



Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Química

Extracción de bioactivos de la semilla de cedro
(*Cupressus lusitanica*) con actividad antifúngica y su
incorporación en emulsiones

TESIS

Que para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químicas

Presenta:

I.Q. Lucia García Guzmán

Asesor Académico

Dra. Andrea Yazmin Guadarrama Lezama

Asesores Adjuntos

Dr. César Pérez Alonso

Dr. Julián Cruz Olivares

Toluca Estado de México, Noviembre 2019

RESUMEN

La contaminación en los alimentos, frutas y hortalizas, debida a hongos fitopatógenos ha representado una grave amenaza para la salud y la seguridad de los seres humanos y los animales. El objetivo del presente trabajo fue extraer los bioactivos de la semilla de cedro (*Cupressus lusitanica*) con actividad antifúngica y su incorporación en emulsiones con la finalidad de retardar su degradación y prologar su efecto inhibitorio contra *Botrytis cinerea* y *Aspergillus niger*. El aceite de semilla de cedro se extrajo mediante el método Soxhlet. Los disolventes usados para la extracción fueron hexano y etanol. El rendimiento del aceite de semilla de cedro (CSO) extraído con hexano fue más alto (11%-20.6% en p/p) con respecto a los obtenidos con etanol (6%-17% en p/p), esto debido a la alta selectividad del hexano por los componentes mayoritarios en los aceites esenciales (terpenoides) en comparación con el etanol.

Un análisis por cromatografía de gases-masas (GC-M) del CSO confirmó la presencia de monoterpenos (48.14%) y sesquiterpenos (33.34%) como los principales componentes. Se identificando 27 componentes en los extractos con hexano con un alto porcentaje en β -pineno, mirceno y α -terpineol. En los extractos obtenidos con etanol se identificaron 19 compuestos, los principales compuestos fueron ácido cummúnico, ferruginol, andrografolido y óxido de cariofileno. Los aceites de semilla de cedro fueron probados como antifúngicos capaces de inhibir la proliferación de *Botrytis cinerea* y *Aspergillus niger*, los cuales son hongos patógenos que contaminan diversos frutos y hortalizas. La inhibición del crecimiento micelial (MIC) de los extractos con hexano contra *Botrytis cinerea* mostraron una inhibición del 45% a una concentración de 300 μ L/mL, mientras que los extractos con etanol mostraron un 12% de inhibición a la misma concentración. En el caso de *Aspergillus niger* los extractos con hexano y etanol mostraron un 24% y 23% de inhibición respectivamente a una concentración de 500 μ L/mL siendo la concentración más efectiva para ambos extractos. Las diferencias encontradas en la MIC se deben a la sinergia de los compuestos presentes en los extractos.

El CSO extraído con hexano (H₂) que presentó los mejores resultados de inhibición, fue emulsionado para retardar su degradación y prolongar su efecto como antifúngico. La

Goma de mezquite (GM), Tween 80 (T) y la mezcla de ambos (TGM) fueron empleados como como material recubrimiento para el CSO.

El aceite emulsionado inhibió mejor con respecto al aceite puro. En este sentido las emulsiones con Tween 80, mostraron el mejor efecto antifúngico respecto a *Aspergillus niger* con un 66% inhibición, mientras que las emulsiones con la combinación de T-GM presentaron la mejor una mejor respuesta de inhibición contra *Botrytis cinerea* con un 54% de inhibición. Las observaciones de microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopia confocal laser de barrido (MCBL) revelaron que las emulsiones de CSO causaron considerables degeneraciones morfológicas de las hifas fúngicas, como el encogimiento de hifas, pérdida de protoplastos y la ruptura de la pared celular.

En este trabajo se puso de evidencia que el aceite extraído de la semilla de cedro presentó actividad antifúngica contra *Botrytis cinerea* y *Aspergillus niger*, siendo mejor inhibidor contra *Botrytis cinerea*. Además, al ser emulsionado el CSO aumento su dispersabilidad y mejoró sus propiedades antifúngicas contra *Aspergillus niger*. En este sentido, el aceite se semilla de cedro puede ser usado como un agente antifúngico para la inhibición de *Botrytis cinerea* y *Aspergillus niger*, los cuales son microorganismos patógenos que contaminan frutas y hortalizas durante su producción y almacenamiento.

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
DEDICATORIAS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
RESUMEN	II
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	2
I. MARCO TEÓRICO	4
1.1. Aspectos botánicos de la semilla de cedro (<i>Cupressus lusitanica</i>).....	4
1.2. Aceites esenciales.....	5
1.3. Extracción de aceites esenciales	6
1.4. Composición química de los aceites esenciales	8
1.4.1. Terpenos	9
1.4.2. Compuestos fenólicos	10
1.4.3. Clorofilas.....	11
1.5. Caracterización de aceites esenciales	11
1.5.1. Cromatografía en capa fina (TLC).....	11
1.5.2. Cromatografía de gases-acoplada a masas (CG-MS)	12
1.5.3. Determinación de compuestos fenólicos totales.	12
1.5.4. Capacidad antioxidante	12
1.5.4.1. Método ABTS	13
1.5.4.2. Método DPPH.....	13
1.6. Hongos patógenos en frutas y hortalizas	14
1.6.1. <i>Botrytis cinérea</i>	14
1.6.2. <i>Aspergillus niger</i>	15
1.7. Encapsulación de aceites esenciales.....	16
1.8. Caracterización de emulsiones.	18
JUSTIFICACIÓN	19

HIPÓTESIS	21
OBJETIVOS	22
Objetivo general	22
Objetivos específicos	22
II. MATERIALES Y MÉTODOS	23
2.1. Caracterización de extractos:	25
2.2. Capacidad antioxidante:	26
2.3. Evaluación de propiedad antifúngica.....	27
2.4. Formulación de emulsiones.....	28
2.5. Caracterización de emulsiones.	29
2.6. Análisis estadístico	32
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
3.1. Características fisicoquímicas de los aceites extraídos.	33
3.2. Características fisicoquímicas de las emulsiones.	42
3.3. Inhibición del crecimiento micelial de los hongos.....	49
3.4. Morfología de las hifas de los hongos en SEM	52
3.5. Microscopía confocal de barrido láser (MCBL)	54
3.6. Degradación de compuestos bioactivos en las emulsiones.....	56
IV. CONCLUSIONES.....	57
V. REFERENCIAS.....	58
VI. ANEXOS	73
Anexo 1: Composición química del aceite extraído con hexano	73
Anexo 2: Composición química del aceite extraído con etanol.	74
Anexo 3: Graficas del crecimiento micelial de Botrytis cinerea y Aspergillus niger	75
Anexo 4: Crecimiento micelial de los hongos con la adición de las emulsiones.....	81
Anexo 5: Composición química de las emulsiones de CSO.....	84

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 <i>Cupressus lusitanica</i>	4
Figura 2 Semillas y estróbilos de <i>Cupressus lusitanica</i>	5
Figura 3 Equipo de extracción soxhlet.....	7
Figura 4 Hifas y conidios de <i>Botrytis cinerea</i>	14
Figura 5 Conidióforos de <i>Aspergillus niger</i>	15
Figura 6 Diagrama de flujo de la metodología de evaluación de la actividad antifúngica de la semilla de cedro.....	23
Figura 7 Inhibición del crecimiento micelial de <i>Botrytis cinerea</i>	39
Figura 8 Inhibición del crecimiento micelial de <i>Aspergillus niger</i>	39
Figura 9 Emulsiones de aceite se semilla de cedro	43
Figura 10 Tamaños de gota de las emulsiones.....	44
Figura 11 Diámetros de las emulsiones	47
Figura 12 Hifas de <i>Botrytis cinerea</i> expuestas a emulsiones	53
Figura 13 Hifas de <i>Aspergillus niger</i> expuestas a emulsiones	54
Figura 14 Hifas de <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Aspergillus niger</i> expuestas a las emulsiones	55
Figura 15 Crecimiento micelial <i>Botrytis cinerea</i> con la adición de 100µL/mL de aceite.	75
Figura 16 Crecimiento micelial <i>Botrytis cinerea</i> con la adición de 300µL/mL de aceite	76
Figura 17 Crecimiento micelial <i>Botrytis cinerea</i> con la adición de 500µL/mL de aceite	77
Figura 18 Crecimiento micelial <i>Aspergillus niger</i> con la adición de 100µL/mL de aceite ..	78
Figura 19 Crecimiento micelial <i>Aspergillus niger</i> con la adición de 300µL/mL de aceite. .	79
Figura 20 Crecimiento micelial <i>Aspergillus niger</i> con la adición de 500µL/mL de aceite.	80
Figura 21 Crecimiento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Aspergillus niger</i> con la adición de las emulsiones de GM.....	81

Figura 22 Crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* y *Aspergillus niger* con la adición de las emulsiones de T.....82

Figura 23 Crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* y *Aspergillus niger* con la adición de las emulsiones la mezcla T-GM83

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Formulación de emulsiones aceite en agua28

Tabla 2: Propiedades físicas del aceite de cedro (*C. lusitanica*)33

Tabla 3: Composición del aceite de cedro extraído con hexano y etanol.....34

Tabla 4: Caracterización del aceite de cedro (*C. lusitanica*).....36

Tabla 5: Contenido de clorofilas del aceite de cedro (*C. lusitanica*).....37

Tabla 6: Propiedades físicas de las emulsiones de CSO42

Tabla 7: Tamaño de gota de las emulsiones de CSO44

Tabla 8: Potencial zeta (ζ) de las emulsiones de CSO.....48

Tabla 9: Inhibición del crecimiento micelial de los hongos50

INTRODUCCIÓN

Las pérdidas postcosecha en frutas y hortalizas durante el almacenamiento y distribución, es un factor importante, causando pérdidas económicas significativas debido a microorganismos patógenos, tales como los hongos *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium italicum* y *Botrytis cinerea*, causantes de enfermedades postcosecha más comunes.

Hoy en día, existe una creciente preocupación pública por los peligros para la salud y el medio ambiente asociados con el uso de pesticidas, los cuales han llevado al desarrollo de alternativas más seguras y métodos naturales en el control de enfermedades postcosecha. Entre las diversas alternativas, los productos naturales de plantas, incluidos los aceites esenciales que son compuestos volátiles producidos en muchas especies de plantas en las que se cree que desempeñan un papel en los mecanismos de defensa contra los fitopatógenos. Por ello se plantea en este trabajo la formulación de emulsiones conteniendo aceite de semilla de cedro (CSO) para la inhibición de hongos fitopatógenos. Se presenta en varias etapas: la extracción, caracterización, emulsificación y la evaluación del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de los hongos.

Esta tesis está estructurada en seis apartados en donde el primer apartado es la descripción de marco teórico en donde se desglosan los temas aplicados en este trabajo de investigación y abordan los conceptos fundamentales, en el segundo apartado se maneja la justificación y se exponen las razones principales del ¿Por qué? de este trabajo, la tercera parte es la hipótesis en donde describe el supuesto de la investigación y la metodología a emplear, en la sección cuatro desarrollan los objetivos tanto general como particulares en donde se organizan las métricas a cumplir y a desarrollar, en la sección cinco, se describe los materiales y métodos empleados para esta investigación siendo esta sección la parte de evaluación formulación y caracterización de las materias primas y las técnicas empleadas para la ejecución de la metodología, en el apartado seis analizan y describen los resultados obtenidos durante el proceso de evaluación y pruebas así como los diferentes análisis que se realizaron en diferentes laboratorios tanto internos como externos y en el séptimo apartado las conclusiones de cada resultado y eventos que suscitaron durante la pruebas y termina esta tesis con las referencias en las cuales sustentan la parte teórica y metodológica de cada prueba y resultado.

ANTECEDENTES

El género *Cupressus* de nombre común ciprés, es ampliamente cultivado como un árbol ornamental y como fuente de madera. Este género está representado por 30 especies perennes en todo el mundo, poseen diferentes propiedades farmacológicas, debido a su contenido de aceites esenciales, diterpenos, flavonoides y esteroides (Ibrahim et al., 2017, Ulukanli et al., 2014, Khouaja et al.).

Tal es el caso de *Calocedrus formosana* Florin cuyos componentes del aceite esencial (EO) de la hoja mostraron actividad contra cuatro hongos: *Lenzites betulina*, *Pycnoporus coccineus*, *Trametes versicolor* y *Laetiporus sulphurous*. Dos compuestos, el α -cadinol y el muralol, fueron los que mostraron la actividad antifúngica (Nuzhat and Vidyasagar, 2014). Por otro lado, la actividad antifúngica del aceite esencial de otro árbol conífero, *Chamaecyparis* también fue reportada por Singh et al. (2004), el componente principal acetato de bornilo, además, el aceite esencial de *Juniperus communis* L. mostro actividad contra las cepas de dermatofitos, *Aspergillus* y *Candida* (Singh, 2001).

Adams et al. (1997) estudiaron la composición química de los aceites extraídos de *cupressus lusitánica*, mostrando que contenían monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos conteniendo abietadieno como el principal componente. En contraste Floreani and Retamar (1982) encontraron α -pineno, β -pineno y 3- Δ -careno como los mayores componentes, mientras que Carmo and Frazão (1989) además de α -pineno, β -pineno y 3- Δ -careno encontraron mirceno. Sin embargo, Bett et al. (2016) realizó hidrodestilaciones de las hojas de *cupressus lusitánica* y encontraron que el principal componente extraído fue umbelulona y en menor proporción a α -pineno. Estos extractos mostraron efectos insecticidas y repelentes contra plagas de insectos de granos y semillas.

Se ha reportado que el OE de *Cupressus arizonica* presenta actividades biológicas importantes, a saber, actividad larvicida, actividad antimicrobiana y actividad antifúngica contra *Aspergillus flavus* (Khouaja et al.).

Kuiate et al. (2006) realizaron extractos hexanoicos de las hojas de *cupressus lusitánica* encontrando al α -pineno como el componente mayoritario, además de sesquiterpenos hidrocarbonados y diterpenos. En este estudio se evaluó la actividad antifúngica a concentraciones de 250 μ g/ml y 500 μ g/ ml contra *Microsporium audouinii*, *Microsporium Langeronii*, *Microsporium canis*, *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton tonsurans* mostrando

efectos fungicidas. Por otra parte Santos Filho et al. (2011) evaluó extractos de *cupressus lusitanica* obtenidos por hidrodestilación, entre los monoterpenos identificados destacaron β -pineno, β -(Z)-ocimeno y geraniol como monoterpeno oxigenado, sin embargo el aceite esencial de *cupressus lusitanica* mostró solo una actividad moderada contra el crecimiento de hongos endofíticos (Xylaria, Guignardia y Xylaria).

I. MARCO TEÓRICO

1.1. Aspectos botánicos de la semilla de cedro (*Cupressus lusitanica*).

La familia Cupressaceae o ciprés es una familia de coníferas distribuida mundialmente, particularmente en América del Sur, la cuenca del Mediterráneo y el norte de África, su diversidad comprende cerca de treinta géneros (Ibrahim et al., 2017, Chaves and Fonseca, 1991).

También es la familia de coníferas más importante en la horticultura moderna, los miembros de esta familia son importantes por su madera, resina, como plantas ornamentales y en plantaciones forestales comerciales en todo el mundo (Kuiate et al., 2006, Watt et al., 2009, Nuzhat and Vidyasagar, 2014).

En particular *Cupressus lusitanica* Mill es una planta de hoja perenne de rápido crecimiento que alcanza entre 25 a 30m de altura (Mamo and Sterba, 2006, Netzahuatl-Muñoz et al., 2012). Pertenece a la familia Cupressaceae, comúnmente llamada como “Ciprés Mexicano” o “cedro de Goa” (Cowan et al., 2001). Este árbol es una conífera nativa de México y América Central; sin embargo, se ha naturalizado ampliamente en todo el mundo donde se ha plantado como ornamental.

El árbol es monoico, siempre verde, resinoso y aromático, que puede crecer más de 30m de altura y hasta alcanzar 100cm de diámetro en el tallo (Figura 1). Posee ramas principales que surgen del tallo en forma normal y forman una capa densa y regular. Las hojas son numerosas, imbricadas, de color verde oscuro a glaucescente, ovaladas, agudas, de uno a dos mm de longitud, en forma de escama, colocadas en cuatro filas sobre las ramillas foliadas y con una glándula en el dorso (Chaves and Fonseca, 1991).



Figura 1 *Cupressus lusitanica* (Instituto de Biología UNAM, 2013)

Los conos o estróbilos femeninos de *Cupressus* son dehiscentes, casi esféricos, de 12 a 15mm de diámetro, constituidos por seis a ocho escamas leñosas, normalmente solitarias y cortamente pedunculados o sésiles, conteniendo de 75 a 120 semillas (Figura 2).



Figura 2 Semillas y estróbilos de *Cupressus lusitanica*.

El cono madura al segundo año de plantación y se torna duro y leñoso, adquiere un color café (marrón o castaño) y pueden transcurrir hasta dos años para que se abran. La fructificación se inicia a edad muy temprana (2 a 5 años) pero solamente después de 10 a 12 años, los árboles producen semilla de buena calidad.

Recientemente, se ha informado que el OE de esta especie tiene actividades biológicas (Chéraif et al., 2007); antioxidante (Emami et al., 2010), fungicidas (Bett et al., 2016), antifúngica (Falasca et al., 2016, Guleria et al., 2008) y antiviral (Emami et al., 2010).

1.2. Aceites esenciales

Los aceites esenciales (OE) son fluidos oleosos hidrófobos concentrados y aromáticos extraídos de varias partes de plantas como hojas, cáscaras, cortezas, raíz, rizoma, flores, yemas, semillas, maderas etc., que en general, como en la mayoría de los productos obtenidos de matrices biológicas, presentan una composición química compleja.

Los principales constituyentes de los aceites esenciales son los mono y sesquiterpenos, incluidos los carbohidratos, fenoles, alcoholes, éteres, aldehídos y cetonas responsables de la actividad biológica (terpenoides, fenilpropanos y fenólicos), así como de su fragancia (Tongnuanchan and Benjakul, 2014, Gutiérrez Galicia, 2016, de Matos et al., 2018, Prakash et al., 2018).

Los aceites esenciales suelen ser los terpenoides responsables del aroma y el flavor asociados con las hierbas, las especias y los perfumes, también llamados aceites volátiles porque se difunden fácilmente en el aire. Los podemos encontrar ampliamente distribuidos en: coníferas (pino, abeto, cedro), mirtáceas (eucalipto), rutáceas (cítricos), umbelíferas (anís, hinojo), labiadas (lavanda, menta) y compuestas (manzanilla) entre otras (García, 2015, Gutiérrez Galicia, 2016).

Se conocen más de 3000 tipos de aceites esenciales, de los cuales solo unos 300 son de interés comercial, estos se biosintetizan en diferentes partes de las plantas, luego se cosechan durante ciertas etapas de madurez características para cada planta, se almacenan en condiciones controladas de luz, temperatura y humedad y luego se someten a diferentes métodos de extracción(Dima and Dima, 2015).

1.3. Extracción de aceites esenciales

Los OE se obtienen a partir de materia prima vegetal mediante varios métodos de extracción(Dima and Dima, 2015, El Asbahani et al., 2015). Estos métodos podrían clasificarse en dos categorías:

Métodos convencionales/clásicos: Destilación, Hidrodestilación, producción orgánica, extracción por solventes y prensado en frío.

Métodos avanzados/innovadores: Extracción con fluidos supercríticos, Líquidos de extracción supercrítica, extracción asistida por ultrasonido o la extracción asistida por microondas.

La destilación es el método más antiguo y simple de extracción de aceites esenciales. Se puede aplicar en diversas opciones tecnológicas. La presencia o ausencia de agua en contacto con el material vegetal son las principales diferencias tecnológicas que nos da hidrodestilación, hidrodestilación de vapor y destilación de vapor. Sin embargo, los métodos mencionados anteriormente tienen algunas desventajas, como el alto consumo de energía, el largo tiempo de extracción (4-6 hrs), la extracción simultánea de otros componentes polares (cumarinas, pigmentos de plantas), la degradación de compuestos sensibles a la temperatura y la contaminación ambiental.

Extracción con disolventes: La extracción con disolvente de muestras sólidas, que comúnmente se conoce como extracción sólido-líquido es una de las técnicas más relevantes en el campo de la extracción ambiental. La muestra se coloca en un soporte para dedal que, durante la operación, se llena gradualmente con disolvente fresco condensado procedente de un matraz de destilación. Cuando el líquido alcanza un nivel de desbordamiento, un sifón aspira todo el contenido del soporte del cartucho y lo vuelve a descargar en el matraz de destilación, llevando los analitos extraídos en el líquido a granel.

Esta operación se repite hasta que se logra la extracción completa (de Castro and Ayuso, 2000, Raynie, 2000). Los disolventes más empleados son etanol, metanol, isopropanol, hexano, ciclohexano, tolueno, xileno, éter etílico, éter isopropílico, acetato de etilo, acetona y cloroformo. Los solventes se recuperan por destilación y pueden ser reutilizados (Hernández, 2011). En el caso del etanol se ha utilizado ampliamente en la extracción con disolventes polares debido a su baja toxicidad. Además, el etanol se clasifica como material biorenovable porque puede obtenerse de una gran variedad de materiales biológicos y es barato (Sbihi et al., 2018)

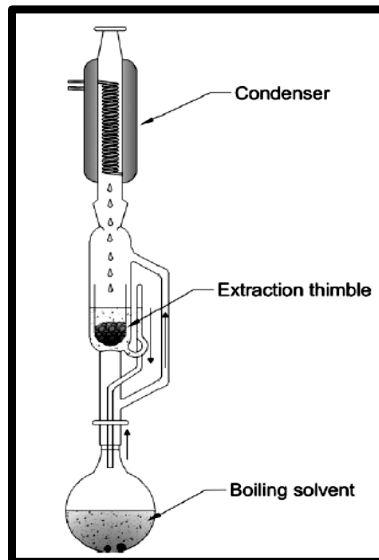


Figura 3 Equipo de extracción soxhlet

Extracción con fluidos supercríticos (EFS): Es una operación unitaria que aprovecha la capacidad de disolución de los fluidos supercríticos (FS) en condiciones por encima de su temperatura crítica (T_c) y presión crítica (P_c). Es posible obtener extractos libres de disolvente utilizando un FS y además la extracción es más rápida que con el uso de disolventes orgánicos convencionales. Estas ventajas se deben a la gran volatilidad de los FS (gases en condiciones ambientales normales) y de sus propiedades de transporte comparativamente mejores (es decir, alta difusividad y baja viscosidad). En el caso particular del dióxido de carbono CO_2 es posible efectuar el proceso de extracción a temperatura moderada y extraer selectivamente ciertos constituyentes minoritarios de productos naturales. Tal es el caso de la extracción selectiva con CO_2 de aceites esenciales, pigmentos carotenoides, agentes antioxidantes, antimicrobianos y otras sustancias relacionadas a partir de especias, hierbas y otras materias primas (Del Valle and Aguilera, 1999, Antunes-Ricardo et al., 2017).

Extracción de agua subcrítica (SWE) también conocida como extracción a presión de agua caliente (PHWE) o extracción a presión de agua de baja polaridad (PLPWE) es una nueva técnica utilizada para extracción de aceites esenciales donde se usa agua sobrecalentada, a temperaturas entre 100°C y 375°C a altas presiones (> 20 bar). En estas condiciones, la polaridad del agua disminuye debido a su constante dieléctrica disminuyendo hasta 14.86 (350°C y 250 bar) asegurando así la solubilización de los componentes no polares y su extracción de materiales vegetales. Generalmente, la SWE se usa principalmente en laboratorio y plantas piloto para obtener cantidades reducidas de aceites esenciales. Las ventajas más importantes de estas nuevas técnicas con respecto a las tradicionales son el reducido consumo de energía y el tiempo de extracción. La extracción de un número mucho mayor de componentes en mayor cantidad, evitando la degradación de componentes sensibles a la temperatura y la disminución de la contaminación ambiental.

Las nuevas técnicas de extracción también deben reducir los tiempos de extracción, el consumo de energía, el uso de disolventes y las emisiones de CO₂.

1.4. Composición química de los aceites esenciales

Los componentes químicos de los aceites esenciales se producen a través de tres vías diferentes de procesos de biosíntesis: vía de metil-eritritol para mono y diterpenos, la ruta de mevalonato para sesquiterpenos y el ácido shikímico para fenilpropanoides (Carson and Hammer, 2011). Más de 100 diferentes componentes en diversas proporciones (1-70%) se pueden encontrar en un solo tipo de aceite esencial.

Sin embargo, no existe una nomenclatura química sistemática para los compuestos químicos que se encuentran en los aceites esenciales. Sus nombres científicos se dan después de sus propiedades o fuentes de procedencia (por ejemplo, terpenos, limoneno, pineno, timol, etc.). En general, los compuestos químicos de EO se clasifican en terpenos, fenilpropanoides, compuestos de azufre o nitrógeno. En estos grupos se pueden encontrar compuestos cíclicos y acíclicos de diferentes clases, como alcoholes, ésteres, fenoles, cetonas, lactonas, aldehídos y óxidos (Dima and Dima, 2015).

También la composición de los aceites esenciales depende de la especie de la planta y de la subespecie de la que se extrajo, la parte de la planta utilizada para la ubicación

geográfica de la extracción, el tiempo de cosecha, las técnicas de extracción y los métodos de procesamiento.

1.4.1. Terpenos

El nombre genérico "terpeno" se aplicó originalmente a los hidrocarburos encontrados en la trementina, el sufijo "ene" que indica la presencia de límites olefínicos (Ludwiczuk et al., 2017). Los terpenos son una clase grande y variada de hidrocarburos, producidos sobre todo por una variedad amplia de las plantas particularmente coníferas. Los terpenoides, también conocidos como isoprenoides, son los productos naturales más numerosos y estructuralmente diversos.

Los terpenoides son quizá más conocidos como componentes principales de los aceites esenciales, que comprenden las fracciones destilables de vapor, hidrodestilación, o fracciones obtenidas por medio de tratamiento mecánico, responsables de la fragancia, esencia y olor característico de muchas plantas. Químicamente, los aceites esenciales terpénicos se pueden dividir en dos clases, los monoterpenoides y sesquiterpenoides, que difieren en su rango de punto de ebullición por ejemplo los monoterpenoides 140-180°C y los sesquiterpenoides a 200°C (Fichan et al., 1999, Fink, 2017). Muchos de estos terpenoides se consideran generalmente como seguros (GRAS) y se usan como aditivos alimentarios y como fragancias.

En general, los hidrocarburos monoterpenos tales como α - y β -pineno, limoneno, 3- Δ -careno y mirceno se encuentran como mezclas complejas en la mayoría de los aceites esenciales, particularmente en los obtenidos a partir de hojas de plantas, además se pueden usar como precursores en las biotransformaciones para producir terpenoides como el borneol, carvona y α -terpineol (van der Werf et al., 1997). Los aceites esenciales de flores y semillas tienden a tener presentes monoterpenoides más especializados (van der Werf et al., 1997, Ludwiczuk et al., 2017).

Los componentes químicos que se encuentran en aceites esenciales representan diferentes propiedades biológicas como antibacterianos, antifúngicos, anticancerígenos, antivirales, anti-mutagénica, antiprotozoarios, anti-inflamatorio, antidiabético o los antioxidantes (Dima and Dima, 2015, El Asbahani et al., 2015, Carson and Hammer, 2011). Varios compuestos en aceites esenciales tienen una estructura que imita a los fenoles vegetales bien conocidos con actividad antioxidante.

La mayor actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se observa en las bacterias gram positivas más que en las bacterias gram negativas. Los extremos lipofílicos de los ácidos lipoteicoicos en la membrana celular de bacterias gram positivas pueden facilitar la penetración de compuestos hidrófobos de aceites esenciales (Tongnuanchan and Benjakul, 2014).

Algunos aceites esenciales han mostrado actividad antifúngica ante diversos patógenos, como el aceite de tanacetum (*Tanacetum parthenium*) tuvo efectos fungistáticos (MIC 3.12% y 1.56%) y fungicidas (6.25% y 3.12%) contra *M. gypseum* y *T. mentagrophytes*, respectivamente (Kalemba and Kunicka, 2003).

Hay pocos factores fisicoquímicos a los que los aceites esenciales son sensibles, como el oxígeno, la luz, la temperatura o el pH. Por lo tanto, el oxígeno en presencia de luz conduce a la oxidación de los compuestos insaturados que resultan en radicales libres. Al almacenar a altas temperaturas pequeñas cantidades sueltas de EO de compuestos volátiles. Además, hay algunos componentes que son altamente inestables a variaciones de pH, como el citral, que se descompone fácilmente en un entorno ácido.

1.4.2. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos o polifenoles, son las sustancias que poseen un anillo aromático, unidos a uno o más grupos hidroxilo, incluyendo derivados funcionales (ésteres, glucósidos, etc.). Los flavonoides constituyen el mayor grupo de fenólicos vegetales, que representan más de la mitad de los ocho mil compuestos fenólicos naturales (Martins et al., 2011).

De acuerdo con el número de anillos fenólicos y los elementos estructurales que los unen entre sí, dan como resultado las principales clases de flavonoides, es decir, flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles, isoflavonas y antocianidinas. De manera similar a los flavonoides, los ácidos fenólicos constituyen también una clase importante de compuestos fenólicos con funciones bioactivas, que generalmente se encuentran en plantas y productos alimenticios. Los ácidos fenólicos se pueden dividir en dos subgrupos según su estructura: los ácidos hidroxibenzoico y hidroxicinámico (Vuolo et al., 2019, Martins et al., 2011).

Estos compuestos se sintetizan a partir de dos principales rutas metabólicas: la ruta del shikimato, la cual origina directamente fenilpropanoides como los ácidos hidroxicinámicos; y la ruta del acetato, la cual produce fenoles simples y algunas quinonas (Decker, 1997).

1.4.3. Clorofilas

Las clorofilas están distribuidas ampliamente en las frutas y verduras verdes como los pigmentos fotosintéticos principales, y son responsables del color de las plantas verdes. En la naturaleza, la clorofila a y b predominan en las plantas superiores, y la relación de clorofila a clorofila b en el cloroplasto es 3:1. Estructuralmente, las clorofilas están compuestas por un anillo de porfirina sustituido con un átomo de magnesio unido en el centro (Mg^{2+}) y una cola de fitol altamente esterificada e hidrofóbica ($C_{20}H_{39}$). La diferencia estructural entre las clorofilas a y b es que la clorofila a tiene un grupo $-CH_3$ en C_7 , mientras que la clorofila b tiene un grupo $-CHO$ (Kang et al., 2018).

Estudios previos han informado que tanto las clorofilas como sus derivados tienen actividad antioxidante (Kang et al., 2018). Por ejemplo, Ferruzzi et al. (2002) encontraron que los derivados de metalo-clorofila tenían una actividad antioxidante significativamente mayor que los derivados de clorofila libres de Mg^{2+} . Endo et al. (1985) y Hoshina et al. (1998) sugirieron que la estructura química de la porfirina es esencial para la actividad antioxidante de las clorofilas y sus derivados.

1.5. Caracterización de aceites esenciales

Se han desarrollado varios métodos analíticos espectroscópicos y cromatográficos para la caracterización de productos de plantas, que incluyen espectrometría de masas (MS), cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS), cromatografía líquida (LC), cromatografía en capa fina (TLC), alta cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y cromatografía de capa fina de alto rendimiento (HPTLC) para garantizar su calidad, eficacia y seguridad (Valle et al., 2016).

1.5.1. Cromatografía en capa fina (TLC)

La cromatografía en capa fina (TLC) es una forma de cromatografía de adsorción que consiste en un absorbente sólido (fase estacionaria) distribuido uniformemente sobre una superficie plana, generalmente hojas de aluminio o placas de vidrio. Es una técnica muy sensible para identificar compuestos orgánicos volátiles separados de productos naturales en función de sus valores de R_F (relación de frentes), usando sistemas solventes de

polaridad variable. R_F representa la distancia recorrida por el compuesto, con relación a la distancia por la fase móvil por lo que sus valores siempre oscilan entre 0 y 1 (Skoog et al., 2001).

1.5.2. Cromatografía de gases-acoplada a masas (GC-MS)

La cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS) es una combinación de dos técnicas microanalíticas: cromatografía de gases (GC), una técnica de separación y espectrometría de masas (MS), una técnica de identificación. Esta combinación tiene varias ventajas. En primer lugar, separa los componentes de una mezcla compleja para que los espectros de masa de los compuestos individuales puedan obtenerse con fines cualitativos; segundo, puede proporcionar información cuantitativa sobre estos mismos compuestos. La combinación GC / MS supera ciertas deficiencias o limitaciones causadas por usando cada técnica individualmente, por ejemplo, al usar MS solo para analizar una muestra impura, se obtienen espectros de masa superpuestos de dos o más compuestos; el resultado puede ser confuso, si no ininterrumpible. Por otro lado, el análisis de una muestra impura por GC/MS separará las impurezas del analito y permitirá que el espectro de masas de cada uno de los componentes se obtenga individualmente. El uso de GC solo puede conducir a resultados cuestionables debido a las ambigüedades al confiar únicamente en un índice de retención para la identificación de varios componentes de muestra (Roessner et al., 2000, Watson and Sparkman, 2007).

1.5.3. Determinación de compuestos fenólicos totales.

El método espectrofotométrico desarrollado por Folin y Ciocalteu, para la determinación de fenoles totales, se fundamenta en su carácter reductor y es el más empleado. Se utiliza como reactivo una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}). La absorbancia del color azul desarrollado se mide a 765 nm. Los resultados se expresan en mg de ácido gálico por 100 g de muestra.

1.5.4. Capacidad antioxidante

Alternativamente, diversos compuestos cromógenos (ABTS, DPPH, DMPD, DMPO y FRAP) son utilizados para determinar la capacidad de los compuestos fenólicos que contienen los frutos para captar los radicales libres generados, operando así en contra los

efectos perjudiciales de los procesos de oxidación, que implican a especies reactivas de oxígeno (EROS) (Kuskoski et al., 2005, Gonzalez Jimenez, 2010). Los métodos más aplicados son ABTS y DPPH. Ambos presentan una excelente estabilidad en ciertas condiciones, aunque también muestran diferencias.

1.5.4.1. Método ABTS

ABTS• (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina)-6 sulfonato de amonio): Se basa en la capacidad para atrapar radicales presentes en el medio. El radical catiónico de color verde azulado $ABTS^{•+}$ se genera por la interacción del ABTS con persulfato de potasio. El radical $ABTS^{•+}$ es un compuesto estable y soluble en metanol. Por lo tanto, se evalúa la capacidad antioxidante de la muestra en función de la habilidad para disminuir la concentración del radical (Pérez-Nájera et al., 2013).

1.5.4.2. Método DPPH

La molécula de 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (α,α -difenil- β -picrilhidrazilo; DPPH) se caracteriza como un radical libre estable en virtud de la deslocalización del electrón de repuesto sobre la molécula en su conjunto, de modo que la molécula no se dimeriza, como sería el caso con la mayoría de los demás radicales libres. La deslocalización del electrón también da lugar al color violeta profundo, caracterizado por una banda de absorción en solución de etanol centrada a aproximadamente 517nm. Cuando una solución de DPPH se mezcla con la de un sustrato (AH) que puede donar un átomo de hidrógeno, esto da lugar a la forma reducida con la pérdida de este color violeta. Con el fin de evaluar el potencial antioxidante a través de la eliminación de radicales libres por las muestras de prueba, se controla el cambio en la densidad óptica de los radicales DPPH (Alam et al., 2013).

El DPPH es un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa, mientras que el ABTS tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato potasio, ABAP) enzimática (peroxidase, mioglobulina), o también eletroquímica. Con el ABTS se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, mientras que el DPPH solo puede disolverse en medio orgánico. El radical $ABTS^{•+}$ tiene, además, la ventaja de que su espectro presenta máximos de absorbancia a 414, 654, 754 y 815nm en medio alcohólico, mientras que el DPPH presenta un pico de absorbancia a 515nm.

1.6. Hongos patógenos en frutas y hortalizas

En la agricultura mundial los hongos fitopatógenos son causantes de enfermedades de pre y poscosecha en los cultivos de hortalizas, cereales y frutas, siendo éstos responsables de pérdidas económicas cuantiosas; el daño que ocasionan no sólo se refiere a las pérdidas de producción económica, sino también a las pérdidas en la producción biológica, es decir, a la alteración que existe en el crecimiento y desarrollo de las plantas hospedantes atacadas por estos microorganismos (Juárez-Becerra et al., 2010).

Una amplia gama de hongos han sido caracterizados como causantes del deterioro patológico en una variedad de productos, siendo las más comunes especies de *Alternaria*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Botrytis* y *Aspergillus* (Martínez-Ruiz et al., 2016, Reyes Ramírez et al., 2012, Soldevilla et al., 2005).

1.6.1. *Botrytis cinérea*.

La podredumbre gris causada por el hongo *Botrytis cinérea*, considerado como uno de los principales patógenos que afecta al menos 235 especies de plantas, entre frutas y hortalizas. Infecta cualquier parte de la planta en cualquier estado de desarrollo, aunque la susceptibilidad al moho gris se incrementa con la edad o maduración. Se desarrolla bajo condiciones de elevada humedad relativa alta (93%) y temperatura de 0°C a 25°C (Elad, 1997).

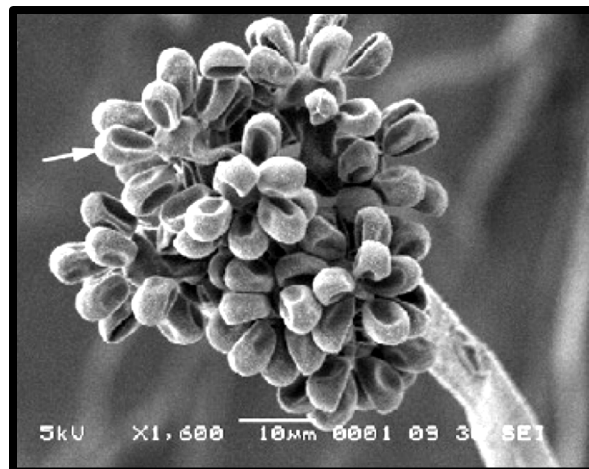


Figura 4 Hifas y conidios de *Botrytis cinerea* (Soylu et al., 2010)

Características morfológicas. Dentro de las estructuras morfológicas de la especie *Botrytis cinerea*, se puede destacar micelio, conidióforos, conidias y esclerocios. Por otro lado, existen compuestos pre-infeccionales y post-infeccionales con capacidad de inhibir el desarrollo de ciertos microorganismos, sin embargo se han presentado casos en el que la *Botrytis cinerea* ha desarrollado resistencia a algunos fungicidas convencionales, particularmente benzimidazoles y dicarboximidas (Poveda Parra, 2006), por lo cual una alternativa para el manejo integrado de este hongo es el uso de compuestos naturales producidos por algunas plantas, a los cuales se les atribuye propiedades antifúngicas, tal es caso de los isoflavonoides, diterpenoides, alcaloides, polipéptidos, estilbenos y aceites esenciales (Soylu et al., 2010).

1.6.2. *Aspergillus niger*

Los hongos del género *Aspergillus* se multiplican rápidamente sobre materia vegetal almacenada o en descomposición, son de interés agroalimentario (cereales, frutas, semillas, etc.), y esto se debe a su rápido crecimiento, tolerancia al pH ácido y alta abundancia en muchos entornos. Algunas de sus especies son fitopatógenas, tal es el caso de *Aspergillus niger*.

A. niger descrito como una especie por van Tieghem en 1867, es un hongo aeróbico muy extendido que crece en una gran variedad de sustratos. Produce varias enzimas extracelulares con importancia industrial importante, incluidas amilasas, proteasas, pectinasas, lipasas y quitinasas; también degrada las celulosas y las hemicelulosas. Por otro lado, es un gran productor de ácidos orgánicos, principalmente ácido cítrico (Parshikov and Sutherland, 2014, Reyes-Ocampo et al., 2013).

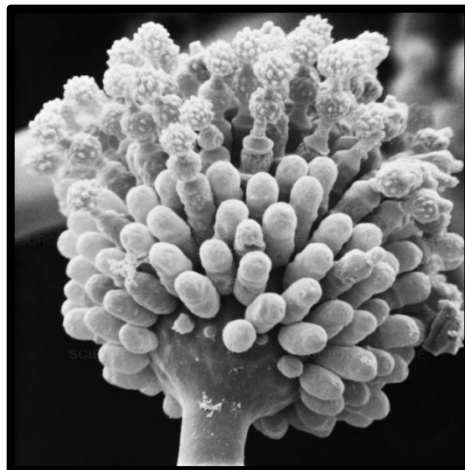


Figura 5 Conidióforos de *Aspergillus niger* (Saeed et al., 2018)

Aspergillus niger es la única especie común que es un patógeno grave, en algunas frutas y verduras. Esta especie puede crecer en plantas bajo condiciones de crecimiento desfavorables, como el estrés por sequía, que permite la infección en el desarrollo y, por lo tanto, la producción de aflatoxinas antes de la cosecha (Wucherpfennig et al., 2011, Taniwaki et al., 2018).

1.7. Encapsulación de aceites esenciales.

La encapsulación de aceites esenciales es una forma de protegerlos durante el almacenamiento, transporte y procesamiento. La encapsulación puede asegurar no solo la protección de EO contra diversos factores fisicoquímicos, sino también la protección del sabor, la preservación de su actividad biológica.

La microencapsulación es el revestimiento de una sustancia con un material encapsulante. Estas micropartículas conformadas por una membrana polimérica porosa poseen un tamaño aproximado que varía de 5 a 300 micras de diámetro contenedora de una sustancia activa, esta membrana, barrera o película está generalmente hecha de componentes con cadenas para crear una red con propiedades hidrofóbicas y/o hidrofílicas (Parra Huertas, 2010, Bustos-Garza et al., 2013, Esquivel - González et al., 2015).

Las microcápsulas pueden liberar sus contenidos a velocidades controladas bajo condiciones específicas (por acción mecánica, calor, difusión, pH, biodegradación y disolución), y pueden proteger el producto encapsulado contra diversos factores de degradación como la humedad, calor, luz y el oxígeno, permitiendo mejorar la estabilidad y aumento de vida útil del material encapsulado. Además, ayudan a que los materiales frágiles resistan las condiciones de procesamiento y empaque mejorando sabor, aroma, estabilidad, valor nutritivo y apariencia (Martins et al., 2014).

La selección de la técnica y el material de la envoltura depende de la aplicación final del producto teniendo en cuenta la estabilidad química, concentración, tamaño de partícula requerido, liberación mecanismo y costos de fabricación (Martins et al., 2014).

Los materiales usados como encapsulantes son, generalmente, formadores de película, flexibles, inodoros, insípidos y no higroscópicos. Usualmente, se emplean proteínas, carbohidratos, lípidos y gomas, como se mencionan a continuación.

Las proteínas tienen la capacidad de crear interfases y películas, debido a su naturaleza anfifílica. El tipo y la solidez de una interface dependen de las proteínas utilizadas para formar la emulsión. Ésta se ve influida por su composición de aminoácidos, así como por su temperatura de desnaturalización. Además, la buena solubilidad de las proteínas en agua es deseable cuando se utiliza un proceso en base acuosa.

Los carbohidratos son considerados buenos agentes de encapsulación debido a que presentan bajas viscosidades a alto contenido de sólidos, además de buena solubilidad. Pero como la mayoría de ellos carecen de propiedades tensoactivas necesarias para encapsular aceites, generalmente se los asocia con otros materiales, como proteínas o gomas.

Las grasas se han utilizado, principalmente, como un revestimiento secundario para mejorar las propiedades de barrera contra el agua, debido a su naturaleza hidrofóbica (Barrera et al.).

Numerosas técnicas han sido utilizadas para la microencapsulación de aceites marinos, vegetales y esenciales. Algunas de estas técnicas incluyen emulsificación (Arm 2016).

El procedimiento de encapsulación mediante emulsificación una técnica utilizada frecuentemente con agentes activos de alimentos solubles en agua (Sandoval-Peraza et al., 2017).

Una emulsión es una dispersión termodinámicamente inestable de dos líquidos inmiscibles, normalmente de naturaleza apolar y polar, generalmente agua-aceite, en la que uno de ellos forma gotas de pequeño tamaño (de 0,1 a 100 micras) que se denomina fase dispersa o interna y el otro, fase continua o externa. (Muñoz et al., 2007, Guadarrama-Lezama et al., 2012). Dependiendo de la naturaleza de las fases dispersa y continua, las emulsiones se clasifican como aceite en agua (O/W), agua en aceite (W/O) o múltiples tipo W/O/W y O/W/O.

En una emulsión O/W la fase dispersa consiste en pequeñas gotas de un líquido de naturaleza oleosa; es decir hidrófoba, y una fase continúa dominada por un medio normalmente acuoso. Como ejemplos de emulsiones O/W se pueden citar: leche, mayonesa, nata, abonos, fitosanitarios y herbicidas emulsionados, algunas salsas y emulsiones de algunos tipos de petróleo. Por el contrario en una emulsión agua en aceite (W/O), la fase dispersa es de naturaleza acuosa y la continua oleosa, de este tipo de

emulsiones son ejemplos: mantequilla, margarina, emulsiones para protección solar, algunas emulsiones de petróleo (Muñoz et al., 2007, Guadarrama-Lezama et al., 2012).

El término estabilidad de la emulsión es generalmente usado para describir la capacidad de resistir cambios en sus propiedades con el tiempo, hay una variedad de mecanismos fisicoquímicos responsables de las alteraciones en las propiedades de una emulsión alguna de las propiedades que se deben evaluar a las emulsiones son: Fracción volumétrica de la fase dispersa (ϕ) (Guadarrama-Lezama et al., 2012), Distribución del tamaño de partícula (Dickinson, 2017), Propiedades interfaciales (McClements, 2000), Carga de la gota (McClements, 2000, Dickinson, 2017), potencial Z.

1.8. Caracterización de emulsiones.

Tamaño promedio de gota. Las propiedades fisicoquímicas de las emulsiones están muy influenciadas por las características de las gotas que contienen; Por ejemplo, la estabilidad de una emulsión se ve fuertemente afectada por el tamaño de las gotas. Cuando todas las gotas en una emulsión tienen el mismo tamaño, la emulsión se denomina "monodispersa", donde la emulsión "polidispersa" se caracteriza por una amplia gama de tamaños de partículas (Portilla-Rivera et al., 2010).

Estabilidad al Cremado: El cremado y la sedimentación son formas de separación gravitacional, el cremado describe el movimiento ascendente de las gotas debido a una menor densidad del líquido circundante, mientras que la sedimentación describe el movimiento descendente de las gotas debido a una mayor densidad que el líquido circundante.

Potencial ζ : es una medida del potencial eléctrico en la superficie interfacial de las partículas suspendidas. Sus unidades son milivoltios (mV). Su variación respecto al pH indica valores de -30 a 30 mV como inestable y valores por debajo de -30 y arriba de 30mV, indican aumento en la estabilidad, siendo ésta, cada vez mayor conforme aumenta (de forma absoluta) el valor del potencial ζ . El valor del potencial ζ se ve marcadamente afectado por el pH de la emulsión, por el efecto de éste en la carga de las partículas.

JUSTIFICACIÓN

Se ha estimado que las pérdidas poscosecha de frutas y verduras en los países en desarrollo son de aproximadamente 30% a 50% o más (Singh and Sharma, 2018). Los géneros *Aspergillus* y *Botrytis* son los causantes de dichas pérdidas, ya sea que contaminen los sembradíos de frutas y hortalizas en campo o bien; ejerzan su efecto directamente sobre los frutos cuando estos se encuentran almacenados. Una de las nuevas tecnologías de control biológico, para la inhibición de dichos microorganismos, es la aplicación de aceites esenciales. En este sentido, se están evaluando nuevas fuentes de aceites esenciales obtenidos de plantas y árboles que contienen diversas sustancias químicas, estas son conocidas también como metabolitos secundarios. Algunos aceites esenciales se han utilizado como antibacterianos, antifúngicos, antivirales, antioxidantes. Esta capacidad antimicrobiana y antifúngica se debe en gran medida a la naturaleza hidrofóbica de los componentes presentes.

La ventaja que tienen los compuestos hidrofóbicos es que pueden interactuar con la membrana celular de microorganismos patógenos, causando su alteración, la fuga de sus componentes celulares y eventualmente su muerte. Aunque la actividad biológica de los aceites esenciales ha sido confirmada en muchos estudios, las diferencias en su efectividad se deben a su composición, a los factores genéticos de cada especie vegetal de donde son extraídos, así como a las condiciones climáticas en las que crecen dichas especies (Prakash et al., 2018). Por ello, es de sumo interés, la extracción, identificación y cuantificación de los constituyentes responsables de la actividad biológica de los aceites esenciales. Se ha encontrado que el aceite proveniente de la familia Cupressaceae posee capacidad antimicrobiana y antiviral, pero no se ha evaluado su potencial como agente antifúngico. Por ello es que en este trabajo se llevará a cabo un estudio de la extracción, identificación y cuantificación de componentes bioactivos de la semilla de cedro (*Cupressus lusitanica*) con la finalidad de identificar su potencial contra la inhibición del hongo *Botrytis cinérea* y *Aspergillus niger*.

Adicionalmente se sabe que los aceites esenciales son compuestos altamente volátiles y susceptibles a la oxidación, por ello es necesario diseñar sistemas en los que se vean disminuidos los efectos degradativos de los aceites. Una manera de retardar la oxidación es incorporando dichos aceites en matrices poliméricas para formar emulsiones estables y así se preserven sus características fisicoquímicas y antifúngicas, además de facilitar su

manejo y/o aplicación como agentes de fácil dispersión. Las emulsiones conteniendo el aceite esencial de la semilla de cedro podrían ser agentes de fácil aplicación como control biológico contra la proliferación de hongos patógenos en la producción y almacenamiento de frutas y hortalizas.

HIPÓTESIS

El aceite de semilla de cedro (*Cupressus lusitanica*) contiene compuestos bioactivos que han presentado actividad biológica por lo que una emulsión hecha con aceite de semilla de cedro inhibirá el crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* y *Aspergillus niger*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la actividad antifúngica del aceite de semilla de cedro (*Cupressus lusitanica*) e incorporarlo en una emulsión que preserve sus características fisicoquímicas y bioactivas, para inhibir el crecimiento de *Botrytis cinerea* y *Aspergillus niger*.

Objetivos específicos

Aplicar la técnica Soxhlet a las semillas de cedro para extraer los compuestos bioactivos por medio de hexano y etanol como disolventes.

Analizar la composición del aceite esencial de semilla de cedro por cromatografía de gases-acoplado a masas (CG-M) para diferenciar los componentes presentes en los diferentes extractos con hexano y etanol por efecto de las condiciones de extracción.

Cuantificar el contenido de compuestos fenólicos totales, clorofilas y capacidad antioxidante total en los diferentes extractos del aceite esencial de semilla de cedro.

Evaluar la actividad antifúngica de los extractos de aceite esencial de la semilla de cedro contra *Botrytis cinérea* y *Aspergillus niger*.

Formular emulsiones conteniendo aceites esenciales de semilla de cedro, para proporcionarles estabilidad ante la oxidación y preservar sus características antifúngicas.

Caracterizar fisicoquímicamente las emulsiones obtenidas con los extractos de aceite esencial de semilla de cedro.

Evaluar las propiedades antifúngicas de las emulsiones conteniendo el aceite esencial de la semilla de cedro.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

La Figura 6 representa el procedimiento para este trabajo. Se dividió en la extracción y caracterización del aceite esencial de las semillas de cedro.

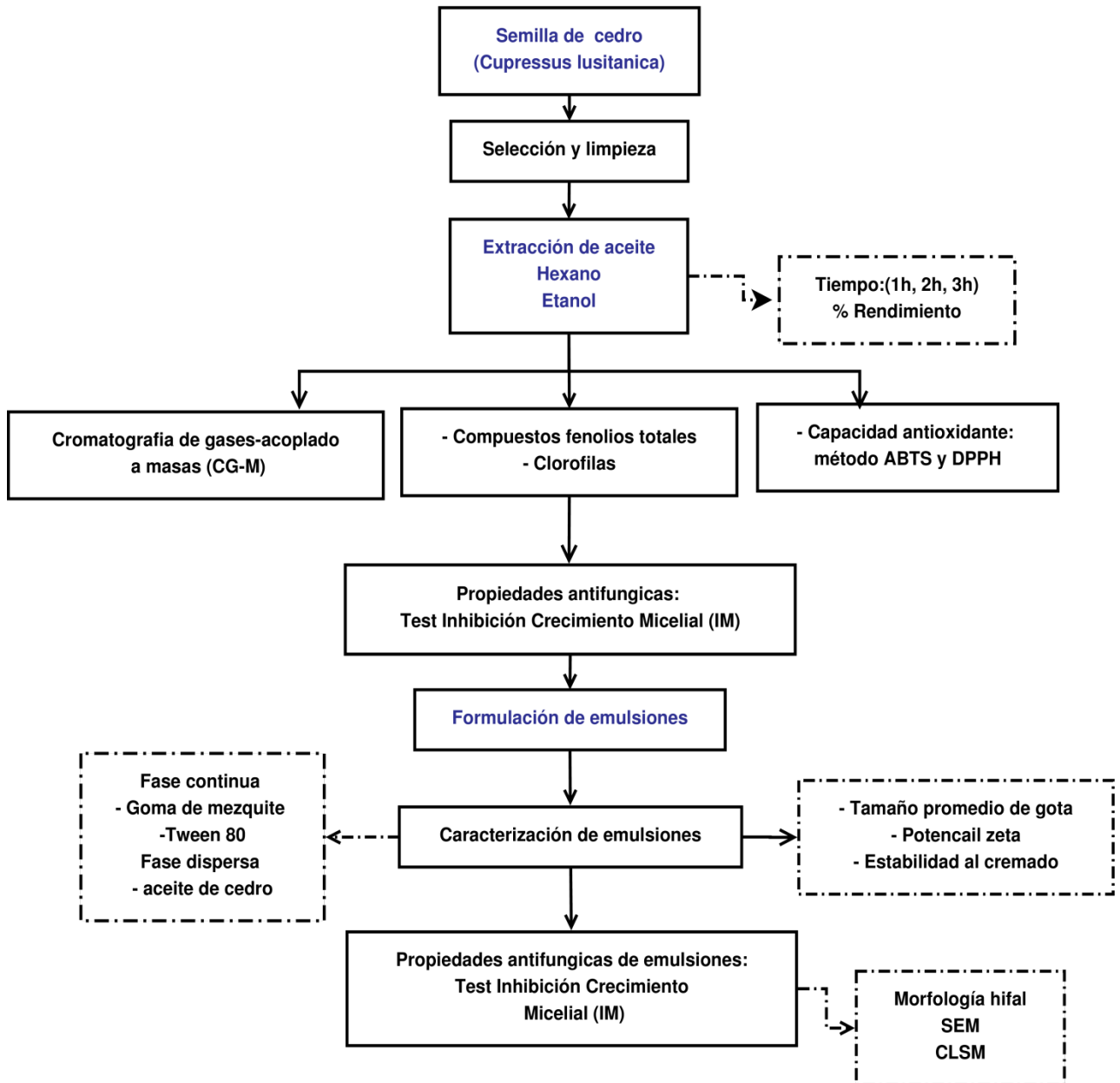


Figura 6 Diagrama de flujo de la metodología de evaluación de la actividad antifúngica de la semilla de cedro.

Posteriormente se formularon las emulsiones del aceite esencial de cedro usando goma de mezquite y Tween 80 como agentes emulsionantes; finalmente se evaluaron las

propiedades fisicoquímicas y antifúngicas de las emulsiones contra *Botrytis cinérea* y *Aspergillus niger*.

Materia prima Las semillas de *Cupressus lusitanica* (*C. lusitanica*) se recolectaron en la zona norte del Estado de México, México. La identificación de la especie fue realizada por el Dr. David S. Gernandt, del Herbario Nacional de México (MEXU) en el Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), con número de folio 1489470.

Botrytis cinerea se compró con Científica Senna S.A de C.V, México. La cepa fue identificada como 11542 número ATCC. El hongo *Aspergillus niger* fue donado por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM).

Selección y preparación de las semillas de cedro

Las semillas de cedro (*C. lusitanica*) fueron seleccionadas con la finalidad de excluir semillas en mal estado. Todas las semillas seleccionadas presentaban un diámetro entre 1.0 a 1.5 cm. Las semillas se lavaron con agua destilada para eliminar suciedad o partículas extrañas. Posteriormente, se secaron a 60°C en un horno de convección forzada durante 24 h para estandarizar su contenido de humedad (3% p/p). Las semillas limpias y secas se trituraron en un molino de martillos (Pulvex 200, México) para luego colocarlas en bolsas herméticamente cerradas y almacenarlas a una temperatura de -4°C hasta la extracción.

Extracción de aceite de cedro por el método Soxhlet.

La extracción de aceites se realizó utilizando un extractor Soxhlet, se colocaron 50 g de semillas secas en el dedal de extracción de celulosa (Whatman, General Electric, EE. UU.). Hexano y etanol fueron los disolventes utilizados para extraer el aceite de las semillas. En un matraz de tres bocas se adicionaron 300mL de disolvente, se llevaron a extracción por un tiempo de 60 min, 120 min y 180 min. Finalmente los aceites obtenidos con hexano (H₁, H₂, H₃) y etanol (E₁, E₂, E₃) a los respectivos tiempo de extracción, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se almacenaron en el refrigeración a 4°C hasta su posterior uso.

El porcentaje de rendimiento y la composición de los aceites se expresaron en g/100g de material de peso seco de semilla. El rendimiento de aceite extraído se calculó con la ecuación 1 de Salgin and Salgin (2013):

$$\text{Rendimiento} = \frac{m_{\text{aceite extraído}}}{m_{\text{semilla seca}}} \times 100\% \quad \text{Ecuación 1}$$

donde: $m_{\text{aceite extraído}}$: masa en gramos de aceite extraído, $m_{\text{semilla seca}}$: masa en gramos de semilla seca. Los resultados son expresados en % de rendimiento de aceite extraído.

2.1. Caracterización de extractos:

Índice de refracción, densidad y viscosidad.

El índice de refracción de los aceites fue determinado usando un refractómetro Atago modelo 131 RX-500 (Atago Co. Ltd., Tokyo, Japan). La densidad se determinó utilizando un picnómetro de marca Superior Marienfeld (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Alemania) de vidrio de borosilicato 3.3. DIN ISO 3507, tipo Gay-lussac. La viscosidad se determinó con un viscosímetro digital (RVDVII, Brookfield, EE.UU.).

Caracterización por cromatografía

La composición de los extractos se realizó con un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de espectrometría de masas selectivo (Shimadzu QP-2010) usando una columna capilar (HT-1 Zebron Inferno, Alemania) con el siguiente programa de calentamiento: la temperatura inicial se fijó a 55°C en 1 minuto, luego se aumenta a 10°C / min hasta alcanzar los 155°C y se mantiene durante 2 minutos a esta temperatura. Luego la temperatura se incrementó en una tasa de 10°C/min a 255°C y se mantuvo durante 5 min. El tiempo total para el análisis fue de 28 min.

Determinación de compuestos fenólicos totales.

El contenido de fenólicos totales se determinó usando el reactivo de Folin-Ciocalteu siguiendo la metodología propuesta por Guadarrama-Lezama et al. (2012). El reactivo de Folin fue diluido 10 veces en agua desionizada. Cada extracto no acuoso fue diluido en etanol en una relación 1:5, del cual 0.1mL se mezclaron con 0.75mL del reactivo de Folin diluido. Posteriormente, la solución se dejó incubar por 5 min, y se adicionan 0.75mL de una solución de bicarbonato de sodio (60 g/L) y se agitó. La mezcla fue incubada a temperatura ambiente por 90 minutos. Se determinó la absorbancia de la solución a

750nm y los datos son extrapolados a una curva estándar de ácido gálico. El contenido total de fenoles fue expresado como equivalentes de ácido gálico por mL de extracto (μg AG/mL extracto).

2.2. Capacidad antioxidante:

Capacidad antioxidante por método del radical ABTS.

La capacidad antioxidante fue determinada por medio del método del radical ABTS+ (Guadarrama-Lezama et al., 2012). El ABTS (2,2'-azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico), se disolvió en agua a una concentración 7mM y se hizo reaccionar con 2.45mM de persulfato de potasio (solución madre). La solución madre se dejó reposar entre 12 y 16 horas en ausencia de luz. Se colocaron 0.5mL de solución madre en un matraz volumétrico se aforo a un volumen total de 25mL con etanol anhidro, la solución obtenida presentó una absorbancia de 0.7 ± 0.02 , a una longitud de onda de 734nm. A 990 μL de reactivo estandarizado (solución de ABTS+), se adicionaron 10 μL de muestra (200 μL de aceite disuelto en 800 μL acetona) y se tomaron las lecturas de absorbancia en intervalos de 1 a 7min. En la determinación de la capacidad antioxidante de los extractos oleosos se realiza una corrección por efecto de la acetona.

El porcentaje de inhibición es calculado de acuerdo a la ecuación 2:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{[A_{S_{to}} - A_{S_{tf}}]}{(A_{S_{to}}) - \left[\frac{A_{D_{to}} - A_{D_{tf}}}{A_{D_{to}}} \right]} \times 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

donde: $A_{S_{to}}$ y $A_{S_{tf}}$: Es la absorbancia de la muestra a tiempo inicial y final, $A_{D_{to}}$ y $A_{D_{tf}}$: Es la absorbancia del disolvente a tiempo inicial y final. Los resultados fueron reportados como % de inhibición.

Capacidad antioxidante por el método DPPH.

La actividad antioxidante se determinó mediante el método de eliminación de radicales libres DPPH, de acuerdo con Brand-Williams (1995). Se añadieron alícuotas de 100 μL del extracto de cedro a 3.9mL de una solución metanólica al 80% de DPPH, seguido de agitación. La reacción se dejó en la oscuridad, a temperatura ambiente, durante 30 y 60

minutos, después de lo cual se midió la absorbancia a 515nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Científica vela Quin S.A. de C.V., México).

Los análisis se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como % de inhibición calculados mediante la ecuación 3.

$$\% \text{ Inhibición del radical DPPH} = \frac{A_{br} - A_{ar}}{A_{br}} \times 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

donde: A_{br} es la absorbancia antes de la reacción, A_{ar} es la absorbancia después de que ha tenido lugar la reacción.

Determinación de clorofilas de aceite extraído.

La determinación de las clorofilas se llevó a cabo a través del método espectrofotométrico propuesto por Marr et al. (1995). Cada muestra (aceite) se suspendió en una solución de acetona-agua al 80% (v/v) como disolvente extractor de pigmentos. Se agitó en un vortex y se dejó reposar en la oscuridad a 4°C durante 24h. Después, las muestras se llevaron a temperatura ambiente y se centrifugaron a 2700 rpm durante 5 min. La absorbancia del sobrenadante se midió a 663nm y 645nm, verificando que no había turbidez o partículas en suspensión. Como blanco, se utilizó acetona-agua. Para la cuantificación de las clorofilas se utilizaron las ecuaciones 4-6 propuestas por Mackinney (1941).

$$\text{Clorofilas totales } \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) = 20.2 A_{645} + 8.02 A_{663} \quad \text{Ecuación 4}$$

$$\text{Clorofilas a } \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) = 12.7 A_{663} - 2.69 A_{645} \quad \text{Ecuación 5}$$

$$\text{Clorofilas b } \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) = 22.9 A_{645} - 4.68 A_{663} \quad \text{Ecuación 6}$$

donde: C_a , C_b : Son las concentraciones de clorofila a y b respectivamente, A : Es la absorbancia medida.

2.3. Evaluación de propiedad antifúngica

Test Inhibición Crecimiento Micelial (MIC)

El efecto inhibitorio de los aceites se determinó utilizando el método de dilución en agar informado por Chen et al. (2014) que involucra la mezcla de aceites extraídos en diferentes concentraciones con el medio PDA. En este caso, se incorporaron

concentraciones de 100, 300, 500µL de aceites de semillas de cedro (CSO) en 20 mL de medio PDA. Luego, placas Petri de 90 mm de diámetro se llenaron con 25 mL de la mezcla (6 repeticiones por tratamiento) y se dejaron enfriar a temperatura ambiente (25 ± 2°C). Se usó PDA como control.

Un disco de PDA de 5 mm de diámetro que contenía los hongos (*Botrytis cinerea* y *Aspergillus niger*) se cultivó en el centro de una placa de Petri y se incubó a 25 ± 2°C. El crecimiento micelial se midió diariamente utilizando un vernier digital (ST-119-200, Weston Plus, México) para evaluar el diámetro alcanzado por el micelio a lo largo del tiempo. La prueba terminó cuando el micelio cubrió completamente la placa de Petri que contenía el tratamiento de control. Los resultados se informaron como índice de inhibición del crecimiento micelial (MIC), según la ecuación 7:

$$\text{MIC} = \left(\frac{C_C - C_T}{C_C} \right) * 100 \quad \text{Ecuación 7}$$

donde: C_C : denota el control del crecimiento, C_T : el crecimiento en el tratamiento.

2.4. Formulación de emulsiones.

La formulación para la elaboración de las emulsiones se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1: Formulación de emulsiones aceite en agua

Emulsion	Aceite de cedro (g)	Goma de mezquite (GM) (g)	Tween 80 (T) (g)
GM ₁	0.3	1.0	-
GM ₂	0.5	1.0	-
GM ₃	0.7	1.0	-
GM ₄	1.0	1.0	-
T ₁	1.0	-	0.3
T ₂	1.0	-	0.5
T ₃	1.0	-	0.7
T ₄	1.0	-	1.0
T-GM ₁	0.3	0.7	0.3
T-GM ₂	0.5	0.5	0.5
T-GM ₃	0.7	0.3	0.7
T-GM ₄	1.0	0.5	0.5

Para la realización de emulsiones aceite en agua (O/W) se siguió la técnica propuesta por Guadarrama-Lezama et al. (2012), en la cual se utilizó un exudado del árbol de mezquite (Goma de mezquite) y un surfactante no iónico (Tween 80) se disolvieron en agua destilada (fase acuosa) y se dejaron reposar 24 h, con la finalidad de lograr la completa rehidratación de los mismos. Posteriormente a la fase acuosa se adiciona el aceite

esencial de cedro (fase oleosa) gota a gota mientras se homogeniza durante 3min más a partir de que la fase oleosa se incorpora por completo.

2.5. Caracterización de emulsiones.

Capacidad de emulsión (EA) y estabilidad (ES)

Las propiedades emulsionantes se evaluaron mediante el método propuesto por Alpizar-Reyes et al. (2017). 10mL de cada emulsión se centrifugaron utilizando una centrífuga (Solbat P-60, Solbat S.A de C.V., México) durante 10 minutos a 5000 rpm. La capacidad emulsionante (EA) se calculó mediante la ecuación 8:

$$\% \text{ EA} = \frac{\text{Volumen emulsión}}{\text{Volumen total}} \times 100 \quad \text{Ecuación 8}$$

La ES se evaluó con un método similar al método de EA. Después de homogeneizar, las emulsiones se calentaron en baño de agua a 80°C durante 30 min, posteriormente se enfriaron a temperatura ambiente (20°C ± 2°C) y se centrifugaron durante 10min a 5000rpm. La capa emulsionada se midió y el ES se determinó mediante la ecuación 9:

$$\% \text{ ES} = \frac{\text{Volumen final emulsión}}{\text{Volumen inicial emulsión}} \times 100 \quad \text{Ecuación 9}$$

Todas las mediciones se realizaron por triplicado para cada emulsión

Tamaño promedio de gota

La distribución del tamaño de partícula de las emulsiones se midió según el método de (Prasanna et al., 2012). Brevemente, se utilizó un microscopio de luz (Carl Zeiss GmbH AxioCam ERc 5s, Carl Zeiss, Alemania) para examinar y fotografiar la emulsión con lentes objetivas de 100x. Se colocó un volumen de 10µL de emulsión en un portaobjetos de microscopio y se mantuvo durante 2 minutos para asentarse, posteriormente fueron observadas bajo el microscopio óptico. La distribución del tamaño de las gotas de aceite en un solo plano focal se determinó a partir de diez imágenes digitales de cada muestra utilizando el software Motic Images Plus 3.0 (Motic, Alemania). Los valores para el diámetro equivalente fueron determinados directamente por el software.

Estabilidad al cremado y coalescencia.

La estabilidad de las emulsiones se analizó utilizando el método propuesto por Prasanna et al. (2012), descrito en la sección anterior. Se utilizó un microscopio de luz (Carl Zeiss GmbH AxioCam ERc 5s, Carl Zeiss, Alemania) para examinar y fotografiar la emulsión con lentes objetivas de 100x. Esto permite dimensionar el cambio del tamaño de partícula de las emulsiones debido a fenómenos de coalescencia y/o floculación.

La separación por gravedad de las fases mediante sedimentación o procesos de formación de crema se midió según el método de Arancibia et al. (2017), donde se evaluó la altura de las emulsiones en un tubo falcón. Para las mediciones, se añadió un volumen de 10mL de diferentes muestras al tubo falcón de 15cm de alto y 1.5cm de diámetro y fueron almacenadas a una temperatura de 25°C durante 7 días.

Se calculó el índice de cremado según la ecuación 10 descrito por Arancibia et al. (2017):

$$\text{Índice de cremado (\%)} = \frac{H_s}{H_E} \times 100\% \quad \text{Ecuación 10}$$

donde: H_E es la altura total de la emulsión (mm) y H_s es la altura de la capa de crema (mm), que se midió visualmente en función del tiempo. Todas las mediciones se realizaron por triplicado para cada emulsión.

Eficiencia de encapsulación (EE)

La proporción encapsulada de aceite en las emulsiones se evaluó según el método propuesto por Guadarrama-Lezama et al. (2012). Se añadió 1 mL de cada emulsión con 4 mL de la mezcla hexano:isopropanol (3:1). La mezcla se agitó en un vórtex (Maxi Mix II, Barnstead Thermolyne, USA) durante 5 minutos y se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos. La mezcla de las fases de la emulsión fueron separadas utilizando una micropipeta y se colocó en un matraz de fondo redondo. El disolvente se evaporó a 50°C utilizando un rotavapor de vacío (Buchi R210-R215, Flawil, Suiza).

La eficiencia de encapsulación (EE) de CSO en emulsiones se obtuvo a partir de los contenidos de CSO de superficie y total de acuerdo con la ecuación 11:

$$EE (\%) = \frac{\text{Aceite total} - \text{Aceite superficial}}{\text{Aceite total}} \times 100 \quad \text{Ecuación 11}$$

Potencial zeta (ζ)

Las mediciones del potencial Zeta se determinaron utilizando un Zetasizer Nano Z (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido). El pH de las emulsiones (10 mL) se ajustó a un pH de 5.5 mediante la adición de una solución de HCl o NaOH (0.1 M) a 25°C. En el caso de CSO, se disolvieron 100 μ L de aceite en hexano y luego se ajustó el pH a 5.5.

Test de crecimiento micelial (MIC) de las emulsiones

El efecto inhibitorio de las emulsiones se determinó utilizando el método de dilución en agar como se informó en la sección 2.3. Para este propósito se añadieron 3 mL de cada emulsión en medio PDA (PDA-emulsión). Posteriormente un disco de PDA de 5 mm de diámetro que contenía los hongos (*Botrytis cinerea* y *Aspergillus niger*) se cultivó en el centro de una placa de Petri (PDA-emulsión) y se incubó a 25 \pm 2°C. El crecimiento micelial se midió diariamente utilizando un vernier digital (ST-119-200, Weston Plus, México) para evaluar el diámetro alcanzado por el micelio a lo largo del tiempo. La prueba terminó cuando el micelio cubrió completamente la placa de Petri que contenía el tratamiento de control.

Se prepararon controles positivos con una dispersión de agua destilada, Tween 80 y GM y la mezcla T-GM. Los resultados se informaron como índice de inhibición del crecimiento micelial (MIC), según la ecuación 7. Cada ensayo se realizó por triplicado.

Microscopía electrónica de barrido (SEM) en morfología hifal de hongos

El análisis SEM se realizó de acuerdo con el método propuesto por Chen et al. (2014). Se observaron materiales fúngicos de siete días de *Botrytis cinerea* y *Aspergillus niger* cultivados solo en medio PDA (control) y medio PDA con la adición de la emulsión más efectiva (en términos de efecto inhibitorio).

Para la preparación de las muestra se cortaron trozos de PDA conteniendo el hongo, los cuales fueron sumergidos por 24h a 4°C en una solución de glutaraldehído a una concentración del 3% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) de 0.1 mol /L a pH 7.2, como solución fijadora. Las muestras fijadas fueron tratadas con los siguientes pasos:

Cada muestra se enjuagó con PBS 1 mol /L (pH 7.2) tres veces durante 15 minutos. Las muestras fijadas se sometieron a una serie de procesos de deshidratación con etanol (20,

30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100% mL / L) durante 20 min. Después de la deshidratación, las muestras se secaron en su punto crítico (K850, Quorum Technologies Ltd, Reino Unido); finalmente, las muestras se recubrieron con una capa de oro/paladio mediante recubrimiento por pulverización catódica con una pulverización de iones y se escanearon y fotografiaron mediante SEM (JSM-7800F, JEOL, Japón).

Microscopía confocal de barrido laser (CLSM)

CLSM es una técnica no destructiva que permite la visualización y localización de estructuras y compuestos mediante fluorescencia. El daño en la morfología hifal de los hongos *Botrytis cinerea* y *Aspergillus niger* se examinó utilizando una microscopía de confocal de barrido láser (CLSM) (LSM 710 NLO, Carl Zeiss, Oberkochen, Baden-Württemberg, Alemania), con una lente objetivo de 20×0.8. Se colocó un pequeño cubo de PDA (4x2 mm) en un cubreobjetos antes del análisis, y se añadió una gota de tinte blanco calcofluor R (0.01%). La longitud de onda de excitación para isotiocianato de fluoresceína (FITC) fue de 405nm al 15% de transmitancia. La emisión se registró en un intervalo de 410nm-524nm y se obtuvieron imágenes de fluorescencia de las muestras con el software (ZEN, versión 8.0, Carl Zeiss, Oberkochen, Baden-Württemberg, Alemania).

2.6. Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron en muestras por triplicado y los valores se expresaron como valores medios \pm SD. El análisis estadístico se realizó a través del programa SPSS Statistics 19.0. Para determinar la diferencia estadísticamente significativa entre los valores, se realizó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba de Tukey. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a $p \leq 0.05$.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Características fisicoquímicas de los aceites extraídos.

Rendimiento, índice de refracción, densidad y viscosidad.

Se realizaron extracciones de aceite a partir de la semilla de cedro, usando hexano (H) y etanol (E) como disolvente, en tres diferentes tiempos de extracción: 1h, 2h y 3h.

El rendimiento del aceite cuando la semilla se encuentra en base seca es del 6% al 20.6%, se analizó la caracterización del aceite de cedro en cuatro categorías; el rendimiento dado en porcentaje, el índice de refracción, la densidad en g/mL y su viscosidad (cP). Estos resultados se encuentran en la Tabla 2, de los resultados más sobresalientes se tiene que el aceite extraído con hexano (H₃) y etanol (E₃) a 3h respectivamente, presento los siguientes rendimientos, para el caso del E₃ un 17% y un índice de refracción de 1.62, la densidad 0.88g/mL, su viscosidad de 800cP. Para el hexano H₃ se obtuvo 20.6% de rendimiento, el índice de refracción de 1.30, la densidad de 0.91 g/mL y la viscosidad de 1066 cP, esto puede ser atribuido a la elevada selectividad del hexano por terpenos presentes en los aceites esenciales y a la fácil recuperación de este, en comparación con el etanol (Ludwiczuk et al., 2017).

Tabla 2 : Propiedades físicas del aceite de cedro (*C. lusitanica*)

Extracto	Rendimiento (%)	Índice de refracción	Densidad (g/mL)	Viscosidad (cP)
H ₁	11.10 ± 3.53 ^a	1.37 ± 0.036 ^a	0.93 ± 0.026 ^a	800 ± 0.005 ^a
H ₂	11.19 ± 3.08 ^a	1.36 ± 0.018 ^a	0.90 ± 0.039 ^a	1000 ± 0.003 ^b
H ₃	20.60 ± 3.29 ^b	1.30 ± 0.051 ^a	0.91 ± 0.027 ^a	1066 ± 0.006 ^c
E ₁	6.10 ± 1.20 ^c	1.51 ± 0.054 ^b	0.86 ± 0.046 ^a	600 ± 0.001 ^d
E ₂	6.51 ± 1.35 ^c	1.58 ± 0.048 ^b	0.87 ± 0.052 ^a	800 ± 0.003 ^a
E ₃	17.10 ± 1.43 ^b	1.62 ± 0.029 ^b	0.88 ± 0.072 ^a	800 ± 0.001 ^d

H: Hexano, E: Etanol

El índice de refracción, la densidad y la viscosidad del CSO obtenidos fue similar a otros trabajos donde se evaluarón aceites y grasas extraídos de plantas, vegetales y coníferas (Francesconi et al., 2001, Comelli et al., 2002, Hong et al., 2004) .

Se han utilizado diferentes métodos, como la extracción con fluidos supercríticos, el arrastre de vapor, para extraer aceites de plantas, cortezas de plantas, hojas, flores y sus diferentes partes, pero los rendimientos son bajos. El intervalo de aceites extraídos por estos métodos se encuentra en el intervalo de 1-1.22% (Mun and Prewitt, 2011, Tumen et al., 2012). Por lo tanto, la extracción con disolvente sigue siendo uno de los métodos más usados, por presentar alta eficiencia y conservar las propiedades químicas, además de los disolventes usados (etanol, isopropanol) están certificados por directivas internacionales y sin presentar un impacto alto al medio ambiente. (Zhuang et al., 2018).

Composición química del aceite por cromatografía de gases acoplada a masas (CG-MS)

Las composiciones químicas de cada aceite de semilla de cedro, fueron analizados por GC/MS. Todos los extractos contenían principalmente monoterpenos y sesquiterpenos como se muestran en el anexo 1 y 2. En el caso de extractos obtenidos con hexano, se encontró una alta proporción de monoterpenos (48.14%) y sesquiterpenos (33.34%) en comparación con el etanol. Los monoterpenos encontrados son: β -pineno, β -mirceno, 3-careno, d-limoneno y oxido de cariofileno, mientras que dentro de los sesquiterpenos se encuentran: β -ocimeno, terpineol, cymenol, α -copaeno, etc.

Tabla 3 : Composición del aceite de cedro extraído con hexano y etanol

Componente	% Aceite extraído con Hexano	% Aceite extraído con Etanol
Triciclono	33.49	-
Ácido comúnico	20.05	40.86
3-careno	10.26	-
Andrografolido	7.70	10.96
Ferruginol	7.70	21.78
β -mirceno	2.18	-
β -pineno	1.33	1.49

En los aceites obtenidos usando etanol como disolvente fueron identificados 19 compuestos. Los principales compuestos individuales se muestran en la Tabla 3, algunos de estos fueron ácido cummúnico, ferruginol, andrografolido y óxido de cariofileno.

Se identificaron 27 compuestos en los aceites extraídos con hexano de los cuales sobresalen como triciclono, ácido cummúnico, ferruginol y β -mirceno. La abundancia relativa de algunos compuestos identificados en el aceite como, el cariofileno, β -pineno, D-limoneno y ferruginol, han sido reportada como agentes antifúngicos y antimicrobianos (Hong et al., 2004, De Alwis et al., 2009, Santos Filho et al., 2011, Bett et al., 2016).

Es importante mencionar que la composición química de los aceites extraídos difiere considerablemente dependiendo del disolvente utilizado para las extracciones, ya que el hexano ha mostrado tener fácil interacción con moléculas de resinas de pino y aceites esenciales. Otros factores que intervinieron en la composición de los extractos fueron: la polaridad, volatilidad, tiempos de extracción e isomerización de los compuestos durante la extracción.

Los datos de composición del CSO obtenidos con hexano reflejan un alto porcentaje en β -pineno, mirceno y α -terpineol en comparación con el CSO extraído con etanol, debido a las altas volatilidades de estos compuestos de terpeno (Fichan et al., 1999, De Alwis et al., 2009). Cuando los tiempos de extracción de aceites fueron prolongados; es decir a 2h y 3h a la misma temperatura, mostraron una ligera disminución en el porcentaje de compuestos. Esto se debe a la oxidación de algunos de ellos. Por ejemplo, se encontró cariofileno en extractos hechos con etanol y se encontró como óxido en comparación con extractos realizados con hexano, donde el óxido de cariofileno se identificó en porcentajes más bajos (anexo 1 y 2). Entonces, es posible decir que los compuestos presentes en las semillas de cedro se transformaron durante la extracción como los β -pineno, triciclono, compuestos bicíclicos, limoneno, entre otros, cuando se trataron en condiciones específicas de extracción. Por lo tanto, las diferencias en composición de los extractos fue evidente. A partir de la isomerización de terpenos (Ebmeyer, 2002, Mercier et al., 2009) es posible formar muchos isómeros derivados.

En los extractos obtenidos en este trabajo, el triciclono se encuentra en los extractos de hexano en un alto porcentaje (~30%), mientras que en los extractos obtenidos con etanol, el ácido cummúnico presentó el mayor porcentaje (~40%) con respecto a los otros compuestos. Uno de los principales compuestos identificados en el género *Cupressus* es el α -pineno.

Compuestos fenólicos, capacidad antioxidante y clorofilas.

Los resultados del contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos con hexano y etanol se muestran en la Tabla 4. Los CSO obtenidos con etanol (E) presentaron la mayor concentración de compuestos fenólicos con respecto a los obtenidos con hexano. Se encontró que a un tiempo intermedio de extracción (2h) el aceite E₂ obtuvo el máximo de compuestos fenólicos, sin embargo al aumentar el tiempo de extracción a 3h esta concentración disminuyó de 323 µg AG/g semilla a 182 µg AG/g semilla, esto puede ser atribuido a la termolabilidad de los compuestos fenólicos presentes en el aceite.

Para los CSO extraídos con hexano el contenido de compuestos fenólicos fue directamente proporcional a la temperatura de extracción, debido a que los compuestos fenólicos no son solubles en disolvente no polares y que por lo tanto requirieron un mayor tiempo de extracción (Pérez-Nájera et al., 2013, Gonzalez Jimenez, 2010).

Además esta diferencia puede atribuirse a la posible formación de productos como feofitinas y feoforbidos, que se derivaron de la exposición de la clorofila a 68±5° C durante la extracción con el hexano, lo que resultó en una aceleración de la oxidación del aceite y en la pérdida de algunos compuestos fenólicos (Can-Cauich et al., 2019).

Tabla 4 : Caracterización del aceite de cedro (*C. lusitanica*)

Extracto	Compuestos fenólicos (µg AG/g semilla)	Capacidad Antioxidante ABTS* (% Inhibición)	Capacidad Antioxidante DPPH* (% Inhibición)
H ₁	4.10 ± 0.70 ^a	96.28 ± 1.92 ^a	12.64 ± 0.03 ^a
H ₂	10.78 ± 0.013 ^b	60.44 ± 8.97 ^b	2.69 ± 2.31 ^b
H ₃	10.98 ± 0.62 ^b	51.26 ± 0.98 ^b	21.25 ± 0.41 ^c
E ₁	18.37 ± 0.10 ^a	89.32 ± 0.31 ^d	52.91 ± 0.08 ^d
E ₂	323.33 ± 19.3 ^b	94.36 ± 0.17 ^{a,d}	82.13 ± 1.40 ^f
E ₃	182.68 ± 8.11 ^c	74.58 ± 4.6 ^f	52.79 ± 0.07 ^d

H: Hexano, E: Etanol

La actividad antioxidante de los aceites extraídos con hexano y etanol se muestra en la Tabla 4. Para cada método de extracción, la actividad antioxidante del CSO fue medida con los ensayos DPPH y ABTS. El aceite extraído con etanol presentó un intervalo de inhibición de radicales libres superior al 50% para ambas técnicas, sin embargo el aceite extraído con hexano mostró una diferencia significativa en el % de inhibición de radicales libres para ambas técnicas, presentando un 96% de inhibición de radicales libres para la

técnica ABTS y solo un 21% inhibición de radicales libres con la técnica DPPH. Esta diferencia puede ser atribuida al tipo de radical utilizado en ambas técnicas, en el caso del radical ABTS* presenta mayor sensibilidad para medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica en a diferencia del radical DPPH (Kuskoski et al., 2005).

Además Pinelo et al (2004) informaron sobre la mayor capacidad antioxidante de extractos alcohólicos y la capacidad de estos extractos para eliminar los radicales libres, lo cual parece ser una tendencia general de los aceites esenciales que contienen hidrocarburos monoterpénicos, monoterpénos oxigenados y/o sesquiterpenos (Mercier et al., 2009) tal es el caso del CSO.

En el caso de los CSO extraídos con hexano mostraron una tendencia decreciente en el % de inhibición del radical ABTS, a medida que aumentó el tiempo de extracción menor fue el %inhibición, esto pudo deberse a termolabilidad de los compuestos presentes en el CSO.

El aceite obtenido bajo diferentes condiciones de extracción mostró un color verde a amarillo brillante. El color observado se debió al contenido en clorofilas en los CSO. Los valores de clorofilas se reportan en la Tabla 5.

Tabla 5 : Contenido de clorofilas del aceite de cedro (*C. lusitanica*)

Extracto	Clorofilas a	Clorofilas b	Clorofilas totales (mg/g semilla)
H ₁	69.44 ± 0.76 ^a	70.80 ± 0.25 ^a	140.20 ± 5.33 ^a
H ₂	9.48 ± 0.45 ^b	35.06 ± 0.23 ^b	44.53 ± 6.14 ^b
H ₃	79.31 ± 0.84 ^c	19.84 ± 0.36 ^c	99.14 ± 0.50 ^c
E ₁	175.13 ± 0.64 ^d	205.37 ± 0.85 ^d	380.30 ± 0.21 ^d
E ₂	44.37 ± 0.35 ^f	60.76 ± 0.36 ^f	105.10 ± 0.52 ^f
E ₃	15.37 ± 0.68 ^g	34.64 ± 0.76 ^a	50.35 ± 0.17 ^b

H: Hexano, E: Etanol

El aceite extraído con hexano (H₁) obtuvo 140.20mg/g de clorofilas totales y para el aceite extraído con etanol (E₁) obtuvo un valor máximo de 380.30mg/g de clorofilas totales. En ese caso, el aceite extraído con etanol presento el valor más alto en clorofilas totales; este valor puede ser atribuido a que el etanol presenta mayor afinidad por las clorofilas (Sbihi et al., 2018).

Además, el tiempo de extracción fue un factor que influyó en la cantidad de clorofilas totales encontradas, a medida que aumentó el tiempo de 2h a 3h el contenido de clorofilas totales disminuyó, este comportamiento fue reportado por dos Reis et al. (2015) en el que a tiempos bajos de extracción, mayor fue la cantidad de clorofilas obtenidas.

En este contexto la actividad antioxidante del CSO (H_1 y E_1) también puede ser atribuida a la cantidad de clorofilas encontradas en ambos aceites (Zhang et al., 2019, Cervantes-Paz et al., 2014) y no solo a los compuestos fenólicos presente en ellos.

Inhibición del crecimiento micelial *Botrytis cinerea* y *Aspergillus niger*

En el Anexo 3, se muestra el crecimiento micelial de los hongos *Botrytis cinerea* y de *Aspergillus niger* con la adición de 100 μ L, 300 μ L y 500 μ L de aceites de semilla de cedro, el cual fue evaluado en un período de 6 a 7 días respectivamente. Se observó un crecimiento lineal que representa un valor máximo de inhibición en el 3 y 4 día de crecimiento para ambos hongos.

Las concentraciones de 100 μ L, 300 μ L y 500 μ L del aceite tuvieron la capacidad de inhibir el crecimiento de *Botrytis cinerea* y *Aspergillus niger*, ya que los hongos mostraron un crecimiento ligeramente más lento en comparación con las placas de control, incluso para las concentraciones más bajas de aceite (~20% *B. cinerea* y ~5% *A. niger*).

En la Figura 7 se muestra la inhibición del crecimiento micelial al sexto día, el cual fue tomado como límite del experimento, se tiene que el porcentaje de inhibición más alto lo presentó el aceite extraído con hexano (H_1) a 300 μ L con un 45.4% de inhibición. Este comportamiento sugiere que los compuestos bioactivos contenidos en los aceites afectan el crecimiento inicial de los hongos, lo que confirmaría su efecto fungistático. En el caso del CSO extraído con etanol, los porcentajes de inhibición para ambos hongos fueron más bajos (~20%) en comparación con los extractos obtenidos con hexano (~45%) a las mismas concentraciones analizadas. El CSO obtenido se probó a concentraciones de 100 μ L, 300 μ L y 500 μ L, ya que a concentraciones más bajas (2-100 μ L) mostraron un efecto inhibitorio mínimo (~5%).

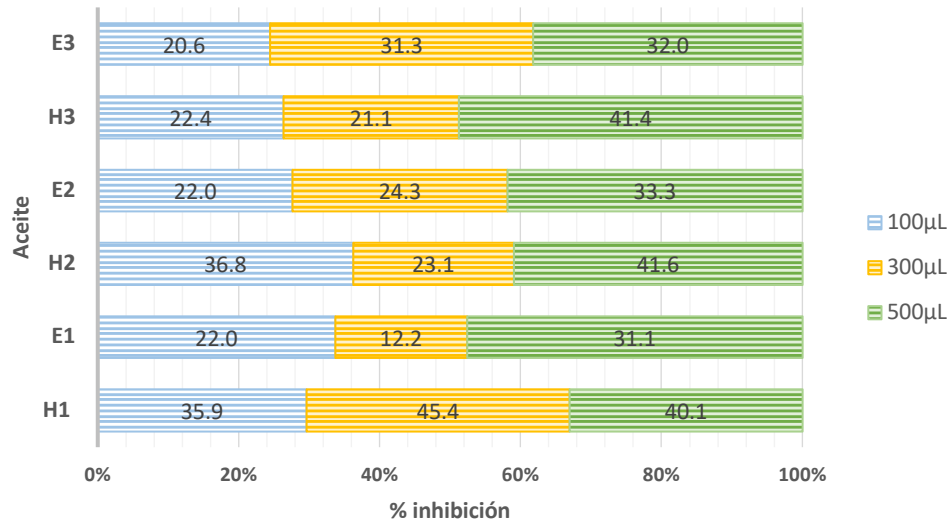


Figura 7. Inhibición del crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* en el sexto día con la adición del CSO.

A la concentración de 300µL de CSO con hexano (H₁) se produce la inhibición más alta del hongo *Botrytis cinerea*, mientras que para *Aspergillus niger* no se mostró una diferencia significativa cuando se usaron 300µL y 500µL de concentración (~ 24%).

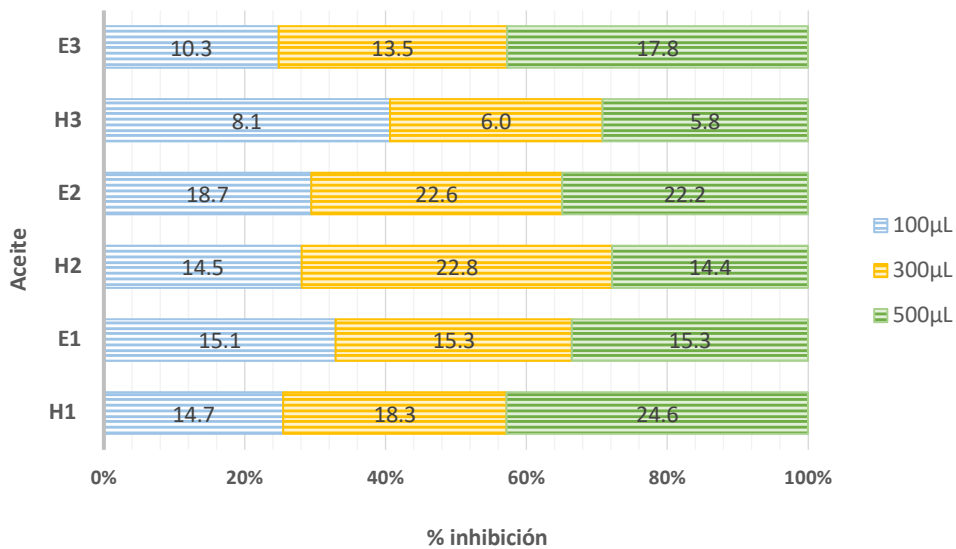


Figura 8. Inhibición del crecimiento micelial de *Aspergillus niger* en el sexto día con la adición del CSO.

Las diferencias encontradas en la inhibición contra hongos se deben a los compuestos químicos contenidos en los aceites. De acuerdo a los resultados obtenidos se puede decir que el efecto inhibitorio se debe a la sinergia de los compuestos químicos contenidos en el aceite y no al efecto de un solo componente. Filipowicz et al. (2003), encontraron que el

α -pineno, el α -cedrol y el β -cariofileno tienen un efecto sinérgico sobre la inhibición fúngica (Filipowicz et al., 2003, Yu et al., 2015, Falasca et al., 2016, Rguez et al., 2018). Por lo tanto, se puede afirmar que los componentes contenidos en CSO tuvieron un efecto sinérgico en la inhibición del crecimiento en ambos hongos. El efecto inhibitorio de los hongos fue mayor en H₁, donde los componentes principales con actividad antifúngica difieren del resto de las muestras de aceites (H₂ y H₃), estos se puede ver en el Anexo 1, siendo β -pineno, careno, β -mirceno, limoneno y cariofileno los más representativos.

Se ha encontrado que existen diversos mecanismos en la inhibición de los hongos por efecto de aceites esenciales. El mecanismo involucrado relaciona principalmente de dos maneras: a) Por inducción de modificaciones estructurales en las células de la pared que afectan a la morfogénesis de las hifas y los adultos, y b) la degradación y/o difusión de sus compuestos químicos como la inhibición de la síntesis de ergosterol y la captación de esteroides (Grande-Tovar et al., 2018).

Se han propuesto algunos mecanismos, como la posibilidad de que los terpenos puedan aumentar la concentración de peróxidos lipídicos y provocar la muerte celular, o que puedan actuar sobre las hifas del micelio, induciendo la filtración de componentes del citoplasma y, por lo tanto, muerte del micelio (Falasca et al., 2016). Por otro lado, la adhesión es un requisito previo importante para la patogénesis de las infecciones por hongos. Como las células fúngicas deben conservar su estructura y tener una capa superficial fibrosa adecuada para adherirse a las células, cualquier sustancia que altere su estructura también puede alterar su adhesividad.

La capacidad previamente demostrada de los monoterpenoides para disminuir la adhesión de hongos de moho a muchos materiales ha sido reportada por German (2005) y Nikitina et al. (2012). En este contexto, los derivados de careno tienen altos niveles de actividad antifúngica debido al efecto de adhesión para hacer patogénesis.

Todas las muestras de CSO que contienen careno (7.76%-10.26%) presentaron una mejor inhibición contra los hongos. Sin embargo, es posible que la actividad antifúngica se reduzca por la oxidación de careno. Nikitina et al. (2012) informaron que la actividad antifúngica contra *Aspergillus niger* era débil en presencia de compuestos derivados (óxidos) de careno. Los extractos de CSO obtenidos con etanol contenían compuestos oxidados derivados de terpenos como el óxido de cariofileno (1.38% -2.75%), mostrando una menor actividad antifúngica.

Además, la actividad antifúngica de los terpenos puede ser modificada por los hongos. Kusumoto et al. (2014) sugirieron que algunos microorganismos (*Heterobasidion parviporum*) tienen la capacidad de degradar completamente los monoterpenos para usarlos como fuente de carbono.

Es posible que esto ocurra en la etapa inicial de desarrollo en hongos, pero a medida que la concentración del agente fungistático aumenta hasta un nivel óptimo, aumenta la inhibición. Este hecho se verificó porque cuando se utilizó una concentración de aceite más baja (1-10 μ L), estimuló el crecimiento de los hongos, pero a medida que la concentración de aceite se incrementó hasta alcanzar 100 μ L, se presentó una mejor inhibición. Por otro lado, cuando la concentración de aceite fue de 500 μ L, el efecto inhibitorio también fue bajo. Esto fue atribuible a la posible degradación del aceite por el oxígeno, la luz, la temperatura y el envejecimiento u oxidación de los aceites al encontrarse medianamente expuestos. Lee et al. (2017) reportaron que la tasa de degradación de los compuestos químicos obtenidos de pino está relacionado a sus tasas de liberación. Por lo tanto, un exceso de aceite en el medio no asegura un mejor efecto inhibitorio, sin embargo depende de la velocidad de liberación o la degradación o volatilidad de los aceites para encontrarse en la forma adecuada y ejercer su efecto inhibitorio.

Algunos investigadores han reportado que una vez que los aceites alcanzaron la MIC (concentración inhibitoria mínima), estos muestran una inhibición reducida (Wang et al., 2018). Todas las muestras de CSO mostraron actividad antifúngica en concentraciones más altas (300 μ L-500 μ L) en comparación con otros aceites, aceites esenciales y extractos reportados en la literatura (Aguilar-González et al., 2015, Wang et al., 2018, Kalemba and Kunicka, 2003) donde la concentración entre 2-10 μ L es suficiente para hacer un efecto inhibitorio. Sin embargo, este trabajo muestra una alternativa de uso de aceites extraídos de coníferas para ser aplicados como posibles agentes antifúngicos en hongos patógenos de frutas y verduras.

Para retrasar la degradación/oxidación de los compuestos contenidos en CSO, así como para preservar y mejorar la actividad antifúngica (Song et al., 2019) fue necesario emulsionar el aceite que mostró el mejor efecto inhibitorio (H₁).

3.2. Características fisicoquímicas de las emulsiones.

Capacidad de emulsión (EA), estabilidad emulsificante (ES) y eficiencia de encapsulación (EE).

La Tabla 6, muestra las diferentes emulsiones preparadas con CSO utilizando GM (goma de mezquite), Tween 80 (T) y su combinación (GM-T). También se reportan las propiedades fisicoquímicas de las emulsiones de CSO; Capacidad emulsionante (EA), estabilidad emulsionante (ES), eficiencia de encapsulación (EE), tamaño de gota promedio y potencial zeta (ζ).

Tabla 6 Propiedades físicas de las emulsiones de CSO

Emulsion	pH	Capacidad emulsificante (%EA)	Estabilidad emulsificante (%ES)	Eficiencia de encapsulación (%EE)
GM ₁	5.369	82.50 ± 0.13	90.20 ± 0.01	100.0 ± 0.04
GM ₂	6.121	78.33 ± 0.05	88.33 ± 0.05	99.09 ± 0.06
GM ₃	5.914	74.10±0.07	86.66 ± 0.15	96.01 ± 0.14
GM ₄	5.404	72.50 ± 0.15	80.10 ± 0.10	95.26 ± 0.09
T ₁	6.258	90.83 ± 0.11	93.66± 0.05	94.039 ± 0.03
T ₂	6.036	86.66 ± 0.07	91.33± 0.04	93.847 ± 0.12
T ₃	5.909	86.56 ± 0.05	86.66± 0.05	92.38 ± 0.19
T ₄	6.050	85.95± 0.05	86.46± 0.06	90.35 ± 0.25
T-GM ₁	5.216	83.33 ± 0.05	90.15± 0.17	98.83 ± 0.29
T-GM ₂	5.899	85.83 ± 0.02	83.10± 0.10	90.58 ± 0.11
T-GM ₃	6.087	86.66 ± 0.03	80.33± 0.07	83.36 ± 0.27
T-GM ₄	5.279	94.16 ± 0.02	77.89± 0.02	95.26 ± 0.25

GM: goma de mezquite, T: Tween 80, T-GM: mezcal de Tween 80 y goma de mezquite

La capacidad de emulsión (EA) mide la capacidad de un agente emulsionante para formar emulsiones de agua en aceite, mientras que la estabilidad de la emulsión (ES) mide el proceso de desestabilización a lo largo del tiempo.

En la Figura 9, se puede observar las emulsiones de CSO con goma de mezquite, Tween 80n y la mezcla de ambos agentes emulsificante. En las emulsiones GM-CSO, la EA y la ES disminuyeron cuando la cantidad de CSO a emulsionar aumentó. Esto se debe a que

a medida que aumenta la concentración de aceite, la GM tiene menos posibilidades de emulsionar y mantener el CSO emulsionado. De hecho, las concentraciones de aceite por encima del 1.5% para incorporarse en el GM a la misma concentración, presentaron una baja homogeneidad en el sistema. Se presentó un comportamiento similar cuando se usó T como emulsionante. Por lo tanto, a concentraciones de CSO y T por encima del 1% no fue posible formar una emulsión. Cuando se probó T a concentraciones más bajas (0.3%-0.7%), se prepararon emulsiones homogéneas. Por lo tanto, a menores concentraciones de T se obtuvieron mayores EA y ES (90.83% y 93.66% respectivamente).

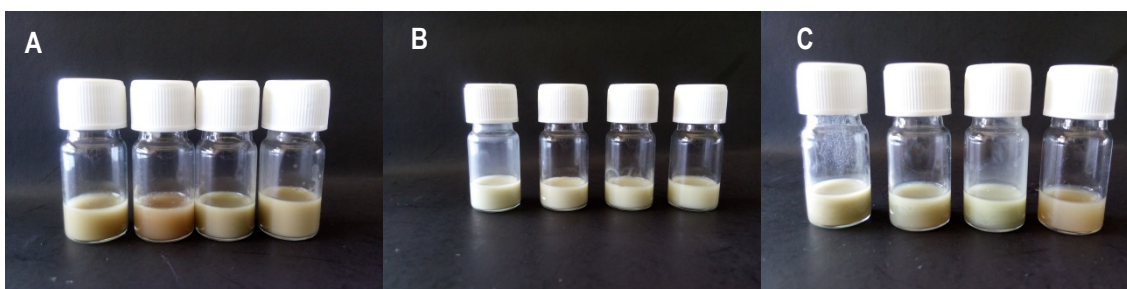


Figura 9: Emulsiones de CSO con A) Goma de mezquite, B) Tween 80 80 y C) la combinación de GM-T

En las mezclas usadas para emulsionar (GM-T), se observa que la concentración de GM aumentaba, la EA disminuía, pero la ES aumentaba. De estos resultados se puede afirmar que GM tuvo un efecto positivo en la estabilidad de las emulsiones y que T proporciona capacidad para emulsionar.

En el caso de EE, las emulsiones con GM presentaron valores superiores al 95%. Todas las emulsiones preparadas con T y la mezcla T-GM presentaron valores menores a las de GM en EE (90%-95%), con excepción de T-GM₁ (~98%). Este comportamiento confirma la capacidad de GM para encapsular al CSO. Los resultados de EE concuerdan con lo reportado por Beristain et al. (2001) donde obtuvo una eficiencia de encapsulación de 83.6% para el aceite esencial de cardamomo utilizando goma de mezquite. Los valores de EE para las emulsiones se vieron afectados por la cantidad de CSO agregado en cada emulsión. A medida que la concentración de aceite aumentaba, la EE disminuía.

Tamaño promedio de gota, estabilidad al cremado y coalescencia

Para evaluar la influencia de la concentración de emulsionante en el tamaño de gota de la emulsión, se llevó a cabo un análisis microscópico. El tamaño de gota para las emulsiones de CSO se muestra en la Tabla 7. Se encontraron tamaños de gota entre 1.26 μ m y 5.93 μ m de diámetro.

Las emulsiones que contenían GM y T tenían diámetros más pequeños (1.26-1.96 μm) que las preparadas con la mezcla de T-GM con excepción de la emulsión T-GM₄. Este hecho se puede explicar debido a que el Tween 80 genera el tamaño de gota más pequeño con la distribución más estrecha y una alta estabilidad durante el almacenamiento de acuerdo lo reportado por Jiménez et al. (2018).

Tabla 7 Tamaño de gota de las emulsiones de CSO

Emulsion	Tamaño promedio de gota (diámetro μm)	Emulsion	Tamaño promedio de gota (diámetro μm)	Emulsion	Tamaño promedio de gota (diámetro μm)
GM₁	1.26 \pm 0.31	T₁	1.62 \pm 0.35	T-GM₁	2.29 \pm 0.23
GM₂	1.28 \pm 0.28	T₂	1.67 \pm 0.25	T-GM₂	5.93 \pm 0.24
GM₃	1.30 \pm 0.17	T₃	1.79 \pm 0.26	T-GM₃	2.14 \pm 0.26
GM₄	1.44 \pm 0.36	T₄	1.96 \pm 0.37	T-GM₄	3.82 \pm 0.17

Por otro lado, la interacción entre el CSO y la combinación de T-GM dio lugar a una serie de partículas de aglomerados en las emulsiones, que presentaron tamaños dispersos (2.14 μm a 5.93 μm) como se observa en la Figura 10c.

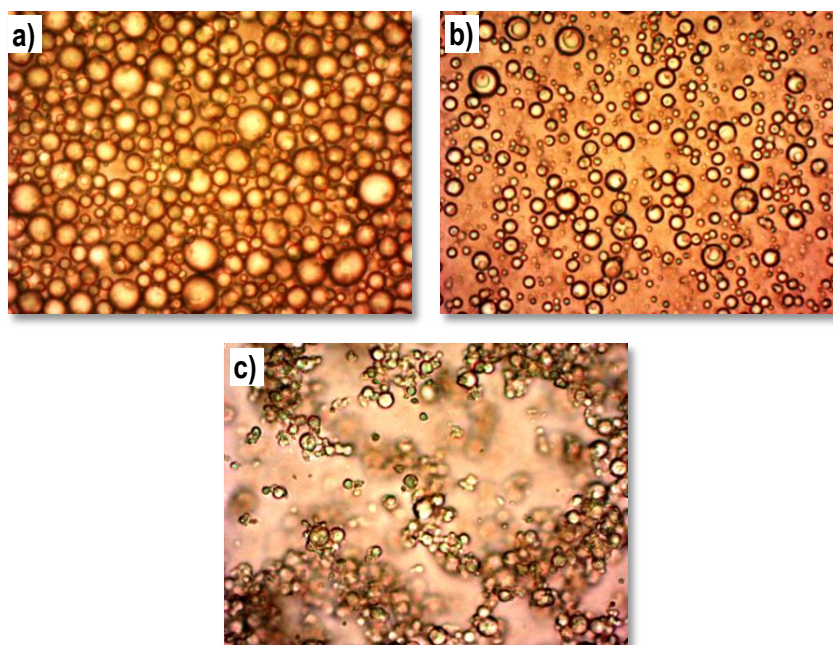


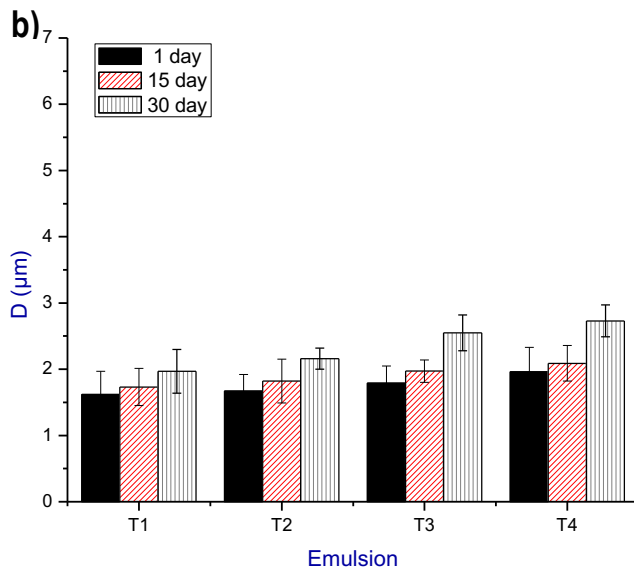
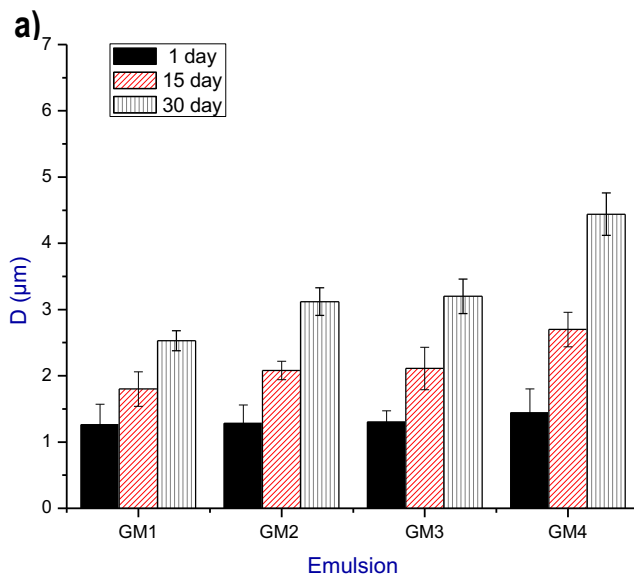
Figura 10: Tamaños de gota de las emulsiones a) Goma de mezquite, b) Tween 80 y c) la combinación de GM-T.

La coalescencia se refiere al proceso de adelgazamiento y ruptura de la película líquida entre las gotas, con el resultado de que se produce la fusión de dos o más gotas para formar gotas más grandes (Tadros, 2009). En este trabajo, la coalescencia se relacionó con un aumento del tamaño de gota en las emulsiones en función del tiempo como se muestra en la Figura 11. La coalescencia de las emulsiones preparadas con GM y T fue más baja que en las emulsiones hechas con la mezcla T-GM. A medida que aumentó la concentración de aceite, el tamaño de las gotas aumentó en las emulsiones GM y T. Las emulsiones preparadas con GM y T presentaron valores similares en el tamaño de las gotas en la etapa inicial (7 días), pero a medida que el tiempo aumentó a los 15 y 30 días, el tamaño de las gotas en la emulsión de GM fue mayor, independientemente de la relación aceite-tensioactivo / biopolímero utilizada. Por lo tanto, es posible decir que el Tween ayuda a formar emulsiones de tamaño de gota más estables en el tiempo en comparación con GM y la mezcla T-GM.

La cantidad de T presentó influencia en el tamaño de las gotas. Cuando se usó una concentración limitada (3%-5%), el tamaño de las gotas fue menor, y al aumentar la concentración (7%-10%) se incrementó el tamaño éstas. En este caso de las emulsiones preparadas con tween hubo suficiente surfactante para formar gotas más pequeñas; sin embargo, se sabe que la eficacia de los surfactantes puede deberse a varios factores que influyen en la coalescencia y la fragmentación de las gotas durante la homogeneización y en el efecto del almacenamiento de emulsiones a largo plazo. Estos factores pueden ser 1) la velocidad a la que los surfactantes se adhieren a las superficies de las gotas de aceite, 2) la capacidad de los surfactantes para disminuir la tensión interfacial, 3) el impacto de los surfactantes en la reología de la interfaz; y 4) la efectividad de los surfactantes para generar fuertes interacciones repulsivas entre las gotas (Zhu et al., 2019).

La GM también exhibe interacciones con el aceite, lo que influye en el tamaño de las gotas y la viscosidad. Valdez et al. (2006) encontraron que la fracción de proteína que constituye GM presenta interacciones hidrófobas con el aceite de naranja. Ellos mencionan que este tipo de interacciones tienen un efecto no solo en las propiedades reológicas de las emulsiones, sino también en las propiedades mecánicas que influyen en la resistencia de la agregación de las gotas en la emulsión. Por otro lado, Ziani et al. (2011) estudiaron la influencia de la naturaleza química de los surfactantes (no iónicos, iónicos) sobre el tamaño de las gotas, la maduración de Ostwald de las emulsiones

preparadas con timol y tween 80 y encontraron que las interacciones entre aceite y tween eran altamente inestables y susceptibles de aumentar el tamaño de gota y el índice de cremado.



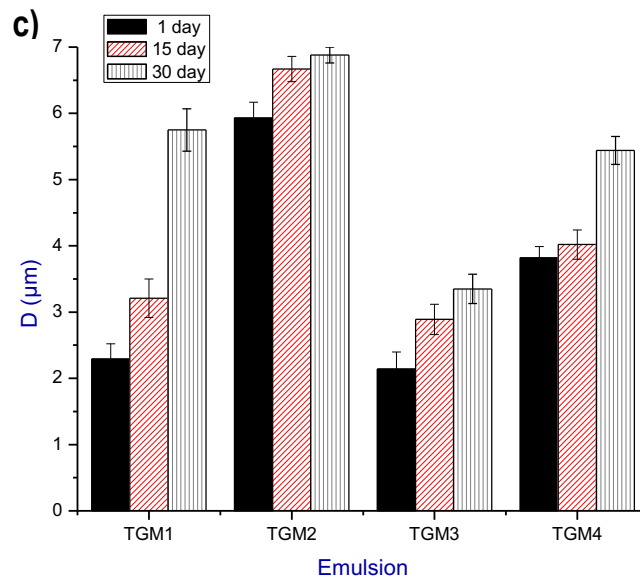


Figura 11. Diámetros de las emulsiones con a) Goma de mezquite, b) Tween 80 y c) la combinación de GM-T a 1, 15 y 30 días.

Por lo tanto, en este trabajo, las diferencias en los tamaños de gota de las emulsiones hechas con la mezcla T-GM se deben a las interacciones entre Aceite-T, Aceite-GM, el T-GM y el Aceite-T-GM, también por los cambios en sus características reológicas y mecánicas, además a las propiedades derivadas de sus interacciones aceite-emulsificantes. De hecho, cuando la concentración de Tween fue evaluada por encima del 1% y la concentración de GM fue evaluada por debajo del 1% no fue posible formar una emulsión estable. Por lo tanto, para la preparación de emulsiones con CSO, GM y T dependen totalmente de la composición y la relación aceite-surfactante / biopolímero.

Con respecto al índice de crema (CI), este depende del tipo y la concentración del emulsionante. Se observó que las emulsiones con GM y T mostraron signos de formación de crema después del día 15. Los signos de formación de crema se reportaron como separación de fases en cm. Las emulsiones GM presentaron 0.5-1.0 cm, mientras que las emulsiones T presentaron 1.2-1.7 cm. Las emulsiones T-GM mostraron formación de crema después del día 7 (1.7 cm). La emulsión TGM1 mostró un índice de cremado más alto en comparación con el resto de las emulsiones TGM₂-TGM₄. Se sabe que las emulsiones que contienen tween 80 como emulsionante presentan una buena estabilidad física durante el almacenamiento (Arancibia et al., 2017, Lu et al., 2018), ya que este surfactante puede ser absorbido rápidamente por las gotas de aceite durante la homogeneización y reduce rápidamente tensión interfacial, produciendo pequeñas gotas

durante la formación de la emulsión y dando una mejor estabilidad a la separación gravitacional. Los datos del índice de cremado concuerdan con los parámetros de coalescencia donde las emulsiones GM presentaron una estabilidad más baja.

Potencial zeta de las emulsiones

La carga superficial de partícula (potencial zeta ζ) es una propiedad clave en el estudio de la estabilidad de un sistema coloidal y mide la magnitud de la atracción o repulsión entre partículas vecinas, lo que mide aún más la estabilidad de las partículas en una emulsión. Cuando el valor de potencial es mayor que 30 mV o menor que -30 mV, las repulsiones electrostáticas entre partículas minimizan su agregación (Wu et al., 2018, Bhosale et al., 2018). En la Tabla 8 se reportan los valores de potencial zeta para las emulsiones con GM, T y la mezcla T-GM a pH que oscilan 5.1 y 5.2.

Tabla 8 Potencial zeta (ζ) de las emulsiones de CSO

Emulsión	Potencial Zeta (mV)	Emulsion	Potencial Zeta (mV)	Emulsión	Potencial Zeta (mV)
GM₁	-26.10 ± 0.81	T₁	-26.93 ± 1.60	T-GM₁	-38.46 ± 1.58
GM₂	-26.30 ± 1.08	T₂	-27.02 ± 0.16	T-GM₂	-32.53 ± 0.20
GM₃	-29.51 ± 0.52	T₃	-27.53 ± 1.02	T-GM₃	-26.56 ± 1.06
GM₄	-31.22 ± 2.60	T₄	-29.43 ± 0.70	T-GM₄	-23.56 ± 1.06

Las emulsiones GM₄, T₄ y T-GM₁ mostraron valores más altos de potencial zeta (ζ) con respecto al resto de las emulsiones. Dichas emulsiones fueron más estables en comparación con el resto de las emulsiones durante los siguientes 15 días.

Los valores de ζ dependieron de la concentración de aceite y la relación surfactante/biopolímero. En las emulsiones con GM, los valores de ζ aumentaron de -26 mV a -31mV, a medida que aumentaba la concentración de aceite (3% a 10%), mientras que en las emulsiones T no mostraron diferencias significativas cuando las concentraciones de T estaban entre 3% y 7%. El ζ de las emulsiones de T-GM usando aceite dependieron fuertemente del aceite y de la concentración de surfactante (T) utilizada.

La carga negativa es habitual en dispersiones aceite-agua debido a la adsorción de los iones negativos presentes en el sistema acuoso. El potencial Zeta del aceite fue de -26.4mV. Solo las emulsiones GM₁ y GM₂ fueron ligeramente menos negativos en comparación con el aceite, pero no se mostró floculación de la gota, debido a la interacción / adsorción de GM con aceite, según sus grupos funcionales químicos (Valdez et al., 2006). En el resto de las formulaciones preparadas con GM, a medida que la concentración de aceite fue mayor (10%), no había suficiente biopolímero para cubrir todas las gotas de aceite, lo que provocó un aumento en el tamaño de partícula y la floculación en el tiempo. Por lo tanto, la contribución del potencial zeta en la emulsión fue influenciada por el aceite y su grado de interacción con el biopolímero en las diferentes emulsiones GM.

Los valores promedio de ζ de las emulsiones preparadas con el surfactante no iónico fueron negativos (alrededor de -26 mV a -29mV) lo que sugiere que la estabilización fue por impedimento estérico. Se ha reportado que T presenta valores de ζ casi a cero (Ziani et al., 2011) por lo tanto, los valores encontrados en las emulsiones preparadas con T fueron principalmente por contribución del aceite.

En el caso de las emulsiones T-GM, la reducción del potencial zeta de las gotas cuando aumenta el contenido de aceite en la formulación, podría explicarse por la presencia de interacciones electrostáticas entre los componentes (GM y aceite. A pH ~5 (el pH se ajustó en todas las emulsiones a su determinación de ζ), el grupo amino de GM (pK_a NH_3^+ / NH_2 , ≈ 6.5) está cargado positivamente y podría neutralizarse a través de las interacciones en la interface de las emulsiones o/w con grupos polares de componentes de aceite. Por ello, se asumió que presentaron interacciones de la GM con el aceite dando lugar a emulsiones con carga neta negativa.

3.3. Inhibición del crecimiento micelial de los hongos

El efecto antifúngico del aceite de semilla de cedro se muestra en las Figuras 7 y 8, mientras que el efecto antifúngico de las emulsiones contra *Botrytis cinerea* y *Aspergillus niger* se muestra en la Tabla 9. Los aceites emulsionados inhibieron el crecimiento micelial de los hongos mejor con respecto a aceite puro. La distribución fue más uniforme y la oportunidad de contacto con los hongos fue mayor; por lo tanto el efecto inhibitorio fue mejor. Este hecho ha sido reportado por varios investigadores (Ribes et al., 2017, Song et al., 2018) donde encontraron que al incorporar el aceite en emulsiones el efecto fúngico

es mayor. Todas las emulsiones inhibieron mejor a *Aspergillus niger* en comparación con *Botrytis cinerea*.

Para las emulsiones con goma de mezquite, el mayor efecto inhibitorio al crecimiento micelial fue en la emulsión GM₄ con una inhibición del 27.72% en *Botrytis cinerea* y 37.22% en *Aspergillus niger*. Las emulsiones preparadas con T presentaron mejor inhibición en ambos hongos. La emulsión T₄ presento un 44.82% de inhibición en *Botrytis cinerea* y un 66.50% en *Aspergillus niger*. Mientras tanto, las emulsión preparadas con la mezcla de Tween y Goma de mezquite (T-GM₄) mostró el mayor efecto antifúngico contra *Botrytis cinerea* con un 54.94% y un 45.13% en *Aspergillus niger*.

Tabla 9 Inhibición del crecimiento micelial de los hongos

Emulsión	Crecimiento micelial (% Inhibición)		Emulsión	Crecimiento micelial (% Inhibición)	
	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Aspergillus niger</i>		<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Aspergillus niger</i>
GM₁	17.46 ± 1.05	31.23 ± 1.16	T₃	43.63 ± 1.32	66.41 ± 1.02
GM₂	21.56 ± 1.30	34.43 ± 1.08	T₄	44.82 ± 0.97	66.50 ± 0.45
GM₃	24.62 ± 1.58	35.57 ± 1.52	T-GM₁	39.94 ± 1.03	35.22 ± 1.50
GM₄	27.74 ± 0.90	37.22 ± 1.13	T-GM₂	41.62 ± 1.79	42.46 ± 1.10
T₁	40.64 ± 1.25	61.11 ± 1.27	T-GM₃	42.90 ± 1.70	44.63 ± 0.60
T₂	43.30 ± 1.96	66.25 ± 0.59	T-GM₄	54.94 ± 1.80	45.13 ± 1.01

En este sentido, T₄, GM₄ y T-GM₄ mostraron valores altos de efecto inhibitorio. T₄ mostró el mayor efecto antifúngico contra *Aspergillus niger*. Es evidente que la emulsión T₄ no presentó los valores más altos en EA, ES y EE, pero la concentración de aceite captado durante el proceso de emulsificación fue suficiente para lograr el efecto inhibitorio.

La emulsión T-GM₄ mostró el mayor efecto antifúngico contra *Botrytis cinerea*, una buena capacidad emulsionante, pero una menor estabilidad emulsionante. Es posible que la incapacidad para retener el aceite, sea mejor, con la finalidad de liberar fácilmente el aceite emulsificado y por lo tanto, tenga un mejor efecto inhibitorio.

En cuanto a la estabilidad del aceite, sería deseable tener la mayor EE (99% - 100%) para prevenir la degradación de los aceites. En este caso, los valores de EE más altos no son

los deseables, ya que no tendría un buen efecto inhibitor como se puede observar en GM₁, T₁ y T-GM₁ que tienen el 100%, 94% y 98% de los valores de EE respectivamente, pero un efecto inhibitor menor contra ambos hongos. Es posible que el aceite no encapsulado/superficial pueda actuar inicialmente como inhibitor y que a medida que disminuya la estabilidad de emulsificación (ES), se produzca la liberación a lo largo del tiempo del aceite.

Los resultados que se muestran en la Tabla 7 confirman que, independientemente del uso de GM o T, el tamaño medio de gota no presentó diferencias significativas ($p < 0,05$). La mezcla T-GM mostró diferencias significativas ($p > 0,05$) en el tamaño con respecto a las emulsiones GM y T. Se ha informado que el uso de Tween 80 da lugar a la formación de emulsiones de tamaño más pequeño que las preparadas con biopolímeros como WPI o gomas (Chang et al., 2013, Ribes et al., 2017). Los tamaños de gotas promedio más pequeños y homogéneos en emulsiones son deseables, porque se ha informado que aumentan la actividad antifúngica (Ribes et al., 2017, Ribes et al., 2018).

En este trabajo, los valores promedio de tamaño de partícula de las emulsiones T y GM fueron similares, pero el tamaño de las emulsiones GM aumentó con el tiempo, lo cual puede reducir la posibilidad de presentar interacciones con la pared celular de los hongos, ya que disminuye la superficie de contacto entre la emulsión y los hongos. El área de contacto y, en consecuencia, el transporte pasivo a través de la pared celular externa, impidiendo su interacción. Este comportamiento es claramente visible en el caso de las emulsiones preparada con T la cual exhibió un porcentaje de inhibición más alto que la emulsión de GM en todos los casos.

Además del tamaño promedio de las gotas en emulsiones, se sabe que los surfactantes funcionan como buenos mejoradores de la permeación en las células. Esto se atribuye a su estructura molecular e iónica causando daños irreversibles a las membranas de las células. Los surfactantes no iónicos como tween 80 pueden abrir rápidamente uniones estrechas paracelulares dando lugar a una fuga periplásmica y, posteriormente, conducen a una fuga que tiene lugar en la membrana citoplasmática, que causó la muerte celular (Kaur and Mehta, 2017). Por lo tanto, la efectividad de las emulsiones de T también se debe al mecanismo de interacción con la pared celular de los hongos. La destrucción de la pared celular es uno de los mecanismos por los cuales muchos aceites esenciales pueden inhibir hongos (Soylu et al., 2010, Song et al., 2019, Knobloch et al., 1989).

Los resultados de diferentes estudios revelaron que el mecanismo de la muerte de hongos muestra dos fases. La primera fase está relacionada con la penetración de la microemulsión en la pared celular del hongo. Esto se conoce como fuga periplásmica inicial donde se produce una fuga inicial desde el espacio entre la pared celular y la membrana citoplásmica. La segunda fase se describe como fuga citoplásmica. El daño de la membrana citoplásmica se puede estimar a partir de la liberación de iones de potasio (K⁺), fosfato inorgánico y materiales como el ARN y el ADN (Al-Adham et al., 2013).

3.4. Morfología de las hifas de los hongos en SEM

La acción de las emulsiones conteniendo CSO sobre el desarrollo fúngico de *Botrytis cinerea* y *Aspergillus niger* se evaluó mediante SEM. La Figura 12 y Figura 13 muestra los daños presentes en la morfología de las hifas de *Botrytis cinerea* y *Aspergillus niger* expuestas a las emulsiones que presentan mayor efecto inhibitorio (GM₄, T₄, y TGM₄).

Una vez aplicada la emulsión GM₄ se observó una disminución en el tamaño de las hifas *Botrytis cinerea*, con superficies plegadas y en algunos casos hifas marchitas (Figura 12b y 12c), mientras que en el control (medio sin adición de emulsión) mostraron una estructura lisa, gruesa y alargada (Figura 12a). En el caso de la aplicación de las emulsiones T₄ y TGM₄ se presentaron alteraciones en la morfología hifal, una deformación micelial severa, hifas marchitas, superficies porosas, y agrietamientos en la superficie hifal (Figura 12d).

Esto sugiere que la emulsión de T y la mezcla T-GM mejoró la dispersión en la superficie del hongo, facilitando la incorporación de los componentes del CSO a la pared celular y causando alteraciones en la morfología hifal. Este daño presente en la estructura de *Botrytis cinerea*, es similar a lo encontrado por Soyly et al. (2010), donde encontraron agregados hifales reducidos, diámetros reducidos y la lisis de la pared hifal debido a la exposición de aceite esencial de orégano.

El impacto de las emulsiones T₄ y T-GM₄ en la estructura hifal reflejan las propiedades lipófilas de los componentes del aceite y la capacidad de la emulsión para penetrar en la membrana plasmática.

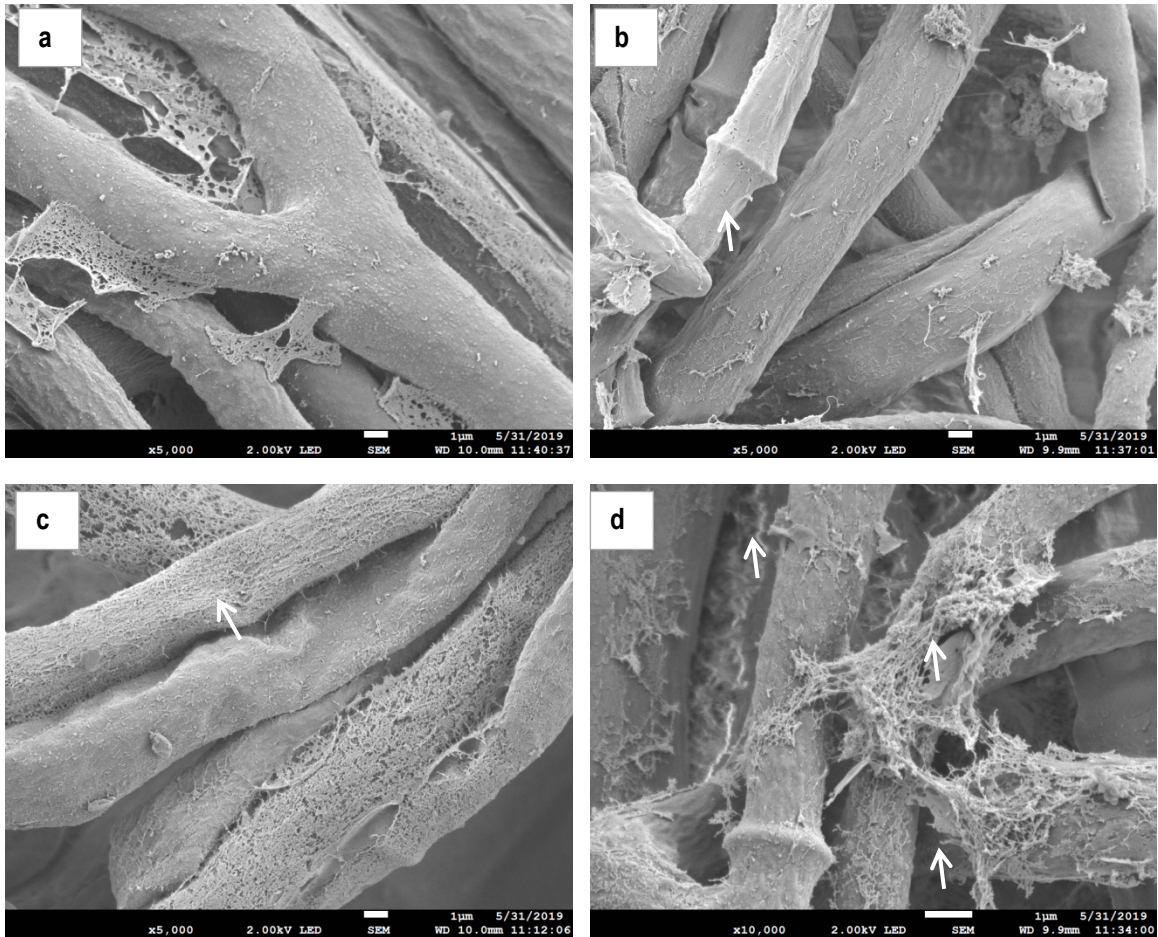


Figura 12. Hifas de *Botrytis cinerea* expuestas a emulsiones conteniendo CSO. a) Hifas saludables en control (PDA sin emulsión), b) emulsión GM₄ muestra disminución en el tamaño hifal, c) emulsión T₄ presenta disminución de tamaño y ruptura hifal y d) emulsión T-GM₄ mostró lisis.

En el caso de *Aspergillus niger* las emulsiones tanto de GM, T y la mezcla T-GM mostraron daño en la morfología hifal. Siendo las emulsiones con T₂ y T₃ la mejor actividad de inhibición (~66%). Las imágenes de SEM revelaron un diámetro reducido y el adelgazamiento de la pared hifal (Figura 13b, 13c y 13d) a diferencia de las hifas en el control. Dichas modificaciones inducidas por el CSO pueden estar relacionadas con la interferencia de los componentes del CSO con reacciones enzimáticas de síntesis de la pared. Rasooli et al. (2006) encontraron este daño en *Aspergillus niger* inducido por aceite esencial de tomillo el cual afectó la morfología y el crecimiento del hongo.

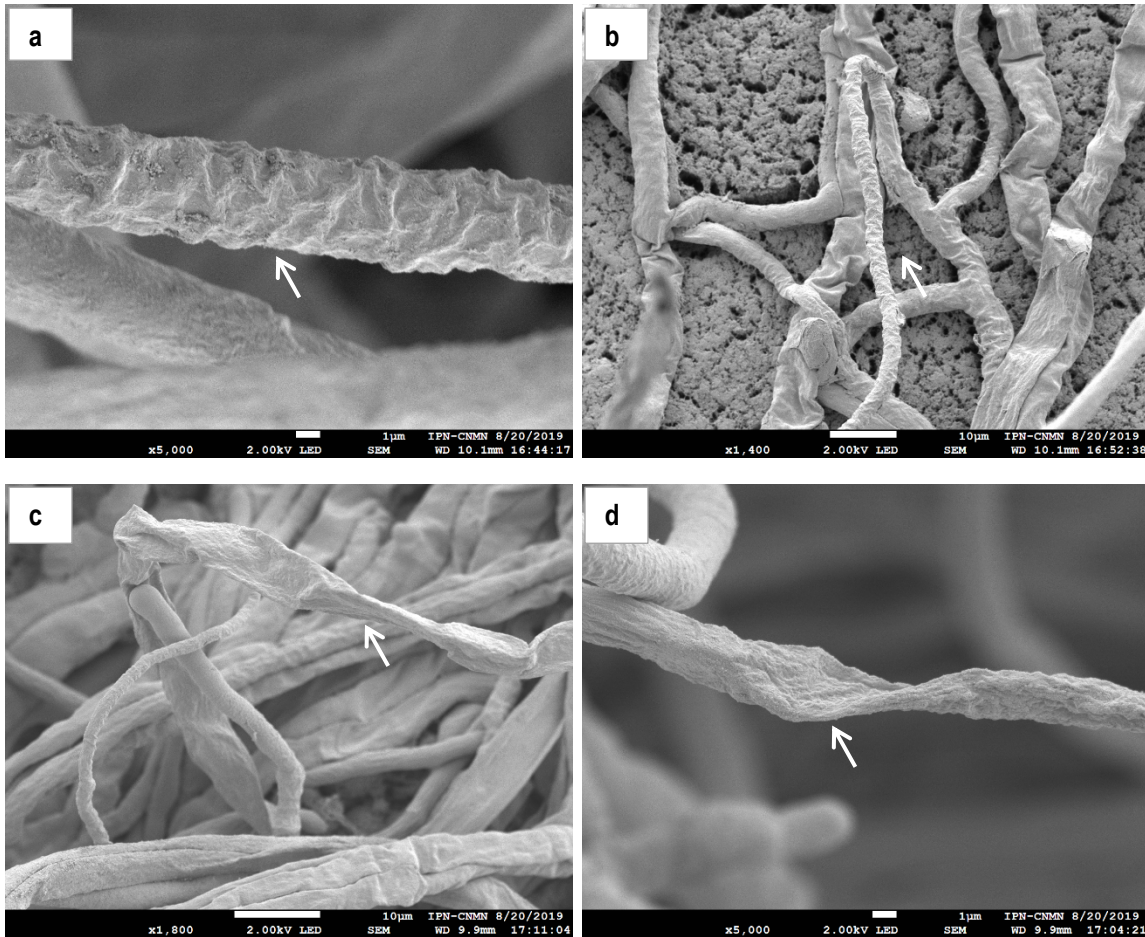


Figura 13. Hifas de *Aspergillus niger* expuestas a emulsiones conteniendo CSO. a) Hifas saludables en control (PDA sin emulsión), b) emulsión GM₄ muestra disminución en el tamaño hifal, c) y d) emulsión T₄ y TGM₄ mostraron un daño significativo en el tamaño de las hifas.

3.5. Microscopía confocal de barrido láser (MCBL)

En la Figura 14 se presenta la acción de las emulsiones de CSO sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea* y *Aspergillus niger* mediante microscopía confocal de barrido láser (MCBL). Las características morfológicas y fisiológicas de las hifas de *Botrytis cinerea* y *Aspergillus niger* se vieron afectadas por las emulsiones conteniendo CSO, en particular la emulsión T₂ y T₄ mostraron una inhibición (~43% *B. cinerea* y ~66% *A. niger*) la cual fue superior a la presentada por las emulsiones de GM y la mezcla T-GM. Estos resultados fueron consistentes con la microscopía electrónica de barrido y la MIC para ambos hongos.

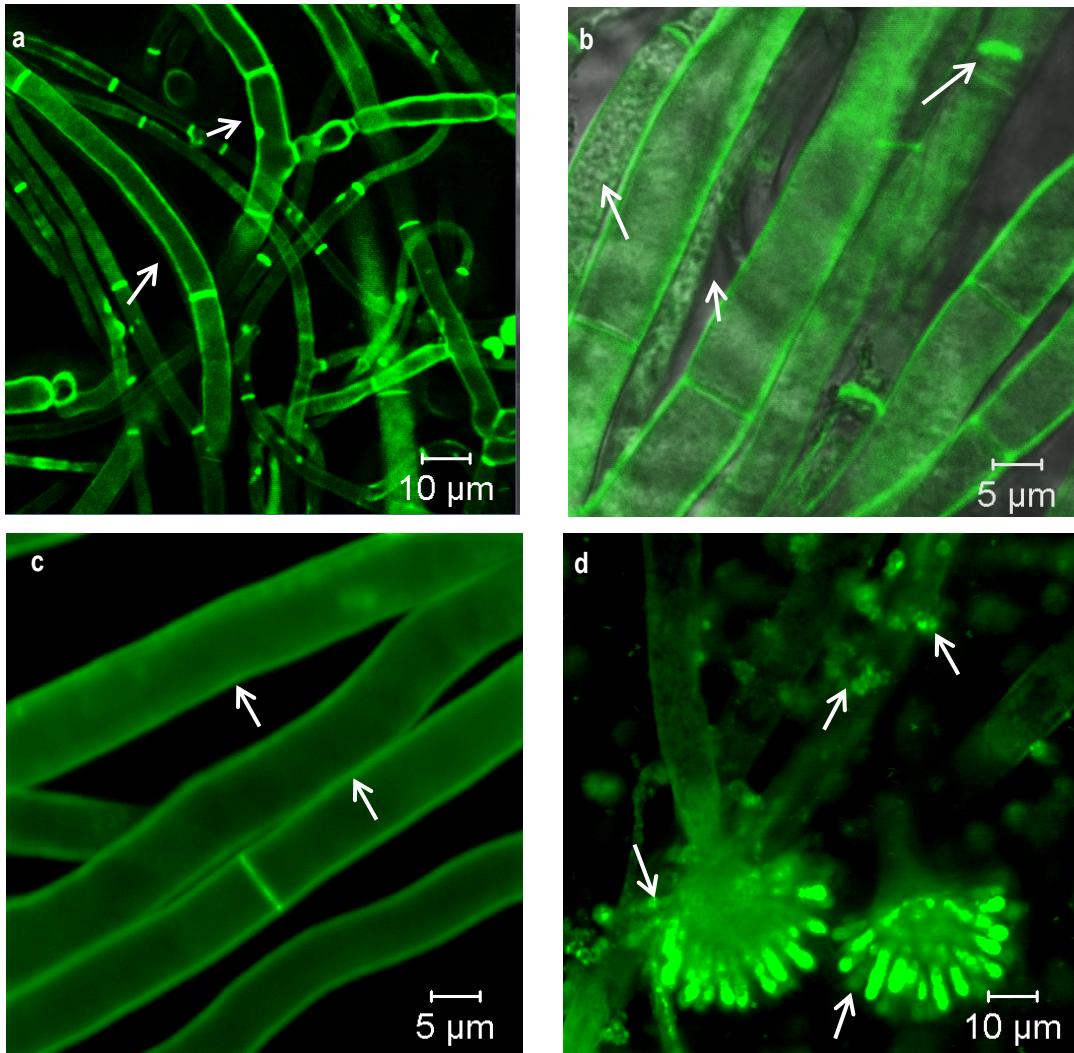


Figura 14. Hifas de *Botrytis cinerea* (a y b) y *Aspergillus niger* (c y d) expuestas a emulsiones conteniendo aceite. a y c) Hifas saludables en control (PDA sin emulsión), b y d) hifas expuestas a la emulsión TGM₄ mostró grietas en las hifas.

En las micrografías se observa el contraste entre el control (Figura 14a) de *Botrytis cinerea* y *Aspergillus niger* (Figura 14c) y la aplicación de las emulsiones de aceite de cedro, donde la disminución en el tamaño de las hifas, rugosidad y la fuga de quitina en la pared celular de ambos hongos expuestos a las emulsiones, lo cual es un indicativo del daño provocado en la morfología hifal. Este comportamiento ha sido reportado por Castro et al. (2017) en donde la intensidad de la fluorescencia en el interior de la pared celular refleja el daño provocado en el hongo.

3.6. Degradación de compuestos bioactivos en las emulsiones

En el anexo 5 se muestran los resultados de los compuestos que se perdieron o disminuyeron después de la preparación de la emulsión de CSO, los cuales fueron analizados mediante cromatografía de gases-acoplada a masas.

Los principales compuestos perdidos durante la formación de las emulsiones fueron, (\pm)- β -Pinene y y citronelol. El citronelol permaneció solo en dos emulsiones (T₃ y T-GM₃) teniendo al Tween 80 como surfactante en mayor proporción. Mientras que para (\pm)- β -pineno permaneció en las emulsiones con goma de mezquite como encapsulante (excepto en GM₂). Sin embargo el contenido relativo de estos compuestos no representó una pérdida significativa en la acción antifúngica de las emulsiones, ya que la sinergia de los compuestos como el β -pineno, careno, β -mirceno, limoneno y cariofileno fueron los que presentaron un efecto en la inhibición de ambos hongos.

Estas pérdidas de compuestos se debió a la volatilidad y susceptibilidad de algunos monoterpenos presentes en el aceite durante el proceso de homogenización. Estos resultados coinciden con los reportados por (Donsì et al., 2011, Ribes et al., 2018), quienes encapsularon aceites esenciales, los cuales presentaron la degradación de diferentes compuestos monoterpenicos, como α -felandreno, terpinoleno, p-cimeno y tujeno, entre otros.

IV. CONCLUSIONES

La extracción del aceite esencial de semillas de *Cupressus lusitanica* mostró una pigmentación verde oliva a verde intenso, debido al contenido de clorofilas. Los aceites extraídos de la semilla de cedro tuvieron marcadas diferencias en la composición debido a las diferentes polaridades de los disolventes de hexano y etanol utilizados como medios de extracción. El aceite extraído con hexano mostró una composición más alta en monoterpenos (β -pineno, cariofileno, limoneno y ferruginol) y presentó la mejor actividad antifúngica contra *Botrytis cinerea* y *Aspergillus niger* en menor proporción, las cuales fueron corroborada por el examen SEM y CLSM.

Las emulsiones estables a tiempo preparadas con T y el aceite, mostraron una mayor actividad antifúngica contra *Aspergillus niger* en comparación con el aceite puro, debido a la mejora de la dispersabilidad del aceite, la generación de pequeños tamaños de gota los cuales presentaron una mejor interacción con el hongo. En general, se concluye que las emulsiones preparadas con aceite de semilla de cedro son una alternativa factible como control biológico contra el moho destinado a su posible pulverización después de la cosecha de frutas y verduras.

V. REFERENCIAS

Adams, R., Zaroni, T. A., Lara, A., Barrero, A. & Cool, L. 1997. Comparisons Among Cupressus Arizonica Greene, C. Benthamii Endl., C. Lindleyi Klotz, Ex Endl. And C. Lusitanica Mill, Using Leaf Essential Oils And Dna Fingerprinting. *Journal Of Essential Oil Research*, 9, 303-309.

Aguilar-González, A. E., Palou, E. & López-Malo, A. 2015. Antifungal Activity Of Essential Oils Of Clove (Syzygium Aromaticum) And/Or Mustard (Brassica Nigra) In Vapor Phase Against Gray Mold (Botrytis Cinerea) In Strawberries. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 32, 181-185.

Al-Adham, I. S. I., Ashour, H., Al-Kaissi, E., Khalil, E., Kierans, M. & Collier, P. J. 2013. Studies On The Kinetics Of Killing And The Proposed Mechanism Of Action Of Microemulsions Against Fungi. *International Journal Of Pharmaceutics*, 454, 226-232.

Alam, M. N., Bristi, N. J. & Rafiquzzaman, M. 2013. Review On In Vivo And In Vitro Methods Evaluation Of Antioxidant Activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21, 143-152.

Alpizar-Reyes, E., Carrillo-Navas, H., Gallardo-Rivera, R., Varela-Guerrero, V., Alvarez-Ramirez, J. & Pérez-Alonso, C. 2017. Functional Properties And Physicochemical Characteristics Of Tamarind (Tamarindus Indica L.) Seed Mucilage Powder As A Novel Hydrocolloid. *Journal Of Food Engineering*, 209, 68-75.

Antunes-Ricardo, M., Gutiérrez-Urbe, J. A. & Guajardo-Flores, D. 2017. Extraction Of Isorhamnetin Conjugates From Opuntia Ficus-Indica (L.) Mill Using Supercritical Fluids. *The Journal Of Supercritical Fluids*, 119, 58-63.

Arancibia, C., Riquelme, N., Zúñiga, R. & Matiacevich, S. 2017. Comparing The Effectiveness Of Natural And Synthetic Emulsifiers On Oxidative And Physical Stability Of Avocado Oil-Based Nanoemulsions. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 44, 159-166.

Barrera, G. M., Alonso, C. P., Espinoza, J. O. & Benítez, L. A. Gomas Y Aceites Naturales Utilizados En La Microencapsulación: Efecto De La Radiación Gamma. *Temas Selectos En Ciencia De Materiales I*, 77.

Beristain, C., Garcia, H. & Vernon-Carter, E. 2001. Spray-Dried Encapsulation Of Cardamom (*Elettaria Cardamomum*) Essential Oil With Mesquite (*Prosopis Juliflora*) Gum. *Lwt-Food Science And Technology*, 34, 398-401.

Bett, P. K., Deng, A. L., Ogendo, J. O., Kariuki, S. T., Kamatenesi-Mugisha, M., Mihale, J. M. & Torto, B. 2016. Chemical Composition Of *Cupressus Lusitanica* And *Eucalyptus Saligna* Leaf Essential Oils And Bioactivity Against Major Insect Pests Of Stored Food Grains. *Industrial Crops And Products*, 82, 51-62.

Bhosale, S., Ekambe, P., Bhoraskar, S. & Mathe, V. 2018. Effect Of Surface Properties Of NiFe₂O₄ Nanoparticles Synthesized By Dc Thermal Plasma Route On Antimicrobial Activity. *Applied Surface Science*, 441, 724-733.

Bustos-Garza, C., Yáñez-Fernández, J. & Barragán-Huerta, B. E. 2013. Thermal And Ph Stability Of Spray-Dried Encapsulated Astaxanthin Oleoresin From *Haematococcus Pluvialis* Using Several Encapsulation Wall Materials. *Food Research International*, 54, 641-649.

Can-Cauich, C. A., Sauri-Duch, E., Moo-Huchin, V. M., Betancur-Ancona, D. & Cuevas-Glory, L. F. 2019. Effect Of Extraction Method And Specie On The Content Of Bioactive Compounds And Antioxidant Activity Of Pumpkin Oil From Yucatan, Mexico. *Food Chemistry*, 285, 186-193.

Carmo, M. M. & Frazão, S. 1989. The Essential Oil Of *Cupressus Lusitanicus* Mill. *Flavour And Fragrance Journal*, 4, 185-186.

Carson, C. F. & Hammer, K. A. 2011. Chemistry And Bioactivity Of Essential Oils. *Lipids And Essential Oils As Antimicrobial Agents*, 25, 203-238.

Cervantes-Paz, B., Yahia, E. M., De Jesús Ornelas-Paz, J., Victoria-Campos, C. I., Ibarra-Junquera, V., Pérez-Martínez, J. D. & Escalante-Minakata, P. 2014. Antioxidant Activity

And Content Of Chlorophylls And Carotenoids In Raw And Heat-Processed Jalapeño Peppers At Intermediate Stages Of Ripening. *Food Chemistry*, 146, 188-196.

Comelli, F., Ottani, S., Francesconi, R. & Castellari, C. 2002. Densities, Viscosities, And Refractive Indices Of Binary Mixtures Containing N-Hexane+ Components Of Pine Resins And Essential Oils At 298.15 K. *Journal Of Chemical & Engineering Data*, 47, 93-97.

Cowan, S., Bartholomew, B., Watson, A., Bright, C., Latif, Z., Sarker, S. D. & Nash, R. J. 2001. Lignans From *Cupressus Lusitanica* (Cupressaceae). Lignanos De *Cupressus Lusitanica* (Cupressaceae). *Biochemical Systematics And Ecology*., 29, 109-111.

Chang, Y., Mclandsborough, L. & Mcclements, D. J. 2013. Physicochemical Properties And Antimicrobial Efficacy Of Carvacrol Nanoemulsions Formed By Spontaneous Emulsification. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 61, 8906-8913.

Chaves, E. & Fonseca, W. 1991. *Ciprés: Cupressus Lusitanica Mill.: Especie De Árbol De Uso Múltiple En América Central*, Catie.

Chen, Q., Xu, S., Wu, T., Guo, J., Sha, S., Zheng, X. & Yu, T. 2014. Effect Of Citronella Essential Oil On The Inhibition Of Postharvest *Alternaria Alternata* In Cherry Tomato. *Journal Of The Science Of Food And Agriculture*, 94, 2441-2447.

Chéraif, I., Ben Jannet, H., Hammami, M., Khouja, M. L. & Mighri, Z. 2007. Chemical Composition And Antimicrobial Activity Of Essential Oils Of *Cupressus Arizonica* Greene. *Biochemical Systematics And Ecology*, 35, 813-820.

De Alwis, R., Fujita, K., Ashitani, T. & Kuroda, K. I. 2009. Volatile And Non-Volatile Monoterpenes Produced By Elicitor-Stimulated *Cupressus Lusitanica* Cultured Cells. *Journal Of Plant Physiology*, 166, 720-728.

De Castro, M. L. & Ayuso, L. 2000. Soxhlet Extraction. *Environmental Applications*, 2701-5.

De Matos, S. P., Lucca, L. G. & Koester, L. S. 2018. Essential Oils In Nanostructured Systems: Challenges In Preparation And Analytical Methods. *Talanta*.

Del Valle, J. & Aguilera, J. 1999. Revision: Extracción Con Co₂ A Alta Presión. Fundamentos Y Aplicaciones En La Industria De Alimentos/Review: High Pressure Co₂ Extraction. Fundamentals And Applications In The Food Industry. *Revista De Agaroquímica Y Tecnología De Alimentos*, 5, 1-24.

Dickinson, E. 2017. Biopolymer-Based Particles As Stabilizing Agents For Emulsions And Foams. *Food Hydrocolloids*, 68, 219-231.

Dima, C. & Dima, S. 2015. Essential Oils In Foods: Extraction, Stabilization, And Toxicity. *Current Opinion In Food Science*, 5, 29-35.

Dos Reis, L. C. R., De Oliveira, V. R., Hagen, M. E. K., Jablonski, A., Flôres, S. H. & De Oliveira Rios, A. 2015. Carotenoids, Flavonoids, Chlorophylls, Phenolic Compounds And Antioxidant Activity In Fresh And Cooked Broccoli (*Brassica Oleracea* Var. Avenger) And Cauliflower (*Brassica Oleracea* Var. Alphina F1). *Lwt - Food Science And Technology*, 63, 177-183.

Ebmeyer, F. 2002. Theoretical Investigations Towards An Understanding Of The A-Pinene/Camphene Rearrangement. *Journal Of Molecular Structure: Theochem*, 582, 251-255.

El Asbahani, A., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. A., Casabianca, H., El Mousadik, A., Hartmann, D., Jilale, A. & Renaud, F. 2015. Essential Oils: From Extraction To Encapsulation. *International Journal Of Pharmaceutics*, 483, 220-243.

Elad, Y. 1997. Responses Of Plants To Infection By *Botrytis Cinerea* And Novel Means Involved In Reducing Their Susceptibility To Infection. *Biological Reviews*, 72, 381-422.

Emami, S., Fakhrjafary, M., Tafaghodi, M. & Hassanzadeh, M. 2010. Chemical Composition And Antioxidant Activities Of The Essential Oils Of Different Parts Of *Cupressus Arizona* Greene. *Journal Of Essential Oil Research*, 22, 193-199.

Endo, Y., Usuki, R. & Kaneda, T. 1985. Antioxidant Effects Of Chlorophyll And Pheophytin On The Autoxidation Of Oils In The Dark. I. Comparison Of The Inhibitory Effects. *Journal Of The American Oil Chemists' Society*, 62, 1375-1378.

Esquivel - González, B., Martínez, L. O. & Rutiaga-Quiñones, O. 2015. Microencapsulación Mediante Secado Por Aspersión De Compuestos Bioactivos. *Revista Iberoamericana De Tecnología Postcosecha*, 16, 180-192.

Falasca, A., Caprari, C., De Felice, V., Fortini, P., Saviano, G., Zollo, F. & Iorizzi, M. 2016. Gc-MS Analysis Of The Essential Oils Of *Juniperus Communis* L. Berries Growing Wild In The Molise Region: Seasonal Variability And In Vitro Antifungal Activity. *Biochemical Systematics And Ecology*, 69, 166-175.

Ferruzzi, M., Böhm, V., Courtney, P. & Schwartz, S. 2002. Antioxidant And Antimutagenic Activity Of Dietary Chlorophyll Derivatives Determined By Radical Scavenging And Bacterial Reverse Mutagenesis Assays. *Journal Of Food Science*, 67, 2589-2595.

Fichan, I., Larroche, C. & Gros, J. 1999. Water Solubility, Vapor Pressure, And Activity Coefficients Of Terpenes And Terpenoids. *Journal Of Chemical & Engineering Data*, 44, 56-62.

Filipowicz, N., Kamiński, M., Kurlenda, J., Asztemborska, M. & Ochocka, J. R. 2003. Antibacterial And Antifungal Activity Of Juniper Berry Oil And Its Selected Components. *Phytotherapy Research*, 17, 227-231.

Fink, J. K. 2017. *Reactive Polymers: Fundamentals And Applications: A Concise Guide To Industrial Polymers*, William Andrew.

Floreani, S. & Retamar, J. Terpenoids Of The Essential Oils From Species Of *Cupressus*. *Anales De La Asociacion Quimica Argentina*, 1982. Asoc Quimica Argentina Sanchez De Bustamante 1749, 1425 Buenos Aires, Argentina, 663-667.

Francesconi, R., Castellari, C. & Comelli, F. 2001. Densities, Viscosities, Refractive Indices, And Excess Molar Enthalpies Of Methyl Tert-Butyl Ether+ Components Of Pine Resins And Essential Oils At 298.15 K. *Journal Of Chemical & Engineering Data*, 46, 1520-1525.

García, R. T. 2015. *Obtención De Aceite Esencial De Citronela (Cymbopogon Winterianus) Extraído Por Arrastre Con Vapor A Escala Piloto: Estudio De La Influencia De Variables En El Rendimiento Y La Calidad Del Aceite.*

Gonzalez Jimenez, F. E. 2010. *Caracterizacion De Compuestos Fenolicos Presentes En La Semilla Y Aceite De Chia (Salvia Hispanica L.) Mediante Electroforesis Capilar.*

Grande-Tovar, C. D., Chaves-Lopez, C., Serio, A., Rossi, C. & Paparella, A. 2018. Chitosan Coatings Enriched With Essential Oils: Effects On Fungi Involve In Fruit Decay And Mechanisms Of Action. *Trends In Food Science & Technology*, 78, 61-71.

Guadarrama-Lezama, A. Y., Dorantes-Alvarez, L., Jaramillo-Flores, M. E., Pérez-Alonso, C., Niranjana, K., Gutiérrez-López, G. F. & Alamilla-Beltrán, L. 2012. Preparation And Characterization Of Non-Aqueous Extracts From Chilli (Capsicum Annuum L.) And Their Microencapsulates Obtained By Spray-Drying. *Journal Of Food Engineering*, 112, 29-37.

Guleria, S., Kumar, A. & Tiku, A. K. 2008. Chemical Composition And Fungitoxic Activity Of Essential Oil Of Thuja Orientalis L. Grown In The North-Western Himalaya. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 63, 211-214.

Gutiérrez Galicia, R. I. 2016. Extracción Del Aceite De Copal Y Su Aplicación En Productos Cosméticos.

Hernández, P. 2011. Encapsulación De Aceite Esencial De Clavo Para Su Aplicación En La Industria Alimentaria. *Universidad Católica San Antonio.*

Hong, E.-J., Na, K.-J., Choi, I.-G., Choi, K.-C. & Jeung, E.-B. 2004. Antibacterial And Antifungal Effects Of Essential Oils From Coniferous Trees. *Biological And Pharmaceutical Bulletin*, 27, 863-866.

Hoshina, C., Tomita, K. & Shioi, Y. 1998. Antioxidant Activity Of Chlorophylls: Its Structure-Activity Relationship. *Photosynthesis: Mechanisms And Effects.* Springer.

Ibrahim, T. A., Atef, A., El-Hefnawy, H. M., Al-Taweel, A. M. & Perveen, S. 2017. Chemical Composition And Antimicrobial Activities Of Essential Oils Of Some Coniferous Plants Cultivated In Egypt. *Iranian Journal Of Pharmaceutical Research: Ijpr*, 16, 328.

Jiménez, M., Domínguez, J. A., Pascual-Pineda, L. A., Azuara, E. & Beristain, C. I. 2018. Elaboration And Characterization Of O/W Cinnamon (*Cinnamomum Zeylanicum*) And Black Pepper (*Piper Nigrum*) Emulsions. *Food Hydrocolloids*, 77, 902-910.

Juárez-Becerra, G., Sosa-Morales, M. & López-Malo, A. 2010. Hongos Fitopatógenos De Alta Importancia Económica: Descripción Y Métodos De Control. *Temas Selectos De Ingeniería De Alimentos*, 4, 14-23.

Kalembe, D. & Kunicka, A. 2003. Antibacterial And Antifungal Properties Of Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10, 813-829.

Kang, Y.-R., Park, J., Jung, S. K. & Chang, Y. H. 2018. Synthesis, Characterization, And Functional Properties Of Chlorophylls, Pheophytins, And Zn-Pheophytins. *Food Chemistry*, 245, 943-950.

Kaur, G. & Mehta, S. 2017. Developments Of Polysorbate (Tween) Based Microemulsions: Preclinical Drug Delivery, Toxicity And Antimicrobial Applications. *International Journal Of Pharmaceutics*, 529, 134-160.

Khouaja, W., Oliveira, R., Raies, A. & Dias, A. C. P. Antifungal Activity Of The Essential Oils From *Cupressus Arizonica* Var. *Arizonica* And Var. *Glabra*. *Industrial Crops And Products*, 77, 614-623.

Knobloch, K., Pauli, A., Iberl, B., Weigand, H. & Weis, N. 1989. Antibacterial And Antifungal Properties Of Essential Oil Components. *Journal Of Essential Oil Research*, 1, 119-128.

Kuiate, J.-R., Bessiere, J. M., Zollo, P. H. A. & Kuate, S. P. 2006. Chemical Composition And Antidermatophytic Properties Of Volatile Fractions Of Hexanic Extract From Leaves Of *Cupressus Lusitanica* Mill. From Cameroon. *Journal Of Ethnopharmacology*, 103, 160-165.

Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J. & Fett, R. 2005. Aplicación De Diversos Métodos Químicos Para Determinar Actividad Antioxidante En Pulpa De Frutos. *Food Science And Technology*, 25, 726-732.

Kusumoto, N., Zhao, T., Swedjemark, G., Ashitani, T., Takahashi, K. & Borg - Karlson, A. K. 2014. Antifungal Properties Of Terpenoids In P Icea Abies Against H Eterobasidion Parviporum. *Forest Pathology*, 44, 353-361.

Lee, H.-R., Lee, S.-C., Lee, D. H., Choi, W.-S., Jung, C.-S., Jeon, J.-H., Kim, J.-E. & Park, I.-K. 2017. Identification Of The Aggregation-Sex Pheromone Produced By Male Monochamus Saltuarius, A Major Insect Vector Of The Pine Wood Nematode. *Journal Of Chemical Ecology*, 43, 670-678.

Lu, W.-C., Huang, D.-W., Wang, C.-C., Yeh, C.-H., Tsai, J.-C., Huang, Y.-T. & Li, P.-H. 2018. Preparation, Characterization, And Antimicrobial Activity Of Nanoemulsions Incorporating Citral Essential Oil. *Journal Of Food And Drug Analysis*, 26, 82-89.

Ludwiczuk, A., Skalicka-Woźniak, K. & Georgiev, M. 2017. Terpenoids. *Pharmacognosy*. Elsevier.

Mackinney, G. 1941. Absorption Of Light By Chlorophyll Solutions. *J. Biol. Chem*, 140, 315-322.

Mamo, N. & Sterba, H. 2006. Site Index Functions For Cupressus Lusitanica At Munesa Shashemene, Ethiopia. *Forest Ecology And Management*, 237, 429-435.

Marr, I. L., Suryana, N., Lukulay, P. & Marr, M. I. 1995. Determination Of Chlorophyll A And B By Simultaneous Multi-Component Spectrophotometry. *Fresenius' Journal Of Analytical Chemistry*, 352, 456-460.

Martínez-Ruiz, F. E., Cervantes-Díaz, L., Aíl-Catzím, C. E., Hernández-Montiel, L. G., Sánchez, C. L. D. T. & Rueda-Puente, E. O. 2016. Hongos Fitopatógenos Asociados Al Tomate (*Solanum Lycopersicum* L.) En La Zona Árida Del Noroeste De México: La Importancia De Su Diagnóstico. *European Scientific Journal*, Esj, 12, 232.

Martins, I. M., Barreiro, M. F., Coelho, M. & Rodrigues, A. E. 2014. Microencapsulation Of Essential Oils With Biodegradable Polymeric Carriers For Cosmetic Applications. *Chemical Engineering Journal*, 245, 191-200.

Martins, S., Mussatto, S. I., Martínez-Avila, G., Montañez-Saenz, J., Aguilar, C. N. & Teixeira, J. A. 2011. Bioactive Phenolic Compounds: Production And Extraction By Solid-State Fermentation. A Review. *Biotechnology Advances*, 29, 365-373.

Mcclements, D. 2000. Comments On Viscosity Enhancement And Depletion Flocculation By Polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 14, 173-177.

Mercier, B., Prost, J. & Prost, M. 2009. The Essential Oil Of Turpentine And Its Major Volatile Fraction (A-And B-Pinenes): A Review. *International Journal Of Occupational Medicine And Environmental Health*, 22, 331-342.

Mun, S. P. & Prewitt, L. 2011. Antifungal Activity Of Organic Extracts From Juniperus Virginiana Heartwood Against Wood Decay Fungi. *Forest Products Journal*, 61, 443-449.

Muñoz, J., Alfaro, M. & Zapata, I. 2007. Avances En La Formulación De Emulsiones. *Grasas Aceites*, 58, 64-73.

Netzahuatl-Muñoz, A. R., Guillén-Jiménez, F. D. M., Chávez-Gómez, B., Villegas-Garrido, T. L. & Cristiani-Urbina, E. 2012. Kinetic Study Of The Effect Of Ph On Hexavalent And Trivalent Chromium Removal From Aqueous Solution By Cupressus Lusitanica Bark. *Water, Air, & Soil Pollution*, 223, 625-641.

Nikitina, L., Startseva, V., Artemova, N., Dorofeeva, L. Y., Kuznetsov, I., Lisovskaya, S., Glushko, N. & Kutyreva, M. 2012. Synthesis And Antifungal Activity Of Monoterpenoids Of The Carane Series. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 45, 664-667.

Nuzhat, T. & Vidyasagar, G. 2014. Antifungal Investigations On Plant Essential Oils. A Review.

Parra Huertas, R. A. 2010. Food Microencapsulation: A Review. *Revista Facultad Nacional De Agronomía, Medellín*, 63, 5669-5684.

Parshikov, I. A. & Sutherland, J. B. 2014. The Use Of *Aspergillus Niger* Cultures For Biotransformation Of Terpenoids. *Process Biochemistry*, 49, 2086-2100.

Pérez-Nájera, V., Lugo-Cervantes, E., Gutiérrez-Lomelí, M. & Del-Toro-Sánchez, C. L. 2013. Extracción De Compuestos Fenólicos De La Cáscara De Lima (*Citrus Limetta* Risso) Y Determinación De Su Actividad Antioxidante. *Biotechnia*, 15, 18-22.

Pinelo, M., Rubilar, M., Sineiro, J. & Núñez, M. J. 2004. Extraction Of Antioxidant Phenolics From Almond Hulls (*Prunus Amygdalus*) And Pine Sawdust (*Pinus Pinaster*). *Food Chemistry*, 85, 267-273.

Portilla-Rivera, O. M., Torrado, A. M., Domínguez, J. M. & Moldes, A. B. 2010. Stabilization Of Kerosene/Water Emulsions Using Bioemulsifiers Obtained By Fermentation Of Hemicellulosic Sugars With *Lactobacillus Pentosus*. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 58, 10162-10168.

Poveda Parra, D. C. 2006. *Selección De Extractos Fúngicos Extracelulares (Efe) Con Potencial Para El Control De Botrytis Cinérea En Tomate (Lycopersicon Esculentum Mill)*.

Prakash, B., Kujur, A., Yadav, A., Kumar, A., Singh, P. P. & Dubey, N. K. 2018. Nanoencapsulation: An Efficient Technology To Boost The Antimicrobial Potential Of Plant Essential Oils In Food System. *Food Control*, 89, 1-11.

Prasanna, P. H. P., Bell, A., Grandison, A. S. & Charalampopoulos, D. 2012. Emulsifying, Rheological And Physicochemical Properties Of Exopolysaccharide Produced By *Bifidobacterium Longum* Subsp. *Infantis* Ccug 52486 And *Bifidobacterium Infantis* Ncimb 702205. *Carbohydrate Polymers*, 90, 533-540.

Rasooli, I., Rezaei, M. B. & Allameh, A. 2006. Growth Inhibition And Morphological Alterations Of *Aspergillus Niger* By Essential Oils From *Thymus Eriocalyx* And *Thymus X-Porlock*. *Food Control*, 17, 359-364.

Raynie, D. 2000. Extraction, The Procter & Gamble Company, Cincinnati, Oh. Usa, Academic Press.

Reyes-Ocampo, I., González-Brambila, M. & López-Isunza, F. 2013. Un Análisis Del Metabolismo De *Aspergillus Niger* Creciendo Sobre Un Sustrato Sólido. *Revista Mexicana De Ingeniería Química*, 12, 41-56.

Reyes Ramírez, A., Alejo, J. C., Ruiz Sánchez, E. & Tun Suárez, J. M. 2012. Inhibición Del Crecimiento In Vitro De *Fusarium Sp.* Aislado De Chile Habanero (*Capsicum Chinensis*) Con Hongos Antagonistas. *Fitosanidad*, 16.

Rguez, S., Djéballi, N., Slimene, I. B., Abid, G., Hammemi, M., Chenenaoui, S., Bachkouel, S., Daami-Remadi, M., Ksouri, R. & Hamrouni-Sellami, I. 2018. Cupressus Sempervirens Essential Oils And Their Major Compounds Successfully Control Postharvest Grey Mould Disease Of Tomato. *Industrial Crops And Products*, 123, 135-141.

Ribes, S., Fuentes, A., Talens, P. & Barat, J. M. 2018. Combination Of Different Antifungal Agents In Oil-In-Water Emulsions To Control Strawberry Jam Spoilage. *Food Chemistry*, 239, 704-711.

Ribes, S., Fuentes, A., Talens, P., Barat, J. M., Ferrari, G. & Donsì, F. 2017. Influence Of Emulsifier Type On The Antifungal Activity Of Cinnamon Leaf, Lemon And Bergamot Oil Nanoemulsions Against *Aspergillus Niger*. *Food Control*, 73, 784-795.

Roessner, U., Wagner, C., Kopka, J., Trethewey, R. N. & Willmitzer, L. 2000. Simultaneous Analysis Of Metabolites In Potato Tuber By Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *The Plant Journal*, 23, 131-142.

Saeed, I., Shaheen, S., Hussain, K., Khan, M., Jaffer, M., Mahmood, T., Khalid, S., Sarwar, S., Tahir, A. & Khan, F. 2018. Assessment Of Mold And Yeast In Some Bakery Products Of Lahore, Pakistan Based On Lm And Sem. *Microscopy Research And Technique*, 82.

Salgın, U. & Salgın, S. 2013. Effect Of Main Process Parameters On Extraction Of Pine Kernel Lipid Using Supercritical Green Solvents: Solubility Models And Lipid Profiles. *The Journal Of Supercritical Fluids*, 73, 18-27.

Sandoval-Peraza, V. M., Cu-Cañetas, T., Peraza-Mercado, G. & Acereto-Escoffié, P. O. M. 2017. Introducción En Los Procesos De Encapsulación De Moléculas Nutraceuticas. *Omniscience Monographs*.

Santos Filho, F. C., Amaral, L. D. S. & Rodrigues-Filho, E. 2011. Composition Of Essential Oils From Cupressus Lusitanica And A Xylariaceous Fungus Found On Its Leaves. *Biochemical Systematics And Ecology*, 39, 485-490.

Sbihi, H. M., Nehdi, I. A., Mokbli, S., Romdhani-Younes, M. & Al-Resayes, S. I. 2018. Hexane And Ethanol Extracted Seed Oils And Leaf Essential Compositions From Two Castor Plant (*Ricinus Communis L.*) Varieties. *Industrial Crops And Products*, 122, 174-181.

Singh, D. & Sharma, R. R. 2018. Chapter 1 - Postharvest Diseases Of Fruits And Vegetables And Their Management. *In: Siddiqui, M. W. (Ed.) Postharvest Disinfection Of Fruits And Vegetables*. Academic Press.

Singh, G., Maurya, S., Catalan, C. & De Lampasona, M. 2004. Chemical Constituents, Antifungal And Antioxidative Effects Of Ajwain Essential Oil And Its Acetone Extract. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 52, 3292-3296.

Singh, N. 2001. Trends In The Epidemiology Of Opportunistic Fungal Infections: Predisposing Factors And The Impact Of Antimicrobial Use Practices. *Clinical Infectious Diseases*, 33, 1692-1696.

Skoog, D. A., Holler, F. J. & Nieman, T. A. 2001. *Principios De Análisis Instrumental*, Mcgraw-Hill Interamericana De España.

Soldevilla, C., Vázquez, C., Patiño, B., Jurado, M. & González-Jaén, M. 2005. Hongos Toxicogénicos Asociados A Trigos Y Cebadas De Castilla Y León. *Rev Bol Sanveg Plagas*, 31, 519-529.

Song, B., Zhu, W., Song, R., Yan, F. & Wang, Y. 2019. Exopolysaccharide From *Bacillus Vallismortis Wf4* As An Emulsifier For Antifungal And Antipruritic Peppermint Oil Emulsion. *International Journal Of Biological Macromolecules*, 125, 436-444.

Song, X., Zuo, G. & Chen, F. 2018. Effect Of Essential Oil And Surfactant On The Physical And Antimicrobial Properties Of Corn And Wheat Starch Films. *International Journal Of Biological Macromolecules*, 107, 1302-1309.

Soylu, E. M., Kurt, Ş. & Soylu, S. 2010. In Vitro And In Vivo Antifungal Activities Of The Essential Oils Of Various Plants Against Tomato Grey Mould Disease Agent *Botrytis Cinerea*. *International Journal Of Food Microbiology*, 143, 183-189.

Tadros, T. F. 2009. *Emulsion Science And Technology: A General Introduction*, Wiley-Vch: Weinheim.

Taniwaki, M. H., Pitt, J. I. & Magan, N. 2018. *Aspergillus* Species And Mycotoxins: Occurrence And Importance In Major Food Commodities. *Current Opinion In Food Science*, 23, 38-43.

Tongnuanchan, P. & Benjakul, S. 2014. Essential Oils: Extraction, Bioactivities, And Their Uses For Food Preservation. *Journal Of Food Science*, 79, R1231-R1249.

Tumen, I., Eller, F. J., Clausen, C. A. & Teel, J. A. 2012. Antifungal Activity Of Heartwood Extracts From Three *Juniperus* Species. *Bioresources*, 8, 12-20.

Ulukanli, Z., Karabörklü, S., Bozok, F., Burhan, A., Erdogan, S., Cenet, M. & Karaaslan, M. G. 2014. Chemical Composition, Antimicrobial, Insecticidal, Phytotoxic And Antioxidant Activities Of Mediterranean *Pinus Brutia* And *Pinus Pinea* Resin Essential Oils. *Chinese Journal Of Natural Medicines*, 12, 901-910.

Valdez, M., Acedo-Carrillo, J., Rosas-Durazo, A., Lizardi, J., Rinaudo, M. & Goycoolea, F. 2006. Small-Deformation Rheology Of Mesquite Gum Stabilized Oil In Water Emulsions. *Carbohydrate Polymers*, 64, 205-211.

Valle, D. L., Puzon, J. J. M., Cabrera, E. C. & Rivera, W. L. 2016. Thin Layer Chromatography-Bioautography And Gas Chromatography-Mass Spectrometry Of Antimicrobial Leaf Extracts From Philippine Piper Betle L. Against Multidrug-Resistant Bacteria. *Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine*, 2016.

Van Der Werf, M. J., De Bont, J. A. & Leak, D. J. 1997. Opportunities In Microbial Biotransformation Of Monoterpenes. *Biotechnology Of Aroma Compounds*. Springer.

Vuolo, M. M., Lima, V. S. & Maróstica Junior, M. R. 2019. Chapter 2 - Phenolic Compounds: Structure, Classification, And Antioxidant Power. *In: Campos, M. R. S. (Ed.) Bioactive Compounds*. Woodhead Publishing.

Wang, H., Yang, Z., Ying, G., Yang, M., Nian, Y., Wei, F. & Kong, W. 2018. Antifungal Evaluation Of Plant Essential Oils And Their Major Components Against Toxigenic Fungi. *Industrial Crops And Products*, 120, 180-186.

Watson, J. T. & Sparkman, O. D. 2007. Introduction To Mass Spectrometry, Instrumentation, Application, And Strategies For Data Interpretation. *West Sussex: John Wiley & Sons*.

Watt, M. S., Palmer, D. J., Dungey, H. & Kimberley, M. O. 2009. Predicting The Spatial Distribution Of Cupressus Lusitanica Productivity In New Zealand. *Forest Ecology And Management*, 258, 217-223.

Wu, Z., Wu, J., Zhang, R., Yuan, S., Lu, Q. & Yu, Y. 2018. Colloid Properties Of Hydrophobic Modified Alginate: Surface Tension, Z-Potential, Viscosity And Emulsification. *Carbohydrate Polymers*, 181, 56-62.

Wucherpennig, T., Hestler, T. & Krull, R. 2011. Morphology Engineering - Osmolality And Its Effect On Aspergillus Niger Morphology And Productivity. *Microbial Cell Factories*, 10, 58.

Yu, D., Wang, J., Shao, X., Xu, F. & Wang, H. 2015. Antifungal Modes Of Action Of Tea Tree Oil And Its Two Characteristic Components Against Botrytis Cinerea. *Journal Of Applied Microbiology*, 119, 1253-1262.

Zhang, Z.-H., Peng, H., Ma, H. & Zeng, X.-A. 2019. Effect Of Inlet Air Drying Temperatures On The Physicochemical Properties And Antioxidant Activity Of Whey Protein Isolate-Kale Leaves Chlorophyll (Wpi-Ch) Microcapsules. *Journal Of Food Engineering*, 245, 149-156.

Zhu, Z., Wen, Y., Yi, J., Cao, Y., Liu, F. & McClements, D. J. 2019. Comparison Of Natural And Synthetic Surfactants At Forming And Stabilizing Nanoemulsions: Tea Saponin, Quillaja Saponin, And Tween 80. *Journal Of Colloid And Interface Science*, 536, 80-87.

Zhuang, X., Zhang, Z., Wang, Y. & Li, Y. 2018. The Effect Of Alternative Solvents To N-Hexane On The Green Extraction Of Litsea Cubeba Kernel Oils As New Oil Sources. *Industrial Crops And Products*, 126, 340-346.

Ziani, K., Chang, Y., McLandsborough, L. & McClements, D. J. 2011. Influence Of Surfactant Charge On Antimicrobial Efficacy Of Surfactant-Stabilized Thyme Oil Nanoemulsions. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 59, 6247-6255.

VI. ANEXOS

Anexo 1: Composición química del aceite extraído con hexano

Nº pico	Tiempo de retención (min)	Componente	Formula	Contenido relativo %		
				H ₁	H ₂	H ₃
1	5.309	Tricyclo[2.2.1.0(2,6)]heptane.1,7,7-trimethyl-	C ₁₀ H ₁₆	33.49	29.61	23.56
2	5.919	Bicyclo [3,1,1]heptane. 6,6-dimethyl-2-methylene-, (1S)-	C ₁₀ H ₁₆	1.03	0.71	0.55
3	5.973	β-Pinene	C ₁₀ H ₁₆	1.33	1.08	0.81
4	6.135	β-Myrcene	C ₁₀ H ₁₆	2.18	1.87	1.87
5	6.525	3-Carene	C ₁₀ H ₁₆	10.26	8.56	7.76
6	6.778	D-Limonene	C ₁₀ H ₁₆	1.47	1.53	1.28
7	7.015	β-Ocimene	C ₁₀ H ₁₆	0.34	0.34	0.36
8	7.697	Cyclohexene, 3-methyl-6-(1-methylethylidene)	C ₁₀ H ₁₆	0.35	0.40	0.37
9	9.067	m-Cymen-8-ol	C ₁₀ H ₁₄ O	0.49	0.47	0.50
10	9.252	L-α-Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	0.65	0.70	0.73
11	9.760	6-Octen-1-ol, 3,7-dimethyl-, (R)-	C ₁₀ H ₂₀ O	0.21	0.20	0.27
12	10.677	Bornyl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	0.37	0.41	0.45
13	11.634	α-Terpinyl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	0.30	0.31	0.36
14	13.245	Caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	1.22	1.23	1.54
15	13.862	1,4,7,-Cycloundecatriene.1,5,9,9-tetramethyl-, Z,Z,Z-	C ₁₅ H ₂₄	0.89	0.80	1.03
16	14.119	α-Copaene	C ₁₅ H ₂₄	0.28	0.40	0.49
17	15.947	Caryophyllene oxide	C ₁₅ H ₂₄	0.47	0.58	0.62
18	16.341	(1R,3E,7E,11R)-1,5,5,8-Tetramethyl-12-oxabicyclo[9,1,0]dodeca-3,7-diene	C ₁₅ H ₂₄ O	0.51	0.59	0.65
19	20.854	Pentadecanoic acid	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	0.46	0.38	0.38
20	21.291	Cycloheptane, 4-methylene-1-methyl-2-(2-methyl-1-propen-1-yl)-1-vinyl	C ₁₅ H ₂₄	0.56	0.66	0.67
21	21.591	Thunbergol	C ₂₀ H ₃₄ O	1.08	1.24	1.39
22	21.986	7-Isopropyl-1,1,4a-trimethyl-1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahydrophenanthrene	C ₂₀ H ₃₀	0.52	0.58	0.65
23	23.263	Andrographolide	C ₂₀ H ₃₀ O ₅	7.70	8.92	10.22
24	23.632	Bicyclo[4,3,0]nonane, 7-methylene-2,4,4-trimethyl-2-vinyl	C ₁₅ H ₂₄	5.36	6.10	7.00
25	24.127	1,4-Dimethyl-7-(prop-1-en-2-yl)decahydroazulen-4-ol	C ₁₅ H ₂₆ O	0.74	0.73	0.87
26	24.888	Ferruginol	C ₂₀ H ₃₀ O	7.70	9.32	11.23
27	26.012	(1S,4aR,5S,8aR)-1,4a-Dimethyl-6-methylene-5-((E)-3-methylpenta-2,4-dien-1-yl)decahydronaphthalene-1-carboxylic acid	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	20.05	22.16	24.37

Anexo 2: Composición química del aceite extraído con etanol.

N° pico	Tiempo de retención (min)	Componente	Formula	Contenido relativo %		
				E ₁	E ₂	E ₃
1	5.271	(1R)-2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene	C ₁₀ H ₁₆	0.40	1.51	1.86
2	8.471	Bicyclo[3.1.1]heptan-3-ol, 6,6-dimethyl-2-methylene-, [1S-(1 α ,3 α ,5 α)]-	C ₁₀ H ₁₆ O	1.49	0.20	0.52
3	9.175	Verbenyl ethyl ether	C ₁₂ H ₂₀ O	2.73	0.59	1.19
4	9.407	Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-one, 4,6,6-trimethyl-, (1S)-	C ₁₀ H ₁₄ O	0.89	0.27	0.52
5	9.639	trans-Carveol	C ₁₀ H ₁₆ O	0.55	0.46	0.45
6	10.677	Bornyl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	0.30	0.61	1.32
7	15.950	Caryophyllene oxide	C ₁₅ H ₂₄	1.38	1.48	2.75
8	16.588	Isospathulenol	C ₁₅ H ₂₄ O	0.43	1.23	0.39
9	19.603	Globulol	C ₁₅ H ₂₆ O	0.80	0.26	0.10
10	20.864	Pentadecanoic acid	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	0.99	1.20	1.17
11	21.189	Pentadecanoic acid, ethyl ester	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	1.50	1.80	4.11
12	21.602	Thunbergol	C ₂₀ H ₃₄ O	1.05	1.84	3.6
13	22.049	(E)-3-Methyl-5-((1R,4aR,8aR)-5,5,8a-trimethyl-2-methylenedecahydronaphthalen-1-yl)pent-2-en-1-ol	C ₂₀ H ₃₄ O	0.82	0.27	0.74
14	23.247	Andrographolide	C ₂₀ H ₃₀ O ₅	10.96	14.28	10.8
15	23.601	Bicyclo[4.3.0]nonane, 7-methylene-2,4,4-trimethyl-2-vinyl-	C ₁₅ H ₂₄	7.47	10.25	14.4
16	24.115	1,4-Dimethyl-7-(prop-1-en-2-yl)decahydroazulen-4-ol	C ₁₅ H ₂₆ O	2.13	1.55	1.55
17	24.858	Ferruginol	C ₂₀ H ₃₀ O	21.78	20.97	12.87
18	25.880	(1S,4aR,5S,8aR)-1,4a-Dimethyl-6-methylene-5-((E)-3-methylpenta-2,4-dien-1-yl)decahydronaphthalene-1-carboxylic acid	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	40.86	40.00	40.00
19	26.608	9(1H)-Phenanthrenone, 2,3,4,4a,10,10a-hexahydro-6-hydroxy-1,1,4a-trimethyl-7-(1-methylethyl)-, (4aS-trans)-	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	3.47	1.23	1.09

Anexo 3: Graficas del crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* y *Aspergillus niger*

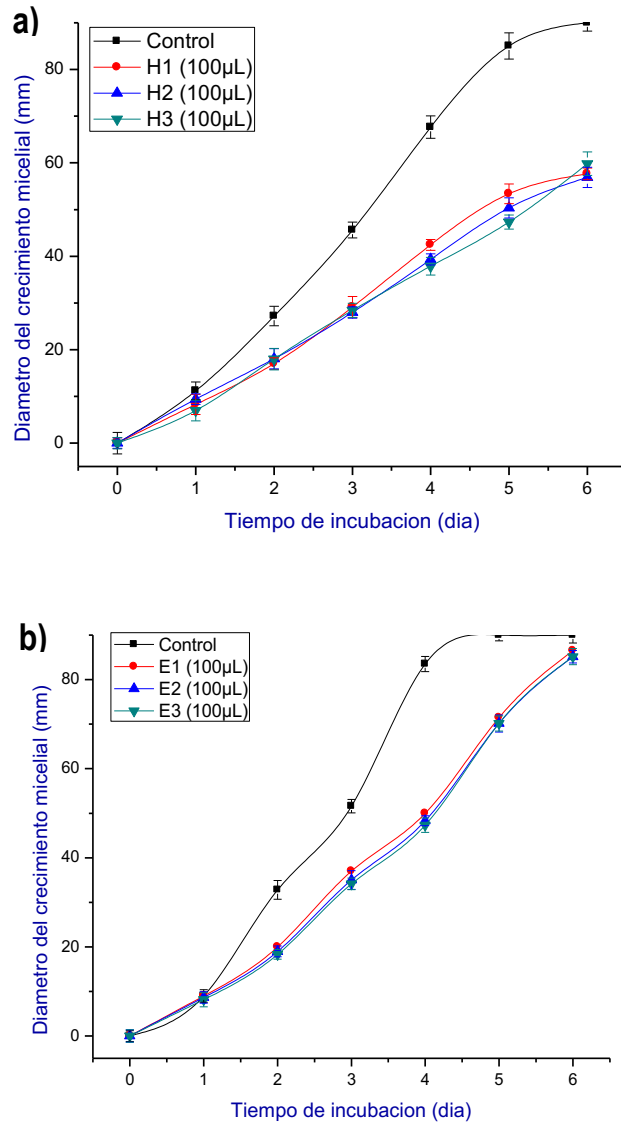


Figura 15. Crecimiento micelial *Botrytis cinerea* con la adición 100µL de CSO en a) hexano y b) etanol.

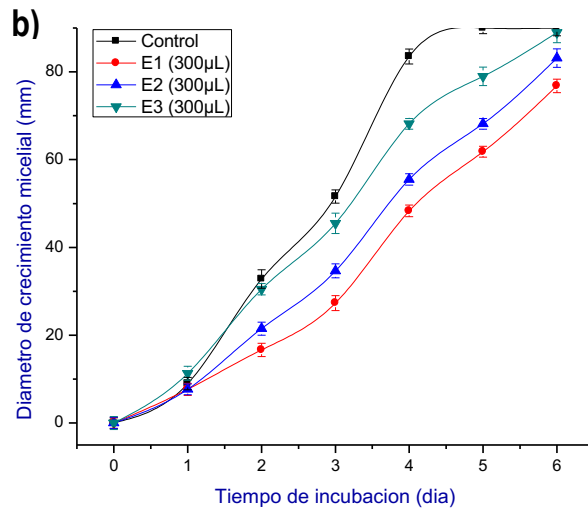
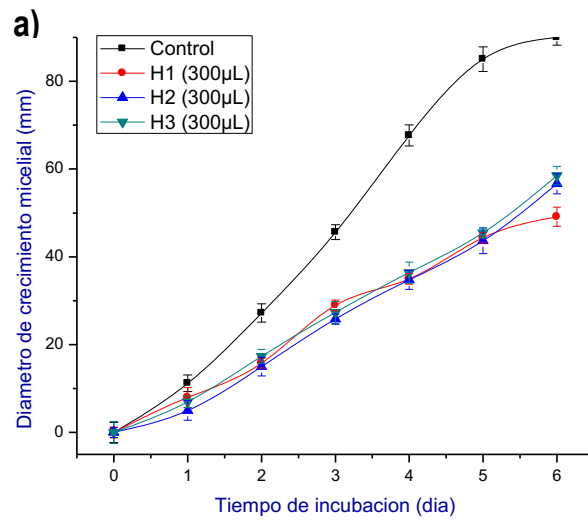


Figura 16. Crecimiento micelial *Botrytis cinerea* con la adición de 300μL CSO en a) hexano y b) etanol.

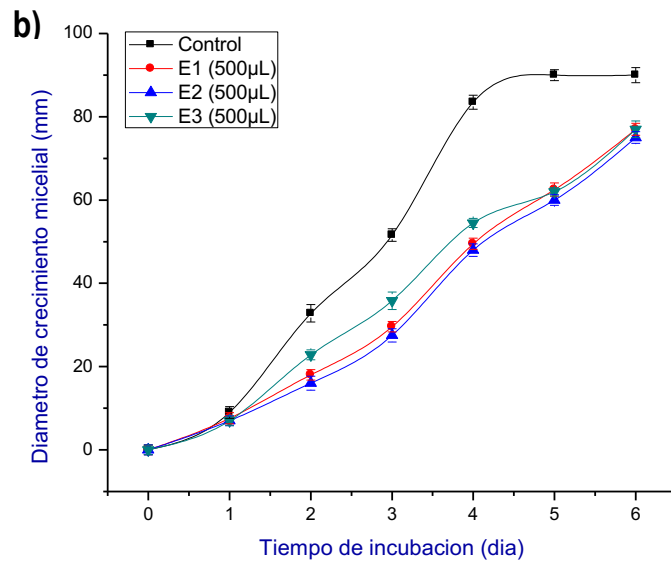
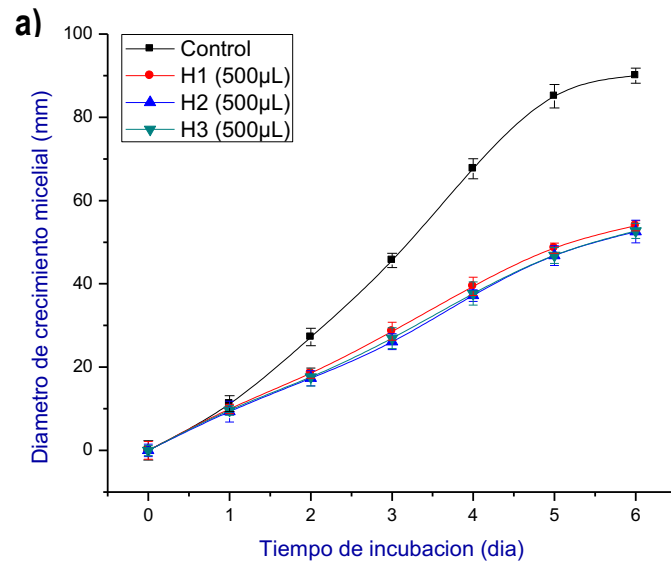


Figura 17. Crecimiento micelial *Botrytis cinerea* con la adición de 500µL CSO en a) hexano y b) etanol.

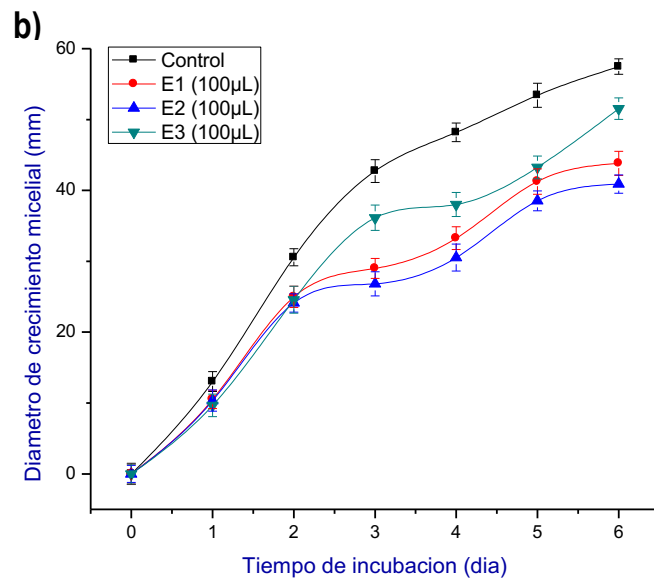
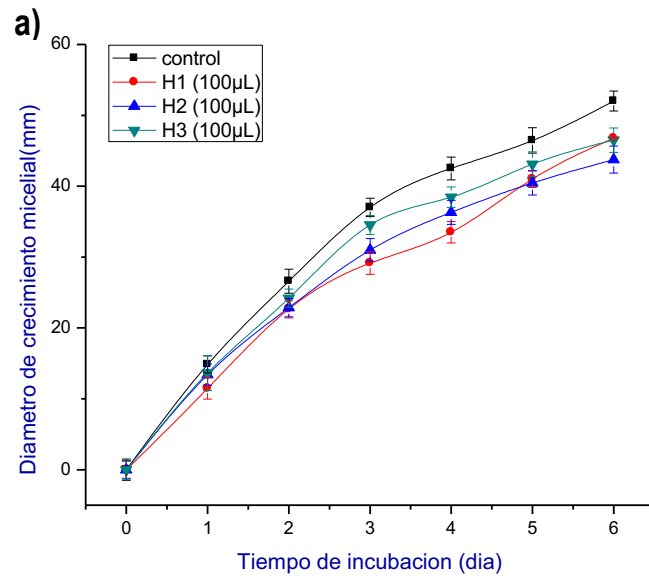


Figura 18. Crecimiento micelial *Aspergillus niger* con la adición de 100µL CSO en a) hexano y b) etanol.

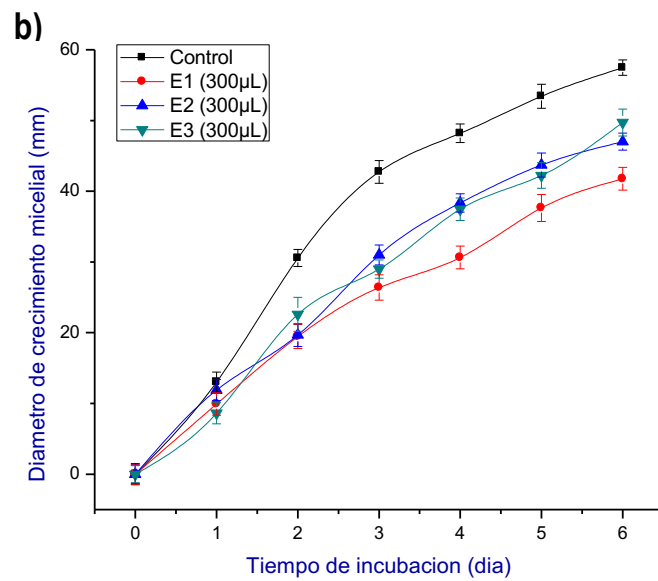
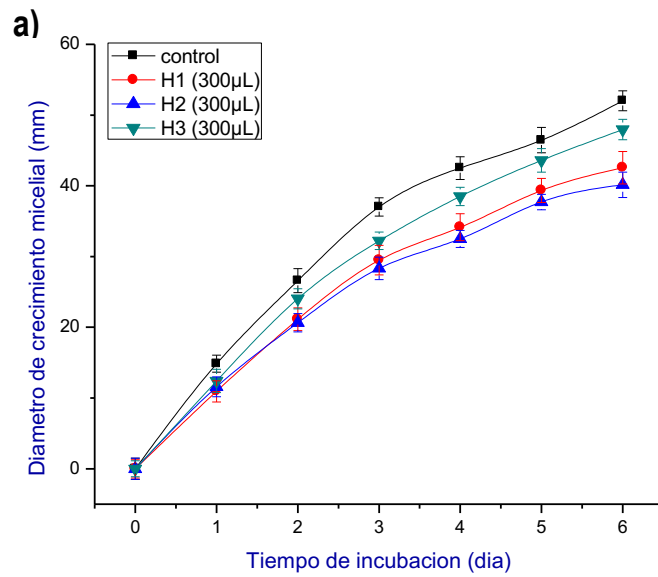


Figura 19. Crecimiento micelial *Aspergillus niger* con la adición de 300µL CSO en a) hexano y b) etanol.

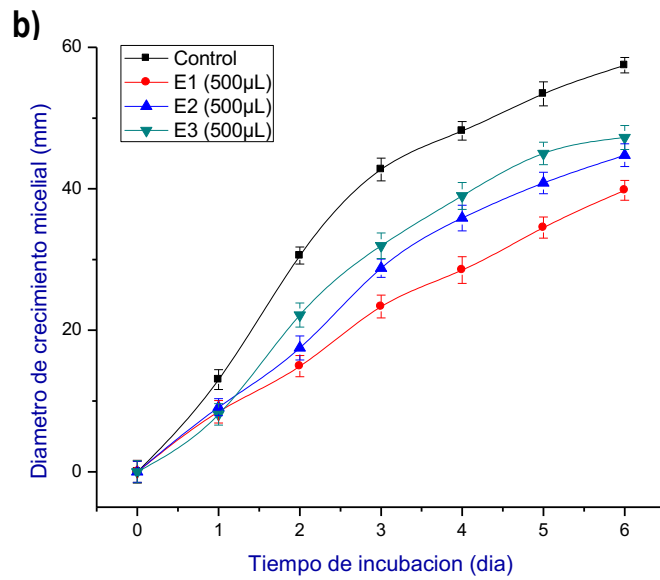
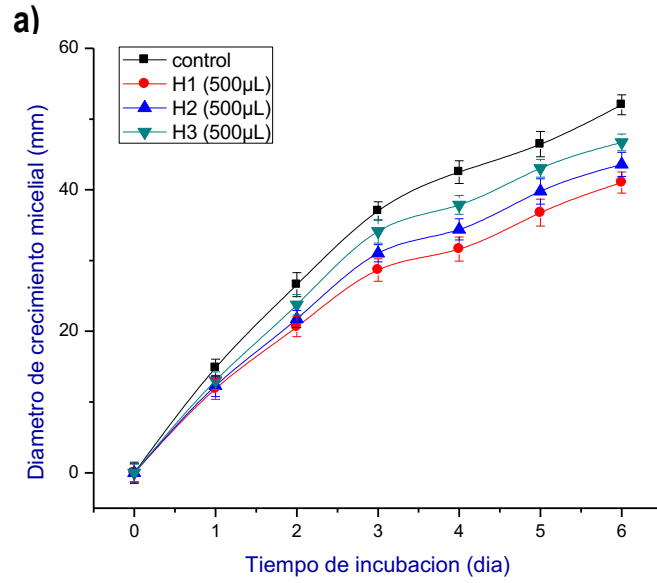


Figura 20. Crecimiento micelial *Aspergillus niger* con la adición de 500μL CSO en a) hexano y b) etanol.

Anexo 4: Crecimiento micelial de los hongos con la adición de las emulsiones

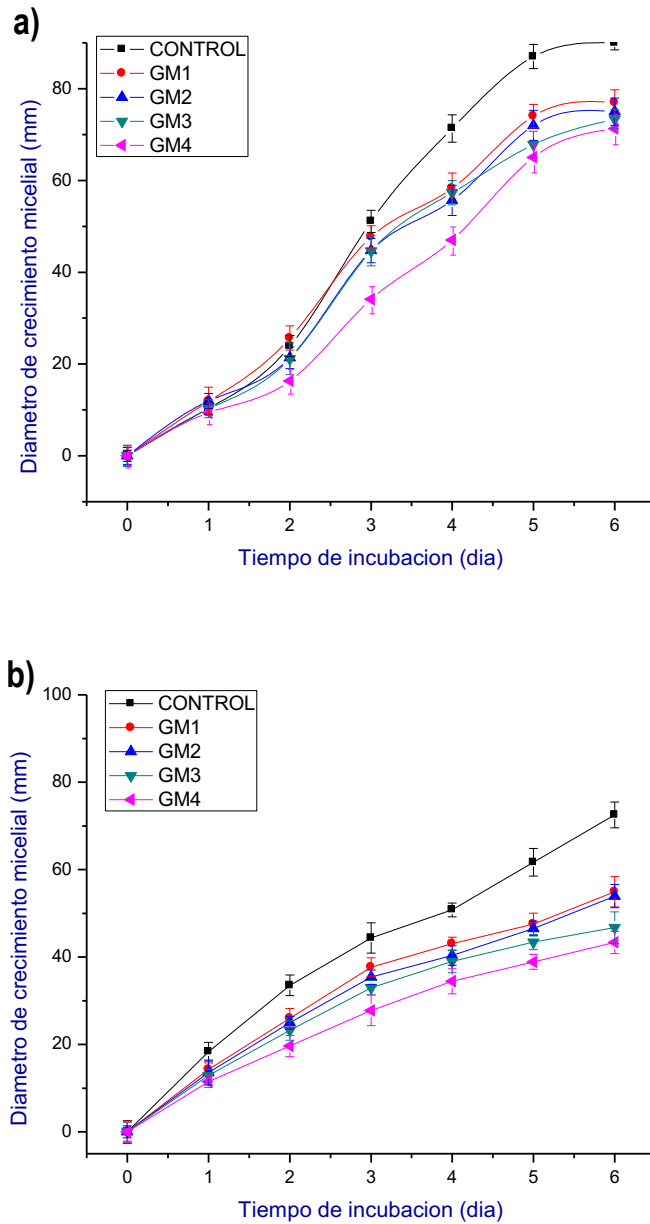


Figura 21 Crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* (a) y *Aspergillus niger* (b) con la adición de las emulsiones de Goma de Mezquite y aceite.

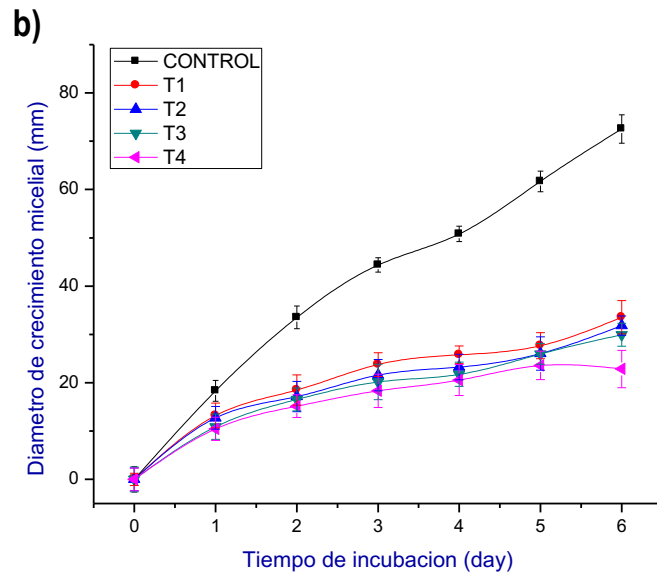
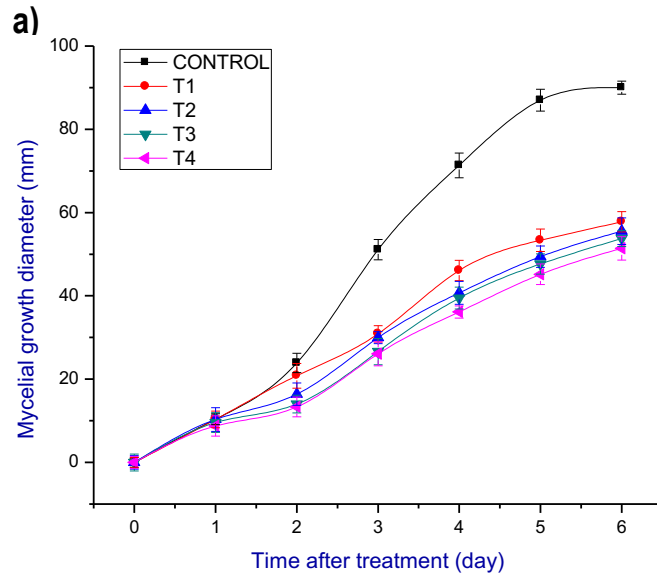


Figura 22 Crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* (a) y *Aspergillus niger* (b) con la adición de las emulsiones de Tween 80 y aceite.

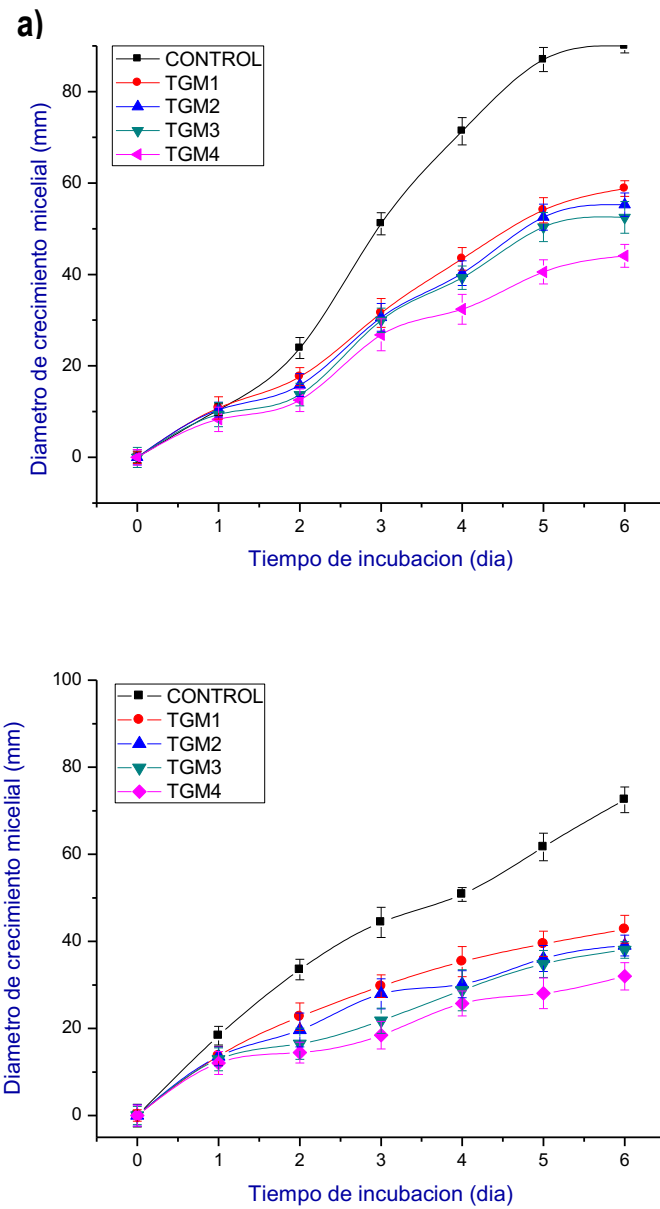


Figura 23. Crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* (a) y *Aspergillus niger* (b) con la adición de las emulsiones de la mezcla de Tween 80 con Goma de Mezquite y aceite.

Anexo 5: Composición química de las emulsiones de CSO.

Compuesto	Aceite				Emulsión									
	H ₁	GM ₁	GM ₂	GM ₃	GM ₄	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	TGM ₁	TGM ₂	TGM ₃	TGM ₄	
(±)-β-Pineno	1.03	3.89	-	0.66	0.52	-	-	0.64	-	-	-	-	-	
β-Pineno	1.33	-	-	0.16	0.21	-	0.19	0.21	0.09	0.24	0.09	0.2	-	
m-Cimen-8-ol	0.34	1.02	-	0.8	0.56	0.63	0.79	0.68	0.31	0.59	-	0.52	0.59	
L-α-Terpineol	0.65	1.38	0.26	1.2	0.84	0.94	1.52	1.24	0.45	1.01	0.48	1	1.02	
citronellol	0.21	-	-	-	-	-	-	0.21	-	-	-	0.22	-	
Bornil acetato	0.37	1.03	-	1.16	0.83	-	1.48	1.12	0.31	1.26	0.36	0.87	0.62	
Oxide de cariofileno	0.47	4.53	0.69	4.54	3.89	2.35	6.27	4.17	1.24	3.59	1.82	3.37	2.48	
Humuleno	0.51	3.26	0.6	3.42	2.36	1.89	4.68	3.06	0.92	2.45	1.46	2.5	1.89	
Ácido pentadecanoico	0.46	9.17	6.16	5.59	3.44	4.97	3.17	4.16	1.68	5.09	2.77	5.15	2.87	
Andrografolido	7.7	5.78	0.92	7.17	5.22	-	10.78	3.19	1.69	7.47	2.75	7.18	4.18	
Ferruginol	7.7	25.33	5.11	33.23	13.2	9.83	29.44	27.38	6.69	22.1	24.1	27.11	20.3	
Ácido communico	20.05	8.24	-	10.9	4.43	7.07	10.54	11.18	2.95	12.37	3.58	18.76	4.4	