# UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

# FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

# CARRERA DE AGRONOMÍA

**"Determinación de la actividad antifúngica *in vitro* de aceites esenciales de *Eucaliptus* sp microencapsulados sobre *Cladosporium fulvum*"**

DOCUMENTO FINAL DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE INGENIERO AGRÓNOMO


**AUTOR:**

Zambrano Jordán Jairo Dionicio

**TUTOR DE TESIS:**

Ing. PhD. Leiva Mora Michel


Cevallos-Ecuador

2026

# APROBACIÓN DEL TUTOR

En mi calidad de Tutor del Trabajo sobre el tema:

**"Determinación de la actividad antifúngica *in vitro* de aceites esenciales de *Eucaliptus* sp microencapsulados sobre *Cladosporium fulvum*"**

del alumno Jairo Dionicio Zambrano Jordán estudiante de la carrera de Agronomía considero que dicho Trabajo de Titulación ha sido revisado en su totalidad, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento para la Titulación de Grado en la Universidad Técnica de Ambato.

Por lo tanto, autorizo la presentación del mismo ante el organismo pertinente para ser sometido a la evaluación de los profesores calificadores designado por el H. Consejo Directivo de la Facultad.

Cevallos 11 de diciembre del 2025



Ing. Leiva Mora Michel, PhD.

**TUTOR**

# AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

El suscrito, Jairo Dionicio Zambrano Jordán, portador de cédula de ciudadanía número: 1804092300, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado: "Determinación de la actividad antifúngica *in vitro* de aceites esenciales de *Eucalyptus* sp microencapsulados sobre *Cladosporium fulvum*; En el laboratorio de Biotecnología vegetal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato" es original, auténtico y personal. En tal virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas.

Cevallos 11 de diciembre del 2025



_____

Zambrano Jordán Jairo Dionicio

**AUTOR**

# DERECHOS DE AUTOR

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado "Determinación de la actividad antifúngica *in vitro* de aceites esenciales de *Eucaliptus* sp microencapsulados sobre *Cladosporium fulvum*; En el laboratorio de Biotecnología vegetal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato" como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Ingeniero Agrónomo, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o de parte de él.



Zambrano Jordán Jairo Dionicio

**AUTOR**

## TIBUNAL DE GRADO

Los miembros del Tribunal de Grado del Trabajo de Titulación, **"Determinación de la actividad antifúngica *in vitro* de aceites esenciales de *Eucaliptus* sp microencapsulados sobre *Cladosporium fulvum*"**, de **Jairo Dionicio Zambrano Jordán**, estudiante de la carrera de Agronomía, de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de conformidad con el Reglamento para la Titulación de Grado para obtener el título terminal de Tercer Nivel de la Universidad Técnica de Ambato, una vez revisado y calificado.

Cevallos enero 2026

REVISADO POR

Dr. Michel Leiva Mora. PhD.

**TUTOR**

**TUTOR APROBADO POR LOS MIEMBROS DE CALIFICACION**

Para constancia firman:

Ing. Pomboza Tamaquiza Pedro Pablo. PhD.

**PRESIDENTE**

Ing. Curay Quispe Segundo Euclides, PhD

**MIEMBRO TRIBUNAL DE GRADO**

Lic. Mera Andrade Rafael Isaías, PhD.

**MIEMBRO TRIBUNAL DE GRADO**

# DEDICATORIA

Al terminar el trabajo de investigación, se lo dedico primeramente a Dios por permitirme mediante la Ciencias conocerlo un poco más. También a mi madre Belén Jordán por ser un constante apoyo durante la carrera de agronomía y gracias a sus esfuerzos y apoyo me han permitido alcanzar este logro. Dedico este trabajo a mi hermana y mi sobrina por brindarme ayuda y apoyo que me han permitido salir adelante lo cual agradezco infinitamente.

***Jairo Dionicio Zambrano Jordán***

# AGRADECIMIENTO

Expreso mi más profundo agradecimiento hacia mí madre, hermana y sobrina ellos son pilares del apoyo que estuvieron presentes en todo momento y me permitieron mi formación personal y académica.

Agradezco a la Universidad Técnica de Ambato y a la facultad de Ciencias Agropecuarias por haberme recibido y permitido formar parte de la institución, agradezco a la docencia por haberme instruido, adquirir conocimiento y formarme de manera profesional y humanitaria. Agradecimiento y respeto a mi tutor de tesis Dr. Michel Leiva por el apoyo dado durante la tesis también se agradece por compartir conocimiento lo cual ayudo como una excelente guía que permitió concluir esta tesis.

***Jairo Dionicio Zambrano Jordán***

## ÍNDICE GENERAL

**PORTADA** ..... **i**
**APROBACIÓN DEL TUTOR** ..... **ii**
**AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN** ..... **iii**
**DERECHOS DE AUTOR** ..... **iv**
**TIBUNAL DE GRADO** ..... **v**
**DEDICATORIA** ..... **vi**
**AGRADECIMIENTO** ..... **vii**
**ÍNDICE DE TABLAS** ..... **xi**
**ÍNDICE DE FIGURAS** ..... **xii**
**RESUMEN EJECUTIVO** ..... **xiii**
**ABSTRACT** ..... **xiv**

**INTRODUCCIÓN** ..... **1**

**CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO** ..... **3**

1.1 Antecedentes investigativos ..... 3

1.2 Categorías fundamentales ..... 6

1.2.1 Cladosporium fulvum Cooke ..... 6

1.2.2 Aceites esenciales ..... 7

1.2.3 Eucaliptus globulus ..... 7

1.2.4 Aceite esencial de Eucalyptus sp ..... 8

1.2.5 Microencapsulación de los aceites esenciales mediante secado por aspersión 10

1.2.6 Espectrometría infrarroja (FT-IR) ..... 11

1.2.7 Evaluación del efecto antifúngico de diferentes concentraciones ..... 11

1.3 Objetivos ..... 14

1.3.1 Objetivo general ..... 14

1.3.2 Objetivos específicos ..... 14

**CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA** ..... **15**

2.1 Ubicación del estudio ..... 15

2.2 Equipos y materiales ..... 16

2.2.1 Equipos ..... 16

2.2.2 Material de laboratorio ..... 16

2.2.3 Reactivos ..... 17

2.3 Tipo de investigación ..... 17

2.4 Hipótesis ..... 17

2.5 Variables de respuesta ..... 17

2.6 Diseño experimental ..... 18

2.6.1 Factores de estudio ..... 18

2.6.2 Factor 1: ..... 18

2.6.3 Tratamientos ..... 18

2.7 Manejo del experimento ..... 19

2.8 Recolección de la información ..... 23

2.9 Procesamiento de la información y análisis estadístico ..... 23

**CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN ..... 24**

3.1 Comprobación de la hipótesis ..... 35

**CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES ..... 36**

4.1 Conclusiones ..... 36

4.2 Recomendaciones ..... 36

# ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1** *Taxonomía (C. fulvum)*..... 6

**Tabla 2** *Composición química de Eucalyptus globolus, y sus porcentajes aproximados* ..... 8

**Tabla 3** *Posibles mecanismos antifúngicos de los componentes de los aceites esenciales de Eucalyptus frente a hongos*..... 10

**Tabla 4** *Tratamientos y controles de los aceites esenciales de Eucalyptus sp con diferentes concentraciones mg. L-1* ..... 18

**Tabla 5** *Preparación de cada tratamiento antes de ser colocado en los pocillos*..... 22

**Tabla 6** T*ratamientos para el aceite sin microencapsular*..... 23

**Tabla 7** *Influencia de diferentes concentraciones de aceite esencial de eucalipto microencapsulado sobre el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de C. fulvum mediante el método de dilución en agar a los 7 días*..... 24

**Tabla 8** *Influencia de diferentes concentraciones de aceite esencial de eucalipto microencapsulado sobre el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de C. fulvum mediante el método de dilución en agar a los 14 días*..... 25

**Tabla 9** *Influencia de diferentes concentraciones de aceite esencial de eucalipto microencapsulado sobre la actividad antifúngica relacionada con la absorbancia (600nm) medida en lector de multiplaca (Bio Tek EPOCH) con el método de microdilución dilución a las 24 horas* ..... 32

# ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** *Diferentes componentes de los aceites esenciales de Eucaliptus globolus*. 9

**Figura 2.** *Placas multipocillos con diferentes tratamientos y controles* ..... 13

**Figura 3.** *Ubicación del Ensayo* ..... 15

**Figura 4.** *Tratamientos y controles de los A.E.M contra C. fulvum a los 7 días*..... 27

**Figura 5**. *Tratamientos y controles de los A.E.M contra C. fulvum a los 14 días*..... 29

**Figura 6**. *Placas multipocillos con los diferentes tratamientos y controles*..... *33*

# RESUMEN EJECUTIVO

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la actividad antifúngica *in vitro* de aceites esenciales de *Eucalyptus* sp. microencapsulados frente a *Cladosporium fulvum*, agente causal de la mancha foliar del tomate riñón cultivado en condiciones de invernadero. El aceite esencial fue extraído a partir de hojas de *Eucalyptus globulus* mediante la técnica de destilación por arrastre de vapor. Posteriormente, el aceite fue microencapsulado utilizando el método de secado por aspersión, empleando maltodextrina y goma arábiga como polímeros microencapsulantes, con el propósito de mejorar su estabilidad fisicoquímica y facilitar su manejo. La actividad antifúngica se evaluó a través de ensayos de inhibición del crecimiento micelial y mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) utilizando el método de microdilución. Los resultados obtenidos demostraron que a partir de una concentración del 6 % del aceite esencial microencapsulado se logró el 100 % de inhibición del crecimiento micelial de *C. fulvum*, mientras que la CMI fue del 5 %. Estos valores evidencian una alta eficacia antifúngica del aceite esencial incluso a bajas concentraciones. Asimismo, los resultados confirman que el proceso de microencapsulación contribuye a preservar la actividad biológica del aceite esencial, reduciendo su volatilidad y favoreciendo una liberación controlada de los compuestos activos. Los resultados destacan el potencial de los aceites esenciales de *Eucalyptus* sp. microencapsulados como una alternativa natural, eficaz y sostenible a los fungicidas sintéticos convencionales para el manejo de *C. fulvum* en sistemas de producción de tomate bajo invernadero, aportando una base sólida para futuras evaluaciones a escala de campo y estudios de viabilidad económica.

**PALABRAS CLAVE:** ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA, ACEITE ESENCIAL, MICROENCAPSULACIÓN, EUCALIPTO

# ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the *in vitro* antifungal activity of microencapsulated essential oils from *Eucalyptus* sp. against *Cladosporium fulvum*, the causal agent of leaf mold in greenhouse-grown tomato. The essential oil was extracted from *Eucalyptus globulus* leaves using steam distillation. Subsequently, the oil was microencapsulated by the spray-drying method, employing maltodextrin and gum arabic as encapsulating polymers in order to improve its physicochemical stability and handling properties. Antifungal activity was assessed through mycelial growth inhibition assays and by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) using the microdilution method. The results demonstrated that a concentration of 6% microencapsulated essential oil achieved 100% inhibition of *C. fulvum* mycelial growth, while the MIC was 5%. These values indicate high antifungal efficacy of the essential oil even at low concentrations. Furthermore, the results confirm that the microencapsulation process helps preserve the biological activity of the essential oil by reducing its volatility and promoting the controlled release of active compounds. Overall, the findings highlight the potential of microencapsulated *Eucalyptus* sp. essential oils as a natural, effective, and sustainable alternative to conventional synthetic fungicides for the management of *C. fulvum* in greenhouse tomato production systems, providing a solid basis for future field-scale evaluations and economic feasibility studies.



**KEYWORDS:** ANTIFUNGAL ACTIVITY, ESSENTIAL OIL, MICROENCAPSULATION, EUCALYPTUS

# INTRODUCCIÓN

En la región interandina del Ecuador la producción de tomate riñón *(Solanum lycopersicum)* en invernadero es elevada gracias a las características ambientales favorables de la zona. Además, este sistema permite cultivar tomate durante todo el año; sin embargo, el cultivo se ve afectado por diversas enfermedades ocasionadas por diferentes patógenos, cuyo desarrollo se ve favorecido por temperaturas superiores a 30 °C y humedades relativas mayores al 80 %, lo que reduce significantemente la productividad de este cultivo (Colimba *et al*., 2022).

*Cladosporium. fulvum* es considerado uno de los hongos patógenos que causa pérdidas financieras significativas para los productores agrícolas de tomate riñón en invernadero por sus diferentes alteraciones fitopatológicas, que se pueden observar claramente en sus hojas, ocasionando su caída temprana hasta llegar a la muerte de las plantas de tomate. La rápida propagación de este patógeno se ve favorecida por condiciones de alta humedad y temperaturas elevadas, lo que incrementa la severidad de la enfermedad y dificulta su manejo (Aghayev, 2022).

*C. fulvum* inicia la infección cuando sus conidios se adhieren a la parte inferior de la hoja y germinan e ingresan por los estomas. Aproximadamente una semana después, comienzan a observarse los primeros indicios de la enfermedad, que se reflejan en pequeñas manchas de color pardo sobre las hojas A medida que el patógeno se desarrolla, produce muchas esporas que terminan bloqueando las aperturas estomáticas, provocando daño en los tejidos y finalmente la muerte celular de las hojas afectadas (Belabess *et al*., 2024).

Para el control de los hongos patógenos se utilizan diversos pesticidas, como los carbamatos, organoclorados y organofosforados. Sin embargo, estos compuestos químicos han sido catalogados como contaminantes persistentes que ocasionan degradación ambiental. Además, los agentes patógenos pueden desarrollar resistencia a dichos productos químicos. Debido a ello se han investigado los aceites esenciales de eucalipto, los cuales poseen efectos nocivos contra diferentes patógenos. No obstante, su aplicación en la agricultura continúa siendo limitada (Tomazoni *et al*., 2017).

Los efectos adversos derivados del uso inadecuado de agroquímicos en la agricultura han generado preocupación por el deterioro del ecosistema. Este escenario ha promovido la búsqueda de alternativas de control fitosanitario más sostenibles. Estudios recientes señalan que los aceites esenciales, gracias a sus compuestos bioactivos, poseen un notable potencial para el control y la prevención de plagas. Asimismo, su uso en los sistemas productivos reduce la dependencia de plaguicidas sintéticos y favorece prácticas agrícolas más seguras para el ambiente (Ayllón *et al*., 2024).

El aceite esencial de eucalipto está compuesto principalmente por 1,8-cineol (eucaliptol), alfa-pineno, limoneno, alfa-terpineol y 2-beta-pineno. Una característica importante de los aceites esenciales de *Eucalyptus* spp. es su hidrofobicidad, lo que permite al aceite adherirse a la membrana celular, afectándola en el interior de la célula causando alteraciones en el metabolismo de los patógenos. Esta capacidad de afectar a la membrana celular provoca cambios en la permeabilidad y puede inducir la pérdida de iones esenciales y desorganización de organelos, lo que finalmente compromete la viabilidad del microorganismo (Merghni *et al*., 2023).

Existen estudios sobre la destilación, la composición química, el modo de acción y la eficacia biológica de los aceites esenciales de *Eucalyptus* spp., los cuales confirman que poseen propiedades medicinales y plaguicidas. Los compuestos antifúngicos del aceite esencial degradan la pared y la membrana de la célula del hongo patógeno, disminuyendo la actividad de las enzimas el contenido de o-lipopolisacárido y ácidos grasos insaturados, lo que provoca daños en la membrana celular e inhibe el crecimiento del patógeno Esta acción de los aceites esenciales de eucalipto sobre los componentes estructurales y metabólicos del hongo contribuye a la efectividad del aceite esencial como alternativa biológica frente a los fungicidas químicos convencionales (Muthee *et al.,* 2017).

El método de la microencapsulación mediante secado por aspersión utiliza polímeros naturales como goma arábiga y la maltodextrina, compuestos que presentan propiedades emulsionantes y permiten encapsular una sustancia dentro de otra, produciendo partículas de menor tamaño que quedan atrapadas en un agente encapsulante (Piñeros & Cusva, 2020).

La encapsulación por secado por aspersión de los aceites esenciales actúa como una barrera protectora que preserva el aceite durante el proceso de microencapsulación, el transporte y el almacenamiento, evitando perdidas por evaporación o degradación. Este método se ha consolidado como una técnica eficiente y económica para mejorar la estabilidad de compuestos volátiles y sensibles, como los aceites esenciales, frente a factores ambientales como la luz, el oxígeno y la temperatura (Altay *et al*., 2024).

El colorante resazurina, o Alamar Blue, se emplea de forma habitual como marcador de viabilidad celular debido a su capacidad para cambiar de color en función de la actividad metabólica. En su forma original es azul, pero cuando entra en contacto con células vivas es reducido a resorufina, adquiriendo un tono rosado. Este proceso depende de enzimas oxidoreductasas que actúan en las mitocondrias, por lo que el cambio cromático es un reflejo directo de la respiración celular. Por ello, este método se ha convertido en una herramienta práctica y de alta sensibilidad para analizar la viabilidad de microorganismos (Petiti *et al*., 2024).

# CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO

## 1.1 Antecedentes investigativos

Hakim *et al*. (2024) mencionaron en su investigación actividad antifúngica del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* contra *Fusarium roseum*, que el aceite esencial de *E. globulus* presentó una notable actividad antifúngica para todas las dosis aplicadas contra la proliferación micelial de *Fusarium roseum,* agente causal de la pudrición de espigas en trigo. Las concentraciones analizadas fueron (250, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 y 4000 µg/ml) En los ensayos se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la mínima concentración fungicida (MFC) en contra del hongo. Los resultados indicaron que la MIC fue 1500µg/ml mientras que la MFC alcanzó un valor de 4000µg/ml, demostrando así la eficacia del aceite esencial en la inhibición y eliminación del crecimiento fúngico.

Pujiarti *et al.* (2018) investigaron la actividad antifúngica del aceite de *Eucalyptus urophylla* frente a *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum*. Para ello se emplearon cinco concentraciones del aceite esencial: (1 mg/ml; 5 mg/ml; 10 mg/ml; 15 mg/ml; 20 mg/ml). Los resultados del experimento evidenciaron efectos antifúngicos a partir de concentraciones $CI_{50}$ = 1,61 mg/ml para *F. oxysporum* y $CI_{50}$ = 13,56 mg/ml para *A. niger.* Los resultados manifestaron mayor efecto inhibitorio para el hongo *F. oxysporum.*

Gakuubi *et al.* (2017) en su investigación de tipo experimental, la actividad antifúngica del aceite esencial de *Eucalyptus camaldulensis* frente a cinco especies de *Fusarium* patógenas del cultivo de maíz. Se ensayaron concentraciones entre 1 y 10 µL/mL, comprobándose su efecto inhibitorio. A 7 µL/mL se observó inhibición completa de *F. subglutinans* y *F. verticillioides*, mientras que a 8 µL/mL se alcanzó una inhibición total en todas las especies evaluadas. Estos resultados destacan el potencial de los aceites esenciales como una alternativa natural frente a los fungicidas químicos en el manejo de hongos fitopatógenos.

(Alzate, 2009) en su investigación evaluación preliminar de la actividad fungicida de los aceites esenciales de eucalipto *Eucalyptus tereticornis,* sobre algunos hongos filamentosos mediante ensayos *in vitro* en medio de cultivo PDA con un volumen de 13 mL. Se probaron concentraciones del aceite esencial que oscilaron de 10 a 4000 ppm para el aceite esencial de eucalipto. El patógeno presento inhibición completa a una concentración de 1000 ppm, esta concentración impidió que se desarrollara el micelio del hongo. Estos resultados demuestran que el aceite esencial de *E. tereticornis* posee actividad antifúngica significativa.

(Chibi & Hassaine, 2023) en su investigación de tipo experimental. Actividad antifúngica del aceite esencial de *Eucalyptus polybractea* frente a *Penicillium* sp., *Aspergillus flavus* y *Trichoderma viride*, mediante ensayos in vitro, evaluaron la actividad antifúngica de *Eucalyptus polybractea,* a concentraciones bajas con (0,089 mg/L) y concentraciones altas con (0,267 mg/L). Los resultados indicaron que el diámetro de la zona de inhibición del crecimiento micelial de *Penicillium* sp. alcanzó 71 mm a bajas concentraciones y 9 mm a altas concentraciones. En *Aspergilus flavus* se registró un crecimiento de 86 mm en concentraciones bajas y de 38 mm en

concentraciones altas. Mientras que *Trichoderma viride* presentó una de 87 mm y 17 mm en concentraciones bajas y altas de AE. Estos valores evidencian que el aceite esencial de *Eucalyptus polybractea* exhibe una mayor actividad antifúngica frente a *Penicillium sp.*

Fammad *et al.* (2024) en su investigación efecto inhibidor del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* contra los hongos *Bothyosphaeria dothidea y Fomitiporia* spp. causantes de enfermedades de la madera en viticultura. Donde evaluaron la intensidad del efecto del aceite esencial que fue dependiente de la dosis y se incrementó con el tiempo de exposición donde las concentraciones de 0,25 % y 0,75 % del aceite esencial de *E. globulus* resultaron eficaces contra ambos hongos patógenos.

Peralta *et al.* (2021) investigaron el efecto inhibitorio in vitro del aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill.) y cáscara de naranja (*Citrus sinensis* Linn. Osbeck.) sobre *Fusarium* spp. Donde evaluaron el efecto antifúngico en contra de *Fusarium* en papa. Donde *E. globulus* en una dosis al (50% de eucalipto) pudo inhibir el crecimiento de este patógenos obteniendo un promedio de 43.7 mm en área radial de la placa Petri.

Bolutari *et al*. (2015) en su investigación la actividad antifúngica *in vitro* de los aceites esenciales de *E. globulus* frente a los hongos patógenos *Aspergillus flavus y Aspergillus parasiticus.* Para el ensayo se utilizó la técnica de disolución en medio de cultivo, donde el aceite esencial inhibió completamente el crecimiento de los hongos micopatógenos desde la concentración más baja de 500 µL hasta la concentración más alta del, 3492 µL

Thi *et al*. (2021) en su investigación microencapsulación del aceite esencial de hierba limón (*Cymbopogon citratus*) mediante secado por aspersión: efectos de los parámetros de la emulsión de alimentación. demostraron que los aceites esenciales de distintas plantas medicinales con la técnica de la microencapsulación por medio del secado por aspersión, con la utilización de polímeros como la maltodextrina al (30%) y goma arábiga consiguieron un rendimiento destacado del (84,75%) sin dañar la composición química ni la calidad de los aceites esenciales.

## 1.2 Categorías fundamentales

### *1.2.1 Cladosporium fulvum Cooke.*

**Tabla 1**

*Taxonomía (C. fulvum)*

| Reino | *Fungi* |
|---|---|
| Hongo | Mitospóricos |
| División | *Eumycota* |
| Filo | *Ascomycota* |
| Subdivisión | *Deutereromycotina* |
| Clase | *Hyphomycetes* |

**Fuente:** (Thomma, 2005).

Los conidios del hongo *C. fulvum* pueden permanecer viables durante varios años en el suelo y en los residuos agrícolas. Cuando las condiciones ambientales son favorables. las esporas germinan sobre la superficie foliar de la planta de tomate y desarrollan unas hifas que penetran el tejido a través de los estomas. Una vez dentro la hoja, el patógeno coloniza el espacio intercelular donde se multiplica e interfiere en los procesos fisiológicos de la planta, como la fotosíntesis (Belabess *et al.*, 2024). Transcurridos aproximadamente 14 días desde la germinación, el hongo produce y libera nuevas esporas que se dispersan por el viento o por el contacto con herramientas y restos vegetales infectados (Charccahuana, 2023).

*C. fulvum* es un hongo fitopatógeno que afecta principalmente al cultivo de tomate riñón, especialmente bajo condiciones de invernadero. La enfermedad se manifiesta mediante la aparición de lesiones de tonalidades amarillas a pardas en las hojas, las cuales progresan hasta provocar el marchitamiento y la necrosis del tejido foliar. Conforme la infección se intensifica, las hojas más dañadas tienden a desprenderse, lo que disminuye la capacidad fotosintética de la planta y ocasiona un deterioro general de su desarrollo. En situaciones de alta severidad, el patógeno puede generar reducciones considerables tanto en el rendimiento como en la calidad del fruto, afectando su peso y su valor comercial (Popov & Smirnov, 2024).

### *1.2.2 Aceites esenciales*

Los aceites esenciales están compuestos por terpenos y compuestos fenilpropanoides que es el componente volátil y representa “entre el 90 % y 95 %” del peso total del aceite esencial. Esta fracción incluye principalmente monoterpenos, sesquiterpenos y sus derivados oxigenados, además de pequeñas cantidades no volátiles de alcoholes, flavonoides, ésteres y aldehídos alifáticos (Hanif *et al*., 2019).

Resulta imprescindible, desde una perspectiva ambiental y agrícola sostenible desarrollar nuevas estrategias que permitan proteger los cultivos frente a enfermedades sin generar impactos a los ecosistemas. En este contexto, diversas investigaciones han propuesto el uso de compuestos naturales, como alternativa al empleo de pesticidas sintéticos. Entre ellos destacan los metabolitos secundarios presentes en las plantas medicinales, los cuales incluyen terpenos, fenoles, alcaloides y otros compuestos con propiedades antimicrobianas, antioxidantes y repelentes de patógenos. Los aceites esenciales representan una de las principales formas de aprovechamiento de dichos compuestos (Devrnja & Milutinović, 2022).

Gracias a su naturaleza lipofílica, los aceites esenciales pueden atravesar la bicapa de fosfolípidos de la membrana celular de los microorganismos, alterando su permeabilidad, desorganizando la pared celular e interfiriendo con procesos metabólicos esenciales. Estas características los convierten en una alternativa prometedora para el control de patógenos fúngicos y bacterianos, reduciendo al mismo tiempo la dependencia de agroquímicos convencionales y promoviendo una agricultura más sostenible (Kumar *et al*., 2022).

### *1.2.3 Eucaliptus globulus*

De la familia Myrtaceae originaria de Australia se clasifican como plantas aromáticas y medicinales, el eucalipto es cultivada por todo el mundo y posee propiedades medicinales, sus aceites son utilizados en diferentes industrias Aproximadamente, existen 300 especies de eucalipto, sin embargo, solo 15 especies son estudiadas y comercializadas (Kisinza, 2021).

**Tabla 2**

*Composición química de Eucalyptus globolus, y sus porcentajes aproximados*

| Componente químico | Porcentaje aproximado |
|---|---|
| 1,8-cineol (eucaliptol) | 63.1 % |
| p-Cimeno (p-cymene) | 7.7 % |
| α-Pineno | 7.3 % |
| a-Limoneno | 6.9 % |
| Globulol | 5.9 % |
| γ-Terpineno | 3.51 % |

**Fuente**: *(Cmikova et al., 2023).*

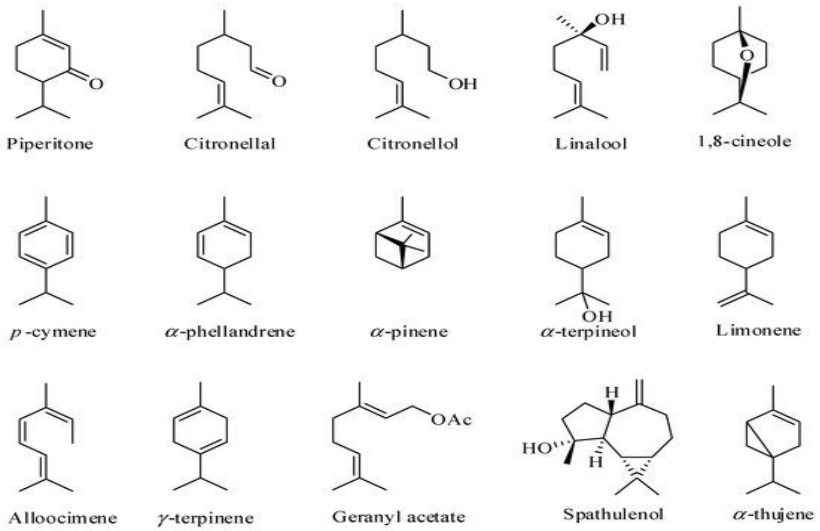
### *1.2.4 Aceite esencial de Eucalyptus sp.*

Los aceites esenciales del eucalipto se sintetizan y almacenan en células secretoras especializadas distribuidas en diferentes órganos de la planta. Estos aceites están compuestos principalmente por monoterpenos y otros compuestos volátiles que les permiten ser utilizadas en aplicaciones industriales. El aceite esencial obtenido del eucalipto del género *E. globulus* contiene aproximadamente un 80 % de 1,8-cineol (eucaliptol), componente responsable de su actividad biológica (Singh *et al*., 2024).

Además, incluye otros compuestos como α-pineno, d-limoneno, p-cimeno, α-felandreno, canfeno, γ-terpineol, así como sesquiterpenos, ácidos orgánicos, taninos y pigmentos flavonoides, todos ellos asociados a propiedades antisépticas, insecticidas, bactericidas y fungicidas (Cmikova *et al*., 2023).

Los aceites esenciales ejercen su acción antifúngica provocando alteraciones estructurales y funcionales en la pared y la membrana celular del hongo. La modificación de la permeabilidad de la membrana sufre un desequilibrio en el transporte de iones y nutrientes esenciales. Asimismo, se ha reportado que los aceites inducen a malformaciones celulares y daños en las mitocondrias, al interferir con el transporte de electrones mitocondriales, lo que interrumpe los procesos de respiración y producción de energía (Leiva-Mora *et al.,* 2025).

Además, afecta la replicación y transcripción del material genético, obstruyendo la síntesis de ARN y ADN, impidiendo con ello la formación normal de proteínas necesarias para el crecimiento y la reproducción celular. En conjunto, estos mecanismos conducen a la inhibición del desarrollo del hongo y, finalmente, a la muerte de las células patógenas (Ammad *et al.,* 2024).




**Fuente:** *(Morcia et al., 2012).*

***Figura 1.***

*Diferentes componentes de los aceites esenciales de Eucaliptus globolus.*

**Tabla 3**

*Posibles mecanismos antifúngicos de los componentes de los aceites esenciales de Eucalyptus frente a hongos*

| Compuesto principal | Modo de acción | Efecto cobre hongos |
|---|---|---|
| 1,8-cineol | Daño de la membrana plasmática; aumenta la permeabilidad celular. | Daño celular, fuga de iones y metabolitos |
| α-Pineno / Limoneno | Interferencia con enzimas de la pared y transporte de protones. | Inhibición del crecimiento micelial |
| Terpinol Globulol | Desnaturalización de proteínas y estrés oxidativo | Inacción de enzimas esenciales |

### *1.2.5 Microencapsulación de los aceites esenciales mediante secado por aspersión*

Los aceites esenciales son ampliamente utilizados en diversas industrias, como la alimentaria, farmacéutica, cosmética, y agrícola debido a sus propiedades funcionales, aromáticas y biológicas. Sin embargo, estos compuestos presentan alta volatilidad y sensibilidad frente a factores ambientales como la luz, el oxígeno y la temperatura. Para neutralizar esos efectos se emplea la técnica de microencapsulación mediante secado por aspersión la cual permite preserva los aceites de la evaporación y la oxidación (Altay *et al*., 2024).

El secado por aspersión consiste en la disolución de polímeros encapsulantes comúnmente maltodextrina y goma arábiga, los cuales actúan como matrices capaces de retener y proteger compuestos volátiles. Posteriormente, la mezcla de los polímeros con el aceite esencial se introduce en una cámara de secado, donde es atomizada en

pequeñas gotas. Estas gotas entran en contacto con una corriente de aire caliente, provocando la rápida evaporación del solvente y la formación de micropartículas sólidas en las que el aceite queda recubierto por el material de pared. Finalmente, el polvo encapsulado se recoge y almacena para su posterior uso (Sousa *et al*., 2022).

### *1.2.6 Espectrometría infrarroja (FT-IR)*

La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) es una técnica analítica ampliamente utilizada para identificar grupos funcionales y determinar la estructura molecular de compuestos orgánicos e inorgánicos. Este método se basa en la interacción de la radiación infrarroja con la materia, lo que produce vibraciones moleculares características de los enlaces presentes en la muestra (Amin *et al*., 2025).

En un espectro infrarrojo, el eje horizontal representa el número de onda ($cm^{-1}$), que indica la cantidad de longitudes de onda contenidas en un centímetro y está relacionado con la longitud de onda de la radiación. Por su parte, el eje vertical muestra la intensidad de la radiación absorbida por la muestra. (Agatonovic *et al*., 2020).

El espectro se divide generalmente en dos regiones principales: la primera, comprendida entre 4000 y 1500 $cm^{-1}$, corresponde a la denominada región de los grupos funcionales, donde se observan las bandas de absorción asociadas a los enlaces característicos de ciertos grupos químicos. La segunda región, entre 1500 y 500 $cm^{-1}$, se conoce como la región de la huella digital, ya que presenta un patrón único e inconfundible para cada molécula, permitiendo su identificación estructural precisa (Asres *et al.,* 2025).

### *1.2.7 Evaluación del efecto antifúngico de diferentes concentraciones*

Se efectuó el almacenamiento y control del crecimiento radial de los tratamientos en los días 7 y 14, tomando como referencia el día inicial (día 1). Las mediciones se realizaron con precisión milimétrica para evaluar la evolución del desarrollo micelial en cada tratamiento. Posteriormente, se calcularon los promedios de los radios obtenidos y se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (ICM) empleando la siguiente fórmula (Rohman, 2020).

$$ICM\ (\%) = \frac{Rc - RT1}{RC} * 100\%$$

Donde:

% ICM = Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial

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

RT = Radio del crecimiento micelial por cada tratamiento

**Fuente**: (Vincent, 1947)

Esta ecuación permite determinar el grado de efecto inhibitorio del tratamiento sobre el crecimiento del hongo en comparación con el control, siendo valores más altos indicativos de una mayor eficacia antifúngica (Rohman, 2020).




**Figura 2.**

*Placas multipocillos con diferentes tratamientos y controles*

La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante el uso del reactivo resuzarina en placas multipocillo permite evaluar de forma cuantitativa la actividad antifúngica del aceite esencial microencapsulado frente a *C. fulvum*. Este método se basa en la capacidad del hongo para reducir el reactivo, lo que produce un cambio de color que indica la presencia de actividad metabólica y, por tanto, crecimiento celular. Cuando las concentraciones del aceite esencial son eficaces, el indicador conserva un tono azul debido a la ausencia de reducción, lo que evidencia inhibición del crecimiento fúngico (Laala *et al.,* 2023).

Se utilizó un lector de placas multipocillo (modelo Bio Tek, EPOCH) para medir la absorbancia durante los ensayos de inhibición del crecimiento de *C. fulvum*. Las variaciones en la coloración del indicador Alamar Blue se registraron mediante lecturas espectrofotométricas a 600 nm. De esta manera, los cambios detectados representan la actividad celular y el cambio de coloración según la actividad metabólica que desarrolle el hongo en cada tratamiento (Tsukatani *et al.,* 2014).

## 1.3 Objetivos

### *1.3.1 Objetivo general*

Determinar la actividad antifúngica *in vitro* de aceites esenciales de *Eucalyptus* sp microencapsulados sobre *Cladosporium fulvum.*

### *1.3.2 Objetivos específicos*

- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones del aceite esencial de *Eucalyptus* sp microencapsulados sobre el crecimiento micelial de *C. fulvum*.
- Identificar la mínima concentración inhibitoria del aceite esencial de *Eucalyptus* sp. sobre *C. fulvum*.

# CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA

## 2.1 Ubicación del estudio

Provincia: Tungurahua

Cantón: Cevallos

Parroquia: Cevallos

Sector: Campus Querochaca campus de la UTA

Latitud: 1° 22′ 08″ S

Longitud: 78° 36′ 22″ W

Altitud: 2 880 msnm

**Figura 3.**

*Ubicación del Ensayo*




**Elaborado por:** *Zambrano, 2025*

## 2.2 Equipos y materiales

### *2.2.1 Equipos*

- Mini sprar dryver (Buchi B-290).
- Espectro infrarrojo (FTIR).
- Cabina de flujo laminar (BIOBASE).
- Incubadora (BIBASE).
- Autoclave (M11 ultra clave).
- Micropipetas de: 1000 ml, 200 ml, 20ml.
- Refrigerador (Indurama).

### *2.2.2 Material de laboratorio*

- Asa Drigalsky
- Matraz Erlenmeyer de 100ml.
- Probetas de 10 y 50ml.
- Pipetas de 5ml.
- Botellas de vidrio ámbar de 50 y 100ml.
- Bisturí.
- Aguja de inoculación.
- Mechero Bunsen.
- Tijeras de acero inoxidable.
- Cajas Petri (90mm de diámetro).
- Papel aluminio.
- Cubre objeto.
- Porta objeto.
- Puntas para micropipeta 200 µl - 20 µl.
- ParafilmR.
- Placas multipocillos.
- Cofias.
- Guantes de examinación.
- Mascarillas.

### *2.2.3 Reactivos*

- Agar Papa Dextrosa (PDA)
- Agua destilada.
- AlamarBlue.
- Caldo de Dextrosa de Papa (PDB).
- Etanol al 70%
- Etanol al 90%
- Goma arábiga
- Malrodextrina
- Tween 80 al 0.05%.

## 2.3 Tipo de investigación

La investigación se desarrolló bajo un enfoque cuantitativo, ya que se basa en la medición objetiva y numérica de variables experimentales, como los porcentajes de inhibición del crecimiento de *C. fulvum* y las diferentes concentraciones del aceite esencial microencapsulado de *Eucalyptus* sp. Lo que permite obtener datos precisos, comparables, reproducibles y facilita analizar la relación entre la dosis del aceite esencial y su efecto antifúngico.

## 2.4 Hipótesis

**Ho**: No existe diferencia significativa entre los porcentajes de inhibición de crecimiento micelial (ICM) del aceite esencial de eucalipto con diferentes concentraciones de A.E microencapsulado.

**Ha:** Existe diferencia significativa entre los porcentajes de inhibición de crecimiento micelial (ICM) del aceite esencial de eucalipto con diferentes concentraciones de A.E microencapsulado.

## 2.5 Variables de respuesta

Para el método de dilución en agar de los AEM se evaluó el porcentaje de inhibición de crecimiento micelial (ICM) mientras que para el método de dilución en placas multipocillos se evaluó la Mínima Concentración Inhibitoria (MCI).

## 2.6 Diseño experimental

Se utilizó el diseño experimental completamente al azar (DCA). Este tipo de diseño se escogió porque las unidades experimentales fueron homogéneas, así como las condiciones de incubación.

### *2.6.1 Factores de estudio*

### *2.6.2 Factor 1:*

Concentraciones de aceite esencial de *Eucalyptus* sp microencapsulado.

### *2.6.3 Tratamientos*

**Tabla 4**

*Tratamientos y controles de los aceites esenciales de Eucalyptus sp con diferentes concentraciones mg.L-1*

| Número | Símbolo | Descripción |
|---|---|---|
| 1 | T1 | Concentración del Aceite Esencial al 5% en PDA. |
| 2 | T2 | Concentración del Aceite Esencial al 6% en PDA. |
| 3 | T3 | Concentración del Aceite Esencial al 7% en PDA. |
| 4 | T4 | Concentración del Aceite Esencial al 8% en PDA. |
| 5 | T5 | Concentración del Aceite Esencial al 9% en PDA. |
| 6 | T6 | Concentración del Aceite Esencial al 10% en PDA. |
| 7 | T7 | Concentración del Aceite Esencial al 15% en PDA. |
| 8 | C1 | PDA sin aceite. |
| 9 | C2 | PDA + fungicida sistémico Serpenter® |
| 10 | C3 | Concentraciones de aceite sin microencapsular al 5%, 10% y 15%. |

## 2.7 Manejo del experimento

Primero se prepararon 50 mL de medio PDA, en matraces Erlenmeyer de 100 mL y se esterilizó en la autoclave a 120°C y 1,5 atm de presión. Se agregan las diferentes concentraciones del aceite esencial microencapsulado (A.E.M) correspondientes a cada tratamiento:

**T1** -5 %: 50 mL de medio PDA + 2,5 g de A.E.M

**T2** -6 %: 50 mL de medio PDA + 3g de A.E.M

**T3** -7 %: 50 mL de medio PDA + 3,5g de A.E.M

**T4** -8 %: 50 mL de medio PDA + 4 g de A.E.M

**T5** -9 %: 50 mL de medio PDA + 4,5g de A.E.M

**T6** -10 %: 50 mL de medio PDA + 5 g de A.E.M

**T7** -15%: 50 mL de medio PDA + 75 g de A.E.M

Se vertieron 25 mL de la mezcla obtenida en cajas Petri de 90 mm de diámetro bajo condiciones estériles.

**T1:** 4 cajas Petri de 90 mm de diámetro agregar 25 mL de mezcla.

**T2**: 4 cajas Petri de 90 mm de diámetro agregar 25 mL de mezcla.

**T3**: 4 cajas Petri de 90 mm de diámetro agregar 25 mL de mezcla.

**T4:** 4 cajas Petri de 90 mm de diámetro agregar 25 mL de mezcla.

**T5**: 4 cajas Petri de 90 mm de diámetro agregar 25 mL de mezcla.

**T6**: 4 cajas Petri de 90 mm de diámetro agregar 25 mL de mezcla.

**T7**: 4 cajas Petri de 90 mm de diámetro agregar 25 mL de mezcla.

Se dejaron enfriar el medio hasta su completa solidificación, una vez solidificado, las cajas se colocarán en posición invertida, se envolverán en papel aluminio y se incubarán a 20–25 °C por 24 horas. En cabina de flujo laminar, se inocularán las placas utilizando discos de micelio (5 mm de diámetro) tomados de cajas Petri con cultivos de *C. fulvum* CC-FCAGP de 7 días de crecimiento. Con la ayuda de puntas azules de micropipetas de 1000 microlitros fueron colocadas en cajas de puntas y esterilizadas a 120°C con 1,5 atm en autoclave.

**T1:** En 4 cajas Petri inocular discos de micelio (5 mm de diámetro).

**T2:** En 4 cajas Petri inocular discos de micelio (5 mm de diámetro)

**T3:** En 4 cajas Petri inocular discos de micelio (5 mm de diámetro)

**T4:** En 4 cajas Petri inocular discos de micelio (5 mm de diámetro).

**T5:** En 4 cajas Petri inocular discos de micelio (5 mm de diámetro)

**T6:** En 4 cajas Petri inocular discos de micelio (5 mm de diámetro)

**T7:** En 4 cajas Petri inocular discos de micelio (5 mm de diámetro)

Las cajas Petri inoculadas se colocarán en posición invertida y se incubarán durante 7 días a 25 °C. Además, se debe llevar 3 controles.

**Control 1:** 4 cajas Petri con 25 ml de PDA + hongo (*C. fulvum*)

**Control 2:** 4 cajas Petri con 25 ml PDA + fungicida sistémico Serpenter®+ hongo (*C. fulvum***)**

**Control 3:** 6 cajas Petri con 25 ml PDA + aceite sin microencapsular+ hongo (C

Para evaluar la actividad antifúngica mediante el método de microdilución en microplacas con medio de cultivo PDB se siguió el siguiente procedimiento. Pesar 1.2 g de medio PDB y colocar en 50 ml de agua destilada en Erlenmeyer de 125mL, se tapa con papel aluminio y colocar una liga. Colocar el Erlenmeyer en la autoclave, esterilizar a 121 °C y 15 psi durante 20 minutos y dejar enfriar antes de su uso. Una

vez enfriados, guardar los frascos en un lugar oscuro y fresco y etiquetar con fecha de elaboración y tipo de medio.

**Preparación del inóculo de *C fulvum***

Se colocan 5 mL de agua destilada estéril en cada tubo de ensayo. Se incorporarán dos discos de micelio de aproximadamente 5 mm de diámetro, provenientes de cultivos del hongo en medio PDA de 7 días de crecidos. Los tubos se agitarán en un Vortex durante 5 minutos para facilitar la liberación de conidios desde el micelio. Posteriormente, se realizará un conteo de conidios utilizando una cámara de Neubauer bajo el microscopio, con el propósito de verificar si la suspensión se encuentra en el rango de $10^5$ conidios/mL.

**Preparaciones de solución madre**

Para el desarrollo experimental del método de microdilución en Placas multipocillos con medio PDB se preparó soluciones madre por tratamiento colocando el medio PDB, se agrega el tratamiento y se realiza una primera incubación de los tubos por 24 horas a 20°C en oscuridad. Con la micropipeta tomar 135 µL de cada tratamiento verter cuidadosamente en el pocillo correspondiente de la microplaca. Con la micropipeta multicanal, tomar 45 µL del inóculo de *C. fulvum* y agregar a cada pocillo que ya contiene el tratamiento. Resultado cada pocillo tiene 180 µL de volumen total (135 + 45), colocar en la incubadora a 20 °C por 24 horas.

Preparar el AlamarBlue obteniendo una concentración de 0.1% (p/v), con la micropipeta multicanal, se tomaron 20 µL de la solución de AlamarBlue y agregaron a cada pocillo como en la figura 2. Se llevó la microplaca al lector multiplacas (Bio Tek, EPOCH) y se midió la absorbancia a 600 nm a las 24h. Para preparar las diferentes concentraciones de aceite microencapsulado se utilizaron las cantidades descritas en la tabla 5.

**Tabla 5**

*Preparación de cada tratamiento antes de ser colocado en los pocillos*

| **Tratamientos** | **AEM (mg)** | **PDB (µL)** | **Concentración en 135** µL | **Inóculo *C. fulvum*** | **Volumen final** | **Concentración final** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| T1 | 36 | 135 | 26.66 % | 45µL | 180 | 20% |
| T2 | 27 | 135 | 20% | 45µL | 180 | 15% |
| T3 | 18 | 135 | 13.33% | 45µL | 180 | 10% |
| T4 | 9 | 135 | 6.66% | 45µL | 180 | 5% |
| T5 | 4.5 | 135 | 3.33% | 45µL | 180 | 2.5 % |
| T6 | 2.25 | 135 | 1.66% | 45µL | 180 | 1.25 % |
| T7 | 1.125 | 135 | 0.833% | 45µL | 180 | 0.625 % |
| T8 | 0.5625 | 135 | 0.4166% | 45µL | 180 | 0.3125 % |

Los controles incluyen: (1) PDB + polímeros, se preparó a partir de una solución madre con maltodextrina (94 mg), goma arábiga (62,5 mg) y 2,5 mL de PDB, de la cual se añadieron 135 µL junto con 45 µL de inóculo de *C. fulvum* por pocillo; (2) PDB + fungicida Serpenter®+ esporas, elaborado a partir de una solución madre de 38 mg del fungicida Serpenter en 10 mL de PDB, distribuyendo 135 µL de esta solución y 45 µL de inóculo en cada pocillo y (3) PDB + inóculo, compuesto por 135 µL de PDB y 45 µL de inóculo por pocillo.También, se prepararon los tratamientos para el aceite sin microencapsular que como se muestra en la tabla 6.

**Tabla 6**

*Tratamientos para el aceite sin microencapsular*

| Tratamientos | Tratamiento F (μL) | Volumen PDB (μL) | Concentración final |
|---|---|---|---|
| T1 | 360 | 1350 | 20% |
| T2 | 270 | 1350 | 15% |
| T3 | 180 | 1350 | 10% |
| T4 | 90 | 1350 | 5% |
| T5 | 45 | 1350 | 2.5 % |
| T6 | 22.5 | 1350 | 1.25 % |
| T7 | 11.25 | 1350 | 0.625 % |
| T8 | 5.625 | 1350 | 0.3125 % |

## 2.8 Recolección de la información

Los datos experimentales fueron organizados y procesados en hojas de cálculo de Excel, registrando los valores de diámetro de las colonias, porcentaje de inhibición del crecimiento micelial para los ensayos que utilizaron el método de dilución en agar. Para el método de microdilución se evaluó la absorbancia en un lector multiplacas (Bio Tek, EPOCH) y la mínima concentración inhibitoria. Además, se tomaron fotografías durante el desarrollo de los ensayos para respaldar visualmente los resultados y registrar el estado de las muestras, asegurando así un seguimiento completo y detallado del proceso investigativo.

## 2.9 Procesamiento de la información y análisis estadístico

La información obtenida en los ensayos *in vitro* fue procesada mediante el registro los datos de absorbancia, crecimiento micelial y mínima concentración inhibitoria. Los valores obtenidos se organizaron en matrices en Excel para su posterior análisis estadístico y se verificaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Posteriormente, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) con el fin de verificar la presencia de diferencias significativas entre los tratamientos. En los casos

en que el ANOVA resultó significativo, se utilizó la prueba de Tukey al 95 % de confianza ($p < 0,05$).

## CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación del efecto de diferentes concentraciones del aceite esencial de *Eucalyptus* sp microencapsulados sobre el crecimiento micelial de *C. fulvum*. Los resultados obtenidos muestran diferencias significativas en el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *C. fulvum* entre los tratamientos evaluados a los 7 y 14 días con diferentes concentraciones de aceite esencial de eucalipto microencapsulado. Los tratamientos 2, 3, 4, 5, 6 y 7 presentaron un 100 % de inhibición con la letra A lo que indica que no existen diferencias estadísticas significativas entre ellos ($p > 0,05$) pero si con el tratamiento de 5% y el control (tabla 7 y tabla 8, figura 4 y figura 5).

**Tabla 7**

*Influencia de diferentes concentraciones de aceite esencial de eucalipto microencapsulado sobre el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de C. fulvum mediante el método de dilución en agar a los 7 días.*

| Tratamientos | | Medias % | n | E.E. | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 5 | 9% | 100,00 | 4 | 0,53 | A | |
| 6 | 10 % | 100,00 | 4 | 0,53 | A | |
| 7 | 15% | 100,00 | 4 | 0,53 | A | |
| 4 | 8% | 100,00 | 4 | 0,53 | A | |
| 2 | 6% | 100,00 | 4 | 0,53 | A | |
| 3 | 7% | 100,00 | 4 | 0,53 | A | |
| 1 | 5 % | 39,56 | 4 | 0,53 | B | |
| 8 | solo PDA | 0,00 | 4 | 0,53 | | C |

**Tabla 8**

*Influencia de diferentes concentraciones de aceite esencial de eucalipto microencapsulado sobre el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de C. fulvum mediante el método de dilución en agar a los 14 días.*

| Tratamientos | | Medias % | n | E.E. | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 5 | 9% | 100,00 | 4 | 0,08 | A | | |
| 6 | 10 % | 100,00 | 4 | 0,08 | A | | |
| 7 | 15% | 100,00 | 4 | 0,08 | A | | |
| 4 | 8% | 100,00 | 4 | 0,08 | A | | |
| 2 | 6% | 100,00 | 4 | 0,08 | A | | |
| 3 | 7% | 100,00 | 4 | 0,08 | A | | |
| 1 | 5 % | 53,38 | 4 | 0,08 | | B | |
| 8 | solo PDA | 0,00 | 4 | 0,08 | | | C |

| | | | |
|---|---|---|---|
|  |  |  |  |
| **15 %** | **10 %** | **9 %** | **8 %** |
|  |  |  |  |
| **7 %** | **6 %** | **5 %** | **C1**<br>**Solo PDA** |

| | | | |
|---|---|---|---|
|  |  |  |  |
| **C2**<br><br>**PDA+Fungicida Serpenter®** | **C3 5 %**<br><br>**Aceite sin microencapsular** | **C3 10%**<br><br>**Aceite sin microencapsular** | **C3 15 %**<br><br>**Aceite sin microencapsular** |

**Figura 4.**

*Tratamientos y controles de los A.E.M contra C. fulvum a los 7 días*

| | | | |
|---|---|---|---|
|  |  |  |  |
| **15 %** | **10 %** | **9 %** | **8 %** |
|  |  |  |  |
| **7 %** | **6 %** | **5 %** | **C1**<br>**Solo PDA** |

| | | | |
|---|---|---|---|
|  |  |  |  |
| **C2**<br><br>**PDA+Fungicida Serpenter®** | **C3 5 %**<br><br>**Aceite sin microencapsular** | **C3 10%**<br><br>**Aceite sin microencapsular** | **C3 15 %**<br><br>**Aceite sin microencapsular** |

**Figura 5**.

*Tratamientos y controles de los A.E.M contra C. fulvum a los 14 días*

## DISCUSIÓN

Los resultados de esta investigación demostraron que el aceite esencial microencapsulado de *Eucalyptus* presenta una actividad antifúngica dependiente de la concentración frente a *C. fulvum*, alcanzando inhibición completa (100 %) del crecimiento micelial a los 14 días, sin diferencias estadísticas significativas entre ellas ($p > 0,05$), mientras que la concentración del 5 % mostró una inhibición parcial (53,38 %), confirmando la existencia de un umbral mínimo efectivo. Estos hallazgos concuerdan con varios estudios previos que han reportado la eficacia antifúngica de aceites esenciales de *Eucalyptus* sobre hongos fitopatógenos. Por ejemplo, la inhibición completa de especies de *Fusarium* a ~7–8 $\mu L \cdot mL^{-1}$). La observación de homogeneidad estadística entre tratamientos de concentraciones medias-altas ($p > 0,05$) sugiere la eficacia en la que el incremento de dosis no produce aumentos significativos de inhibición (Gakuubi *et al.*, 2017).

Aunque los mecanismos de acción no fueron evaluados directamente diversos autores han señalado que los aceites esenciales de *Eucalyptus* poseen una elevada actividad antifúngica debido a la presencia de compuestos bioactivos como eucaliptol (1,8-cineol), α-pineno y limoneno, los cuales actúan principalmente sobre la membrana celular de los hongos, provocando alteraciones en la permeabilidad, Esto podrían explicar la inhibición total del crecimiento micelial de *C. fulvum* observada en este estudio. La ausencia de diferencias estadísticas entre las concentraciones más altas sugiere que, una vez superado el umbral mínimo requerido, los compuestos activos ejercen un efecto fungicida completo. Resultados similares fueron reportados por (Vania *et al*., 2022), quienes indicaron que el aumento de la concentración de aceites esenciales no siempre genera un mayor efecto inhibitorio, ya que la acción antifúngica alcanza un punto máximo debido a la saturación de los sitios de acción del microorganismo.

La microencapsulación constituyó un aspecto técnico clave para la eficacia antifúngica observada *in vitro*. El uso de matrices de recubrimiento como maltodextrina y goma arábiga permitió reducir la volatilidad del aceite, proteger los compuestos activos frente a procesos de oxidación y controlar su liberación en el

medio, incrementando así el tiempo de contacto efectivo con el patógeno. Revisiones recientes sobre técnicas y materiales de microencapsulación (Sousa *et al*., 2022), han documentado mejoras significativas en la estabilidad térmica, el control de liberación y la conservación de la actividad antifúngica de los aceites esenciales cuando se formulan en sistemas microencapsulados, lo que respalda los resultados obtenidos en el presente estudio

Si bien la microencapsulación no modifica el mecanismo de acción molecular del aceite esencial, sí contribuye a mantener concentraciones locales efectivas durante periodos prolongados, favoreciendo su acción antifúngica. No obstante, es importante considerar que la variabilidad en la composición química del aceite esencial entre distintas especies de *Eucalyptus*, así como la susceptibilidad específica del patógeno, pueden influir en la magnitud del efecto observado (Elgat *et al.,* 2020).

Los resultados obtenidos confirman que el aceite esencial microencapsulado de *Eucalyptus* presenta un potencial significativo como alternativa para el manejo de *C. fulvum* en condiciones *in vitro*, mostrando una respuesta antifúngica dependiente de la concentración y un desempeño favorecido por el proceso de microencapsulación. No obstante, antes de proponer su aplicación a escala agrícola, resulta indispensable realizar evaluaciones adicionales en condiciones de campo, así como estudios de caracterización química de la formulación y de su permanencia y estabilidad en el ambiente.

En la tabla 9 se muestran las mediciones de absorbancia a 600 nm que evidenciaron que la actividad metabólica de *C. fulvum* disminuyó progresivamente conforme aumentó la concentración del aceite esencial de *Eucalyptus* microencapsulado. El control con hongo y el tratamiento con polímero presentaron los valores más altos y estadísticamente similares, lo que confirma la ausencia de efecto inhibitorio en ambos casos.

En las concentraciones bajas del aceite (0,312 % y 0,625 %), la reducción de absorbancia fue leve, reflejando una inhibición parcial del crecimiento. A partir de 1,27 % y 2,5 %, la disminución en actividad metabólica se hizo más evidente, ubicando a estos tratamientos en grupos estadísticos intermedios que indicó un efecto

antifúngico mayor. Las concentraciones de 5 %, 10 % y 15 % mostraron descensos notorios en absorbancia, demostrando una inhibición significativa del hongo.

En la concentración más elevada evaluada 20 %, los valores de absorbancia se aproximaron al mínimo registrado, lo que indicó una inhibición prácticamente completa del crecimiento fúngico. El fungicida comercial Serpenter® mostró un patrón de respuesta comparable, aunque con una absorbancia ligeramente inferior. El análisis estadístico evidenció que las diferencias entre tratamientos fueron significativas únicamente cuando no compartieron letras, lo que confirma que el aceite esencial microencapsulado manifiesta una elevada actividad antifúngica a partir de concentraciones iguales o superiores al 5 %.

**Tabla 9**

*Influencia de diferentes concentraciones de aceite esencial de eucalipto microencapsulado sobre la actividad antifúngica relacionada con la absorbancia (600nm) medida en lector de multiplaca (Bio Tek, EPOCH) con el método de microdilución dilución a las 24 horas*

| Tratamientos | | Medias | n | E.E. | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 9 | PDB + hongo | 1,84 | 8 | 0,05 | A | | | | | | |
| 7 | PDB + polímero | 1,60 | 8 | 0,05 | A | B | | | | | |
| 8 | PDB+0,312 % | 1,50 | 8 | 0,05 | | B | | | | | |
| 6 | PDB+0,625 | 1,49 | 8 | 0,05 | | B | | | | | |
| 5 | PDB+1,27 | 1,46 | 8 | 0,05 | | B | C | | | | |
| 4 | PDB+2,5 % | 1,36 | 8 | 0,05 | | B | C | D | | | |
| 3 | PDB+5 % | 1,22 | 8 | 0,05 | | | C | D | E | | |
| 2 | PDB+10 % | 1,20 | 8 | 0,05 | | | | D | E | | |
| 11 | PDB+15 | 1,17 | 8 | 0,05 | | | | D | E | | |
| 1 | PDB+20 | 1,04 | 8 | 0,05 | | | | | E | F | |
| 12 | PDB + fungicida | 0,84 | 8 | 0,05 | | | | | | F | G |
| 10 | solo PDB | 074 | 8 | 0,04 | | | | | | | G |

En la figura 6 se observa que los tratamientos a las 24h. En las primeras columnas a altas concentraciones conservan un color más purpura, señalando inhibición fuerte del hongo. El color violeta indica inhibición parcial, predominante en concentraciones intermedias. Las concentraciones más altas (20–10 %) muestran inhibición mayor, evidenciada por tonos más oscuros. La MIC es.5 %. En la figura 12 a se identifica en la columna 10 PBD + Hongo el color es rosa, lo que confirma que el hongo se desarrolla sin restricciones, en la columna 11 demuestra que los polímeros no aportan actividad antifúngica. En la columna 12 muestra un color violeta señala que el fungicida Serpenter® si es efectivo.

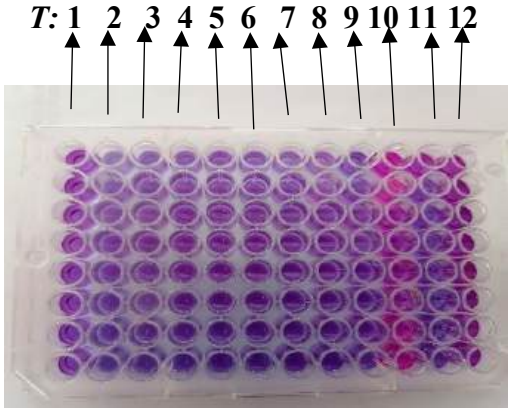



**Figura 6**.

*Placas multipocillos con los diferentes tratamientos y controles*

| | | | |
|---|---|---|---|
| **T1** | **Solo PBD** | **T7** | **PBD+ aceite 1,25 %** |
| **T2** | **PBD + aceite 20 %** | **T8** | **PBD + aceite 0,625 %** |
| **T3** | **PBD + aceite 15 %** | **T9** | **PBD + aceite 0,312 %** |
| **T4** | **PBD + aceite 10 %** | **T10** | **PBD + hongo** |
| **T5** | **PBD + aceite 5 %** | **T11** | **PBD + polímeros** |
| **T6** | **PBD + aceite 2,5 %** | **T12** | **PBD + fungicida** |

# DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la placa multipocillo muestran una clara inhibición del crecimiento de *C. fulvum* a concentraciones elevadas del aceite esencial microencapsulado de *Eucalyptus* sp., evidenciada por la permanencia del color azul morado del reactivo Alamar Blue. Este color indicó la ausencia de actividad metabólica del hongo, lo cual confirma que el tratamiento logró impedir la reducción del colorante, asociado directamente con la viabilidad celular (Caetano *et al.,* 2022).

Al disminuir la concentración del aceite, se observó un cambio progresivo hacia tonalidades púrpura y rosada, que revelan una recuperación paulatina del metabolismo del hongo. Este patrón gradual es característico de los ensayos tipo MIC, donde el incremento en la reducción del colorante refleja un aumento en la actividad respiratoria del patógeno (Rampersad, 2012). Estos resultados concuerdan con estudios previos que reportan el fuerte efecto antifúngico de los aceites esenciales de *Eucalyptus* sobre hongos fitopatógenos. Por ejemplo, Singh *et al.* (2024) demostraron que el aceite esencial de *Eucalyptus globulus* genera alteraciones en la membrana celular y pérdida de integridad estructural en hongos similares, afectando su metabolismo y capacidad de germinación. Igualmente. La interpretación de la prueba con Alamar Blue en este estudio coincide con lo señalado por (Herman *et al*., 2024).

La conservación de la coloración azul del reactivo indica la ausencia de actividad metabólica celular y, en consecuencia, la inhibición del crecimiento fúngico. En aquellas concentraciones en las que no se evidenció un cambio de color, se constató que el aceite esencial microencapsulado redujo eficazmente la viabilidad del hongo. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Fammad *et al.,* (2024), quienes emplearon el reactivo Alamar Blue para evaluar la actividad metabólica en hongos fitopatógenos.

Asimismo, estudios sobre microencapsulación señalan que el uso de matrices como maltodextrina y goma arábiga favorece la estabilidad del aceite esencial y prolonga su liberación en el medio (Reis et al., 2021). Esto podría explicar la inhibición observado incluso en concentraciones intermedias, ya que la microencapsulación protege los compuestos bioactivos y mejora su biodisponibilidad, como también lo reporta Silva *et al*. (2023) en su ensayo colorimétrico basado en resazurina para la

evaluación de diferentes fungicidas en contra de hongos patógenos. En comparación con los tratamientos controles, especialmente el fungicida químico, se evidencia que las formulaciones microencapsuladas del aceite esencial generan una inhibición comparable en los pozos donde el color se mantiene azul. Esto coincide con lo reportado por Pérez *et al*. (2021), quien encontró que aceites esenciales encapsulados poseen una eficacia similar a fungicidas convencionales, con la ventaja adicional de reducir toxicidad y riesgos ambientales.

En general, los presentes resultados respaldan que los aceites esenciales microencapsulados representan una alternativa sostenible para el control de *C. fulvum*, mostrando una respuesta antifúngica dependiente de la concentración, coherente con investigaciones previas que evalúan la actividad biológica de compuestos bioactivos en sistemas de microdilución (Nazzaro *et al.,* 2013).

La transición observada en la placa del azul al rosado permite establecer de manera precisa la MIC y confirma la capacidad del aceite para mantener su actividad antifúngica incluso tras el proceso de microencapsulación. Los resultados del presente estudio confirman que el aceite esencial de *Eucalyptus* sp., microencapsulado, representa una alternativa sostenible y eficaz para el control de *Cladosporium fulvum*. Además, al comparar con investigaciones previas, se evidencia una tendencia hacia la actividad antifúngica de los aceites esenciales.

## 3.1 Comprobación de la hipótesis

**Ho: < 0,05:** Se rechaza la hipótesis nula**.**

**Ha:** Se acepta la hipótesis alternativa, se concluye que existe diferencia significativa entre los porcentajes de inhibición de crecimiento micelial (ICM) del aceite esencial de eucalipto con diferentes concentraciones de A.E microencapsulado.

# CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

## 4.1 Conclusiones

- A partir de la concentración del 6% de aceite esencial de *Eucalyptus* sp. microencapsulados se alcanzó un 100 % de inhibición del crecimiento micelial de *C. fulvum* a los 7 y 14 días de evaluación.
- La mínima concentración inhibitoria del aceite esencial de *Eucalyptus* sp. sobre *C. fulvum* fue de 6 % en el método de dilución en agar mientras que en el método de microdilución a partir de 5% no existió crecimiento micelial.

## 4.2 Recomendaciones

- Evaluar el efecto protector contra *C. fulvum* en plantas de tomate y hortalizas, utilizando las concentraciones de 5 y 6% versus un control sin aceite esencial microencapsulado.
- Evaluar estas mismas concentraciones de aceite esencial microencapsulado de eucaliptus frente a diferentes patógenos como *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea* en condiciones *in vitro*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS


Agatonovic, S., Ristivojevic, P., Gegechkori, V., Litvinova, M., & Morton, D. (2020). Essential Oil Quality and Purity Evaluation via FT-IR Spectroscopy and Pattern Recognition Techniques. *Applied Sciences*, 10(20), 7294 https://doi.org/10.3390/app10207294

Aghayev, J. (2022). Diseases of solanaceous crops and integrated management of Cladosporium fulvum Cooke and Oidium lycopersici Cooke et Masse of tomato. *Ukrainian Journal of Ecology*, 12(3), 87-94 https://www.ujecology.com/articles/diseases-of-solanaceous-crops-and-integrated-management-of-emcladosporium-fulvum-cookeem-and-emoidium-lycopersici-cookeem-et-masse-90636.html

Altay, O., Köprüalan, O., İlter, I., K, E., & Jafari, S. (2024). Spray drying encapsulation of essential oils; process efficiency, formulation strategies, and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* , 1139-1157 https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2113364

Alzate, N. (2009). Evaluación preliminar de la actividad fungicida de los aceites. *Ciencias Químicas*, 59-71 https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/3631002.pdf

Amin, K., Kawsar, M., Rahaman, T., & Hossain, M. (2025). Fourier transform infrared spectroscopic technique for analysis of inorganic materials: a review. *Nanoscale Advances*, 6677-6702 https://doi.org/10.1039/d5na00522a

Ammad, F., Bentoumi, Y., Lotfi, M., Bachar, G., & Merah, O. (2024). Inhibitory effect of Eucalyptus globulus essential oil against Botryosphaeria dothidea and Fomitiporia mediterranea fungi causing wood diseases in viticulture. *Vegetos*, https://doi.org/10.1007/s42535-024-01081-1

Ashaq, B., Mohd, S., Rasool, K., Haib, S., Rouf, M., Parveen, S., . . . Rizwan, R. (2025). Nanoencapsulación de aceite esencial de limoncillo y bioactivos

extraídos mediante ultrasonidos a partir de residuos, utilizando goma arábiga y maltodextrina como material de pared. *Revista Internacional de Macromoléculas Biológicas*, Volumen 322, Parte 2 https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.146800

Asres, Y., Hymete, A., Admassu, H., & Ayalew, A. (2025). Characterization of Microencapsulated Thymus schimperi Essential Oil Prepared by Spray and Freeze-Drying Using Gum Arabic as Carrier Material. *Food Science and Nutrition*, 13(7): 70604 https://doi.org/10.1002/fsn3.70604

Ayllón, R., Díaz, L., Montaño, M., Haro, M., & Córdova, I. (2024). Applications of Plant Essential Oils in Pest Control and Their Encapsulation for Controlled Release: A Review. *Agriculture*, 14(10), 1766 https://doi.org/10.3390/agriculture14101766

Belabess, Z., Gajjout, B., Legrifi, E., & Lahlali, R. (2024). Exploring the Antifungal Activity of Moroccan Bacterial and Fungal Isolates and a Strobilurin Fungicide in the Control of Cladosporium fulvum, the Causal Agent of Tomato Leaf Mold Disease. *Plants*, 13(16), 2213. https://doi.org/10.3390/plants13162213

Bolutari, E., Zimmermann, D., Barros, A., & Barbosa, N. (2015). Chemical composition and antifungal activity of essential oil from Eucalyptus smithii against dermatophytes. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropica*, 48(6):746-75 http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0188-2015

Bonaldo, M., Freitas, R., Stangarlin, J., & Silva, M. (2007). Contribuição ao estudo das atividades antifúngica e elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja por eucalipto (Eucalyptus citriodora)*. *Summa Phytopathologica,* , 383-387 https://www.scielo.br/j/sp/a/RYFxbbLxHLKWrv4hyhgVNBb/?format=pdf&lang=pt.

Caetano, A., Cardoso, M., Reenviar, M., Chalfuon, S., Martins, M., Gomes, H., . . . Oliveira, J. (2022). Antifungal activity of poly(ε-caprolactone) nanoparticles incorporated with Eucalyptus essential oils against Hemileia vastatrix. *Lett Appl Microbiol*, 75(4):1028-1041 https://doi: 10.1111/lam.13782.

Charccahuana, A. (2023). Enfermedades del tomate. *Agropecuaria Horticultura*, 15-16 https://books.instituto-idema.org/sites/default/files/2023_08_15_11_06_49_albertocharccahuanagmail.com_Enfermedades_del_tomate.pdf.

Chen, Q., Huyan, Z., Kou, Y., & Xu, L. (2018). Application of Fourier transform infrared spectroscopy for the quality and safety analysis of fats and oils: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(22):3597-3611. https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1500441.

Chibi, A., & Hassaine, A. (2023). Essential Oil of Eucalyptus polybractea chemical Composition, Antifungal, Insect. *Tropical Journal of Natural Product Research*, 4160-4165 https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219423001424.

Cmikova, N., Galovicova, L., Schwarzová, M., Vukic, M., Vukovic, N., Bakay, L., & Kluz, M. (2023). Composición química y actividades biológicas del aceite esencial de Eucalyptus globulus. *Plants* , 12 (5), 1076 https://doi.org/10.3390/plants12051076.

Colimba, J., Minguez, S., & Rodríguez, L. (2022). Programación óptima del riego para el cultivo de tomate en invernadero ( Solanum lycopersicum L.) en Ecuador. *Agronomía*, 12 (5), 1020 https://doi.org/10.3390/agronomy12051020.

Devrnja, N., & Milutinović, M. (2022). When scent becomes a weapon—plant essential oils as potent bioinsecticides. *Sustainability*, 14(11), 6847. https://doi.org/10.3390/su14116847.

Duarte, P., Wlodarkieviez, M., do Nacimiento, L., Puton, B., Fischer, B., Fernandes, l., . . . Junges, A. (2022). Microencapsulation of Citronella Essential Oil (Cymbopogon winterianus) with Different Wall Materials Using Spray Drying. *Letter in Applied NanoBioScience*, Volume 12, 3, https://doi.org/10.33263/LIANBS123.071.

Elgat, W., Kordy, A., Bohm, M., Cerny, R., Megeed, A., & Salem, M. (2020). Eucalyptus camaldulensis, Citrus aurantium, and Citrus sinensis Essential Oils

as Antifungal Activity against Aspergillus flavus, Aspergillus niger, Aspergillus terreus, and Fusarium culmorum. *Processes*, (8) 1003 https://doi.org/10.3390/pr8081003.

Fammad, F., Bentoumi, Y., Gharnaout, M. Z., & Merah, O. (2024). Inhibitory effect of Eucalyptus globulus essential oil against Botryosphaeria dothidea and Fomitiporia mediterranea fungi causing wood diseases in viticulture. *Research Articles*, 1-6 https://doi.org/10.1007/s42535-024-01081-1.

Gakuubi, M., Maina, A., & Wagacha, J. (2017). Actividad antifúngica del aceite esencial de Eucalyptus camaldulensis Dehnh. contra especies seleccionadas de Fusarium. *International journal of Microbiology*, https://doi.org/10.1155/2017/8761610.

Gupta, I., Singh, R., Muthusamy, S., Sharma, M., Grewal, K., Singh, H., & Batish, D. (2023). Plant Essential Oils as Biopesticides: Applications, Mechanisms, Innovations, and Constraints. *Plants*, 12(16), 2916; https://doi.org/10.3390/plants12162916.

Hanif, M., Nisar, S., Khan, G., Mushtaq, Z., & Zubair, M. (2019). . Essential oils. EnEssential Oil Research. Trends in biosynthesis, analytics, industrial applications and biotechnological production. *(Ed. Malik S.)*, 3-17. Springer Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-16546-8_1.

Herman, T., Goersch, C., Bocca, A., & Fernandes, L. (2024). Resazurin to determine the minimum inhibitory concentration on antifungal susceptibility assays for Fonsecaea sp. using a modified EUCAST protocol. *Braz J Microbiol*, 55(2):1349-1357 https://doi.org/10.1007/s42770-024-01293-2.

Kisinza, W. (2021). Composición química de los aceites esenciales de Eucalyptus gbulus y Eucalyptus maculata cultivados en Tanzania. *Ciencia África* , 1-6 https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2021.e00758.

Kumar, S., Saini, R., Suthar, P., Kumar, V., & Sharma, R. (2022). Plant Secondary Metabolites. En: Plant secondary metabolites. *Their food and therapeutic importance*, , pp. 371-413. https:// doi.org/10.1007/978-981-16-4779-6_12.

laala, G., Irshad, G., Naz, F., & Hafiz, A. (2023). Microencapsulation of Eucalyptus globulus essential oil anti-fungal sachet against blue mold on peaches. *Journal of Plant Protection Research*, 4: 428–439 https://journals.pan.pl/Content/129612/PDF/OA_07_JPPR_63_4_1650_Laala.pdf.

Larkin, P., & Infrared, J. (2018). Spectroscopy. *Principles and spectral interpretation,*, 66-81 https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/743/1/Cap%206%20Analisis%20de%20los%20espectros%20de%20infrarrojo.pdf.

Laureanti, E., Thainnane, S., Paiva, S., & Matos, J. (2023). Microencapsulation of bioactive compound extracts using maltodextrin and gum arabic by spray and freeze-drying techniques. *International Journal of Biological Macromolecules*, 253(Pt 4):126969 https://doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.126969.

Leiva, M., Bustillos, D., Arteaga, C., Hidalgo, K., Guevara, D., López, O., . . . Bustillos, A. (2025). Antifungal Mechanisms of Plant Essential Oils: A Comprehensive Literature Review for Biofungicide Development. *Agriculture*, 15(21), 2303 https://doi.org/10.3390/agriculture15212303.

López, A., Plascencia, J., Lizardi, E., Burgos, R., Guadalupe, A., & Onofre, M. (2015). Antifungal and antimycotoxigenic activity of essential oils from Eucalyptus globulus, hymus capitatus and Schinus molle. *Food Sci. Technol, Campinas*, 35(4): 664-671, http://dx.doi.org/10.1590/1678-457X.6732.

Melo, A., Turola, R., Chaves, F., Cándido, W., Barboza, J., Alvarenga, D., . . . Germano, R. (2022). Effect of Microencapsulation on Chemical Composition and Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Properties of Lemongrass (Cymbopogon flexuosus) Essential Oil. *Food Technology y Biotechnology*, https://doi.org/10.17113/ftb.60.03.22.7470.

Merghni, A., Belmamoun, A., Urcan, A., Bobis, O., & Lassoued, A. (2023). 1,8-Cineol (Eucalyptol) Disrupts Membrane Integrity and Induces Oxidative Stress in

Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. *Antioxidants*, 12(7), 1388 https://doi.org/10.3390/antiox12071388.

Mondragón, P. (2017). Espectroscopia de infrarrojo para todos. *Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado*, 33-34 https://ciatej.mx/files/divulgacion/divulgacion_5a43b7c09fdc1.pdf.

Montoya, C. (2010). Aceites Esenciales una alterntiva de diversificación para el eje cafetero. *Seción de publicaciones Universidad Nacional de Colombia*, 12-174 http://bdigital.unal.edu.co/50956/7/9588280264.pdf.

Morcia, M., Malnati, M., & Terzi, V. (2012). In vitro antifungal activity of terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1,8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens. *Food Additives y Contaminants*, 29(3):415-22 https://doi.org/10.1080/19440049.2011.643458.

Muthee, M., Maina, A., & Wagacha, D. (2017). Antifungal Activity of Essential Oil of Eucalyptus camaldulensis Dehnh. against Selected Fusarium spp. *International Journal of Microbiology*, 1-7 http://dx.doi.org/10.1155/2017/8761610.

Nazario, F., Fratianni, F. M., & Coppola, R. (2013). Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451-1474 https://doi.org/10.3390/ph6121451.

Oliveira, D., Souza, E., Almeida, E., Silva, T., Oliveira, H., & Cavalcant, M. (2022). Microencapsulation of Cymbopogon citratus D.C. Stapf Essential Oil with Spray Drying: Development, Characterization, and Antioxidant and Antibacterial Activities. *Application of Innovative Spray Drying Technology on Food Engineering*, 11(8), 1111; https://doi.org/10.3390/foods11081111.

Pérez, M., Valdés, R., Alcalá, C., Canche, C., & Castillo, F. (2021). A review of nano and micro-encapsulated phytochemical compounds for. *Acta agrícola*, 1006 https://doi.org/10.30973/aap/2021.7.0071005.

Petiti, J., Caria, S., Revel, L., Pegoraro, M., & Diivieto, C. (2024). Standardized Protocol for Resazurin-Based Viability Assays on A549 Cell Line for Improving Cytotoxicity Data Reliability. *Cells*, 13(23), 1959 https://doi.org/10.3390/cells13231959.

Piñeros, N., & Cusva, C. (2020). Microencapsulación de aceite de oliva y evaluación de la microencapsulación de aceite de Eucalipto Citriodora por el método de secado por Atomización (Spray-Drying). *Departamento de Ingenieria Química. Universidad de los Andes*, 10-30 http://hdl.handle.net/1992/48732.

Pipatpaiboom, N., Parametthanuwat, T., Bhuwakietkumjohn, N., Ding, Y., & Sichamnam, S. (2025). Improving the Efficiency of Essential Oil Distillation via Recurrent Water and Steam Distillation: Application of a 500-L Prototype Distillation Machine and Different Raw Material Packing Grids. *Agri Engineering*, 7(6), 175 https://doi.org/10.3390/agriengineering7060175.

Popov, S., & Smirnov, A. (2024). New data on the survival of tomato pathogens after overwintering. *Agricultural Biology*, V. 59, Iss. 3, pp. 561-570 http://www.agrobiology.ru/articles/3-2024popov-eng.pdf.

Pujiarti, R., Hadi, H., & Sunarta, S. (2018). Actividad antifúngica del aceite de Eucalyptus urophylla contra Aspergillus niger y Fusarium oxysporum. *Journal of Agricultural Science*, 40(1): 55-62 https://doi.org/10.17503/agrivita.v40i1.990.

Rajab, L., Dayoub, A., Gazal, I., & Ahmad, M. (2025). The fungal strain and inoculation method mediate the endophytic activity of Beauveria bassiana and its impact on the growth of cucumber plants and the population of Liriomyza sativae. *Plant Protection Research*, 65(1):61-74 https://doi.org/10.24425/jppr.2025.153817.

Rampersad, N. (2012). Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel)*, 12(9):12347-60 https://doi: 10.3390/s120912347.

Rohman, A. G. (2020). Comprehensive review on application of FTIR spectroscopy coupled with chemometrics for authentication analysis of fats and oils in the food products. *Molecules*, 25(22), 5485 https://doi.org/10.3390/molecules25225485.

Sareriya, K., Piyush, B., J, V., & Subarna, M. (2024). Optimization of Eucalyptus essential oil extraction by applying response surface methodology in traditional distillation and its adaption to solar thermal process. *Sustainable Energy Research* , 25 https://doi.org/10.1186/s40807-024-00118-y.

Silva, T., Moreira, S., Assis, F., Campos, S., Gomes, A., Oliveira, T., . . . Leite, P. (2023). An Accurate, Affordable, and Precise Resazurin-Based Digital Imaging Colorimetric Assay for the Assessment of Fungicide Sensitivity Status of Fungal Populations. *Agonomy*, 13(2), 343 https://doi.org/10.3390/agronomy13020343.

Singh, K., Deepa, N., Chauchan, S., Tandon, S., Swaroop, R., & Singh, A. (2024). Antifungal action of 1,8 cineole, a major component of Eucalyptus globulus essential oil against Alternaria tenuissima via overproduction of reactive oxygen species and downregulation of virulence and ergosterol biosynthetic genes. *Industrial Crops and Products*, 118-580 https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.118580

Sousa, V., Parente, J., Marques, J., Forte, M., & Tavares, C. (2022). Microencapsulation of Essential Oils: A Review. *Advances in Sustainable Polymeric Materials*, 14(9), 1730 https://doi.org/10.3390/polym14091730

Thi, N., Thi, L., Nhu, D., & Dan Chi Nguyen. (2021). Microencapsulación de aceites esenciales mediante secado por aspersión y factores influyentes. *Instituto de Biotecnología y Medio Ambiente, Universidad Tay Nguyen, Buon Ma*, 4-6 https://doi.org/10.1155/2021/5525879

Thomma, B. (2005). Cladosporium fulvum (syn. Passalora fulva), a highly specialized plant pathogen as a model for functional studies on plant pathogenic

Mycosphaerellaceae. *Patología molecular de plantas* , 379-393 https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00292.x

Tomazoni, E. Z., Pauletti, G., Ribeiro, R., Moura, S., & Schwambach, J. (2017). Actividad in vitro e in vivo de aceites esenciales extraídos de Eucalyptus staigeriana , Eucalyptus globulus y Cinnamomum camphora frente a Alternaria solani Sorauer causante del tizón temprano en tomate. *Scientia Horticulturae*, 72-77 https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.04.033

Tsukatani, A., Suenaga, H., Shiga, H., & Matsumoto, K. (2014). A rapid microplate method for the proliferation assay of fungi and the antifungal susceptibility testing using the colorimetric microbial viability assay. *Lett Appl Microbiol*, 59(2):184-92 https://doi.org/10.1111/lam.12264

Vania, I., Parente, J., Marques, J., Forte, M., & Tavares, C. (2022). Microencapsulation of Essential Oils: A Review. *Polymers*, (9):1730 https://doi.org/10.3390/polym14091730

Vincent, M. (1947). Distortion of Fungal Hyphæ in the Presence of Certain Inhibitors. *Nature*, 850 https://www.nature.com/articles/159850b0

Yilmaz, H., & Mürüvvet, M. (2025). Evaluation of Pesticide Use in Greenhouse Tomato Production in the Context of Sustainability, Food Safety and Export Residue Notifications. *Agricultural Sciences*, 46-58 https://doi.org/10.15832/ankutbd.1469332

Zhang, H., & Du, G. (2004). Assay of mitochondrial functions by resazurin in vitro. *Acta Pharmacol Sin*, 385-389 https://www.researchgate.net/publication/227911012_Investigation_of_the_Alamar_Blue_resazurin_fluorescent_dye_for_the_assessment_of_mammalian_cell_cytotoxicity_Resazurin_as_a_cytotoxicity_assay

Zhao, Y., Wang, Y., Zhang, Z., & Huizhen, L. (2023). Advances in Controllable Release Essential Oil Microcapsules and Their Promising Applications. *Molecules*, 28(13), 4979 https://doi.org/10.3390/molecules28134979

## ANEXOS

**Anexo 1.** *Microencapsulación del aceite esencial de Eucalipto.*



**Anexo 2.** *Método de dilución en agar de los AEM (ICM).*



**Anexo 3.** *Método de dilución en placas multipocillos (MCI).*



**Anexo 4.** *Lecturas de placas multipocillo relacionada con la absorbancia (600nm) medida en lector de multiplaca (EPOCH).*

