carga polimérica para cumplir con un efectivo proceso de microencapsulación. En la investigación de Rigon & Zapata Noreña (2016) se utilizó una matriz polimérica de goma arábica, sustancia con alta solubilidad en agua que posee baja viscosidad y alto contenido de fibras solubles y maltodextrina, polímero que tiene propiedades reológicas y es soluble en agua.

En el proceso de microencapsulación por secado por aspersion, se utilizó una temperatura de entrada de 150 °C. Gharsallaoui et al. (2007) expresa que una temperatura de entrada de aire caliente en este tipo de proceso oscila entre 150 y 220 °C, lo cual permite evaporar los líquidos de forma instantánea. Además, se utilizó una temperatura de salida de 90 °C, Mohammadinejhad & Kurek (2021) refiere que la temperatura de salida para el caso del aceite de hierba Luisa suele oscila entre 80 y 90 °C. En mención de López (2008) una ventaja clara del secado por aspersion es que puede adaptarse a materiales sensibles al calor, lo cual permite la microencapsulación de sustancias que podrían verse afectadas por altas temperaturas.

Según Bonifaz (2019), es fundamental tener en cuenta el valor del principio activo del aceite esencial en el proceso de microencapsulación. Esto asegura que se haya incorporado una cantidad optima del aceite esencial en las microcápsulas lo que indica que la mayoría del aceite esencial se depositó en el interior de las microcápsulas. En la presente investigación, el uso de un homogenizador de alta velocidad permitió una mayor homogenización de la emulsión. Se destaca que, a mayor homogenización, se logra una mayor eficiencia en la microencapsulación del aceite esencial (Núñez, 2022).

3.1.2. Eficiencia cualitativa de la microencapsulación mediante (FT-IR)

A continuación, en la Figura 2 se muestra el resultado del análisis de espectroscopía infrarroja del aceite esencial de hierba Luisa (*C. citratus*) y la presencia de sus grupos funcionales sin microencapsular.

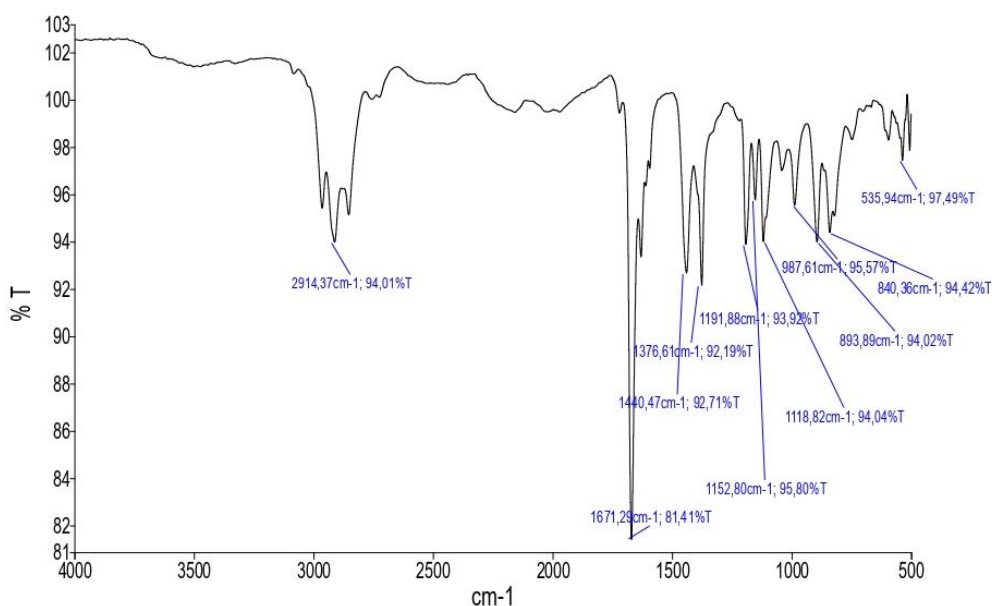


Figura 2. Espectros infrarrojos FT-IR del aceite de hierba Luisa (*C. citratus*) y la presencia de sus grupos funcionales

El análisis espectral realizado en el rango de 550 y 4000 cm^{-1} reveló ciertas bandas representativas en el espectro obtenido del aceite de hierba Luisa (*C. citratus*). En la figura 2 se observa que las bandas más destacadas corresponden a 2914,37 cm^{-1} que representa al 94,01 %T de Citral (3,7-Dimetil-2,6-octadienal) y 1671,29 cm^{-1} que representa el 81,41 %T de Geranial (α -citral) y Neral (β -citral), Estos valores son similares a la composición química del aceite de hierba Luisa (*C. citratus*) (Huanca, 2021).

En comparación con un estudio realizado por Meza & Vargas (2013), donde se reportan resultados similares se concluye que el Citral es el componente responsable

del olor distintivo del aceite de hierba Luisa (*C. citratus*) y su actividad antifúngica. Sin embargo, se menciona que el Citral no actúa de manera aislada, sino en conjunto con todos los componentes presentes en el aceite (Citral, Geranial y Neral).

A continuación, en la Figura 3 se muestra el resultado del análisis de espectroscopía infrarroja del aceite esencial de hierba Luisa (*C. citratus*) antes, después de su microencapsulación y la mezcla polimérica.

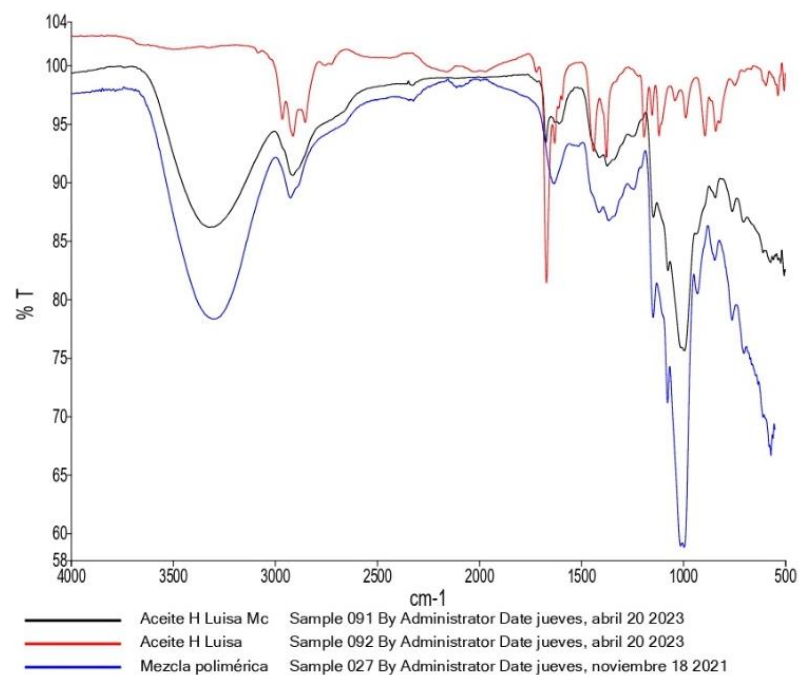


Figura 3. Espectroscopía infrarroja FT-IR de Hierba Luisa (*C. citratus*) antes y después de su microencapsulación y la mezcla polimérica.

Espectros de hierba luisa sin microencapsular (ROJO), microencapsulado (NEGRO), y de la mezcla polimérica de maltodextrina y goma arábica (AZUL).

En la figura 3 se puede observar la presencia de picos pronunciados en las longitudes de onda de 3000 y 3500 cm^{-1} . Estos picos corresponden a la mezcla homogénea del microencapsulado representada por el color negro y mezcla polimérica representada por el color azul. Según Ortiz (2023) la alta concentración de azúcares de la maltodextrina en la mezcla es la responsable de estos picos. Es interesante destacar que los picos correspondientes al aceite esencial correspondiente al color rojo tienen

un valor de frecuencia similar, lo cual permite una alta eficiencia en el proceso de microencapsulación (Telenchana, 2019).

Además, en la figura 3 se puede observar la relación de las bandas de frecuencia entre 1000 y 2000 cm^{-1} , los cuales corresponden a la humedad presente en la mezcla de microencapsulado del aceite esencial de hierba Luisa (banda negra) con relación al espectro de la mezcla polimérica (banda azul). Ortiz (2023) mencionó que la similitud en el proceso de microencapsulación a través del secado por aspersion ha permitido eliminar la mayor parte de humedad presente en la mezcla de aceites.

Estos resultados resaltan la importancia del análisis espectroscópico para identificar los componentes químicos presentes en el aceite de hierba Luisa (*C. citratus*), lo cual facilita comprender mejor sus propiedades y posibles aplicaciones antifúngicas (Meza & Vargas, 2013).

3.1.3. Efecto antifúngico del microencapsulado del aceite esencial de Hierba Luisa sobre el crecimiento micelial de *C. fulvum*

A continuación, en la Tabla 3 se muestra la influencia de diferentes concentraciones del aceite esencial de hierba Luisa (*C. citrus*) microencapsulado con relación al crecimiento micelial de colonias de (*C. fulvum*).

Tabla 3. Porcentaje de la Inhibición del crecimiento micelial en relación con sus tratamientos (Control positivo, control negativo y diferencias de concentraciones con microencapsulado).

Tratamientos	Inhibición del crecimiento micelial expresada en porcentaje (ICM%)
Medio de cultivo PDA	0 ^d
20 % de microencapsulado en PDA	9,87±2,89 ^c

30 % de microencapsulado en PDA	16,57±6,62 ^{bc}
40 % de microencapsulado en PDA	18,79±3,33 ^b
Fludioxonil+Cyprodinil (Galant)	68,93±7,64 ^a

Medias que en una misma columna no compartan letras comunes difieren estadísticamente según la prueba de Tukey para $P < 0,05$

En la Tabla 3 se presentan los valores que indican la capacidad del aceite de hierba Luisa microencapsulado para detener o inhibir el crecimiento de *C. fulvum* en comparación al control biológico (blanco) y un control químico (control positivo) utilizando el medio de cultivo (PDA). Los tratamientos se basaron en diferentes proporciones de microencapsulado en el medio, como 20, 30 y 40 % en PDA. Los resultados muestran que a medida que aumenta la proporción de microencapsulado en el medio, se logra una mayor inhibición del crecimiento de *C. fulvum*. Por ejemplo, con un 20 % de microencapsulado en el medio, se obtuvo un 9,87 % de inhibición, mientras que con un 30 % de microencapsulado en PDA se logró un 16,57 % de inhibición. El tratamiento con un 40 % de microencapsulado en PDA mostró el porcentaje más alto de inhibición, con un valor de 18,79. Estos valores son comparables con el estudio de Segura et al. (2015) donde se expresó que la inhibición de *S. molle* presentó una inhibición de 0,15%. Estos resultados respaldan la utilidad de la hierba Luisa (*C. citrus*) microencapsulado como alternativa efectiva para controlar el crecimiento de diferentes patógenos.

A continuación, en la figura 4 se muestra la influencia de diferentes concentraciones del aceite esencial microencapsulado de (*C. citrus*) con relación al crecimiento micelial de colonias de (*C. fulvum*).

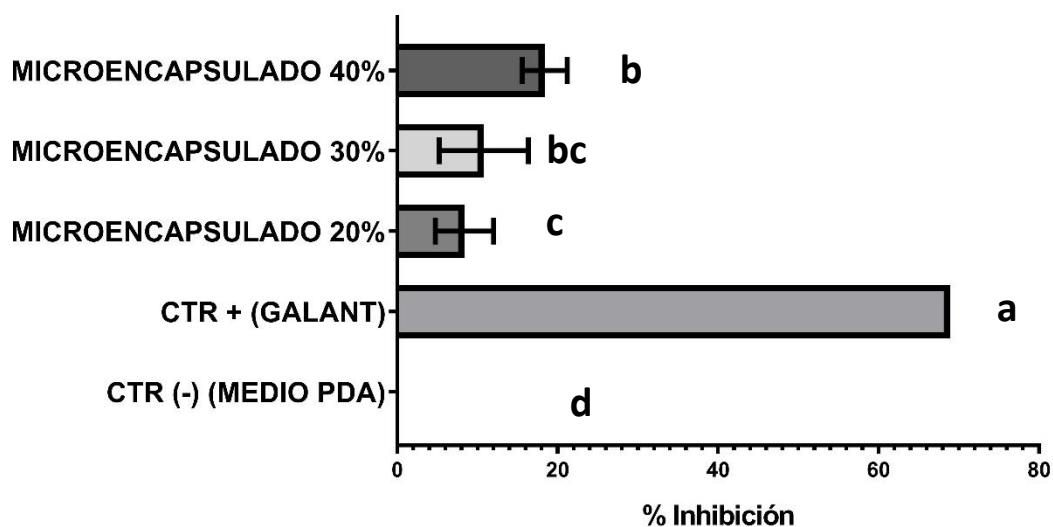


Figura 4. Diagrama de la influencia de diferentes concentraciones del aceite esencial microencapsulado de (*C. citrus*) con relación al crecimiento micelial de *C. fulvum*.

Medias que en una misma columna no compartan letras comunes difieren estadísticamente según la prueba de Tukey para $P < 0,05$

El uso de la mezcla de aceite se plantea como una alternativa viable para inhibir o detener el crecimiento micelial de patógenos causantes de enfermedades en el campo. En un estudio realizado por Coello (2022) refiere que el aceite esencial de hierba Luisa (*C. citrus*) mostró inhibición sobre *Candida* spp con un valor de estadístico ($P < 0,05$). La inhibición de crecimiento de *Candida* spp fue del 0,05 % lo que indica una reducción del patógeno. Estos resultados son comparables como se puede observar en la figura 4, donde se evidenció una reducción eficiente del patógeno de 18,79 % que presenta las concentraciones de microencapsulado (40%) en cuanto a la inhibición de crecimiento micelial de *C. fulvum*.

Con respecto al control químico comercial llamado “Galant”, es un compuesto que contiene Fludioxonil y Cyprodinil, los cuales ayudan a inhibir el crecimiento de *C. fulvum*. Sin embargo, es importante destacar que existe una diferencia entre los tratamientos microencapsulado y el control químico (Positivo) como observar en la figura 4. En referencia a la información por Díaz-Vallejo et al. (2021) se menciona que

el Fludioxonil, uno de los componentes del control químico “Galant”, puede tener efectos perjudiciales para la salud de los consumidores. El Fludioxonil es un agroquímico que puede causar daños respiratorios, digestivos y en casos graves o en exposiciones prolongadas, incluso puede llevar a la muerte.

Estos hallazgos resaltan la importancia de buscar alternativas más seguras y amigables con el medio ambiente para el control del patógeno. En este sentido el uso del aceite esencial de hierba Luisa muestra una efectividad en la inhibición de *C. fulvum*, sin los efectos perjudiciales para la salud asociada con el uso agroquímico con el de Fludioxonil (Díaz-Vallejo et al., 2021). El efecto de inhibición observado en el aceite esencial microencapsulado de hierba luisa (*C. citrus*) puede atribuirse a la presencia de compuestos bioactivos como el Citral, Geranial y Neral, presentes en el aceite. Meza & Vargas (2013) mencionan que estos compuestos han sido reconocidos por su actividad antibacteriana y antifúngica.

3.1.4. Características de las colonias de los aislados monospóricos de *C. fulvum*

A continuación, en la figura 4 se observa las características de las colonias de los aislados monospóricos de *C. fulvum*.

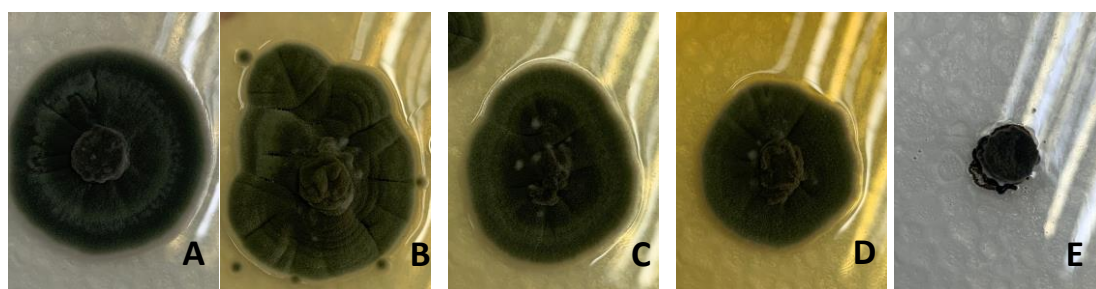


Figura 5. Características de las colonias de (*C. fulvum*) en relación con los tratamientos experimentales

Muestra A= control negativo, B=20% de microencapsulado, C= 30% de microencapsulado, D=40% de microencapsulado en, E=Control positivo (Fludioxonil+Cyprodinil).

En la figura 5 se puede apreciar los aislados monospóricos obtenidos de *C. fulvum*. Estos aislados no presentan diferencias en comparación con la investigación realizada por Bernal et al. (2006) donde se obtuvieron aislados con colonias de color gris, gris oliváceo, bordes irregulares, color del reverso negro y textura afelpada. Esto nos indica que las características morfológicas de los aislados de *C. fulvum* obtenidos fueron homogéneas. Es importantes destacar que según Medina & Balatti (2011) las características morfológicas y culturales de *C. fulvum* son elementos importantes para su clasificación. Estas características pueden proporcionar información relevante sobre la identificación y clasificación de la especie.

En el presente trabajo, se han obtenido resultados similares a la investigación realizada por Jácome (2022) lo cual presenta características de *C. fulvum* los cuales son uniformes y no tienen complicaciones de aislamiento. Además Medina & Balatti (2011) señala que el medio de cultivo utilizado tiene un impacto directo en la obtención de colonias homogéneas. En la figura 5 se observó variaciones en la coloración del medio, pero la concentración cabe recalcar sigue siendo la misma. Estos hallazgos resaltan la importancia del medio de cultivo en el desarrollo de apariencia de las colonias de *C. fulvum*.

Medina & Balatti (2011) expresó que mientras mayor sea la proporción del aceite esencial de hierba Luisa la morfología del patógeno seguirá modificándose. Como se puede observar en la figura 5 se puede evidencia una inhibición de crecimiento micelial en cuanto a la proporción adicionando el microencapsulado, donde se manifiesta que a mayor concentración del microencapsulado más eficiente en la inhibición resulta. En la presencia del microencapsulado la coloración varía dependiendo la proporción, esta similitud en las características de las colonias de *C. fulvum* con respecto a la investigación de Jácome (2022) refuerza la consistencia en los resultados obtenidos.

3.1.5. Características morfológicas de los aislados monospóricos en microcultivos y su observación bajo microscopio óptico

A continuación, en la figura 6 se observa las características morfológicas de los aislados monospóricos en microcultivos de (*C. fulvum*).

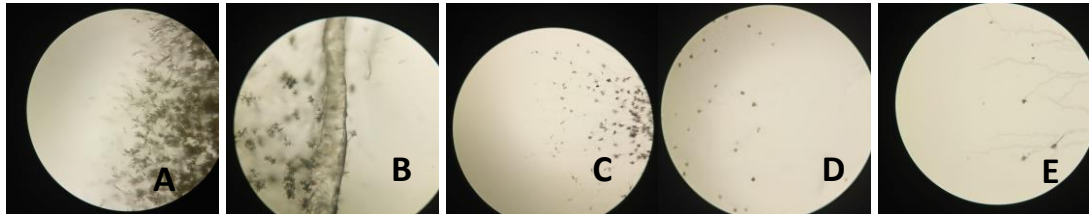


Figura 6. Características morfológicas de los aislados monospóricos de (*C. fulvum*) en microcultivos en relación con los tratamientos experimentales bajo microscopio. Muestra A= control negativo, B=20% de microencapsulado, C= 30% de microencapsulado, D=40% de microencapsulado en, E=Control positivo (Fludioxonil+Cyprodinil).

En este estudio, se realizaron observaciones microscópicas de los aislamientos monospóricos en microcultivos. En la figura 6 se destacó una notable variedad en la forma de los conidióforos hifas y conidios. Estos hallazgos concuerdan con lo mencionado en la investigación de Medina & Balatti (2011), donde describieron una morfología de conidios esféricos formando cadenas de diferentes estructuras y tamaños. En cuanto a la presencia del microencapsulado la inhibición es notoria, al observar menor presencia de hifas y conidios. Es interesante notar que, a pesar de la diversidad y disposición de los conidióforos y conidios, existen similitud en el alargamiento en los aislamientos. A su vez, destacan la importancia de analizar y describir la morfología de sus estructuras relacionadas para una caracterización adecuada de los aislamientos del fitopatógeno (Bernal et al., 2006).

Por otro lado, Medina & Balatti (2011), mencionan que el tamaño de los conidios está relacionado con su velocidad de crecimiento, a su vez Jácome (2022) expresó que las características de los aislados monospóricos de *C. fulvum* muestran variaciones en el tamaño de los conidios y esto está relacionado con la tasa de crecimiento del cultivo. Esta relación entre el tamaño de los conidios y la velocidad de crecimiento se determinó por la presencia de las concentraciones del microencapsulado que se puede

observar en la figura 6 donde la presencia de microencapsulado inhibe el crecimiento donde sugiere que existe diferencias en la morfología de los conidios dependiendo de la dinámica de crecimiento de los cultivos.

En la figura 6 se puede observar las características morfológicas de los aislados monospóricos de *C. fulvum*, donde se evidencia en cuanto a la proporción del microencapsulado su morfología se modifica. Jácome (2022), expresó que el aceite de hierba Luisa inhibe el crecimiento micelial y a su vez modifica la presencia de hifas en la observación microscópica del patógeno, en donde los conidios y onidióforos disminuyen su alargamiento.

3.2.Verificación de hipótesis

Al realizar los diferentes análisis se comprobaron los datos obtenidos de la microencapsulación del aceite de hierba luisa (*C. citratus*) donde se decidieron:

- Se rechaza la hipótesis nula.
- Se acepta la hipótesis alternativa, es decir el microencapsulado de aceite esencial de hierba Luisa (*C. citratus*) tiene actividad antifúngica frente a *Cladosporium fulvum*.

CAPITULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1.Conclusiones

- Se obtuvo un polvo microencapsulado del aceite esencial de hierba Luisa (*C. citratus*), mediante el secado por aspersión, en condiciones óptimas de 150 °C

de temperatura de entrada y un 220 °C de salida, empleando una proporción de 20:80 entre el aceite esencial y el polímero.

- Se evaluó la eficiencia del microencapsulado del aceite de hierba Luisa mediante espectrofotometría infrarroja con la transformada de Fourier (FTIR). La mezcla del aceite microencapsulado con el espectro de la mezcla polimérica mostraron similitudes, lo que indica una eficiencia en el proceso de microencapsulación a través del secado por aspersión.
- Los resultados mostraron que mientras se aumenta la proporción de microencapsulado en el medio, más eficiente es la inhibición del crecimiento de *C. fulvum*. Así, observó un alto porcentaje de inhibición (18,79%) con el 40% de microencapsulado. Los tratamientos de microencapsulado respaldan la utilidad de la hierba luisa microencapsulado como alternativa efectiva para controlar el crecimiento de diferentes patógenos.

4.2. Recomendaciones

- Se recomienda microencapsular el aceite esencial de hierba luisa empleando diferentes tipos de polímeros para contrastar su eficiencia.
- Realizar un análisis *in vitro* del crecimiento de *Cladosporium fulvum* Cooke en un tiempo superior a los 7 días.

- Se recomienda realizar una evaluación de la inhibición del crecimiento micelial a través de un ensayo *ex vitro* que permita analizar el comportamiento que causa sobre un cultivo.

MATERIALES DE REFERENCIA

Referencias bibliográficas

Bernal, A., Martínez, B., Díaz, M., & Lidcay, I. (2006). Efecto de los medios de cultivo y la temperatura en el crecimiento de *Cladosporium fulvum* cooke (sin. *passalora fulva*). in /25 *fitosanidad* (Vol. 10, Issue 1).

- Bonifaz, J. (2019). *Efecto de la inclusión de microencapsulados de tomillo en la elaboración de queso fresco.*
- Cacoango, M. (2018). *Estudio de la adaptación y rendimiento de 10 variedades de tomate riñón (Solanum lycopersicum L) bajo invernadero, cantón riobamba, provincia de chimborazo.*
- Calle, D. (2020). *Extracción y microencapsulación de carotenoides de chonta (Bactris gasipaes).*
- Castillo, B., & Castillo, V. (2021). *Uso de plaguicidas químicos en tomate riñón (Solanum lycopersicum L.) en condiciones de invernadero y campo en Loja, Ecuador. 11.*
- Chamba, L. (2015). “*Efecto antifúngico del aceite esencial del origanum vulgare (orégano) y cymbopogon citratus (hierba luisa), sobre cepas de candida albicans en comparación con la nistatina estudio in vitro.*”
- Coello, D. (2022). *Actividad Antifúngica del Aceite Esencial de Hierba Luisa (Cymbopogon citratus) Frente a Candida spp.*
<https://doi.org/10.13140/RG.2.2.11450.06081>
- Díaz-Vallejo, J., Barraza-Villarreal, A., Yáñez-Estrada, L., & Hernández-Cadena, L. (2021). Plaguicidas en alimentos: Riesgo a la salud y marco regulatorio en Veracruz, México. *Salud Publica de Mexico*, 63(4), 486–497.
<https://doi.org/10.21149/12297>
- Estrella, Á., Poveda, S., & Alvarado, G. (2022). *Bioactivos de la hierba luisa utilizados en la industria.*
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. In *Food Research International* (Vol. 40, Issue 9, pp. 1107–1121).
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004>
- Huanca, C. (2021). *Estudio fitoquímico del aceite esencial de la Aloysia aloysioides Loes & Moldenke y su evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica.*

- Jácome, D. (2022). *Aislamiento, caracterización cultural y morfológica de aislados monospóricos del agente causal del moho gris de la hojate Solanum lycopersicumL. en la provincia de Tungurahua*. [Aislamiento, caracterización cultural y morfológica de aislados monospóricos del agente causal del moho gris de la hojate Solanum lycopersicumL. en la provincia de Tungurahua.]. Universidad Técnica de Ambato.
- Kandansamy, K., & Somasundaram, P. D. (2012). Microencapsulation of colors by spray drying-A review. In *International Journal of Food Engineering* (Vol. 8, Issue 2). <https://doi.org/10.1515/1556-3758.2647>
- López, O. (2008). *Preparation of microspheres through spray drying*. <https://www.researchgate.net/publication/286313163>
- Medina, R. (2011). *Caracterización morfológica y molecular de aislamientos de Cladosporium*.
- Medina, R., & Balatti, P. (2011). “*Caracterización morfológica y molecular de aislamientos de Cladosporium*.”
- Mesa, V., Marín, P., Ocampo, O., & Calle, L. (2019). Fungicidas a partir de extractos vegetales: una alternativa en el manejo integrado de hongos fitopatógenos. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 45, 23–30.
- Meza, K., & Vargas, G. (2013). *Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro del aceite de hierba luisa (Cymbopogon citratus), poaceae en una formulación cosmética con finalidad antiacnéica*.
- Mohammadlinejhad, S., & Kurek, M. A. (2021). Microencapsulation of anthocyanins-critical review of techniques and wall materials. In *Applied Sciences (Switzerland)* (Vol. 11, Issue 9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/app11093936>
- Núñez, B. (2022). *Extracción, microencapsulación y evaluación de la capacidad antioxidante de las antocianinas presentes en las flores de Hibiscus sabdariffa cultivadas en el cantón Milagro, provincia del Guayas*.

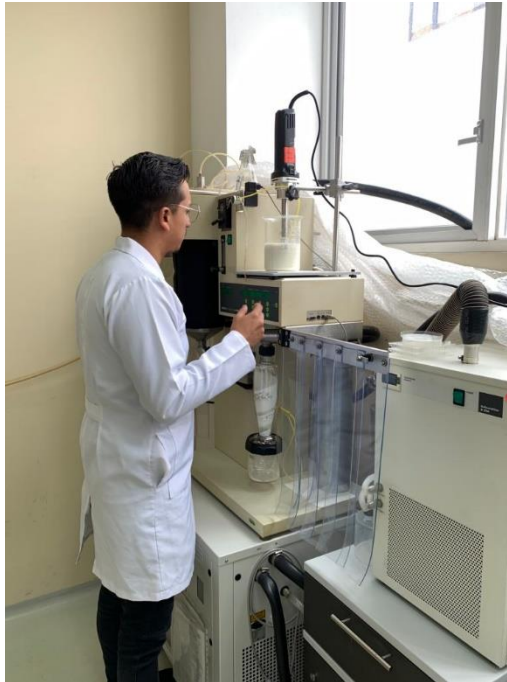
- Ortiz, L. (2023). *Microencapsulación de mezcla de aceites de cáñamo, girasol y sachá inchi rico en CBD*.
- Rigon, R. T., & Zapata Noreña, C. P. (2016). Microencapsulation by spray-drying of bioactive compounds extracted from blackberry (*rubus fruticosus*). *Journal of Food Science and Technology*, 53(3), 1515–1524. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-2111-x>
- Romero-Estévez, D., Yáñez-Jácome, G. S., Simbaña-Farinango, K., Vélez-Terrerros, P. Y., & Navarrete, H. (2020). Determination of cadmium and lead in tomato (*Solanum lycopersicum*) and lettuce (*Lactuca sativa*) consumed in Quito, Ecuador. *Toxicology Reports*, 7, 893–899. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.07.008>
- Ruiz Garay, G. M., & Saavedra Rotta, J. J. (2017). *Determinación de los parámetros óptimos de funcionamiento para un equipo de extracción sólido – líquido en la extracción de aceite esencial de naranja usando un sistema de cáscara de naranja – alcohol etílico*. 22(1), 9–18.
- Segura, S., Rodríguez, M., & Chico, J. (2015). Actividad antifúngica del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* sobre el crecimiento de *Lasioidiplodia theobromae* en condiciones de laboratorio. *REBIOL*, 35(2), 47–52.
- Senasica. (2019). *Protocolo de Diagnóstico: Passalora fulva (Cooke) U. Braun & Crous, 2003 (Moho de la hoja del tomate)*. <http://sinavef.senasica.gob.mx/CNRF/AreaDiagnostico/DocumentosReferencia/Documentos/ProtocolosFichas/Protocolos/HongosFitopatogenos/PD%20P.%20fulva%20Pub%20V.%201.pdf>
- Silva, L., Bermúdez, A., Castiblanco, D., Almario, F., Mojica, P., Cuéllar, S., Media, C., & Tamayo, A. (2014). Tecnologías relacionadas con biofertilizantes. *Banco de Patentes SIC*, 1–132.
- Telenchana, E. (2019). *Evaluación de la actividad antioxidante y antiinflamatoria de antocianinas microencapsuladas a partir de cáscaras de berenjena (Solanum melongena)*. Universidad Técnica de Ambato.

Anexos

Anexo 1. *Proceso de homogenización de la muestra*



Anexo 2. Proceso de Microencapsulación



Anexo 3. Microencapsulado obtenido



Anexo 4. Microencapsulado del aceite de hierba Luisa



Anexo 5. Análisis del FT-IR



Anexo 6. Análisis in vitro



Anexo 7. Extracción de las colonias monospóricas de *C. fulvum*



Anexo 8. Análisis in vitro

