



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO



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

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Evaluación del efecto antifúngico del microencapsulado de aceite esencial extraído de *Schinus molle* sobre hongos fitopatógenos de interés agrícola

Informe final del Trabajo de Titulación, Opción: Sistematización de experiencias prácticas de investigación y/o intervención, presentado 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: Josafat Alexander Montachana Ibarvo

Tutor: Ing. Orestes Darío López Hernández. PhD

Ambato – Ecuador

Febrero - 2024

APROBACIÓN DEL TUTOR

Ing. Orestes Darío López Hernández. PhD

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final del Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autoriza la presentación de este Trabajo de Titulación, Opción Sistematización de experiencias prácticas de investigación y/o intervención, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 12 de enero de 2024

Ing. Orestes Darío López Hernández. PhD

C.I. 175478486-4

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Josafat Alexander Montachana Ibarvo, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Sistematización de experiencias prácticas de investigación y/o intervención, previo a la obtención del Título de Ingeniero Biotecnólogo, son absolutamente originales, auténticos y personales, a excepción de las referencias bibliográficas.



Josafat Alexander Montachana Ibarvo

C.I. 1803740867

AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Informe Final del 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 Informe Final del Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo 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.



Josafat Alexander Montachana Ibarvo

C.I. 1803740867

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Sistematización de experiencias prácticas de investigación y/o intervención, 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 constancia firman:

Presidente del Tribunal

Ing. M.Sc. Daniel Alfonso Cabrera Valle

1802560595

Ing. M.Sc. Ruth Narcisa Pérez Salinas

1802726628

Ambato, 06 de febrero del 2024

DEDICATORIA

A Dios

A mis papis, Nelly y Edwin que siempre han dado la vida por sus hijos y por quién siempre estaré orgulloso por su amor, entrega y por hacer posible que mis sueños se cumplan.

A mis hermanos Kevin y Mishel quienes han sido mis compañeros toda la vida y por los cuales estoy orgulloso por cumplir sus metas y enseñarme a cumplirlas.

Y finalmente a mí mismo, por demostrarme que a pesar de que el camino nunca fue fácil, rendirse no era una opción.

AGRADECIMIENTO

Quiero comenzar agradeciendo a la Universidad Técnica de Ambato por ser por muchos años casi mi segunda casa, a los grandes profesores que con su empeño y su forma de enseñar se ganaron mi respeto y fueron motivación para seguir aprendiendo sobre la Biotecnología.

De manera especial un agradecimiento a mi tutor PhD. Orestes López por su tiempo, enseñanza, apoyo y paciencia durante el desarrollo del proyecto de investigación. Asimismo, a la gerente de la empresa BIOINNOVSA S.A, MSc. María Verónica Cepeda Miranda quien ha permitido con su apoyo y confianza que la investigación se lleve a cabo en las instalaciones de su empresa.

Agradecer también a mi familia a quienes quiero mucho y que con sus consejos me han ayudado a ser mejor persona. Por otra parte, un grandísimo agradecimiento a mi novia Michelle, quien ha sido mi brazo derecho y quien más me ha ayudado en mi última etapa universitaria y ha sido un gran pilar para mí.

Por otro lado, a personas quienes se han convertido en mi segunda familia y quienes han estado junto a mí en este proceso tan lindo y han formado parte de varias etapas, principalmente a mi mejor amiga que la universidad me pudo dar, Camila quien ha estado junto a mí en toda la etapa universitaria (hasta cuando casi nos retiramos), con quien ha perdurado una linda amistad, pero que, sin ella, las clases y la universidad no hubiera sido tan linda y divertida. Además de grandes personas que se transformaron en amigos y que los querré toda la vida como Alli, Mishu, Washo, Fernanda, Vivi, Pato, Pepe, Liss, Erick, Angelita, Josu, Juanito, Kevito, Abelito, Raque y por supuesto a mi mejor amiga Doménica que desde el colegio me brindó su amistad y su apoyo.

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 TABLAS	5
ÍNDICE GENERAL DE FIGURAS	6
RESUMEN EJECUTIVO	7
ABSTRACT	8
CAPÍTULO 1.- MARCO TEÓRICO	9
1.1. Antecedentes Investigativos	9
1.1.1. <i>Schinus molle</i>	9
1.1.1.1. Generalidades.....	9
1.1.1.2. Taxonomía	9
1.1.1.3. Importancia	10
1.1.2. Metabolitos secundarios en plantas.....	10
1.1.2.1. Metabolitos secundarios en la producción de fitohormonas.....	10
1.1.3. Aceites esenciales.....	11
1.1.3.1. Características y propiedades fisicoquímicas	11
1.1.3.2. Aceites esenciales para el control de plagas y enfermedades.....	12
1.1.4. Aceite esencial de molle.....	12
1.1.4.1. Terpenos.....	13
1.1.4.2. Taninos.....	13

1.1.4.3.	Flavonoides.....	13
1.1.5.	Extracción de aceites esenciales.....	13
1.1.5.1.	Métodos de extracción.....	14
1.1.6.	Microencapsulación.....	14
1.1.6.1.	Técnicas de microencapsulación.....	15
1.1.7.	Análisis cualitativo de microencapsulación.....	16
1.1.7.1.	Espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)	16
1.1.8.	Hongos fitopatógenos de interés agrícola.....	17
1.1.8.1.	<i>Fusarium spp.</i>	17
1.1.8.2.	<i>Botrytis cinerea</i>	18
1.1.8.3.	<i>Cladosporium spp.</i>	18
1.1.9.	Evaluación antifúngica <i>in vitro</i>	19
1.1.10.	Uso de insumos agrícola en Ecuador.....	19
1.1.10.1.	Insumos utilizados en la agricultura.....	19
1.1.10.2.	Promoción y Producción Orgánica-Ecológica-Biológica.....	20
1.1.11.	Importancia del estudio.....	20
1.2.	Objetivos.....	21
1.2.1.	Objetivo General.....	21
1.2.2.	Objetivos Específicos.....	21
CAPÍTULO 2.- METODOLOGÍA.....		22
2.1.	Materiales y Equipos.....	22
2.1.1.	Equipos.....	22
2.1.2.	Material fungible.....	22
2.1.3.	Reactivos.....	23
2.2.	Métodos.....	23

2.2.1.	Extracción del aceite esencial por arrastre de vapor	23
2.2.1.1.	Recolección del material vegetal	23
2.2.1.2.	Acondicionamiento del material vegetal	23
2.2.1.3.	Obtención del aceite esencial por arrastre de vapor	24
2.2.1.4.	Rendimiento de aceite esencial.....	24
2.2.2.	Microencapsulación del aceite esencial por secado por aspersión.....	24
2.2.2.1.	Preparación de emulsión.....	24
2.2.2.2.	Secado por aspersión con “Spray drying”	25
2.2.2.3.	Análisis de espectrometría infrarroja (FTIR).....	25
2.2.3.	Evaluación <i>in vitro</i> de la capacidad antifúngica del aceite esencial de molle microencapsulado.....	25
2.2.3.1.	Material biológico fitopatógeno.....	25
2.2.3.2.	Preparación y siembra del inóculo.....	25
2.2.3.3.	Resuspensión y colocación de discos	26
2.2.3.4.	Medición de los halos de inhibición	26
2.2.3.5.	Tratamientos experimentales	27
2.2.3.6.	Diseño Experimental.....	28
-	Variables.....	28
-	Hipótesis	29
CAPÍTULO 3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		30
3.1.	Análisis y discusión de resultados	30
3.1.1.	Extracción del aceite esencial por arrastre de vapor	30
3.1.1.1.	Acondicionamiento del material vegetal	30
3.1.1.2.	Obtención de aceite esencial por arrastre de vapor.....	30
3.1.1.3.	Rendimiento de aceite esencial.....	32
3.1.2.	Microencapsulación del aceite esencial por secado por aspersión.....	32

3.1.2.1. Eficiencia cualitativa de microencapsulación.....	32
3.1.3. Evaluación <i>in vitro</i> de la capacidad antifúngica del aceite esencial de molle microencapsulado.....	37
3.1.3.1. Medición de los halos de inhibición	37
3.2. Verificación de hipótesis.....	52
CAPÍTULO 4.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	53
4.1. Conclusiones.....	53
4.2. Recomendaciones	54
C. MATERIALES DE REFERENCIA	55
Referencias Bibliográficas	55
Anexos.....	61

ÍNDICE GENERAL DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Schinus molle</i>	9
Tabla 2. Taxonomía de <i>B. cinerea</i>	18
Tabla 3. Escala de sensibilidad según Duraffourd.....	27
Tabla 4. Tratamientos para <i>Botrytis cinerea</i>	27
Tabla 5. Tratamientos para <i>Cladosporium spp.</i>	27
Tabla 6. Tratamientos para <i>Fusarium spp.</i>	28
Tabla 7. Resultados de obtención de aceite esencial	31
Tabla 8. Resultado de los valores de espectro infrarrojo para cada muestra	35
Tabla 9. Medición del diámetro de inhibición para <i>Botrytis cinerea</i> a diferentes concentraciones de aceite esencial microencapsulado.....	37
Tabla 10. Medición del diámetro de inhibición para <i>Cladosporium spp.</i> a diferentes concentraciones de aceite esencial microencapsulado.....	40
Tabla 11. Medición del diámetro de inhibición para <i>Fusarium spp.</i> a diferentes concentraciones de aceite esencial microencapsulado.....	42
Tabla 12. Medias marginales para la concentración del aceite esencial microencapsulado.....	45
Tabla 13. Prueba de igualdad de Levene de varianzas de error a,b.....	50
Tabla 14. Pruebas de efectos inter-sujetos.....	50
Tabla 15. Comparaciones múltiples.....	52

ÍNDICE GENERAL DE FIGURAS

Figura 1. Biosíntesis de terpenos. Síntesis de IPP.....	11
Figura 2. Técnicas de microencapsulación	16
Figura 3. Molienda de bayas de molle.	30
Figura 4. Decantación de aceite esencial	31
Figura 5. Recolección de aceite esencial.....	31
Figura 6. Espectros infrarrojos de la transformada de Fourier (FTIR) para distintas muestras.	34
Figura 7. Resultado de actividad antifúngica de aceite esencial microencapsulado a 100 mg/ml frente a <i>Botrytis cinerea</i>	39
Figura 8. Resultado de actividad antifúngica de aceite esencial microencapsulado a 100 mg/ml frente a <i>Cladosporium spp</i>	41
Figura 9. Resultado de actividad antifúngica de aceite esencial microencapsulado a 100 mg/ml frente a <i>Fusarium spp</i>	43
Figura 10. Comparación de medias marginales estimadas de los diámetros de los halos de inhibición para cada hongo fitopatógeno en torno a la concentración del microencapsulado de aceite esencial de molle.....	46
Figura 11. Comparación de medias marginales estimadas de los diámetros de los halos de inhibición en torno a cada hongo fitopatógeno.....	47
Figura 12. Diagrama de cajas simple representando el diámetro de halo de inhibición y la concentración del aceite esencial microencapsulado sin controles....	48
Figura 13. Diagrama de cajas simple representando el diámetro de halo de inhibición y la concentración del aceite esencial microencapsulado con controles	49

RESUMEN EJECUTIVO

El molle es un árbol de origen andino que alrededor de la historia ha sido utilizado con fines medicinales, culinarios, textiles, entre otros, demostrando además una fuerte actividad biológica en el área agrícola para el control de plagas en insectos, bacterias y hongos ya que presenta propiedades antimicrobianas. Es por ello por lo que su aceite esencial puede ser importante para desarrollo de un fungicida de origen biológico y vegetal, que sirva para el control de varias enfermedades agrícolas causadas por hongos fitopatógenos.

En el presente proyecto de investigación se extrajo el aceite esencial de molle por el método de arrastre de vapor, obteniendo un rendimiento de 2,8 por ciento, además para la conservación del aceite esencial se ha utilizado el método de microencapsulación por secado por aspersión haciendo uso de una mezcla de polímeros con maltodextrina y goma arábica como agentes microencapsulantes, en la que por medio espectroscopía por la transformada de Fourier (FTIR) se comprobó de forma cualitativa el rendimiento de microencapsulación.

Finalmente, con el método de Kirby Bauer, se comprobó de forma *in vitro* que con una concentración de 100 miligramos sobre mililitros de microencapsulado de aceite esencial de molle existe sensibilidad frente a *Botrytis cinerea*, *Cladosporium spp* y *Fusarium spp*.

Palabras clave: Biotecnología agrícola, control biológico, actividad antifúngica, microencapsulación, metabolitos secundarios, aceites esenciales, hongos fitopatógenos, molle

ABSTRACT

The molle is a tree of Andean origin that throughout history has been used for medicinal, culinary, textile purposes, among others, also demonstrating strong biological activity in the agricultural area for the control of pests in insects, bacteria, and fungi since it has antimicrobial properties. This is why its essential oil may be important for the development of a fungicide of biological and plant origin, which serves to control several agricultural diseases caused by phytopathogenic fungi.

In the present research project, the essential oil of molle was extracted by the steam drag method, obtaining a yield of 2.8 percent, in addition to the conservation of the essential oil, the microencapsulation method by spray drying was used using of a mixture of polymers with maltodextrin and gum arabic as microencapsulating agents, in which the microencapsulation performance was qualitatively verified by means of Fourier transform spectroscopy (FTIR).

Finally, with the Kirby Bauer method, it was verified *in vitro* that with a concentration of 100 milligrams per milliliters of microencapsulated molle essential oil there is sensitivity to *Botrytis cinerea*, *Cladosporium spp* and *Fusarium spp*.

Keywords: Agricultural biotechnology, biological control, antifungal activity, microencapsulation, secondary metabolites, essential oils, phytopathogenic fungi, molle

CAPÍTULO 1.- MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes Investigativos

1.1.1. *Schinus molle*

1.1.1.1. Generalidades

Schinus molle también conocido como “molle” o “aguaribay” es un árbol perennifolio de origen andino, que mide de 4 a 8 metros de altura, que puede llegar hasta 15 metros, de la familia *Anacardiaceae*, presente en zonas cálidas y/o templadas de las zonas altas de los Andes y cultivado de forma ornamental (Llanos, 2012).

El molle posee raíz de tipo extendido y superficial, tronco color marrón de madera dura con corteza rugosa, con ramas colgantes y flexibles, sus hojas de forma imparipinnadas son de color verde y miden de 15 a 30 cm de largo, sus frutos de color rosa se distribuyen racimos colgantes y brotan en primavera y verano (Werdin et al., 2008).

1.1.1.2. Taxonomía

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Schinus molle*

Reino:	<i>Plantae</i>
Phyllum:	<i>Spermatophyta</i>
Subphyllum:	<i>Magnoliophytina</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase:	<i>Rosidas</i>
Orden:	<i>Sapindales</i>
Familia:	<i>Anacardiaceae</i>
Género:	<i>Schinus</i>
Especie:	<i>Schinus molle</i> L.

Fuentes: (Llanos, 2012)

1.1.1.3. Importancia

En el país, específicamente en la Región Andina, está conformada por una variedad de microclimas lo que da lugar a una gran variedad de especies vegetales, entre ellas las especies endémicas que son de gran importancia para la agricultura y medicina dentro de la comunidad (**Kramer, 1957**). Dentro de las plantas endémicas utilizadas de forma ancestral, el molle ha sido utilizado en la zona andina peruana con fines medicinales, culinarios, textiles, entre otros. Sus extractos y aceites han sido descritos para la utilización médica, demostrando además una fuerte actividad biológica en el área agrícola para el control de plagas en insectos, bacterias y hongos ya que presenta propiedades antimicrobianas. (**Werdin et al., 2008**).

1.1.2. Metabolitos secundarios en plantas

Las moléculas que no tienen relación directa en el metabolismo primario de la planta, se denominan metabolitos secundarios, los cuales se relacionan con las interacciones entre el medio ambiente y las plantas, es decir, está relacionado con la resistencia de las plantas y son denominados compuestos orgánicos de bajo peso molecular que son sintetizados principalmente en fases de estrés (**Morales & Sánchez, 2022**).

1.1.2.1. Metabolitos secundarios en la producción de fitohormonas

Las fitohormonas son compuestos orgánicos que cumplen funciones defensivas en la planta, además por su composición química son encargadas de la adaptación ambiental y regulación de funciones estructurales como el desarrollo y crecimiento, mediante una acción estimulante o inhibitoria. Siendo los principales grupos las auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico, etileno, poliaminas, ácido salicílico, brasinoesteroides y jasmonato (**Vázquez et al., 2018**).

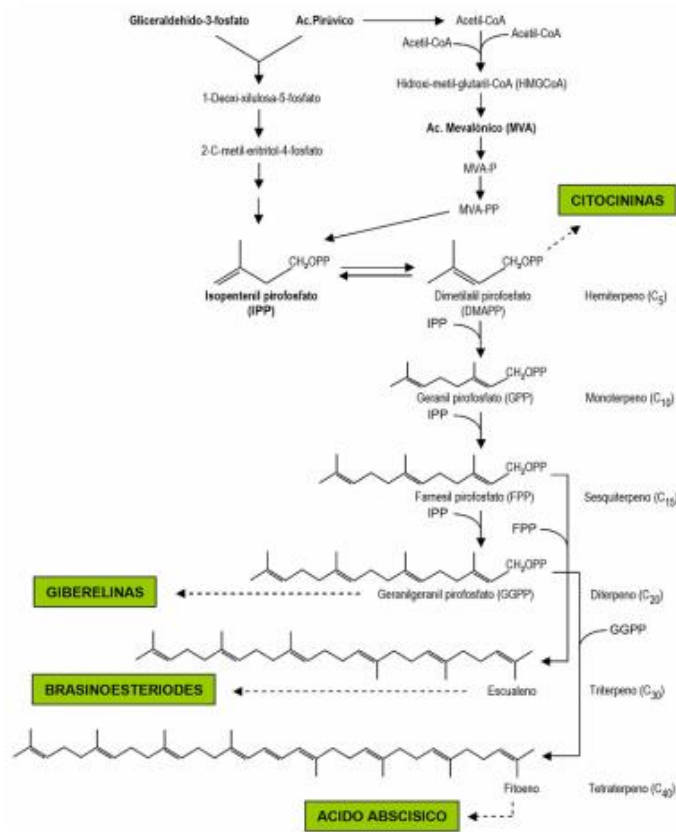


Figura 1. Biosíntesis de terpenos. Síntesis de IPP

1.1.3. Aceites esenciales

Por concepto los aceites esenciales son mezclas complejas de componentes volátiles, resultado del metabolismo secundario de las plantas, compuestos de hidrocarburos y compuestos oxigenados como alcoholes, fenoles y aldehídos, los cuales dan las características organolépticas a los aceites esenciales. Los aceites esenciales se encuentran en estructuras secretoras como hojas, cáscaras, tallo y en el caso del género “*Schinus*” (conocidos como pimenteros) en las células modificadas del parénquima (Santos, 2008).

1.1.3.1. Características y propiedades fisicoquímicas

Los aceites esenciales tienen propiedades perceptibles sensitivamente para el ser humano, por su olor y color característico dependiendo de la especie y género de plantas. Además, debido a sus características volátiles, son

susceptibles a degradación ambiental por presencia de luz, aire, calor, álcalis y ácidos fuertes, entre otros, generando ácido carbónico y oligómeros debido a su degradación que puede ser oxidativa al contacto con el ambiente (Santos, 2008).

1.1.3.2. Aceites esenciales para el control de plagas y enfermedades

Desde la antigüedad se ha descrito el efecto curativo de las plantas que contienen aceites esenciales comúnmente han sido utilizados en la medicina ancestral, sin embargo, en la actualidad, por su actividad biológica ha sido utilizado en diversas áreas como: cosmética, medicina, agronomía, productos de limpieza, alimentaria, aromatizante entre otras. En el área de la agronomía el uso de los aceites esenciales ha sido utilizado para el control de enfermedades y plagas desde la domesticación de las plantas demostrando ser eficientes en cuanto a su actividad y costo, en contraste al uso de fungicidas sintéticos, en los últimos años debido a varias investigaciones se ha demostrado que pueden causar daño al ambiente y a la población causando enfermedades y generación de resistencia de los hongos (Faggiani et al., 2015).

1.1.4. Aceite esencial de molle

La composición del aceite esencial varía dependiendo de la parte de la planta y en función al órgano, principalmente en el fruto y en las hojas, además está constituido de terpenos como: monoterpenos, triterpenos y sesquiterpenos; taninos; y flavonoides (Lopez & Caso, 2015). Los frutos contienen la mayor concentración de aceites esenciales (5 %) y en las hojas se encuentra la segunda mayor concentración de aceite esencial (2 %), compuesto principalmente por: β -mirceno (30,1 %), α felandreno (26,4 %), β -pineno (13,5 %), α -pineno (11,9 %), limoneno (9,9 %) y β -felandreno (5,7 %), entre otros compuestos (Bernhard et al., 1983).

1.1.4.1. Terpenos

Los terpenos son metabolitos secundarios en la síntesis de metabolitos primarios indispensables para el crecimiento y supervivencia en plantas, principalmente fitohormonas como: giberelinas, citoquininas y ácido abscísico (Vázquez et al., 2018). Los terpenos son indispensables para el metabolismo de la planta, como el ácido giberélico y por lo tanto cumple la función de defensa contra patógenos, además son responsables del sabor y aroma de las plantas (Aguirre, 2020).

1.1.4.2. Taninos

Son compuestos orgánicos que le adquieren el sabor amargo a las plantas, clasificado como un metabolito secundario fenólico no nitrogenado, que pueden encontrarse principalmente en las raíces y cortezas, además son solubles en agua e insolubles en alcohol, acetona entre otros. Utilizados por sus características antimicrobianas, antisépticas, antioxidantes, etc (Arias et al., 2016).

1.1.4.3. Flavonoides

En el caso del molle en sus hojas contiene flavonoides como: quercetina, rutina, quercitrina e isoquercitrina; que tienen propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antihistamínicas (Cuasés, 2018).

1.1.5. Extracción de aceites esenciales

La extracción de aceites esenciales es el proceso en el que se obtienen los compuestos aromáticos y volátiles de plantas, flores, frutos u hojas, entre otros. Los aceites esenciales tienen la propiedad de ser altamente concentrados y pueden ser extraídos mediante varios métodos como destilación por arrastre de vapor, prensado, extracción con solventes, entre otros (Martínez, 2001).

1.1.5.1. Métodos de extracción

- Destilación al vapor: La destilación por arrastre de vapor de agua es el método más convencional para la extracción de aceites esenciales, en este proceso se utiliza vapor saturado o sobrecalentado a presión atmosférica, en donde el material vegetal al tener contacto con el vapor se calienta y libera el aceite esencial debido a su alta volatilidad, siendo arrastrado en corriente al mezclarse, en el condensador la mezcla es enfriada hasta la temperatura ambiente, la cual posteriormente es separada mediante un florentino o un decantador dinámico **(Rodríguez et al., 2019)**.
- Extracción con disolventes: Se utilizan disolventes químicos para disolver los aceites esenciales, para que el disolvente se evapore hasta obtener la mayor concentración de aceite esencial **(Sierra et al., 2018)**.
- Maceración: En este método el material vegetal se sumerge en un tipo de aceite portador, como aceite de oliva, durante un periodo de tiempo largo, hasta el que aceite portador adquiera los compuestos aromáticos del material vegetal **(Rodríguez et al., 2019)**.

1.1.6. Microencapsulación

Para mejorar la estabilidad oxidativa y degenerativa de los aceites esenciales se utiliza la técnica de microencapsulación, el cuál es un proceso en el que pequeñas partículas sólidas o líquidas son recubiertas con una película de material polimérico evitando reacciones con el ambiente, manteniendo así sus propiedades fisicoquímicas y biológicas funcionales, así también, ayuda a mejorar las propiedades de manejo de compuestos reactivos. El material que se encuentra dentro de la microcápsula es denominado núcleo, mientras que la pared de recubrimiento se denomina capa o membrana **(Bakry et al., 2016)**.

Por su parte, la microencapsulación de fungicidas presenta ventajas como la protección del componente activo, evitando su degradación y prolongando su

vida útil, también mejora la adherencia del fungicida en superficies vegetales permitiendo una mayor duración de control y por último ayuda a reducir la toxicidad al contacto directo con humanos y animales, mejora el proceso e liberación controlada gracias a que su membrana se degrada gradualmente (Gouin, 2004).

1.1.6.1. Técnicas de microencapsulación

- Secado por aspersión: Transforma el material de alimentación rociándolo en un medio de secado caliente, desde un estado fluido a una forma de partículas secas. El secado por aspersión involucra la atomización (es un proceso que rompe el líquido a granel en millones de gotas de aspersión individuales) en un medio de secado, lo que resulta en la evaporación del disolvente y la formación de partículas secas (Garg & Arora, 2011).
- Coacervación: Es una técnica donde se debe formar una capa homogénea del polímero de cubierta alrededor del material del núcleo, esto se logra alterando propiedades fisicoquímicas como pH, temperatura o fuerza iónica. El material nuclear se mezcla con los polímeros de cubierta formando una solución inmiscible para que se produzca un cambio de fases por fuerza iónica, temperatura o pH, formando coacervados, es decir pequeñas gotas que contienen una rica fase en polímeros los cuales rodean al material nuclear, formando las microcápsulas (Jun-xia et al., 2011).
- Recubrimiento en lecho fluidizado: Este método se basa en la pulverización del material de cubierta sobre el núcleo fluidizado aplicando aire. Los métodos de recubrimiento en lecho fluidizado son por pulverización superior, inferior y tangencial y depende de varios parámetros para que la eficiencia sea la deseada (Coronel & San Martín, 2015).
- Extrusión: Se utiliza para producir microcápsulas muy densas, pero de un tamaño considerablemente grandes, para ello, el material de pared debe ser inmiscible para ser pasadas a través de boquillas concéntricas,

permitiendo que el material de pared recubra el núcleo, para finalmente ser enfriado y se produzca su solidificación (Song et al., 2013).

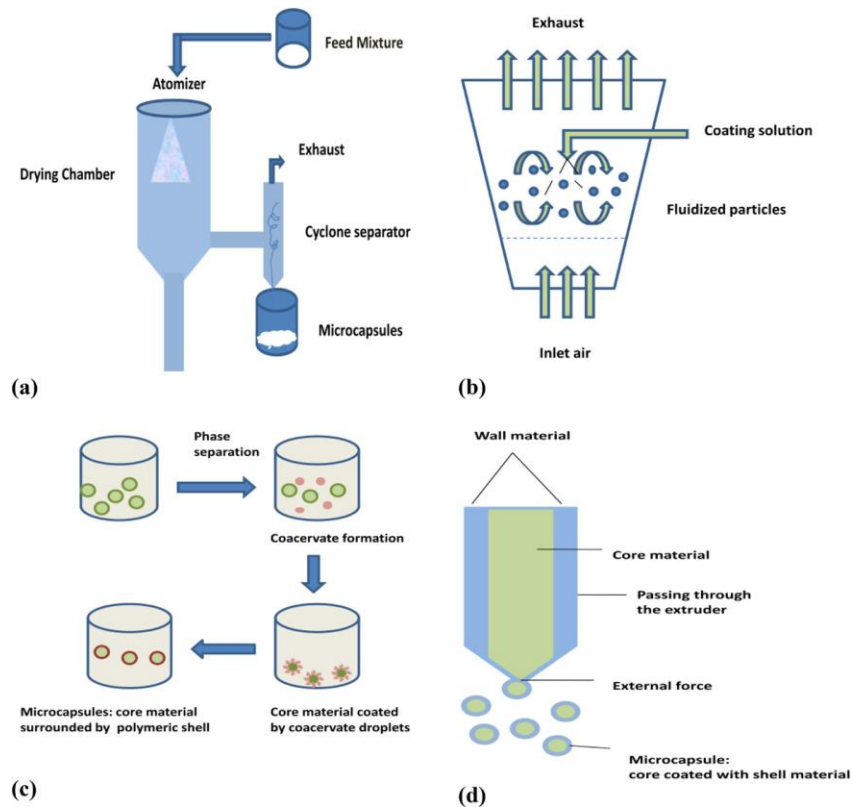


Figura 2. Técnicas de microencapsulación: (a) secado por aspersión; (b) revestimiento en lecho fluidizado; (c) coacervación; (d) extrusión.

Fuente: Food Frontiers, Volume: 2, Issue: 4, Pages: 426-442, First published: 18 June 2021, DOI: (10.1002/fft2.94)

1.1.7. Análisis cualitativo de microencapsulación

1.1.7.1. Espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)

El análisis infrarrojo de la transformada de Fourier (FTIR) ayuda a medir la absorción de radiación infrarroja, por lo que los átomos y moléculas presentan frecuencias específicas de las que dependen su composición y estructura química de una muestra, los resultados se presentan como espectro

infrarrojo y básicamente la intensidad de absorción infrarroja en función de la frecuencia (Pinares et al., 2023).

1.1.8. Hongos fitopatógenos de interés agrícola

En el control de enfermedades en plantas, los agentes bióticos que afectan a la fisiología y funcionamiento de la planta, hasta causar la muerte, son conocidos como fitopatógenos (bacterias, hongos, virus, fitoplasmas, nemátodos, entre otros), de los cuales los hongos fitopatógenos han originado millones de pérdidas anuales debido al daño ocasionado en los cultivos a través de investigaciones descritos hacia varios años (Bustamante, 1999). Los hongos son pequeños organismos filamentosos o micelios que se reproducen a través de esporas, además de ser distinguibles por su apariencia algodonosa frente a las bacterias, sobreviven en ciclos agrícolas como esclerocios, micelio, clamidiosporas (Ejemplo: *Botrytis cinerea*) y esporas en tejido vegetal diseminados a través del agua, viento, insectos y hospederos como animales o maquinaria (Lastres, 2009).

1.1.8.1. Fusarium spp.

De la familia *Nectriaceae*, *Fusarium* es un fitopatógeno que causa marchitez en los cultivos por la enfermedad llamada fusariosis, el cuál aparece en cultivos con problemas de drenaje, y que además son causados por una serie de síndromes de infección vascular y para el cuál no existe algún control químico ni biológico (Duarte et al., 2016), por lo que, es uno de los fitopatógenos con mayor importancia en el Ecuador, ya que afecta a la exportación del mercado agrícola nacional (Magdama et al., 2020).

En torno a su taxonomía es complicada al momento de definir la especie, por lo que distintos autores consideran que existen entre 26 a 78 especies, ya que debido a su variabilidad genética su clasificación puede llegar a ser muy extensa y por consecuencia, presenta una extensa capacidad de colonización en distintas

plantas hospederas, acoplándose a diversas condiciones ya que sufren mutaciones en un periodo corto de tiempo (Ochoa & Flores, 2012).

1.1.8.2. *Botrytis cinerea*

B. cinerea (familia *Sclerotiniaceae*) es un hongo patógeno necrófito que causa la llamada podredumbre gris, afectando a una gran cantidad de cultivos agrícolas atacando a tejidos blandos de frutas, flores y verduras, considerado uno de los patógenos más importantes causando pérdidas económicas masivas (Bi et al., 2023). Además, debido a su fácil adaptación a condiciones ambientales, puede ser capaz de infectar a 200 especies de plantas, afectando a diversas áreas como hojas, tallos y frutos causando pudrición u posteriormente la muerte (Tudzynski & Schulze, 2007).

Tabla 2. Taxonomía de *B. cinerea*

Reino	<i>Fungi</i>
Clase	<i>Ascomycota</i>
Subdivisión	<i>Pezizomycota</i>
Clase	<i>Leotimycetes</i>
Orden	<i>Helotiales</i>
Familia	<i>Sclerotiniaceae</i>
Género	<i>Botrytis</i>
Especie	<i>cinerea</i>

Fuente: (Infante et al., 2009).

1.1.8.3. *Cladosporium spp.*

Y por último, *Cladosporium* (familia: *Davidiellaceae*) el cuál es un hongo fitopatógeno de origen saprófito localizado en el agua, aire y en el suelo que causan manchas foliares y otras lesiones causadas por cladosporiosis,

acumulando fitotoxinas y disminuyendo el rendimiento de los cultivos agrícolas (Pérez & Sánchez, 2019).

El género *Cladosporium* se distribuye de forma común en el ambiente, encontrándose comúnmente en todo tipo de plantas, desechos, aislados de alimentos, suelo, pintura, entre otras materias vegetales. Así mismo la distribución de los conidios de las especies de *Cladosporium* son el componente más común en el aire, con relevancia también en el ámbito clínico (Bensch et al., 2012).

1.1.9. Evaluación antifúngica *in vitro*

Uno de los métodos para la evaluación antimicrobiana o antifúngica es el método de difusión, el cuál es usado en extractos de plantas para obtener resultados de forma cuantitativa, midiendo su efecto mediante la difusión en discos o pozos descrito comúnmente como el método de Kirby-Bauer, basándose en los halos de inhibición en la superficie de las placas *in vitro* con agar sembrado con el microorganismo en relación entre la concentración de la sustancia a estudiar (Ramirez & Marin, 2009).

1.1.10. Uso de insumos agrícola en Ecuador

1.1.10.1. Insumos utilizados en la agricultura

En el Ecuador según el Instituto Nacional de Estadística y Censos, (2016) a través de la “Información Ambiental en la Agricultura 2016” se determinó que en el año 2016 apenas el 2,66 % de insumos utilizados por los agricultores son de origen orgánico, los cuáles han sido utilizados en la superficie sembrada. Adicionalmente se dio a conocer que el 2,24 % de los agricultores han utilizado fungicidas extremadamente peligrosos y el 21,28 % han utilizado fungicidas moderadamente peligrosos en cultivos permanentes, mientras que el 3,42 % han utilizado fungicidas extremadamente peligrosos y el 22,87 % han utilizado fungicidas moderadamente peligrosos en cultivos transitorios a nivel nacional.

1.1.10.2. Promoción y Producción Orgánica-Ecológica-Biológica

Considerando que la provincia de Tungurahua es la principal productora de productos de origen agrícola en la zona centro norte del Ecuador, principalmente papa, cebolla blanca, maíz suave, entre otros, según registros tomados en el 2022 (INEC, 2023), es indispensable la promoción de formas de agricultura orgánica y ecológica que permitan desaparecer la dependencia de insumos agrícolas de origen inorgánico que son potencialmente peligrosos y un problema a nivel mundial.

Por lo que el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca a través de Agrocalidad en consideración con el artículo 281 sobre la soberanía alimentaria, de la Constitución de la República, fortalece la introducción de tecnologías ecológicas y orgánicas en la producción agropecuaria, el desarrollo biotecnológico, así como su experimentación, uso y comercialización, como el caso de aceites vegetales consideradas dentro de las sustancias de origen vegetal o animal para el control de plagas y enfermedades (AGROCALIDAD, 2013).

1.1.11. Importancia del estudio

Por lo tanto, lo que se busca es el desarrollo de un fungicida de origen biológico y vegetal, que pueda aplicarse en los cultivos para el control de varias enfermedades causadas por hongos fitopatógenos, que además presente diversas ventajas, como la liberación controlada, su aplicación sólida sobre la superficie vegetal y que no cause toxicidad al ambiente y las personas.

1.2.Objetivos

1.2.1. Objetivo General

- Evaluar la capacidad antifúngica del aceite esencial microencapsulado de *Schinnus molle* sobre hongos fitopatógenos de interés agrícola.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Extraer aceite esencial de *Schinnus molle* por arrastre de vapor como método convencional.
- Preparar microencapsulado de aceite esencial de *Schinnus molle* mediante secado por aspersión.
- Determinar de forma *in vitro* la capacidad antifúngica del microencapsulado utilizando los siguientes hongos indicadores: *Botrytis cinerea*, *Cladosporium spp* y *Fusarium spp*.

CAPÍTULO 2.- METODOLOGÍA

2.1. Materiales y Equipos

2.1.1. Equipos

- Molinillo triturador de hierro
- Balanza analítica Ohaus PA-313
- Autoclave
- Espectroscopio FTIR Perkin Elmer Spectrum Two
- Mini Spray Dryer
- Cámara de flujo laminar
- Incubadora
- Microscopio
- VÓRTEX MIXER (LABNET)
- Refrigerador
- Micropipetas

2.1.2. Material fungible

- Asas de cultivo
- Pinzas
- Portaobjetos
- Espátula
- Puntas para micropipeta
- Vasos de precipitación
- Matraces
- Probeta
- Mechero Bunsen
- Guantes de examinación
- Mascarillas
- Cofias
- Cámara de Neubauer

- Papel filtro
- Paquete de fundas Ziploc
- Tubos de ensayo
- Gradillas
- Tubos eppendorf

2.1.3. Reactivos

- Agua destilada
- Maltodextrina
- Goma arábica
- Agar Papa Dextrosa (PDA)
- Solución Tween 80
- Etanol
- Solución Salina PBS
- Mancozeb

2.2. Métodos

2.2.1. Extracción del aceite esencial por arrastre de vapor

2.2.1.1. Recolección del material vegetal

Las bayas de *Schinus molle* (molle) fueron entregadas por la empresa BIOINNOVSA S.A, alrededor de 3 kg en total para posteriormente ser acondicionados en los laboratorios de investigación dentro de la misma empresa.

2.2.1.2. Acondicionamiento del material vegetal

Al seguir la metodología planteada por **Toro et al., (2020)**, para la extracción primero se acondicionó la materia prima, por ello, en el caso del molle se recolectó su fruto, el cual contiene bayas de color rojo rosáceo en su etapa de maduración (**Escobar, 2019**), se eliminó cualquier tipo de impurezas, como descarte de hojas, tallos y bayas infectadas, y luego se trituroó con un molino manual de acero.

2.2.1.3. Obtención del aceite esencial por arrastre de vapor

Dentro de las instalaciones por la empresa BIOINNOVSA S.A, con ayuda del equipo de destilación (Marca HPC, de 3 kg/h de capacidad), como máquina de extracción de aceite esencial, se colocó 1 kg de la materia prima acondicionada previamente, en un proceso de extracción de aproximadamente 60 minutos.

Mediante arrastre de vapor se obtuvo una mezcla de fases entre el hidrolato y el aceite esencial, por lo que la mezcla obtenida fue vertida en una pera de decantación y se dejó reposar hasta que se observó la separación completa de las fases y finalmente se recolectó el aceite esencial (Toro et al., 2020).

2.2.1.4. Rendimiento de aceite esencial

El rendimiento del aceite esencial se evaluó mediante la expresión descrita por (Quert et al., 2001), la cual se expresa de la siguiente forma:

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

P = Rendimiento

M1 = Peso del aceite esencial (g)

M2 = Peso del material vegetal (g)

2.2.2. Microencapsulación del aceite esencial por secado por aspersión

2.2.2.1. Preparación de emulsión

Se preparó una emulsión en la cual la fase acuosa estará formada por agua y una mezcla de maldotextrina y goma arábiga como agentes microencapsulantes en proporción 53,3 % y 26,7 % en porcentaje peso/peso, respectivamente, del 80 % del total, en constante agitación se adicionará el aceite esencial hasta obtener un porcentaje de carga en las microcápsulas del 20 %, manteniendo la agitación durante todo el proceso (Bringas et al., 2011).

2.2.2.2. Secado por aspersión con “Spray drying”

La microencapsulación del aceite esencial de molle se realizó en las instalaciones de la Universidad Técnica de Ambato – Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología – Unidad Operativas de Investigación y Desarrollo (UODIDE) en el equipo BUCHI MINI SPRAY DRYER.

La emulsión formada fue alimentada a un secador por aspersión en condiciones como: Temperatura de entrada entre 160 °C ; temperatura de salida de 100 °C; %Aspiración de 100, bomba de 15 % (López et al., 2014). Cuando la temperatura es de 70 °C se desensambló el equipo y se colectaron las microcápsulas de la cámara (Reyes, 2021).

2.2.2.3. Análisis de espectrometría infrarroja (FTIR)

Se realizó mediante espectroscopía infrarroja de la transformada de Fourier con dispositivo de reflexión total atenuada, donde se compararon los espectros del aceite esencial, con el del microencapsulado y el de la mezcla polímeros utilizados, empleando un espectroscopio infrarrojo Perkin-Elmer spectrum two.

2.2.3. Evaluación *in vitro* de la capacidad antifúngica del aceite esencial de molle microencapsulado

Para la evaluación *in vitro* de la capacidad antifúngica del aceite esencial de molle microencapsulado se siguió la metodología descrita por (Guayasamin, 2016), utilizando el método de Kirby-Bauer.

2.2.3.1. Material biológico fitopatógeno

Se utilizaron los inóculos de *Botrytis cinerea*, *Cladosporium spp* y *Fusarium spp* caracterizados por la empresa BIOINNOVSA S.A.

2.2.3.2. Preparación y siembra del inóculo

Primero se preparó la solución de Tween 80 al 0,1 %, para ello, se tomó 1 ml de la solución de Tween 80 para ser colocada en 9 ml de una solución salina PBS al 0,85 % para que la solución se encuentre al 10 %, y después se tomó 1 ml de la

primera disolución y nuevamente se diluyó en la solución salina PBS en 99 ml y se obtiene la solución de Tween 80 al 0,1%.

A continuación, se tomaron los cultivos de 7 días de incubación con gran desarrollo micelial de *Botrytis cinerea*, *Cladosporium spp* y *Fusarium spp*, se agregaron 15 ml de la solución de Tween 80 al 0.1 % a través de toda la caja Petri, se siguió agitando durante 4 minutos hasta tener la mayor cantidad de conidios y esporas, y finalmente con la micropipeta se tomó 1 ml de la suspensión de esporas para trasvasar a un tubo de ensayo estéril hasta ser sembrado.

Para la siembra, primero se tomó 10 µl de la suspensión y con ayuda de la cámara de Neubauer se estableció una concentración de 1×10^5 conidios/ml de dilución, para luego así, tomar 500 µl de la dilución de conidios y fue vertido en una caja Petri con medio PDA, donde fue distribuido con ayuda de un asa Drigalsky, y después de 5 minutos se dividió la caja en 3 partes con un rotulador y se colocaron los diferentes tratamientos con los controles.

2.2.3.3. Resuspensión y colocación de discos

Para ello, primero se realizó una resuspensión de las microcápsulas con agua estéril y se llevó a agitación en un VÓRTEX MIXER marca LABNET. Después se colocaron los tratamientos en discos de papel filtro de 6 mm de diámetro, a las siguientes concentraciones C1:20, C2:50, C3:100 (mg/ml) del microencapsulado y fue colocado en cada división discos con el control negativo (agua destilada) y el control positivo (Mancozeb a 5 mg/ml). Se realizó por triplicado en cada cepa con cada tratamiento y se llevó a incubación con temperatura de 20 a 25 °C y 80 % de humedad (Masaquiza, 2018).

2.2.3.4. Medición de los halos de inhibición

Se recogieron los datos de las mediciones de halos de inhibición según la visualización de crecimiento en las cajas en incubación. El diámetro medido fue el traslúcido formado alrededor de los discos en milímetros de acuerdo con la escala de Duraffourd (Castillo & Ibarra, 2018) descrita en la Tabla 3 como:

Tabla 3. Escala de sensibilidad según Duraffourd

Inhibición	Símbolo	Diámetro (mm)
Altamente sensible	+++	>20mm
Muy sensible	++	>14 - 20mm
Sensible	+	$\geq 8\text{mm} \leq 14\text{mm}$
Nula	-	< 8mm

Fuente: (Castillo & Ibarra, 2018)

2.2.3.5. Tratamientos experimentales

- Total Tratamientos: 27

Tabla 4. Tratamientos para *Botrytis cinerea*.

Concentración de aceite esencial microencapsulado	Tratamiento	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
C1: 20 mg/ml	BC1	BC1R1	BC1R2	BC1R3
C2: 50 mg/ml	BC2	BC2R1	BC2R2	BC2R3
C3: 100 mg/ml	BC3	BC3R1	BC3R2	BC3R3

Tabla 5. Tratamientos para *Cladosporium spp.*

Concentración de aceite esencial microencapsulado	Tratamiento	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
C1: 20 mg/ml	CC1	CC1R1	CC1R2	CC1R3
C2: 50 mg/ml	CC2	CC2R1	CC2R2	CC2R3
C3: 100 mg/ml	CC3	CC3R1	CC3R2	CC3R3

Tabla 6. Tratamientos para *Fusarium spp.*

Concentración de aceite esencial microencapsulado	Tratamiento	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
C1: 20 mg/ml	FC1	FC1R1	FC1R2	FC1R3
C2: 50 mg/ml	FC2	FC2R1	FC2R2	FC2R3
C3: 100 mg/ml	FC3	FC3R1	FC3R2	FC3R3

2.2.3.6. Diseño Experimental

En esta investigación se busca evaluar si existen diferencias significativas en los halos de inhibición de los tratamientos en función del tipo de hongo fitopatógeno y la concentración del aceite esencial microencapsulado, por lo que se realizó un diseño factorial AxB con tres réplicas y dos controles (positivo y negativo), los factores de estudio son: Tipo de hongo fitopatógeno (*Botrytis cinerea*, *Cladosporium spp* y *Fusarium spp*); concentración de microencapsulado (C1:20, C2:50, C3:100 mg/ml). La variable respuesta son los halos de inhibición de los tratamientos en mm. El análisis fue realizado en el software SPSS mediante la prueba gratuita de 30 días, aplicando un ANOVA y verificado la validez de los tratamientos mediante una Prueba de DMS.

- Variables

- **Variable Dependiente:** Diámetro de halo de inhibición (mm).

- **Variables Independientes:** Concentración de aceite esencial microencapsulado y tipo de hongo fitopatógeno.

- **Hipótesis**

- **Ho:** No hay diferencias significativas en los diámetros de halos de inhibición entre los diferentes tipos de hongos fitopatógenos y la concentración del microencapsulado de aceite esencial de *Schinus molle*.

- **Ha:** Existe diferencias significativas en los diámetros de halos de inhibición entre los diferentes tipos de hongos fitopatógenos y la concentración del microencapsulado de aceite esencial de *Schinus molle*.

CAPÍTULO 3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de resultados

3.1.1. Extracción del aceite esencial por arrastre de vapor

3.1.1.1. Acondicionamiento del material vegetal



Figura 3. Molinado de bayas de molle.

Las bayas de molle fueron acondicionadas primero mediante secado a sol directo y molienda, ya que se necesita liberar los componentes bioactivos presentes en el fruto y eliminar la mayor cantidad de humedad, ya que como menciona **(Grasso, 2013)** al tratarse de un fruto que contiene semillas oleaginosas, la mayor parte del aceite esencial presente se encuentra organelos celulares llamados cuerpos lipídicos u oleosomas.

3.1.1.2. Obtención de aceite esencial por arrastre de vapor

Por medio de la técnica de arrastre de vapor se obtuvo como resultado en la Tabla 7 el aceite esencial de observado y descrito a continuación:

Tabla 7. Resultados de obtención de aceite esencial



Figura 4. Separación líquido - líquido de aceite esencial

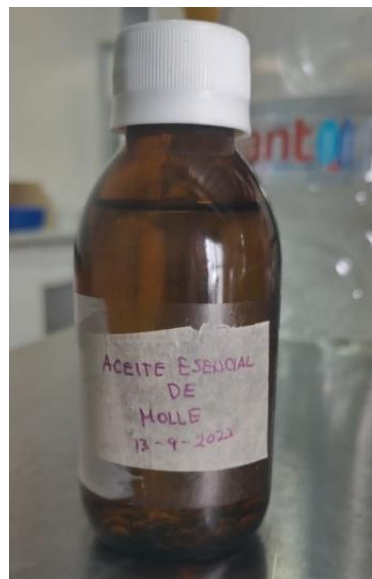


Figura 5. Recolección de aceite esencial

Fuente: Autor

En la Tabla 7 se muestran los resultados obtenidos de la extracción de aceite esencial de molle por arrastre de vapor en donde el material vegetal no tuvo contacto directo con el agua utilizada para generar vapor, permitiendo que el vapor se distribuya de forma uniforme por todo el material vegetal, esto se da gracias a que los aceites esenciales con puntos de ebullición de hasta 300°C se evaporan a la temperatura de ebullición del agua (Cerutti & Neumayer, 2004).

Obteniendo finalmente una mezcla de aceite esencial y agua con componentes hidrosolubles del fruto del molle (hidrolato), que fueron arrastrados luego de la condensación por el sistema de enfriamiento del destilador, evitando así la generación de precipitados e impurezas no deseadas en la recolección final del aceite esencial de molle (Casado, 2018).

3.1.1.3. Rendimiento de aceite esencial

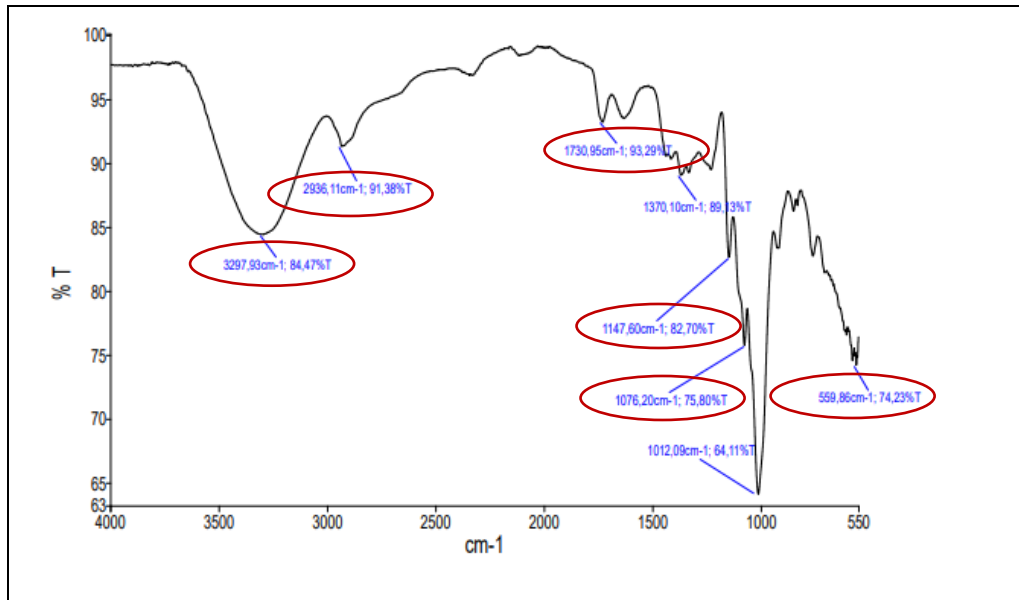
A partir de 1 kg de bayas de molle molidas se obtuvieron 25 ml de aceite esencial, por lo que obtuvo un rendimiento del 2,8 % (P = 2,8 %). Sin embargo, este rendimiento se encuentra fuera del rango descrito por **(Dikshit et al., 1986)**, ya que menciona que el rendimiento en frutos puede contener hasta el 5 %, pero 2 % en hojas de molle, eso se puede deber a la temporada en que fueron recolectados los frutos del molle (septiembre), debido a que su mejor época para la recolección es noviembre **(CONABIO & CONAFOR, 2015)**, además de la influencia de la humedad que puede variar en el rendimiento final, así como su estado de madurez y los factores ambientales en los que se encuentran.

Por otro lado, **(Dellacassa, 2010)** en su informe de normalización menciona específicamente que para frutos maduros molidos como en el caso de esta investigación, por medio de la operación extractiva de arrastre con vapor, su rendimiento puede llegar a 1,6 % en porcentaje peso/peso (w/w), por lo tanto en este caso estaría mucho más alto que el rendimiento mencionado anteriormente, que en contraste con el método de cohobación sumergida se obtienen rendimientos cercanos a los obtenidos, ya que es un método de extracción mucho más eficiente al de arrastre de vapor **(Romero & Bistoni, 2011)**.

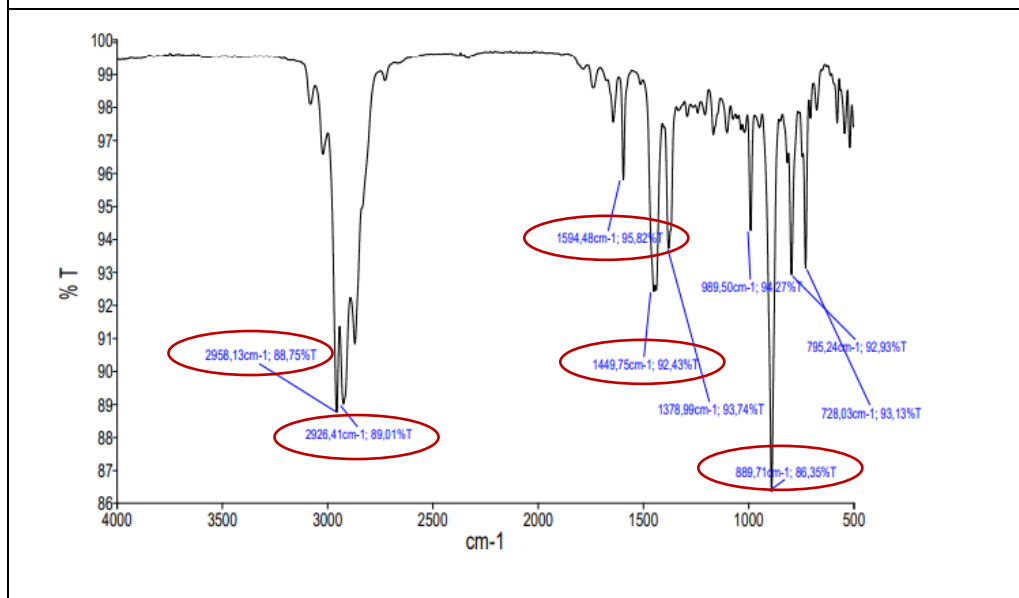
3.1.2. Microencapsulación del aceite esencial por secado por aspersion

3.1.2.1. Eficiencia cualitativa de microencapsulación

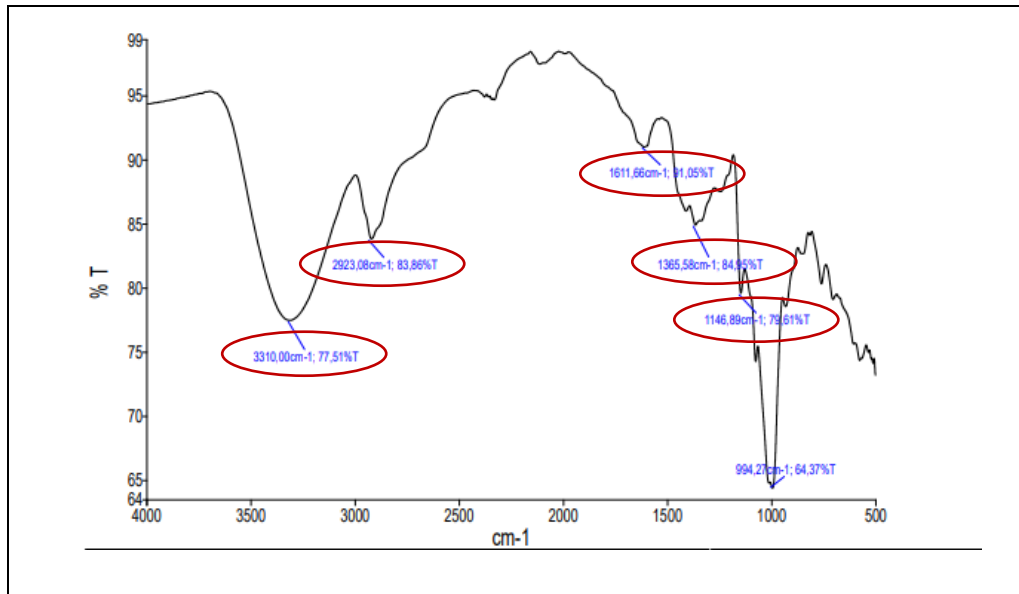
A continuación, en la Figura 6 se muestran los resultados del análisis infrarrojo por espectroscopía infrarroja de la transformada de Fourier (FTIR) para todas las muestras estudiadas y la presencia de sus grupos funcionales.



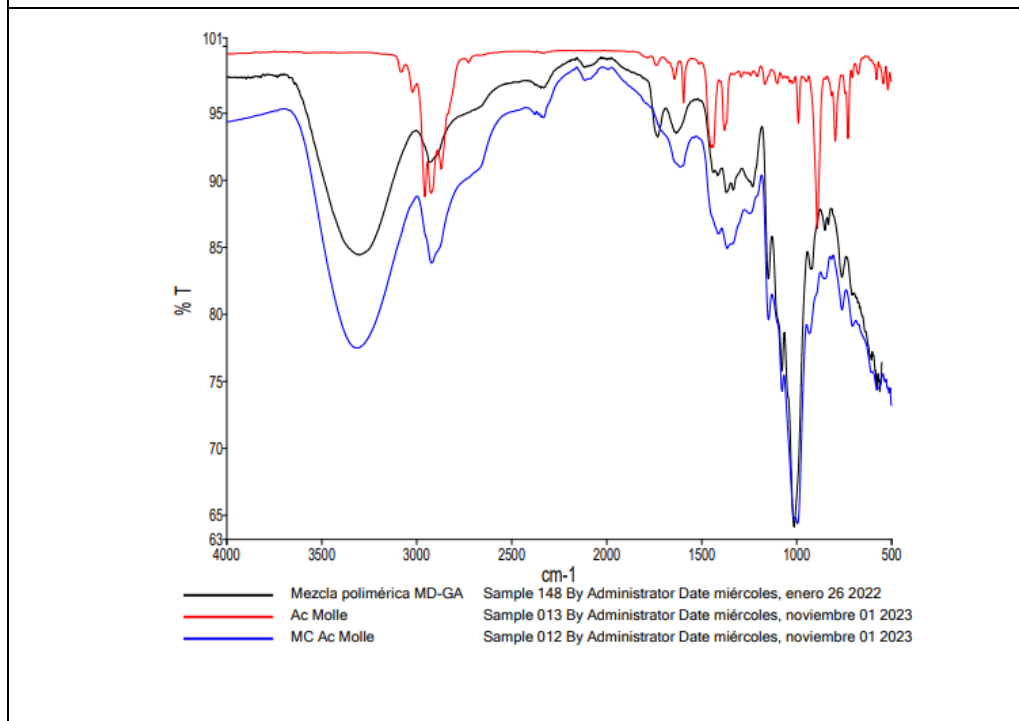
A) Mezcla de polímeros (maltodextrina + goma arábica)



B) Aceite esencial de molle



C) Microencapsulado de aceite esencial de molle



D) Comparación de los movimientos vibratorios de cada muestra

Figura 6. Espectros infrarrojos de la transformada de Fourier (FTIR) para distintas muestras. A) Espectro de resonancia para la mezcla de polímeros (goma arábica + maltodextrina); B) Espectro de resonancia para el aceite esencial de molle; C) Espectro de resonancia de microencapsulado de aceite esencial de molle; D) Espectros de resonancia comparativos de mezcla de polímeros (goma arábica + maltodextrina), aceite esencial de molle y microencapsulado de aceite esencial de molle.

Según lo observado en la Figura 6 en la que se muestra los espectros infrarrojos de la transformada de Fourier (FTIR), es decir los movimientos vibratorios para distintas muestras, la figura que más destaca en la cuantificación cualitativa es la Figura 6D donde muestra los picos representativos superpuestos de la mezcla de polímeros (goma arábica + maltodextrina), aceite esencial de molle y del microencapsulado de aceite esencial, descritos además en la Tabla 8, observando que los picos tanto de la mezcla de polímeros como del microencapsulado son casi idénticas, esto se debe a que la película protectora de las microcápsulas aíslan el núcleo que contiene el aceite esencial hasta que sea liberado (Silva et al., 2014), comparado con los picos de espectro del aceite esencial que presentan diferentes valores a lo observado en las microcápsulas.

Tabla 8. Resultado de los valores de espectro infrarrojo para cada muestra

Valores de espectro infrarrojo de la mezcla de polímeros (goma arábica + maltodextrina)		Valores de espectro infrarrojo del aceite esencial de molle		Valores de espectro infrarrojo de microencapsulado de aceite esencial de molle	
	%T		%T		%T
3297,93 cm ⁻¹	84,47	2958,13 cm ⁻¹	88,75	3310,00 cm ⁻¹	77,51
2936,11 cm ⁻¹	91,38	2926,41 cm ⁻¹	89,01	2923,08 cm ⁻¹	83,86
1730,95 cm ⁻¹	93,29	1594,48 cm ⁻¹	95,82	1611,66 cm ⁻¹	91,05
1370,10 cm ⁻¹	89,13	1449,75 cm ⁻¹	92,43	1365,58 cm ⁻¹	84,95
1147,60 cm ⁻¹	82,70	1378,99 cm ⁻¹	93,74	1146,89 cm ⁻¹	79,61
1076,20 cm ⁻¹	75,80	989,50 cm ⁻¹	94,27	994,27 cm ⁻¹	64,37
1012,09 cm ⁻¹	64,11	889,71 cm ⁻¹	86,35		
559,86 cm ⁻¹	74,23	795,24 cm ⁻¹	92,93		
		728,03 cm ⁻¹	93,13		

En la Tabla 8 se muestran los resultados del análisis infrarrojo FTIR para las muestras de la mezcla de polímeros (goma arábica + maltodextrina), aceite esencial de molle y microencapsulado de aceite esencial de molle respectivamente.

En concreto en la Figura 6B comparado además con la Tabla 8, muestra los picos de los valores de los espectros para el aceite esencial de molle, donde se observa que los picos más destacables son a $2958,13\text{ cm}^{-1}$ a $88,47\%$ T y $2926,41\text{ cm}^{-1}$ a $89,01\%$ T, que se relacionan con los estiramientos de banda pertenecientes a los enlaces C-H. Otros de los picos más destacables se dan a $1449,75\text{ cm}^{-1}$ a $92,43\%$ T, característico del grupo de los ácidos carboxílicos (C = O) o CH₂, mientras que los picos de 1000 a 1170 cm^{-1} representan los enlaces C – O. Por otro lado, los picos correspondientes a la región de 3200 a 3400 cm^{-1} , característicos de los compuestos fenólicos por su grupo funcional O-H (Cárdenas et al., 2021), los cuales no fueron representativos en el espectro final, ya que según (Paladino, 2008) su concentración varía según el ciclo vegetativo donde se encuentre, así también, en comparaciones de extracción según diferentes partes de la planta de *Schinus molle*, se menciona que en los frutos hay más ausencia de fenoles a comparación de sus hojas (Mendoza, 2011).

En el caso de la mezcla de polímeros (goma arábica + maltodextrina), visualizado en la Figura 6A y la Tabla 8, los picos más representativos corresponden a $3297,93\text{ cm}^{-1}$ a $84,47\%$ T los cuales representan los enlaces de hidrógeno (O-H), $2936,11\text{ cm}^{-1}$ a $91,38\%$ T correspondiente a estiramientos (C – H), $1730,95\text{ cm}^{-1}$ a $93,29\%$ T correspondientes a estiramientos carboxilo (C = O), $1147,60\text{ cm}^{-1}$ a $82,70\%$ T estiramiento de grupo amino (N - H), el estiramiento de pico a $1076,20\text{ cm}^{-1}$ a $75,80\%$ T corresponde al estiramiento del grupo C-O y el último pico a $559,86\text{ cm}^{-1}$ a $74,23\%$ T corresponde a vibraciones en el grupo O-H o vibraciones del anillo piranoides en el caso de la maltodextrina (Kang et al., 2019).

Los picos característicos del microencapsulado de aceite esencial de molle en la Figura 6C se encuentran dentro del rango de estiramiento descrito para la mezcla de polímeros (Figura 6A) comparado además con los datos de la Tabla 8, es por ello por lo que se resuelve en que hubo una microencapsulación exitosa. Esto es

mucho más claro en la Figura 6D, donde las intensidades de los picos de estiramiento de los grupos carbono-hidrógeno, hidroxilo y carboxilo del aceite esencial de molle son mucho menos intensos que en el caso de los picos de espectro del microencapsulado, mientras que picos de espectro a $1449,75\text{ cm}^{-1}$ y $795,24\text{ cm}^{-1}$ no fueron detectados en el espectro infrarrojo del microencapsulado, por lo tanto, la condiciones para la microencapsulación de aceite esencial de molle y la mezcla de polímeros resultaron en la pulverización exitosa por secado por aspersión.

3.1.3. Evaluación *in vitro* de la capacidad antifúngica del aceite esencial de molle microencapsulado

Los resultados de inhibición para cada microorganismo fitopatógeno fueron determinados mediante la medición de los halos translúcidos observados en las placas alrededor del disco con el tratamiento, siendo comparados con los controles (positivo y negativo) como se muestra en la Figura 7, de los cuales se determinó su grado de inhibición mediante la escala de sensibilidad según Duraffourd descrito en la Tabla 3.

3.1.3.1. Medición de los halos de inhibición

La Tabla 9 presenta las mediciones obtenidas de los halos de inhibición para *Botrytis cinerea*, considerando que para cada tratamiento y cada réplica se midieron los diámetros de inhibición de los controles positivo y negativo.

Tabla 9. Medición del diámetro de inhibición para *Botrytis cinerea* a diferentes concentraciones de aceite esencial microencapsulado.

Tratamiento	Réplica	Tratamiento y réplica	Halos de inhibición (mm)
BC1	1	BC1R1	6
	1	C+	28
	1	C-	6
	2	BC1R2	6
	2	C+	27

	2	C-	6
	3	BC1R3	7
	3	C+	27
	3	C-	6
BC2	1	BC2R1	6
	1	C+	24
	1	C-	6
	2	BC2R2	6
	2	C+	26
	2	C-	6
	3	BC2R3	7
	3	C+	29
	3	C-	6
BC3	1	BC3R1	8
	1	C+	27
	1	C-	6
	2	BC3R2	8
	2	C+	26
	2	C-	6
	3	BC3R3	9
	3	C+	28
	3	C-	6

Fuente: Autor

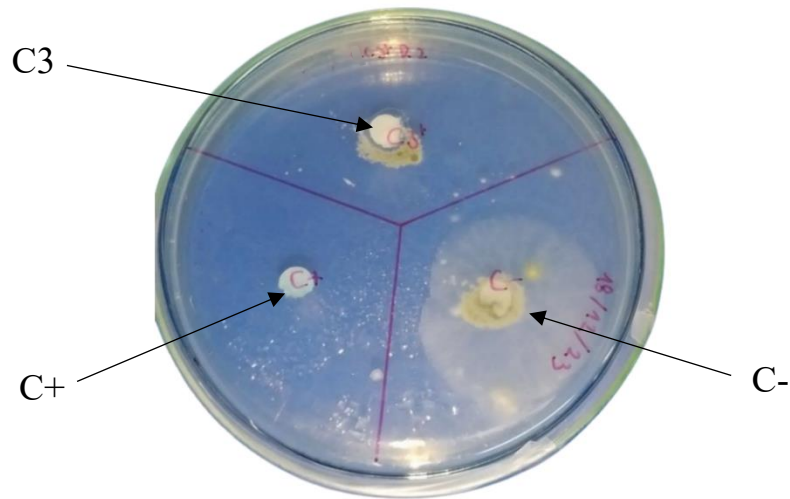


Figura 7. Resultado de actividad antifúngica de aceite esencial microencapsulado a 100 mg/ml frente a *Botrytis cinerea*.

La actividad antifúngica del microencapsulado de aceite esencial de *Schinus molle* sobre *Botrytis cinerea* demostró a través de los diferentes tratamientos que fueron aplicados (20 mg/ml, 50 mg/ml y 100 mg/ml), el que tuvo resultados más significativos fue el tratamiento a 100 mg/ml de microencapsulado, que en promedio tuvo 8,33 mm de inhibición a las 48 horas, es decir, es sensible (+) al microencapsulado como se muestra en la Figura 7, sin embargo, los otros tratamientos no tuvieron resultados significativos, mostrando nula inhibición (-) para *Botrytis cinerea*.

Estos resultados son contrastados con los obtenidos por (A. Santos et al., 2010) donde menciona que a mayor concentración de aceite esencial existe mayor inhibición, para el caso de *Botrytis cinérea*, diluciones superiores al 25 % presentan inhibición al crecimiento, pero teniendo en cuenta que el aceite esencial fue microencapsulado con una carga del 20 % de aceite esencial, tenemos que en la concentración más alta de aceite esencial de microencapsulado existen 20 mg/ml de aceite esencial efectivo, por lo tanto, su poca sensibilidad frente a *Botrytis cinerea* se debe a este motivo. Asimismo, al tomar en cuenta el tiempo en donde se visualizó crecimiento (48 horas), es decir su fase de crecimiento exponencial en la que la esporulación va en aumento y se puede

visualizar la presencia de conidios (Miclea et al., 2012), el aceite esencial inhibe a *Botrytis cinerea* alterando la morfología y las estructuras de las hifas fúngicas, debido a sus componentes volátiles como terpenos los cuales interfieren en la membrana celular de los hongos, induciendo a la ruptura celular y por lo tanto su crecimiento (Elshafie et al., 2016).

La Tabla 10 presenta las mediciones obtenidas de los halos de inhibición para *Cladosporium spp*, considerando para cada tratamiento y réplica los diámetros de inhibición de los controles positivo y negativo.

Tabla 10. Medición del diámetro de inhibición para *Cladosporium spp.* a diferentes concentraciones de aceite esencial microencapsulado.

Tratamiento	Réplica	Tratamiento y réplica	Halos de inhibición (mm)
CC1	1	CC1R1	6
	1	C+	27
	1	C-	6
	2	CC1R2	7
	2	C+	29
	2	C-	6
	3	CC1R3	6
	3	C+	29
	3	C-	6
CC2	1	CC2R1	6
	1	C+	24
	1	C-	6
	2	CC2R2	7
	2	C+	28
	2	C-	6
	3	CC2R3	6
	3	C+	26
	3	C-	6
CC3	1	CC3R1	8

1	C+	27
1	C-	6
2	CC3R2	10
2	C+	28
2	C-	6
3	CC3R3	8
3	C+	27
3	C-	6

Fuente: Autor

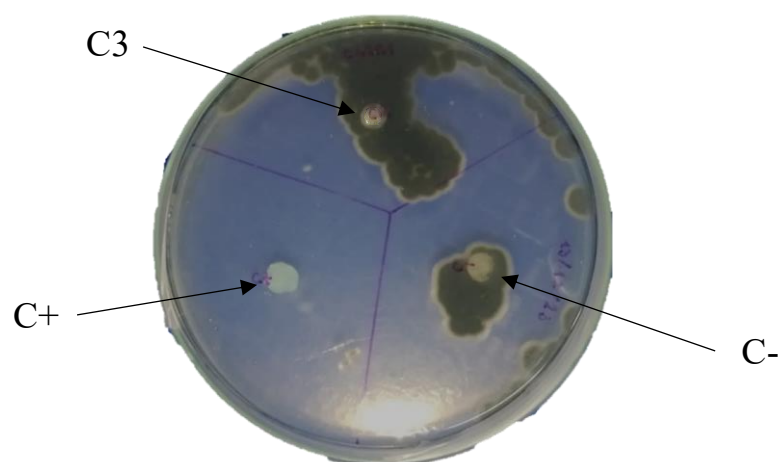


Figura 8. Resultado de actividad antifúngica de aceite esencial microencapsulado a 100 mg/ml frente a *Cladosporium spp*

La actividad antifúngica del microencapsulado de aceite esencial de *Schinus molle* sobre *Cladosporium spp.* demostró que la mayor concentración de (100 mg/ml) fue donde se visualiza mayor inhibición, ya que en promedio el diámetro de halo de inhibición fue de 8,66 mm, es decir es sensible (+) al microencapsulado como se muestra en la Figura 8, sin embargo, para los demás tratamientos (20 y 50 mg/ml) no hubo inhibición significativa a simple vista, es decir hay una nula (-) respuesta frente a *Cladosporium spp.*

En cuanto a *Cladosporium spp.* en la investigación realizada por **(De la Rosa, 2016)** muestra que a partir de las 1000 ppm (1 mg/ml) de aceite esencial de molle hubo inhibición pero con el método de dilución en agar, observando menos

crecimiento en su evaluación *in vitro*, pero en este caso el aceite esencial microencapsulado de molle tuvo una respuesta inhibitoria mucho más baja a la de la investigación mencionada, debido a la carga de aceite esencial en las microcápsulas (20 %). Ahora bien, en otras investigaciones realizadas con extractos de molle a diferentes disolventes, (Zahari et al., 2014) menciona que existe de igual forma una inhibición significativa, debido a que además de la presencia de terpenos entre sus componentes bioactivos, la presencia de fenoles ayuda a su capacidad antimicrobiana.

En conjunto los componentes bioactivos presentes en el aceite esencial, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos tienen gran actividad frente a varias especies del género *Cladosporium* (Pérez & Sánchez, 2019), considerando además que, la liberación del microencapsulado y con una mayor concentración puede llegar a tener mejor eficiencia de inhibición al interferir en el mantenimiento de la membrana celular para el hongo fitopatógeno mencionado.

Por último, la Tabla 11 presenta las mediciones obtenidas de los halos de inhibición para *Fusarium spp*, considerando para cada tratamiento y réplica los diámetros de inhibición de los controles positivo y negativo.

Tabla 11. Medición del diámetro de inhibición para *Fusarium spp*. a diferentes concentraciones de aceite esencial microencapsulado.

Tratamiento	Réplica	Tratamiento y réplica	Halos de inhibición (mm)
FC1	1	FC1R1	6
	1	C+	29
	1	C-	6
	2	FC1R2	7
	2	C+	32
	2	C-	6
	3	FC1R3	6
	3	C+	26
	3	C-	6

FC2	1	FC2R1	6
	1	C+	25
	1	C-	6
	<hr/>		
	2	FC2R2	7
	2	C+	27
	2	C-	6
	<hr/>		
	3	FC2R3	7
3	C+	29	
3	C-	6	
<hr/>			
FC3	1	FC3R1	9
	1	C+	26
	1	C-	6
	<hr/>		
	2	FC3R2	8
	2	C+	30
	2	C-	6
	<hr/>		
	3	FC3R3	8
3	C+	27	
3	C-	6	

Fuente: Autor

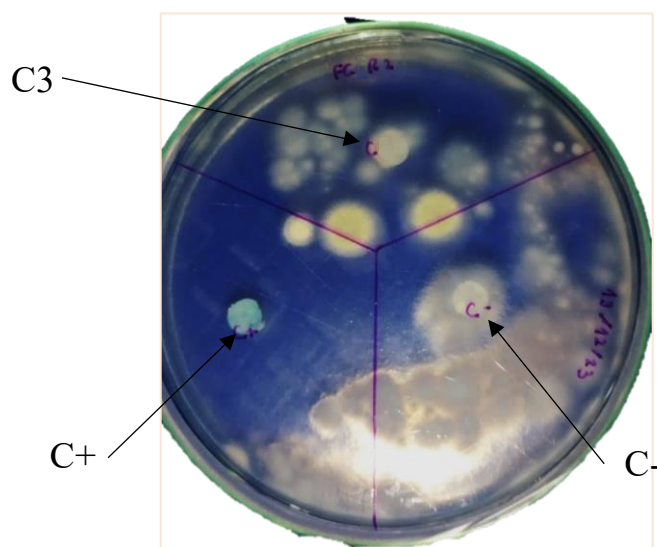


Figura 9. Resultado de actividad antifúngica de aceite esencial microencapsulado a 100 mg/ml frente a *Fusarium spp.*

La actividad antifúngica del microencapsulado de aceite esencial de *Schinus molle* sobre *Fusarium spp.* demostró que la mayor concentración de (100 mg/ml) fue donde se visualiza mayor inhibición, ya que en promedio el diámetro de halo de inhibición fue de 8,33 mm, es decir es sensible (+) al microencapsulado como se muestra en la Figura 9, sin embargo, para los demás tratamientos (20 y 50 mg/ml) no hubo inhibición significativa a simple vista, es decir hay una nula (-) respuesta frente a *Fusarium spp.*

En relación a lo que menciona **(Moutassem et al., 2019)** sobre la evaluación antimicrobiana frente a diferentes especies de *Fusarium* al demostrar la actividad antimicrobiana, encontró que el aceite esencial de molle a una concentración de 5 µl/ml existe un potente poder de inhibición el crecimiento micelial, esporulación y germinación de las esporas, ya que en su investigación determinó el crecimiento radial, reduciendo además el marchitamiento en plántulas, debido a que el aceite esencial afectan a las células microbianas mediante diversos mecanismos, como el ataque la membrana celular, destrucción de los sistemas enzimáticos, comprometer el material genético, entre otros. Al ser contrastado con lo obtenido se puede inferir igual que en los anteriores casos, por la carga del microencapsulado no tuvo los mismos resultados, ya que como se muestra en la Tabla 11 a mayor concentración (100 mg/ml) hubo mayor inhibición, pero no tan significativa. Además de la técnica de evaluación antifúngica, entre otros factores externos de la investigación y el tipo de hongo (el cual no ha sido totalmente caracterizado) influye en el resultado final, más, sin embargo, mientras haya mayor carga de aceite esencial existirá mayor inhibición.

Las medias marginales estimadas del diámetro de halo de inhibición presentados en la Tabla 12 y la Figura 10 muestran la incidencia e intersección que puede llegar a tener las diferentes concentraciones de microencapsulado para cada tipo de hongo fitopatógeno, presentado a continuación:

Tabla 12. Medias marginales para la concentración del aceite esencial microencapsulado

Variable dependiente: Diámetro de halo de inhibición (mm)

Concentración del aceite esencial microencapsulado	Media	Desv. Error	Intervalo de confianza al 95 %	
			Límite inferior	Límite superior
20 mg/ml	6,444	,222	5,978	6,911
50 mg/ml	6,444	,222	5,978	6,911
100 mg/ml	8,444	,222	7,978	8,911

Para la Tabla 12 muestra las medias marginales del diámetro de halo de inhibición para las diferentes concentraciones del aceite esencial microencapsulado, en este caso no se tomó en cuenta el tipo de hongo fitopatógeno ya que en promedio sus valores no son significativos para la investigación. Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente se puede observar que las medias no son significativas excepto para 100 mg/ml (la más alta), donde además sus valores de intervalo no son tan alejados y no existe una alta desviación en cada uno de los casos.

Gráficamente se puede visualizar en la Figura 10 y 11, en torno al diámetro de halo de inhibición y los factores de estudio.

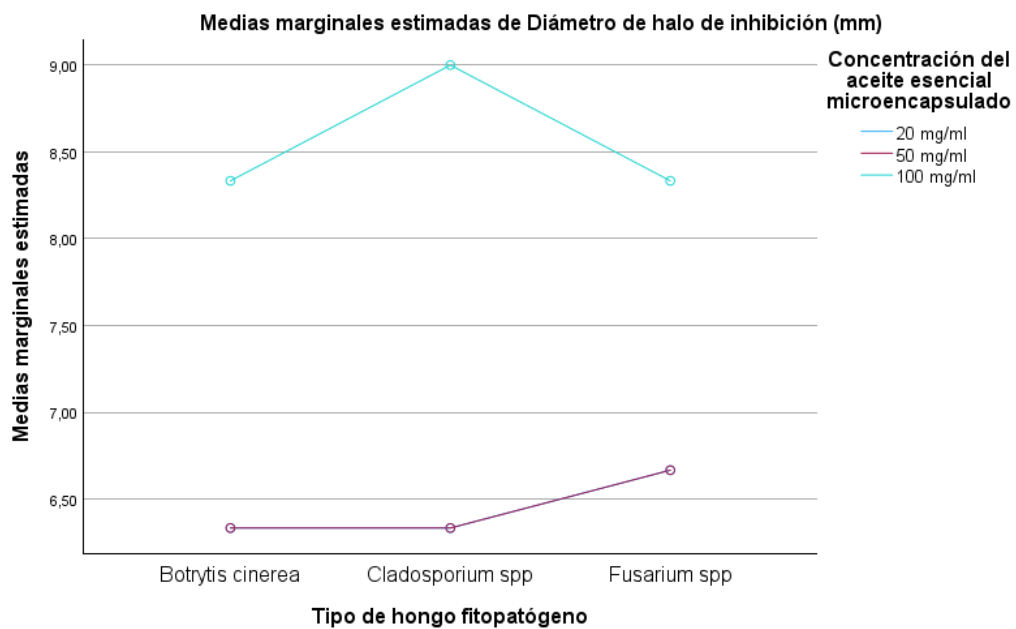


Figura 10. Comparación de medias marginales estimadas de los diámetros de los halos de inhibición para cada hongo fitopatógeno en torno a la concentración del microencapsulado de aceite esencial de molle.

A través de la Figura 10 se puede apreciar que la mejor concentración del aceite esencial microencapsulado en cuanto al tipo de hongo fitopatógeno en torno a las medias marginales de los diámetros de halo de inhibición (mm). A 100 mg/ml de concentración del aceite esencial microencapsulado demuestra que es la mejor concentración que presenta inhibición, sin diferencia significativa en torno a los tipos hongos fitopatógenos. No se observa intersección entre las diferentes concentraciones y el tipo de hongo.

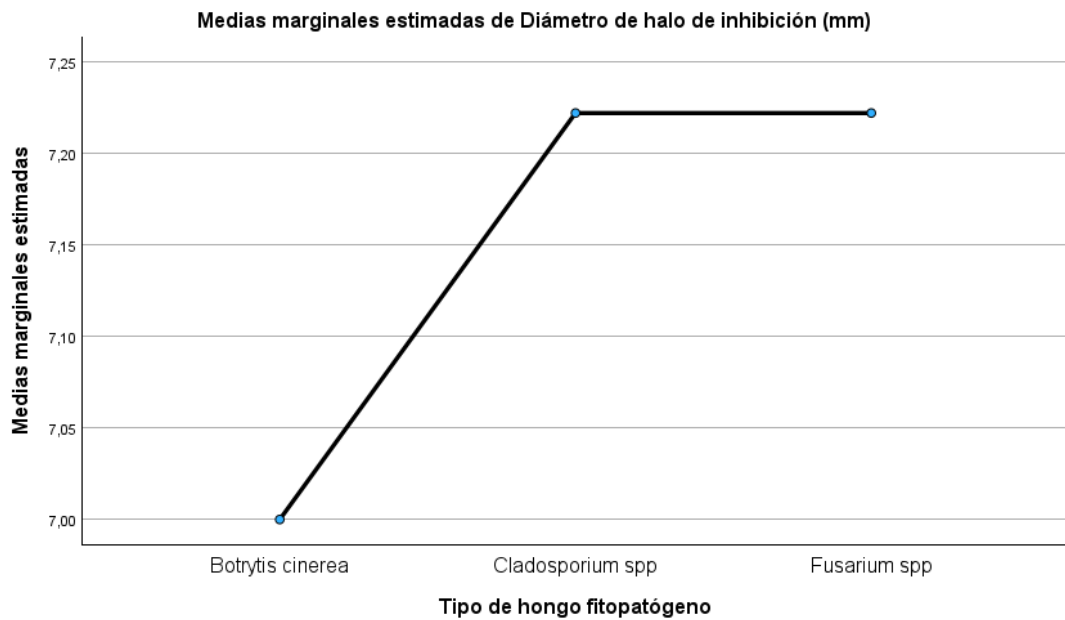


Figura 11. Comparación de medias marginales estimadas de los diámetros de los halos de inhibición en torno a cada hongo fitopatígeno.

A través de la Figura 11 se puede identificar las medias marginales en torno a los diámetros de halo de inhibición para cada tipo de hongo fitopatígeno, mostrando que no existe diferencia significativa según el tipo de hongo fitopatígeno, por lo que no representa un factor importante en la inhibición.

Por otra parte, en la Figura 12 a través del diagrama de cajas simple que muestra la distribución de cuartiles en torno a la concentración del aceite esencial microencapsulado en torno a la distribución del diámetro de halo de inhibición, presentado a continuación.

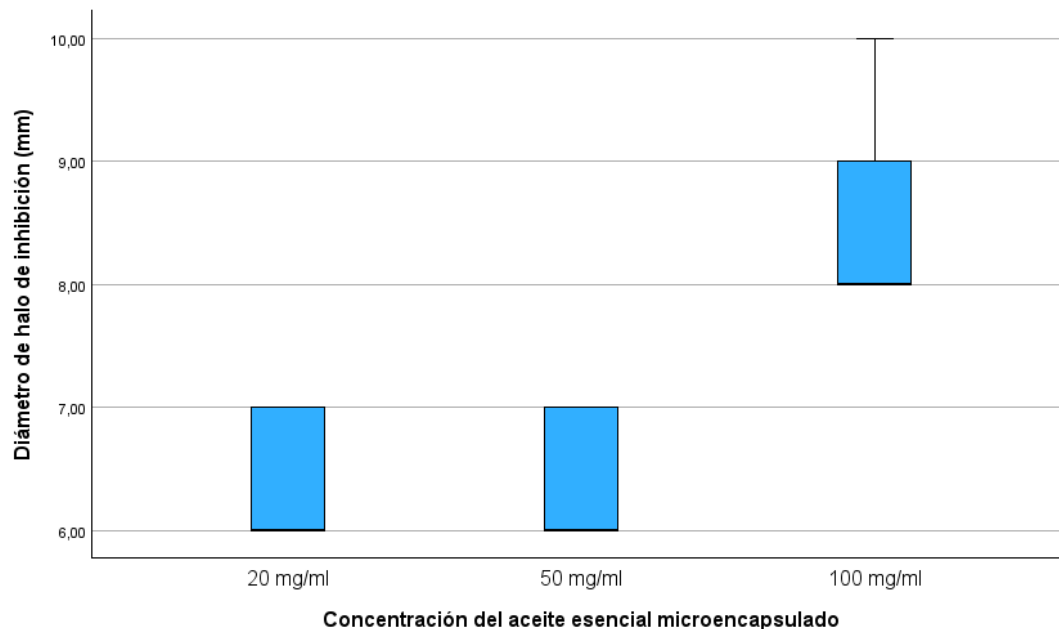


Figura 12. Diagrama de cajas simple representando el diámetro de halo de inhibición y la concentración del aceite esencial microencapsulado sin controles

En la Figura 12 se puede evidenciar por medio del diagrama de cajas que la mejor inhibición se da a 100 mg/ml de concentración del aceite esencial microencapsulado y las concentraciones más bajas se mantienen en un rango de 6 a 7 mm siendo poco representativo. La concentración a 100 mg/ml además tiende a incrementar durante las réplicas realizadas.

En contraste lo que se muestra en la Figura 13 en el diagrama de cajas simple muestra la distribución de cuartiles en torno a la concentración del aceite esencial microencapsulado en torno a la distribución del diámetro de halo de inhibición, pero teniendo en cuenta los controles (positivo y negativo) para evidenciar de mejor manera el efecto frente a un producto comercial como es el control positivo.

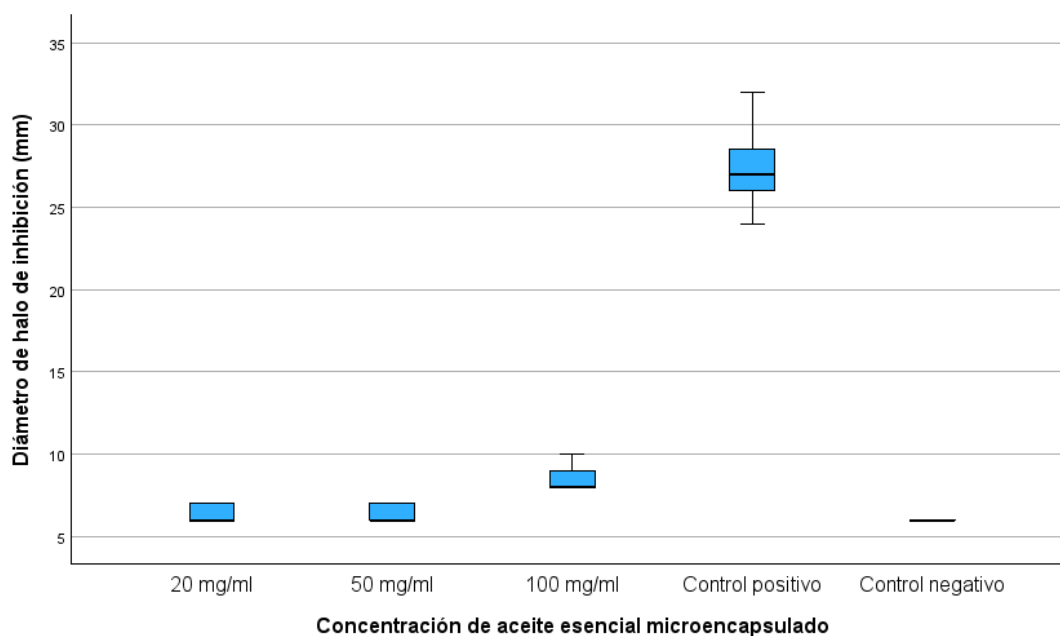


Figura 13. Diagrama de cajas simple representando el diámetro de halo de inhibición y la concentración del aceite esencial microencapsulado con controles

En la Figura 13 se puede apreciar que al tomar en cuenta los controles testigo, que el control positivo muestra una diferencia significativa en torno a todas las concentraciones de aceite esencial microencapsulado, mostrando además que no existe una diferencia significativa entre los tratamientos y el control negativo, demostrando la alta efectividad del fungicida comercial que presenta cuartiles de alto valor.

Debido a que el control positivo utilizado fue mancozeb, que a nivel comercial se lo vende como “Poncho de aguas” a un bajo costo y se trata de un producto de contacto, que en conjunto con otros fungicidas como cymoxanil, el cual es un fungicida sistémico, inhibe el sistema respiratorio de los hongos y la síntesis de ergosterol en la membrana celular (Agrosad, 2020), es por ello que su efectividad como se muestra en la Figura 13 es mucho más alta a las concentraciones de microencapsulado.

Para el caso de la Tabla 13 la prueba de igualdad evaluó la igualdad de varianzas y por lo tanto describe de mejor manera la conclusión de la hipótesis nula en torno a todos los tratamientos mostrados.

Tabla 13. Prueba de igualdad de Levene de varianzas de error a,b

		Estadístico de Levene			
		gl1	gl2	Sig.	
Diámetro de halo de inhibición (mm)	Se basa en la media	0,235	8	18	0,978
	Se basa en la mediana	0,111	8	18	0,998
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	0,111	8	18	0,998
	Se basa en la media recortada	0,224	8	18	0,982

Prueba la hipótesis nula de que la varianza de error de la variable dependiente es igual entre grupos.

a. Variable dependiente: Diámetro de halo de inhibición (mm).

b. Diseño: Intersección + hongo + concentracionMc + hongo * concentracionMc

En cuanto a la prueba de igualdad descrita en la Tabla 13, lo que indica la significancia de 0,978 basada en la media, la cual es mayor a 0,05 que representa al nivel de confianza (95 % de intervalo de confianza), es que se rechaza la hipótesis alternativa y se aprueba la hipótesis nula. Por consecuencia según la prueba de igualdad de Levene, no hay diferencias significativas en los diámetros de halos de inhibición entre los diferentes tipos de hongos fitopatógenos y la concentración del microencapsulado de aceite esencial de *Schinus molle*.

La Tabla 14 se muestra el análisis de varianzas, teniendo en cuenta el modelo, la intersección de datos y cada una de las variables, es decir a todos los efectos del modelo.

Tabla 14. Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Diámetro de halo de inhibición (mm)

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Medi a cuadrática	F	Sig.	Parámetro de no centralidad	Potencia observada^a
Modelo corregido	28,074 ^a	8	3,509	8,61	0,000	68,909	1,000
Intersección	1379,593	1	1379,593	338	0,000	3386,273	1,000

				0,36			
hongo	0,296	2	0,148	4	0,700	0,727	0,099
concentracio			13,37	32,8			
nMc	26,741	2	0	18	0,000	65,636	1,000
hongo *							
concentracio				0,63			
nMc	1,037	4	0,259	6	0,643	2,545	0,171
Error	7,333	18	0,407				
Total	1415,000	27					
Total							
corregido	35,407	26					

a. R al cuadrado = ,793 (R al cuadrado ajustada = ,701)

b. Se ha calculado utilizando alpha = ,05

Por otra parte, la Tabla 14 describe las pruebas de efectos inter-sujetos, en donde a partir de la significancia primero del modelo que al ser de 0,000 y una potencia mayor a 0,793, el modelo es significativo al ser menor a 0,05 (intervalo de confianza), al igual que la interacción y la concentración del microencapsulado de aceite esencial de molle. Por otra parte, en el caso del tipo de hongo fitopatógeno presentó una significancia mayor a 0,05 y potencia menor a 0,793, además del tipo de hongo fitopatógeno con la concentración del microencapsulado de aceite esencial de molle que no presentó significancia.

Finalmente, en la Tabla 15 se realizó una prueba post hoc de comparación múltiple para estimar las diferencias significativas entre las diferentes concentraciones del aceite esencial microencapsulado, realizando una prueba DMS (Diferencia Menos Significativa) la cual es una prueba post hoc utilizados en diseños balanceados y no balanceados, entro grupos donde existe diferente cantidad de datos para cada tratamiento (Pelaez, 2021).

Tabla 15. Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Diámetro de halo de inhibición (mm)

DMS						
(I) Concentración del aceite esencial microencapsulado	(J) Concentración del aceite esencial microencapsulado	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95 %	
					Límite inferior	Límite superior
20 mg/ml	50 mg/ml	,00	,314	1,000	-,66	,66
	100 mg/ml	-2,00*	,314	<,001	-2,66	-1,34
50 mg/ml	20 mg/ml	,00	,314	1,000	-,66	,66
	100 mg/ml	-2,00*	,314	<,001	-2,66	-1,34
100 mg/ml	20 mg/ml	2,00*	,314	<,001	1,34	2,66
	50 mg/ml	2,00*	,314	<,001	1,34	2,66

"Se basa en las medias observadas. El término de error es la media cuadrática (Error) = ,407."

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel ,05.

Mostrando que, en torno a lo obtenido, la comparación muestra que no existe diferencia en el uso de concentraciones de microencapsulado de 20 mg/ml y 50 mg/ml y solo existe diferencia al utilizar la concentración más alta (100 mg/ml).

3.2. Verificación de hipótesis

$H_0 > 0,05$ Se acepta la hipótesis nula, se concluye en que no hay diferencias significativas en los diámetros de halos de inhibición entre los diferentes tipos de hongos fitopatógenos y la concentración del microencapsulado de aceite esencial de *Schinus molle*.

$H_a \neq 0$ Se rechaza la hipótesis alternativa.

CAPÍTULO 4.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Se evaluó la capacidad antifúngica del aceite esencial microencapsulado de *Schinus molle* sobre hongos fitopatógenos de interés agrícola, mediante la medición de los diámetros del halo de inhibición formados alrededor de los discos con los diferentes tratamientos, presentando que el mejor resultado fue utilizando 100 mg/ml de aceite esencial microencapsulado, sin evidente incidencia con el tipo de hongo fitopatógeno.
- Se extrajo aceite esencial de *Schinus molle* por arrastre de vapor como método convencional, obteniendo un rendimiento de 2,8 %, siendo óptimo según la matriz utilizada y el tipo de método.
- Se realizó la microencapsulación de aceite esencial de *Schinus molle* mediante secado por aspersión, obteniendo mediante el análisis de espectroscopía infrarroja por la transformada de Fourier (FTIR) que es útil para la protección y conservación de los principales componentes bioactivos volátiles del aceite esencial, gracias a la cobertura formada por la mezcla de polímeros de maltodextrina y goma arábica.
- Se determinó de forma *in vitro* la capacidad antifúngica del microencapsulado utilizando los siguientes hongos indicadores: *Botrytis cinerea*, *Cladosporium spp* y *Fusarium spp*, a diferentes concentraciones en las cuales se determinó que ha mayor concentración de microencapsulado, existe mayor inhibición, concluyendo que con 100 mg/ml de aceite esencial microencapsulado de *Schinus molle* existe poca sensibilidad frente a los hongos indicadores previamente mencionados y que el control positivo tiene mucha más sensibilidad frente a hongos fitopatógenos.

4.2. Recomendaciones

- Realizar investigaciones del efecto antifúngico frente a otros hongos fitopatógenos, aumentando la concentración de microcápsulas, debido a que, por la carga de este, su efecto es bastante bajo a lo esperado.
- Ampliar la investigación sobre otros métodos de extracción de aceite esencial y comprobar el mejor rendimiento para *Schinus molle*.
- Experimentar con diferentes cubiertas de microcápsulas para *Schinus molle* a diferentes condiciones, para evaluar el mejor rendimiento de microencapsulación.

C. MATERIALES DE REFERENCIA

Referencias Bibliográficas

- AGROCALIDAD. (2013). Instructivo de la normativa general para promover y regular la producción orgánica-ecológica-biológica en el Ecuador. *Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca*, 202. <https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2020/05/by3.pdf>
- Agrosad. (2020). *Poncho de aguas* ®.
- Aguirre, K. (2020). Evaluación de la actividad antifúngica de los aceites esenciales de *Clinopodium tomentosum* (Kunth) Govaerts., *Tagetes minuta* L., y *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb., para el control *in vitro* de *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum*. *Journal of Physics A: Mathematical and Theoretical*, 44(8), 1–12. <http://clik.dva.gov.au/rehabilitation-library/1-introduction-rehabilitation%0Ahttp://www.scirp.org/journal/doi.aspx?DOI=10.4236/as.2017.81005%0Ahttp://www.scirp.org/journal/PaperDownload.aspx?DOI=10.4236/as.2012.34066%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.201>
- Arias, J., Gonzalo, S. A., Figueroa, I., Fischer, S., Robles-Bermúdez, A., Concepción Rodríguez-Maciel, J., & Lagunes-Tejeda, A. (2016). Actividad insecticida, repelente y antialimentaria del polvo y aceite esencial de frutos de *Schinus molle* L. Para el control de *Sitophilus zeamais* (Motschulsky). *Chilean J. Agric. Anim. Sci., Ex Agro-Ciencia*, 33(2), 93–104.
- Bakry, A. M., Abbas, S., Ali, B., Majeed, H., Abouelwafa, M. Y., Mousa, A., & Liang, L. (2016). Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 143–182. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12179>
- Bensch, K., Braun, U., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2012). The genus *Cladosporium*. *Studies in Mycology*, 72, 1–401. <https://doi.org/10.3114/sim0003>
- Bernhard, R. A., Shibamoto, T., Yamaguchi, K., & White, E. (1983). The Volatile Constituents of *Schinus molle* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31(2), 463–466. <https://doi.org/10.1021/jf00116a075>
- Bi, K., Liang, Y., Mengiste, T., & Sharon, A. (2023). Killing softly: a roadmap of *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Trends in Plant Science*, 28(2), 211–222. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2022.08.024>
- Bringas, M., Expósito, I., Reineccius, G. A., López, O., & Pino, J. A. (2011). Influence of spray-dryer air temperatures on encapsulated mandarin oil. *Drying Technology*, 29(5), 520–526. <https://doi.org/10.1080/07373937.2010.513780>
- Bustamante, E. (1999). *Control biológico de patógenos de plantas*. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/1772>
- Cárdenas, K., Domínguez, J., Palacios, E., García, L., Ramírez, P., & Flores, M.

- (2021). Synthesis and Characterization of ZnO Nanoparticles Obtained from the Extract of *Schinus Molle*. In *Characterization of Minerals, Metals, and Materials 2021* (pp. 569–575). https://doi.org/10.1007/978-3-030-65493-1_58
- Casado, I. (2018). Optimización de la extracción de Aceites Esenciales por destilación en Corriente de Vapor. *Universidad Politécnica de Madrid*, 1, 84. <https://bit.ly/3ObkF1a>
- Castillo, J., & Ibarra, M. (2018). Inhibitory effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* on the strain of *Porphyromonas gingivalis*: *In vitro* study. *Odontologia*, 20(2), 5–13. <https://doi.org/10.29166/odontologia.vol20.n2.2018-5-13>
- Cerutti, M., & Neumayer, F. (2004). Introducción a la obtención de Aceite Esencial de Limón. *Invenio*, 149–155.
- CONABIO, & CONAFOR. (2015). *Schinus molle* L. 1, 1–6. <http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/13/1000Schinusmolle.pdf>
- Coronel, C., & San Martín, F. (2015). Encapsulation of spray dried β -carotene emulsion by fluidized bed coating technology. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.12.036>
- Cuasés, M. (2018). "Actividad antifúngica del extracto acuoso de la planta hierba mora (*Solanum nigrum*) sobre cepas de *Cándida albicans* Atcc®10231TM" Estudio *in vitro* Proyecto. *Journal of Business Ethics*, 14(3), 37–45. <https://www-jstor-org.libproxy.boisestate.edu/stable/25176555?Search=yes&resultItemClick=true&searchText=%28Choosing&searchText=the&searchText=best&searchText=research&searchText=design&searchText=for&searchText=each&searchText=question.%29&searchText=AND>
- De la Rosa, M. (2016). Evaluación del efecto de aceite esencial de Pirul (*Schinus molle*): sobre el desarrollo in vitro de hongos de importancia agrícola. Universidad de Sonora.
- Dellacassa, E. (2010). Normalización de productos naturales obtenidos de especies de la flora aromática latinoamericana: proyecto CYTED IV. 20. In *Vasa* (Issue May 2010). <http://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.pdf%5Cnhttp://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=KkoCitWOKwkC&oi=fnd&pg=PA7&dq=Normalización+de+Productos+Naturales+Obtenidos+de+Especies+de+la+Flora+Aromática+Latinoamericana&ots=KVDOGLYtAd&sig=IBZd>
- Dikshit, A., Nanqvi, A. A., & Husain, A. (1986). *Schinus molle*: A new source of natural fungitoxicant. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(5), 1085–1088. <https://doi.org/10.1128/aem.51.5.1085-1088.1986>
- Duarte, Y., Echevarría, A., & Martínez, B. (2016). Identificación y caracterización de aislamientos de *Fusarium spp.* presentes en garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en Cuba. *Revista de Protección Vegetal*, 31(3), 173–183.

- Elshafie, H. S., Ghanney, N., Mang, S. M., Ferchichi, A., & Camele, I. (2016). An in Vitro Attempt for Controlling Severe Phytopathogens and Human Pathogens Using Essential Oils from Mediterranean Plants of Genus *Schinus*. *Journal of Medicinal Food*, 19(3), 266–273. <https://doi.org/10.1089/jmf.2015.0093>
- Escobar, J. C. (2019). Industrialización de la semilla del molle (*Schinus molle*) para la elaboración de pimienta blanca y rosada. *Sistema Biodigestor*.
- Faggiani, E., Lombardo, P., Umpiérrez, N., Minteguiaga, M., Alves, P., Blanco, O., Guimaraens, A., Rodriguez, F., Pardo, H., & Dellacasa, E. (2015). FUNGICIDAS BOTÁNICOS . Aceites esenciales de plantas nativas que controlan enfermedades de poscosecha de los cítricos. *Revista INIA, No. 40*, 52–56.
- Garg, S., & Arora, M. (2011). Patented microencapsulation techniques and its application. *Journal of Pharmacy Research* 2011, 4(7), 2097–2102.
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation. *Trends in Food Science & Technology*, 15(7–8), 330–347. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.10.005>
- Grasso, V. (2013). Estudios para la extracción de aceites vegetales con pretratamiento enzimático en un extractor columna. 2013, *GRASAS Y ACEITES*, 194.
- Guayasamin, M. (2016). Evaluación antimicótica de extracto de mosquera (*Croton elegans*) frente a: *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, *Microsporum canis* ATCC 36299, *Candida albicans* ATCC 10231, patógenos de dermatomicosis [Universidad Técnica de Ambato]. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/13225/1/UPS-QT10561.pdf>
- INEC. (2023). *Información Productiva Territorial/Cifras Agroproductivas*. <http://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/cifras-agroproductivas>
- Infante, D., Martínez, B., & González, N. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*, 24(1), 14–21.
- Instituto Nacional de Estadística y Censos. (2016). Información ambiental en la agricultura 2016. *Instituto Nacional de Estadísticas y Censos*, 1–34. http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Encuestas_Ambientales/Informacion_ambiental_en_la_agricultura/2016/PRESENTACION_AGRO_AMBIENTE_2016.pdf
- Jun-xia, X., Hai-yan, Y., & Jian, Y. (2011). Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. *Food Chemistry*, 125(4), 1267–1272. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.063>
- Kang, Y. R., Lee, Y. K., Kim, Y. J., & Chang, Y. H. (2019). Characterization and storage stability of chlorophylls microencapsulated in different combination of gum Arabic and maltodextrin. *Food Chemistry*, 272(August 2018), 337–346. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.063>
- Kramer, F. L. (1957). The pepper tree, *Schinus molle* L. *Economic Botany*, 11(4),

322–326. <https://doi.org/10.1007/BF02903811>



- Lastres, L. (2009). Patógenos que atacan los cultivos. *Sanidad Vegetal*, 30–53. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/1f1bdfd5-c1f6-46b9-90ff-d0bd118286ca/content>
- Llanos, S. (2012). Extracción y caracterización del aceite de molle (*Schinus molle* L.). <https://n9.cl/17jft>
- López, A., Castro, S., Andina, M. J., Ures, X., Munguía, B., Llabot, J. M., Elder, H., Dellacassa, E., Palma, S., & Domínguez, L. (2014). Insecticidal activity of microencapsulated *Schinus molle* essential oil. *Industrial Crops and Products*, 53, 209–216. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.038>
- Lopez, R., & Caso, N. (2015). Rendimiento y Composición Química de Aceites Esenciales de *Eucalyptus archeri* y *Schinus molle* - Valle del Mantaro. *Tecnología de Fuentes Biológicas*, 22(1), 60–68. [http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/UNCP/3508/Lopez De La Cruz - Caso Orihuela.pdf?sequence=1](http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/UNCP/3508/Lopez%20De%20La%20Cruz%20-%20Caso%20Orihuela.pdf?sequence=1)
- Magdama, F., Monserrate-Maggi, L., Serrano, L., García Onofre, J., & Jiménez-Gasco, M. del M. (2020). Genetic Diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, the *Fusarium* Wilt Pathogen of Banana, in Ecuador. *Plants*, 9(9), 1133. <https://doi.org/10.3390/plants9091133>
- Martínez, A. (2001). Aceites Esenciales. *División de Publicaciones UIS*, 34. <https://bit.ly/3y1JZRg>
- Masaquiza, M. (2018). Evaluación de la actividad antimicrobiana y antioxidante de antocianinas microencapsuladas de maíz morado (*Zea mays* L.), papa morada (*Solanum tuberosum* L.) y mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth).
- Mendoza, A. (2011). Actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de hojas, tallos y frutos de *Schinus molle* L. “molle.” UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA.
- Miclea, R. V., Suciú, L. A., & Puia, C. E. (2012). *In vitro* studies regarding the morphology of *Botrytis Cinerea* pers . Isolated from Geranium Plants. *ProEnvironment*, 5, 60–66.
- Morales, T., & Sánchez, H. (2022). Mecanismos Inmunológicos en las Plantas. *Volumen 73, Número 4*, 73–79.
- Moutassem, D., Belabid, L., Bellik, Y., Ziouche, S., & Baali, F. (2019). Efficacy of essential oils of various aromatic plants in the biocontrol of *Fusarium* wilt and inducing systemic resistance in chickpea seedlings. *Plant Protection Science*, 55(3), 202–217. <https://doi.org/10.17221/134/2018-PPS>
- Ochoa, Y., & Flores, J. (2012). Evaluación in vitro de la actividad antifúngica de cuatro extractos vegetales metanólicos para el control de tres especies de *Fusarium* spp. 9457(01), 69–73.
- Paladino, S. (2008). Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (*Vitis vinifera* L.). *Facultad de Ciencias Agrarias, Sede Mendoza*, 100. http://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/2627/tesispaladino.pdf

- Pérez, I., & Sánchez, K. C. (2019). Aspectos fisiológicos del género *Cladosporium* desde la perspectiva de sus atributos patogénicos, fitopatogénicos y biodeteriorantes. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*, 7(July), 1–10. <http://www.rccb.uh.cu>
- Pinares, R., Machaca, V., Lozano, F., Quispe, A., Ccopa, R., & Calsin, B. (2023). Comparaciones de la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), parámetros colorimétricos y porcentaje de medulación en fibra de viciña. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 34(4), e25953. <https://doi.org/10.15381/rivep.v34i4.25953>
- Quert, R., Martínez, M., Córdova, B., Leyva, H., & Ayón, G. (2001). Rendimiento de aceite esencial en *Pinus caribaea morelet* según el secado al sol y a la sombra. III. *Rev Cubana Farm*, 35(1), 47–50.
- Ramirez, L., & Marin, D. (2009). Metodologías Para Evaluar *in Vitro* La Actividad Antibacteriana De Compuestos De Origen Vegetal. *Scientia Et Technica*, 15(42), 263–268. <https://www.redalyc.org/pdf/849/84916714049.pdf#:~:text=Los métodos para evaluar la actividad antibacteriana están,o impedancia del medio de cultivo %5B11 %5D>.
- Reyes, M. (2021). Microencapsulación de aceites mediante secado por aspersión: avances, beneficios y aplicaciones en América Latina [Universidad Técnica de Ambato]. https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/33667/1/BQ_287.pdf
- Rodriguez, M., Alcaraz, L., & Real, S. (2019). Procedimientos para la extracción de aceite en plantas aromáticas. *Centro de Investigaciones Biológicas Del Noroeste, S.C*, 12–17. https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/540/1/rodriguez_m.pdf
- Romero, E., & Bistoni, I. (2011). Destilador De Aceite Esencial De Comino Con Energía Solar Térmica. *Ensayos Preliminares*. 15, 41–45.
- Santos, A., Rossato, M., Serafini, L., Bueno, M., Crippa, L., Sartori, V., Dellacassa, E., & Moyna, P. (2010). Efeito fungicida dos óleos essenciais de *Schinus molle* L. e *Schinus terebinthifolius* Raddi, *Anacardiaceae*, do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(2), 154–159. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000200003>
- Santos, G. (2008). Estudio De La Composición Química De Los Aceites Esenciales De Seis Especies Vegetales Cultivadas.
- Sierra, M., Barros, R., Gómez, D., Mejía, A., Suarez, D., Postgraduados, C. De, & Tenango, M. P. (2018). Productos naturales: metabolitos secundarios y aceites esenciales. In *Uniagraria* (Issue November).
- Silva, P. T. da, Fries, L. L. M., Menezes, C. R. de, Holkem, A. T., Schwan, C. L., Wigmann, É. F., Bastos, J. de O., & Silva, C. de B. da. (2014). Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. *Ciência Rural*, 44(7), 1304–1311. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20130971>
- Song, H., Yu, W., Gao, M., Liu, X., & Ma, X. (2013). Microencapsulated

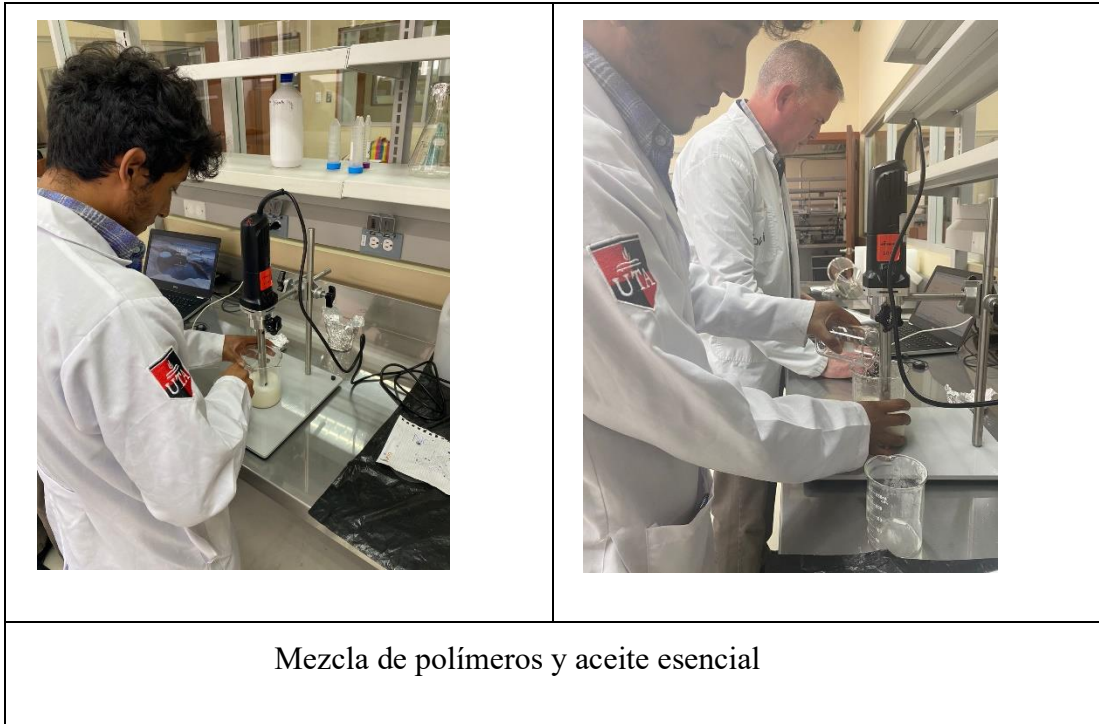
- probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process. *Carbohydrate Polymers*, 96(1), 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.068>
- Toro, B., Mait, A., & Solano, Á. (2020). Obtención de aceite esencial de molle (*Schinus molle L.*) y su evaluación antifúngica sobre *Colletotrichum spp.* in vitro".
- Tudzynski, B., & Schulze, C. (2007). Signalling in *Botrytis cinerea*. In *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (pp. 85–97).
- Vázquez, S. M., Bonillo, P. G., & Fernández, J. L. G. (2018). El ácido maslínico como enraizante en cultivos herbáceos: Influencia en parámetros físicos de la planta. *XL Jornadas de VITICULTURA Y ENOLOGÍA de La Tierra de Barros*, 14.
- Werdin, J., Murray, A., & Ferrero, A. (2008). Bioactividad de aceites esenciales de *Schinus molle* var. areira (*Anacardiaceae*) en ninfas II de *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). *Boletín de San Juan Sobre Vegetación y Plagas*, 34, 367–375.
- Zahari, R., Halimoon, N., Sajap, A. S., Ahmad, M. F., & Mohamed, M. R. (2014). Bioantifungal activity of selected medicinal plant extracts against root rot of fungal disease. *Journal of Plant Sciences*, 2(1), 31–36. <https://doi.org/10.11648/j.jps.20140201.16>

Anexos

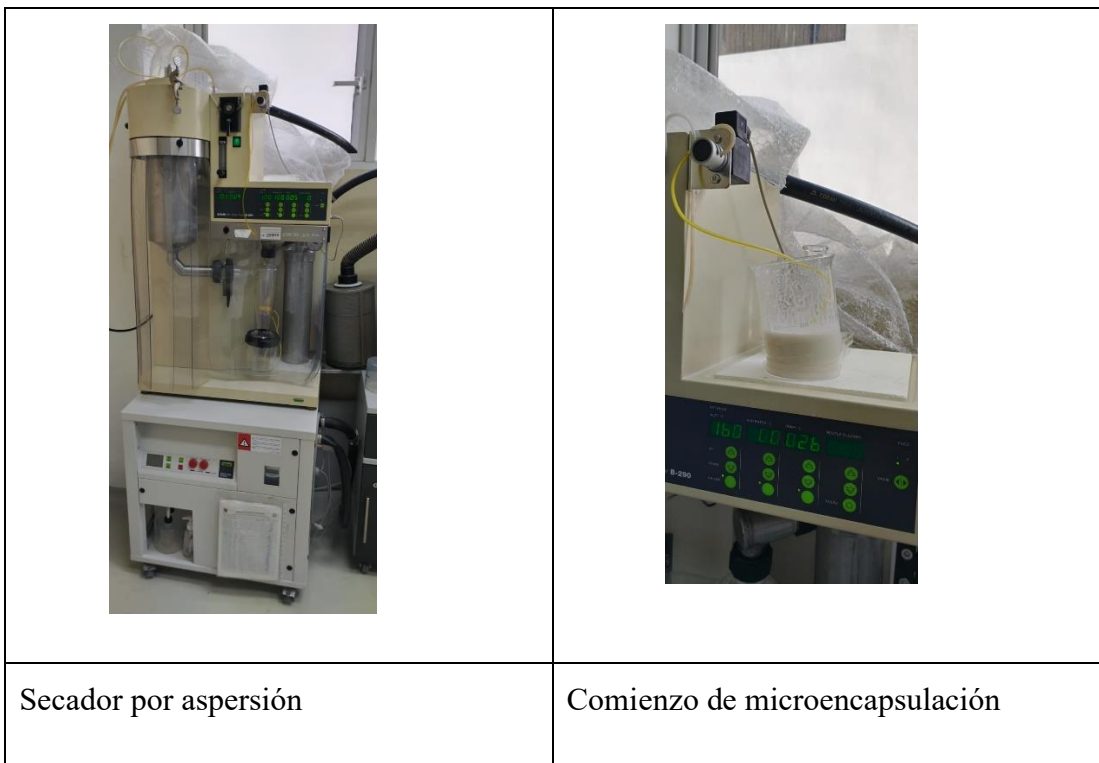
Anexo 1. Extracción de aceite esencial de *Schinus molle*

	
<p>Acondicionamiento del material vegetal</p>	<p>Extracción de aceite esencial por arrastre de vapor</p>



Anexo 2. Preparación de emulsión para microencapsulación




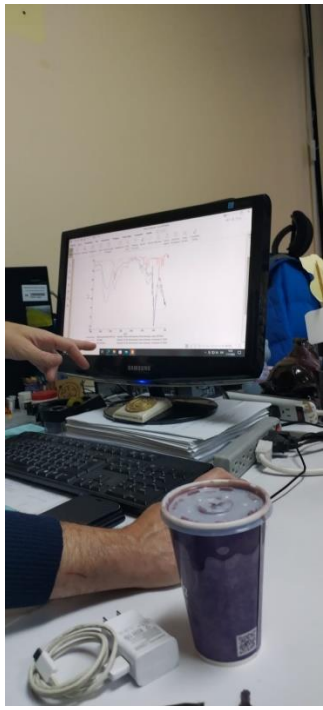
Anexo 3. Proceso de microencapsulación



Anexo 4. Recolección de microcápsulas




	
<p>Resultado final de la microencapsulación</p>	<p>Recolección de microcápsulas.</p>

Anexo 5. Análisis infrarrojo FTIR

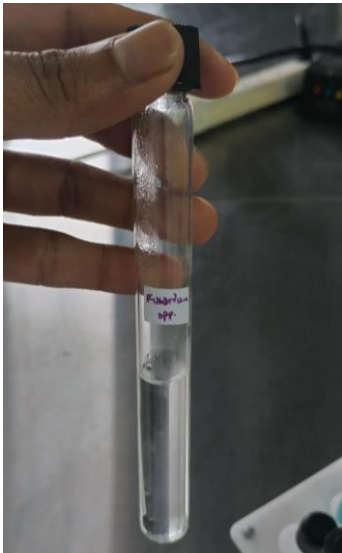
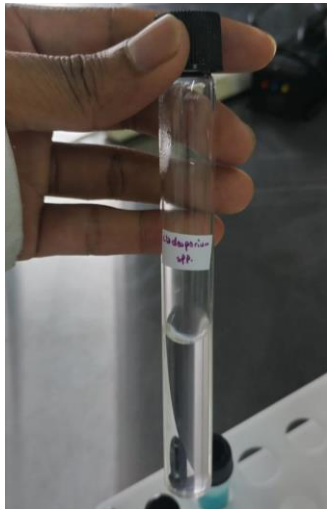

	
---	--

Espectroscopio infrarrojo por la transformada de Fourier	Análisis de datos infrarrojos
--	-------------------------------

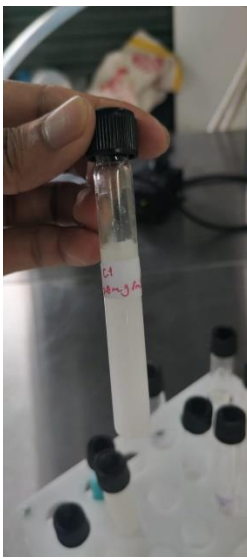

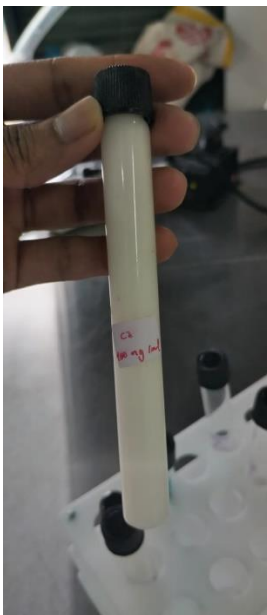

Anexo 6. Muestras de hongos fitopatógenos

		
<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Fusarium spp</i>	<i>Cladosporium spp</i>

Anexo 7. Preparación de inóculos

		
Dilución de <i>Botrytis cinerea</i> .	Dilución de <i>Fusarium spp.</i>	Dilución de <i>Cladosporium spp.</i>

Anexo 8. Preparación de tratamientos

			
C1:20 mg/ml	C2: 50 mg/ml	C3: 100 mg/ml	C+: 5 mg/ml