UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Tema: Evaluación de la actividad antifúngica de los aceites esenciales microencapsulados de *Salvia rosmarinus* (romero) y *Mentha piperita* (menta negra) frente a *Cladosporium fulvum* Cooke

---

Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniera Biotecnóloga, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Allison Anabel Chérrez Carriel

Tutor: Dr. Orestes Darío López Hernández

Ambato – Ecuador

Febrero – 2025

APROBACIÓN DEL TUTOR

Dr. Orestes Darío López Hernández

CERTIFICA

Que el presente Informe Final del Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación 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, 20 de enero de 2025



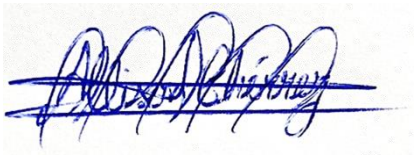
Dr. Orestes Darío López Hernández

1754784864

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Allison Anabel Chérrez Carriel manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Allison Anabel Chérrez Carriel

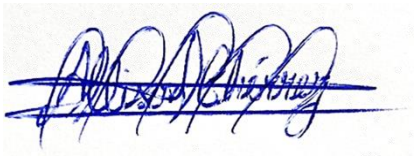
1850608520

AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga uso 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.

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



Allison Anabel Chérrez Carriel

1850608520

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

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

Para constancia firman:

Firmado electrónicamente por:
LILIANA PATRICIA ACURIO ARCOS

Presidente del Tribunal

Firmado electrónicamente por:
MIRARI YOSUNE ARANCIBIA SORIA

Dra. Mirari Yosune Arancibia Soria

1802142461

Firmado electrónicamente por:
HELENA MARITZA DE LA TORRE OLVERA

Dra. Helena Maritza De la Torre Olvera

130965199-8

Ambato, 30 de enero de 2025

DEDICATORIA

A Dios

por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida, por los triunfos y los momentos difíciles que me ha enseñado a valorarlo cada día más.

A mis padres

Abel y Elena quien con sus consejos han sabido guiarme para culminar mi carrera profesional y demostrarme con su ejemplo que todo con amor y esfuerzo es posible.

A mis hermanas y sobrinita

Cynthia, Arlette y Ellie por su amor y apoyo incondicional.

Allison Chérrez

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mis padres por su gran sacrificio de apoyarme en este camino de la educación y a Dios por haberme dado la fuerza y el valor para culminar esta etapa de mi vida.

Agradezco a mi tutor PhD. Orestes López por su sabiduría, enseñanza y apoyo para la realización de mi proyecto final, con su humildad que le caracteriza.

Agradezco al proyecto de investigación "Colección de aislados monospóricos de Cladosporium fulvum Cooke que afectan a Solanum lycopersicum L. *y detección de genes de avirulencia presentes en la provincia de Tungurahua" coordinado por el Phd. Michel Leiva Mora aprobado mediante Resolución Nro. UTA-CONIN-2023-0296-R el 4 de octubre del 2023 de la Facultad de Ciencias agropecuarias, por facilitarme el aislado monospórico de Cladosporium fulvum CC-FCAGP-Cf-EA 1008. De igual forma agradezco al mencionado doctor por su ayuda en el diseño experimental y en ejecución de los ensayos de actividad antifúngica y en el procesamiento estadístico de los datos obtenidos.*

Agradezco a mis demás familiares Cynthia, Arlette, Ellie y Dan a quienes adoro muchísimo ya que con cada uno de sus consejos y amor supieron entenderme en los momentos más difíciles.

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

AGRADECIMIENTOS vii

ÍNDICE DE TABLAS xi

ÍNDICE DE FIGURAS xii

RESUMEN EJECUTIVO xiii

ABSTRACT xiv

CAPITULO I.- MARCO TEÓRICO 1

1.1. Antecedentes Investigativos 1

1.1.1. Moho de la hoja en el cultivo de tomate riñón (*Cladosporium fulvum* Cooke). 1

1.1.1.1. Taxonomía de *Cladosporium fulvum* Cooke. 1

1.1.2. Identificación morfológica 2

1.1.3. Aislamiento en medios de cultivos 2

1.1.5. *Salvia rosmarinus* (romero), *Mentha piperita* (menta negra) y su importancia 3

1.1.6. Uso de los aceites esenciales para el control de plagas y enfermedades .. 3

1.1.6.1. Composición de los aceites esenciales de romero y menta negra 4

1.1.7. Microencapsulación 4

1.1.8. Análisis de espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR) 5

1.1.9. Importancia del estudio 5

1.2. Objetivos 5

1.2.1. Objetivo general 5

1.2.2. Objetivos específicos 5

CAPÍTULO 2.- METODOLOGÍA 7
2.1. Materiales y Equipos 7
2.2. Métodos 8
2.2.1. Microencapsulación de los aceites esenciales de *Salvia rosmarinus* y *Mentha piperita* mediante secado por aspersión. 8
2.2.1.1. Preparación de la microencapsulación de los aceites esenciales de romero y menta. 8
2.2.1.2. Secado por aspersión con "Spray drying" 8
2.2.2. Evaluación de la eficiencia de la microencapsulación utilizando espectroscopia infrarroja de ransformada de Fourier (FTIR) 8
2.2.3. Comprobación de la actividad antifúngica del microencapsulado de los aceites esenciales de *Salvia rosmarinus* y *Mentha piperita* de forma *in vitro* sobre *C. fulvum* Cooke. 9
2.2.3.1. Método de difusión en agar 9
2.2.3.1.1. Material biológico fitopatógeno 9
2.2.3.1.2. Preparación y siembra del inóculo 9
2.2.3.1.3. Tratamientos de estudio 9
2.2.3.1.4. Medición de las colonias de los aislados monospóricos de C. fulvum Cooke en medio de cultivo PDA 10
2.2.3.1.5. Descripción de las características de las colonias 10
2.2.3.1.6. Diseño Experimental 11
2.2.3.2. Microdiluciones 11
CAPÍTULO 3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN 13
3. Análisis y discusión de resultados 13
3.1. Microencapsulación de aceites esenciales de romero y menta 13
3.2. Evaluación de la eficiencia de microencapsulación 14
3.2.1. Evaluación cualitativa de la microencapsulación de A.E de *Salvia rosmarinus* (Romero) mediante FT-IR 15

3.2.2. Evaluación cualitativa de la microencapsulación de A.E de *Mentha piperita* (menta negra) mediante FTIR 19

3.3. Efecto antifúngico de los microencapsulados de A.E de romero y menta sobre el crecimiento micelial de *C. fulvum* Cooke. 23

3.3.1. Efecto inhibitorio por el método de difusión en agar 23

3.3.2. Características de las colonias de *C. fulvum* Cooke 28

3.3.3. Efecto de las microdiluciones en el ensayo de viabilidad con Alamar Blue frente a *C. fulvum* Cooke) 30

3.3.3.1. Porcentaje de inhibición 31

3.4. Verificación de hipótesis 32

C. MATERIALES DE REFERENCIA 34

Referencias Bibliográficas 34

Anexos 39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de *Cladosporium fulvum* Cooke. 1

Tabla 2. Composición del aceite esencial de *Salvia rosmarinus.* 4

Tabla 3. Composición del aceite esencial de *Mentha piperita.* 4

Tabla 4. Determinación de factores y asignación de tratamientos 9

Tabla 5. Características de los controles de estudio 10

Tabla 6. Resultado de los valores del espectro infrarrojo para la muestra de A.E de romero 17

Tabla 7. Resultado de los valores del espectro infrarrojo para la muestra de aceite esencial de menta 22

Tabla 8. Resultado del crecimiento micelial de *C. fulvum* Cooke sobre los diferentes tratamientos 23

Tabla 9. Análisis de varianza 27

Tabla 10. Comparaciones múltiples a través de la prueba de Tukey 27

Tabla 11. Resultado fotográfico de las características de las colonias de *C. fulvum* Cooke para los diferentes tratamientos 28

Tabla 12. Resultado del porcentaje de inhibición de los diferentes tratamientos en el ensayo de Alamar Blue 31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación de la distribución de los tratamientos y controles en la microplaca .. 12

Figura 2. Resultado de la microencapsulación de A.E de romero y menta 13

Figura 3. Espectros infrarrojos de la transformada de Fourier (FTIR) para distintas muestras. A) Espectro de resonancia para la mezcla de polímeros (goma arábiga + maltodextrina); B) Espectro de resonancia para el A.E de romero; C) Espectro de resonancia de A.E.M de romero; D) Espectros de resonancia comparativos de mezcla de polímeros (goma arábiga + maltodextrina), A.E de romero y A.E.M de romero. 16

Figura 4. Espectros infrarrojos de la transformada de Fourier (FTIR) para distintas muestras. A) Espectro de resonancia para la mezcla de polímeros (goma arábiga + maltodextrina); B) Espectro de resonancia para el A.E de menta; C) Espectro de resonancia de A.E.M de menta; D) Espectros de resonancia comparativos de mezcla de polímeros (goma arábiga + maltodextrina), A.E de menta y A.E.M de menta. 21

Figura 5. Diagrama de barras del ICM (%) de las concentraciones del Ac. esencial de romero 24

Figura 6. Diagrama de barras del ICM (%) de las concentraciones del Ac. esencial de menta . 24

Figura 7. Diagrama de barras representando el valor de medias del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (ICM) total para los tratamiento y controles..... 25

Figura 8. Resultado de la prueba con Alamar Blue al 0.1% en *C. fulvum* Cooke con el aceite esencial de romero microencapsulado..... 30

Figura 9. Resultado de la prueba con Alamar Blue al 0.1% en *C. fulvum* Cooke con el aceite esencial de menta microencapsulado. 30

Figura 10. Diagrama de barras representando el porcentaje de inhibición de los aceites esenciales de romero y menta y sus respectivas concentraciones. 32

RESUMEN EJECUTIVO

El romero (*Salvia rosmarinus*) es una planta aromática que tiene una larga historia de uso en la medicina tradicional al actuar como aceite esencial proporciona funciones, en las cuales la más destacada es su actividad antifúngica gracias a su composición química de cineol y borneol. Por otro lado, la menta (*Mentha piperita*) es una planta aromática conocida por su intenso sabor y aroma mentolado y el uso del aceite esencial contiene propiedades potentes de acción antifúngica por su gran composición de mentol, responsable de alterar la membrana celular fúngica o llegar a detener por completo el crecimiento de los hongos. En esta investigación se centró en la evaluación de la actividad antifúngica de los aceites esenciales de romero y menta negra microencapsulados contra *Cladosporium fulvum* Cooke. Los aceites fueron encapsulados mediante el método de microencapsulación por secado por aspersión aplicando la mezcla de maltodextrina y goma arábiga como polímeros microencapsulantes. Los ensayos *in vitro* se dieron a diferentes concentraciones de los tratamientos en estudio y fueron comparados con un grupo control. Demostrando que el aceite esencial de menta negra llegó a ser el más efectivo para poder controlar el hongo fitopatógeno por su resultado de 66,8 por ciento del crecimiento micelial inhibitorio. Estos resultados sugieren que esta técnica de microencapsular los aceites esenciales son de gran potencial actuando como fungicida natural para controlar el fitopatógeno *C. fulvum* Cooke en cultivos, siendo una vía sostenible y amigable con el medio ambiente.

Palabras claves: Microencapsulación, aceites esenciales, fitopatógeno, actividad antifúngica, aplicaciones agrícolas, control biológico.

ABSTRACT

Rosemary (*Salvia rosmarinus*) is an aromatic plant with a long history of use in traditional medicine. As an essential oil, it provides various functions, the most notable being its antifungal activity due to its chemical composition of cineole and borneol. On the other hand, Peppermint (*Mentha piperita*) is an aromatic plant known for its intense flavor and minty aroma. Its essential oil contains potent antifungal properties, largely attributed to menthol, which can disrupt fungal cell membranes or completely inhibit fungal growth. This study focused on evaluating the antifungal activity of microencapsulated essential oils of rosemary and black peppermint against *Cladosporium fulvum* Cooke. The oils were encapsulated using the spray-drying microencapsulation method, employing a mixture of maltodextrin and gum arabic as microencapsulating polymers. In vitro tests were conducted with different concentrations of the treatments under study and compared with a control group. Results showed that black peppermint essential oil was the most effective in controlling the phytopathogenic fungus, achieving a 66.8% inhibitory effect on mycelial growth. These findings suggest that the microencapsulation technique for essential oils holds great potential as a natural fungicide to control the phytopathogen *C. fulvum* Cooke in crops, offering a sustainable and environmentally friendly solution.

Keywords: Microencapsulation, essential oils, phytopathogen, antifungal activity, agricultural applications, biological control.

CAPITULO I.- MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes Investigativos

1.1.1. Moho de la hoja en el cultivo de tomate riñón (*Cladosporium fulvum* Cooke).

En el Ecuador la producción de tomate riñón ha crecido notable en los últimos años, ya que los pequeños y grandes productores de la sierra buscaron nuevas vías de producción como los invernaderos, para obtener condiciones favorables para un buen desarrollo del cultivo (Jano, 2019). Guerrero (2018), menciona que el tomate riñón es una de las hortalizas con tradición ancestral en el Ecuador, es considerado ser parte de la dieta alimentaria y producto básico en el consumo por su alto contenido de vitamina C y licopenos **(Castillo & Castillo, 2021).** Sin embargo, el cultivo de tomate riñón suele afectarse por plagas y enfermedades debidos a diferentes factores o patógenos, lo que genera una problemática a estudiar y buscar una vía adecuada para su control.

Uno de los patógenos es el fitopatógeno *Cladosporium fulvum* Cooke proveniente del género *Cladosporium* el cual cuenta con numerosas especies de hongos como las saprofitas las cuales son especiales por su alimentación de la materia orgánica muerta. Este es característico por infectar a plantas del género *Solanum* más conocido como el tomate, causando la enfermedad de la "mancha de la hoja"; este hongo es capaz de crecer en condiciones de alta húmeda lo que hace su crecimiento fácil en invernaderos y en climas húmedos **(Bernal, 2019)**.

Se opta por los plaguicidas para controlar la acción del hongo fitopatógeno, muchas de las veces se suele aplicar una gran cantidad, por lo que sería también dañino para la especie. Sin embargo, la Biotecnología provee de nuevas alternativas para prevenir al cultivo ante un patógeno, entre ellas, la extracción de los aceites esenciales de romero y menta por su composición de ácido rosmarínico, terpenoides y mentenoles los cuales servirían como protección antibacteriana y antifúngica **(Flores et al., 2020)**.

1.1.1.1. Taxonomía de *Cladosporium fulvum* Cooke.

Tabla 1. Taxonomía de *Cladosporium fulvum* Cooke.

Reino	*Fungi*
Hongo	Mitospóricos
División	*Eumycota*
Subdivisión	*Deuteromycotina*
Clase	*Hyphomycetes*

Fuente: **(Berra & Laucirica, 1999)**.

1.1.2. Identificación morfológica

La morfología en condiciones in vitro de *C. fulvum* se suele identificar los micelios por medio del microscopio óptico y su preparación debe ser con fragmentos de 0,2 mm de diámetro, asimismo se realiza la medición de cada estructura del hongo para terminar con la comparación de las dimensiones y se dispone la especie y genero según su morfología.

Una de las características principal en la morfología es cuando se identifican las estructuras microscópicas. El crecimiento de las hifas se da por alargamiento del ápice el llamado crecimiento polarizado, y todo este conjunto se lo conoce como el micelio **(Senasica, 2019).** Las hifas pueden ser continuas y alternativas los cuales se dividen en tabiques simples o complejos. A medida que los micelios crecen, forman tejidos falsos que luego se convierten en las partes visibles del hongo, como las setas, y en las estructuras que producen esporas.

1.1.3. Aislamiento en medios de cultivos

El crecimiento y esporulación micelial del hongo *C. fulvum* Cooke se da gracias al uso del medio de cultivo Agar de Dextrosa de Patata (PDA) ya que brinda los nutrientes necesarios en un intervalo de temperaturas entre 20 y 25 °C, mostrando diferencia y aumento en los aislados con respecto a su crecimiento **(Jácome, 2022)**.

Asimismo, el crecimiento de micelios de manera *in vitro* es valioso por algunas razones sobre todo en aplicaciones agrícolas ya que se logra comprender la biología y ciclo de vida por medio del hongo al examinar cuanto invade el tejido vegetal y factores que favorecerían y suele estudiar el comportamiento que logre diseñar estrategias de control biológico que permitan analizar microorganismos antagonistas que inhiban su crecimiento **(Romero et al., 2020)**.

1.1.4. Ensayo de Alamar Blue

Pesch y Simmert fueron los primeros en utilizar la resazurina con el objetivo de apreciar el contenido bacteriano de la leche y desde ese entonces se ha utilizado en las últimas décadas para el monitoreo de la contaminación bacteriana o microbiológica (**Punithavathy et al., 2021)**.

El colorante Alamar Blue está compuesto químicamente por resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona-10-óxido), este es un colorante no fluorescente y de color azul en su estado oxidado **(Herman et al., 2023)**. Al preparar las soluciones el color azul se reduce a color rosa (resorufina) demostrando la alta actividad metabólica, asimismo es considerablemente utilizado como un indicador de viabilidad celular en muchos ensayos de citotoxicidad, proliferación y crecimiento celular por su ser un método rápido, no toxico y altamente sensible.

1.1.5. *Salvia rosmarinus* (romero), *Mentha piperita* (menta negra) y su importancia

La región sierra del Ecuador son zonas con mayor variedad de climas y especies vegetales incluyendo las endémicas, que brindan un gran aporte en la agricultura y la medicina a los habitantes.

Salvia rosmarinus comúnmente conocido como romero, es una planta de hojas perennes de color verde con flores azules blanquecinas, tiene varios usos aplicados a la industria cosmética, alimentaria y en la preparación de perfumes y fragancias. Una de las funciones importantes del romero es su uso en la medicina tradicional ya que es capaz de tratar desde un dolor de cabeza hasta anomalías circulatorias **(Miladi et al., 2018)**. Además, posee compuestos activos con gran actividad antioxidante entre los cuales se encuentran los ácidos fenólicos, flavonoides y terpenos, los cuales son tema de estudio para demostrar los efectos de sus moléculas contra afecciones patológicas.

Por otro lado, *Mentha piperita* conocida como la menta negra es una planta herbácea de la familia Lamiaceae característica por su aroma fresco y mentolado y por su amplio uso en diversas culturas gracias a las propiedades medicinales y culinarias que posee. Se emplea en infusiones que ayudan a la digestión y tradicionalmente mostraban resultados positivos como calmante y estimulante. La menta negra es rica en mentol, mentona, limoneno y cineol lo que le hace una planta esencial para el manejo e inhibición del crecimiento de hongos patógenos **(García, et al. 2019)**.

1.1.6. Uso de los aceites esenciales para el control de plagas y enfermedades

Las plantas de forma natural son conocidas por poseer Aceites Esenciales (A.E) en su composición y además por su efecto curativo que es demostrado por los ancestros los cuales han hecho uso en la medicina tradicional. En los últimos tiempos los A.E se han involucrado con más interés en los estudios por sus grandes características fisicoquímicas y la capacidad de no generar residuos nocivos de fuente natural **(Hidalgo, 2021)**.

En este caso, en el campo agronómico el uso de los A.E como agentes de control biológico es una de las estrategias con propiedades naturales y compuestos esenciales como los terpenoides, óxidos, éteres, alcoholes, aldehídos, son antioxidantes, antimicrobianos e insecticidas los cuales permiten combatir plagas y enfermedades que afecten a diferentes plantas y cultivos puesto que viene a ser una de las opciones válidas frente al uso de fungicidas tradicionales o sintéticos **(Bustamante, 2020)**, de tal manera que contribuya a una agricultura más ecológica y sostenible.

1.1.6.1. Composición de los aceites esenciales de romero y menta negra

Tabla 2. Composición del aceite esencial de *Salvia rosmarinus.*

Componente	Porcentaje (%)
Alfa pineno	15,3
Camfeno	5,7
Mirceno	4,9
Limoneno	3,7
1,8 cineol	21,5
Alcanfor	18,0
Cariofileno	3,4
Borneol	3,7

Fuente: **(Flores-Villa et al., 2020).**

Tabla 3. Composición del aceite esencial de *Mentha piperita.*

Componente	Porcentaje (%)
Mentol	30 – 50
Mentona	15 – 30
Acetato de metilo	2,5 – 10
Isomentona	2 – 10
Mentanona	1 – 5
1,8 Cineol (Eucaliptol)	3 – 8
Limoneno	1 – 5
Beta – pineno	1 – 2
Mentanol	0,5 – 2
Pulegona	0,5 – 2
Carvona	0,1 – 0,5

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

1.1.7. Microencapsulación

La microencapsulación es la técnica por la cual se mejora la estabilidad oxidativa y degenerativa de los Aceites Esenciales (A.E) capaz de no ser degradado por varios factores ambientales y alargando su vida útil **(Mesa et al., 2019)**. Además, esta técnica busca aprovechar las funciones biológicas ya sea antioxidantes, antiinflamatorias, antifúngicas, entre otras

Un claro ejemplo de mejora como fungicida microencapsulado de aceite esencial se encuentra el de A.E de tomillo (*Thymus vulgaris*) el cual es un fungicida natural que cada vez más se lo utiliza en la agricultura gracias a sus propiedades antifúngicas muy potentes y gracias a su composición de timol y carvacrol son los capaces en destruir las membranas celulares de los hongos patógenos, llevándolo al desgaste celular para terminar con la muerte de este **(Gouin, 2018)**.

Es así como la microencapsulación de los A.E de romero y menta negra mediante el método de secado por aspersión, el cual transforma el material de alimentación rociado a un medio de secado caliente, empezando desde un estado fluido hasta llegar a una forma de partículas secas **(Bakry et al., 2016)**. Este proceso permite a los Aceites Esenciales Microencapsulados (A.E.M) la capacidad de dispersarse en agua y liberar gradualmente el aceite esencial que posee.

1.1.8. Análisis de espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR)

La Espectroscopia Infrarroja por la Transformada de Fourier (FT-IR), es un análisis de espectroscopia vibratoria capaz de detectar los grupos funcionales de diferentes muestras orgánicas e inorgánicas por medio de la medida de absorción de radiación infrarroja estimado en un rango de longitud de onda especifica **(Berna, 2017; Peak, 2005)**.

Este método analiza las características y problemas del fenómeno que se va a evaluar, siendo este empleado comúnmente en los estudios de sistemas biológicos, por su capacidad de obtener un espectro infrarrojo de emisión o absorción de un sólido en este caso el Aceite Esencial Microencapsulado (A.E.M) y dando una compilación sincrónica de datos espectrales de alta resolución **(Albertini et al., 2019).**

1.1.9. Importancia del estudio

Finalmente, el interés de la microencapsulación de estos aceites esenciales muestra una herramienta eficaz y respetuosa en el medio ambiente la cual busca desarrollar y aplicar sus funciones de protección contra las enfermedades por hongos patógenos con la ventaja de ser empleada en la superficie vegetal sin causar ningún daño tóxico. Contando con el beneficio de permitir a los componentes activos liberarse de manera gradual, lo cual hace que aumente la duración de acción a cuál es la llamada liberación controlada.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

- Evaluar la actividad antifúngica de los aceites esenciales microencapsulados de *Salvia rosmarinus* (romero) y *Mentha piperita* (menta negra) frente a *Cladosporium fulvum* Cooke.

1.2.2. Objetivos específicos

- Desarrollar el microencapsulado de los aceites esenciales de *Salvia rosmarinus* y *Mentha piperita* mediante secado por aspersión.
- Analizar la eficiencia de la microencapsulación utilizando espectroscopia infrarroja por la Transformada de Fourier (FT-IR).

- Determinar la actividad antifúngica *in vitro* de los microencapsulados de los aceites esenciales de romero y menta negra frente a *Cladosporium fulvum* Cooke.

CAPÍTULO 2.- METODOLOGÍA

2.1. Materiales y Equipos

Equipos

- Balanza analítica
- Autoclave
- Espectroscopio FTIR Perkin Elmer Spectrum Two
- Mini Spray Dryer BUCHI-B290
- Cámara de flujo laminar
- Refrigerador
- Cámara fotográfica
- Incubadora
- Microscopio
- Lector de microplacas
- Vórtex mixer
- Cámara de Neubauer

Materiales

- Asa Drigalsky
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Espátula
- Micropipetas
- Puntas para micropipeta 200 µl - 20 µl
- Pipetas 1 – 5 mL
- Matraz Erlenmeyer 10 mL
- Tijera
- Cofias
- Cajas Petri 90 mm
- Papel aluminio
- Aguja inoculación
- Tubos de ensayo
- Botellas de vidrio ámbar 10 – 50 mL
- Tubos cónicos
- Frascos de vidrio
- Embudo
- Papel film
- Vasos de precipitación (100 mL – 500 mL)
- Probeta (10 mL - 1 l)
- Mechero Bunsen
- Guantes de examinación
- Mascarillas
- Papel filtro
- Paquete de fundas Ziploc
- Microplacas

Reactivos

- Agua destilada
- Maltodextrina
- Goma arábiga
- Etanol al 70%
- AlamarBlue
- Agar Papa Dextrosa (PDA)
- Caldo de Dextrosa de Papa (PDB)

2.2. Métodos

2.2.1. Microencapsulación de los aceites esenciales de *Salvia rosmarinus* y *Mentha piperita* mediante secado por aspersión.

2.2.1.1. Preparación de la microencapsulación de los aceites esenciales de romero y menta.

Los A.E de romero (*Salvia rosmarinus*) y menta negra (*Mentha piperita*) fueron adquiridos de manera comercial por parte de la empresa "D'SANPI". Y se preparó una emulsión en donde la fase acuosa se mezcló con la goma arábiga y la maltodextrina actuando como agentes microencapsulantes. Por otro lado, la fase oleosa proveniente de los aceites esenciales de romero y menta negra fueron agitados y homogenizados a 20 000 min^{-1} apropiadamente por 5 minutos **(Gonçalves., et al, 2021)**.

2.2.1.2. Secado por aspersión con "Spray drying"

La microencapsulación de los A.E de romero y menta negra se llevó a cabo en los laboratorios de la Unidad Operativas de Investigación y Desarrollo (UODIDE) presentes en la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Una vez obtenida la emulsión fue llevada al equipo BUCHI MINI SPRAY DRYER y fue alimentada a un secador por aspersión con condiciones específicas de presión a -50 atm, temperatura de entrada de 160 °C y temperatura de salida de 80 °C **(Reyes, 2021)**. Después del proceso de microencapsulado se configuró a una temperatura a 70 °C y una vez llegada a esa temperatura se recolectó el A.E.M de la cámara y se dispensó en bolsas de aluminio con cierre hermético para proteger en producto final de la humedad, la luz y el oxígeno **(Pájaro et al., 2018)**.

2.2.2. Evaluación de la eficiencia de la microencapsulación utilizando espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR)

Para la evaluación de la eficiencia de la microencapsulación de los A.E se realizaron a través de la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) y se ejecutó

con un dispositivo de reflexión total atenuada de un espectroscopio infrarrojo Perkin – Elmer spectum two, en el cual se compararon los espectros de los A.E y los A.E.M para detectar la eficiencia cualitativa.

2.2.3. Comprobación de la actividad antifúngica del microencapsulado de los aceites esenciales de *Salvia rosmarinus* y *Mentha piperita* de forma *in vitro* sobre *C. fulvum* Cooke.

2.2.3.1. Método de difusión en agar

2.2.3.1.1. Material biológico fitopatógeno

Se obtuvo los aislados monospóricos del patógeno *C. fulvum* Cooke, en condiciones de laboratorio presentes en la Unidad Operativa de Investigación en Ciencias Agropecuarias (UODIDE – ICAP) bajo la dirección del docente investigador el Dr. Michel Leiva.

2.2.3.1.2. Preparación y siembra del inóculo

Se preparó el medio PDA en matraces de Erlenmeyer de 140 mL de volumen y se añadieron los A.E.M independientemente a diferentes concentraciones (10 – 20 – 30) % los cuales fueron esterilizados en autoclave y vertidos en las placas Petri, asimismo fueron comparados con un grupo de controles, iniciando con el medio PDA sin los A.E, medio PDA con el microencapsulado sin los A.E, medio PDA y los A.E de romero y menta negra puros y por último el fungicida comercial llamado "PREDOSTAR" el cual está compuesto por Metalaxil y Propamocarb en su fórmula, encargados de evitar el crecimiento micelial y la producción de esporas, por lo que es capaz de funcionar como un aceptable fungicida comercial afectando a la membrana celular del hongo y acabando con su desarrollo.

Se esperó la solidificación de los medios de cultivo y se colocó un disco de micelio de 1 mm de diámetro en el centro y se tomó del cultivo puro de *C. fulvum* con la ayuda del instrumento "sacabocados" el cual permitió obtener muestras fúngicas de algunas superficies específicas, siendo este el método de siembra que se basa en el raspado de los conidios evitando variaciones en la inhibición del crecimiento **(Jácome, 2022)**.

2.2.3.1.3. Tratamientos de estudio

Tabla 4. Determinación de factores y asignación de tratamientos

Tratamiento	Aceite esencial		[Microencapsulado]	
T1	A1	Menta	C1	10%
			C2	20%

			C3	30%
T2	A2	Romero	C1	10%
			C2	20%
			C3	30%

Tabla 5. Características de los controles de estudio

Control	Medio de cultivo
Control 1	PDA sin A.E
Control 2	PDA + microencapsulado sin A.E
Control 3	PDA + Fungicida comercial
Control 4	PDA + A.E de menta
Control 5	PDA + A.E de romero

2.2.3.1.4. Medición de las colonias de los aislados monospóricos de *C. fulvum* Cooke en medio de cultivo PDA

Se registraron y almacenaron las medidas del radio de los tratamientos y controles en el séptimo día tomando como punto de referencia el primer día. Finalmente, se obtuvo los promedios y se calculó en porcentajes de inhibición del crecimiento micelial (ICM) por medio de la siguiente formula:

$$\text{ICM}\ (\%) = \frac{\overline{\text{R}_\text{C}} - \overline{\text{R}_\text{T1}}}{\text{R}_\text{C}} \cdot 100$$

Donde:

% ICM = Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial

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

RT = Radio del crecimiento micelial por cada tratamiento

2.2.3.1.5. Descripción de las características de las colonias

Se consideró los caracteres morfológicos cualitativos y cuantitativos para llevar a cabo la caracterización cultural. Se examinó el color del verso, el anverso y el reverso de la colonia, así como su forma, textura, borde, elevación y si tiene o no pigmentación. Asimismo, considerar si hay líquido de transpiración y si la colonia tiene pliegues o grietas **(Jácome, 2022)**.

2.2.3.1.6. Diseño Experimental

A través de esta investigación se buscó evaluar la actividad antifúngica mediante la determinación de la diferencia significativa entre los porcentajes de inhibición de crecimiento micelial (ICM) determinado por la medición del crecimiento de *C. fulvum* Cooke para los diferentes tratamientos descritos en función de la concentración del aceite esencial microencapsulado, comparado además con diversos controles para obtener mayor espectro de resultados. Los datos obtenidos fueron analizados a través del modelo bifactorial con un análisis de varianza (ANOVA) y evaluando su significancia a través de comparaciones con pruebas post-hoc como Tukey ($p \leq 0,05$) en el modelo estadístico Infostat.

- **Variables**

  Variable Dependiente: Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial (ICM)

  Variable Independiente: Tipo de A.E y Concentración de A.E microencapsulado en el medio de cultivo.

- **Hipótesis**

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

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

2.2.3.2. Microdiluciones

Se preparó una solución madre de 1100 µL en cada tubo de ensayo con el medio PDB (Potato Dextrose Broth) más agua destilada y se lo llevó a autoclavar. Una vez realizada la esterilización, se añadió los tratamientos y controles correspondientes.

Para la preparación del inóculo se colocó 5 mL de agua destilada estéril en cada tubo de ensayo, se colocó dos discos de micelio de la siembra del hongo se llevó al vortex por 5 minutos. Luego se hizo el conteo de esporas en la cámara Neubauer con el fin de verificar si se encuentra en el rango de 10^5 conidios/mL las esporas. Seguidamente, se dispensó en cada pocillo de la microplaca 180 µL de la solución y de esto se realizó una primera incubación de 36 horas.

Una vez transcurrido ese tiempo, se procedió con la adición 20 µl de reactivo Alamar Blue en cada pocillo y se sometió a una segunda incubación de 4 horas.

De tal manera que la distribución de la microplaca quedo así:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		PDB	PDB + Hongo	PDB + Alamar Blue	PDB + T1 (10%)	PDB + T1 (20%)	PDB + T1 (30%)	PDB + Ac.1 Puro	PDB + Fungicida	PDB + Micr. Sin aceite		
C		PDB	PDB + Hongo	PDB + Alamar Blue	PDB + T1 (10%)	PDB + T1 (20%)	PDB + T1 (30%)	PDB + Ac.1 puro	PDB + Fungicida	PDB + Micr. Sin aceite		
D		PDB	PDB + Hongo	PDB + Alamar Blue	PDB + T1 (10%)	PDB + T1 (20%)	PDB + T1 (30%)	PDB + Ac.1 puro	PDB + Fungicida	PDB + Micr. Sin aceite		
E		PDB	PDB + Hongo	PDB + Alamar Blue	PDB + T1 (10%)	PDB + T1 (20%)	PDB + T1 (30%)	PDB + Ac.1 puro	PDB + Fungicida	PDB + Micr. Sin aceite		
F		PDB	PDB + Hongo	PDB + Alamar Blue	PDB + T1 (10%)	PDB + T1 (20%)	PDB + T1 (30%)	PDB + Ac.1 puro	PDB + Fungicida	PDB + Micr. Sin aceite		
G												
H												

Figura 1. Representación de la distribución de los tratamientos y controles en la microplaca

Después, se llevó al lector de placas para ser medida la absorbancia en un rango de 590 nm y 540 nm utilizando el espectrofotómetro.

Finalmente se dio una observación cualitativa a través del cambio de color de azul a rosa o incoloro y una medición espectrofotométrica midiendo las absorbancias de 590 nm a 540 nm en el rango y se calculó el porcentaje de inhibición aplicando la siguiente formula:

$$\text{Porcentaje de inhibicion} = \left(\frac{\text{Absorbancia del control positivo} - \text{Absorbancia del tratamiento}}{\text{Absorbancia del control positivo}}\right) \times 100$$

CAPÍTULO 3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

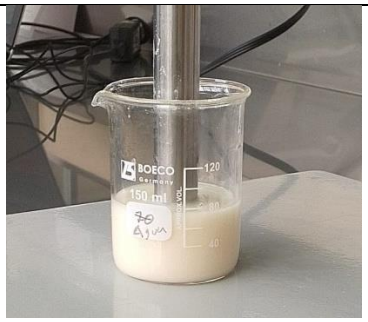
3. Análisis y discusión de resultados

3.1. Microencapsulación de aceites esenciales de romero y menta negra

1) Resultado de la microencapsulación del aceite esencial de romero



a) Fotografía del A.E de romero



b) Fotografía de la emulsión del A.E de romero



c) Fotografía del A.E.M de romero

2) Resultado de la microencapsulación del aceite esencial de menta negra



a) Fotografía del A.E de menta negra



b) Fotografía de la emulsión del A.E de menta negra



c) Fotografía del A.E.M de menta negra

Figura 2. Resultado de la microencapsulación de A.E de romero y menta negra

En primera instancia para obtener emulsiones estables de los aceites esenciales de romero y menta (Figura 2.1b y 2.2b) se lo realizó a partir de mezclar y obtener una solución con los polímeros de cubierta (goma arábiga y maltodextrina), teniendo en cuenta que la utilización de estos polímeros en conjunto se debe a que se complementan en paridad, debido a que por parte de la maltodextrina al tener alta solubilidad en agua proporciona muchas ventajas en la estabilidad del microencapsulado, sin embargo su capacidad emulsificante es muy pobre, la cual es compensada al ser mezclada con goma arábiga la cual tiene mejores propiedades emulsificantes, según lo mencionado por **Akram et al., (2021)**. Así también, la proporción utilizada fue de 80% para el material de cubierta y 20% para cada aceite con agua debido a que según **(Fernandes et al., 2014)** existe un

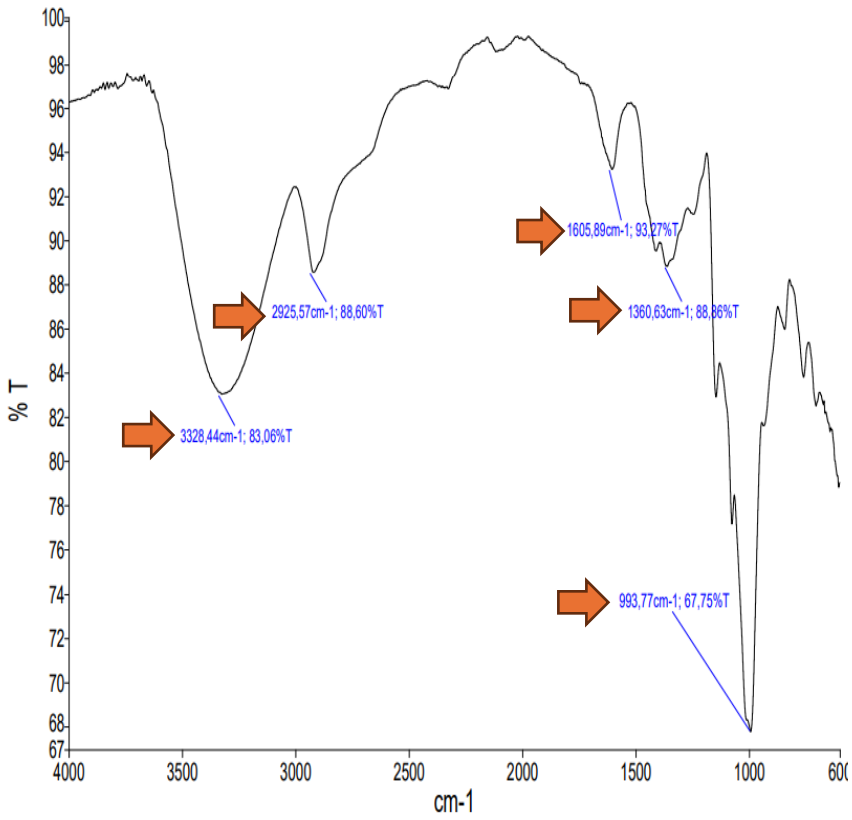
mejor porcentaje de retención de aceite en el núcleo de la microcápsula al utilizar una concentración superior al 75% (p/p) para goma arábiga y maltodextrina, obteniendo así la emulsión en total mezclada y homogenizada con ayuda de un agitador mecánico ya que el mismo permite que en determinado tiempo la solución se estabilice al girar las paletas en una velocidad considerablemente alta y sin considerar la exposición a una temperatura elevada que pueda intervenir en el cambio de las propiedades de los aceites, entre otros aspectos ajenos que se evitan **(Dalmazzone, 2005)**.

Por otro lado, una vez que se obtiene la emulsión y al ser llevada al equipo BUCHI mini Spray Dryer se incorpora hacia la cámara de secado del mismo, a una temperatura de entrada de 160 °C y 80 °C de salida obteniendo después del proceso un polvo de color blanco (Figura 2.1c y 2.2c), ya que según **(Bringas et al., 2011)** a estas condiciones la temperatura del aire en la cámara de secado tiene una fuerte influencia en la tasa de evaporación, retención de aceite esencial una vez que se forman las microcápsulas y una mayor eficiencia de microencapsulación, teniendo en cuenta además que la temperatura de entrada es mucho mayor que la de salida debido a que la temperatura de salida tiene una influencia negativa en la evaporación de agua de la emulsión, y mientras mejor sea la tasa de evaporación el rendimiento aumenta.

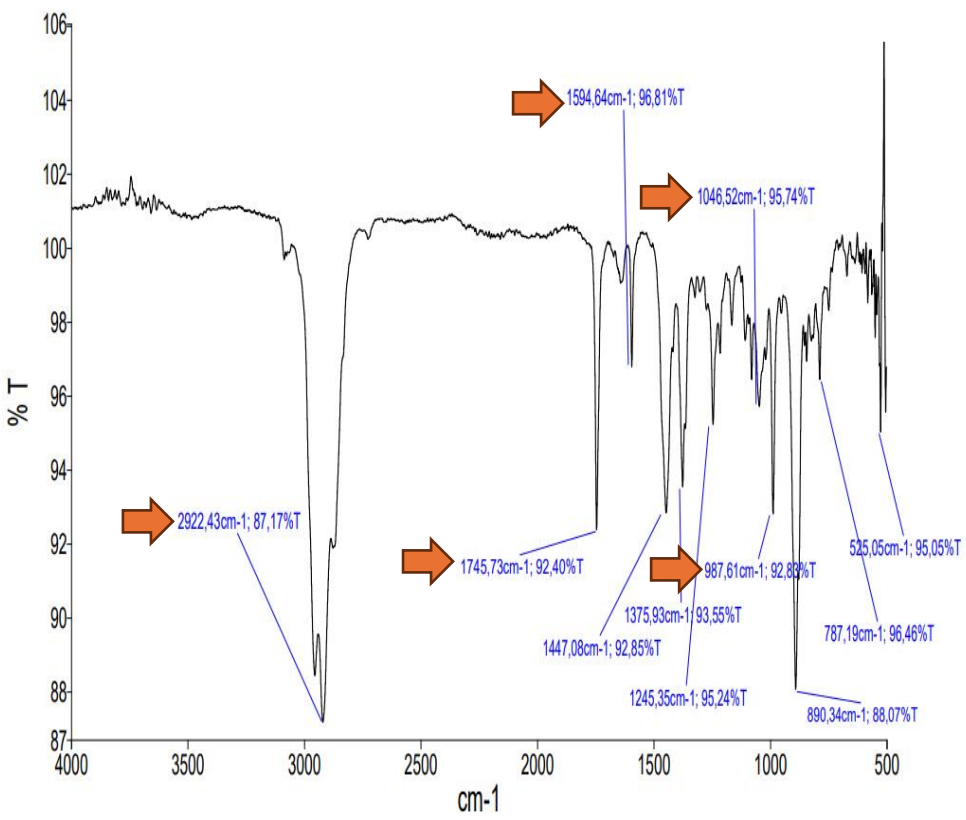
3.2. Evaluación de la eficiencia de microencapsulación

En la Figura 3 se observan los resultados de los espectros del análisis infrarrojo, para medir la eficiencia de microencapsulación de A.E de romero a través de espectroscopía por la transformada de Fourier (FTIR), todo esto a través de la visualización comparativa de los picos representativos en los espectros tanto de la membrana, el núcleo por separado y en conjunto.

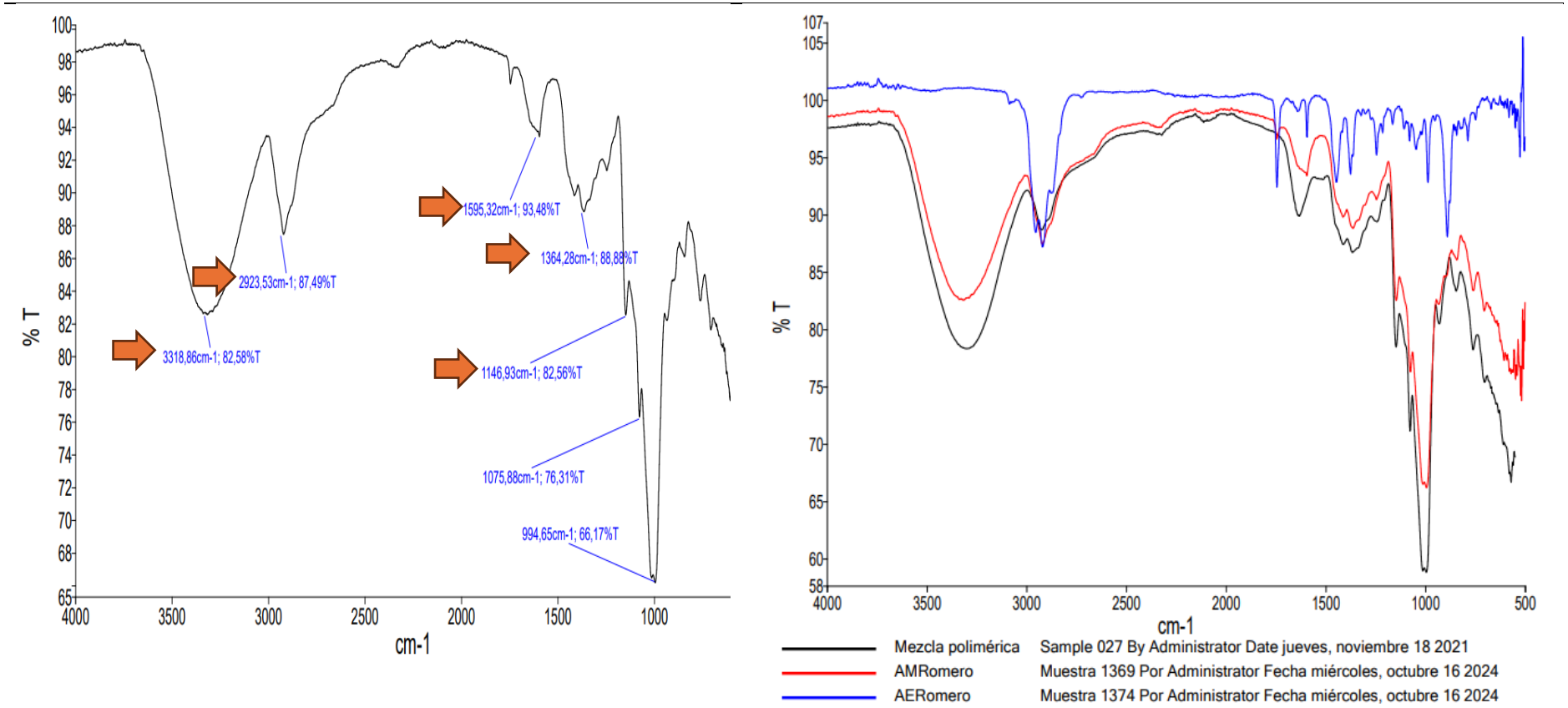
3.2.1. Evaluación cualitativa de la microencapsulación de A.E de *Salvia rosmarinus* (Romero) mediante FT-IR



A) Polímero de cubierta (maltodextrina + goma arábiga)



B) Espectro de resonancia para el A.E de romero



C) A.E.M de romero

D) Comparación de los movimientos vibratorios de cada muestra

Figura 3. Espectros infrarrojos de la transformada de Fourier (FTIR) para distintas muestras. A) Espectro de resonancia para la mezcla de polímeros (goma arábiga + maltodextrina); B) Espectro de resonancia para el A.E de romero; C) Espectro de resonancia de A.E.M de romero; D) Espectros de resonancia comparativos de mezcla de polímeros (goma arábiga + maltodextrina), A.E de romero y A.E.M de romero.

Como se observa en la Figura 3 en la que se muestran los espectros infrarrojos de los movimientos vibratorios por la transformada de Fourier característicos para la muestra del A.E.M de romero, detallando la diferencia entre cada parte de este, descritos tanto de la membrana en la Figura 3A (mezcla polimérica), el núcleo en la Figura 3B (aceite esencial de romero) y en conjunto por las Figura 3C y Figura 3D para determinar de manera cualitativa el correcto proceso de microencapsulación.

Tabla 6. Resultado de los valores del espectro infrarrojo para la muestra de A.E de romero

Valores de espectro infrarrojo de la mezcla de polímeros (goma arábiga + maltodextrina)	**%T**	**Valores de espectro infrarrojo del A.E de romero**	**%T**	**Valores de espectro infrarrojo de A.E.M de romero**	**%T**
3328,44 cm^{-1}	83,06	2922,43 cm^{-1}	87,17	3318,86	82,58
2925,57 cm^{-1}	88,60	1745,73 cm^{-1}	92,40	2923,53	87,49
1605,89 cm^{-1}	93,27	1594,64 cm^{-1}	96,81	1595,32	93,48
1360,63 cm^{-1}	88,86	1447,08 cm^{-1}	92,85	1364,28	88,88
993,77 cm^{-1}	67,75	890,34 cm^{-1}	88,07	1146,93	82,56

En la Tabla 6 presenta los resultados de los valores del espectro infrarrojo para la muestra de A.E de romero, polímeros de cubierta y del microencapsulado a través del análisis infrarrojo FTIR.

Al ser comparadas las imágenes de los espectros infrarrojos en la Figura 3 con los valores obtenidos y extraídos en la Tabla 6, se tiene que en primer lugar los picos correspondientes para la cubierta polimérica presentes en las Figuras 3A y 4A, donde se visualizan los valores más destacables en los picos con valores de 3328,74 cm^{-1} a 83,06 %T y 2925,57 cm^{-1} a 88,60 %T son correspondientes a las vibraciones de estiramiento de carbono e hidrógeno (CH), principalmente de CH_3 y CH_2 según **(Mot et al., 2022)**, sin embargo cabe mencionar que no existieron estiramientos de banda superior a los 3400 cm^{-1} correspondiente a estiramientos hidroxilo (OH), que pueden ser perceptibles individualmente tanto en goma arábiga y maltodextrina, ya que la mezcla de los mismos implica su participación en reacciones químicas durante el proceso de microencapsulación como la esterificación de los mismos **(Kang et al., 2019)**. Por otro lado, los valores de los picos de estiramiento descritos en los valores entre 1605,89 cm^{-1}

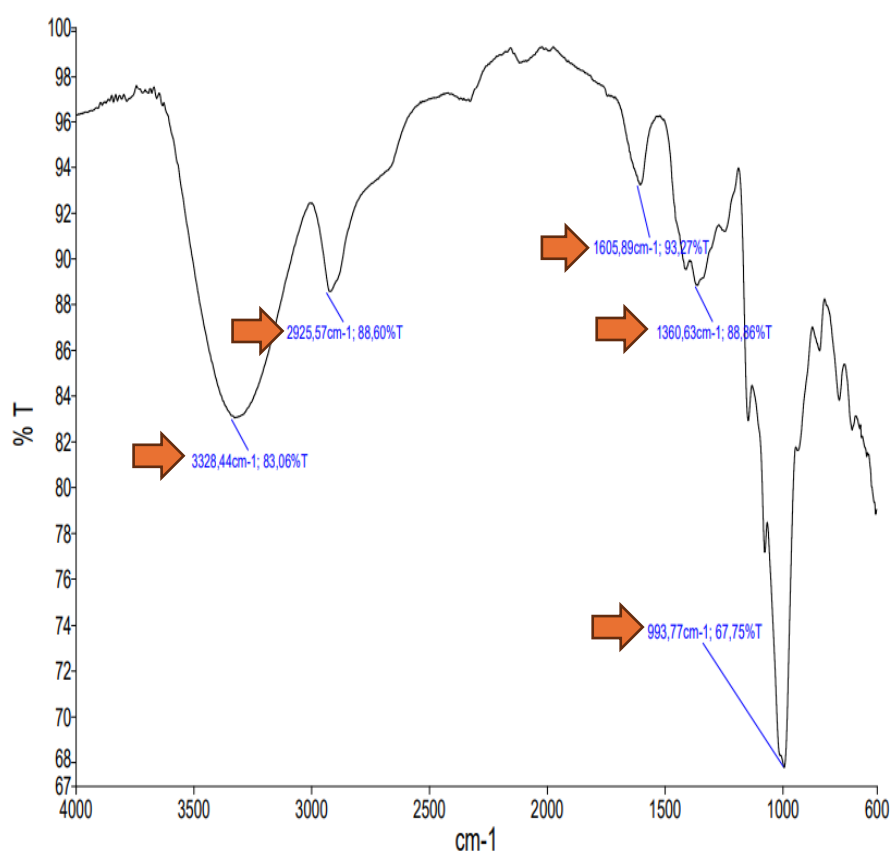
a 93,27 %T son vibraciones de estiramiento de grupos carbonilo y alquilo (C=O, C=C) y 1360,63 cm^{-1} a 88,86 %T son vibración de flexión simétrica de CH y asimétrica de grupos CH^3 y CH^2, lo cual es importante tener en cuenta ya que la flexión de los picos proporciona la información simétrica de la estructura de las moléculas, infiriendo en la presencia de hidrocarburos, cicloalcanos y compuestos orgánicos de cadenas alquílicas **(Karaaslan et al., 2021)**, y finalmente el valor de espectro de 993,77 cm^{-1} a 67,75 %T muestra la vibración fuera del plano de CH y CH^2, es decir que puede incidir en la presencia de anillos aromáticos, y en el caso de la cubierta, la presencia del anillo piranosa **(Khan et al., 2018)**.

Por su parte, los valores del espectro de resonancia del A.E de romero visto en la Figura 3B y sus valores descritos en la Tabla 6, destaca en primer lugar el pico a 2922,43 cm^{-1} a 87,17 %T correspondiente a vibraciones de banda de los grupos CH, el cuál es el más común su presencia en la mayoría de los aceites esenciales, ya que describe la presencia de compuestos orgánicos como terpenos, fenilpropanoides y ésteres **(Luo et al., 2019)**, por otro lado el valor de pico de 1745,73 cm^{-1} a 92,40 %T que describe la presencia de grupos carbonilo el cuál dicta la presencia de α-tuyona y alcanfor descrito para la mayoría de especies del género *Salvia*, mientras que los valores de 1594,64 cm^{-1} a 96,81 %T y 1447,08 cm^{-1} a 92,85 %T según **(Hameed et al., 2024)** están asociados a grupos con enlaces alquenos (C=C) los cuales infieren en la presencia de compuestos aromáticos como pineno, canfeno y limoneno. Por último, el valor de 890,34 cm^{-1} a 88,07 %T representa las vibraciones fuera del plano de CH correspondiente a los isoprenoides, siendo el carvacrol el componente principal de este grupo y del A.E de romero **(Topala & Tataru, 2016)**.

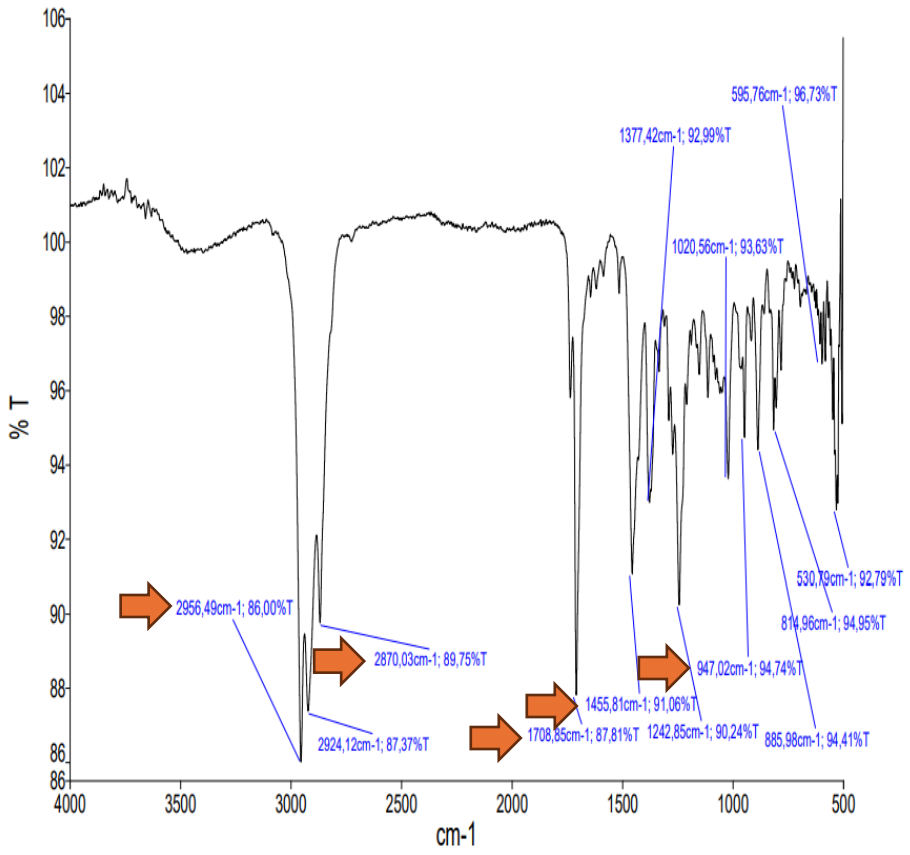
Finalmente, los picos más destacables del A.E de romero microencapsulado que se observan en la Figura 3C al ser comparado con los valores de la Figura 3A de la mezcla de polímeros de cubierta y vistos de mejor manera con valores resaltados en la Tabla 6 se evidenció su similitud significativa en los valores de espectro así como el %T, demostrando que la cubierta del microencapsulado es la única que muestra valores en el espectro infrarrojo impidiendo el paso de la luz infrarroja en el núcleo del mismo, es decir el A.E de romero estuvo perfectamente cubierto. Lo mencionado anteriormente es aún más claro en la Figura 3D que compara en una imagen los espectros de la mezcla de polímeros, el A.E de romero y el A.E.M de romero, donde las intensidades de los picos del A.E de romero, principalmente a 2922,43 cm^{-1} a 87,17 %T y 1745,73 cm^{-1} a 92,40 %T que representan la presencia de grupos alcanos y carbonilos son opacadas por los picos del microencapsulado obtenido, lo cual también demuestra la exitosa microencapsulación de manera visual y cualitativa.

3.2.2. Evaluación cualitativa de la microencapsulación de A.E de *Mentha piperita* (menta negra) mediante FTIR

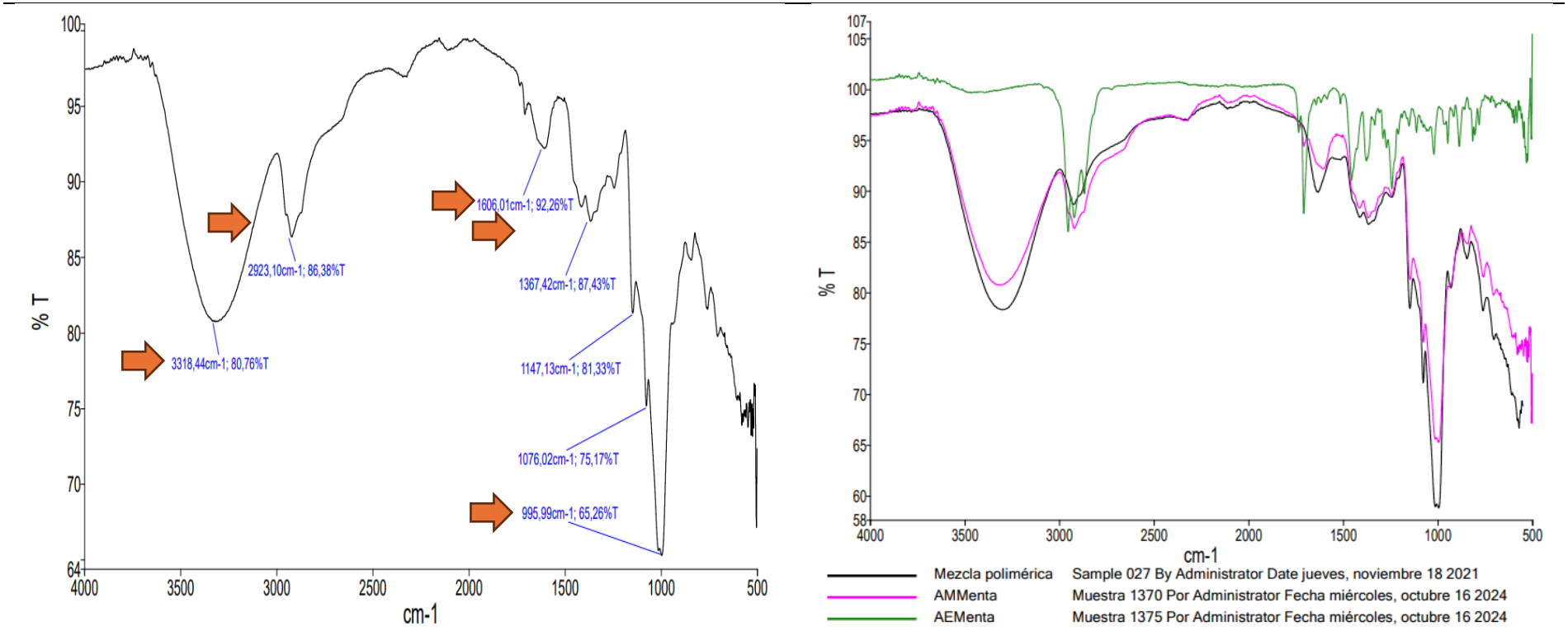
En la Figura 4 se observan los resultados de los espectros del análisis infrarrojo, para medir la eficiencia de microencapsulación de A.E de menta negra a través de espectroscopía por la transformada de Fourier (FTIR), todo esto a través de la visualización comparativa de los picos representativos en los espectros tanto de la membrana, el núcleo por separado y en conjunto.



A) Polímero de cubierta (maltodextrina + goma arábiga)



B) A.E de menta negra



C) A.E.M de menta negra

D) Comparación de los movimientos vibratorios de cada muestra

Figura 4. Espectros infrarrojos de la transformada de Fourier (FTIR) para distintas muestras. A) Espectro de resonancia para la mezcla de polímeros (goma arábiga + maltodextrina); B) Espectro de resonancia para el A.E de menta negra; C) Espectro de resonancia de A.E.M de menta negra; D) Espectros de resonancia comparativos de mezcla de polímeros (goma arábiga + maltodextrina), A.E de menta negra y A.E.M de menta negra.

Con respecto a lo que se observa en la Figura 4 en la que se muestran los espectros infrarrojos de los movimientos vibratorios por la transformada de Fourier característicos para la muestra del A.E.M de menta negra, detallando la diferencia entre cada parte del mismo, descritos tanto de la membrana en la Figura 4A (mezcla polimérica), el núcleo en la Figura 4B (aceite esencial de romero) y en conjunto por las Figura 4C y Figura 4D para determinar de manera cualitativa el correcto proceso de microencapsulación.

Tabla 7. Resultado de los valores del espectro infrarrojo para la muestra de aceite esencial de menta

Valores de espectro infrarrojo de la mezcla de polímeros (goma arábiga + maltodextrina)	**%T**	**Valores de espectro infrarrojo del A.E de menta negra**	**%T**	**Valores de espectro infrarrojo de A.E.M de menta negra**	**%T**
3328,44 cm^{-1}	83,06	2956,49 cm^{-1}	86,00	3318,44 cm^{-1}	80,76
2925,57 cm^{-1}	88,60	2924,12 cm^{-1}	87,37	2923,10 cm^{-1}	86,38
1605,89 cm^{-1}	93,27	1708,85 cm^{-1}	87,81	1606,01 cm^{-1}	92,26
1360,63 cm^{-1}	88,86	1455,81 cm^{-1}	91,06	1367,42 cm^{-1}	87,43
993,77 cm^{-1}	67,75	885,98 cm^{-1}	94,41	995,99 cm^{-1}	65,26

En la Tabla 7 presenta los resultados de los valores del espectro infrarrojo para la muestra de A.E de menta negra, polímeros de cubierta y del microencapsulado a través del análisis infrarrojo FTIR.

En primer lugar, los valores de espectro infrarrojo de la mezcla de polímeros que se pueden observar en la Figura 4A y la Tabla 7 fue descrita y profundizado de mejor manera anteriormente ya que la microencapsulación del A.E de menta negra fue realizada con la misma cubierta de polímeros, obteniendo resultados similares con una correcta microencapsulación tanto para romero como para menta. Por consiguiente, con relación a los valores del espectro de la Figura 4B se puede enfatizar los picos a 2956,49 cm^{-1} a 86,00 %T y 2924,12 cm^{-1} a 87,37 %T que representan las vibraciones simétricas y asimétricas de CH, CH_2 y CH_3, la banda con el valor de 1708,85 cm^{-1} a 87,81 %T muestras las vibraciones del grupo carbonilo C=O, la otra banda a 1455,81 cm^{-1} a 91,06 %T origina varios de los compuestos orgánicos con mayor presencia en el A.E de la menta negra, describiendo además que se puede encontrar mentol y mentona en el rango de espectro de 2894 a 2954 cm^{-1} **(Yilmaztekin et al., 2019)**.

Para finalizar se puede focalizar la diferencia existente y evidente entre los espectros del A.E de menta negra con el de la mezcla polimérica y en su conjunto con el del microencapsulado, visto de mejor manera en la Figura 4D, donde se puede comparar que los picos superpuestos del aceite esencial son superpuestos con el de la mezcla polimérica y el microencapsulado, esto demuestra que los picos representativos del A.E de menta negra no deben incidir al final del proceso de microencapsulación debido a que la membrana creada en este proceso por la mezcla polimérica impide la liberación del mismo al estar en su núcleo **(Pajaro et al., 2018)**.

3.3. Efecto antifúngico de los microencapsulados de A.E de romero y menta negra sobre el crecimiento micelial de *C. fulvum* Cooke.

3.3.1. Efecto inhibitorio por el método de difusión en agar

En la siguiente sección se muestra los resultados del crecimiento micelial *C. fulvum* Cooke con respecto a los diferentes tratamientos y controles aplicados, todo esto observado a través del porcentaje de Inhibición del Crecimiento Micelial (ICM) mostrado en la Tabla 8 a continuación:

Tabla 8. Resultado del crecimiento micelial de *C. fulvum* Cooke sobre los diferentes tratamientos.

Tratamientos		Promedio del diámetro de crecimiento (mm)	ICM (%)
T1	A1C1	2,6	51,7
	A1C2	2,3	57,9
	A1C3	1,8	66,8
T2	A2C1	3,5	34,9
	A2C2	3,2	41,3
	A2C3	2,8	49,1
Control 1		5,4	0
Control 2		3,9	28,8
Control 3		0,6	88,9
Control 4		0,6	88,9
Control 5		0,6	88,9

A1= A.E de menta negra, A2 = A.E de romero, C1= 10% de A.E.M en PDA, C2= 20% de A.E.M en PDA, C3= 30% de A.E.M en PDA, Control 1= Control negativo, Control 2= PDA + microencapsulado sin A.E, Control 3= Control positivo, Control 4= PDA + A.E de menta negra, Control 5= PDA + A.E de romero.

Tal como se puede observar en la Tabla 8 demuestra a partir del porcentaje de inhibición ICM que el A.E.M de menta negra y romero (Tratamientos 1 y 2) a diferentes concentraciones de microencapsulado en el medio de cultivo al ser comparado con el control negativo (Control 1), demuestra que existe disminución en el crecimiento micelial de medio PDA, teniendo en cuenta

que cuanto mayor sea la concentración utilizada de A.E.M, tiene mayor incidencia en inhibir el crecimiento de *C. fulvum* Cooke. Según lo mencionado anteriormente para el caso de los dos tratamientos utilizados hubo mejor porcentaje de inhibición a 30% de A.E.M (C3) con un porcentaje de inhibición ICM del 66,8% para el A.E.M de menta negra y un porcentaje de inhibición ICM del 49,1% para el A.E.M de romero, seguido de las concentraciones más bajas de 20% y 10% de A.E.M (C1 y C2) las cuales tuvieron un porcentaje de inhibición ICM más bajo, esto se debe a que como menciona **Bustamante et al., (2023)** con una mayor concentración de A.E.M permite que actúen una mayor cantidad de compuestos antifúngicos activos, es decir una mayor actividad en la interacción en la membrana celular de *C. fulvum* Cooke, además de intervenir en sus procesos metabólicos.

Como se muestra en las Figuras 5 y 6 a través del diagrama de barras, se puede observar el promedio del porcentaje de inhibición ICM en torno a las diferentes concentraciones de A.E de romero y menta negra, como se muestra a continuación:

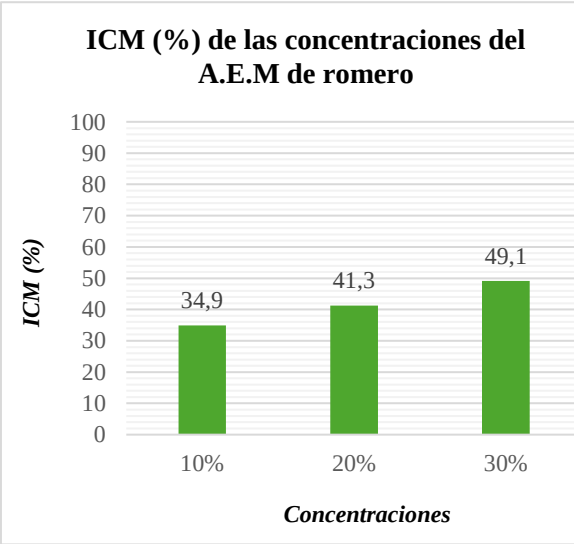


Figura 5. Diagrama de barras del ICM (%) de las concentraciones del A.E.M de romero

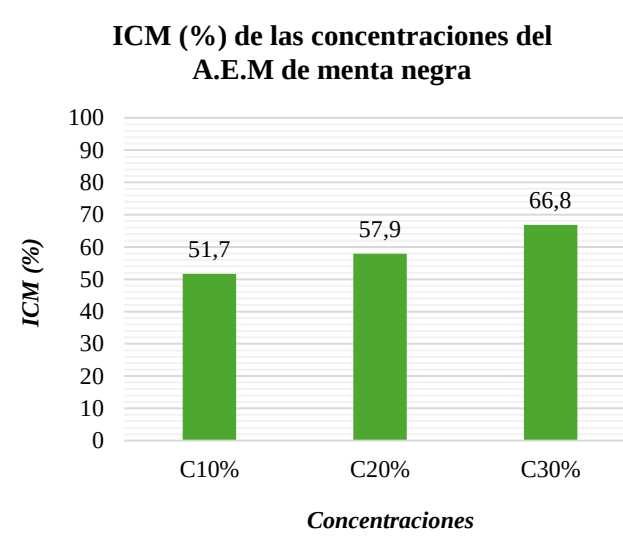


Figura 6. Diagrama de barras del ICM (%) de las concentraciones del A.E.M de menta negra

En las Figuras 5 y 6 se puede observar que el mejor porcentaje de inhibición se dio con la concentración más alta de A.E.M, tanto para romero como para menta, con una diferencia del casi 10% entre las tres concentraciones, sin embargo, el porcentaje de inhibición del A.E.M de menta negra en los tres casos fueron superiores al valor más alto registrado por el A.E.M de romero.

Además de manera gráfica se puede observar en la Figura 7 por medio de un gráfico de barras los valores de media obtenido para los diferentes tratamientos y controles, obteniendo un espectro más amplio del resultado que se obtuvo.

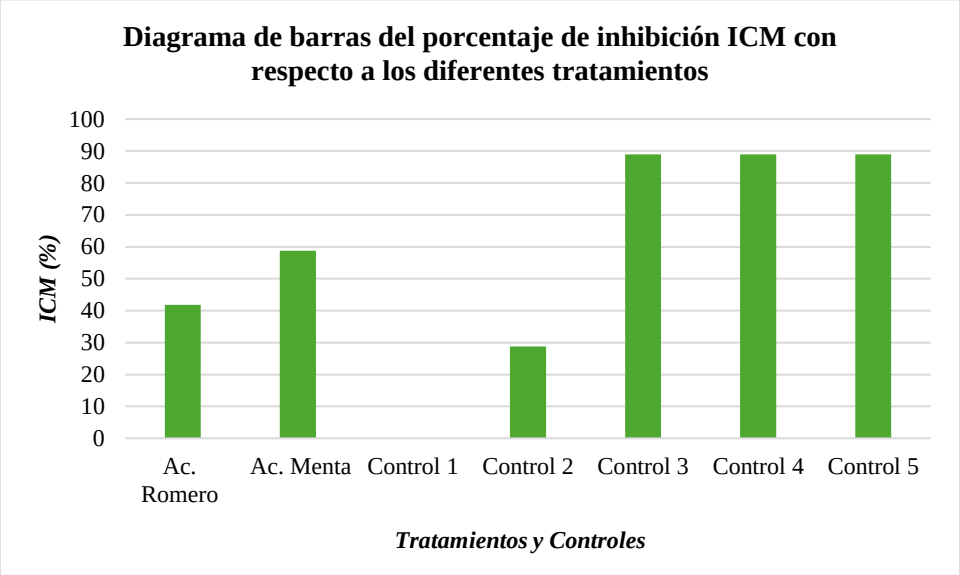


Figura 7. Diagrama de barras representando el valor de medias del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (ICM) total para los tratamiento y controles.

En la Figura 7 se puede observar gracias al diagrama de barras que los tanto el A.E.M de menta negra como romero mantienen un rango considerable de porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (ICM), siendo bastantes significativos considerando el control negativo y cabe destacar que los Controles 3,4 y 5 mantuvieron una media de igual valor considerando así que no hubo diferencia significativa entre los A.E puros utilizados con el fungicida de origen químico.

Por lo mismo, comparativamente los controles que corresponde al 100% de A.E utilizado para los dos tipos de tratamiento (Control 4 y 5) se tiene un porcentaje de inhibición ICM del 88,9% para los dos casos, contrastando con los porcentajes de inhibición más altos obtenidos mencionados anteriormente al 30% de A.E.M como se observa en la Figura 7, que cabe recordar que cada microcápsula contiene el 20% de A.E efectivo, por lo tanto los tratamientos realizados al 30% de A.E.M en medio PDA contiene tan solo el 6% de A.E efectivo, así que existió inhibición del crecimiento mucho más alta a la esperada según los resultados obtenidos y comparados. Estos resultados pueden deberse a que, primero en el caso de la menta, así como en la investigación de **Moghaddam et al., (2013)** al estudiar la composición del A.E de menta negra y su efecto antifúngico, muestra como resultado que la inhibición del crecimiento se debe principalmente a sus componentes, principalmente la mentona, mentol y mentofurano entre otros compuestos orgánicos descritos que actúan de manera conjunta para evitar el crecimiento de conidios y expansión por esporas, además según **Tancinova et al., (2023)** muestra que en el caso de *Cladosporium* después de 7 días de cultivo presenta inhibición a una concentración mínima de 250 µL/L de A.E de menta. Mientras que según **Bozin et al., (2007)** de modo similar para el A.E

de romero al ser analizado su composición muestra que la actividad antifúngica está relacionado a sus componentes primarios como terpenos y monoterpenos, teniendo en mayor composición alcanfor, tuyona y borneol específicamente estos compuestos aromáticos, penetran a través de la membrana celular e intervienen en sitios activos de enzimas fúngicas, desestabilizando su metabolismo y afectando la estabilidad estructural de la misma y evitando su proliferación previniendo la germinación de las esporas por medio de los compuestos volátiles, pero para el A.E de romero la actividad inhibitoria no se relaciona con la gradiente creciente de concentración como se ve en la Tabla 8 donde la actividad tiene una diferencia mínima entre las tres debido a que la tuyona no incide en la actividad inhibitoria y según la especie de plantas del género *Salvia* interfiere en una mayor concentración de alcanfor que si actúa sobre el metabolismo de membrana y la germinación de esporas para la proliferación de *Cladosporium* **(Pinto et al., 2007)**. Y por consiguiente también hay que destacar que los polímeros de cubierta del microencapsulado tienen un efecto mínimo visible en el crecimiento de *C. fulvum* Cooke como muestra el Control 2, ya que la maltodextrina y goma arábiga por si solos no inhiben directamente al crecimiento de hongos fitopatógenos, como se observa en la Figura 7, pero en conjunto con el A.E lo protege y mejora su dispersión en el medio **(Sarabandi et al., 2019)**.

Por lo demás al descomponer los resultados de los tratamientos se tiene que para el caso del A.E de menta presenta una mayor actividad antifúngica en comparación al A.E de romero como se observan en las Figuras 5,6 y 7 , describiendo que: a 10% de A.E.M (C1) el porcentaje de inhibición ICM fue del 51,7% para menta negra y de 34,9% para romero; a 20% de A.E.M (C2) el porcentaje de inhibición ICM fue del 57,9% para menta negra y de 41,3% para romero; 30% de A.E.M (C3) el porcentaje de inhibición ICM fue del 66,8% para menta negra de 49,1% para romero. Esta variación que fue explicada anteriormente es complementada ya que la variación de los componentes químicos hace que la menta tenga mayor poder inhibitorio debido a su contenido de mentol, mentona, que son fuertemente influyentes en la descomposición de la membrana plasmática en cambio el A.E de romero en sus componentes está más asociado a la inhibición de la germinación, pero también en el caso de los tratamientos utilizando A.E.M en el proceso de microencapsulación gracias a los polímeros de membrana utilizados como cubierta de los microencapsulados, ayudan e influyen en la mejora de la inhibición de la actividad antifúngica **(Al-Rejaboo & Jalaluldeen, 2019)**. Y finalmente comparado con el control positivo (C3) el cuál es un fungicida comercial llamado PREDOSTAR que está denominado en su ficha técnica por **(INTEROC, 2017)** siendo un fungicida sistémico que contiene Metalaxil y Propamocarb actuando independientemente en la inhibición de la síntesis de ARN y en la formación y estabilidad de la membrana celular, siendo así unos de los fungicidas con mejor resultado en el mercado, teniendo como resultado en el caso de *C. fulvum* Cooke un porcentaje de inhibición ICM de 88,9%, es decir, igual al obtenido por los Controles 4 y 5 que utilizan aceite esencial puro

en dispersión en medio PDA, debido a que tiene similar modo de acción contra hongos fungicidas, por lo tanto los resultados esperados se correlacionan con los obtenidos.

Para complementar lo obtenido se realizó el análisis estadístico de los resultados obtenidos por medio del análisis de varianza (ANOVA) de cada uno de los factores como se muestra en la Tabla 9 que permite comparar las medias en base a la respuesta tanto del modelo, del A.E y de las concentraciones como se muestra a continuación:

Tabla 9. Análisis de varianza

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
Porcentaje de inhibición d..	30	0,94	0,92	6,67

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3929,79	5	785,96	71,30	<0,0001
Aceites esenciales	2401,29	1	2401,29	217,84	<0,0001
Concentraciones	1517,20	2	758,60	68,82	<0,0001
Aceites esenciales*Concent..	11,31	2	5,65	0,51	0,6051
Error	264,56	24	11,02		
Total	4194,35	29			

Fuente: Realización propia en Infostat.

A partir de lo observado en la Tabla 9 muestra que gracias al nivel de significancia (p-valor), se interpreta en que existieron diferencias estadísticas significativas entre los aceites esenciales de Menta negra y Romero en relación al porcentaje de inhibición del crecimiento micelial que al ser mayor al nivel de significancia preestablecido (0,05), así también en el caso de las concentraciones que al tener un p-valor <0.05 significa que es altamente significativo, más sin embargo, la interacción entre los dos factores (A.E y concentración) al tener un p-valor >0,05 indica que sin importar el tipo de A.E su función es similar a cualquier concentración.

Por último, en la Tabla 10 se muestra el resultado de realizar una prueba post hoc de comparación múltiple a través de la prueba de Tukey para así obtener las diferencias significativas de las diferentes concentraciones de A.E.M utilizadas.

Tabla 10. Comparaciones múltiples a través de la prueba de Tukey

```
Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=6,49252
Error: 11,0232 gl: 24
Aceites esenciales Medias n  E.E.
Romero al 10%       32,84  5 1,48 A
Romero al 20%       38,38  5 1,48 A
Romero al 30%       51,28  5 1,48    B
menta al 10%        52,02  5 1,48    B
menta al 20%        56,64  5 1,48    B
menta al 30%        67,52  5 1,48       C
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)
```

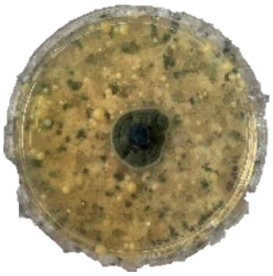
Fuente: Realización propia en Infostat.

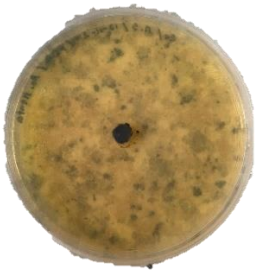
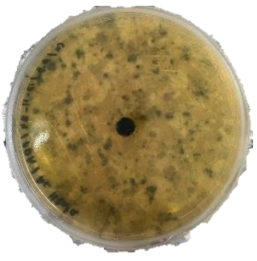
Obteniendo que, el A.E.M de menta negra al 30% fue quien mostró el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Cladosporium fulvum* con el método de dilución en agar utilizando cajas de Petri, seguido por A.E.M de romero al 30%, A.E.M de menta negra al 10% y A.E.M de menta negra al 20%, quienes presentaron una menor inhibición agrupada pero significativa y finalmente A.E.M de romero al 10% y A.E.M de romero al 20% presentando un porcentaje de inhibición aún más bajo.

3.3.2. Características de las colonias de *C. fulvum* Cooke

En esta sección en la Tabla 11 se puede observar a través de un registro fotográfico las características de las colonias de *C. fulvum* Cooke para los diferentes tratamientos después de 7 días de incubación.

Tabla 11. Resultado fotográfico de las características de las colonias de *C. fulvum* Cooke para los diferentes tratamientos

Tratamiento	C1	C2	C3
A.E.M de menta negra			
A.E.M de romero			

Control 1	
Control 2	
Control 3	
Control 4	
Control 5	

C1= 10% de A.E.M en PDA, C2= 20% de A.E.M en PDA, C3= 30% de A.E.M en PDA, Control 1= Control negativo, Control 2= PDA + microencapsulado sin A.E, Control 3= Control positivo, Control 4= PDA + A.E de menta negra, Control 5= PDA + A.E de romero.

En la Tabla 11 se puede observar las colonias de *C. fulvum* Cooke, mostrando que en condiciones normales en medio PDA como se muestra en el Control 1 se identifica a través una colonia uniforme con textura afelpada en todos los casos, con un color verde olivo grisáceo y bastante oscurecido tanto en el anverso e inverso de las cajas Petri lo cual indica una buena característica morfológica de *C. fulvum* Cooke según **(Leiva et al., 2023)**, destacando además que la ausencia

de transpiración y una correcta metodología de cultivo permitió tener cultivos selectivos y evitar la contaminación ambiental que puede existir en este tipo de medio.

En este momento al analizar las características morfológicas en conjunto, se tiene que al agregar un factor externo en el medio de cultivo PDA afecta al crecimiento y proliferación normal de *C. fulvum* Cooke, ya que en este estudio se utilizaron dos tipos de aceite esencial (A.E de menta negra y romero) que afectaron de manera evidente en el crecimiento normal, considerando su utilización en forma microencapsulada a diferentes concentraciones en el total del medio de cultivo, teniendo así como se observa en la Tabla 11 que al ascender la concentración de A.E.M (C1, C2 y C3) en el medio de cultivo incide en la formación de colonias abundantes y su proliferación en toda la caja Petri, obteniendo mejores resultados de inhibición visibles a una concentración más alta en los dos casos (C3) y comprobando además ausencia casi total de crecimiento de *C. fulvum* Cooke en los controles utilizando solo A.E de menta negra y romero, es decir mientras mayor sea la concentración de A.E efectivo en el medio, mayor es la inhibición, que comparado con el control positivo el cuál usa un control químico, genera resultados semejantes, así como en el estudio de **Girardi et al., (2017)** utilizando A.E.M sobre *Cladosporium*, describiendo que una correcta microencapsulación y entre mayor sea su concentración en el medio permite inhibir y controlar su crecimiento.

3.3.3. Efecto de las microdiluciones en el ensayo de viabilidad con Alamar Blue frente a *C. fulvum* Cooke)

A continuación, en las Figuras 8 y 9 se presentan los resultados de cambio de color prueba con Alamar Blue al 0,1% en *C. fulvum* Cooke con el A.E.M de romero y menta, con los respectivos controles.



Figura 8. Resultado de la prueba con Alamar Blue al 0,1% en *C. fulvum* Cooke con el A.E.M de romero.



Figura 9. Resultado de la prueba con Alamar Blue al 0,1% en *C. fulvum* Cooke con el A.E.M de menta negra.

En el ensayo de Alamar Blue que se aplicó para medir la viabilidad celular, se combinó con los tratamientos en estudio por su capacidad de detectar la actividad metabolica de las celulas. Es asi

como en la Figura 8 se visualizó los cambios de color de azul inicial a rosado oscuro (fila B:columna 8) indicando actividad metabolica alta a una concentracion del 30%. Por otro lado, en la Figura 9 los pozos correspondientes a la columna 2 y 4 que representan a los controles sin hongo ni aplicación de ningun tratamiento sostienen colores amarillos o anaranjados, revelando una inexistente actividad metabolica significativa siendo controles de buen funcionamiento para la comparacion. Al considerar la concentracion mas alta de 30% presento colores de rojo tenue siendo este un efecto fuerte contra la viabilidad del hongo.

Visualmente la comparacion de las placas de la Figura 8 y 9 explicó que al considerar concentraciones altas (30%) la Figura 9 correspondiente al A.E.M de menta manifiesta un efecto inhibitorio comparable al del A.E.M de romero con colores más claros en la placa.

3.3.3.1. Porcentaje de inhibición

El porcentaje de inhibición fue una herramienta útil en el desarrollo experimental, ya que permitió tener información valiosa de la efectividad de los A.E.M de menta negra y romero junto al ensayo de Alamar Blue que se realizó previamente ya que es un indicador redox que evidenció cambio de color en respuesta a la actividad metabólica de las células.

Tabla 12. Resultado del porcentaje de inhibición de los diferentes tratamientos en el ensayo de Alamar Blue.

	Concentraciones del A.E.M de menta negra		
	10%	**20%**	**30%**
Porcentaje de inhibición (%)	24,61	51,19	62,11
	Concentraciones del A.E.M de romero		
	10%	**20%**	**30%**
Porcentaje de inhibición (%)	22,09	32,70	46,82

En la Tabla 12 se evidencio al A.E.M de menta negra que mientras más concentración se ocupa más aumenta el porcentaje de inhibición en el ensayo con Alamar Blue, en donde al 20 % y 30 % de concentración se da un incremento notable de 10,92% reflejando una efectividad del A.E.M de menta negra más estable a una concentración mucho más alta. Por otro lado, con el A.E.M de romero la diferencia del 20% y 30% fue de 14,12% siendo efectivo de igual manera, aunque menos significativo comparado con el A.E.M de menta negra. Los dos A.E.M de romero y menta negra mostraron una tendencia positiva en cuanto a la inhibición al ir aumentando su concentración (ver Figura 8 y 9). Sin embargo, el aceite esencial de menta resulto ser más relevante en este estudio y en términos de inhibición,

mediante la observación cualitativa que mostraron las placas y el cálculo del porcentaje de inhibición.

A través de la Figura 10 se puede observar a través de un diagrama de barras, el porcentaje de inhibición obtenido por el método de Microdiluciones en el ensayo de viabilidad con Alamar Blue.

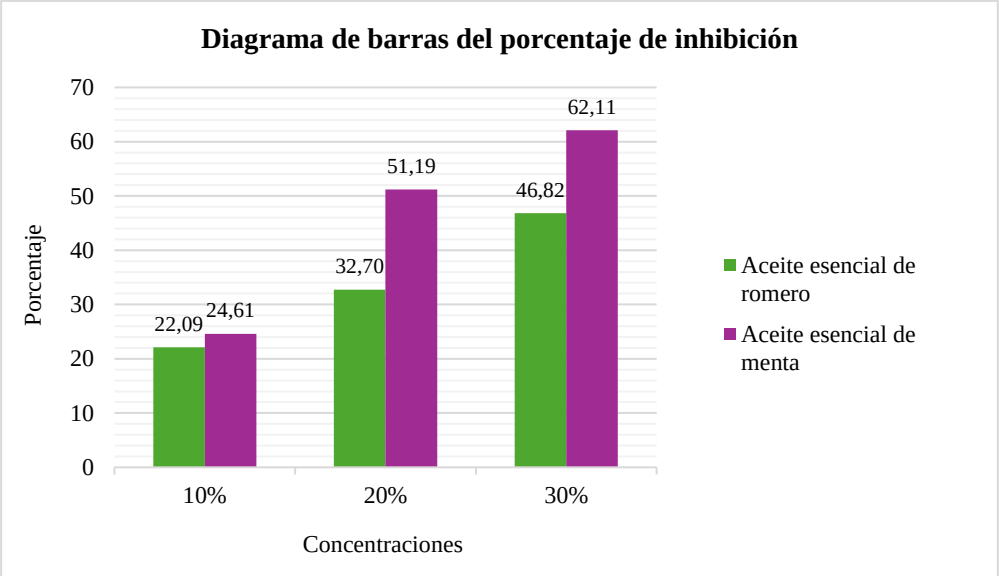


Figura 10. Diagrama de barras representando el porcentaje de inhibición de los aceites esenciales de romero y menta y sus respectivas concentraciones.

Como muestra en la Figura 10, a pesar de utilizar otro método de comprobación del porcentaje de inhibición se obtuvieron resultados similares a los obtenidos por difusión en agar (Figura 5 y 6), teniendo que de igual forma a una mayor concentración de A.E.M se obtiene un mayor porcentaje de inhibición para menta y romero, con la diferencia de que el A.E.M de menta negra en este caso también fue más efectivo inhibiendo la cepa de *C. fulvum* Cooke.

3.4. Verificación de 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) y el tipo de aceite esencial con diferentes concentraciones de A.E microencapsulado.

4. CAPITULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

- Se llevó a cabo la microencapsulación de los aceites esenciales de romero y menta negra (*Salvia rosmarinus* y *Mentha piperita* respectivamente) por medio del método de secado por aspersión, mezclando los polímeros microencapsulantes como la maltodextrina y goma arábiga en condiciones óptimas a una temperatura de entrada de 160 °C y a una temperatura de salida de 80 °C, con una proporción de 20:80 del ingrediente activo y el polímero.
- Se analizó la eficiencia de los A.E.M de romero y menta negra mediante espectrofotometría infrarroja de transformada de Fourier (FTIR), identificando la incorporación efectiva de los aceites esenciales en la matriz de microencapsulación, en los espectros se evidencio los grupos funcionales de los aceites esenciales más los materiales encapsulantes demostrando una técnica exitosa.
- Se determinó la actividad antifúngica *in vitro* de los A.E.M de romero y menta negra, dando una diferencia significativa en la efectividad de estos tratamientos, ya que a la concentración del 30% el A.E.M de menta negra mostró un ICM de 66,8% lo cual superó el valor del A.E.M de romero de 49,1%. Por otra parte, en el ensayo de viabilidad celular con Alamar Blue, se destacó nuevamente el A.E.M de menta negra con un porcentaje de inhibición del 62,11%, por el contrario del A.E.M de romero que arrojo un 46,82% a la misma concentración. Lo cual indicó, que el A.E.M de menta negra es el más eficaz en este estudio para la inhibición de *C. fulvum* en condiciones evaluadas.

4.2 RECOMENDACIONES

- Emplear normas de esterilidad al realizar la microencapsulación evitando contaminaciones cruzadas en el resultado final.
- Utilizar otros tipos de aceites esenciales que ayuden a potencializar la alternativa ecológica a los fungicidas comerciales.
- Aumentar los valores de concentración de los aceites esenciales microencapsulados en el análisis *in vitro* del crecimiento de *Cladosporium fulvum* Cooke en una futura experimentación diferenciando el cambio en su inhibición.

C. MATERIALES DE REFERENCIA

Referencias Bibliográficas

Akram, S., Bao, Y., Butt, M. S., Shukat, R., Afzal, A., & Huang, J. (2021). Fabrication and characterization of gum arabic- and maltodextrin-based microcapsules containing polyunsaturated oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 101*(15), 6384–6394. https://doi.org/10.1002/jsfa.11309

Albertini, B., Perissutti, B., Bertoni, S., Zanolla, D., Franceschinis, E., Voinovich, D., Lombardo, F., Keiser, J., & Passerini, N. (2019). Combining mechanochemistry and spray congealing for new praziquantel pediatric formulations in schistosomiasis treatment. International Journal of Molecular Sciences 2019, Vol. 20, Page 1233, 20(5), 1233. https://doi.org/10.3390/IJMS20051233

Al-Rejaboo, M. A., & Jalaluldeen, A. M. (2019). Studying the Airborne Fungi of some rooms in the internal sections of Mosul university campus and the Possibility of using Sage plants to control it. *Journal of Advanced Pharmacy Education and Research,* 9(3), 17–22.

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

Berna, F. (2017). Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). Encyclopedia of Earth Sciences Series, 285–286. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4409- 0_15/COVER

Bernal, A. (2019). Caracterización de aislados de Passalora fulva (Cooke) U. Braun & Crous provenientes de tomate (*Solanum lycopersicum L.*) en condiciones de cultivo protegido. Las Villas: Universidad Central Martha Abreu. Disponible: https://www.researchgate.net/publication/262653139_Caracterización_De_AISLADOS_DE_Passalora_fulva_BRAUN_CROUS_SIN_Cladosporium_fulvum_COOKE_PROVENIENTES_DE_TOMATE_Lycopersicon_esculentum_MILL_EN_CONDICIONES_DE_CULTIVO_PROTEGIDO.

Berra, F. R., & Laucirica, F. (1999). *Cladosporium fulvum* Cooke: taxonomía y aspectos relacionados. Revista de Micología Aplicada, 21(3), 123-130.

Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., & Jovin, E. (2007). Antimicrobial and Antioxidant Properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis L. and Salvia officinalis L., Lamiaceae*) Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55*(19), 7879–7885. https://doi.org/10.1021/jf0715323

Bringas, M., Expósito, I., Reineccius, G., López, O., & Pino, J. (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, K., Herrera, S., & Jaramillo, E. (2023). Potencial antifúngico de extractos de plantas y aceites esenciales contra fusarium incarnatum. *Portal Del Conocimiento*, 8(10), 534–551. https://doi.org/10.23857/pc.v8i10.6140

Bustamante, E. (2020). *Control biológico de patógenos de plantas.* http://hdl.handle.net/20.500.12324/1772

Castillo, B., & Castillo, V. (2021). Uso de plaguicidas químicos en tomate riñón (*Solanum lycopersicum L.)* en condiciones de invernadero y campo en Loja, Ecuador. 11.

Dalmazzone, C. (2005). The mechanical generation of emulsions. *Lubrication Science*, 17(2), 197–237. https://doi.org/10.1002/ls.3010170207

Fernandes, R. V. de B., Borges, S. V., & Botrel, D. A. (2014). Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. *Carbohydrate Polymers, 101*, 524–532. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.083

Flores-Villa, E., Sáenz-Galindo, A., Castañeda-Facio, A. O., & Narro-Céspedes, R. I. (2020). Romero (Rosmarinus officinalis L.): su origen, importancia y generalidades de sus metabolitos secundarios. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas,* 23, 1–17. https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.266

García-Caparrós P, Romero MJ, Llanderal A, Cermeño P, Lao MT, Segura ML (2019). Effects of drought stress on biomass, essential oil content, nutritional parameters, and costs of production in six *Lamiaceae* species. Water, 11(3):573. https://doi.org/10.3390/w11030573

Girardi, N. S., García, D., Passone, M. A., Nesci, A., & Etcheverry, M. (2017). Microencapsulation of Lippia turbinata essential oil and its impact on peanut seed quality preservation. *International Biodeterioration & Biodegradation, 116, 227–233.* https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.11.003

Gouin, S. (2018). Microencapsulation. *Trends in Food Science & Technology*, 15(7–8), 330–347. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.10.005

Guerrero, R. (2018). Evaluación de la producción comercial de tomate riñón bajo invernadero en la finca California (Universidad Andina Simón Bolívar, Sede Ecuador).

Hameed, M. K., Nematollahi, F., & Rouhani, M. (2024). Green Synthesis of Gold Nanoparticles Using Salvia rosmarinus Essential Oil. *Journal of Medicinal Plants and By-Products, 13*(3), 582–589. https://doi.org/10.22034/jmpb.2023.363373.1599

Herman, T. S., da Silva Goersch, C., Bocca, A. L., & Fernandes, L. (2023). Resazurin to determine the minimum inhibitory concentration on antifungal susceptibility assays for Fonsecaea sp. using a modified EUCAST protocol. Brazilian Journal of Microbiology, 55(2), 1349–1357. https://doi.org/10.1007/s42770-024-01293-2

Hidalgo, J. (2021). La situación actual de la sustitución de insumos agroquímicos por productos biológicos como estrategia en la producción agrícola: *In Universidad Andina Simón Bolívar (Vol. 1)*. https://repositorio.uasb.edu.ec/bitstream/10644/6095/1/T2562-MRI-Hidalgo-La situacion.pdf

Hudz, N., Kobylinska, L., Pokajewicz, K., Horčinová Sedláčková, V., Fedin, R., Voloshyn, M., Myskiv, I., Brindza, J., Wieczorek, P. P., & Lipok, J. (2023). Mentha piperita: *Essential Oil and Extracts, Their Biological Activities, and Perspectives on the Development of New Medicinal and Cosmetic Products. Molecule*s, 28(21). https://doi.org/10.3390/molecules28217444

INTEROC. (2017). *Ficha técnica Predostar*. 57(1), 1–3. https://croper-production.s3.amazonaws.com/product_provider_files/files/000/006/578/original/FICHA_TÉCNICA_PREDOSTAR_.pdf

Jácome, D. (2022). Aislamiento, caracterización cultural y morfológica de aislados monospóricos del agente causal del moho gris de la hoja de *Solanum lycopersicum*. en la provincia de Tungurahua. [Aislamiento, caracterización cultural y morfológica de aislados monospóricos del agente causal del moho gris de la hoja de *Solanum lycopersicum*. en la provincia de Tungurahua.]. Universidad Técnica de Ambato.

Jano F, (2019). Cultivo y producción de tomate. Primera edición. Ediciones *Ripalme*. Lima, Perú, 134 p.

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

Karaaslan, M., Şengün, F., Cansu, Ü., Başyiğit, B., Sağlam, H., & Karaaslan, A. (2021). Gum arabic/maltodextrin microencapsulation confers peroxidation stability and antimicrobial ability to pepper seed oil. *Food Chemistry, 337*, 127748. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127748

Khan, S. A., Khan, S. B., Khan, L. U., Farooq, A., Akhtar, K., & Asiri, A. M. (2018). Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Application in Functional Groups and Nanomaterials Characterization. *In Handbook of Materials Characterization (pp. 317–344)*. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-92955-2_9

Leiva, M., Jacome, D., Pallo, E., & Núñez, R. (2023). Aislamiento, caracterización cultural y morfológica de aislados monospóricos del agente causal del moho gris de la hoja de *Solanum lycopersicum* L. en la provincia de Tungurahua. *Bionatura, 8(3),* 1–7. https://doi.org/10.21931/RB/2023.08.03.17

Luo, X., Sedman, J., & Ismail, A. A. (2019). Microencapsulation of oregano (Origanum vulgare L.), rosemary (*Rosmarinus officinalis L.)* and sage (*Salvia officinalis L*.) essential oils in β-lactoglobulin. *SDRP Journal of Food Science & Technology*, 4(9), 970–985. https://doi.org/10.25177/jfst.4.9.ra.612

Mesa, V., Marín, P., Ocampo, O., & Calle, L. (2019). Fungicidas a partir de extractos vegetales: una alternativa en el manejo integrado de hongos fitopatógenos. Revista de Investigaciones Agropecuarias, 45, 23–30.

Miladi, H., Slama, R. Ben, Mili, D., Zouari, S., Bakhrouf, A., & Ammar, E. (2018). Essential oil of *Thymus vulgaris L.* and *Rosmarinus officinalis L*.: Gas chromatography-mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against foodborne pathogens. Natural Science, 05(06), 729–739. https://doi.org/10.4236/ns.2013.56090

Moghaddam, M., Pourbaige, M., Tabar, H. K., Farhadi, N., & Hosseini, S. M. A. (2013). Composition and Antifungal Activity of Peppermint (*Mentha piperita*) Essential Oil from Iran. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants, 16(4),* 506–512. https://doi.org/10.1080/0972060X.2013.813265

Mot, M. D., Gavrilaș, S., Lupitu, A. I., Moisa, C., Chambre, D., Tit, D. M., Bogdan, M. A., Bodescu, A. M., Copolovici, L., Copolovici, D. M., & Bungau, S. G. (2022). *Salvia officinalis L.* Essential Oil: Characterization, Antioxidant Properties, and the Effects of Aromatherapy in Adult Patients. *Antioxidants, 11(5).* https://doi.org/10.3390/antiox11050808

Pajaro, N. P., Méndez, G. L., Fortich, M. del R. O., Alarcón, M. E. T., & Vega, J. M. R. (2018). Microencapsulación del aceite esencial de *Cinnamomum verum J.* mediante secado por aspersión y su potencial actividad antioxidante. Revista Cubana de Farmacia, 51(2).

Peak, D. (2005). Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Encyclopedia of Soils in the Environment, 4, 80–85. https://doi.org/10.1016/B0-12-348530-4/00174-0

Punithavathy, P. M., Nalina, K., & Menon, T. (2021). Antifungal susceptibility testing of Candida tropicalis biofilms against fluconazole using calorimetric indicator resazurin. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, 55(1), 72–74. https://doi.org/10.4103/0377-4929.94861

https://revfarmacia.sld.cu/index.php/far/article/view/227/133%0Ahttps://revfarmacia.sld.cu/index.php/far/article/view/227

Pinto, E., Salgueiro, L. R., Cavaleiro, C., Palmeira, A., & Gonçalves, M. J. (2007). In vitro susceptibility of some species of yeasts and filamentous fungi to essential oils of *Salvia officinalis*. *Industrial Crops and Products, 26(2),* 135–141. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2007.02.004e

Romero-Estévez, D., Yánez-Jácome, G. S., Simbaña-Farinango, K., Vélez-Terreros, P. Y., & Navarrete, H. (2020). Determination of cadmium and lead in tomato (Solanum lycopersicum) and lettuce (Lactuca sativa) consumed in Quito, Ecuador. Toxicology Reports, 7, 893–899. https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.07.008

Sarabandi, K., Jafari, S. M., Mahoonak, A. S., & Mohammadi, A. (2019). Application of gum Arabic and maltodextrin for encapsulation of eggplant peel extract as a natural antioxidant and color source. *International Journal of Biological Macromolecules*, 140, 59–68. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.133

Senasica. (2019). Protocolo de Diagnóstico: *Passalora fulva* (Cooke) U. Braun & Crous, 2003 (Moho de la hoja del tomate). http://sinavef.senasica.gob.mx/CNRF/AreaDiagnostico/DocumentosReferencia/Documentos/ProtocolosFichas/Protocolos/HongosFitopatogenos/PD%20P.%20fulva%20Pub%20V.%201.pdf

Tancinova, D., Barboráková, Z., Mašková, Z., Mrvová, M., Medo, J., Golian, M., Štefániková, J., & Árvay, J. (2023). In vitro ANTIFUNGAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS (FAMILY LAMIACEAE) AGAINST CLADOSPORIUM SP. STRAINS – POSTHARVEST PATHOGENS OF FRUITS. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences,* e9921. https://doi.org/10.55251/jmbfs.9921

Topala, C. M., & Tataru, L. D. (2016). ATR-FTIR Study of thyme and rosemary oils extracted by supercritical carbon dioxide. *Revista de Chimie*, *67*(5), 842–846.

Yilmaztekin, M., Lević, S., Kalušević, A., Cam, M., Bugarski, B., Rakić, V., Pavlović, V., & Nedović, V. (2019). Characterisation of peppermint (Mentha piperita L.) essential oil encapsulates. *Journal of Microencapsulation*, 36(2), 109–119. https://doi.org/10.1080/02652048.2019.1607596

Anexos

<table>
<tr>
<td>
Usando el equipo de seguridad en el laboratorio para ejecución de experimentos.</td>
<td>
Resultado final de la microencapsulación</td>
</tr>
<tr>
<td>
Filtración de los microencapsulados.</td>
<td>
Ejemplo de la consistencia del microencapsulado para ser llevado a esterilizar.</td>
</tr>
</table>

Anexo 1. Preparación de la microencapsulación.



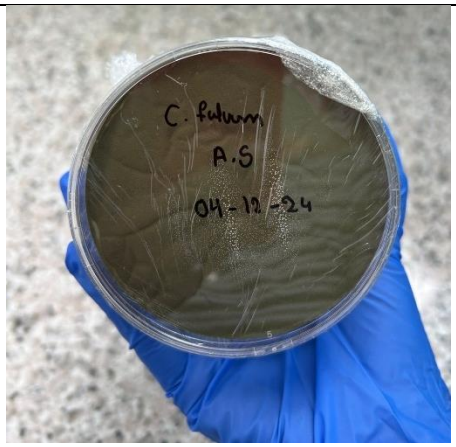
Pesaje del medio PDA.



Preparación del medio PDA.

Preparacion de los tratamientos *C. fulvum* Cooke.



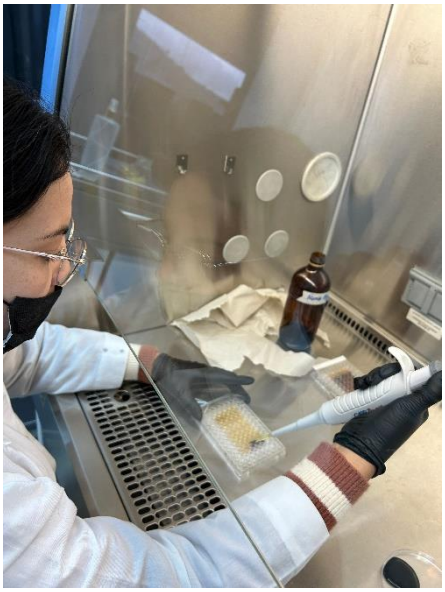


Crecimiento del hongo.

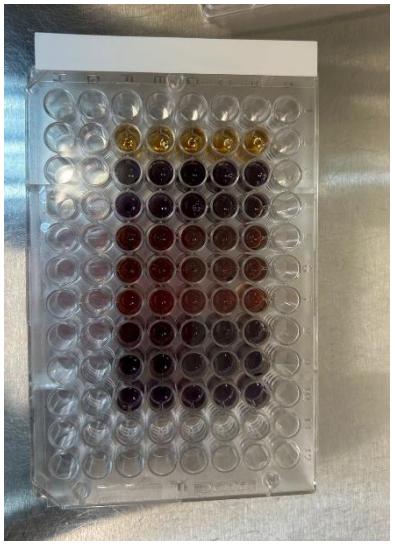
Anexo 2. Método de difusión en agar.



Preparación de las microplacas.



Adición del colorante.



Placa con el colorante.



Lectura de la placa en espectrofotómetro.

Anexo 3. Ensayo del Alamar Blue.