

# **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

## **Facultad de Ingeniería en Ciencias Naturales y Matemáticas**

“Valoración de la actividad antifúngica *in vitro* de dos aceites esenciales para la inhibición del crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae* patógeno de banano y cacao post cosecha”

### **PROYECTO INTEGRADOR**

Previo la obtención del Título de:

**Ingeniero Químico**

Presentado por:

Cinthya Gabriela Duarte Pasaguay

Christopher José Tomalá Reyes

Tutor(a):

Patricia Isabel Manzano Santana, PhD.

Co-Tutor (a):

Q.F. Glenda Margarita Piloza Muentes

**GUAYAQUIL - ECUADOR**

**Año: 2022**

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a mi madre Alexandra Reyes y a mi tía Patricia Reyes quienes han sido un ejemplo a seguir, me han aconsejado en cada decisión que he tomado, me han apoyado afectiva y económicamente en todo momento.

A mi hermana Sheyla Tomalá, quien me soporta cada idea que se me ocurre y me ha acompañado en las noches de estudio.

A mi abuelo Fulton Reyes que ha sido una figura paterna para mí en todo momento que lo he necesitado.

A mi abuela Leonor Criollo y a mi padre Jorge Tomalá, quienes estarían orgullosos y contentos de que haya logrado terminar mi carrera. Esta va por ustedes.

Y porque no a todos mis familiares, amigos y compañeros de la universidad quienes han hecho de ésta, mi vida universitaria, la mejor etapa de mi vida.

**Christopher José Tomalá Reyes**

## **DEDICATORIA**

El presente proyecto lo dedico a Dios, a la vida y a las personas que me permitió conocer para llegar a este momento. A mi familia, tanto de madre que no me dejo desfallecer y dejarlo todo botado, y a la de mi padre que me dejo en este hermoso país y con estas hermosas personas. A mis compañeros amigos, profesores, y todo aquel que me acompañó en el proceso. Te lo dedico a ti.

**Cinthy Gabriela Duarte Pasaguay**

# **AGRADECIMIENTOS**

Primero que nada, queremos agradecer a Dios.

A nuestros padres, hermanos, abuelos, tíos; quienes son parte fundamental de lo que somos hoy.

A nuestros compañeros y amigos, con quienes compartimos ratos amenos en nuestra estadía.

Al Centro de Investigaciones de Biotecnologías del Ecuador por abrirnos las puertas de sus instalaciones para llevar a cabo el proyecto.

A nuestros tutores, Patricia Manzano PhD. y Glenda Piloza Q.F., quienes nos ayudaron y apoyaron en la ejecución de la tesis y nos acompañaron en él proceso.

Nuestros profesores, quienes nos compartieron su tiempo, paciencia, y conocimientos a lo largo de la carrera,

De verdad muchas gracias a todos.

**Christopher Tomalá – Cinthya Duarte**

## DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, nos corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; Cinthya Gabriela Duarte Pasaguay y Christopher José Tomalá Reyes, damos nuestro consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”

*Cinthya Duarte P.*

**Cinthya Gabriela Duarte Pasaguay**

*Christopher Tomalá R.*

**Christopher José Tomalá Reyes**

## EVALUADORES

Patricia  
Manzano  
Santana

Firmado digitalmente  
por Patricia Manzano  
Santana

Fecha: 2022.09.05  
19:32:47 -05'00'

---

**Nadia Magaly Flores Manrique MSc.**

PROFESOR DE LA MATERIA

---

**Patricia Isabel Manzano Santana PhD.**

PROFESOR TUTOR



Firmado electrónicamente por:  
**GLENDA MARGARITA  
PILOZO MIENTES**

---

**Q.F. Glenda Margarita Piloza Muentes**

CO-TUTOR

## RESUMEN

En este estudio se evaluó el poder antifúngico del aceite esencial y su hidrolato obtenido por arrastre de vapor de las especies *Origanum vulgare* y *Thymus vulgaris* contra el *Lasiodiplodia theobromae*, en base a estudios previos realizados por Muzzio y Segovia en el 2021 en otras cepas de hongos. En el ensayo de inhibición de crecimiento micelial *in vitro*, los AE e hidrolato fueron diluidos en el medio de cultivo siguiendo la técnica de Ávalos *et al.* Implementada en el 2019, y se comparó el potencial antifúngico de ambos productos de la destilación mediante la herramienta estadística del análisis de la varianza de un factor (ANOVA), donde se observó que el aceite esencial (2000 ppm) e hidrolato (50000 ppm) de tomillo inhibió el 100% del crecimiento del patógeno, mientras que para el orégano se obtuvo en una capacidad de inhibición del 51,12%, 1,28% y 21,05% en los tres días de ensayo con el hidrolato; y, un 89,03%, 74,1%, y 27,28% para el aceite esencial en los mismos días de ensayo respectivamente. Luego de evaluar el índice de inhibición de crecimiento micelial del *Lasiodiplodia theobromae* se concluye, con un nivel de significancia del 5%, que el factor de la concentración del aceite esencial tiene un efecto significativo en el área micelial del hongo logrando inhibir el crecimiento del patógeno.

**Palabras Clave:** Aceite esencial, hidrolato, inhibición del crecimiento micelial, *Lasiodiplodia theobromae*, *in vitro*.

## ABSTRACT

*In this study, the antifungal potential of the essential oil and its hydrolate obtained by steam distillation of the species *Origanum vulgare* and *Thymus vulgaris* against *Lasiodiplodia theobromae* was evaluated, based on previous studies carried out by Muzzio and Segovia in 2021 in other strains of fungi. In the *in vitro* mycelial growth inhibition assay, the EO and hydrolate were diluted in the culture medium following the technique of Ávalos et al. implemented in 2019, and the antifungal potential of both distillation products was compared using the one-factor analysis of variance (ANOVA) statistical tool, where it was observed that essential oil (2000 ppm) and hydrolate (50000 ppm) of thyme inhibited 100% of the growth of the pathogen, while for oregano an inhibition capacity of 51.12%, 1.28% and 21.05% was*

*obtained in the three days of testing with the hydrolate; and, 89.03%, 74.1%, and 27.28% for the essential oil on the same test days, respectively. After evaluating the mycelial growth inhibition index of *Lasiodiplodia theobromae*, it is concluded, with a significance level of 5%, that the concentration factor of the essential oil has a significant effect on the mycelial area of the fungus, managing to inhibit the growth of the pathogen.*

**Keywords:** *Essential oil, hydrolate, mycelial growth inhibition, *Lasiodiplodia theobromae*, *in vitro*.*

# ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	I
ABSTRACT .....	II
ÍNDICE GENERAL .....	III
ABREVIATURAS .....	V
SIMBOLOGÍA.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS .....	VII
ÍNDICE DE TABLAS .....	VIII
CAPÍTULO 1 .....	1
1. Introducción.....	1
1.1 Descripción del problema .....	1
1.2 Justificación del problema .....	2
1.3 Objetivos .....	3
1.3.1 Objetivo General.....	3
1.3.2 Objetivo Específico .....	3
1.4 Marco teórico .....	4
1.4.1 Fitopatógenos .....	4
1.4.2 Tratamientos contra fitopatógenos.....	5
1.4.3 Aceites esenciales .....	6
1.4.4 Especies vegetales .....	7
1.4.5 Destilación por arrastre de vapor .....	10
1.4.6 Métodos de control de patógenos <i>in vitro</i> .....	11
CAPÍTULO 2 .....	12
2. Metodología.....	12
2.1 Revisión bibliográfica .....	12
2.2 Técnicas para la ejecución del proyecto .....	12
2.3 Selección de especies.....	13

2.4	Recolección de las especies .....	14
2.5	Secado de especies .....	15
2.6	Obtención de aceites esenciales .....	15
2.6.1	Equipo de destilación .....	15
2.6.2	Aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> .....	16
2.6.3	Aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> .....	16
2.6.4	Caracterización de las muestras de aceite e hidrolato .....	17
2.7	Evaluación en patógenos .....	18
2.7.1	Cepas de <i>L. theobromae</i> .....	18
2.7.2	Soluciones madre .....	18
2.7.3	Ensayos de inhibición con diluciones de aceites .....	20
2.8	Diseño experimental de las muestras .....	20
CAPÍTULO 3 .....		21
3.	Resultados Y ANÁLISIS .....	21
3.1	Secado de las especies .....	21
3.2	Aceites esenciales e hidrolatos .....	22
3.3	Propiedades organolépticas y físicas de los aceites e hidrolatos .....	23
3.4	Rendimiento de la destilación .....	26
3.5	Pruebas antifúngicas .....	28
3.6	Análisis económico de producción de aceites esenciales .....	32
CAPÍTULO 4 .....		34
4.	Conclusiones Y Recomendaciones .....	34
4.1	Conclusiones .....	34
4.2	Recomendaciones .....	35
BIBLIOGRAFÍA .....		37
APÉNDICES .....		44
APÉNDICE A .....		45

## ABREVIATURAS

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
<i>L. theobromae</i>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
AE	Aceite Esencial
MAG	Ministerio de Agricultura y Ganadería
CIBE	Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador
PDA	Papa Dextrosa Agar
DMSO	Dimetilsulfóxido
BCE	Banco Central del Ecuador
MAATE	Ministerio de Ambiente, Agua y Transición Ecológica
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
NPIC	Centro Nacional de Información sobre Plagas

## SIMBOLOGÍA

MM	Miles de millones
ppm	Partes por millón
mm	milímetros
μL	microlitros
g	gramos
lb	libras
C	Celsius
nD	índices de refracción
cm	centímetros

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Medio PDA con <i>Lasiodiplodia theobromae</i> .....	4
Figura 1.2 Moléculas de terpenos: a) Timol, b) Carvacrol, c) $\rho$ -Cimeno y d) $\gamma$ -Terpineno .....	7
Figura 1.3 Atado de <i>Thymus vulgaris</i> .....	8
Figura 1.4 Atado de <i>Origanum Vulgare</i> .....	9
Figura 2.1 Esquema de la metodología usada en la ejecución del proyecto .....	13
Figura 2.2 Equipo de destilación utilizado .....	16
Figura 3.1 Curva de secado de <i>Thymus vulgaris</i> .....	22
Figura 3.2 Curva de secado de <i>Origanum vulgare</i> .....	22
Figura 3.3 Aceites esenciales destilados a) <i>Thymus vulgaris</i> b) <i>Origanum vulgare</i> .....	24
Figura 3.4 Hidrolatos recolectados a) <i>Origanum vulgare</i> , b) <i>Thymus vulgaris</i> .....	25
Figura 3.5 Superficies de respuesta con datos recolectados de la destilación.....	28
Figura 3.6 Resultados de los ensayos AE e hidrolato de <i>O. Vulgare</i> contra <i>L. theobromae</i> .....	29
Figura 3.7 Resultados de los ensayos AE e hidrolato de <i>T. Vulgaris</i> contra <i>L. theobromae</i> .....	29
Figura 3.8 Análisis de la varianza de dos factores de los ensayos realizados .....	31

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Clasificación taxonómica de <i>L. theobromae</i> .....	5
Tabla 1.2 Taxonomía de la especie “Tomillo” .....	8
Tabla 1.3 Taxonomía de la especie “Orégano” .....	9
Tabla 1.4 Componentes principales del <i>Origanum vulgare</i> .....	10
Tabla 2.1 Especies utilizadas. ....	14
Tabla 2.2 Información de la cosecha .....	14
Tabla 2.3 Información del proceso de secado .....	15
Tabla 2.4 Cantidad usada de materia prima por ciclo de destilación.....	17
Tabla 2.5 Información sobre la solución madre .....	19
Tabla 2.6 Información sobre la solución madre II.....	19
Tabla 3.1 Resumen de proceso de secado de las especies .....	21
Tabla 3.2 Resultados de la destilación de las especies vegetales .....	23
Tabla 3.3 Propiedades organolépticas de los aceites destilados .....	23
Tabla 3.4 Propiedades organolépticas de los hidrolatos .....	24
Tabla 3.5 Rendimiento de los productos de la destilación .....	26
Tabla 3.6 Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial de los distintos tratamientos .....	30
Tabla 3.7 Presupuesto en la inversión del equipo de destilación .....	32
Tabla 3.8 Costos de producción y venta (tentativa) del aceite destilado .....	33

# CAPÍTULO 1

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Descripción del problema

A nivel internacional, las exportaciones del Ecuador representan un 23.4% en el mercado norteamericano y un 17.5% en la Unión Europea. Estos porcentajes se deben en gran medida a la venta de productos agropecuarios, tales como el camarón, banano, enlatados, cacao y pescados. El sector agrícola, para el primer semestre del 2020, había aportado con ingresos que superaban los 3 MM de dólares con 2.5 y 0.5 MM en exportación de banano y cacao respectivamente (BCE, 2020).

Las enfermedades de las plantaciones son una limitante en la producción de cualquier cultivo, por lo que su control es un factor importante a considerar. Los hongos y bacterias son los patógenos más importantes que causan elevadas pérdidas. Estos causan el deterioro de las partes de la planta e incluso puede terminar en la muerte. Los hongos más estudiados y reportados en la literatura son *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Diplodia*, *Phomopsis* y *Rhizopus*, los cuales generan pérdidas de 5-25% en países de primer mundo y 20-50% en países en vía de desarrollo (Quiroga *et al.*, 2007).

Incluyendo a la especie *Lasiodiplodia theobromae*, hongo responsable de la muerte descendente y pudrición de los frutos (Sandoval *et al.*, 2012). El mecanismo de contaminación de este patógeno no se ha descrito totalmente, sin embargo, se presume que ocurre durante el abonado y riego del cultivo con insumos contaminados. Para establecer control de plagas es fundamental establecer métodos de identificación de este patógeno, puesto que, según reportes del MAG existen patógenos que han desarrollado resistencia a los controles que se les aplican (MAG, 2013).

En la actualidad, el control contra patógenos más empleado es la aplicación de plaguicidas de origen inorgánico. Varios estudios se han llevado a cabo para controlar a *L. theobromae* una vez detectado en el cultivo Li *et al.* (1995), como la carbendazima y el metil-tiofanato inhibieron el crecimiento micelial, la germinación de conidios y controlaron el desarrollo del patógeno (Picos *et al.*, 2015). Sin

embargo, el uso continuo de estos plaguicidas causa afecciones en la salud de las personas y afectan al medio ambiente, de ahí surge la necesidad de encontrar alternativas sustentables, como el ejemplo de especies vegetales (Moutassem *et al.*, 2019).

En este contexto, Vázquez *et al.* (2013), evaluaron el potencial antifúngico de varias especies vegetales obteniendo que la aplicación de aceites esenciales refleja viabilidad antifúngica, ambiental y productiva, logrando replicar el efecto de fungicidas tóxicos sin los efectos secundarios sobre la salud de las plantas y el ser humano; además, la materia prima de los aceites son recursos renovables, contribuyendo así a la sostenibilidad ambiental (Vázquez *et al.*, 2013).

Investigaciones sobre el uso de aceites de orégano (*Origanum vulgare*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) para el control de patógenos en cultivos *in vitro* es extensa, en estos documentos se detalla la metodología que se aplica para encontrar la concentración mínima inhibitoria existe evidencia científica de la actividad antifúngica de estos aceites contra diversos patógenos de las familias *Fusarium* y *Moniliophthora* (Yan *et al.*, 2020). Pero la información que aún no se refleja en bibliografías es la aplicación de fungicidas a base de estos aceites para el control de *L. theobromae*, debido a esto se propuso llevar a cabo la presente investigación (Acosta & Molina, 2019).

## **1.2 Justificación del problema**

Las exportaciones de banano y cacao constituyen una de las principales fuentes de ingresos en el Ecuador. Ante esto es un deber primordial, de los agricultores y gobierno de turno, mantener saludable los cultivos hasta su cosecha y posterior venta al extranjero. Pese a todos los métodos que se ejecutan para cuidar el cultivo, existen patógenos como los hongos del género *Moniliophthora*, *Diplodia* y *Fusarium* que afectan drásticamente a estos cultivos, generando que la producción y rendimiento del cultivo sea inestable (Moreira-Morrillo *et al.*, 2021).

Dentro de los métodos para el cuidado de estos cultivos encontramos el manejo integrado del cultivo con el control de malezas, remoción y eliminación semanal de frutos enfermos; el control genético mediante el uso de genotipos tolerantes a la enfermedad y el control químico con el uso de fungicidas que

involucra un alto riesgo a la salud y el ambiente (Gómez *et al.*, 2020). Estos controles químicos son piezas clave en la protección de cualquier cultivo, pero a medida que pasa del tiempo los patógenos adquieren resistencia a estos plaguicidas, que en su mayoría son inorgánicos, provocando un rebrote con un patógeno más resistente y pérdida de la fertilidad del suelo (Lucas *et al.*, 2015).

Los aceites esenciales forman parte de una alternativa sustentable al uso de los fungicidas sintéticos para controlar la proliferación de patógenos en cultivos (Baser *et al.*, 2007). Las especies vegetales usadas para este trabajo de investigación se escogieron dado que contienen, en sus aceites esenciales, compuestos fenólicos que combaten varios fitopatógenos en cultivos de banano y cacao (Lizcano, 2007). Las pruebas *in vitro* son parte de los ensayos previos a realizar un procedimiento a una gran escala (Del Puerto *et al.*, 2014). Para el método de discos en cultivo envenenado, se puede observar de manera directa el desarrollo del hongo ante diluciones de fungicidas, por ende, se puede concluir si el uso de ese fungicida es o no el ideal para el control de ese patógeno (Quintana *et al.*, 2017).

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1 Objetivo General**

Evaluar la capacidad antifúngica *in vitro* de dos aceites esenciales contra *Lasiodiplodia theobromae* mediante el índice de inhibición de crecimiento micelial para el control fúngico en los cultivos de cacao y banano post cosecha

#### **1.3.2 Objetivo Específico**

1. Obtener aceites esenciales de orégano y tomillo aplicando destilación por arrastre de vapor a mediana escala
2. Realizar pruebas antifúngicas *in vitro* de los aceites esenciales de tomillo y orégano para la inhibición del crecimiento de *L. theobromae*
3. Comparar el potencial antifúngico de aceites esenciales y el hidrolato mediante la inhibición del crecimiento del patógeno

## 1.4 Marco teórico

### 1.4.1 Fitopatógenos

Se conoce como fitopatógeno a cualquier organismo que causa enfermedades a especies vegetales por medio de alteraciones en su metabolismo o partes de su estructura. Pueden ser bacterias, protozoarios, hongos, moluscos, nematodos o virus; por lo general, son identificados durante su desarrollo en las hojas o frutos de la planta hospedera y, causando pérdida de firmeza de la planta e incluso la pudrición de la parte afectada (Quiroga *et al.*, 2007).

#### 1.4.1.1 *Lasiodiplodia theobromae*

*L. theobromae* es una especie del género *Lasiodiplodia*, descrito por primera vez alrededor de 1890 en cultivos de cacao afectados en Ecuador (Crous & Palm, 1999). Este hongo puede hospedarse en muchas especies de plantas, las enfermedades que se le atribuyen son el cáncer, gomosis, muerte descendente y pudrición de raíz (Shahbaz *et al.*, 2009). A nivel mundial existen registros de *L. theobromae* afectando cultivos frutales de plátano, mango, aguacate, papaya, uva, duraznos y entre otros, generando pérdidas económicas en las distintas etapas de la producción (Martínez, 2012).



Figura 1.1 Medio PDA con *Lasiodiplodia theobromae*

**Tabla 1.1 Clasificación taxonómica de *L. theobromae*  
(Griffon & Maubl, 1909)**

<b>Reino</b>	<i>Fungi</i>
<b>División</b>	<i>Ascomycota</i>
<b>Clase</b>	<i>Dothideomycetes</i>
<b>Orden</b>	<i>Botryosphaeriales</i>
<b>Familia</b>	<i>Botryosphaeriaceae</i>
<b>Genero</b>	<i>Lasiodiplodia</i>
<b>Especie</b>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>

#### **1.4.2 Tratamientos contra fitopatógenos**

De acuerdo a lo expresado en sitio web del Centro Nacional de Información sobre Plagas, NPIC por sus siglas en inglés, un control de plagas eficaz requiere de tres etapas. La primera de estas consiste en identificar correctamente el patógeno, luego se debe conocer su desarrollo. Finalmente se evalúa las estrategias de control más apropiadas la plaga del cultivo (National Pesticide Information Center, 2021).

##### **1.4.2.1 Control biológico**

Consiste en mitigar los efectos nocivos de los pesticidas, las pérdidas económicas e integrar las estrategias compatibles para optimizar la efectividad del manejo integrado de plagas. Estas acciones serán el resultado del uso de organismos vivos que ayuden a contrarrestar a los organismos dañinos hospedados en los cultivos (Viera *et al.*, 2020).

##### **1.4.2.2 Control cultural**

Hace referencia al uso de diferentes técnicas agronómicas y fitosanitarias para modificar el cultivo de tal forma que este sea menos propicio para el

desarrollo de plagas. Como establecer una óptima fecha de siembra, rotación de cultivos, uso de semillas sanas y poda de órganos afectados (Centeno, 2016).

#### **1.4.2.3 Control químico**

Es un tratamiento, que según estudios de Arango *et al.* (2016), se realiza con el uso de productos químicos sintéticos llamados plaguicidas, muchos de los cuales generan el deterioro del ambiente, salud humana, evolución de poblaciones plaga más agresivas, la pérdida de polinizadores y predadores naturales (Arango *et al.*, 2016; Viera *et al.*, 2020).

Esto genera grandes impactos ambientales; además, la aplicación permanente de estos fungicidas provoca el aumento de su resistencia a estos controles, reduciendo continuamente la eficacia de los fungicidas y hasta puede provocar que la enfermedad sea incontrolable (Arango *et al.*, 2016).

#### **1.4.3 Aceites esenciales**

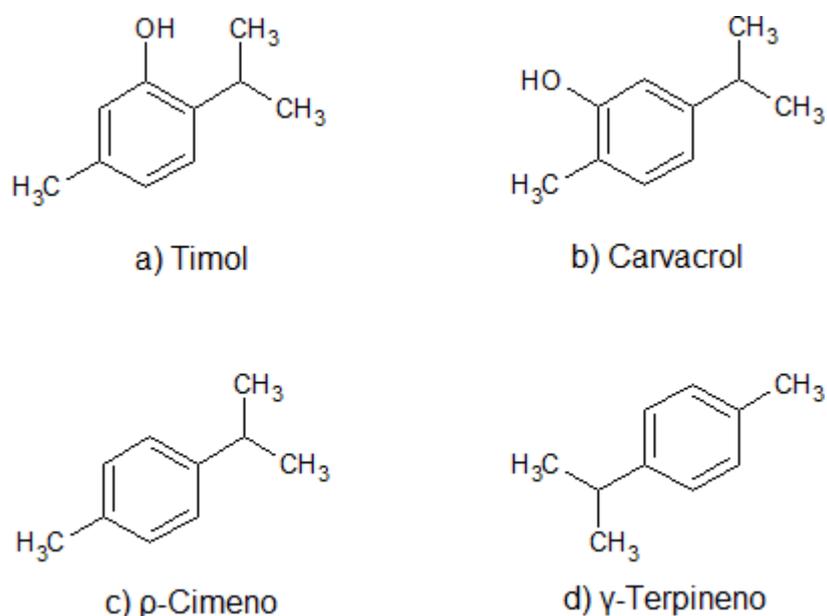
Son una mezcla compleja de líquidos volátiles que contienen compuestos alifáticos, terpenos y fenilpropanos (Martínez, 2001). Estos forman parte de los principios activos de las diversas especies vegetales aromáticas, su abundancia varía dependiendo de su localización en la planta, pero mayoritariamente se localizan en los tricomas glandulares de las hojas, tallos o flores de la especie (Camina *et al.*, 2018).

Los métodos más comunes para la obtención de aceites esenciales es la hidrodestilación y la destilación por arrastre de vapor. Cada una de ellas presentan ventajas y desventajas de una con respecto a la otra, pues todo depende de las condiciones termodinámicas, materia prima a usar, equipos, etc (Patiño *et al.*, 2014). Actualmente, en los procesos industriales, se emplea más la destilación por arrastre de vapor, por su fácil aplicación, buenos resultados en cuanto a calidad, cantidad y pureza de los aceites destilados (Casado, 2018).

##### **1.4.3.1 Terpenos**

Son compuestos orgánicos presentes en mayor abundancia en los aceites esenciales; encargados de dar propiedades organolépticas como el sabor y olor característico de cada planta (López *et al.*, 2012). Se ha encontrado en la literatura que, los terpenos carvacrol,  $\rho$ -Cimeno, timol y  $\gamma$ -Terpineno, son dos de los compuestos que podrían tener capacidades antioxidantes, antifúngicos y antibacteriales (Yan *et al.*, 2020), por esta razón varios estudios proponen el uso

de aceites de origen vegetal ante el peligro del uso de fungicidas potencialmente tóxicos.



**Figura 1.2 Moléculas de terpenos: a) Timol, b) Carvacrol, c) p-Cimeno y d)  $\gamma$ -Terpineno**

#### 1.4.4 Especies vegetales

De los estudios realizados por Muzzio y Segovia (2021) sobre diferentes especies vegetales con un poder antifúngico ante ciertos patógenos, se ha elegido a dos especies las cuales son el tomillo (*Thymus vulgaris*) y el orégano (*Origanum vulgare*), las cuales se describirán a continuación.

##### 1.4.4.1 Tomillo

Su nombre científico es *Thymus vulgaris*, pertenece a la familia de las *Lamiaceae*. Se encuentra en climas secos, templados y soleados bajo ecosistemas con suelos ásperos. Su tallo tiene un aspecto leñoso en forma de arbusto, con hojas de una tonalidad verde que poseen el olor aromático característico de esta planta, además, cuenta con flores pequeñas de una tonalidad rosada (Coy & Acosta, 2013).

**Tabla 1.2 Taxonomía de la especie “Tomillo”  
(Coy & Acosta, 2013)**

<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>
<b>División</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Clase</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Orden</b>	<i>Lamiales</i>
<b>Familia</b>	<i>Lamiaceae</i>
<b>Genero</b>	<i>Thymus</i>
<b>Especie</b>	<i>Thymus vulgaris</i>

Diversos estudios comprueban que el tomillo cuenta con propiedades antifúngicas, antiinflamatorias y antioxidantes pues cuenta con terpenos donde el compuesto predominante es el timol. Luego del proceso de destilación de su aceite esencial se estima que el rendimiento es de aproximadamente un 3% v/v (Flórez & Mojica, 2019); por lo tanto, en cada destilación que se realice se esperan resultados similares, más no iguales, puesto que el rendimiento depende de la época de destilación, lugar y estación de la cosecha, etc (Montero *et al.*, 2018).



**Figura 1.3 Atado de *Thymus vulgaris***

#### 1.4.4.2 Orégano

Es una planta de la familia *Lamiaceae*, introducida a Ecuador desde Europa. Utilizada como condimento, calmante, desinflamatorio, y la falta de apetito (Arcila *et al.*, 2004). Es perene, puede llegar a crecer hasta 80 cm de alto y se caracteriza por tener hojas ovaladas, flores coloridas, y una fragancia característica (Kumar *et al.*, 2016).



Figura 1.4 Atado de *Origanum Vulgare*

Tabla 1.3 Taxonomía de la especie “Orégano”  
(Spreng, 1825)

<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>
<b>División</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Clase</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Orden</b>	<i>Lamiales</i>
<b>Familia</b>	<i>Lamiaceae</i>
<b>Género</b>	<i>Origanum</i>
<b>Especie</b>	<i>Origanum Vulgare</i>

El mayor componente presente en el *Origanum vulgare* es el carvacrol. Se considera que la propiedad antifúngica de dicho compuesto es debido a su estructura fenólica, la cual la comparte con varios aceites esenciales (Velázquez *et al.*, 2014).

**Tabla 1.4 Componentes principales del *Origanum vulgare*  
(Khan *et al.*, 2018)**

Componente	Porcentaje
Carvacrol	70,2 ± 1,37%
γ-terpinene	5,6 ± 0,11%
p-cymene	4,5 ± 0,42%
trans-sabinene hydrate	3,8 ± 0,07%
Thymol	2,2 ± 0,12%

#### 1.4.5 Destilación por arrastre de vapor

La destilación por arrastre de vapor es un tipo de destilación en la que dependiendo del sistema se usa uno o dos compartimientos. Si el sistema es de un solo compartimiento es necesario el uso de un soporte dentro de este para que el lecho no esté en contacto con el agua, de lo contrario si se usa dos compartimientos en uno de ellos debe de estar solamente el agua y en el otro el lecho (Bandoni, 2003).

Dentro de esta operación se involucran transferencias de masa y energía, la energía se transfiere en forma de calor en el proceso de ebullición del agua del sistema, así como también en la condensación del flujo del condensado, en ambos casos se necesitan de fuentes que den o cedan energía. Para la ebullición se necesita de un foco caliente que puede ser una llama o una resistencia eléctrica mientras que para la condensación se necesita de un foco frío que puede ser cualquier tipo de refrigerante, pero, el más usado es el agua de enfriamiento (Bandoni, 2003).

La transferencia de masas en el sistema se da desde el lecho de materia prima hacia el vapor que asciende dentro del sistema. Algunos de los compuestos presentes en la superficie de las plantas se volatilizan y se ascienden con el flujo de vapor que circula, haciendo que el vapor se enriquezca con estos compuestos que luego serán separados por diferencia de densidades (Chirife, 1968).

#### **1.4.6 Métodos de control de patógenos *in vitro***

Previo a la aplicación de algún fungicida en cultivos se deben de llevar a cabo pruebas en laboratorios. A este tipo de ensayos se les conoce como pruebas *in vitro*, ya que se llevan a cabo estudios a menor escala en ambientes controlados con los que poder concluir algo para posteriormente escalar la idea (Larios *et al.*, 2020).

El método de control de patógenos *in vitro* más usado es el método de dilución en agar o medio envenenado. En este tipo de método se prueba el crecimiento micelial de algún patógeno en medios de cultivos que contengan algún componente que le impida desarrollarse por completo. Según sea el caso se pueden realizar ensayos por duplicado, triplicado o quintuplicado; todo depende de la exactitud que se requiera del ensayo (Alburquerque, 2018).

Las mediciones que se toman del ensayo pasando un cierto periodo de tiempo son representadas en gráficas y tablas, estas ayudan al investigador a concentrar y representar correctamente los datos para poder concluir con un margen de error pequeño si ocurre o no la inhibición del crecimiento del hongo con ese fungicida (Larios *et al.*, 2020).

# CAPÍTULO 2

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 Revisión bibliográfica

La revisión bibliográfica realizada recopiló aproximadamente 56 documentos en los que se encuentran libros, publicaciones, artículos científicos, revistas digitales entre otras fuentes con credibilidad académica. Las palabras claves empleadas fueron: “actividad antifúngica”, “*Lasiodiplodia theobromae*”, “aceites esenciales”, “destilación por arrastre de vapor”, “métodos para pruebas *in vitro*”, “terpenos”, y “especies vegetales con terpenos”.

Se encontró información puntual sobre los tipos de destilación, las partes de la especie para obtener mejor rendimiento, relación materia prima-solvente, otros factores que afectan al rendimiento de la destilación, métodos de ensayo para las pruebas *in vitro* y tratamiento estadístico de las mediciones tomadas. Además, se encontraron artículos que detallan la actividad antifúngica de aceites esenciales de aceites contra *L. Theobromae* y actividad antifúngica de aceite de *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare* contra varios patógenos.

### 2.2 Técnicas para la ejecución del proyecto

El trabajo de investigación tiene como objetivo primordial evaluar la actividad antifúngica del aceite de tomillo (*Thymus vulgaris*) y orégano (*Origanum vulgare*) *in vitro* contra *Lasiodiplodia theobromae*, patógeno que afecta a la producción y exportación de cultivos de cacao y banano post cosecha.

Luego de la revisión bibliográfica se seleccionó las dos especies vegetales por su gran potencial antifúngico. Posteriormente el proyecto fue dividido en cuatro partes. La primera y segunda parte fue la obtención y caracterización del aceite esencial, incluyendo la cosecha, el secado, la destilación y la purificación y almacenamiento siguiendo los lineamientos de (Blinda *et al*, 2010; Silva *et al*, 2013; Domínguez, 2018) con leves modificaciones; la cuarta parte fueron las pruebas antifúngicas tomado de (Avalos *et. al* 2019) con ligeras modificaciones. Asimismo,

esta parte cuenta de dos etapas: pruebas *in vitro* y tratamiento estadístico de las mediciones.

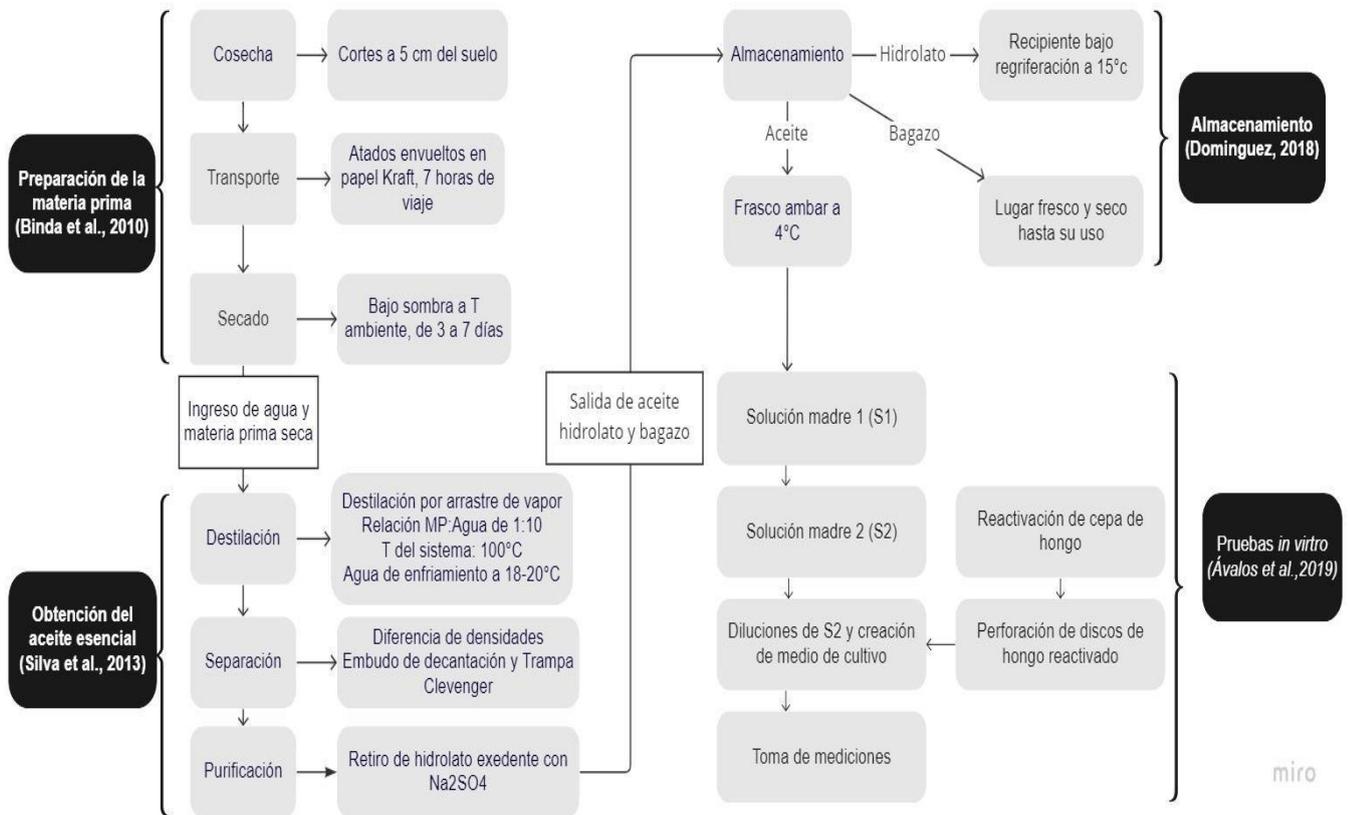


Figura 2.1 Esquema de la metodología usada en la ejecución del proyecto

### 2.3 Selección de especies

Las especies vegetales seleccionadas para este estudio se encuentran en la tabla 2.1, estas fueron escogidas a partir del trabajo de investigación realizado por Muzzio & Segovia en el 2021, ya que cuentan con un porcentaje ideal de compuestos como carvacrol y timol que inhiben el crecimiento de hongos fitopatógenos, además tienen un rendimiento alto en la destilación y fueron fáciles de conseguir.

**Tabla 2.1 Especies utilizadas**

Nombre común	Nombre científico	Partes utilizadas en destilación	Productos
<b>Tomillo</b>	<i>Thymus vulgaris</i>	Hojas y tallos	Aceite esencial, hidrolato y bagazo
<b>Orégano</b>	<i>Origanum vulgare</i>	Hojas y tallos	Aceite esencial, hidrolato y bagazo

## 2.4 Recolección de las especies

Las especies provienen de la región interandina, de comunidades cercanas a la ciudad de Ambato. Esta investigación se realizó en el marco del contrato entre la ESPOL y el MAATE registrado con el código MAATE-DBI-CM-2022-0241. El orégano fue cosechado con cortes a 10 cm sobre el suelo; el tomillo se extrajo con raíces que luego fueron removidas. La información de las condiciones se detalla a continuación en la tabla 2.2.

**Tabla 2.2 Información de la cosecha**

Especie	Fecha de cosecha	Fecha de transporte	Ubicación de cultivo	Temperatura	Coordenadas	Peso fresco
<b><i>Thymus vulgaris</i></b>	30/05/22 06:30	30/05/2022 13:00-20:00	San Antonio de Pasa, Tungurahua, Ecuador	19°C	-1,265626, -78,741699	5,5 (Kg)
<b><i>Origanum vulgare</i></b>	30/05/22 07:45	30/05/2022 13:00-20:00	Patate, Tungurahua, Ecuador	15°C	-1,307191, -78,503035	5,5 (Kg)

## 2.5 Secado de especias

Para facilitar el proceso de destilación se llevó a cabo una etapa de secado. Este proceso se ejecutó bajo sombra a temperatura ambiente (25-28°C) y 1 atmósfera de presión. A cada especie se las agrupó en pequeños atados y luego se secaron en una superficie plana sobre papel Kraft, priorizando que la ventilación sea suficiente y que el espaciado entre atado sea de 10 cm como mínimo. Estas acciones se realizaron con el fin de que no se deteriore la materia prima y que exista un secado uniforme de esta. Los datos del secado de las especias se detallan en la tabla 2.3.

**Tabla 2.3 Información del proceso de secado**

<b>Especie</b>	<b>Peso fresco</b>	<b>Tiempo de secado</b>	<b>Peso seco</b>
<i>Thymus vulgaris</i>	5,5 (Kg)	3 días	1,5 (Kg)
<i>Origanum vulgare</i>	5,5 (Kg)	5 días	1,5 (Kg)

## 2.6 Obtención de aceites esenciales

### 2.6.1 Equipo de destilación

El tipo de destilación usada fue arrastre de vapor debido a las ventajas que esta presentaba frente a otros tipos de destilación.

El sistema consta de una olla de destilación de aproximadamente de 5 L con un plato interno perforado que separa la materia prima del agua del sistema. Para el sistema de condensación se utilizó una bomba sumergible y

\*agua en un rango de 18-20°C. La fuente térmica era una cocina de gas doméstico. El condensado fue recogido en un embudo de separación. La figura 2.2 detalla cada equipo usado en la destilación.



**Figura 2.2** Equipo de destilación utilizado

### **2.6.2** Aceite esencial de *Origanum vulgare*

La obtención del aceite esencial de *Origanum vulgare* requirió una serie de destilaciones realizadas en ciclos de 60 min en 3 días, debido a la cantidad de materia prima (12 lb peso húmedo). Por cada ciclo de destilación se utilizó 250 gr aproximadamente de materia seca con 2.50 L de agua. Una vez obtenido el aceite se utilizó el embudo de decantación para separar las dos fases y evitar pérdidas. Tal como se describe en la Tabla 2.3.

### **2.6.3** Aceite esencial de *Thymus vulgaris*

La destilación para esta especie se realizó en 6 ciclos de 80 min cada uno durante tres días. La masa de materia vegetal usada en cada ciclo fue de 250 g aproximadamente, asimismo se añadió 2,5 L de agua para cumplir la relación de materia prima-agua de 1:10 (p/v). Para separar los bioproductos

de destilación se utilizó una trampa Clevenger de 12 mL ya que este aceite resultó ser menos miscible con el hidrolato permitiendo su pronta separación.

**Tabla 2.4 Cantidad usada de materia prima por ciclo de destilación.**

Ciclo	Materia prima seca (g)	
	Tomillo	Orégano
1	257,34	149,48
2	256,64	150,43
3	256,99	260,11
4	248,47	249,56
5	252,29	249,65
6	153,40	291,51
<b>Total</b>	1425,13	1350,74

#### **2.6.4 Caracterización de las muestras de aceite e hidrolato**

Previo a la caracterización del aceite se usó sulfato de sodio anhidro para separar el hidrolato restante que se encontraba en las muestras de aceite.

##### **2.6.4.1 *Propiedades organolépticas***

Luego de extraer los aceites e hidrolatos de las dos especies vegetales, se establecieron las propiedades organolépticas de estos productos, de manera visual, reportando cambios de olor, color y textura durante dos semanas.

Además; se realizó, como control de calidad para los productos de destilación, pruebas físico-químicas para determinar dos propiedades físicas con las que demostrar la pureza del aceite.

#### **2.6.4.2 Propiedades físicas**

Una primera prueba fue realizada para medir la densidad de los aceites. Para esto se usó la relación masa-volumen, cuantificando 0,2 mL de aceite, el cual fue pesado en una balanza analítica OHAUS con tres décimas de precisión, finalmente se dividió dividir la masa obtenida para el volumen cuantificado. Esta operación se realizó tres veces para obtener una media estadística para esta propiedad.

Luego de esto, se realizó una segunda prueba, la cual consistió en determinar el índice de refracción del aceite. Para esto se usó un refractómetro digital Abbemat 300, en el cual fue cargado una gota de cada aceite (0,2 mL aprox.) indicando inmediatamente el índice de refracción resultante.

### **2.7 Evaluación en patógenos**

#### **2.7.1 Cepas de *L. theobromae***

Se utilizó una cepa de *L. theobromae* preservada bajo congelación en la colección de microorganismos del CIBE-ESPOL.

La reactivación de este patógeno se realizó en cajas Petri con Agar Papa Dextrosa (PDA), para esto se colocó un disco de este hongo (5 mm de diámetro aproximadamente) en el medio de cultivo, el cual se obtuvo perforando la cepa en el medio. Este proceso duró 7 días.

#### **2.7.2 Soluciones madre**

La solución madre I fue una de las primeras soluciones que se preparó, para esto se tomó 0,3 mL de aceite y 37,5 mL de hidrolato de cada aceite en recipientes por separado. Luego se la diluyó en dimetilsulfóxido (DMSO), teniendo así 2 mL de solución madre I para el aceite, mientras que al hidrolato no se le agregó este reactivo, quedando solo los 37,5 mL. El aceite paso de tener una concentración de 1000000 ppm (considerado como puro) a una solución de 165000 ppm mientras que el hidrolato tuvo una concentración de

1000000 ppm. La tabla 2.5 detalla la metodología propuesta para realizar la solución madre I.

**Tabla 2.5 Información sobre la solución madre I**

<b>Solución madre I (SM I)</b>					
<b>Producto</b>	<b>Concentración inicial (ppm)</b>	<b>Concentración final (ppm)</b>	<b>Volumen (mL)</b>	<b>Volumen de DMSO (mL)</b>	<b>Volumen total (mL)</b>
<b>Aceite esencial</b>	1000000	165000	0,3	1,7	2,0

Luego de esta preparación se volvió a diluir la solución madre I con agua, para llevar la solución de 165000 a 2000 ppm para el aceite y de 1000000 a 500000 ppm para el hidrolato, con un volumen final de 75 mL de solución. Para esto se usa 74 mL de agua y 1 mL de la solución madre I preparada para el aceite y 37,5 mL de agua con 37,5 mL de hidrolato. La información resumida se detalla a continuación.

**Tabla 2.6 Información sobre la solución madre II**

<b>Solución madre II (SM II)</b>					
<b>Producto</b>	<b>Concentración inicial (ppm)</b>	<b>Concentración final (ppm)</b>	<b>Volumen de SM I (mL)</b>	<b>Volumen de agua (mL)</b>	<b>Volumen total (mL)</b>
<b>Aceite esencial</b>	165000	2000	1,0	74,00	75,0
<b>Hidrolato</b>	1000000	500000	37,5	37,5	75,0

### **2.7.3 Ensayos de inhibición con diluciones de aceites**

Luego de haber reactivado la cepa del hongo y de haber preparado la solución madre II, se realizó los ensayos de inhibición de crecimiento. Para esto se perforaron discos de la cepa del hongo reactivado y se preparó el medio de cultivo. Entonces, se usó 74 mL de agua para el medio del aceite esencial mientras que para el medio del hidrolato se usó 37,5 mL de agua. A cada volumen de agua se le agregó y mezcló 2,9 g de PDA y se autoclavó para eliminar cualquier microorganismo del medio preparado.

Para finalizar con la preparación del medio, se le agregó la cantidad de aceite esencial e hidrolato siguiendo la información de la tabla 2.6. Con estos 75 mL de cada concentración se realizaron los ensayos por quintuplicado, es decir que se colocaron 15 mL de cada dilución en 5 cajas Petri, para luego colocarle el disco con la cepa del hongo, como se detalla en la tabla 2.7. Finalmente, se cerró la caja Petri y se incubó el hongo por 5 días para tomar la primera medición. Se realizaron marcas radiales en estas cajas Petri donde se midió la longitud, desde el centro de la caja hasta la marca, en cada ensayo con ayuda del programa IMAGEJ® para calcular el área micelial del patógeno.

## **2.8 Diseño experimental de las muestras**

El experimento consistió en evaluar la capacidad de inhibir el crecimiento micelial del hongo *L. theobromae* con diluciones de aceites a diferentes concentraciones. La variable de estudio a medir es el crecimiento radial del hongo en mm y esto dependerá de la variable concentración del aceite (ppm). Las entradas del experimento fueron los medios de cultivos con discos del hongo y las salidas del experimento fueron los mismos medios con hongos ya desarrollados.

Como en el experimento se va a medir el efecto de una sola variable, se usó un diseño completamente aleatorizado, en la que se aplicó la herramienta estadística del análisis de la varianza de un factor (ANOVA) con un nivel de significancia del 5%. Con dicha herramienta estadística se verificó la hipótesis de la incidencia de la concentración del AE e hidrolato en el crecimiento micelial del patógeno.

# CAPÍTULO 3

## 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

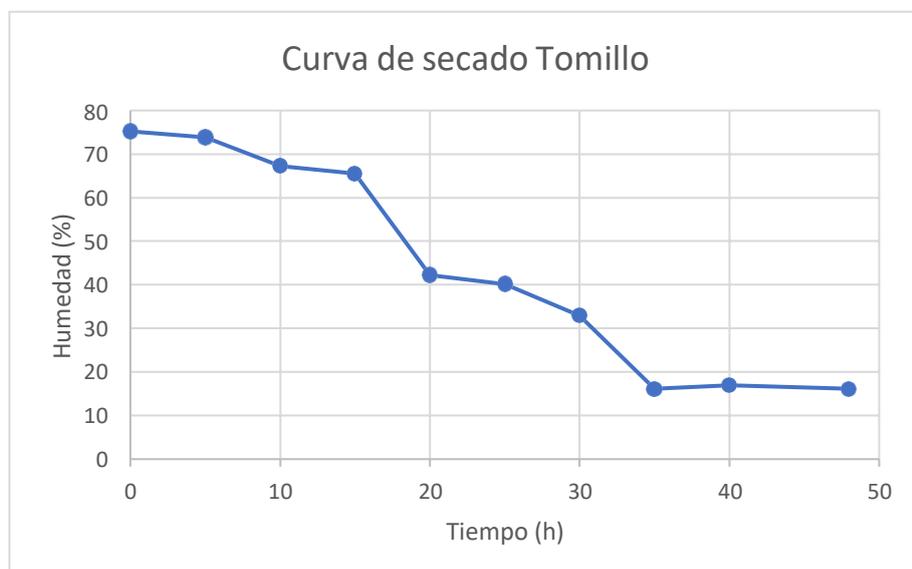
### 3.1 Secado de las especies

El proceso de secado de las especies fue llevado a cabo como se describió en la metodología propuesta obteniendo los valores que se presentan en la tabla 3.1

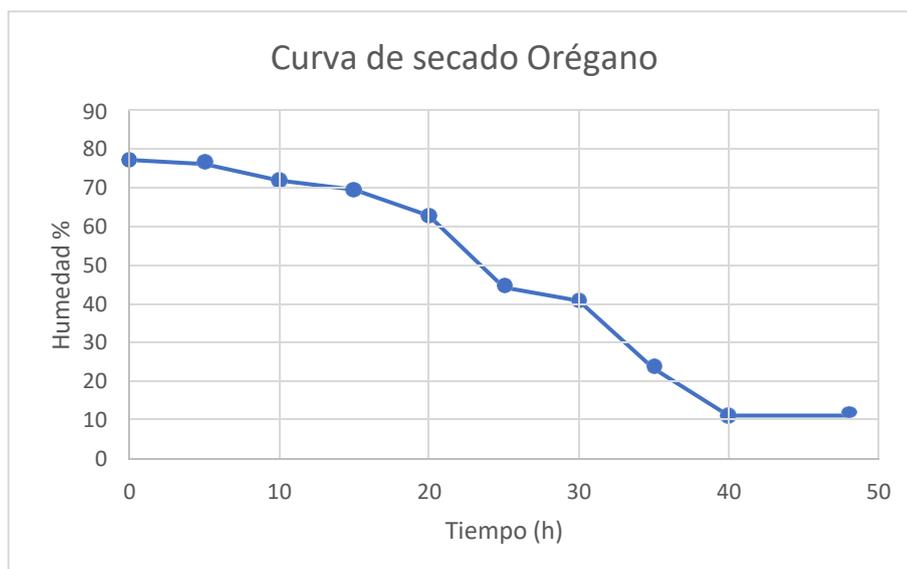
Tabla 3.1 Resumen de proceso de secado de las especies

Especie	Peso fresco	Tiempo de secado	Peso seco	Humedad en el equilibrio	
				Autores	Reportado
<i>Thymus vulgaris</i>	5,5 (Kg)	3 días	1,5 (Kg)	17%	12% Da Rocha <i>et al.</i> 2012
<i>Origanum vulgare</i>	5,5 (Kg)	5 días	1,5 (Kg)	12%	12% Castillo <i>et al.</i> 2019

Asimismo, se realizó las respectivas curvas de secado para ambas especies vegetales las cuales se encuentran en la figura 3.1 y 3.2.



**Figura 3.1 Curva de secado de *Thymus vulgaris***



**Figura 3.2 Curva de secado de *Origanum vulgare***

El resultado de este proceso de secado evidencia que la especie *Origanum vulgare* tiene una humedad final del 12%; este valor concuerda con lo reportado en la literatura referenciada. Por otro lado, la especie *Thymus vulgaris* presentó un porcentaje de humedad final del 17%; este porcentaje difiere con el porcentaje de la humedad final consultado en la bibliografía el cual era de 12%. Esto evidencia que el proceso de secado no fue del todo óptimo, pero esto no afectó el rendimiento de la destilación de esta especie tal como se demostrará en la sección 3.4.

### 3.2 Aceites esenciales e hidrolatos

Los productos de la destilación de materia prima seca por arrastre de vapor fueron recolectados, separados y almacenados en diferentes contenedores. El volumen de aceite obtenido se presenta en la tabla 3.2 y está ligado a la cantidad de materia prima que se coloque en el sistema. En esta tabla se evidencia que, para la especie *Thymus vulgaris* se obtuvo un mayor volumen aceite mientras que en la destilación de la especie *Origanum vulgare* se obtuvo poco volumen de aceite.

El volumen del subproducto de la destilación (Hidrolato) para ambas especies fue considerable, ya que este producto está ligado tanto a la cantidad de agua con el que inició el sistema para la destilación como el tiempo que se empleó para la

destilación. Y en la tabla se observa que la especie *Origanum vulgare* tuvo un mayor tiempo de destilación, por consiguiente, un mayor volumen de hidrolato fue recolectado.

**Tabla 3.2 Resultados de la destilación de las especies vegetales**

Especie	Masa de material prima seca (lb)	Tiempo de destilación (min)	Volumen de aceite (mL)	Volumen de Hidrolato (mL)
<i>Origanum vulgare</i>	4	465	1,75	6615
<i>Thymus vulgaris</i>	4	408	4,7	5100

### 3.3 Propiedades organolépticas y físicas de los aceites e hidrolatos

Las propiedades organolépticas de los aceites como el aroma, color y textura fueron similares entre ambas especies. Estas se detallan en la tabla 3.3.

**Tabla 3.3 Propiedades organolépticas de los aceites destilados**

Especie	Aroma	Coloración	Textura
<i>Origanum vulgare</i>	Herbáceo	Amarillo	Ligeramente viscosa
<i>Thymus vulgaris</i>	Herbáceo	Naranja	Viscosa

Estas propiedades fueron comparadas con los resultados obtenidos por Muzzio & Segovia en el 2021, encontrando que, las propiedades para la especie *Origanum vulgare* concuerdan totalmente, pero, para la especie *Thymus vulgaris* no concuerdan. Esta variación puede deberse a que, según la bibliografía consultada, “estos aceites son propensos a oxidarse ya que estos aceites cuentan en su estructura con ácidos grasos insaturados que de no contar con un ambiente

adecuado en la destilación (temperatura, luz natural, oxígeno presente) pueden tomar una coloración más oscura de lo normal” (Juárez, 2017).



**Figura 3.3 Aceites esenciales destilados a) *Thymus vulgaris* b) *Origanum vulgare***

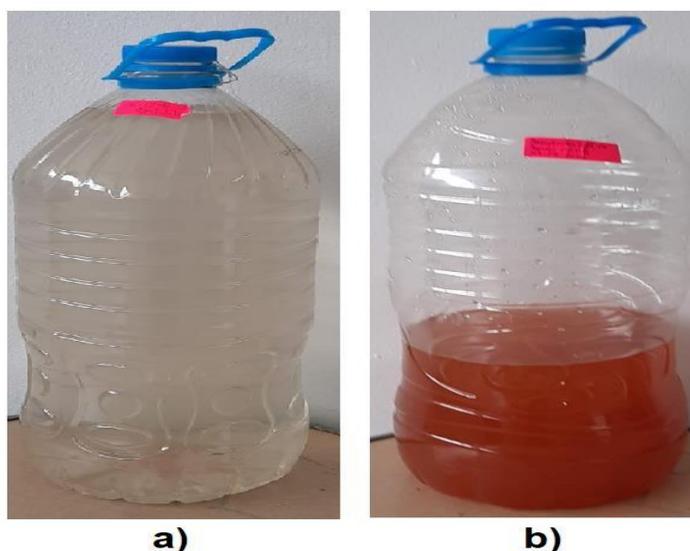
Asimismo, las propiedades organolépticas de los hidrolatos de las especies se detallan en la tabla 3.4.

**Tabla 3.4 Propiedades organolépticas de los hidrolatos**

Especie	Aroma	Coloración	Textura
<i>Origanum vulgare</i>	Herbáceo	Transparente-Blanquecina	Líquida
<i>Thymus vulgaris</i>	Herbáceo	Blanquecina-Naranja	Líquida

Estas propiedades también fueron comparadas con trabajos previos encontrando que estas propiedades difieren dependiendo del autor y la época en la que se realiza la destilación. (Cáceres *et al.*, 2021) Del resultado de este trabajo se tiene que, el hidrolato de la destilación de *Origanum vulgare* no presentó cambios en su coloración a lo largo del tiempo, siempre mantuvo su tonalidad transparente-blanquecina. Pero el hidrolato del *Thymus vulgaris* si fue afectado a

lo largo de la destilación y posteriores pruebas antifúngicas ya que este hidrolato a medida que pasaba el tiempo se iba oxidando, tomando una coloración naranja, pese a que se mantuvo en refrigeración y bajo sombra, tal como se observa en la figura 3.4.



**Figura 3.4 Hidrolatos recolectados a) *Origanum vulgare*, b) *Thymus vulgaris***

Las propiedades físicas de la densidad e índice de refracción fueron comprobadas como control de calidad del aceite. La densidad fue medida a 20°C por medio de la relación masa-volumen teniendo que la densidad para el aceite de *Thymus vulgaris* fue 0,907 g/mL mientras que para *Origanum vulgare* fue de 0,869 g/mL. Estos valores se encuentran muy cercanos a las densidades reportadas por Cáceres *et al.* (2021), 0,929 mg/mL y 0,943 mg/mL para el orégano y tomillo respectivamente, comparando las densidades de la bibliografía y las obtenidas se obtuvo un porcentaje de error menor al 10%, lo cual es aceptable ya que no se contó ni con un volumen considerable de aceite para probar otros métodos de comprobar la densidad ni con equipos de laboratorios con una precisión mayor.

El índice de refracción de ambos aceites fue medido con la ayuda de un refractómetro Abbemat 300 a una temperatura de 20°C. El resultado de esta prueba fue que para el aceite de tomillo y orégano se obtuvieron índice de refracción de 1,4966 nD y 1,5028 nD respectivamente. Cáceres *et al.* (2021), reporta que el índice de refracción se encuentra dentro del rango de [1,4900-1,5080] nD para ambas especies. Entonces, el porcentaje de error comparando los valores de esta

propiedad para los aceites extraídos con los de la bibliografía son menores al 10% por lo que los índices de refracción medidos son un buen indicador de la pureza del aceite extraído.

Con todas estas pruebas organolépticas y físicas se tiene constancia de que los aceites obtenidos de la destilación cuentan con la calidad necesaria y pueden ser usados en las pruebas posteriores.

### 3.4 Rendimiento de la destilación

Para el rendimiento de la destilación se tomó en cuenta los volúmenes de hidrolato y aceite esencial. En el rendimiento del hidrolato se calculó en base al volumen de agua usado en la destilación con la siguiente ecuación:

$$\%rendiminetohidrolato = \frac{mL\ de\ hidrolato}{mL\ de\ agua} * 100 \quad (1)$$

En cuanto al rendimiento del aceite, este fue calculado en base a la masa de materia prima seca usada en la destilación con la siguiente ecuación:

$$\%rendiminetoAceite = \frac{g\ de\ Aceite}{g\ de\ MP_{seca}} * 100 \quad (2)$$

La tabla 3.5 muestra los rendimientos calculados para el hidrolato y aceite de las dos especies usadas en la destilación.

**Tabla 3.5 Rendimiento de los productos de la destilación**

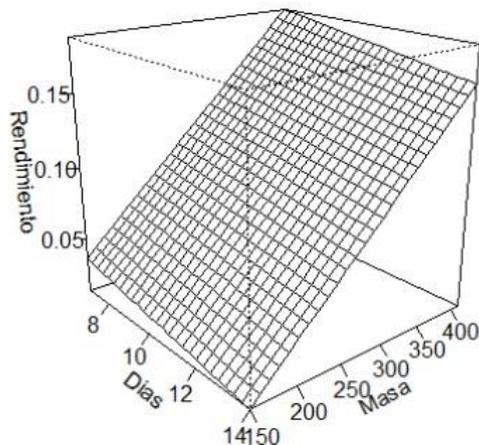
Especie	Hidrolato		Aceite	
	Autores	Reportado	Autores	Reportado
<i>Origanum vulgare</i>	44,39%	-	0,12%	0,76 % (Muzzio & Segovia, 2021)
<i>Thymus vulgaris</i>	36,69%	-	0,38%	0,27% (Muzzio & Segovia, 2021)

Como se observa el rendimiento del hidrolato es alto en comparación con el rendimiento del aceite. Este rendimiento del hidrolato puede incrementarse si la destilación se hace por un tiempo más prolongado al que se usó en esta destilación. Pero, así como se incrementa el rendimiento del hidrolato también puede ocurrir que se evapore toda el agua del sistema y se comience a quemar la materia prima. Además, no se podría llegar a un rendimiento del 100% ya que puede existir pérdida de vapor en alguna de las conexiones del sistema en general e incluso la materia prima se hidrata en todo el proceso de destilación.

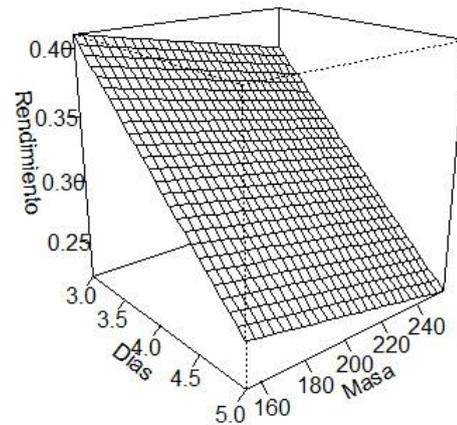
El rendimiento del aceite para la especie *Thymus vulgaris* es mayor al consultado en la bibliografía puesto que en la destilación de esta especie se ha alcanzado un 0,38%. (Muzzio Villafuerte & Segovia Llor, 2021) Este rendimiento obtenido puede deberse a que, como se expuso antes, se usó la raíz de esta planta. Por otro lado, el rendimiento de la destilación de orégano fue menor al 0,2%, esto evidencia que existió algún factor que afectó en alguna etapa de la preparación de la materia prima, la época, lugar de cosecha, destilación o la separación. Según Muñoz en el 2019, expresó que la recolección y cosecha de orégano se debe de realizar en los meses de junio-septiembre, ya que en esta época del año es cuando esta especie se encuentra en floración y es precisamente en esta parte de la planta donde se concentra un porcentaje considerable del aceite esencial que se quiere extraer (Muñoz, 2019).

Otro factor que se tuvo en cuenta para analizar el rendimiento de la destilación fue el tiempo de secado de la materia prima. Este proceso se realizó para quitar la humedad que esta tenía, ya que estas especies vegetales cuentan con un 80% de humedad en su estructura. Para esto se realizaron gráficas que ayudaron a constatar lo antes expuesto.

**Superficie de Respuesta: Orégano**



**Superficie de Respuesta: Tomillo**



**Figura 3.5 Superficies de respuesta con datos recolectados de la destilación**

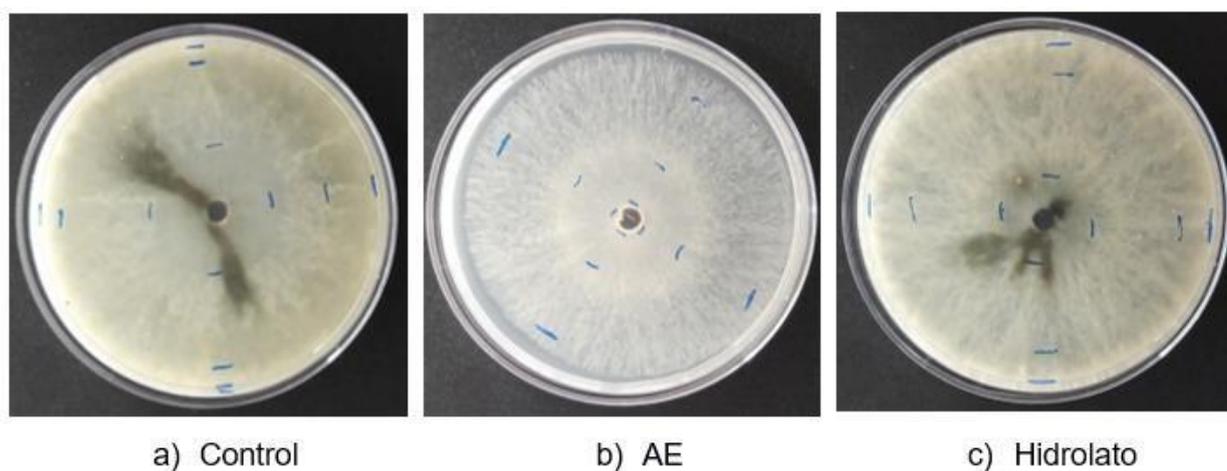
La figura 3.5 es el resultado de graficar la variable masa de materia prima seca, días de secado y rendimiento de la destilación para ambas especies vegetales. Esta información se graficó ya que existen días de separación entre destilación, pero revisando dato a dato se puede observar que la significancia de la cantidad de días de secado en el rendimiento de la destilación es mínima y estadísticamente inexistente por lo que se descarta que la etapa de secado haya influido en los resultados de la destilación.

### 3.5 Pruebas antifúngicas

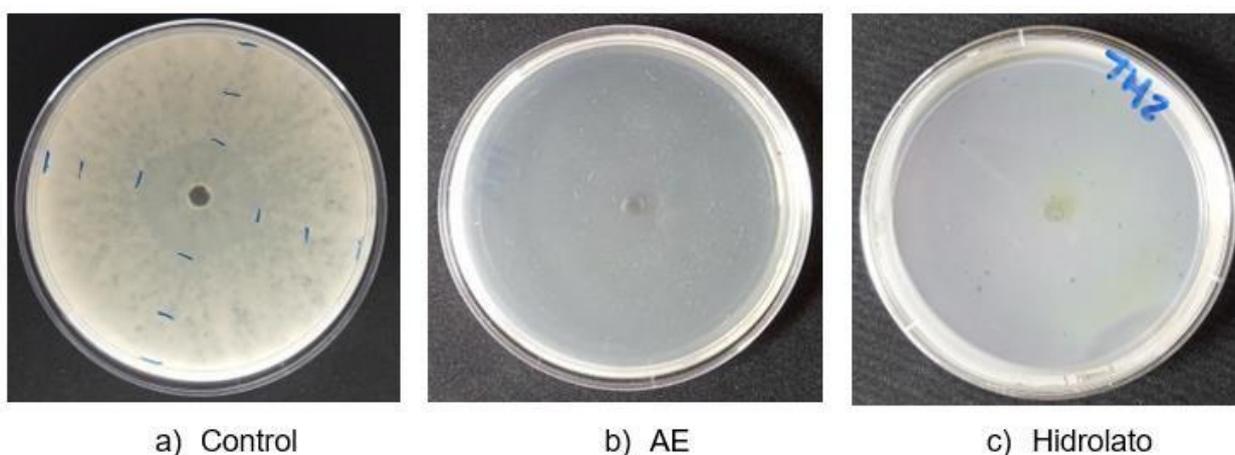
Tal como se expresó en el capítulo 1 el aceite esencial de ambas especies obtenidas en la destilación posee compuestos fenólicos con potencial actividad antifúngica debido al grupo hidroxilo en sus estructuras. Lizcano (2007) y Casacchia (2018) probaron el efecto antifúngico de algunos aceites esenciales de orégano y tomillo contra *Fusarium solani*, *Phytophthora capsici* y *Rhizoctonia solani*, encontrando que efectivamente estos aceites esenciales a diferentes concentraciones inhiben el crecimiento de los patógenos a diferentes concentraciones, para *F. Solani* fue a 250 ppm de AE de tomillo, para *P. Capsici* fue a 200 ppm de AE de tomillo y para *R. Solani* fue a 100 ppm de este mismo aceite; pero en estas investigaciones no se realizaron pruebas *in vitro* contra *L. theobromae*.

En las pruebas antifúngicas *in vitro* de los aceites esenciales se obtuvo que el aceite esencial de la especie *Origanum vulgare* inhibe el crecimiento micelial del

patógeno parcialmente durante los tres días que duró el ensayo, mientras que el aceite esencial de la especie *Thymus vulgaris* presentó una inhibición total del crecimiento de este patógeno desde el inicio hasta el final del ensayo. Las figuras 3.6 y 3.7 muestran los ensayos llevados a cabo, donde se observa el crecimiento del patógeno en los distintos medios de cultivo (control, con hidrolato de la especie y con aceite esencial de la especie)



**Figura 3.6 Resultados de los ensayos AE e hidrolato de *O. Vulgare* contra *L. theobromae***



**Figura 3.7 Resultados de los ensayos AE e hidrolato de *T. Vulgaris* contra *L. theobromae***

Asimismo, en la tabla 3.6 se observan los porcentajes de inhibición durante los días en los que se realizó las pruebas, corroborando que el aceite esencial de *Thymus vulgaris* tiene mayor potencial antifúngico de las dos especies debido a que cuenta con una mayor proporción de timol en su composición en comparación con la especie *Origanum vulgare*. Por lo que, un análisis estadístico para esta especie no sería necesario ya que no existen datos diferentes que analizar.

**Tabla 3.6 Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial de los distintos tratamientos**

	<i>Thymus vulgaris</i>		<i>Origanum vulgare</i>	
	Hidrolato (50%)	Aceite Esencial (2000ppm)	Hidrolato (50%)	Aceite Esencial (2000ppm)
<b>Día 1</b>	100%	100%	51,12%	89,03%
<b>Día 2</b>	100%	100%	1,28%	74,10%
<b>Día 3</b>	100%	100%	21,05%	27,28%

Los porcentajes de inhibición del hidrolato y aceite esencial de la especie *Thymus vulgaris* no presentan diferencia alguna en el control del patógeno, mientras que para la especie *Origanum vulgare* se observa que el aceite esencial tiene un mayor porcentaje de inhibición que el hidrolato. Esta diferencia puede justificarse ya que, tanto en este como en otras pruebas llevados a cabo en la bibliografía consultada, se hacen los ensayos con una dilución del hidrolato a un 50% mientras que el aceite se diluye al 1-2%, por lo que el hidrolato al componerse mayormente por agua tiene menos cantidad de compuestos fenólicos que el aceite (Ramírez *et al.*, 2011).

Se verificó y comparó los resultados de las pruebas antifúngicas. Para la especie *Origanum vulgare* se encontró que, con 600 ppm de aceite esencial de esta especie se llegó a inhibir totalmente el crecimiento micelial de *L. theobromae*. (Espitia *et al.*, 2012) En los ensayos realizados en este proyecto no se obtuvo el mismo rendimiento. Ya que a pesar de que las disoluciones que se usaron fueron mucho más elevadas, 2000 ppm, solo se llegó a inhibir el crecimiento micelial parcialmente y no totalmente, como lo describe en el artículo. Lo que quiere decir

que posiblemente factores como el lugar, clima o suelo de la cosecha, el tiempo de destilación, o secado de la especie llegaron a alterar la concentración de componentes activos presentes.

En la bibliografía consultada sobre el uso del AE del *Thymus vulgaris* contra *L. theobromae* se encontró que se inhibió el 100% del crecimiento del patógeno a partir de 0,33 ppm de aceite esencial en los medios de cultivo. (Perumal *et al.*, 2016) Estos resultados, de la actividad antifúngica, fueron replicados en este trabajo utilizando una concentración de 2000 ppm en los medios de cultivo; además, se realizó otro ensayo en el que se utilizó hidrolato de esta especie con una concentración de 50000 ppm, consiguiendo así mismo el 100 % de inhibición del patógeno. Con esto se comprobó la actividad antifúngica de ambos productos de destilación de esta especie contra *L. theobromae*.

De acuerdo a las pruebas realizadas se ha demostrado que las concentraciones a las que se diluyó el aceite de *Origanum vulgare* y los días de duración del ensayo son factores a tomar en cuenta al momento de decidir cuál podría ser el CMI para inhibir el crecimiento micelial. La figura 3.8 muestra el uso de la herramienta estadística del análisis de la varianza de dos factores.

Tabla ANOVA

Fuente de variación	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Día	2	10431.1	5215.5	192.175	< 2.2e-16
Tipo de Experimento	2	1631.7	815.8	30.061	1.073e-08
Residuals	40	1085.6	27.1		

**Figura 3.8 Análisis de la varianza de dos factores de los ensayos realizados**

Entonces, el *P-valor* para el factor de días de duración del ensayo es menor a 2.2e-16, el cual es menor al nivel de significancia de 0.05. Por lo tanto, este factor tiene un efecto significativo en el área micelial del hongo. Asimismo, el *P-valor* para el factor de tipo de experimento es de 1.073e-08, el cual también es menor al nivel de significancia de 0.05. Por lo tanto, los diferentes tipos de experimento utilizados también influyen en la variable de respuesta

Como resultado de las pruebas visuales y estadísticas del diseño experimental completamente aleatorizado se obtuvo que los días de duración del ensayo y tipo de tratamiento usado si influyen en la inhibición del patógeno y, más en concreto, que la dilución del aceite esencial de *Thymus vulgaris* tiene la capacidad antifúngica idónea contra *L. theobromae* por lo que la que estimar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de este aceite se podría hacer en estudios posteriores, mientras que para el aceite de orégano se comprobó que no cuenta con un buen potencial antifúngico contra este patógeno.

### 3.6 Análisis económico de producción de aceites esenciales

Tomando en cuenta el rendimiento de la destilación obtenido y la eficacia del aceite de tomillo en las pruebas antifúngicas *in vitro* sobre el uso del aceite de orégano se escogió esta especie para realizar el análisis económico.

Los costos involucrados en la destilación del aceite de tomillo se detallan en las tablas 3.7 y 3.8. En estas tablas se tienen los costos de los equipos y materiales usados en la producción de este tipo de aceites.

**Tabla 3.7 Presupuesto en la inversión del equipo de destilación**

Equipo	Precio
Cocina industrial (1 puesto)	\$ 70,00
Olla de destilación (Acero inoxidable)	\$ 60,00
Mangueras PVC (2 m)	\$ 4,00
Bomba sumergible FP-1005	\$ 28,00
Embudo de decantación (250 mL)	\$ 35,00
Soporte Universal, pinza y nuez	\$ 40,00
Cilindro de gas 15 Kg	\$ 3,00
Total	\$ 240,00

**Tabla 3.8 Costos de producción y venta (tentativa) del aceite destilado**

Especie vegetal (12 Lb)	\$ 10,00
Agua (30 m <sup>3</sup> )	\$ 5,00
Costo de producción de 5 mL de aceite	\$ 15,00
Precio de venta (Ganancia del 30%)	\$ 19,50

Este proyecto al ser a mediana escala aún no se tomó en cuenta la mano de obra directa. Asimismo, la inversión que se contempla para que la destilación de aceite inicie sería de 260\$ aproximadamente. Pero de este rubro tan solo se va a necesitar de 15\$ para obtener 5 mL de este aceite y sería vendido con un margen de ganancia del 30%. Este valor de venta al público sería muy bien recibido en el mercado ya que el aceite de los competidores está cercano a los 22-23\$ por lo que las técnicas implementadas en la destilación son muy rentables.

# CAPÍTULO 4

## 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 4.1 Conclusiones

- Los productos de la destilación de la especie *Thymus vulgaris* lograron inhibir el 100% el crecimiento de *L. theobromae*. Esto se evidenció en los medios de cultivo con 2000 ppm del aceite y los medios de cultivo con 50000 ppm del hidrolato; puesto que estos ensayos no presentaron crecimiento micelial durante su ejecución. Sin embargo, bajo las mismas concentraciones del aceite esencial e hidrolato de la especie *Origanum vulgare* existió crecimiento micelial en sus respectivos medios de cultivo.
- Se obtuvo un buen rendimiento en volumen de aceite esencial e hidrolato de las especies, los cuales fueron suficientes para realizar las pruebas antifúngicas *in vitro* con cada una de las diluciones en el medio. Lo que evidencia que la técnica de destilación por arrastre de vapor con las modificaciones realizadas, en la relación materia prima y agua de 1:10 (p/v); y las dos etapas de separación, tuvieron una leve mejora en cuanto al rendimiento de la destilación reportado por autores de trabajos previos.
- El potencial antifúngico de los hidrolatos de ambas especies fue considerable en el crecimiento del patógeno. Pero el hidrolato a 50000 ppm del *Thymus vulgaris* fue quien inhibió al 100% el crecimiento mientras que, el hidrolato del *Origanum vulgare* retardo el crecimiento del patógeno más no lo inhibió. Estos subproductos de destilación son una gran alternativa a usar debido a su bajo costo de producción y mayor rendimiento en volumen, comparado con los aceites.
- Con los resultados obtenidos de las pruebas antifúngicas con los productos de destilación de *O. vulgare*, se evidencia que tanto el AE como el hidrolato tienen un bajo potencial antifúngico contra el *L. theobromae*. Por lo que se concluye

que los productos de destilación de esta especie no son aptos para seguir llevando a cabo investigaciones contra este patógeno puesto que los pesticidas deben de llevar una baja concentración de estos bioproductos.

- Del análisis económico se obtuvo, tanto el aceite esencial e hidrolato del *Thymus vulgaris* debido a su gran porcentaje de ganancia y bajo costo de producción son potenciales productos para la comercialización por sí solos o como reactivos para formulación de un posible fungicida orgánico comercial.

## 4.2 Recomendaciones

- Al momento de transportar la materia prima se recomienda el uso cartones o papel Kraft, pero sobre todo evitar usar fundas plásticas ya que estas hacen que la planta transpire expulsando agua con pequeñas partículas de aceite debido a la humedad que se genera en la funda. Estas partículas de aceite a largo plazo afectarán en el rendimiento de la destilación del aceite de la especie.
- Se recomienda, controlar de una manera más efectiva las condiciones térmicas del espacio destinado al secado de la materia prima, ya que los cambios bruscos de temperatura afectan en esta operación, provocando que se retire del secado la materia prima sin que esta se encuentre totalmente seca. Además, se recomienda distribuir uniformemente en el área de secado las plantas, de tal manera que cada una de ellas tenga el flujo necesario de aire para que se seque correctamente.
- En cuanto a la destilación, se recomienda optimizar el tiempo de destilación, la cantidad de materia prima y volumen de agua que se ingrese a este tipo de sistemas, ya que existe evidencia de que gran cantidad de aceite esencial de estas especies se obtiene dentro de la primera media hora de destilación. Con esta acción se mejoraría los rendimientos de los productos de destilación y el análisis económico en la obtención de estos.

- Tomar los datos recopilados de las pruebas antifúngicas *in vitro* como base para encontrar las concentraciones mínimas inhibitorias para ambas especies, ya que por factor tiempo y volumen de aceite no se lograron hacer las diluciones a 1000, 500, 250 y 100 ppm para los aceites con las que probar el efecto fúngico de estas especies vegetales.
- Al momento de preparar los medios de cultivo se recomienda, homogeneizar bien las soluciones madres para obtener una distribución equivalente de terpenos presentes y poder garantizar la fiabilidad de las pruebas antifúngicas.
- Finalmente, se recomienda hacer combinaciones aceite-aceite, aceite-hidrolato e hidrolato-hidrolato entre las especies vegetales para realizar nuevos ensayos y constatar si el efecto fúngico es aditivo para así mejorar los resultados presentados en este trabajo.

# BIBLIOGRAFÍA

- Acosta De Guevara, E., & Molina Castillo, A. (2019). *Aplicabilidad biotecnológica de aceites esenciales de Lippia alba* [Universidad Libre Seccional Barranquilla]. <https://repository.unilibre.edu.co/bitstream/handle/10901/17821/41545222.pdf?sequence=1>
- Alburqueque Andrade, D. (2018). Eficacia de fungicidas químicos para el control in vitro de diferentes fitopatógenos en condiciones controladas. *Arnaldoa*, 25(2). <https://doi.org/10.22497/ARNALDOA.252.25209>
- Arango Isaza, R. E., Diaz-Trujillo, C., Dhillon, B., Aerts, A., Carlier, J., Crane, C. F., V. de Jong, T., de Vries, I., Dietrich, R., Farmer, A. D., Fortes Ferreira, C., Garcia, S., Guzman, M., Hamelin, R. C., Lindquist, E. A., Mehrabi, R., Quiros, O., Schmutz, J., Shapiro, H., ... Kema, G. H. J. (2016). Combating a Global Threat to a Clonal Crop: Banana Black Sigatoka Pathogen *Pseudocercospora fijiensis* (Synonym *Mycosphaerella fijiensis*) Genomes Reveal Clues for Disease Control. *PLOS Genetics*, 12(8), e1005876. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1005876>
- Arcila-Lozano, C. C., Loarca-Piña, G., Lecona-Urbe, S., & González de Mejía, E. (2004). El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(1). [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222004000100015](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222004000100015)
- Bandoni, A. (2003). *Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica* (2nd ed., Vol. 1). Ciencia y Tecnología para el desarrollo. <https://www.cytred.org/es/biblioteca/los-recursos-vegetales-aromaticos-en-latinoamerica>
- Baser, K. H. C., Esen, G., Azaz, A. D., Kurkcuoglu, M., & Tinmaz, A. (2007). Essential oil and antimicrobial activity of wild and cultivated *Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum* (Link) letsvaart from the Marmara region, Turkey. *Flavour and Fragrance Journal*, 22(5), 371–376. <https://doi.org/10.1002/FFJ.1808>
- BCE. (2020). *Informe de gestión*. [https://www.produccion.gob.ec/wp-content/uploads/2021/05/3.-Informe-de-gestion-MPCEIP-2019\\_compressed.pdf](https://www.produccion.gob.ec/wp-content/uploads/2021/05/3.-Informe-de-gestion-MPCEIP-2019_compressed.pdf)
- Božik, M., Nový, P., & Klouček, P. (2017). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Cinnamon, Thyme, Oregano and Clove Essential Oils Against Plant

Pathogenic Bacteria. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 65(4), 1129–1134. <https://doi.org/10.11118/actaun201765041129>

Cáceres, M. B., Rozo, V. F., & del Valle García, E. (2021). Estudio de la calidad de aceites esenciales de orégano, tomillo y romero cultivados en Severino (El carmen, JUJUY) recolectados en invierno y primavera. *Revista Científica FCA*, 14(1), 7–18.

Camina, J. L., Dambolena, J. S., Zygadlo, J. A., & Ashworth, L. (2018). Composición química del aceite esencial de tricomas glandulares peltados en hojas y flores de *Lepechinia floribunda* (Lamiaceae). *Boletín de La Sociedad Argentina de Botánica*, 53(3), 375–384. <https://doi.org/10.31055/1851.2372.V53.N3.21312>

Casado, I. (2018). Optimización de la extracción de aceites esenciales por destilación en corriente de vapor [Universidad Politécnica de Madrid]. In *Universidad Politécnica de Madrid*. [https://oa.upm.es/49669/1/TFG\\_IRENE\\_CASADO\\_VILLAVERDE.pdf](https://oa.upm.es/49669/1/TFG_IRENE_CASADO_VILLAVERDE.pdf)

Centeno Greeys. (2016). *Metodos de controles: cultural, físico y mecánico*. Universidad Central de Maracay. [http://www.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_agronomia/Zoologia\\_Agricola/Manejo\\_Integrado/CONTROL\\_\\_CULTURAL\\_\\_FISICO\\_Y\\_MECÁNICO\\_2016\\_JULIO.pdf](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_agronomia/Zoologia_Agricola/Manejo_Integrado/CONTROL__CULTURAL__FISICO_Y_MECÁNICO_2016_JULIO.pdf)

Chirife, J. (1968). *Transferencia de masa y calor en el secado de lechos rellenos por circulación transversal de aire* [Universidad Nacional de La Plata]. <https://doi.org/10.35537/10915/133429>

Coy, C., & Acosta, G. (2013). Actividad antibacteriana y determinación de la composición química de los aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y cúrcuma (*Curcuma longa*) de Colombia. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(2). [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962013000200007&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962013000200007&lng=es&nrm=iso&tlng=es)

Crous, P., & Palm, M. (1999). Reassessment of anamorph genera *Botryodiplodia*, *Dothiorella* and *Fusicoccum*. *South African Journal of Science - S AFR J SCI*, 51(2).

Del Puerto, A., Suárez, S., & Palacio, D. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52(3). [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1561-30032014000300010](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032014000300010)

- Espitia, P. J. P., Soares, N. de F. F., Botti, L. C. M., Melo, N. R. de, Pereira, O. L., & Silva, W. A. da. (2012). Assessment of the efficiency of essential oils in the preservation of postharvest papaya in an antimicrobial packaging system. *Brazilian Journal of Food Technology*, 15(4), 333–342. <https://doi.org/10.1590/S1981-67232012005000027>
- Flórez, C., & Mojica, J. (2019). *Determinación de la composición química de los aceites esenciales de Tomillo (Thymus vulgaris) y Romero (Rosmarinus officinalis) y su posible uso como antifúngico contra microorganismos fitopatógenos en productos agrícolas.* [Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca]. [https://repositorio.unicolmayor.edu.co/bitstream/handle/unicolmayor/287/1 para subir Determinacion de la composicion quimica de los AE y el efecto antifungico CD %281%29.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://repositorio.unicolmayor.edu.co/bitstream/handle/unicolmayor/287/1_para_subir_Determinacion_de_la_composicion_quimica_de_los_AE_y_el_efecto_antifungico_CD_%281%29.pdf?sequence=2&isAllowed=y)
- Gómez-López, A., Martínez-Bolaños, L., Ortiz-Gil, G., Martínez-Bolaños, M., Avendaño-Arrazate, C., & Hernández-Meneses, E. (2020). Bioaceites esenciales inhiben a *Moniliophthora roreri* (Cif. Y Par.) Evans et al., causante de la moniliasis en el cultivo del cacao. *Acta Agrícola y Pecuaria*, 6(1), 1–12. [https://redib.org/Record/oai\\_articulo3535983-bioaceites-esenciales-inhiben-a-moniliophthora-roseri-cif-y-par-evans-et-al-causante-de-la-moniliasis-en-el-cultivo-del-cacao](https://redib.org/Record/oai_articulo3535983-bioaceites-esenciales-inhiben-a-moniliophthora-roseri-cif-y-par-evans-et-al-causante-de-la-moniliasis-en-el-cultivo-del-cacao)
- Griffon, & Maubl. (1909). *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl. <https://www.gbif.org/es/species/2611222>
- Khan, M., Khan, S. T., Khan, N. A., Mahmood, A., Al-Kedhairi, A. A., & Alkathlan, H. Z. (2018). The composition of the essential oil and aqueous distillate of *Origanum vulgare* L. growing in Saudi Arabia and evaluation of their antibacterial activity. *Arabian Journal of Chemistry*, 11(8), 1189–1200. <https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2018.02.008>
- Kumar, V., Marković, T., Emerald, M., & Dey, A. (2016). Herbs: Composition and Dietary Importance. *Encyclopedia of Food and Health*, 332–337. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00376-7>
- Larios-Palacios, O. E., López-Vázquez, É. Y., Curiel Rodríguez, A., Ruíz-Espinoza, F. de J., Solano-Vidal, R., & Serrato-Cruz, M. Á. (2020). Evaluación in vitro de métodos contra *Botrytis cinerea*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícola*, 11(3). <https://cienciasagricolas.inifap.gob.mx/index.php/agricolas/article/view/2077/3209>

Lizcano Gonzales, M. C. (2007). *Evaluación de la actividad antifúngica del extracto de tomillo (Thymus vulgaris) contra Botrytis cinerea, Fusarium oxysporum y Sclerotinia sclerotiorum* [Pontificia Universidad Javeriana]. [https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/57367460/tesis100-with-cover-page-v2.pdf?Expires=1656306376&Signature=XZ3K1rL2d1U6felBqbNULdHu5LRYvyBdT1wrRpyI7~LflwPULVEG77c~xofWtNCIv~aDrExpGZrVek3Ine~tiVygOG2ZhHXeWDLN3ManDVcCwmYLPjb6m7U7Y8sgukrI6MGv8Xyf6xtV1P4YOWvvhNLEj3EGu27wJTW2E-bmKCRbu2RPxcMXgv-WiiQxjs3emVDKss405gMz7E2lvN0KsZg2aF7ShXSZBYaBqzJP56QUI0KI~m8so5pqqp1tiY~vKnUsVhR9INhO2b~ncNaiX2GM6sMu72RIHaUqVfXEjLh686zpbZW46z4HMfou2HeXI~BhiWFP1rZerS17SFUGbA\\_&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/57367460/tesis100-with-cover-page-v2.pdf?Expires=1656306376&Signature=XZ3K1rL2d1U6felBqbNULdHu5LRYvyBdT1wrRpyI7~LflwPULVEG77c~xofWtNCIv~aDrExpGZrVek3Ine~tiVygOG2ZhHXeWDLN3ManDVcCwmYLPjb6m7U7Y8sgukrI6MGv8Xyf6xtV1P4YOWvvhNLEj3EGu27wJTW2E-bmKCRbu2RPxcMXgv-WiiQxjs3emVDKss405gMz7E2lvN0KsZg2aF7ShXSZBYaBqzJP56QUI0KI~m8so5pqqp1tiY~vKnUsVhR9INhO2b~ncNaiX2GM6sMu72RIHaUqVfXEjLh686zpbZW46z4HMfou2HeXI~BhiWFP1rZerS17SFUGbA_&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA)

López, N., Miguel, M., & Aleixandre, ; (2012). Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud. *Nutr. Clín. Diet. Hosp*, 32(3), 81–91.

Lucas, J. A., Hawkins, N. J., & Fraaije, B. A. (2015). The Evolution of Fungicide Resistance. *Advances in Applied Microbiology*, 90, 29–92. <https://doi.org/10.1016/BS.AAMBS.2014.09.001>

MAG. (2013). *Plan estrategico institucional del MAG*. [https://www.agricultura.gob.ec/wp-content/uploads/2020/09/AM\\_068\\_PEI2.pdf](https://www.agricultura.gob.ec/wp-content/uploads/2020/09/AM_068_PEI2.pdf)

Martínez-Bolaños, L. (2012). *Resistencia a fungicidas en poblaciones de Mycosphaerella fijiensis del sureste mexicano*.

Martínez, A. (2001). Aceites esenciales. *Universidad de Antioquia*.

Montero-Recalde, M., Mira, J. C., Avilés-Esquivel, D., Pazmiño-Miranda, P., & Erazo-Gutiérrez, R. (2018). Eficacia antimicrobiana del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre una cepa de *Staphylococcus aureus*. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 29(2), 588–593. <https://doi.org/10.15381/RIVEP.V29I2.14520>

Moreira-Morrillo, A. A., Cedeño-Moreira, Á. V., Canchignia-Martínez, F., Garcés-Fiallos, F. R., Moreira-Morrillo, A. A., Cedeño-Moreira, Á. V., Canchignia-Martínez, F., & Garcés-Fiallos, F. R. (2021). *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maul [(sin.) *Botryodiplodia theobromae* Pat] en el cultivo de cacao: síntomas, ciclo biológico y estrategias de manejo. *Scientia Agropecuaria*, 12(4), 653–662.

<https://doi.org/10.17268/SCI.AGROPECU.2021.068>

Moutassem, D., Belabid, L., Bellik, Y., Ziouche, S., & Baali, F. (2019). Efficacy of essential oils of various aromatic plants in the biocontrol of Fusarium wilt and inducing systemic resistance in chickpea seedlings. *Plant Protection Science*, 55(3), 202–217. <https://doi.org/10.17221/134/2018-PPS>

Muñoz, L. (2019, November 10). *¿Cómo cultivar orégano?. Sembrar orégano en macetas | Guía completa*. <https://www.agrohuerto.com/sembrar-oregano-en-macetas-guia-completa/>

Muzzio Villafuerte, M. D., & Segovia Loor, K. M. (2021). *Bioprospección de especies con actividad antimicrobiana In vitro contra patógenos de cacao y banano* [ESPOL. FCNM]. <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/54379>

National Pesticide Information Center. (2021). *Control de plagas*. <http://npic.orst.edu/pest/index.es.html>

Patiño, L., Saavedra, A., Martínez, J., Patiño, L., Saavedra, A., & Martínez, J. (2014). Extracción por arrastre de vapor de aceite esencial del romero. *Facultad de Ciencias Tecnológicas*.

Perumal, A. B., Sellamuthu, P. S., Nambiar, R. B., & Sadiku, E. R. (2016). Antifungal activity of five different essential oils in vapour phase for the control of Colletotrichum gloeosporioides and Lasiodiplodia theobromae in vitro and on mango. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(2), 411–418. <https://doi.org/10.1111/IJFS.12991>

Picos Muñoz, P. A., García Estrada, R. S., León Félix, J., Sañudo Barajas, A., & Allende Molar, R. (2015). Lasiodiplodia theobromae en Cultivos Agrícolas de México: Taxonomía, Hospedantes, Diversidad y Control. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 33(1). [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092015000100054&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092015000100054&lng=es&nrm=iso)

Quintana-Obregón, E. A., Sánchez-Mariñez, R. I., Cortez-Rocha, M. O., & González-Aguilar, G. A. (2017). Actividad antifúngica in vitro de mezcla de terpenos de naranja contra Alternaria tenuissima. *Revista Mexicana de Micología*, 45(1), 7–12. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-31802017000100007](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802017000100007)

- Quiroga Ricardo, Rosales María, Rincón Patricia, Hernández Elizabeth, & Garrido Eduardo. (2007). Enfermedades Causadas por Hongos y Nematodos en el Cultivo de Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el Municipio de Villaflores, Chiapas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25(2). [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092007000200004](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092007000200004)
- Ramírez González, S., López Báez, O., Guzmán Hernández, T., Munguía Ulloa, S., & Espinosa Zaragoza, S. (2011). Actividad antifúngica in vitro de extractos de *Origanum vulgare* L., *Tradescantia spathacea* Swartz y *Zingiber officinale* Roscoe sobre *Moniliophthora roreri* (Cif & Par) Evans et ál. *Tecnología En Marcha*, 24(2), 3–17.
- Sandoval-Sánchez, M., Nieto-Ángel, D., Sandoval-Islas, J. S., Téliz-Ortiz, D., Orozco-Santos, M., & Silva-Rojas, V. (2012). Hongos asociados a pudrición del pedúnculo y muerte descendente del mango (*Mangifera indica* L.) Fungi associated to stem-end rot and dieback of mango (*Mangifera indica* L.). *Agrociencia*, 47(1).
- Shahbaz, M., Iqbal, Z., Saleem, A., & Anjum, M. A. (2009). Association of *Lasiodiplodia theobromae* with different decline disorders in mango (*Mangifera indica* L.). *Pak. J. Bot*, 41(1), 359–368.
- Vázquez-Covarrubias, D. A., Montes-Belmont, R., Jiménez-Pérez, A., & Flores-Moctezuma, H. E. (2013). Aceites Esenciales y Extractos Acuosa para el Manejo in vitro de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *F. solani*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 31(2), 170–179. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61231509008>
- Velázquez, M., Álvarez, R., Tamayo, P., & Carvalho, C. (2014). Evaluación in vitro de la actividad fungistática del aceite esencial de mandarina sobre el crecimiento de *Penicillium* sp. *Revista Corpoica, Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 15(1), 7–14. <http://www.scielo.org.co/pdf/ccta/v15n1/v15n1a02.pdf>
- Viera-Arroyo, W. F., Tello-Torres, C. M., Martínez-Salinas, A. A., Navia-Santillán, D. F., Medina-Rivera, L. A., Delgado-Párraga, A. G., Perdomo-Quispe, C. E., Pincay-Verdezoto, A. K., Báez-Cevallos, F. J., Vásquez-Castillo, W. A., & Jackson, T. (2020). Control Biológico: Una herramienta para una agricultura sustentable, un punto de vista de sus beneficios en Ecuador. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 8(2), 128–149. <https://doi.org/10.36610/J.JSAB.2020.080200128>

Yan, J., Zhang, J., Hu, C., Deng, L., & Ritenour, M. A. (2020). Use of carvacrol and thymol in shellac coating to control stem-end rot on 'Ruby Red' grapefruit and maintain fruit quality during simulated storage and marketing. *Scientia Horticulturae*, 272. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109606>

# APÉNDICES

# APÉNDICE A

Tabla A.1 Ciclos de destilación llevados a cabo para *Thymus vulgaris*

Día	Ciclo	Masa MP (g)	Agua (mL)	Tiempo (min)	Aceite (mL)	Hidrolato (mL)
3/6/2022	1	257.34	2500	80	0.5	1200
	2	256.64	2500	80	1.5	520
	3	256.99	2500	95	1.1	860
6/6/2022	1	248.47	2400	90	0.8	970
	2	252.29	2500	60	0.4	1000
	3	153.40	1500	60	0.4	550
<b>Total</b>	6	1425.13	13900	465	4.7	5100

Tabla A.2 Ciclos de destilación llevados a cabo para *Origanum vulgare*

Día	Ciclo	Masa MP (g)	Agua (mL)	Tiempo (min)	Aceite (mL)	Hidrolato (mL)
8/6/2022	1	149.48	1500	60	0.0	635
	2	150.43	1500	45	0.1	1300
	3	260.11	4000	120	0.8	1800
9/6/2022	1	249.56	2500	68	0.3	850
	2	249.65	2500	55	0.25	1280
20/6/2022	1	291.51	2900	60	0.3	750
<b>Total</b>	6	1350.74	14900	408	1.75	6615

Tabla A.3 Áreas miceliales medidas para los productos de destilación de *Origanum vulgare*

	Placa Petri	Día 1	Día 2	Día 3
<b>Control (Sin tratamiento)</b>	1	7.203	37.047	51.522
	2	7.063	25.62	50.801
	3	4.207	27.013	50.95
	4	4.565	28.225	52.211
	5	7.016	32.066	51.348
<b>Hidrolato (500000 ppm)</b>	1	3.510	17.620	33.510
	2	3.390	16.780	33.480
	3	3.450	15.900	31.330
	4	4.600	17.460	32.970
	5	3.740	16.940	32.750
<b>AE (2000 ppm)</b>	1	0.921	10.399	45.283
	2	0.916	11.551	48.166
	3	0.475	5.176	26.974
	4	0.466	6.223	34.324
	5	0.518	5.498	32.031

Tabla A.4 Áreas miceliales medidas para los productos de destilación de *Thymus vulgaris*

	Placa Petri	Día 1	Día 2	Día 3
<b>Control (Sin tratamiento)</b>	1	7.203	37.047	51.522
	2	7.063	25.62	50.801
	3	4.207	27.013	50.95
	4	4.565	28.225	52.211
	5	7.016	32.066	51.348
<b>Hidrolato (500000 ppm)</b>	1	0.000	0.000	0.000
	2	0.000	0.000	0.000
	3	0.000	0.000	0.000
	4	0.000	0.000	0.000
	5	0.000	0.000	0.000
<b>AE (2000 ppm)</b>	1	0.000	0.000	0.000
	2	0.000	0.000	0.000
	3	0.000	0.000	0.000
	4	0.000	0.000	0.000
	5	0.000	0.000	0.000

**Tabla A.5 Formato de recolección de datos de los experimentos**

Experimento	Concentraciones (ppm)		
	165000	2000	500000
<b>Experimento 1</b>	$X_{1,1}$	$X_{1,2}$	$X_{1,3}$
<b>Experimento 2</b>	$X_{2,1}$	$X_{2,2}$	$X_{2,3}$
<b>Experimento 3</b>	$X_{3,1}$	$X_{3,2}$	$X_{3,3}$
.....	....	....	...
<b>Experimento <math>n</math></b>	$X_{n,1}$	$X_{n,2}$	$X_{n,3}$

**Tabla A.6 Cálculos para realizar una tabla ANOVA de un factor**

Función de Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Prueba F
<b>Entre tratamientos</b>	$SC_{et} = \sum \frac{(x_i)^2}{n_i} - \frac{(\sum x)^2}{N}$	k-1	$\frac{SC_{et}}{g \cdot L}$	$\frac{CM_{entre}}{CM_{dentro}}$
<b>Dentro del tratamiento</b>	$SC_{dt} = SCT - SC_{et}$	N-K	$\frac{SC_{dt}}{g \cdot L}$	
<b>Total</b>	$SCT = \sum (x_i)^2 - \frac{(\sum x)^2}{N}$	N-1		

Figura A.1 Diagrama de cajas de las pruebas antifúngicas usando *Origanum vulgare*

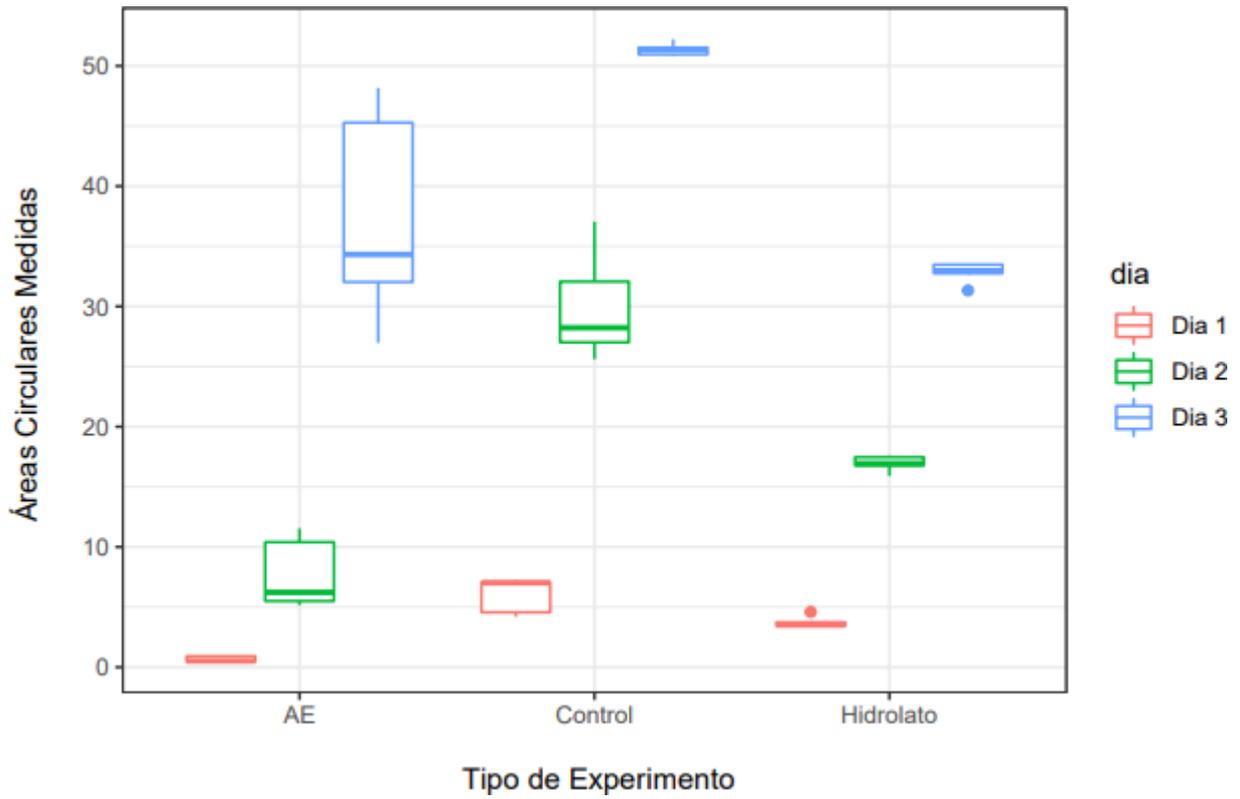


Figura A.2 Gráfico de interacción de medias de las pruebas antifúngicas usando *Origanum vulgare*

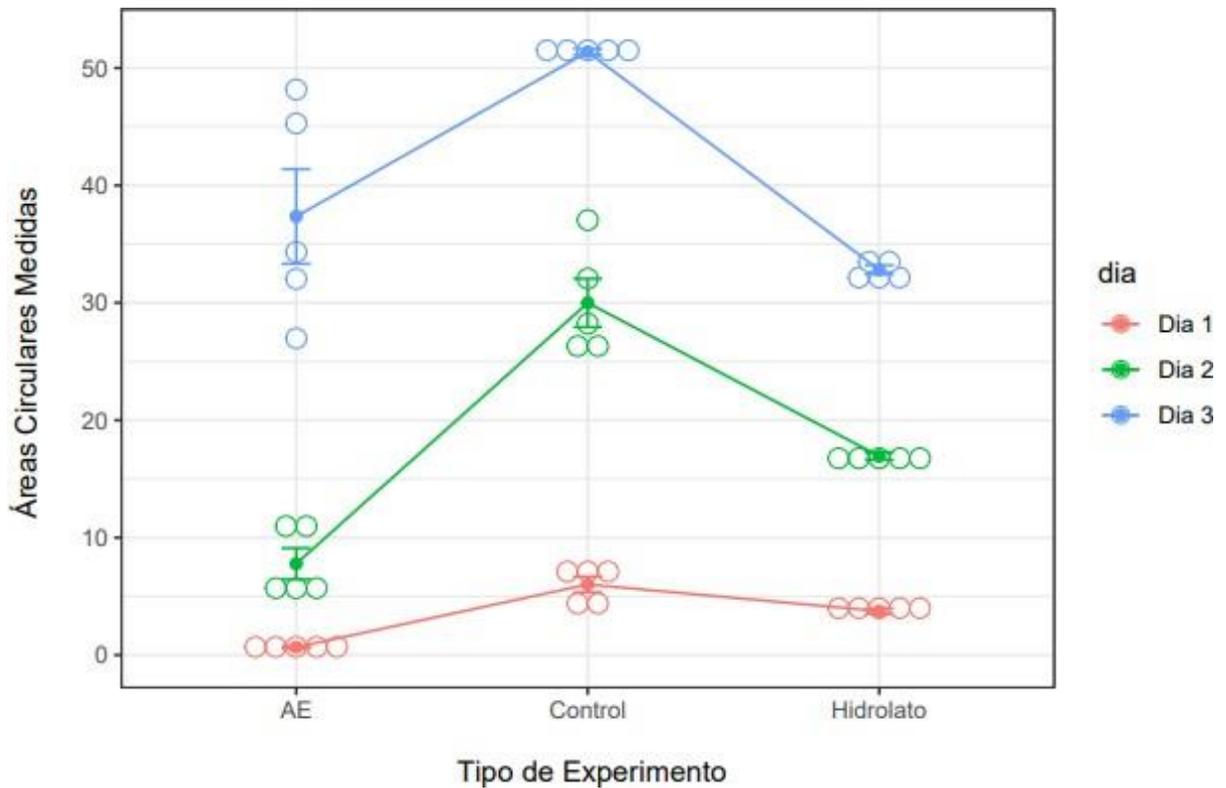


Figura A.3 Protocolo solicitado por el CIBE para la destilación de *Origanum vulgare* y *Thymus vulgaris* (1/5)



## Protocolo para destilación de aceite esencial de *Origanum vulgare* y *Thymus Vulgaris*

Tomalá Reyes Christopher José, Duarte Fasaguay Cinthya Gabriela

### REFERENCIAS

- Antezana Ruiz, B. F. (2017). OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL E HIDROLATO DE HERBABUENA (MINTHA SPICATA) (MEDIANTE EL PROCESO DE DESTILACIÓN POR ARRASTRE CON VAPOR) [Universidad Mayor De San Andrés]. [https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/13582/IEG-1911-Antezana Ruiz%20Bryan%20Fabian.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/13582/IEG-1911-Antezana%20Bryan%20Fabian.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Blanco, K. M., Castañeda, M. L., Reyes, J. A., Kouznetsov, V. V., Cárdenas, C. Y., Acevedo, A. M., & Stashenko, E. E. (2007). Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de TIMOL Y CARVACROL. *Scientia Et Technica*, XIII(33), 125–128. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84603329>
- Cáceres, M. B., Rizzo, V. F., & del Valle García, E. (2021). ESTUDIO DE LA CALIDAD DE ACEITES ESENCIALES DE ORÉGANO, TOMILLO Y ROMERO CULTIVADOS EN SEVERINO (EL CARMEN, JULIY) RECOLECTADOS EN INVIERNO Y PRIMAVERA. *Revista Científica FCA*, 14(1), 7–18.

### INTRODUCCIÓN

El *Origanum vulgare* es una especie vegetal que pertenece a la familia *Labiatae*, entre sus propiedades organolépticas destacan sus hojas con vellosidades y además sus flores de color púrpura. Esta planta produce sustancias volátiles que se recolectan en forma de gotas de aceite el cual se usa en la industria cosmética, farmacéutica y licorera. Pero se ha demostrado en varios estudios que el aceite de *Origanum vulgare* contiene compuestos aromáticos en su estructura. Entre estos podemos encontrar al  $\alpha$ -cimeno y  $\gamma$ -terpeneo, así como también los isómeros fenólicos timol y carvacrol. Estos compuestos poseen un gran potencial anti genotóxica, antifúngica y antimicrobiana. (Blanco et al., 2007)

La operación unitaria usada para obtener este aceite es la destilación y más en concreto la destilación por arrastre de vapor. Esta operación consiste en pasar una corriente de vapor de agua (100°C) en un lecho de materia prima, este vapor hincha las paredes de los tejidos de la materia vegetal facilitando que los compuestos volátiles se separen y se transfieran a la corriente de vapor. Las ventajas de este tipo de destilación sobre las de otro tipo son muchas, pero podemos mencionar es energéticamente más eficiente, se puede controlar la velocidad de la destilación y lo más relevante es su simplicidad de operación del sistema en cualquier escala. (Antezana Ruiz, 2017)

Figura A.4 Protocolo solicitado por el CIBE para la destilación de *Origanum vulgare* y *Thymus vulgaris* (2/6)



## MATERIALES

### Materia prima y reactivos

Cantidad	Descripción
15 Kg	Materia vegetal fresca ( <i>Origanum vulgare</i> )
150 L	Agua
1	Marquetas de hielo

### Equipos

Cantidad	Descripción
1	Balanza analítica CHAUS
1	Olla de destilación 55 L
1	Cocina industrial (1 puesto)
1	Embudo de decantación 500 mL
1	Trampa Clevenger 12 mL
1	Probeta 1000 mL
1	Bomba sumergible Q-1500
2	Manueras 3/4 (2 m)
2	Abrazaderas
1	Soporte universal
2	Nuez y pinzas
1	Balde o cooler
1	Aro de calentamiento
1	Beaker 250 mL
1	Tubo de ensayo
1	Refractómetro digital
1	Micropipeta
12	Puntas para micropipeta
1	Frasco vidrio ámbar
1	Recipiente Plástico (4 L)

## PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

La materia prima previo a la destilación tendrá un proceso de secado de al menos 7 días y máximo 14 días. El tipo de secado a llevar a cabo es natural bajo sombra, donde una corriente de aire pasa por encima de las especies retirando humedad presente en su estructura. Para esto, las plantas de la especie serán esparcidas en un sobre papel Kraft en un área de 10 m<sup>2</sup> cuidando que ninguna se sobreponga sobre otra. Las variables termodinámicas del secado serán las que rigen a la ciudad en la que se lleve a cabo este proceso. En Guayaquil, durante los meses de abril-agosto, la temperatura oscila entre los 25-27°C y la presión atmosférica se mantiene a 1 atm.

Se escogerá cierta cantidad de materia vegetal, la cual será pesada cada tres horas en una balanza analítica. Estos datos se tabularán y servirán para realizar la curva de secado de la especie. Una vez que la materia vegetal reporte por al menos 4 veces el mismo peso se retirará todo el lote que se haya puesto a secar para iniciar el proceso de destilación.

## Figura A.5 Protocolo solicitado por el CIBE para la destilación de *Origanum vulgare* y *Thymus vulgaris* (3/5)



### PROCEDIMIENTO

#### Armado del sistema de destilación

Conectar las dos mangueras 3/4 a la bomba sumergible y al condensador que viene incorporado en la olla de destilación. Para esto puede guiarse con la figura 1.



Figura 1. Equipo de destilación

Nota: Asegurarse de la unión de las mangueras al condensador con ayuda de las dos abrazaderas.

#### Purga del sistema

1. Cuantificar 800 mL de agua en la probeta de 1000 mL.
2. Depositar el agua dentro de la olla de destilación y cerrar esta con sus seguros.
3. Colocar la olla de destilación en la hornilla de la cocina industrial.
4. Colocar agua y hielo picado en el balde o cooler.
5. Colocar el soporte universal con el aro y el embudo en la salida del flujo del condensado.
6. Depositar la bomba sumergible en el recipiente ante mencionado y poner en marcha este equipo.
7. Encender la cocina industrial con una llama azul.
8. Esperar a que el flujo de condensado llegue un volumen tal que sea la mitad del volumen que se cargó en el punto 1.
9. Apague el sistema de destilación (Cierre la llave de paso de la cocina y apague la bomba)

Nota 1: Controlar que la temperatura del agua del balde o cooler no supere los 24°C

Nota 2: Esperar al menos 15 minutos para cargar la materia prima del siguiente apartado.

Nota 3: No desconectar ninguna manguera. El sistema debe seguir armado para el siguiente apartado.

**Figura A.6 Protocolo solicitado por el CIBE para la destilación de *Origanum vulgare* y *Thymus vulgaris* (4/5)**



#### **Destilación de aceite esencial**

1. Pesar 250 g de *Origanum vulgare* seco
2. Cuantificar 2000 mL de agua e introducirlos dentro de la olla de destilación post-purga.
3. Colocar el soporte de lecho de la olla
4. Cargar la materia prima pesada en el punto 1
5. Cerrar la olla de destilación con todos sus seguros.
6. Colocar el embudo de decantación en la salida de flujo de condensado.
7. Encender la bomba sumergible.
8. Encender la cocina industrial con una llama azul.
9. Esperar a que se recolecte 500 mL de destilado en el embudo. (Tiempo aproximado: 15-30 minutos)
10. Apagar el sistema de destilación. (Bomba sumergible y hornilla de la cocina)

Nota 1: El proceso antes descrito corresponde a un ciclo de destilación. Con la materia prima seca obtenida en la sección de preparación de la materia se puede hacer hasta 6 ciclos de destilación.

Nota 2: Si el hielo del cooler se deshizo en la purga del sistema colocar más para la esta etapa.

Nota 3: Usar guantes térmicos en toda esta etapa ya que los equipos se encuentran con temperaturas superiores a los 60°C.

Nota 4: Controlar que la temperatura del agua del balde o cooler no supere los 24°C, de pasar esta temperatura se recomienda retirar agua y colocar más hielo.

Nota 5: Retirar el soporte con el condensado del embudo luego de apagar el sistema.

Nota 6: Tener un recipiente y colocarlo a la salida del condensado, puede que al manipular el equipo siga saliendo liquido condensado.

#### **Separación de productos del destilado**

1. Colocar el soporte con el embudo en una superficie plana.
2. Colocar la trampa Clevenger de 12 mL (con liquido en cargada previamente) en la salida del embudo de decantación
3. Colocar un beaker de 250 mL a la salida de la trampa Clevenger para recoger el hidrolato.
4. Cuantificar el hidrolato separado una vez que el aceite se encuentre dentro de la trampa Clevenger.
5. Almacenar el hidrolato en un lugar sin luz y bajo refrigeración a 15°C.
6. Colocar el tubo de ensayo a la salida de la trampa y abrir la llave de paso.
7. Cuantificar el aceite esencial con la micropipeta.
8. Almacenar el aceite esencial en un frasco de vidrio ámbar de 10 mL en refrigeración a 4°C.

Nota 1: Esperar al menos 15 minutos luego del proceso de destilación o esperar a que se formen las fases dentro del embudo para iniciar la separación.

Nota 2: No olvidar que la trampa Clevenger debe tener liquido (9-10 mL aprox.) antes de iniciar la separación.

Nota 3: Hacer enjuagues al embudo con el hidrolato por al menos 3 veces al finalizar la separación para recolectar partículas de aceite que se hallan pegado a la pared del embudo.

Figura A.7 Protocolo solicitado por el CIBE para la destilación de *Origanum vulgare* y *Thymus vulgaris* (5/5)



## ANÁLISIS DE CALIDAD

### Densidad del aceite

1. Pesar un microtubo de ensayo vacío en la balanza analítica. ( $M_1$ )
2. Tomar una alícuota del aceite ( $V_1=0.2$  mL) con la micropipeta y colocar en el microtubo de ensayo.
3. Pesar nuevamente el microtubo de ensayo con el aceite y anotar el peso. ( $M_2$ )
4. Calcular la masa del aceite. ( $M_2=M_2-M_1$ )
5. Calcular la densidad del aceite. ( $M_2/V_1$ )

Nota: La densidad del aceite de *Origanum vulgare* se debe encontrar en el rango de [0.938-0.963] mg/mL. (Cáceres et al., 2021)

### Índice de refracción

1. Limpiar la superficie cristalina del refractómetro digital.
2. Tomar una alícuota del aceite (0.2 mL) con la micropipeta.
3. Colocar la alícuota en la superficie cristalina del refractómetro digital.
4. Tomar nota del valor del índice de refracción resultante.

Nota: El índice de refracción del aceite de *Origanum vulgare* se debe encontrar en el rango de [1.5020-1.5080] nD. (Cáceres et al., 2021)