

UNEMI

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

REPÚBLICA DEL ECUADOR

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

FACULTAD DE POSTGRADOS

INFORME DE INVESTIGACIÓN

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA

TEMA:

“CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIFÚNGICO DEL ACEITE
ESENCIAL DE LIMÓN MANDARINA (*CITRUS LIMON X RETICULATA*) DE LOS BOSQUES
SIEMPREVERDES MONTANO BAJOS DE LA PROVINCIA DE SUCUMBÍOS”

Autor:

SERGIO ESTEPHAN GOMEZ LOAIZA

Director

MsC. BARZALLO GRANIZO DIEGO GEOVANNY

Milagro, 2025

Derechos de Autor

Sr. Dr.

Fabricio Guevara Viejó

Rector de la Universidad Estatal de Milagro

Presente.

Yo, **SERGIO ESTEPHAN GOMEZ LOAIZA**, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de este informe de investigación, mediante el presente documento, libre y voluntariamente cedo los derechos de Autor de este proyecto de desarrollo, que fue realizada como requisito previo para la obtención de mi Grado, de **Magíster en Biotecnología**, como aporte a la Línea de Investigación **PROMOCIÓN DEL DESARROLLO ECONÓMICO: ECONOMÍA VERDE** de conformidad con el Art. 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, concedo a favor de la Universidad Estatal de Milagro una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos. Conservo a mi favor todos los derechos de autor sobre la obra, establecidos en la normativa citada.

Así mismo, autorizo a la Universidad Estatal de Milagro para que realice la digitalización y publicación de este Proyecto de Investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

El autor declara que la obra objeto de la presente autorización es original en su forma de expresión y no infringe el derecho de autor de terceros, asumiendo la responsabilidad por cualquier reclamación que pudiera presentarse por esta causa y liberando a la Universidad de toda responsabilidad.

Milagro, 09 de Enero de 2025



Firmado electrónicamente por:
**SERGIO ESTEPHAN
GOMEZ LOAIZA**

Sergio Estephan Gómez Loaiza

C.I.: 1003641030

Aprobación del Tutor del Trabajo de Titulación

Yo, BARZALLO GRANIZO DIEGO GEOVANNY, en mi calidad de tutor del trabajo de titulación, elaborado por SERGIO ESTEPHAN GOMEZ LOAIZA, cuyo tema es “CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIFÚNGICO DEL ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN MANDARINA (CITRUS LIMON X RETICULATA) DE LOS BOSQUES SIEMPREVERDES MONTANO BAJOS DE LA PROVINCIA DE SUCUMBÍOS”, que aporta a la Línea de Investigación **PROMOCIÓN DEL DESARROLLO ECONÓMICO: ECONOMÍA VERDE**, previo a la obtención del Grado Magíster en Biotecnología. Trabajo de titulación que consiste en una propuesta innovadora que contiene, como mínimo, una investigación exploratoria y diagnóstica, base conceptual, conclusiones y fuentes de consulta, considero que el mismo reúne los requisitos y méritos necesarios para ser sometido a la evaluación por parte del tribunal calificador que se designe, por lo que lo APRUEBO, a fin de que el trabajo sea habilitado para continuar con el proceso de titulación de la alternativa de Informe de Investigación de la Universidad Estatal de Milagro.

Milagro, 09 de Enero de 2025



DIEGO GEOVANNY
BARZALLO GRANIZO

Diego Barzallo

C.I.: 0603923095

Aprobación del tribunal de calificación



VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO FACULTAD DE POSGRADO CERTIFICACIÓN DE LA DEFENSA

El TRIBUNAL CALIFICADOR previo a la obtención del título de **MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**, presentado por **ING. GOMEZ LOAIZA SERGIO ESTEPHAN**, otorga al presente proyecto de investigación denominado **"CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIFÚNGICO DEL ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN MANDARINA (CITRUS LIMON X RETICULATA) DE LOS BOSQUES SIEMPREVERDES MONTANO BAJOS DE LA PROVINCIA DE SUCUMBIÓS**", las siguientes calificaciones:

TRABAJO ESCRITO	50.07
SUSTENTACIÓN	34.33
PROMEDIO	85.00
EQUIVALENTE	Muy Bueno



Ing. RAMOS MENDIETA SIMON ABELARDO
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



Mgs RODAS PAZMIÑO KAREN ALEXANDRA
VOCAL



CHENCHÉ LOPEZ OSCAR MAURICIO
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL

Dedicatoria

Dedico esta tesis a los majestuosos árboles. Su grandeza y biodiversidad no solo inspiran esta investigación, sino que también nos recuerdan la importancia de conservar y proteger nuestro entorno natural. A estos árboles, fuente de vida y conocimiento, cuyo aceite esencial es objeto de este estudio, les agradezco su contribución silenciosa pero vital. Que este trabajo sirva para resaltar su valor y fomentar la preservación de nuestros preciados ecosistemas para las generaciones futuras.

Agradecimientos

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a los bosques, con su inigualable riqueza y biodiversidad, han sido la fuente de inspiración y el pilar fundamental de esta investigación. Su capacidad para albergar una amplia variedad de flora y fauna, y su papel crucial en la regulación del clima y la conservación del medio ambiente, son invaluable. Agradezco a cada árbol y planta, especialmente al limón mandarina, por sus generosas aportaciones que han permitido desarrollar este estudio. Que este trabajo contribuya a su conservación y a la valorización de sus recursos naturales, promoviendo un futuro sostenible y respetuoso con la naturaleza.

Resumen

Esta investigación se centra en la caracterización del aceite esencial de limón mandarina (*Citrus limon* x *Citrus reticulata*) en los bosques siempreverdes montanos bajos de la provincia de Sucumbíos, Cantón Lago Agrio, Parroquia Santa Cecilia, Ecuador. En este contexto, los objetivos que esta investigación persigue son: caracterizar químicamente y estandarizar la extracción del aceite esencial de limón mandarina, determinar sus propiedades químicas mediante destilación por arrastre de vapor y analizar su capacidad antifúngica, concluyendo con los mejores parámetros para lograr el máximo rendimiento.

En la metodología de esta investigación se analizaron variables morfológicas, botánicas y químicas. La optimización se realizó mediante el análisis de diferentes concentraciones de materia prima y solvente. La caracterización química se llevó a cabo mediante cromatografía de gases con espectrometría de masas (GC-MS) y espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) del aceite esencial de hojas. Por último, la capacidad antifúngica se midió mediante la aplicación del aceite esencial en cultivos de *Aspergillus niger*.

El análisis GC-MS reveló componentes bioactivos significativos, como el limoneno y el mirceno, conocidos por sus propiedades antifúngicas. El rendimiento del aceite esencial se optimizó mediante el ajuste de la variable solvente-materia prima. El análisis del aceite esencial sugiere que la sustancia posee capacidades antioxidantes y biocidas, lo que indica posibles aplicaciones en las industrias farmacéutica y alimentaria, contribuyendo a la conservación de la biodiversidad local mediante la valorización de productos no maderables.

Este estudio subraya la importancia de la biotecnología en la conservación de los ecosistemas amazónicos y el desarrollo de una bioeconomía sostenible. Concluye que la caracterización y aplicación del aceite esencial de limón mandarina no solo proporcionará beneficios económicos locales, sino que también promoverá la protección ambiental. Se recomienda fomentar investigaciones futuras de este aceite esencial en otras aplicaciones como: analizar la capacidad antibacteriana o de inhibición de radicales libres, dados los componentes químicos afines a estos estudios, presentes en el mismo.

Palabras clave: *Citrus limon*, *Citrus reticulata*, aceite esencial, caracterización química, capacidad antifúngica, bioeconomía sostenible.

Abstract

This research focuses on the characterization of the essential oil of lemon mandarin (*Citrus limon* x *Citrus reticulata*) in the lower montane evergreen forests of the Sucumbíos province, Lago Agrio Canton, Santa Cecilia Parish, Ecuador. In this context, the objectives of this research are: to chemically characterize and standardize the extraction of lemon mandarin essential oil, determine its chemical properties through steam distillation, and analyze its antifungal capacity, concluding with the best parameters to achieve maximum yield.

The methodology of this research involved analyzing morphological, botanical, and chemical variables. Optimization was carried out by analyzing different concentrations of raw material and solvent. The chemical characterization was conducted using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) and Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) of the essential oil from leaves. Finally, the antifungal capacity was measured by applying the essential oil to *Aspergillus niger* cultures.

GC-MS analysis revealed significant bioactive components, such as limonene and myrcene, known for their antifungal properties. The yield of the essential oil was optimized by adjusting the solvent-to-raw material ratio. The analysis of the essential oil suggests that the substance possesses antioxidant and biocidal properties, indicating potential applications in the pharmaceutical and food industries while contributing to the conservation of local biodiversity through the valorization of non-timber products.

This study highlights the importance of biotechnology in the conservation of Amazonian ecosystems and the development of a sustainable bioeconomy. It concludes that the characterization and application of lemon mandarin essential oil will not only provide local economic benefits but also promote environmental protection. It is recommended to encourage future research on this essential oil in other applications, such as analyzing its antibacterial capacity or free radical inhibition potential, given its chemical components that are relevant to these studies.

Keywords: *Citrus limon*, *Citrus reticulata*, essential oil, chemical characterization, antifungal capacity, sustainable bioeconomy.

Lista de Gráficas

Gráfico 1: Rendimiento del aceite esencial de limon mandarina	2
Gráfico 2: Gráfica FTIR, aceite esencial de limón mandarina Fuente: Elaboración propia	7
Gráfico 3: Porcentaje de inhibición del aceite esencial Fuente: Propia	9

Lista de Tablas

Tabla 1: Variables dependientes	12
Tabla 2 Variables Independientes.....	13
Tabla 3: Prueba de homogeneidad del proceso de estandarización del aceite esencial	2
Tabla 4: Análisis Tukey para la estandarización del aceite esencial	3
Tabla 5: Compuestos químicos de la extracción del aceite esencial de limon mandarina	5
Tabla 6: Prueba de homogeneidad.....	9

Índice / Sumario

Derechos de Autor	II
Aprobación del Tutor del Trabajo de Titulación.....	III
Aprobación del tribunal de calificación	IV
Dedicatoria	V
Agradecimientos.....	VI
Lista de Gráficas.....	IX
Lista de Tablas	X
Índice / Sumario.....	XI
Introducción.....	1
CAPÍTULO I: El Problema de la Investigación	6
1.1. Planteamiento del problema	6
1.2. Delimitación del problema.....	7
1.3. Formulación del problema	7
1.4. Preguntas de investigación.....	8
1.5. Objetivos	9
Objetivo general	9
Objetivos específicos	9
1.6. Hipótesis.....	9
1.6.1. Hipótesis Nula.....	9
1.6.2. Hipótesis alterna	10
1.7. Justificación.....	10
1.8. Declaración de las variables (Operacionalización).....	12
1.8.1. Dependientes.....	12
1.8.2. Independientes	13
CAPÍTULO II: Marco Teórico Referencial	14

2.1. Antecedentes Referenciales	16
2.2. Marco Conceptual.....	19
2.2.1. Aceites Esenciales.....	19
2.2.2. Tipos de aceites esenciales	19
2.2.3. Características Específicas de los Aceites Esenciales Cítricos.....	21
2.2.4. Citrus limon x reticulata.....	21
2.2.5. Limoneno.....	22
2.2.6. Mirceno.....	22
2.2.7. Técnicas de extracción de aceites esenciales	22
2.2.8. Técnicas de caracterización de aceites esenciales.....	24
2.2.8. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).....	26
2.2.9. Rendimiento del Aceite Esencial.....	27
2.2.11. Mecanismos de Acción.....	29
2.2.12. Ejemplos de Aceites Esenciales con Actividad Antimicótica	30
2.3. Marco Teórico.....	31
2.3.1. Técnicas de caracterización.....	31
2.3.4 Posición Conceptual Crítica.....	34
CAPÍTULO III: Diseño Metodológico.....	37
3.1. Tipo y diseño de investigación	38
3.2. La población y la muestra	39
3.3. Los métodos y las técnicas.....	40
3.3.1. Optimización y estandarización de materia prima	41
3.3.2. Caracterización química.....	42
3.3.3. Actividad antifúngica.....	46
3.4. Procesamiento estadístico de la información	47
3.5. Maquinaria e instrumentos.....	48

3.5.1. Destilación	48
3.5.2. Caracterización química	52
CAPÍTULO IV: Análisis e Interpretación de Resultados	1
4.1. Análisis e Interpretación de Resultados	1
4.1.1. Estandarización de la extracción del aceite esencial	1
4.1.1.1. ANOVA estandarización de extracción de aceites esenciales	2
4.1.1.2. Prueba Post hoc	3
4.1.2. Propiedades químicas del aceite esencial	3
4.1.3. FTIR del aceite de limón	6
4.1.4. Actividad antifúngica del aceite esencial	8
4.1.4.1. ANOVA propiedad antifúngica	9
4.1.4.2. Prueba Post hoc	10
CAPÍTULO V: Conclusiones, Discusión y Recomendaciones	12
5.1. Discusión	12
5.1.1. Estandarización de la extracción de aceite esencial	12
5.1.2. Propiedades químicas del aceite esencial	12
5.1.3. Actividad antifúngica del aceite esencial	13
5.2. Conclusiones	14
5.3. Recomendaciones	15
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
ANEXOS	23

Introducción

Los bosques siempreverdes montano bajos de la provincia de Sucumbíos, Ecuador, representan un ecosistema vital tanto para la biodiversidad global como para las comunidades locales (GADP, 2019a). La importancia de estos bosques radica en su capacidad para producir oxígeno, regular el ciclo de nutrientes y actuar como sumideros de carbono, mitigando así el cambio climático (Whitehead, 2011).

Estos bosques, albergan una gran diversidad de flora y fauna, muchas de las cuales son endémicas y están en peligro de extinción, sin embargo, estos ecosistemas están amenazados por la deforestación y el cambio de uso del suelo, que provocan la pérdida de biodiversidad y la degradación ambiental (Fernández-Llamazares et al., 2021).

Este estudio se centra en la optimización, caracterización química del aceite esencial de limón mandarina y medición de capacidad antifúngica (*Citrus limon x reticulata*) (Vásquez-Gomez et al., 2023a), una especie híbrida que combina características del limón y la mandarina, los aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos volátiles producidos por las plantas y han sido utilizados desde la antigüedad por sus propiedades medicinales, aromáticas y culinarias (Rivera et al., 2022).

En los últimos años, ha habido un renovado interés en los aceites esenciales debido a sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorias y anticancerígenas, lo que ha impulsado su uso en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria (Zhang et al., 2022).

El limón mandarina es una especie de interés particular debido a su perfil químico único, que incluye compuestos bioactivos como el limoneno, el mirceno y otros

terpenos, que son conocidos por sus efectos beneficiosos para la salud (A. C. S. D. Oliveira, 2021). La caracterización química de estos aceites esenciales no solo permitirá entender mejor su composición y propiedades, sino que también abrirá nuevas oportunidades para su uso en aplicaciones industriales y terapéuticas (Vásquez-Gomez et al., 2023b).

La Amazonía ecuatoriana, y en particular la provincia de Sucumbíos enfrenta una alarmante tasa de deforestación. Según (Llerena et al., 2020) se pierden en promedio 5.416 hectáreas de bosque cada año debido a la silvicultura, lo que posiciona a Sucumbíos como la segunda provincia con mayor deforestación en Ecuador (Paes et al., 2021). Esta pérdida de cobertura forestal tiene múltiples causas, entre ellas la expansión de la agricultura, la explotación maderera y la minería. La deforestación no solo resulta en la pérdida de hábitats y especies, sino que también afecta a las comunidades indígenas que dependen de los recursos forestales para su subsistencia.

El cambio climático exacerba esta problemática, provocando alteraciones en los patrones de precipitación y temperatura, lo que afecta la productividad de los ecosistemas y la distribución de las especies (Ma et al., 2022). La degradación ambiental también tiene consecuencias a nivel global, ya que la Amazonía es un importante regulador del clima y un sumidero de carbono crucial, la pérdida de estos bosques contribuye al aumento de las concentraciones de dióxido de carbono en la atmósfera, acelerando el calentamiento global (Lorenz et al., 2021).

La hipótesis central es que los aceites esenciales de limón mandarina contienen compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes y antimicrobianas significativas, que pueden ser aprovechados para el desarrollo de productos

farmacéuticos y cosméticos, la investigación se centrará en la identificación y cuantificación de los principales componentes químicos del aceite esencial, así como en la evaluación de su actividad biológica.

Para ello, se utilizará un análisis estadístico de 45 árboles de limón mandarina en los bosques siempreverdes montano bajos de Sucumbíos, de estos árboles se extraerán aceites esenciales de hojas. Las variables para analizar incluyen la composición química del aceite esencial, su rendimiento y sus propiedades antifúngicas.

Para la extracción y caracterización química, se llevarán a cabo la extracción de aceites esenciales mediante destilación por arrastre de vapor, posteriormente, se analizarán los componentes químicos utilizando cromatografía de gases con espectrometría de masas y espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), estas técnicas permitirán identificar y cuantificar los principales compuestos volátiles presentes en los aceites esenciales de limón mandarina e identificar los grupos funcionales presentes en la muestra respectivamente (Simirgiotis et al., 2020).

Evaluación de Rendimientos: se evaluarán diferentes rendimientos con la variable: solvente/materia prima en un destilador por arrastre de vapor hasta encontrar el método con mayor rendimiento.

Análisis de Resultados y Aplicaciones: Se discutirán los resultados obtenidos en términos de su relevancia para la conservación y el desarrollo sostenible, se explorarán las posibles aplicaciones de los aceites esenciales de limón mandarina en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria, y se propondrán estrategias para la valorización de estos productos forestales no maderables (Espinoza et al., 2022).

La tesis se organiza en cinco capítulos principales, cada uno de los cuales aborda diferentes aspectos de la investigación:

Capítulo I: Introducción y Planteamiento del Problema: Este capítulo presenta el contexto general de la investigación, la importancia del estudio, y define el problema de investigación, se discuten las manifestaciones y posibles causas de la deforestación en Sucumbíos y se plantea la hipótesis central de la investigación.

Capítulo II: Marco Teórico: Se ofrece una revisión exhaustiva de la literatura relevante sobre aceites esenciales, sus propiedades químicas y biológicas, y sus aplicaciones, este capítulo también incluye una discusión sobre los métodos de extracción y análisis de aceites esenciales.

Capítulo III: Metodología En este capítulo se detalla el diseño experimental, las técnicas de extracción de aceites esenciales y los métodos de análisis químico y biológico.

Capítulo IV: Resultados y Discusión Aquí se presentan los hallazgos del estudio, incluyendo los perfiles químicos de los aceites esenciales, sus rendimientos y sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas, se discuten los resultados en el contexto de la literatura existente y se exploran sus implicaciones para la conservación y el desarrollo sostenible.

Capítulo V: Conclusiones y Recomendaciones Este capítulo resume los resultados clave de la investigación y proporciona recomendaciones para futuras investigaciones y aplicaciones prácticas, se discuten las limitaciones del estudio y se proponen estrategias para la valorización de los aceites esenciales de limón mandarina.

La presente investigación busca demostrar que la valorización de productos forestales no maderables, como los aceites esenciales de limón mandarina, puede contribuir significativamente a la conservación de la biodiversidad y al desarrollo económico local, la caracterización química y la evaluación de las propiedades biológicas de estos aceites esenciales no solo proporcionarán una base sólida para futuras aplicaciones industriales y terapéuticas, sino que también promoverán la protección del medio ambiente y el uso sostenible de los recursos naturales.

CAPÍTULO I: El Problema de la Investigación

1.1. Planteamiento del problema

La degradación de los bosques, deforestación y pérdida de biodiversidad en los bosques del Ecuador se debe entre otras a el desconocimiento de los pobladores de sus recursos, es decir cuáles son las potencialidades de las especies que se encuentran en los bosques (FAO, 2020). El analizar las aplicaciones del aceite esencial, precisamente para contribuir a mejorar esta problemática, estudiar nuevas aplicaciones que tienen los árboles, específicamente el de limón mandarina y con ello preservar los bosques que son cruciales no solo por su biodiversidad sino también por su papel en la regulación climática y la conservación de recursos naturales esenciales.

La deforestación en Sucumbíos se ha intensificado en las últimas décadas, impulsada por la expansión agrícola, la tala ilegal, extracción petrolera y la minería, esta pérdida de bosques afecta significativamente a la biodiversidad, ya que muchas especies endémicas se encuentran en peligro de extinción debido a la destrucción de su hábitat , según (Torres et al., 2020), la deforestación no solo disminuye la biodiversidad local, sino que también contribuye al cambio climático global al liberar grandes cantidades de dióxido de carbono almacenadas en los árboles.

Los aceites esenciales de plantas como la limón mandarina han cobrado importancia debido a sus múltiples aplicaciones industriales y terapéuticas (Vásquez-Gomez et al., 2023a) estos aceites contienen compuestos bioactivos como el limoneno y el mirceno, que poseen propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antiinflamatorias, la caracterización de estos compuestos no solo permitirá su mejor aprovechamiento,

sino que también fomentará la conservación de los bosques a través de la valorización de productos no maderables (Agarwal et al., 2022).

La extracción de aceite esencial de limón mandarina se realiza mediante técnicas avanzadas como la destilación por arrastre de vapor, misma que permite que el agua transporte las pequeñas partículas establecidas en las hojas del limon mandarina

En cuanto a la caracterización química la técnica instrumental que se utiliza es la cromatografía de gases, que permite identificar y cuantificar los compuestos volátiles presentes en el aceite, proporcionando información valiosa sobre sus propiedades y posibles aplicaciones (Chóez-Guaranda et al., 2023).

1.2. Delimitación del problema

La investigación se enfoca en la caracterización química del aceite esencial de limón mandarina (*Citrus limon x reticulata*) en los bosques siempreverdes montano bajos de la provincia de Sucumbíos, Ecuador, en la parroquia de Santa Cecilia, este estudio se llevará a cabo entre junio y diciembre de 2024, abarcando medio año para capturar variaciones estacionales en la composición del aceite esencial.

La selección del área de estudio se basa en la alta biodiversidad y la presencia significativa de la especie *Citrus limon x reticulata* en los bosques montano bajos de Sucumbíos este entorno específico proporciona un contexto ideal para evaluar el potencial del aceite esencial, considerando tanto las condiciones climáticas como ecológicas únicas de la región (GADP, 2019a).

1.3. Formulación del problema

El problema se centra en la creciente deforestación de los bosques siempreverdes montano bajos de Sucumbíos, Ecuador, esta deforestación, impulsada por la expansión agrícola, la explotación maderera y la minería, está llevando a la pérdida de biodiversidad y la degradación de importantes ecosistemas (GADP, 2019b; INEC, 2010).

La investigación busca abordar esta problemática mediante la revalorización de los árboles de limón mandarina (*Citrus limon x reticulata*) a través de la caracterización química y el estudio de sus posibles usos industriales y terapéuticos, al encontrar nuevas aplicaciones para el aceite esencial de estos árboles, se espera promover su conservación y ofrecer una alternativa económica viable que incentive la protección de los bosques (Dazzini Langdon & Navarrete Zambrano, 2020).

Este enfoque pretende no solo reducir la tasa de deforestación, sino también proporcionar beneficios económicos y ambientales para las comunidades locales, contribuyendo así a un desarrollo sostenible en la región.

1.4. Preguntas de investigación

¿Cuál es la composición química del aceite esencial de limón mandarina?

¿Qué métodos de extracción son más eficientes para este aceite esencial?

¿Qué efectos antimicóticos presenta el aceite esencial de limón mandarina?

¿Cómo contribuye la extracción del aceite a la conservación de los bosques de Sucumbíos?

¿Qué aplicaciones industriales puede tener el aceite esencial de limón mandarina?

1.5. Objetivos

Objetivo general

Establecer un método eficiente para la extracción del aceite esencial de limón mandarina (*Citrus limon x reticulata*) y caracterizar sus propiedades químicas y actividad antifúngica.

Objetivos específicos

Estandizar la extracción del aceite esencial de limón mandarina (*Citrus limon x reticulata*), mediante la destilación por arrastre de vapor, maximizando su eficiencia productiva.

Determinar las propiedades químicas el aceite esencial de limón mandarina (*Citrus limon x reticulata*) presente en los bosques siempreverdes montano bajos de la provincia de Sucumbíos, mediante cromatografía de gases y espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

Analizar la actividad antifúngica del aceite esencial de limón mandarina (*Citrus limon x reticulata*), mediante la inhibición de *Aspergillus niger*, describiendo las potencialidades del aceite esencial.

1.6. Hipótesis

1.6.1. Hipótesis Nula

La caracterización química y la actividad antifúngica del aceite esencial de limón mandarina (*Citrus limon x reticulata*) presente en los bosques siempreverdes montano bajos de la provincia de Sucumbíos, muestra que no tiene potencialidades.

1.6.2. Hipótesis alterna

La caracterización química y la actividad antifúngica del aceite esencial de limón mandarina (*Citrus limon x reticulata*) presente en los bosques siempreverdes montano bajos de la provincia de Sucumbíos, muestra que tiene potencialidades.

1.7. Justificación

Con más de 10000 especies de árboles descritas y casi sin conocer sus composiciones químicas, la biomasa de los bosques del Ecuador presenta una gran potencialidad por explotar, sin embargo, la deforestación, cambio de uso de suelo, actividades extractivistas amenazan con acabar con estas potencialidades (FAO, 2013), la presente investigación sobre la caracterización química del aceite esencial de limón mandarina (*Citrus limon x reticulata*) es fundamental para abordar la problemática de la deforestación en los bosques siempreverdes montano bajos de la provincia de Sucumbíos, Ecuador.

El aceite esencial de limón mandarina posee compuestos bioactivos como el limoneno y el mirceno, que tienen propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antiinflamatorias, estos compuestos pueden ser utilizados en la industria farmacéutica y cosmética, proporcionando una fuente de ingresos alternativa que incentive la conservación de los bosques, la importancia de los aceites esenciales en diversas industrias ha sido ampliamente documentada, destacando su potencial para el desarrollo de nuevos productos y terapias efectivas (Ali et al., 2015a).

La utilización sostenible de estos recursos naturales contribuye a la mitigación del cambio climático. Los bosques actúan como sumideros de carbono, y su conservación es esencial para reducir las emisiones de dióxido de carbono, la revalorización de los

productos forestales no maderables, como los aceites esenciales, promueve prácticas de manejo forestal sostenible, reduciendo la presión sobre los recursos madereros y fomentando la biodiversidad (Norden, 2014; Soares et al., 2022).

La investigación también tiene un impacto significativo en la economía local, la extracción y comercialización de aceites esenciales pueden generar empleos y mejorar la calidad de vida de las comunidades locales, que a menudo dependen de los recursos forestales para su subsistencia, este enfoque no solo ayuda a conservar los bosques, sino que también ofrece oportunidades económicas que pueden transformar la economía rural (Valarezo et al., 2021).

El avance en técnicas para el análisis de aceites esenciales, como la cromatografía de gases y la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), permite una caracterización precisa de estos compuestos, maximizando su eficiencia y calidad. La adopción de nuevas tecnologías de extracción, como la extracción de aceites esenciales por arrastre de vapor, ha demostrado mejorar significativamente los rendimientos y la pureza de los aceites esenciales, lo que es crucial para su aplicación en productos de alto valor añadido (Simirgiotis et al., 2020).

Por último, la investigación sobre los aceites esenciales de limón mandarina puede abrir nuevas fronteras en el ámbito de la medicina y la farmacología, los estudios han demostrado que estos aceites tienen múltiples propiedades terapéuticas, incluyendo efectos anticancerígenos, antiulcerosos y antidiabéticos, lo que sugiere un vasto potencial para el desarrollo de nuevos tratamientos médico (McDonnell & Newcomb, 2019; Russo et al., 2015; Sharmeen et al., 2021) la exploración de estas propiedades puede conducir a importantes avances en la medicina natural y complementaria, beneficiando a una amplia gama de pacientes.

1.8. Declaración de las variables (Operacionalización)

1.8.1. Dependientes

Tabla 1: Variables dependientes.

<u>Objetivo</u> <u>Específico</u>	<u>Variable</u>	<u>Descripción de</u> <u>variable</u>	<u>Indicador</u>	<u>Instrumento</u>
OBS1.	Rendimiento del aceite esencial.	Rendimiento del aceite esencial cambiando condiciones específicas (temperatura, disolvente, tiempo)	Rendimiento del aceite de aceite esencial/cantidad de materia prima destilada)	Tabla de rendimiento.
OBS2.	Composición química.	Espectro químico con los compuestos químicos presentes.	Numero de compuestos químicos constitutivos y % del compuesto.	Espectro GC Espectro FTIR
OBS3.	Acción antifúngica.	Capacidad de inhibición de hongos	Inhibición de hongos de colonias	Tabla de inhibición del aceite esencial.

presenta el inicial/conteo de
aceite esencial. colonias final)

1.8.2. Independientes

Tabla 2 Variables Independientes

<u>Objetivo</u> <u>Específico</u>	<u>Variable</u>	<u>Descripción de</u> <u>variable</u>	<u>Indicador</u>	<u>Instrumento</u>
OBS1.	Parte vegetativa de donde se obtiene el aceite: Hoja	Aceite esencial obtenido por destilación en destilador por arrastre de vapor	Aceite esencial	Tablas de extracción de aceite esencial Aceite esencial
OBS3.	Cascará			

CAPÍTULO II: Marco Teórico Referencial

La investigación adopta una perspectiva de conservación ambiental y desarrollo sostenible, desde este enfoque, la biodiversidad de los bosques siempreverdes montano bajos de la provincia de Sucumbíos se considera un recurso invaluable, tanto por su valor ecológico como por su potencial para generar productos biotecnológicos de alto valor añadido, como los aceites esenciales.

La provincia de Sucumbíos, situada en la región amazónica de Ecuador, se caracteriza por una geografía y ecología altamente biodiversa, el suelo en esta área es predominantemente ácido y de baja fertilidad natural debido a la elevada lixiviación de nutrientes, típica de las regiones tropicales con alta pluviosidad, estos suelos presentan una capa superficial rica en materia orgánica derivada de la descomposición de la densa vegetación, lo que favorece el desarrollo de la biodiversidad local (GADP, 2019b).

Esta provincia experimenta un régimen de lluvias intenso y constante a lo largo del año. Las precipitaciones anuales oscilan entre los 3.000 y 4.000 mm, con una temporada más húmeda entre los meses de marzo y mayo, esta alta pluviosidad es crucial para el mantenimiento de los bosques siempreverdes montano bajos, que cubren gran parte de la provincia y son esenciales para la regulación del ciclo hidrológico y de nutrientes.

La flora de Sucumbíos es diversa y rica, con una predominancia de especies maderables como la caoba (*Swietenia macrophylla*) y el cedro (*Cedrela odorata*), las plantas no maderables como el limón mandarina (*Citrus limon x reticulata*), que es

objeto de esta investigación. La flora incluye una amplia variedad de epífitas, helechos, orquídeas y otras plantas características del bioma amazónico.

La fauna es igualmente diversa, albergando numerosas especies emblemáticas, como el jaguar (*Panthera onca*), el tapir amazónico (*Tapirus terrestris*) y varias especies de primates. Los ríos de la provincia son el hogar de delfines de río (*Inia geoffrensis*) y caimanes, lo que refuerza el estatus de Sucumbíos como un punto caliente de biodiversidad en Ecuador (GADP, 2019b).

Se sustenta en la idea de que la biotecnología es una herramienta crucial para la conservación ambiental, ya que permite aprovechar los recursos naturales de manera sostenible, contribuyendo al desarrollo económico local y a la preservación de la biodiversidad.

En este contexto de un ecosistema variable, exuberante único y diverso la variable principal de este estudio es el aceite esencial de limón mandarina, definido como una mezcla compleja de compuestos volátiles obtenidos de la planta *Citrus limon x reticulata*. Este aceite esencial se investiga en términos de su composición química, propiedades biológicas y aplicaciones potenciales (Rivera et al., 2022).

El rendimiento del aceite esencial, que se refiere a la cantidad de aceite extraído en relación con la materia prima utilizada. Este aspecto es crucial para determinar la viabilidad económica y la eficiencia del proceso de extracción. El estudio evalúa la destilación por arrastre de vapor, y optimiza parámetros como la temperatura, el tiempo y el tipo de disolvente para maximizar el rendimiento.

Existen estudios previos sobre aceites esenciales de cítricos, hay una carencia significativa de investigaciones centradas específicamente en el aceite esencial de

limón mandarina y su potencial biotecnológico. La mayoría de los estudios realizados no se han enfocado en los bosques siempreverdes montano bajos de Sucumbíos, lo que deja un vacío en la comprensión de cómo las condiciones ecológicas de esta región influyen en la composición química y las propiedades biológicas del aceite esencial (Stampella et al., 2013).

La contribución académica de esta investigación radica en llenar estas lagunas mediante una caracterización detallada del aceite esencial de limón mandarina en este entorno específico. Este estudio ampliará el conocimiento científico sobre los aceites esenciales de cítricos y proporcionará una base sólida para el desarrollo de aplicaciones industriales y terapéuticas que promuevan la conservación de los bosques y el desarrollo sostenible.

Los resultados de esta investigación pueden revelar una alta concentración de compuestos bioactivos como el limoneno, lo que podría abrir nuevas oportunidades para el uso del aceite esencial de limón mandarina en aplicaciones industriales y terapéuticas. La optimización del rendimiento del aceite esencial podría tener implicaciones importantes para su viabilidad económica, así como para la conservación de los recursos naturales.

El marco teórico de esta investigación establece una base sólida para el estudio del aceite esencial de limón mandarina en los bosques de Sucumbíos. Este enfoque teórico, que integra la biotecnología con la conservación ambiental y el desarrollo sostenible, ofrece un camino prometedor para abordar los desafíos actuales de la deforestación y la pérdida de biodiversidad.

2.1. Antecedentes Referenciales

La investigación sobre aceites esenciales y sus aplicaciones ha sido objeto de múltiples estudios tanto a nivel nacional como internacional, debido a su relevancia en diversas industrias, como la farmacéutica, cosmética y alimentaria. A continuación, se presentan algunos antecedentes clave que contextualizan la importancia del aceite esencial de limón mandarina (*Citrus limon x reticulata*) en el ámbito científico.

En el contexto internacional, estudios como el de (Ali et al., 2015b) han demostrado la efectividad de los aceites esenciales de cítricos en la inhibición de bacterias patógenas, lo que sugiere su potencial en el desarrollo de productos antimicrobianos naturales o, investigaciones realizadas por (Boukhatem & Setzer, 2020) han caracterizado los aceites esenciales de diversas especies de cítricos, destacando la alta concentración de limoneno, un compuesto conocido por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias .

En el contexto de la biotecnología y la investigación sobre aceites esenciales, diversos estudios han explorado la capacidad inhibidora de hongos por parte de aceites esenciales derivados de cítricos. Un estudio significativo es el realizado por (Marinas et al., 2023), que investigó los efectos antimicrobianos de los aceites esenciales de diferentes especies de cítricos, incluyendo *Citrus sinensis* y *Citrus reticulata*. Este trabajo demostró que los aceites esenciales cítricos, especialmente aquellos con altos contenidos de limoneno y mircenol, son eficaces en la inhibición del crecimiento de hongos patógenos, como *Aspergillus niger* y *Candida albicans*. Los compuestos volátiles presentes en estos aceites esenciales actúan alterando la integridad de la membrana celular de los hongos, lo que provoca la pérdida de nutrientes esenciales y la muerte celular (Landeta & Molinar, 2020; Mobolade, 2020).

El investigador (Horowitz, 2011) revisó el uso de aceites esenciales en aromaterapia y sus aplicaciones antimicrobianas. Se encontró que los aceites esenciales de cítricos tienen un notable efecto antifúngico, lo que los convierte en candidatos prometedores para el desarrollo de tratamientos naturales contra infecciones fúngicas. Estos aceites, debido a su naturaleza lipofílica, pueden penetrar fácilmente en las membranas celulares de los hongos, interfiriendo con la función mitocondrial y la producción de energía, lo que inhibe su crecimiento y proliferación.

En Ecuador, el trabajo de (Noriega et al., 2019) ha explorado la actividad antifúngica de extractos de plantas locales, incluyendo cítricos, y ha subrayado la importancia de la biodiversidad del país para el desarrollo de nuevos productos biotecnológicos. Estos son particularmente relevantes para la presente investigación, que se centra en la caracterización del aceite esencial de limón mandarina, una especie híbrida que combina características de limón y mandarina, como indican estudios previos realizados en la región.

Según (Naik & Sellappan, 2020a), analizaron las capacidades antioxidantes y antibacterianas de aceites esenciales obtenidos en regiones áridas, utilizando técnicas como la cromatografía de gases y la espectroscopia infrarroja, métodos que también serán empleados en la presente investigación. Este tipo de euna base sólida para la aplicación de estos métodos en el análisis de aceites esenciales en Ecuador.

En investigaciones parecidas según indica (Julián et al., 2020), la deforestación y la pérdida de biodiversidad en Ecuador han impulsado la búsqueda de alternativas sostenibles para la explotación de los recursos naturales, como los productos no maderables derivados de aceites esenciales. Este enfoque es crucial para la conservación de los bosques de Sucumbíos y el desarrollo de una bioeconomía

sostenible . Los antecedentes referenciales destacan la importancia de los aceites esenciales en diversas aplicaciones industriales y la necesidad de investigar más a fondo su potencial, especialmente en regiones ricas en biodiversidad como Ecuador.

2.2. Marco Conceptual

El marco conceptual de la presente investigación se enfoca en la fundamentación teórica y en la definición de los conceptos clave que guiarán el estudio sobre la caracterización química y los usos potenciales del aceite esencial de limón mandarina (*Citrus limon x reticulata*). Este marco precisa las variables principales de la investigación, permitiendo una comprensión clara de los términos y métodos utilizados en el análisis.

2.2.1. Aceites Esenciales

El concepto de *aceites esenciales* se refiere a mezclas complejas de compuestos volátiles producidos por plantas, que se caracterizan por sus aromas distintivos y sus múltiples propiedades biológicas, como actividades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicóticas. Según (Gyesi et al., 2019) los aceites esenciales se extraen comúnmente a través de procesos como la destilación por arrastre de vapor y se utilizan ampliamente en industrias como la farmacéutica, cosmética y alimentaria. En el contexto de esta investigación, el aceite esencial de limón mandarina es la variable principal, cuyo análisis se centrará en identificar sus componentes bioactivos más relevantes, como el limoneno y el mirceno.

2.2.2. Tipos de aceites esenciales

Los aceites esenciales pueden clasificarse en función de los compuestos químicos predominantes en su composición, siendo los monoterpenoides y los politerpenoides dos de las principales categorías. Esta clasificación se basa en la estructura de los terpenos, que son hidrocarburos derivados de unidades de isopreno y constituyen la base de la mayoría de los aceites esenciales (Rojas-Armas et al., 2022).

Los monoterpenoides son compuestos formados por dos unidades de isopreno, lo que les confiere una estructura básica de 10 carbonos. Estos compuestos son volátiles y responsables de los aromas característicos de muchas plantas. Los aceites esenciales ricos en monoterpenoides incluyen:

Aceite de Limón (*Citrus limon*): Contiene una alta concentración de limoneno, un monoterpenoide que constituye hasta el 90% de su composición. El limoneno es conocido por sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas y su capacidad para mejorar la digestión.

Aceite de Menta (*Mentha piperita*): Este aceite es rico en mentol, un monoterpenoide con efectos refrescantes y analgésicos. Se utiliza comúnmente en productos para aliviar dolores musculares y en preparados para el tratamiento de resfriados.

Aceite de Pino (*Pinus sylvestris*): Predominantemente compuesto de alfa-pineno y beta-pineno, estos monoterpenoides tienen propiedades antisépticas y descongestionantes, siendo utilizados en la aromaterapia para tratar afecciones respiratorias (Esquivel-Córdova et al., 2022).

Los politerpenoides son compuestos más complejos, formados por múltiples unidades de isopreno, lo que les da estructuras más largas y menos volátiles que los

monoterpenoides. Estos aceites esenciales suelen tener propiedades medicinales más duraderas y específicas.

Aceite de Copaiba (*Copaifera spp.*): Contiene beta-cariofileno, un politerpenoide con propiedades antiinflamatorias y cicatrizantes. Se utiliza ampliamente en medicina tradicional para tratar heridas y problemas de la piel.

Aceite de Pachulí (*Pogostemon cablin*): Rico en patchoulol, un sesquiterpenoide (un tipo de politerpenoide) conocido por sus propiedades antifúngicas y estabilizadoras en perfumería. Este aceite es menos volátil y tiene un aroma terroso y persistente.

Aceite de Vetiver (*Vetiveria zizanoides*): Contiene una mezcla de politerpenoides que le confieren propiedades calmantes y relajantes, siendo utilizado en la aromaterapia para aliviar el estrés y la ansiedad (Ali et al., 2015).

2.2.3. Características Específicas de los Aceites Esenciales Cítricos

Los aceites esenciales cítricos, como los de limón y naranja, se caracterizan por ser predominantemente monoterpenoides, especialmente limoneno. Este compuesto les otorga sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas, haciendo que estos aceites sean útiles en una amplia variedad de aplicaciones, desde la conservación de alimentos hasta la formulación de productos cosméticos (Sharmeen et al., 2021).

2.2.4. Citrus limon x reticulata

Citrus limon x reticulata es un híbrido entre el limón y la mandarina, que combina características de ambas especies. Este híbrido es de particular interés debido a su perfil químico único y sus aplicaciones potenciales. (Vasquez-Gomez et al., 2023a) señalan que el perfil químico de la mandarina incluye una alta concentración de

terpenos, como el limoneno, que son conocidos por sus propiedades beneficiosas para la salud, incluidas actividades antioxidantes y antimicóticas. En esta investigación, se explora la composición específica del aceite esencial de este híbrido y se evalúan sus posibles aplicaciones industriales y terapéuticas.

2.2.5. Limoneno

El *limoneno* es un monoterpeno cíclico, comúnmente encontrado en la cáscara de los cítricos, que se destaca por sus propiedades antioxidantes y antimicóticas. Según Zhang et al (2022), el limoneno es uno de los principales componentes de los aceites esenciales de cítricos y ha sido ampliamente estudiado por su capacidad para inhibir el crecimiento de hongos patógenos y neutralizar radicales libres. Este compuesto es uno de los principales objetivos del análisis en la presente investigación, dado su potencial para aplicaciones en la industria farmacéutica y alimentaria.

2.2.6. Mirceno

Otro compuesto de interés es el *pineno*, que se encuentra en diversas plantas, incluyendo los cítricos. Este compuesto es conocido por sus propiedades antiinflamatorias y sedantes. Según Soares et al (2022), el pineno tiene un efecto sinérgico con otros terpenos, potenciando su actividad biológica. En el contexto de esta investigación, el mirceno será cuantificado y evaluado como parte de la caracterización química del aceite esencial de limón mandarina, con el objetivo de identificar su contribución a las propiedades terapéuticas del aceite.

2.2.7. Técnicas de extracción de aceites esenciales

2.2.7.1. Destilación por arrastre de vapor

La destilación por arrastre de vapor es una técnica usada para extraer aceites esenciales mediante la circulación de vapor de agua caliente a través de la materia vegetal. Este proceso permite separar los compuestos volátiles debido a sus diferentes puntos de ebullición, posibilitando que el vapor arrastre las moléculas de aceite esencial. Posteriormente, el vapor cargado con aceite se condensa y se recolecta en un recipiente donde el agua y el aceite esencial se separan naturalmente. Esta técnica es ideal para plantas cuyos aceites resisten el calor y se emplea en la industria de perfumes y productos naturales, destacándose por su eficiencia sin alterar la composición química, lo cual produce aceites esenciales puros y de alta calidad (Sethunga et al., 2020).

2.2.7.1. Destilación agua-vapor

La destilación agua-vapor combina el uso de agua y vapor para extraer aceites esenciales. La materia vegetal se pone en contacto con ambos elementos, y el calor ayuda a liberar los aceites, que son transportados por el vapor hasta un sistema de condensación donde se enfrían y separan. Este método es especialmente adecuado para plantas con compuestos frágiles o sensibles al calor. Muy popular en la extracción de aceites en industrias farmacéuticas y cosméticas, la destilación agua-vapor preserva la integridad de los aromas naturales y es ampliamente usada por su efectividad (Machado et al., 2022).

2.2.7.2. Hidrodestilación

La hidrodestilación implica sumergir la materia vegetal en agua y calentarla hasta su punto de ebullición. A medida que el agua hierve, los aceites volátiles de la planta se evaporan con el vapor y luego se condensan. Al enfriarse, el aceite esencial se separa del agua debido a su menor densidad. Este método es adecuado para plantas con compuestos susceptibles a altas temperaturas y es común en la producción de aceites esenciales de plantas medicinales, destacándose por su capacidad de extraer componentes aromáticos sin alterarlos (Molina et al., 2024).

2.2.7.3. Inmersión en aceite

La técnica de inmersión en aceite consiste en colocar la planta en un aceite portador, que absorbe los compuestos aromáticos a través de maceración. La planta se deja reposar en el aceite a una temperatura controlada, evitando la degradación de los compuestos volátiles. Con el tiempo, el aceite portador extrae los componentes aromáticos, obteniendo una infusión con propiedades del aceite esencial. Ideal para plantas delicadas, esta técnica es común en la elaboración de aceites para cosméticos y masajes, siendo una opción accesible para extracciones caseras y comerciales a pequeña escala (Williams & Roberts, 2017).

2.2.7.4. Fermentación

La fermentación es una técnica en la que la materia vegetal se somete a condiciones controladas de temperatura y humedad. Durante este proceso, las enzimas de la planta y los microorganismos descomponen las estructuras celulares, liberando aceites esenciales. Aunque menos común, la fermentación se utiliza para extraer aceites de materiales que requieren descomposición inicial para liberar sus compuestos. Este método es empleado en la industria para ciertos tipos de raíces y maderas que no responden bien al calor (Stratakos & Koidis, 2015).

2.2.7.5. Expresión mecánica

La expresión mecánica, o prensado en frío, es un método que no emplea calor y se usa especialmente en cítricos. Mediante presión mecánica, se extrae el aceite esencial de las glándulas de la fruta sin alteraciones químicas, manteniendo el aroma natural. Es común en aceites de frutas como limón, naranja y pomelo, y se utiliza en productos alimenticios y cosméticos que requieren fragancias frescas y naturales (Ünlü, 2022).

2.2.8. Técnicas de caracterización de aceites esenciales

2.2.8.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS)

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) es una técnica analítica avanzada y esencial para la caracterización de compuestos volátiles presentes en mezclas complejas, como los aceites esenciales. Este método combina la separación de compuestos por cromatografía de gases (GC) con la identificación precisa de cada componente mediante espectrometría de masas (MS), lo que permite no solo separar, sino también identificar y cuantificar los componentes volátiles de una muestra. Esto resulta fundamental en áreas como la biotecnología, la farmacología y otras ciencias aplicadas, donde es crucial conocer la composición exacta de los compuestos analizados.

En el proceso GC/MS, la muestra se volatiliza y se introduce en un flujo de gas portador (normalmente helio o nitrógeno) que la transporta a través de una columna capilar recubierta con una fase estacionaria. Los compuestos en la muestra interactúan con la fase estacionaria de manera distinta en función de sus propiedades físicas y químicas, lo que causa su separación en el tiempo. Los compuestos con menor afinidad por la fase estacionaria pasan más rápidamente por la columna, mientras que aquellos con mayor afinidad tardan más en salir. Este tiempo, conocido como tiempo de retención, es característico de cada compuesto bajo condiciones específicas de columna y gas portador. (Boughendjioua et al., 2020)

En el análisis de aceites esenciales cítricos, la técnica GC/MS permite identificar y cuantificar compuestos específicos como el limoneno, el mirceno y el linalool, proporcionando una "huella digital" del aceite. Esta información es crucial no solo para aplicaciones en aromaterapia y cosmética, sino también para garantizar consistencia y eficacia en aplicaciones farmacéuticas. La GC/MS ofrece así una herramienta poderosa para evaluar el potencial terapéutico o industrial de un aceite esencial, con aplicaciones que contribuyen tanto a la investigación científica como a la industria (Tapayachi, 2024)

La cromatografía de gases (GC, por sus siglas en inglés) es una técnica analítica esencial en la caracterización de compuestos volátiles presentes en mezclas complejas, como los aceites esenciales. Este método permite separar, identificar y

cuantificar los componentes químicos volátiles en una muestra, lo que es crucial para estudios en biotecnología, farmacología, y otras ciencias aplicadas.

En la cromatografía de gases, la muestra a analizar se volatiliza y se introduce en un flujo de gas portador (generalmente helio o nitrógeno) dentro de una columna capilar recubierta con una fase estacionaria, a medida que los compuestos de la muestra pasan a través de la columna, interactúan de manera diferente con la fase estacionaria según sus propiedades físicas y químicas, lo que provoca su separación en el tiempo.

Los compuestos con menor afinidad por la fase estacionaria se diluyen más rápidamente, mientras que aquellos con mayor afinidad tardan más en salir de la columna. El tiempo que tarda cada compuesto en diluirse se denomina tiempo de retención, y este valor es característico de cada compuesto bajo condiciones específicas de la columna y del gas portador.

2.2.8. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

La *espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier* (FTIR) es otra técnica crítica en el análisis de aceites esenciales. Esta técnica se basa en la absorción de radiación infrarroja por los compuestos químicos, lo que permite identificar los diferentes grupos funcionales presentes en una muestra. Según Chóez-Guaranda et al (2023), la FTIR es especialmente útil para complementar los datos obtenidos por GC-MS, proporcionando una visión más completa de la estructura química de los componentes del aceite esencial. En el presente estudio, la FTIR se utilizará para confirmar la identidad de los compuestos detectados por GC-MS y para explorar las posibles interacciones entre ellos.

2.2.9. Rendimiento del Aceite Esencial

El *rendimiento del aceite esencial* es una variable que se refiere a la cantidad de aceite extraído en relación con la cantidad de materia prima utilizada. Este parámetro es crucial para evaluar la viabilidad económica del proceso de extracción. Según Ramírez (2022), factores como la temperatura, el tiempo de extracción y el tipo de disolvente pueden influir significativamente en el rendimiento. En la presente investigación, se optimizarán estas variables para maximizar el rendimiento del aceite esencial de limón mandarina, asegurando que el proceso sea eficiente y sostenible.

El rendimiento del aceite esencial es un parámetro clave en la producción y evaluación de aceites esenciales, que se refiere a la cantidad de aceite obtenido a partir de una cantidad específica de materia prima vegetal. Este rendimiento se expresa comúnmente como un porcentaje, que se calcula mediante la siguiente fórmula:

Las variables que influyen en el Rendimiento son: tipo de materia prima: La parte de la planta utilizada (hojas, flores, cáscara, raíces) tiene un impacto significativo en el rendimiento. Por ejemplo, las cáscaras de cítricos como el limón y la naranja suelen proporcionar rendimientos más altos debido a su mayor contenido de glándulas productoras de aceite.

El método de extracción y sus parámetros son cruciales para maximizar el rendimiento. La destilación por arrastre de vapor es el método más común, y las variables críticas incluyen:

Temperatura: Una temperatura demasiado alta puede degradar los compuestos volátiles, mientras que una demasiado baja puede resultar en una extracción incompleta.

Presión: En destilación a presión reducida, se pueden extraer compuestos más delicados que se descomponen a presiones normales.

Tiempo de Extracción: Un tiempo adecuado es necesario para asegurar que se extraigan todos los componentes volátiles sin sobrecalentar la materia prima.

Estado de la Materia Prima: La frescura y la humedad de la materia prima también afectan el rendimiento. Las plantas frescas generalmente rinden más aceite esencial que las plantas secas, aunque esto puede depender del tipo específico de planta y del método de extracción utilizado (Ramírez, 2022).

Método de Extracción: Métodos avanzados como la extracción asistida por microondas o la extracción con fluidos supercríticos pueden mejorar significativamente el rendimiento en comparación con la destilación tradicional. Estos métodos permiten una extracción más eficiente de compuestos volátiles, aunque pueden ser más costosos y técnicamente complejos.

El rendimiento del aceite esencial es crucial tanto desde un punto de vista económico como científico. Desde el punto de vista económico, un mayor rendimiento implica una mayor eficiencia y rentabilidad en la producción de aceites esenciales, lo cual es vital para su comercialización. Científicamente, el rendimiento puede proporcionar información sobre la calidad y la pureza del aceite esencial, lo que influye en su aplicación terapéutica y en la investigación sobre sus propiedades biológicas (Simirgiotis et al., 2020).

2.2.10. Actividad Antimicótica

La actividad antimicótica de los aceites esenciales es una de sus propiedades más investigadas, y se refiere a la capacidad de estos compuestos para inhibir el crecimiento de hongos patógenos. Según Ali et al (2015), los aceites esenciales de cítricos, debido a su alto contenido de terpenos como el limoneno, son particularmente efectivos contra una amplia gama de hongos. En este estudio, se evaluará la actividad antimicótica del aceite esencial de limón mandarina mediante pruebas de inhibición de crecimiento fúngico, lo que podría abrir nuevas vías para su aplicación en la industria farmacéutica.

La actividad antimicótica de los aceites esenciales es un área de investigación que ha ganado considerable atención debido a la creciente resistencia de los hongos patógenos a los tratamientos convencionales. Los aceites esenciales, que son mezclas complejas de compuestos volátiles extraídos de plantas, han demostrado poseer propiedades antimicóticas potentes, ofreciendo una alternativa natural a los fungicidas sintéticos.

2.2.11. Mecanismos de Acción

Los aceites esenciales ejercen su actividad antimicótica a través de varios mecanismos. Uno de los mecanismos principales es la disrupción de la membrana celular fúngica. Los componentes lipofílicos de los aceites esenciales, como los terpenos y fenoles, se integran en la bicapa lipídica de la membrana celular, alterando su integridad. Esto conduce a un aumento en la permeabilidad de la membrana, lo que permite la pérdida de iones, metabolitos y macromoléculas esenciales, causando la muerte celular del hongo (Zhang et al., 2022).

La inhibición de la síntesis de ergosterol, un componente crucial de la membrana celular fúngica. Los aceites esenciales interfieren con las enzimas involucradas en la biosíntesis de ergosterol, lo que debilita la membrana celular y compromete la viabilidad del hongo. Algunos aceites esenciales pueden generar especies reactivas de oxígeno (ROS), que causan daño oxidativo a los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos fúngicos, contribuyendo a su actividad antimicótica (Ali et al., 2015).

2.2.12. Ejemplos de Aceites Esenciales con Actividad Antimicótica

Aceite de Limón (*Citrus limon*): Este aceite esencial es rico en limoneno y beta-pineno, compuestos que han demostrado tener una actividad antimicótica significativa. El aceite de limón ha mostrado eficacia contra hongos como *Candida albicans* y *Aspergillus niger*, donde su mecanismo de acción incluye la disrupción de la membrana celular fúngica y la inhibición de la biosíntesis de ergosterol. Su uso en formulaciones antimicóticas naturales es cada vez más popular, debido a su capacidad para combatir infecciones superficiales en la piel y uñas (Zhang et al., 2022).

Aceite de Naranja (*Citrus sinensis*): Contiene altos niveles de limoneno y mirceno, los cuales poseen propiedades antimicóticas notables. Este aceite esencial ha sido estudiado por su efectividad en la inhibición del crecimiento de hongos como *Penicillium expansum* y *Trichophyton mentagrophytes*. Los estudios han demostrado que el aceite de naranja actúa dañando la membrana celular fúngica y generando especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que lleva a la muerte del hongo. Es utilizado en la industria alimentaria como un conservante natural y en productos de higiene para prevenir infecciones fúngicas (Simirgiotis et al., 2020).

La actividad antimicótica de los aceites esenciales tiene aplicaciones en diversas áreas, incluyendo la medicina, la agricultura y la industria alimentaria. En medicina, los aceites esenciales se están explorando como tratamientos alternativos para infecciones fúngicas resistentes. En la agricultura, se utilizan para controlar patógenos fúngicos en cultivos, reduciendo la dependencia de fungicidas químicos. En la industria alimentaria, se emplean como conservantes naturales para prevenir el crecimiento de hongos en productos perecederos.

2.3. Marco Teórico

Los aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos volátiles, extraídos de diversas partes de las plantas, como hojas, flores y cáscaras. Según Ali et al (2015), estos compuestos son conocidos por sus propiedades terapéuticas y se han utilizado históricamente en la medicina tradicional y, más recientemente, en la industria farmacéutica y cosmética. Su capacidad para actuar como antimicrobianos, antioxidantes y antiinflamatorios los convierte en componentes valiosos para una amplia gama de aplicaciones.

2.3.1. Técnicas de caracterización

Las técnicas de caracterización química son fundamentales para analizar la composición y propiedades de los aceites esenciales. Estas técnicas permiten identificar y cuantificar los componentes químicos presentes en los aceites, proporcionando información esencial para su aplicación en diversas industrias, incluyendo la farmacéutica, cosmética y alimentaria.

La cromatografía de gases (GC) es una de las técnicas más utilizadas para la caracterización de aceites esenciales. Esta técnica combina la capacidad de

separación de la cromatografía de gases. En el proceso, los compuestos volátiles de la muestra se separan en función de su volatilidad y se detectan individualmente.

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) es otra técnica clave en la caracterización química de los aceites esenciales. Esta técnica se basa en la absorción de radiación infrarroja por los compuestos químicos, lo que provoca vibraciones en las moléculas. Cada compuesto tiene un espectro infrarrojo único, lo que permite identificar los diferentes grupos funcionales presentes en la muestra. La FTIR es particularmente útil para complementar la información obtenida por GC-MS, proporcionando detalles sobre la estructura química de los compuestos volátiles (Chóez-Guaranda et al., 2023).

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es otra técnica utilizada en la caracterización de aceites esenciales, especialmente cuando se trata de compuestos menos volátiles que no se analizan fácilmente mediante GC-MS. En HPLC, los compuestos de la muestra se separan en función de su interacción con una fase estacionaria líquida y una fase móvil. Esta técnica es ideal para identificar y cuantificar compuestos polares y termolábiles presentes en los aceites esenciales, como ciertos polifenoles y ácidos orgánicos.

La resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica avanzada que proporciona información detallada sobre la estructura molecular de los componentes de los aceites esenciales. A través de la interacción de los núcleos atómicos con un campo magnético, la RMN permite determinar la disposición espacial de los átomos dentro de una molécula. Esta técnica es crucial para la elucidación estructural de nuevos compuestos presentes en aceites esenciales, aunque requiere una mayor cantidad de muestra y es más costosa.

Las técnicas de caracterización química son esenciales para garantizar la calidad, pureza y consistencia de los aceites esenciales, lo que es fundamental para su uso en aplicaciones industriales y terapéuticas. Estas técnicas no solo permiten la identificación precisa de los compuestos presentes, sino que también proporcionan información valiosa sobre su posible actividad biológica y estabilidad, aspectos clave para su comercialización y uso seguro. La caracterización química es un paso fundamental para comprender la composición y las propiedades de los aceites esenciales.

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) es una técnica complementaria que permite identificar los grupos funcionales presentes en las moléculas de los aceites esenciales. Según Chóez-Guaranda et al (2023), la combinación de GC-MS y FTIR proporciona una comprensión más completa de la estructura molecular de los aceites esenciales, lo que es crucial para su aplicación en productos de alto valor añadido.

En el contexto de esta investigación, la aplicación de GC-MS y FTIR en la caracterización del aceite esencial de limón mandarina es esencial para identificar y cuantificar sus componentes bioactivos. Esto no solo permite una mejor comprensión de sus propiedades, sino que también facilita la optimización de los métodos de extracción, como sugiere Vasquez-Gomez et al (2023) .

Los aceites esenciales han demostrado tener un amplio espectro de aplicaciones biotecnológicas. Ali et al (2015) destacan que estos compuestos son fundamentales en el desarrollo de productos farmacéuticos, debido a sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes . En particular, el aceite esencial de cítricos, como el

de limón mandarina, es altamente valorado por su alta concentración de terpenos, como el limoneno, que poseen fuertes propiedades biológicas.

A nivel internacional, Zhang et al (2022) han explorado el uso de aceites esenciales en la industria alimentaria, donde se utilizan como conservantes naturales debido a su capacidad para inhibir el crecimiento microbiano y prolongar la vida útil de los productos. Esto subraya el potencial de los aceites esenciales no solo en la medicina, sino también en la preservación de alimentos, alineándose con la creciente demanda de productos naturales y sostenibles.

En Ecuador, Ramírez (2022) ha estudiado la aplicación de aceites esenciales en la agricultura, destacando su uso como biopesticidas naturales. Esta aplicación es de particular importancia en el contexto de la agricultura sostenible, donde se busca reducir el uso de productos químicos sintéticos en favor de alternativas naturales que no dañen el medio ambiente.

2.3.4 Posición Conceptual Crítica

El enfoque teórico predominante en la investigación de aceites esenciales se basa en su caracterización química y en la exploración de sus propiedades biológicas para su aplicación en diversas industrias. Sin embargo, es esencial adoptar una posición crítica frente a esta concepción, reconociendo tanto las oportunidades como las limitaciones de estos compuestos.

Por un lado, autores como Simirgiotis et al (2020) han subrayado la importancia de la precisión en la caracterización química para asegurar la calidad y efectividad de los aceites esenciales en aplicaciones industriales. Este enfoque es fundamental para maximizar el potencial de estos compuestos en productos farmacéuticos y

cosméticos, asegurando que sus propiedades terapéuticas se conserven y optimicen durante el proceso de producción.

Es importante considerar las limitaciones que presentan las técnicas actuales de extracción y caracterización. Aunque la GC-MS y la FTIR son herramientas poderosas, Ramírez (2022) señala que la variabilidad en la composición química de los aceites esenciales puede depender de factores como el clima, el tipo de suelo y las condiciones de cultivo, lo que puede afectar la consistencia de los resultados. Este aspecto subraya la necesidad de desarrollar métodos de extracción más estandarizados y reproducibles, que permitan obtener aceites esenciales de calidad consistente.

Es crucial abordar el impacto ambiental de la extracción de aceites esenciales, especialmente en regiones biodiversas como el Amazonas. Según Chóez-Guaranda et al (2023), la explotación no sostenible de plantas para la producción de aceites esenciales podría llevar a la degradación de ecosistemas sensibles. Por lo tanto, es fundamental que la investigación en este campo se enfoque también en la sostenibilidad y en la conservación de los recursos naturales, promoviendo prácticas agrícolas y de recolección responsables.

El marco teórico de esta investigación se apoya en una base sólida de estudios previos que han explorado las propiedades y aplicaciones de los aceites esenciales. Al mismo tiempo, adopta una posición crítica que reconoce tanto las oportunidades como los desafíos en la caracterización y aplicación de estos compuestos. La combinación de técnicas analíticas avanzadas, como la GC-MS y la FTIR, con un enfoque en la sostenibilidad, ofrece un camino prometedor para maximizar el

potencial del aceite esencial de limón mandarina en diversas aplicaciones industriales, mientras se asegura la protección del medio ambiente y la biodiversidad.

CAPÍTULO III: Diseño Metodológico

El diseño metodológico del presente estudio se fundamenta en un enfoque cuantitativo, sustentado en el paradigma positivista, que busca establecer relaciones objetivas y medibles entre las variables de interés. Este enfoque se caracteriza por la recolección y análisis de datos cuantificables que permiten la generalización de los resultados y la verificación de hipótesis previamente planteadas (Saavedra, 2022). La elección de este paradigma responde a la necesidad de realizar una investigación rigurosa y sistemática que permita evaluar de manera precisa los efectos y relaciones entre las variables estudiadas.

La metodología adoptada es de tipo experimental debido a que se busca manipular una o más variables independientes para observar sus efectos sobre las variables dependientes, permitiendo así establecer relaciones de causalidad (Moumni et al., 2020). Este tipo de investigación es idóneo para el estudio de los procesos biotecnológicos, ya que facilita la evaluación controlada de diferentes condiciones experimentales y su impacto en los resultados.

Los métodos teóricos empleados incluyen la revisión exhaustiva de literatura científica para la construcción del marco teórico y la formulación de hipótesis. Estos métodos permiten situar el estudio en el contexto de investigaciones previas y justificar la relevancia del mismo (Scalvenzi et al., 2019).

En cuanto a los métodos empíricos, se utilizarán técnicas de recolección de datos basadas en experimentos controlados, donde se medirán variables como la tasa de crecimiento microbiano, la concentración de sustrato y la actividad enzimática bajo diferentes condiciones. Estos datos se obtendrán mediante la aplicación de técnicas

analíticas como la cromatografía de gases y la espectroscopia infrarroja, garantizando la precisión y confiabilidad de las mediciones (Hasanvandi et al., 2023).

La población y muestra del estudio se centrará en sistemas biológicos específicos, como cultivos microbianos y reacciones enzimáticas, seleccionados por su relevancia en el campo de la biotecnología. La selección de la muestra se realizará de manera que represente adecuadamente las condiciones típicas de estos sistemas, asegurando que los resultados sean aplicables en contextos similares (Abdoul-Latif et al., 2022).

Los métodos estadísticos para utilizar incluirán el análisis de varianza (ANOVA) para comparar los efectos de diferentes tratamientos experimentales, así como la regresión lineal para evaluar las relaciones entre las variables. Estos métodos permitirán no solo la interpretación precisa de los datos obtenidos, sino también la validación de las hipótesis formuladas, (Naik & Sellappan, 2020b) las conclusiones del estudio.

3.1. Tipo y diseño de investigación

El presente estudio adopta un enfoque cuantitativo, fundamentado en la necesidad de obtener resultados medibles y objetivos que permitan establecer relaciones causales claras entre las variables estudiadas. Este tipo de investigación es idóneo para evaluar la eficacia de los aceites esenciales en la inhibición de hongos, dado que se basa en la recolección de datos numéricos y su análisis estadístico. El diseño de investigación es experimental, ya que se manipulan variables independientes, como la procedencia y parte de la planta utilizada, para observar su efecto sobre variables dependientes como la inhibición fúngica (ABDU et al., 2021).

Los métodos teóricos empleados, como la revisión de la literatura, permiten contextualizar el estudio dentro del campo de la biotecnología y fundamentar las hipótesis planteadas (García & Figueroa, 2018). Por otro lado, los métodos prácticos experimentales, como la extracción y caracterización de aceites esenciales, proporcionan datos empíricos que validan o refutan dichas hipótesis, aportando así resultados concretos y generalizables a contextos similares.

3.2. La población y la muestra

La población del presente estudio está compuesta por 45 árboles de limón mandarina (*Citrus limon x reticulata*), distribuidos en tres procedencias diferentes dentro de la provincia de Sucumbíos, Ecuador. Cada procedencia contribuye con 15 árboles, seleccionados para representar la diversidad genética y ambiental de la región. Estos árboles proporcionan la materia prima necesaria para la extracción de aceites esenciales, específicamente de las hojas y cáscaras, los cuales serán objeto de análisis químico y pruebas de actividad biológica. (Vasquez-Gomez et al., 2023b).

Posterior a los árboles, se incluye en la población un cultivo de hongos patógenos comúnmente presentes en la región, sobre los cuales se aplicará el aceite esencial extraído. Este cultivo de hongos se utilizará para evaluar la capacidad inhibidora de los aceites esenciales, midiendo su eficacia en la reducción del crecimiento fúngico.

El tipo de muestra utilizada en el estudio es de tipo estratificado, dado que los árboles se seleccionan de manera que cada grupo o procedencia esté representado proporcionalmente. Esto asegura que las diferencias observadas en los resultados puedan atribuirse a las características de cada procedencia y no a sesgos en la selección de los árboles.

El proceso de selección de la muestra se realiza mediante un muestreo aleatorio simple dentro de cada procedencia. Se seleccionan al azar 20 árboles de cada grupo, garantizando que la muestra sea representativa de la variabilidad natural en la población de árboles de limón mandarina en Sucumbíos. Para los cultivos de hongos, se utilizarán cepas estándar en laboratorio, inoculadas en medios de cultivo adecuados para garantizar condiciones controladas y reproducibles en las pruebas de inhibición.

Este enfoque permite una evaluación exhaustiva de las propiedades químicas y biológicas de los aceites esenciales, proporcionando resultados robustos y generalizables en el contexto de la biotecnología aplicada a la conservación y valorización de los recursos naturales.

3.3. Los métodos y las técnicas

Métodos, técnicas e instrumentos utilizados en su investigación, considerando validez y confiabilidad de los instrumentos empleados.

La investigación se basa en métodos experimentales apoyados por técnicas analíticas específicas para garantizar la validez y confiabilidad de los resultados. Los métodos empleados incluyen la extracción de aceites esenciales mediante destilación por arrastre de vapor, una técnica reconocida por su capacidad para obtener aceites esenciales sin degradar sus componentes volátiles (Vasquez-Gomez et al., 2023b). Esta técnica es fundamental para asegurar que los compuestos extraídos sean representativos de la materia prima original, manteniendo su integridad química (Marinas et al., 2023).

Para la caracterización química de los aceites esenciales, se utilizan cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). La cromatografía de gases es una técnica clave para separar y cuantificar los compuestos volátiles en los aceites esenciales, permitiendo identificar los componentes principales y sus concentraciones relativas (Asgari et al., 2023). La espectroscopia FTIR complementa este análisis proporcionando información sobre los grupos funcionales presentes en los compuestos, lo que facilita la identificación de las características estructurales de los mismos (Tarhan et al., 2023).

Ambos instrumentos han sido seleccionados por su alta validez en el análisis de aceites esenciales, dado su uso extensivo y validado en la literatura científica. La confiabilidad de estas técnicas se garantiza mediante la calibración regular de los equipos y la realización de controles de calidad durante los experimentos (Tarhan et al., 2023).

Para evaluar la actividad biológica de los aceites esenciales, se aplica la técnica de difusión en agar para medir la inhibición del crecimiento fúngico. Esta técnica es ampliamente reconocida por su confiabilidad en la determinación de la eficacia antimicrobiana, permitiendo una comparación precisa entre los aceites esenciales extraídos de diferentes procedencias y partes de la planta (Noriega et al., 2019). La repetición de los experimentos y el análisis estadístico de los datos aseguran que los resultados obtenidos sean robustos y reproducibles, lo que refuerza la validez y confiabilidad de la investigación (Marinas et al., 2023; Noriega et al., 2019).

3.3.1. Optimización y estandarización de materia prima

La estandarización del aceite esencial se realizó con un análisis univariable del aceite esencial donde se tenían 3 variables, donde las 2 primeras eran estáticas y en la tercera se cambió los parámetros, de la siguiente manera:

Variables: Tiempo de extracción, temperatura y relación solvente/materia prima, descritos de la siguiente manera:

- T1: Tiempo de extracción 90 min, temperatura 100°C, relación solvente/materia prima: 5:1
- T2: Tiempo de extracción 90 min, temperatura 100°C, relación solvente/materia prima 6,5:1
- T3: Tiempo de extracción 90 min, temperatura 100°C, relación solvente/materia prima 8:1

3.3.2. Caracterización química

3.3.2.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa

Se realizará con la metodología de (Gyesi et al., 2019) donde, se selecciona el método de análisis General2volatiles.M en el software MassHunter, el cual fue previamente programado y ajustado para este tipo de compuestos volátiles. No se asigna ningún método de preparación de muestra, ya que el aceite esencial se introduce directamente en el sistema.

La muestra se inyecta en el sistema de cromatografía de gases (GC) a través de un autosampler (ALS) ubicado en la parte frontal del equipo. Se activa el espectrómetro de masas (MS) para su análisis posterior.

Se indica que, si bien los equipos y disolventes pueden variar, varios autores entre ellos (Boughendjioua et al., 2020; Tao et al., 2008; Tapayachi, 2024) han utilizado esta metodología (GC-MS) para analizar la extracción de aceites esenciales y análisis estructural del mismo, presentándose como una metodología idónea para este tipo de análisis en los aceites esenciales.

El tiempo total de ejecución en el sistema de GC es de 18.75 minutos, seguido de un tiempo de post-ejecución de 3 minutos para asegurar la limpieza del sistema. La temperatura del horno del cromatógrafo se fija inicialmente en 40 °C, con un tiempo de espera de 5 minutos. A continuación, se inicia un programa de calentamiento con una tasa de 8 °C por minuto hasta alcanzar una temperatura de 150 °C. No se mantiene tiempo adicional en este punto. La temperatura máxima del horno está configurada en 325 °C y no se aplica ninguna anulación de esta configuración. El ventilador lento está desactivado.

El sistema de inyección utiliza una jeringa de 10 µL, pero el volumen de inyección efectivo es de 1 µL. Antes de la inyección, se realizan dos lavados con el solvente A, y otros dos lavados tras la inyección, con un volumen de 8 µL para cada lavado. No se utilizan lavados con solvente B para este análisis. Se realizan cinco lavados de muestra con un volumen de 8 µL cada uno, sin utilizar bombas de muestra. Tanto antes como después de la inyección, no se requieren tiempos de espera.

La velocidad de aspiración y dispensación del solvente durante los lavados es de 300 µL/min y 3000 µL/min respectivamente, mientras que la velocidad de aspiración y dispensación de la muestra es la misma. El proceso de inyección se realiza con una velocidad de dispensación de 6000 µL/min, sin retardo por viscosidad, y la

profundidad de la muestra está desactivada. El tipo de inyección es estándar (L1), con una separación de aire de 0.2 μL entre la muestra y el solvente.

El sistema de inyección utiliza helio (He) en modo dividido (split), con el calentador del inyector ajustado a 250 $^{\circ}\text{C}$ y una presión de 6.2908 psi. La relación de división es de 100:1, y el flujo de división es de 250 mL/min. El ahorro de gas se activa después de 3 minutos, reduciendo el flujo a 15 mL/min.

La línea de transferencia del espectrómetro de masas se mantiene a una temperatura de 280 $^{\circ}\text{C}$ durante el análisis, pero se apaga después de la corrida. El flujo inicial de la columna se fija en 2.5 mL/min, y durante el post-análisis se reduce a 1.5 mL/min.

La columna utilizada para el análisis es una Agilent 19091J-413 HP-5, con dimensiones de 30 metros de longitud, 320 μm de diámetro interno y un espesor de película de 0.25 μm , diseñada para operar en un rango de temperatura entre -60 $^{\circ}\text{C}$ y 325 $^{\circ}\text{C}$. La entrada de la columna se conecta al inyector frontal y la salida se conecta al espectrómetro de masas. El flujo de gas de arrastre en la columna es de 2.5 mL/min, con una velocidad media de 57.335 cm/seg y un tiempo de retención de 0.87207 minutos. La presión de salida de la columna es de 0 psi. Durante el análisis se registran cuatro señales de prueba con una tasa de adquisición de datos de 50 Hz, pero no se guardan los datos, ya que son solo para comprobación del sistema.

El espectrómetro de masas opera en modo de escaneo, con un retardo de solvente de 3 minutos para evitar interferencias. El archivo de afinación utilizado es ATUNE.U, ajustando el multiplicador de electrones (EM) con una ganancia de 1.000000. El análisis de masas se realiza en modo normal, sin detección de iones traza, y tiene una duración total de 650 minutos si se realiza solo con MS. El rango de masas

escaneadas abarca desde 10 hasta 400 unidades de masa atómica (uma), con un umbral de 150.

Las temperaturas de las zonas del espectrómetro de masas están configuradas en 230 °C para la fuente de iones y 150 °C para el cuadrupolo. No se programan eventos temporizados adicionales. Finalmente, se registran y ajustan los parámetros de afinación, incluyendo la energía, el repulsor y el enfoque de iones. Con estos parámetros ajustados, el análisis del aceite esencial de mandarina se completa, obteniendo resultados precisos y detallados de la composición química del aceite.

3.3.2.2. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

Para el análisis del aceite esencial de limón mandarina mediante Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR), se utiliza el siguiente procedimiento.

Primero, se establece el rango de análisis en el espectrofotómetro FTIR entre 4000 cm^{-1} y 500 cm^{-1} . A continuación, con un clic izquierdo se selecciona el background (fondo), lo que permite establecer una referencia sin la muestra, y se ajusta el equipo a cero. Se coloca una pequeña cantidad de la muestra líquida de aceite esencial de limón mandarina en la parte superior del lente del equipo. Luego, en el sistema de control del espectrofotómetro, se identifica la muestra y se inicia la lectura presionando el botón Scan. Esto genera el espectro infrarrojo de la muestra.

Una vez obtenido el espectro, se selecciona la opción process para corregir la línea base, eliminar el ruido de fondo y aplicar el factor de suavizado. Se aceptan las correcciones y se procede a identificar todos los picos del espectro que corresponden a los diferentes compuestos presentes en la muestra, el espectro corregido, con todos los picos señalados, se exporta en formato gráfico para su análisis posterior.

3.3.3. Actividad antifúngica

Para medir la capacidad antifúngica del aceite esencial de limón mandarina, se emplea la metodología de (Anwar et al., 2023), que utiliza el método de difusión en pozo utilizando agar de dextrosa de patata (PDA). Primero, se cultivan las cepas fúngicas *Aspergillus niger*, PDA. El aceite esencial se diluye en dimetilsulfóxido (DMSO) mezclando 360 μL de aceite con 640 μL de DMSO, obteniendo una solución homogénea mediante vortex.

Se preparan placas de Petri esterilizadas, en las cuales se vierte el medio PDA previamente esterilizado y enfriado a 45-50 °C. Las cepas fúngicas, con una concentración de 2×10^5 esporas, se esparcen uniformemente sobre el medio utilizando un hisopo de algodón. Con un asa de inoculación, se hacen pozos en el agar donde se añaden 30 μL de la solución diluida del aceite esencial en cada pozo utilizando una pipeta. Estas placas se incuban a 37 °C durante 24 horas, permitiendo el crecimiento de los hongos. Se observa la zona de inhibición alrededor de los pozos como indicativo de la actividad antifúngica del aceite esencial.

Para el presente análisis se medirá cuatro tratamientos, con tres repeticiones cada uno:

T1: Testigo.

T2: 360 μL de aceite con 640 μL de DMSO.

T3: 400 μL de aceite con 600 μL de DMSO.

T4: 450 μL de aceite con 550 μL de DMSO.

3.4. Procesamiento estadístico de la información

El procesamiento y análisis de la información en este estudio se lleva a cabo utilizando métodos estadísticos adecuados para garantizar la interpretación precisa y objetiva de los datos recolectados. Una vez obtenidos los datos experimentales, estos se ingresan en software estadístico especializado, como SPSS, para su análisis (Noriega et al., 2019)

El análisis de varianza (ANOVA) es el método principal empleado para evaluar la significancia estadística de las diferencias observadas entre los grupos experimentales (Montgomery, 2017). ANOVA permite determinar si las variaciones en los resultados, como la eficacia inhibidora de los aceites esenciales sobre los hongos, se deben a las diferentes procedencias de los árboles de limón mandarina o a las partes de la planta utilizadas (hojas o cáscaras), en lugar de a la variabilidad natural dentro de los grupos.

Se utilizarán pruebas post hoc, como la prueba de Tukey, para identificar específicamente cuáles grupos difieren entre sí, proporcionando una comprensión más detallada de las relaciones entre las variables estudiadas (Field, 2018). Esto es crucial para validar la hipótesis de que la procedencia y la parte de la planta afectan significativamente la composición y eficacia del aceite esencial.

Para analizar la relación entre variables continuas, como la concentración de componentes volátiles y la tasa de inhibición fúngica, se empleará regresión lineal (Montgomery, 2017). Este método permitirá evaluar la fuerza y dirección de las relaciones, proporcionando una base sólida para las conclusiones sobre la efectividad del aceite esencial en función de su composición química (Creswell, 2014).

3.5. Maquinaria e instrumentos

3.5.1. Destilación

El destilador por arrastre de vapor es un equipo diseñado específicamente para la extracción de aceites esenciales y otros compuestos volátiles a partir de materias primas vegetales. Este sistema se compone de tres partes fundamentales: el caldero de vapor, la zona de recepción de materia prima, y la torre de enfriamiento o condensador. La capacidad total de este destilador es de 300 litros, lo que lo convierte en un equipo adecuado para procesos de destilación a escala mediana.

A) Caldero de Vapor:

Capacidad y Función: El caldero de vapor tiene una capacidad total de 300 litros, lo que permite generar una cantidad considerable de vapor a alta presión y temperatura. Este vapor es necesario para volatilizar los compuestos esenciales presentes en la materia prima.

Dimensiones: El caldero tiene una altura de 0,7 metros y un diámetro de 0.8 metros. Está fabricado en acero inoxidable para soportar altas temperaturas y presiones, y cuenta con un sistema de seguridad que incluye un manómetro y una válvula de seguridad para controlar la presión interna.

B) Zona de Recepción de Materia Prima:

Capacidad y Función: La zona de recepción de la materia prima está diseñada para albergar aproximadamente 440 litros de material vegetal. Este volumen es adecuado para una carga de materia prima que optimiza el contacto con el vapor generado, asegurando una eficiente extracción de los compuestos volátiles.

Dimensiones Estimadas: La cámara de recepción tiene una altura de 1 metros y un diámetro de 0.75 metros, suficiente para contener una cantidad significativa de materia prima y permitir un flujo uniforme de vapor a través de esta. Esta sección está ubicada inmediatamente encima del caldero, permitiendo que el vapor generado pase directamente a través de la materia prima.

3. Torre de Enfriamiento (Condensador):

Función: La torre de enfriamiento, también conocida como condensador, es la parte del destilador donde el vapor, cargado con los compuestos volátiles, se enfría y se condensa para formar un líquido. Este líquido, que es una mezcla de agua y aceites esenciales, es recolectado en un recipiente posterior para su separación.

Dimensiones Estimadas: La torre de enfriamiento tiene una altura estimada de 1.8 metros y un diámetro de 0.3 metros. El condensador está equipado con un sistema de enfriamiento por agua, que circula alrededor de las tuberías internas donde pasa el vapor, facilitando su condensación. La longitud de la tubería interna, que suele ser en forma de serpentín, es suficiente para asegurar que el vapor se enfríe adecuadamente antes de salir de la torre.

3.1.1. Cultivo de microorganismos

Para llevar a cabo el cultivo, se emplean varios materiales y equipos especializados que aseguran la pureza y viabilidad de los cultivos. A continuación, se describen los materiales necesarios y su uso en el contexto de una metodología científica.

Cajas Petri: Las cajas Petri son recipientes de vidrio o plástico, de forma circular y plana, que se utilizan para el cultivo de microorganismos en medios sólidos. Estas

cajas permiten la expansión de colonias microbianas en condiciones controladas. Deben ser estériles antes de su uso para evitar la contaminación cruzada.

Uso: En esta metodología, las cajas Petri se esterilizan previamente y se llenan con el medio de cultivo preparado. Posteriormente, se inoculan con los microorganismos obtenidos de las frutas contaminadas.

Agitador Magnético: El agitador magnético es un dispositivo utilizado para mezclar soluciones de manera uniforme. Consiste en una base que genera un campo magnético rotatorio, sobre la cual se coloca un recipiente con un imán encapsulado que gira con el campo magnético.

Uso: Se utiliza para mezclar el medio de cultivo (PDA) mientras se disuelve en agua destilada y se calienta, asegurando una distribución homogénea de los componentes.

Medio de Cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar): El PDA es un medio de cultivo sólido que proporciona los nutrientes esenciales para el crecimiento de hongos y otros microorganismos. Se compone principalmente de extracto de papa, dextrosa y agar.

Uso: El PDA se prepara disolviendo los componentes en agua destilada, esterilizando la solución en autoclave, y luego vertiéndola en las cajas Petri bajo condiciones estériles.

Frutas Contaminadas: Las frutas contaminadas son aquellas que presentan signos de descomposición debido a la presencia de microorganismos. Estas frutas sirven como fuente natural de los microorganismos que se quieren aislar y cultivar. Para el presente se utilizará moras y frutillas contaminadas

Uso: Trozos de fruta contaminada se colocan en el medio de cultivo PDA en las cajas Petri para permitir que los microorganismos presentes en las frutas se desarrollen.

Cámara de Flujo Laminar: es un equipo que proporciona un ambiente estéril mediante la filtración del aire, protegiendo los cultivos de la contaminación externa.

Uso: Se utiliza para manipular todos los materiales y realizar el proceso de inoculación en un entorno libre de contaminantes.

Alcohol y Cloro: El alcohol (70%) y el cloro son agentes desinfectantes utilizados para esterilizar las superficies y el equipo antes y durante el trabajo microbiológico.

Uso: Las manos, superficies de trabajo y equipos se desinfectan con alcohol, mientras que el cloro se utiliza para la limpieza general de la zona de trabajo.

Mechero de Alcohol: proporciona una llama abierta para la esterilización de herramientas de trabajo, como las asas de inoculación.

Uso: Se emplea para flamear las herramientas antes de entrar en contacto con los cultivos, asegurando que no haya contaminación.

Balanza Analítica: es un instrumento de precisión utilizado para medir pequeñas cantidades de sólidos y líquidos con alta exactitud.

Uso: Se utiliza para pesar con precisión los componentes del medio de cultivo y otros reactivos.

Incubadora Perkin: es un dispositivo que mantiene condiciones controladas de temperatura y humedad, fundamentales para el crecimiento de los microorganismos.

Uso: Las cajas Petri inoculadas se colocan en la incubadora para permitir el desarrollo de los microorganismos en condiciones óptimas.

3.5.2. Caracterización química

Este paso se desarrolla con el cromatógrafo de gases (PerkinElmer GC Clarus 580) conectado a un espectrómetro de masas PerkinElmer (Clarus SQ 8 S) equipado con Elite-5MS (Columna capilar fusionada con 5% de difenilo/95% de dimetilpolisiloxano (30 x 0,25 mm de diámetro interior x 0,25 μ m de profundidad).

CAPÍTULO IV: Análisis e Interpretación de Resultados

4.1. Análisis e Interpretación de Resultados

Una vez desarrollado el proceso de optimización y estandarización, junto con la caracterización química y el análisis de la capacidad antifúngica del aceite esencial de limón mandarina, se obtuvieron los siguientes resultados.

4.1.1. Estandarización de la extracción del aceite esencial

En primer lugar, el rendimiento del aceite esencial mostró una correlación de la proporción de materia prima respecto al solvente. Es decir, al incrementar esta relación, se observó un aumento en el rendimiento del aceite extraído.

Este comportamiento sugiere que una mayor cantidad de solvente en relación con la materia prima favorece la liberación de los compuestos aromáticos y activos presentes en la piel y otras partes de la fruta, lo que se traduce en un mayor volumen de aceite esencial obtenido.

La tendencia fue evidente en la gráfica N°1 obtenida durante el análisis, donde se ve una línea ascendente que correlaciona el aumento del solvente con la cantidad de materia prima con el incremento en la cantidad de aceite esencial extraído.

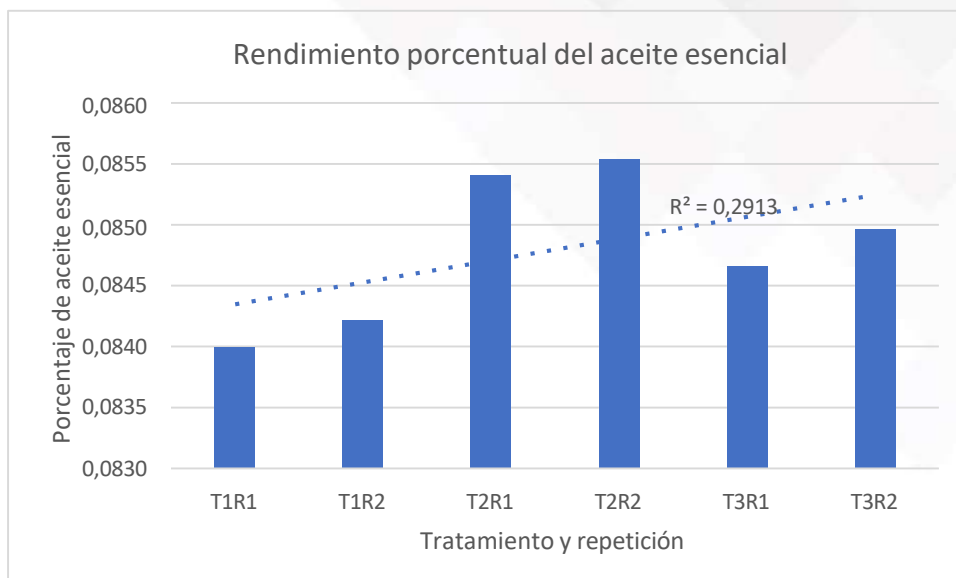


Gráfico 1: Rendimiento del aceite esencial de limon mandarina

Fuente: Propia

Esta tendencia se debe corroborar con una prueba de homogeneidad la cual me permite evidenciar que existe o no existe diferencias entre los tratamientos.

4.1.1.1. ANOVA estandarización de extracción de aceites esenciales

Como primer paso se realiza una prueba de homogeneidad de varianza para indicar si existe o no existe diferencia entre tratamientos como se evidencia en la tabla 3 efectivamente existe diferencia significativa al ser el SIG inferior a 0,05

Tabla 3: Prueba de homogeneidad del proceso de estandarización del aceite esencial

Análisis de homogeneidad					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	0	2	0	39,214	0,007
Dentro de grupos	0	3	0		
Total	0	5			

Fuente: Elaboración propia

4.1.1.2. Prueba Post hoc

Tabla 4: Análisis Tukey para la estandarización del aceite esencial

Prueba Post hoc Tukey				
Tratamiento	N	Subconjunto 1	Subconjunto 2	Sig.
1	2	0,0841		1
3	2	0,0849	0,0849	
2	2		0,085	0,059

Fuente: Elaboración propia

Realizado el análisis Tukey en la tabla 4, se establece que no existen diferencias significativas entre los tratamientos al presentar un Sig superior a 0.05, por lo que no representa un parámetro a tomar en cuenta en el proceso de extracción de aceites esenciales.

4.1.2. Propiedades químicas del aceite esencial

El análisis químico del aceite esencial revela una notable composición de compuestos volátiles clave, entre los que destacan los monoterpenos y sesquiterpenos, con una fuerte capacidad antimicótica y antibacteriana. El componente más abundante es D-Limoneno, que representa el 33.34% del total de la muestra. Aunque este compuesto es mayormente reconocido por su aroma cítrico, también tiene propiedades antibacterianas moderadas, contribuyendo a la protección de superficies y productos contra ciertas bacterias como lo concluyen algunas investigaciones como las desarrolladas por (Anwar et al., 2023; Espinoza et al., 2022; Marinas et al., 2023; Wu et al., 2020)

Uno de los principales compuestos con actividad antimicótica es el β -Pineno (23.56%), que, junto con su isómero α -Pineno (2.59%), ha demostrado una notable 3

eficacia frente a hongos patógenos. Estos compuestos como lo menciona (Boughendjioua et al., 2020) son frecuentemente utilizados en la formulación de productos antimicóticos, especialmente en el tratamiento de infecciones dérmicas y en la preservación de productos alimenticios.

Otro compuesto relevante es el Citronelal (11.51%), conocido por su capacidad para repeler insectos y actuar como un potente agente antimicrobiano, con un fuerte efecto tanto antimicótico como antibacteriano. Este compuesto como se evidencia en investigaciones como las desarrolladas por (Tao et al., 2008; Tran et al., 2019) se encuentra frecuentemente en productos de higiene personal y en soluciones para la limpieza de superficies, dadas sus propiedades desinfectantes.

α -Terpineol (2.31%) y Linalool (1.73%) son otros monoterpenos presentes en la muestra que destacan por su marcada capacidad antimicótica. Estos compuestos se han utilizado en formulaciones para combatir infecciones fúngicas y bacterianas, tanto en productos cosméticos como farmacéuticos.

Entre los sesquiterpenos, el Caryophyllene (1.16%) muestra propiedades antimicóticas y antibacterianas significativas, lo que lo convierte en un ingrediente clave en productos de uso tópico para tratar infecciones cutáneas.

En conjunto, el análisis reveló la presencia de 27 compuestos químicos en el aceite esencial, cada uno con distintas propiedades antimicóticas y antibacterianas, los cuales se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 5: Compuestos químicos de la extracción del aceite esencial de limon mandarina

<u>N°</u>	<u>tr(min)</u>	<u>Compuesto identificado</u>	<u>Porcentaje</u> <u>relativo</u>	<u>Probabilida</u> <u>d (%)</u>
1	6606	Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 2-methyl- 5-(1-methylethyl)-	0,3	91
2	6764	alpha-Pinene	2,59	95
3	8063	beta-Pinene	25,53	94
4	8505	5-Hepten-2-one,6-methyl-	0,4	74
5	9152	(+)-2-Carene	0,29	96
6	9574	D-Limonene	33,34	96
7	9795	trans-beta-Ocimene	0,95	90
8	10041	beta-Ocimene	4,14	95
9	10213	gamma-Terpinene	1,17	96
10	10867	Cyclohexene,1-methyl-4-(1- methylethylidene)-	0,24	97
11	11311	Linalool	1,73	95
12	12134	dl-Isopulegol	0,46	90
13	12352	Citronellal	11,51	90
14	1279	Terpinen-4-ol	1,22	91
15	13106	alpha-Terpineol	2,31	86
16	13332	Decanal	0,42	87
17	13857	2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl- ,(Z)-	0,99	90
18	13917	Citronellol	5,57	95

19	13992	Citral	1	74
20	14357	Geraniol	1,68	94
21	14541	Citral	1,15	91
22	15961	2,6-Octadiene, 2,6-dimethyl-	0,83	96
23	16148	Geranyl isobutyrate	0,26	80
24	16467	Geranyl acetate	0,33	87
25	17019	Caryophyllene	1,16	99
26	1842	alpha-Farnesene	0,46	91

Fuente: Elaboración propia

La presencia predominante de limoneno y otros compuestos volátiles le confiere al aceite esencial sus propiedades aromáticas distintivas, mientras que los compuestos fenólicos identificados sugieren posibles aplicaciones industriales en productos que requieren componentes naturales bioactivos. La identificación de estos componentes químicos en *Citrus limon-reticulata* es crucial para entender su potencial y sus aplicaciones en la industria alimentaria y farmacéutica, como saborizantes o en la producción de productos naturales.

4.1.3. FTIR del aceite de limón

El espectro de FTIR (Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier) que has proporcionado muestra las diferentes bandas de absorción que corresponden a los enlaces y vibraciones moleculares de los compuestos presentes en una muestra. A continuación, te explico algunos aspectos importantes del espectro que puedes observar en la imagen:

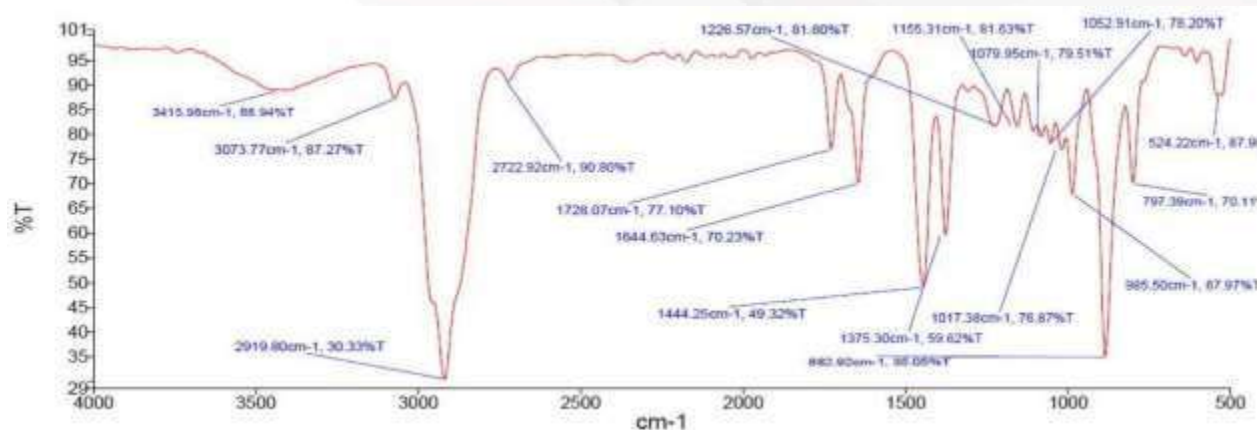


Gráfico 2: Gráfica FTIR, aceite esencial de limón mandarina

Fuente: Elaboración propia

En el gráfico 3 se puede observar que el eje X representa la frecuencia de las vibraciones moleculares en número de onda (cm^{-1}), es decir, el inverso de la longitud de onda. Estas frecuencias están asociadas a los diferentes grupos funcionales presentes en los compuestos.

El eje Y indica el porcentaje de transmisión (%T), lo que significa cuánta energía infrarroja atraviesa la muestra sin ser absorbida. Cuanto menor sea el %T, mayor es la absorción en esa región. Los principales picos del espectro, son:

3415.98 cm^{-1} : Corresponde a una absorción fuerte asociada a los grupos OH de alcoholes o fenólicos, característicos de enlaces de hidrógeno (H-O-H).

3073.77 cm^{-1} : Puede estar relacionado con las vibraciones de estiramiento de los C-H en compuestos aromáticos.

2722.92 cm^{-1} : Señal fuerte que puede estar relacionada con C-H de compuestos como aldehídos o alcoholes.

1728.07 cm^{-1} : Representa la vibración de estiramiento del grupo C=O (carbonilo), presente en aldehídos, cetonas o ácidos carboxílicos.

1644.63 cm^{-1} : Esta señal se asocia con el doble enlace C=C o vibraciones de enlaces C=O conjugados con dobles enlaces.

1444.25 cm^{-1} : Absorción relacionada con las deformaciones del enlace C-H, típicamente observadas en alcanos o grupos metilo (-CH₃).

1155.31 cm^{-1} y 1052.91 cm^{-1} : Señales típicas de las vibraciones de estiramiento de los enlaces C-O en alcoholes, éteres o ácidos.

985.50 cm^{-1} y 797.39 cm^{-1} : Son señales características de las deformaciones fuera del plano de los enlaces C-H en anillos aromáticos o alquenos.

4.1.4. Actividad antifúngica del aceite esencial

Realizado el análisis antifúngico, se tiene que el tratamiento T3 presentó la mejor inhibición contra *Aspergillus niger*, alcanzando un 80% de mortalidad total. Este resultado se correlaciona directamente con la presencia de varios compuestos en el tratamiento que son conocidos por su capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos. Como se puede apreciar en la imagen.

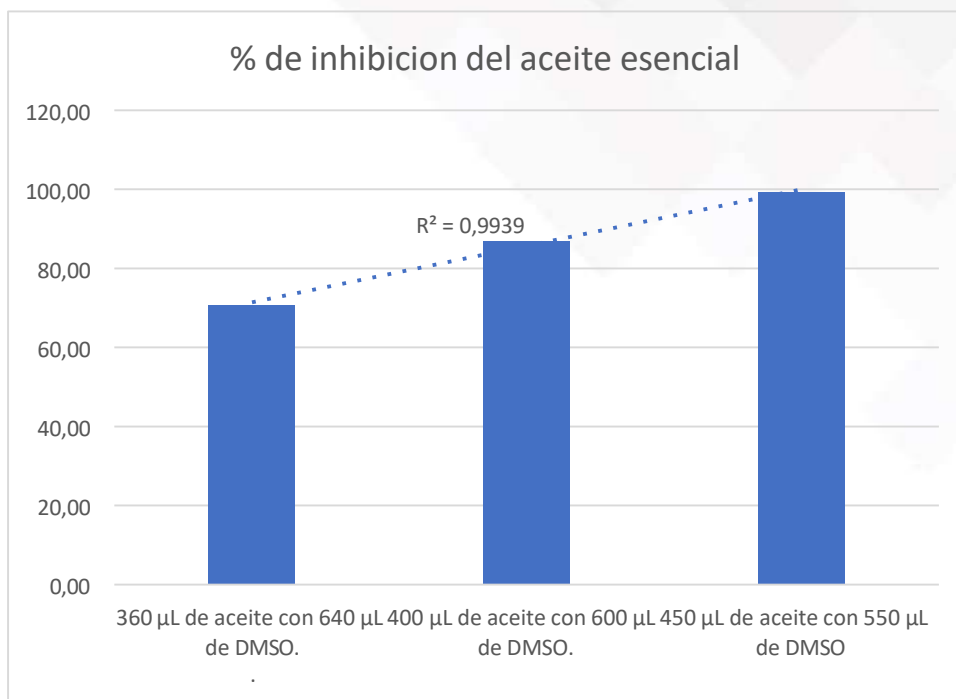


Gráfico 3: Porcentaje de inhibición del aceite esencial
Fuente: Propia

4.1.4.1. ANOVA propiedad antifúngica

Como primer paso se realiza un ANOVA para indicar si existe o no existe diferencia entre tratamientos como se evidencia en la tabla 4 efectivamente existe diferencia significativa al ser el SIG inferior a 0,05

Tabla 6: Prueba de homogeneidad

ANOVA					
	Suma	de	Media	F	Sig.
	cuadrados	gl	cuadrática		
Entre grupos	126255,100	3	42085,033	274,525	,000
Dentro de grupos	8584,876	56	153,301		
Total	134839,976	59			

Fuente: Propia

4.1.4.2. Prueba Post hoc

Realizado el análisis Tukey en la tabla 4, se establece que existen diferencias significativas entre los tratamientos al presentar un Sig inferior a 0.05, por lo que se recomienda el uso de T4: 450 μ L de aceite con 550 μ L de DMSO.

Análisis Post Hoc Tukey					
Tratamiento	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
1	15	-17,6322			
2	15		70,693 8		
3	15			86,966 6	
4	15				99,354 7
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Fuente: Propia

Entre los compuestos claves identificados en T4 450 μ L de aceite con 550 μ L de DMSO, que con el análisis químico del aceite esencial se demuestra que la capacidad antifúngica está compuesto por el limoneno (260.7 mg/mL), que es uno de los más abundantes y efectivos, conocido por su potente actividad antifúngica. Linalool (24.5 mg/mL), otro compuesto significativo en T3, también contribuye a la inhibición del hongo, debido a sus propiedades antimicrobianas y calmantes. Geraniol (14.0 mg/mL) y citronellal (15.3 mg/mL) refuerzan la acción antifúngica del tratamiento, cada uno

con propiedades bien documentadas para combatir patógenos como la investigación realizada por (Anwar et al., 2023), incluyendo hongos. Neral (88.3 mg/mL) y geranial (106.2 mg/mL) como lo también están presentes en concentraciones considerables, y ambos han demostrado eficacia contra una variedad de microorganismos, proporcionando un efecto sinérgico en la inhibición de *Aspergillus niger*.

Estos compuestos trabajan conjuntamente, haciendo que T3 sea significativamente más efectivo en comparación con los otros tratamientos evaluados. La alta concentración y la combinación de estos compuestos en T3 explican su superioridad en la inhibición del crecimiento del hongo, posicionándolo como la opción más eficaz en aplicaciones antifúngicas.

CAPÍTULO V: Conclusiones, Discusión y Recomendaciones

5.1. Discusión

5.1.1. Estandarización de la extracción de aceite esencial

5.1.2. Propiedades químicas del aceite esencial

Las características químicas de los estos aceites están influenciadas por factores como la especie específica y la adaptación ecológica a diversas áreas geográficas. El aceite esencial de citrus limon reticulata al ser un híbrido, comparte características, tanto con el limon como con la mandarina, a continuación, se realiza un análisis comparativo entre las semejanzas y diferencias entre estas especies.

En el análisis de Citrus limon según (Tapayachi, 2024), el limoneno se presenta como el compuesto dominante, con un 30.16% del contenido total, acompañado de un contenido relevante de β -pineno (12.3%) y γ -terpineno (12.41%). Frente al limoneno (33.94%) β -pineno (23.56%) y γ -terpineno (1.22%), del limon mandarina Esta composición, caracterizada por una elevada proporción de monoterpenos como el α -pineno (4.79%) y β -pineno, resalta la eficacia antimicrobiana de este aceite contra cepas patógenas, lo cual se atribuye a la permeabilidad y alteración de membranas celulares en microorganismos.

En el caso de la mandarina Satsuma (Citrus limon reticulata), estudiada por (Tao et al., 2008)., se observa también una dominancia del limoneno (67.44%), aunque con una mayor diversidad en componentes secundarios como el p-cimeno (2.43%) y sabineno (0.77%). La presencia significativa de α -pineno (2.52%) y β -pineno (1.46%) subraya una adaptabilidad ecológica que favorece la síntesis de estos monoterpenos en menor proporción, pero con impacto en la actividad biológica.

Comparativamente, con el aceite esencial de Citrus reticulata de Argelia, reportado por (Boughendjioua et al., 2020)., también destaca el limoneno como componente principal con una presencia aún más elevada, alcanzando el 85.10%. Frente al

limoneno (33.94%) del limon mandarina Este notable contenido de limoneno es complementado con cantidades menores de α -pineno (1.75%) y β -pineno (0.89%). Estas diferencias sugieren que *Citrus reticulata* tiene una composición menos variada en terpenos menores en comparación con *C. limon*, lo que podría reflejar una especialización en la acumulación de limoneno debido a factores ecológicos.

Después de esta comparativa se sugiere que aunque limoneno es el compuesto mayoritario en todas las variedades, la proporción de α -pineno y β -pineno varía significativamente entre *C. limon* y las diferentes mandarinas. Estas diferencias se deben a variaciones de especie y a adaptaciones ecológicas a distintos hábitats, que modulan la producción de compuestos secundarios para enfrentar desafíos ambientales específicos, potenciando así su actividad biológica diferencial.

5.1.3. Actividad antifúngica del aceite esencial

La eficacia antifúngica del aceite esencial de *Citrus sinensis* contra *Aspergillus niger* ha sido reportada previamente por Anwar et al (2023), quienes observaron una inhibición significativa del crecimiento micótico al utilizar una mezcla de 360 μ L de aceite esencial con 640 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO), alcanzando un 93% de inhibición (Anwar et al., 2023). Sin embargo, en el presente estudio se obtuvo una inhibición completa del crecimiento de *A. niger* al emplear diferentes concentraciones del aceite esencial de *Citrus limon reticulata*. En las pruebas realizadas, se emplearon tres formulaciones: T2, con 360 μ L de aceite y 640 μ L de DMSO; T3, con 400 μ L de aceite y 600 μ L de DMSO; y T4, con 450 μ L de aceite y 550 μ L de DMSO. La formulación T4 demostró ser la más efectiva, logrando una inhibición total del crecimiento del microorganismo.

El notable incremento en la efectividad observado en el presente estudio puede atribuirse a la composición química diferenciada del aceite de *Citrus limon reticulata*, en comparación con el aceite de *Citrus sinensis*. Específicamente, el aceite de *C. limon reticulata* presenta una mayor concentración de α -pineno y β -pineno, con porcentajes de 2.59% y 25.53%, respectivamente. Estos monoterpenos han sido reconocidos por sus propiedades antimicrobianas y su capacidad para alterar la permeabilidad de la membrana celular de los microorganismos, promoviendo así una

acción antifúngica más potente y rápida. La mayor concentración de estos compuestos en el aceite esencial de *C. limon reticulata* parece ser determinante en la eficacia observada, superando la inhibición del 93% reportada por Anwar et al (2023) en el aceite de *C. sinensis*, cuya concentración de pinenos es significativamente menor (β -pineno: 2.59% y α -pineno: 25.53%).

Estos hallazgos resaltan el potencial de los aceites esenciales ricos en α -pineno y β -pineno como agentes antifúngicos naturales efectivos, y sugieren que una formulación con mayores concentraciones de estos compuestos podría ser utilizada como alternativa para el control de infecciones fúngicas en aplicaciones industriales y médicas.

5.2. Conclusiones

Después de realizado el proceso de investigación se concluye que, la extracción del aceite esencial de limón mandarina (*Citrus limon x reticulata*), mediante la destilación por arrastre de vapor, maximiza su eficiencia productiva con el tratamiento 2 el cual tiene una relación Materia prima/solvente de 8, indicando que es más eficiente el tener más agua respecto al solvente utilizado (siendo esta agua), aunque en la prueba post hoc se muestra que no existen diferencias significativas, este tratamiento nos brinda mayor cantidad de aceites esenciales

De igual manera la caracterización del aceite esencial de limón mandarina (*Citrus limon x reticulata*) presente en los bosques siempreverdes montano bajos de la provincia de Sucumbíos, mediante cromatográfica de gases y espectroscopia infrarroja por transformada muestra que existen 9 compuestos con capacidades antifúngicas siendo el mas representativo el B Pineno por la cantidad de porcentaje referente al total. Además, se presentan 8 familias químicas como: carbonilo, grupos

aromáticos, metilos, alcoholes, como los más representativos por su cantidad referente al total del compuesto

Por último se menciona que analizada la actividad antifúngica del aceite esencial de limón mandarina (*Citrus limon x reticulata*), mediante la inhibición de *Aspergillus niger*, se describen las potencialidades del aceite esencial en inhibición de aceites esenciales siendo el T4 450 um/550 disolvente el que mayor inhibición presento.

5.3. Recomendaciones

Debido a la dependencia a múltiples variables del rendimiento del aceite esencial se recomienda hacer una optimización de otros parámetros en la extracción y comparar los resultados obtenidos con otros métodos de extracción.

Al tener el aceite esencial compuestos que tienen incidencia en la inhibición de radicales libres se recomienda realizar ensayos con el aceite para medir este efecto.

Por la presencia de compuestos de capacidad anti bactericida se recomienda realizar ensayos para medir este efecto

Al tener el aceite esencial compuestos que tienen incidencia en la mejora de calidad de sueño se recomienda realizar ensayos con el aceite para medir este efecto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A. C. S. D. Oliveiraa, C. C. F. L. S. S. A. C. B. B. C. L. G. M. M. L. D. M (2021). *Chemical composition, in vitro larvicidal and antileishmanial activities of the essential oil from Citrus reticulata Blanco fruit peel.*
- Abdoul-Latif, F. M., Elmi, A., Merito, A., Nour, M., Risler, A., Ainane, A., Bignon, J., & Ainane, T (2022). Essential Oils of Tagetes minuta and Lavandula coronopifolia from Djibouti: Chemical Composition, Antibacterial Activity and Cytotoxic Activity against Various Human Cancer Cell Lines. *International Journal of Plant Biology*, 13(3), 315-329. <https://doi.org/10.3390/ijpb13030026>
- ABDU, K. M., ERAHIOUI, R., ZAHIDI, A., KHEDID, K., IBN, S., & AHMED (2021). Evaluation of Antifungal Activity of Lemon (Citrus lemon) in Marrakech and Kenitra cities Morocco. *Egyptian Journal of Chemistry*, 64(8), 4183-4190. <https://doi.org/10.21608/EJCHEM.2021.54730.3143>
- Agarwal, P., Sebghatollahi, Z., Kamal, M., Dhyan, A., Shrivastava, A., Singh, K. K., Sinha, M., Mahato, N., Mishra, A. K., & Baek, K. H (2022). Citrus Essential Oils in Aromatherapy: Therapeutic Effects and Mechanisms. In *Antioxidants* (Vol. 11, Issue 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antiox11122374>
- Ali, B., Al-Wabel, N. A., Shams, S., Ahamad, A., Khan, S. A., & Anwar, F (2015a). Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. In *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* (Vol. 5, Issue 8, pp. 601-611). Hainan Medical University. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.05.007>
- Ali, B., Al-Wabel, N. A., Shams, S., Ahamad, A., Khan, S. A., & Anwar, F (2015b). Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. In *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* (Vol. 5, Issue 8, pp. 601-611). Hainan Medical University. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.05.007>
- Anwar, T., Qureshi, H., Fatima, A., Sattar, K., Albasher, G., Kamal, A., Ayaz, A., & Zaman, W (2023). Citrus sinensis Peel Oil Extraction and Evaluation as an Antibacterial and Antifungal Agent. *Microorganisms*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071662>
- Boughendjioua, H., Mezedjeri, N. E. H., & Idjouadiene, I (2020). Chemical constituents of Algerian mandarin (Citrus reticulata) essential oil by GC-MS and FT-IR analysis. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*, 33(4), 197-201. <https://doi.org/10.2478/cipms-2020-0032>
- Boukhatem, M. N., & Setzer, W. N (2020). Aromatic herbs, medicinal plant-derived essential oils, and phytochemical extracts as potential therapies for coronaviruses: Future perspectives. In *Plants* (Vol. 9, Issue 6, pp. 1-23). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/PLANTS9060800>

- Chóez-Guaranda, I., Espinoza-Lozano, F., Reyes-Araujo, D., Romero, C., Manzano, P., Galarza, L., & Sosa, D (2023). Chemical Characterization of *Trichoderma* spp. Extracts with Antifungal Activity against Cocoa Pathogens. *Molecules*, 28(7). <https://doi.org/10.3390/molecules28073208>
- Dazzini Langdon, M. M., & Navarrete Zambrano, H (2020). *Bosques azules : humedales en riesgo : una visión latinoamericana*.
- Espinoza, L. C., Valarezo, E., Fábrega, M. J., Rodríguez-Lagunas, M. J., Sosa, L., Calpena, A. C., & Mallandrich, M (2022). Characterization and In Vivo Anti-Inflammatory Efficacy of Copal (*Dacryodes peruviana* (Loes.) H.J. Lam) Essential Oil. *Plants*, 11(22). <https://doi.org/10.3390/plants11223104>
- Esquivel-Córdova, J., Castro-Castañeda, S., Pérez-Sánchez, R. E., & Ortiz-Rodríguez, R (2022). CALIDAD DE SITIO Y CAPTURA DE CARBONO DE ESPECIES DE PINO DEL BOSQUE DE LA CIUDAD DE URUAPAN, MICHOACÁN, MÉXICO. *Journal of Agricultural Sciences Research (2764-0973)*, 2(2), 2-7. <https://doi.org/10.22533/at.ed.973222201037>
- FAO (2013). *Los factores de la deforestación y de la degradación de los bosques*. <https://www.fao.org/3/xii/ms12a-s.htm>
- FAO (2020). El estado de los bosques del mundo 2020. In *El estado de los bosques del mundo 2020*. FAO and UNEP. <https://doi.org/10.4060/ca8642es>
- Fernández-Llamazares, Á., López-Baucells, A., Velazco, P. M., Gyawali, A., Rocha, R., Terraube, J., & Cabeza, M (2021). The importance of Indigenous Territories for conserving bat diversity across the Amazon biome. In *Perspectives in Ecology and Conservation* (Vol. 19, Issue 1, pp. 10-20). Associacao Brasileira de Ciencia Ecologica e Conservacao. <https://doi.org/10.1016/j.pecon.2020.11.001>
- GADP (2019a). *PLAN DE DESARROLLO Y ORDENAMIENTO TERRITORIAL DE LA PROVINCIA DE SUCUMBÍOS*. <https://www.proamazonia.org/es/actualizacion-de-planes-de-ordenamiento-territorial-2019-2023-en-gad-de-la-provincia-de-sucumbios/>
- GADP (2019b). *PLAN DE DESARROLLO Y ORDENAMIENTO TERRITORIAL DE LA PROVINCIA DE SUCUMBÍOS*.
- Gyesi, J. N., Opoku, R., & Borquaye, L. S (2019). Chemical Composition, Total Phenolic Content, and Antioxidant Activities of the Essential Oils of the Leaves and Fruit Pulp of *Annona muricata* L (Soursop) from Ghana. *Biochemistry Research International*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4164576>
- Hasanvandi, S., Neisi, E., & Meshkat, M. H (2023). Comparative analysis of essential oils from two *Satureja* species; extraction methods, chemical composition, and antimicrobial activities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 50. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102731>

- Horowitz, S (2011). Aromatherapy: Current and Emerging Applications. *Https://Home.Liebertpub.Com/Act*, 17(1), 26-31. <https://doi.org/10.1089/ACT.2011.17103>
- INEC (2010). *FASCICULO PROVINCIAL DE SUCUMBIOS*.
- Julián, V., Bucheli, P., Henry, K., & Muchavisoy, M (2020). *La Agroforestería frente a la Agenda 2030 PARA EL DESARROLLO SOSTENIBLE*. www.udca.edu.co
- Landeta, J. M. I.-, & Molinar, R. H.- (2020). Selection of Alternaria Fungi Control Treatments in a Citrus Grove through the Lens of the Electre Technique: A Case Study in San Luis Potosi, Mexico. *Journal of Experimental Agriculture International*, 122-130. <https://doi.org/10.9734/jeai/2020/v42i830578>
- Llerena, S., Arias, P., Cueva, J., Almeida, G., & Salazar, C (2020). Identifying priority management of Ecuadorian forests based on the environmental integrated assessment. *E3S Web of Conferences*, 169. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202016902015>
- Lorenz, C., de Oliveira Lage, M., & Chiaravalloti-Neto, F (2021). Deforestation hotspots, climate crisis, and the perfect scenario for the next epidemic: The Amazon time bomb. In *Science of the Total Environment* (Vol. 783). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147090>
- Ma, C., Pu, R., Downs, J., & Jin, H (2022). Characterizing Spatial Patterns of Amazon Rainforest Wildfires and Driving Factors by Using Remote Sensing and GIS Geospatial Technologies. *Geosciences (Switzerland)*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/geosciences12060237>
- Machado, C. A. ;, Oliveira, F. O. ;, De Andrade, M. A. ;, Hodel, K. V. S. ;, Lepikson, H. ;, Machado, B. A. S., Machado, C. A., Oliveira Oliveira, F., Antônio De Andrade, M., Valéria, K., Hodel, S., Lepikson, H., Aparecida, B., & Machado, S (2022). Steam Distillation for Essential Oil Extraction: An Evaluation of Technological Advances Based on an Analysis of Patent Documents. *Sustainability 2022, Vol. 14, Page 7119, 14(12)*, 7119. <https://doi.org/10.3390/SU14127119>
- Marinas, I. C., Oprea, E., Gaboreanu, D. M., Gradisteanu Pircalabioru, G., Buleandra, M., Nagoda, E., Badea, I. A., & Chifiriuc, M. C (2023). Chemical and Biological Studies of Achillea setacea Herba Essential Oil—First Report on Some Antimicrobial and Antipathogenic Features. *Antibiotics*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020371>
- McDonnell, B., & Newcomb, P (2019). Trial of essential oils to improve sleep for patients in cardiac rehabilitation. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 25(12), 1193-1199. <https://doi.org/10.1089/acm.2019.0222>
- Mobolade, A (2020). *Volatile oils from Cedrela odorata L. As Protectants against Sitophilus zeamais (Coleoptera: Curculionidae)*. www.essencejournal.com

- Molina, R., López-Santos, C., Balestrasse, K., Gómez-Ramírez, A., & Sauló, J (2024). Enhancing Essential Oil Extraction from Lavandin Grosso Flowers via Plasma Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(4), 2383. <https://doi.org/10.3390/IJMS25042383/S1>
- Moumni, S., Elaissi, A., Trabelsi, A., Merghni, A., Chraief, I., Jelassi, B., Chemli, R., & Ferchichi, S (2020). Correlation between chemical composition and antibacterial activity of some lamiaceae species essential oils from Tunisia. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12906-020-02888-6>
- Naik, A. V., & Sellappan, K (2020a). Chromatographic Fingerprint of Essential Oils in Plant Organs of *Annona muricata* L (Annonaceae) using HPTLC. *Analytical Chemistry Letters*, 10(2), 214-226. <https://doi.org/10.1080/22297928.2020.1763197>
- Naik, A. V., & Sellappan, K (2020b). Chromatographic Fingerprint of Essential Oils in Plant Organs of *Annona muricata* L (Annonaceae) using HPTLC. *Analytical Chemistry Letters*, 10(2), 214-226. <https://doi.org/10.1080/22297928.2020.1763197>
- Norden, N (2014). DE PORQUÉ LA REGENERACIÓN NATURAL ES TAN IMPORTANTE PARA LA COEXISTENCIA DE ESPECIES EN LOS BOSQUES TROPICALES. *Colombia Forestal*, 17(2), 247. <https://doi.org/10.14483/udistrital.jour.colomb.for.2014.2.a08>
- Noriega, P., Guerrini, A., Sacchetti, G., Grandini, A., Ankuash, E., & Manfredini, S (2019). Chemical composition and biological activity of five essential oils from the Ecuadorian Amazon rain forest. *Molecules*, 24(8). <https://doi.org/10.3390/molecules24081637>
- Paes, M. X., Campos-Silva, J. V., & de Oliveira, J. A. P (2021). Integrating circular economy in urban Amazon. *Npj Urban Sustainability*, 1(1). <https://doi.org/10.1038/s42949-021-00031-z>
- Rivera, D., Bermúdez, A., Obón, C., Alcaraz, F., Ríos, S., Sánchez-Balibrea, J., Pablo Ferrer-Gallego, P., & Krueger, R (2022). Analysis of 'Marrakesh limetta' (*Citrus × limon* var. *limetta* (Risso) Ollitrault, Curk & R.Krueger) horticultural history and relationships with limes and lemons. *Scientia Horticulturae*, 293. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110688>
- Rojas-Armas, J. P., Arroyo-Acevedo, J. L., Palomino-Pacheco, M., Ortiz-Sánchez, J. M., Calva, J., Justil-Guerrero, H. J., Castro-Luna, A., Ramos-Cevallos, N., Cieza-Macedo, E. C., & Herrera-Calderon, O (2022). Phytochemical Constituents and Ameliorative Effect of the Essential Oil from *Annona muricata* L. Leaves in a Murine Model of Breast Cancer. *Molecules*, 27(6). <https://doi.org/10.3390/molecules27061818>

- Russo, R., Corasaniti, M. T., Bagetta, G., & Morrone, L. A (2015). Exploitation of Cytotoxicity of Some Essential Oils for Translation in Cancer Therapy. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 397821. <https://doi.org/10.1155/2015/397821>
- Saavedra, R (2022). "Aceites esenciales (*Eucalyptus globulus/Citrus limon*), y empaque en la conservación de carne de *Capra aegagrus hircus*."
- Scalvenzi, L., Radice, M., Toma, L., Severini, F., Boccolini, D., Bella, A., Guerrini, A., Tacchini, M., Sacchetti, G., Chiurato, M., Romi, R., & Luca, M. Di (2019). Larvicidal activity of *Ocimum campechianum*, *Ocotea quixos* and *Piper aduncum* essential oils against *Aedes aegypti*. *Parasite*, 26. <https://doi.org/10.1051/parasite/2019024>
- Sethunga, M., Ranaweera, K., Munaweera, I., Profile, S., Prasanna, K. D., Gunathilake, P., & Kdpp Gunathilake, ; (2020). *Recent advances in the extraction methods of essential oils and oleoresins from plant materials and its potential applications: A comprehensive review*. <https://doi.org/10.22059/jfabe.2022.347001.1126>
- Sharmeen, J. B., Mahomoodally, F. M., Zengin, G., & Maggi, F (2021). Essential oils as natural sources of fragrance compounds for cosmetics and cosmeceuticals. In *Molecules* (Vol. 26, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules26030666>
- Simirgiotis, M. J., Burton, D., Parra, F., López, J., Muñoz, P., Escobar, H., & Parra, C (2020). Antioxidant and antibacterial capacities of *origanum vulgare* l. Essential oil from the arid andean region of chile and its chemical characterization by gc-ms. *Metabolites*, 10(10), 1-12. <https://doi.org/10.3390/metabo10100414>
- Soares, G. A. B. E., Bhattacharya, T., Chakrabarti, T., Tagde, P., & Cavalu, S (2022). Exploring pharmacological mechanisms of essential oils on the central nervous system. In *Plants* (Vol. 11, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/plants11010021>
- Stampella, P. C., Delucchi, G., & Pochettino, M. L (2013). Naturalización e identidad del "limón mandarina", *Citrus x taitensis* (Rutaceae, Aurantioideae) en la Argentina. *Boletín de La Sociedad Argentina de Botánica*, 48(1), 161-169. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-23722013000100012&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Stratakos, A. C., & Koidis, A (2015). Methods for Extracting Essential Oils. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, 31-38. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00004-3>
- Tao, N.-G., Liu, Y.-J., Zhang, J.-H., Zeng, H.-Y., Tang, Y.-F., & Zhang, M.-L (2008). Chemical composition of essential oil from the peel of Satsuma mandarin. *African Journal of Biotechnology*, 7(9), 1261-1264. <https://doi.org/10.5897/AJB08.033>

- Tapayachi, A (2024). *COMPOSICION QUIMICA Y SU EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE Citrus limon (L) Osbeck SOBRE CEPAS DE Staphylococcus aureus, Pseudomonas Aeruginosa Y Escherichia coli.*
- Torres, B., Fischer, R., Vargas, J., & Gunter, S (2020). *Deforestación en paisajes forestales tropicales del Ecuador.*
- Tran, T. H., Cam Quyen, N. T., Kieu Linh, H. T., Le Ngoc, T. T., Quan, P. M., & Toan, T. Q (2019). Essential oil from vietnamese mandarin (*Citrus reticulata* blanco) using hydrodistillation extraction process and identification of it's components. *Solid State Phenomena*, 298, 100-105. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/SSP.298.100>
- Ünlü, B (2022). Herbal medicine and common dermatologic diseases. *Herbal Medicines: A Boon for Healthy Human Life*, 329-345. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90572-5.00019-6>
- Valarezo, E., Aguilera-Sarmiento, R., Meneses, M. A., & Morocho, V (2021). Study of Essential Oils from Leaves of Asteraceae Family Species *Ageratina dendroides* and *Gynoxys verrucosa*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 24(3), 400-407. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2021.1948919>
- Vasquez-Gomez, K. L., Mori-Mestanza, D., Idrogo-Vasquez, G., Fernández-Jeri, A. B., Auquiñivin-Silva, E. A., Castro-Alayo, E. M., Cruz-Lacerna, R., Muñoz-Astecker, L. D., Balcázar-Zumaeta, C. R., Torrejón-Valqui, L., Yoplac-Collantes, C., Yoplac-Tafur, I. J., & Chavez, S. G (2023a). *Characterization of Essential Oils from the Skin of Citrus li-metta Risso, Citrus limetta sp., Citrus reticulata and Citrus sinensis Grown in Northeastern PERU.* <https://doi.org/10.20944/preprints202307.1006.v1>
- Vasquez-Gomez, K. L., Mori-Mestanza, D., Idrogo-Vasquez, G., Fernández-Jeri, A. B., Auquiñivin-Silva, E. A., Castro-Alayo, E. M., Cruz-Lacerna, R., Muñoz-Astecker, L. D., Balcázar-Zumaeta, C. R., Torrejón-Valqui, L., Yoplac-Collantes, C., Yoplac-Tafur, I. J., & Chavez, S. G (2023b). *Characterization of Essential Oils from the Skin of Citrus li-metta Risso, Citrus limetta sp., Citrus reticulata and Citrus sinensis Grown in Northeastern PERU.* <https://doi.org/10.20944/preprints202307.1006.v1>
- Whitehead, D (2011). Forests as carbon sinks - Benefits and consequences. *Tree Physiology*, 31(9), 893-902. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpr063>
- Wu, P. S., Jeng, J., Yang, J. J., Kao, V., Yen, J. H., & Wu, M. J (2020). *Vernonia patula* (Dryand.) Merr. and *Leucas chinensis* (Retz.) R. Brown exert anti-inflammatory activities and relieve oxidative stress via Nrf2 activation. *Journal of Ethnopharmacology*, 262. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113155>
- Zhang, W., Liu, D., Fu, X., Xiong, C., & Nie, Q (2022). Peel Essential Oil Composition and Antibacterial Activities of *Citrus x sinensis* L. Osbeck 'Tarocco' and *Citrus*

reticulata
<https://doi.org/10.3390/horticulturae8090793>

Blanco.

Horticulturae,

8(9).

ANEXOS

Fotografía N° 1: Recolección de las hojas de limon mandarina



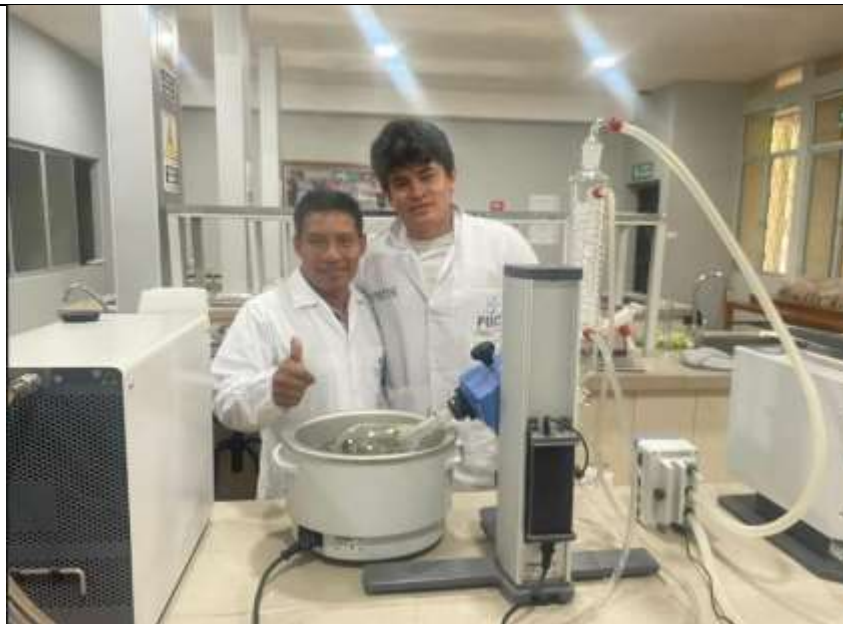
Fotografía N° 2: Recolección en el campo



Fotografía N° 3: Recolección en el campo hojas de limón mandarina



Fotografía N° 4: Primeras pruebas de extracción en laboratorio con rotavapor



Fotografía N° 5: Primeras pruebas de extracción en laboratorio con rotavapor



Fotografía N° 6: Segundas pruebas de extracción en laboratorio con destilación con arrastre de vapor



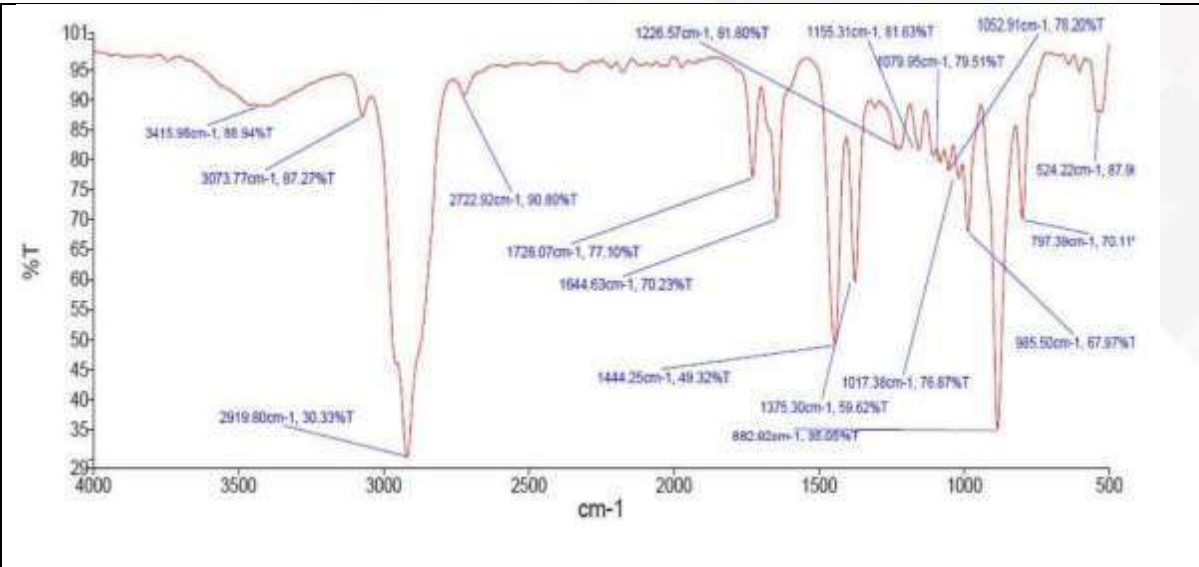
Fotografía N° 7: Primeras extracciones del aceite esencial de limon mandarina



Fotografía N° 8: Cromatograma aceite esencial de limon mandarina

N°	tr(min)	Compuesto identificado	Porcentaje relativo	Probabilidad (%)
1	6.606	Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-	0.30%	91
2	6.764	.alpha.-Pinene	2.59%	95
3	8.063	.beta.-Pinene	23.56%	94
4	8.505	5-Hepten-2-one,6-methyl-	0.40%	74
5	8.582	.beta.-Pinene	1.97%	87
6	9.152	(+)-2-Carene	0.29%	96
7	9.574	D-Limonene	33.34%	96
8	9.795	trans-.beta.-Ocimene	0.95%	90
9	10.041	.beta.-Ocimene	4.14%	95
10	10.213	.gamma.-Terpinene	1.17%	96
11	10.867	Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)-	0.24%	97
12	11.311	Linalool	1.73%	95
13	12.134	dl-Isopulegol	0.46%	90
14	12.352	Citronellal	11.51%	90
15	12.79	Terpinen-4-ol	1.22%	91
16	13.106	.alpha.-Terpineol	2.31%	86
17	13.332	Decanal	0.42%	87
18	13.857	2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-,(Z)-	0.99%	90
19	13.917	Citronellol	5.57%	95
20	13.992	Citral	1.00%	74
21	14.357	Geraniol	1.68%	94
22	14.541	Citral	1.15%	91
23	15.961	2,6-Octadiene, 2,6-dimethyl-	0.83%	96
24	16.148	Geranyl isobutyrate	0.26%	80
25	16.467	Geranyl acetate	0.33%	87
26	17.019	Caryophyllene	1.16%	99
27	18.42	.alpha.-Farnesene	0.46%	91

Fotografía N° 9: FTIR de aceite esencial de limon mandarina



Fotografía N° 10: Preparación medio PDA para *Aspergillum*



Fotografía N° 11: Preparación medio PDA para *Aspergillum*



Fotografía N° 12: Inoculación y cultivo en estufa de *Aspergillum*



Fotografía N° 13: Primeros resultados sin purificar de microorganismos



Fotografía N° 14: Cultivo purificado de aspergillum



Fotografía N° 15: Medición de diámetros de colonias



Fotografía N° 16: Medición de diámetros después de aplicación de aceite esencial

