



Evaluación comparativa del efecto inhibitorio de aceites esenciales extraídos de la naranja (Citrus sinensis) en diferentes etapas de madurez sobre Lasiodiplodia theobromae bajo condiciones in vitro

Comparative evaluation of the inhibitory effect of essential oils extracted from orange (Citrus sinensis) at different stages of maturity on Lasiodiplodia theobromae under in vitro conditions

Avaliação comparativa do efeito inibitório de óleos essenciais extraídos de laranja (Citrus sinensis) em diferentes estados de maturação sobre Lasiodiplodia theobromae em condições in vitro

Loguard Smith Rojas-Uribe ^I

lrojas@uteq.edu.ec

<https://orcid.org/0000-0001-8971-0292>

Angie Anahí Álvarez-Aspiazu ^{II}

kattia.pinos2015@uteq.edu.ec

<https://orcid.org/0009-0006-2274-0538>

Edison Geovanny Díaz-Campozano ^{III}

ediazc2@uteq.edu.ec

<https://orcid.org/0000-0003-3639-4040>

Denis Kevin Cárdenas-Briones ^{IV}

denis.cardenas2016@uteq.edu.ec

<https://orcid.org/0009-0003-9357-8927>

Correspondencia: ediazc2@uteq.edu.ec

Ciencias Técnicas y Aplicadas
Artículo de Investigación

* **Recibido:** 11 de julio de 2025 * **Aceptado:** 14 de agosto de 2025 * **Publicado:** 12 de septiembre de 2025

- I. Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Quevedo, Los Ríos, Ecuador.
- II. Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Quevedo, Los Ríos, Ecuador.
- III. Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Quevedo, Los Ríos, Ecuador.
- IV. Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Quevedo, Los Ríos, Ecuador.

Resumen

El presente trabajo forma parte del proyecto investigativo de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo "Extracción del aceite esencial de limón (*Citrus limón*) y naranja (*Citrus sinensis*) con potencial efecto inhibitorio en hongos que afectan la calidad del cacao y chocolate". El estudio tuvo como propósito evaluar de manera comparativa el efecto inhibitorio de aceites esenciales extraídos de cáscara de naranja (*Citrus sinensis*) en dos etapas de madurez (inmadura y madura) sobre el crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae* bajo condiciones in vitro. Los aceites esenciales se obtuvieron mediante destilación por arrastre de vapor a partir de cáscaras recolectadas en Quevedo (Los Ríos, Ecuador) en dos estados de madurez (inmadura y madura). Posteriormente, se caracterizó su composición química mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). El diseño experimental se basó en un esquema factorial (2×4), considerando dos niveles de madurez (E1: inmadura y E2: madura) y cuatro concentraciones del aceite (0 %, 50 %, 75 % y 100 %), con tres repeticiones por tratamiento. Las variables analizadas fueron rendimiento de aceite esencial, diámetro del micelio, crecimiento micelial e inhibición del crecimiento micelial. La caracterización química mostró que el aceite de frutos inmaduros estuvo dominado por d-limoneno (79,7 %) y linalool (7,4 %), mientras que en frutos maduros se redujo la fracción de hidrocarburos (limoneno 38,6 %) y se incrementaron los compuestos oxigenados, destacando el linalool (29,3 %). El rendimiento de aceite fue significativamente mayor en frutos inmaduros (2,21 mL; 0,76 %) que en maduros (1,81 mL; 0,65 %). En las evaluaciones de crecimiento micelial, el factor estado de madurez no mostró efectos significativos ($p > 0,05$). En contraste, el factor concentración sí presentó diferencias altamente significativas, con la mayor inhibición en el tratamiento al 100 %. Los valores de inhibición fueron de 100 % a 24 h, 83,96 % a 48 h y 41,75 % a 72 h para la concentración máxima. El efecto antifúngico del aceite esencial dependió principalmente de la concentración aplicada, sin diferencias atribuibles al estado de madurez y las formulaciones concentradas mostraron un alto potencial para reducir el crecimiento de *L. theobromae* in vitro.

Palabras clave: Inhibición; aceite esencial; fitopatógenos; in vitro.

Abstract

This work is part of the research project of the Technical State University of Quevedo "Extraction of essential oil from lemon (*Citrus limon*) and orange (*Citrus sinensis*) with potential inhibitory

effect on fungi that affect the quality of cocoa and chocolate." The study aimed to comparatively evaluate the inhibitory effect of essential oils extracted from orange peel (*Citrus sinensis*) at two stages of maturity (immature and ripe) on the growth of *Lasiodiplodia theobromae* under in vitro conditions. The essential oils were obtained by steam distillation from peels collected in Quevedo (Los Ríos, Ecuador) at two stages of maturity (immature and ripe). Subsequently, their chemical composition was characterized by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). The experimental design was based on a factorial scheme (2×4), considering two maturity levels (E1: unripe and E2: ripe) and four oil concentrations (0%, 50%, 75% and 100%), with three replications per treatment. The variables analyzed were essential oil yield, mycelial diameter, mycelial growth and mycelial growth inhibition. Chemical characterization showed that the oil from unripe fruits was dominated by d-limonene (79.7%) and linalool (7.4%), while in ripe fruits the hydrocarbon fraction was reduced (limonene 38.6%) and oxygenated compounds increased, highlighting linalool (29.3%). The oil yield was significantly higher in unripe fruits (2.21 mL; 0.76%) than in ripe fruits (1.81 mL; 0.65%). In the mycelial growth evaluations, the maturity stage factor showed no significant effects ($p > 0.05$). In contrast, the concentration factor did present highly significant differences, with the greatest inhibition in the 100% treatment. Inhibition values were 100% at 24 h, 83.96% at 48 h, and 41.75% at 72 h for the maximum concentration. The antifungal effect of the essential oil depended mainly on the applied concentration, with no differences attributable to the maturity stage. Concentrated formulations showed a high potential to reduce the growth of *L. theobromae* in vitro.

Keywords: Inhibition; essential oil; phytopathogens; in vitro.

Resumo

Este trabalho insere-se no projeto de investigação da Universidade Técnica Estadual de Quevedo "Extração de óleo essencial de limão (*Citrus limon*) e laranja (*Citrus sinensis*) com potencial efeito inibitório sobre fungos que afetam a qualidade do cacau e do chocolate". O objetivo do estudo foi avaliar comparativamente o efeito inibitório de óleos essenciais extraídos da casca de laranja (*Citrus sinensis*) em dois estados de maturação (imaturo e maduro) no crescimento de *Lasiodiplodia theobromae* em condições in vitro. Os óleos essenciais foram obtidos por destilação a vapor de cascas recolhidas em Quevedo (Los Ríos, Equador) em dois estados de maturação (imaturo e maduro). Posteriormente, a sua composição química foi caracterizada por cromatografia

gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). O desenho experimental baseou-se num esquema fatorial (2×4), considerando dois níveis de maturação (E1: imaturo e E2: maduro) e quatro concentrações de óleo (0%, 50%, 75% e 100%), com três repetições por tratamento. As variáveis analisadas foram o rendimento em óleo essencial, o diâmetro micelial, o crescimento micelial e a inibição do crescimento micelial. A caracterização química mostrou que o óleo dos frutos imaturos foi dominado pelo d-limoneno (79,7%) e pelo linalol (7,4%), enquanto nos frutos maduros a fração hidrocarboneto foi reduzida (limoneno 38,6%) e os compostos oxigenados aumentaram, destacando-se o linalol (29,3%). O rendimento em óleo foi significativamente maior nos frutos imaturos (2,21 mL; 0,76%) do que nos frutos maduros (1,81 mL; 0,65%). Nas avaliações do crescimento micelial, o fator estágio de maturação não apresentou efeitos significativos ($p > 0,05$). Em contraste, o fator concentração apresentou diferenças altamente significativas, sendo a maior inibição no tratamento de 100%. Os valores de inibição foram de 100% às 24 h, 83,96% às 48 h e 41,75% às 72 h para a concentração máxima. O efeito antifúngico do óleo essencial dependeu principalmente da concentração aplicada, não havendo diferenças atribuíveis ao estado de maturação. As formulações concentradas demonstraram um elevado potencial para reduzir o crescimento de *L. theobromae* in vitro.

Palavras-chave: Inibição; óleo essencial; fitopatógenos; in vitro.

Introducción

La creciente preocupación por el impacto ambiental y sanitario del uso excesivo de pesticidas químicos en la agricultura ha motivado la búsqueda de alternativas más sostenibles para el control de fitopatógenos (Moreta et al., 2025). En este contexto, los aceites esenciales han emergido como compuestos bioactivos naturales con propiedades antimicrobianas, antifúngicas y antioxidantes, lo que los posiciona como candidatos prometedores para el manejo integrado de plagas y enfermedades agrícolas (Marín et al., 2025). Estos compuestos, derivados de diversas estructuras vegetales como flores, hojas y cáscaras, han sido ampliamente estudiados por su eficacia contra microorganismos patógenos que afectan la producción y la calidad de los cultivos (Graf & Stappen, 2022).

Entre los aceites esenciales de mayor interés se encuentra el aceite de naranja (*Citrus sinensis*), caracterizado por su alto contenido de limoneno, un monoterpeno con comprobada actividad biológica (Siddiqui et al., 2022). Diversos estudios han demostrado que el aceite de naranja posee

propiedades antifúngicas, antibacterianas y antioxidantes, lo cual le confiere una amplia aplicabilidad tanto en la industria alimentaria como en la fitosanitaria (Palacios et al., 2025). Sin embargo, uno de los factores determinantes en su actividad antimicrobiana es la etapa de madurez del fruto del cual se extrae, ya que esta influye directamente en la concentración y composición de los compuestos volátiles presentes en el aceite (Ricardo et al., 2024). En particular, el limoneno puede representar entre el 85 % y el 95 % del aceite esencial de naranja, acompañado por otros monoterpenos como el mirceno y el α -pineno, así como compuestos oxigenados como el linalool y el geraniol, que potencian sus efectos biológicos (Dehghan et al., 2020).

Uno de los patógenos de mayor importancia en cultivos tropicales y subtropicales es *Lasiodiplodia theobromae*, un hongo perteneciente a la familia *Botryosphaeriaceae*, ampliamente distribuido y con un rango hospedero que incluye especies de alto valor comercial como el cacao, mango, aguacate, cítricos, y papaya (Yang et al., 2019). Este fitopatógeno causa diversos síntomas, entre ellos la muerte regresiva de ramas, pudrición de frutos, necrosis y tizón foliar, lo que reduce drásticamente la calidad y el rendimiento de los cultivos afectados (Berraf et al., 2020), con su capacidad de persistir en restos vegetales y su amplio rango de hospederos lo convierten en una amenaza difícil de erradicar, especialmente en condiciones climáticas favorables.

Tradicionalmente, el control de *L. theobromae* se ha basado en la aplicación de fungicidas sintéticos, pero su uso intensivo ha generado resistencia en las poblaciones del hongo, así como efectos negativos sobre la biodiversidad, los suelos y la salud humana (Moreira et al., 2021). Frente a esta problemática, el uso de aceites esenciales como el de naranja aparece como una alternativa viable y menos nociva, ya que se ha demostrado que el limoneno puede alterar la integridad de la membrana celular de hongos y bacterias, interferir en su metabolismo y estimular respuestas de defensa en las plantas (Li et al., 2018).

El objetivo del presente estudio fue evaluar comparativamente el efecto inhibitorio del aceite esencial extraído de la cáscara de naranja (*Citrus sinensis*) en dos etapas de madurez (inmadura y madura) sobre el hongo *Lasiodiplodia theobromae* bajo condiciones in vitro, con la finalidad de determinar si el grado de madurez del fruto influye en la actividad antifúngica del aceite. Para ello, se analizó la composición química del aceite mediante cromatografía de gases (GC-MS), se cuantificó el rendimiento de extracción y se midió la inhibición del crecimiento micelial del hongo, estableciendo relaciones entre las concentraciones evaluadas, el tiempo de exposición y el estado de madurez.

Metodología

Se aplicó un diseño experimental bifactorial A*B con ANOVA, seguido de una prueba de Tukey para evaluar las diferencias entre los promedios. El factor A, fue el estado de madurez con dos niveles (naranja inmadura y naranja madura); el factor B que se refirió a la concentración del aceite esencial (0, 50, 75 y 100 %), generando ocho tratamientos por triplicado, dando un total de 24 unidades experimentales (Tabla 1).

Tabla 1. Factores de estudio

Factores	Simbología	Descripción
A: Estado de madurez	e1	Naranja inmadura
	e2	Naranja madura
B: Tipo de microorganismo	c0	0 %
	c1	50 %
	c2	75 %
	c3	100 %

Esto dio lugar a un total de ocho tratamientos, cada uno con tres repeticiones, lo que resultó en 24 unidades experimentales en total (Tabla 2). La información recopilada fue analizada utilizando los softwares estadísticos Statgraphics e Infostat.

Tabla 2. Descripción de los tratamientos

Tratamientos	Simbología	Descripción
T1	e1c0	Naranja inmadura – 0 %
T2	e1c1	Naranja inmadura – 50 %
T3	e1c2	Naranja inmadura – 75 %
T4	e1c3	Naranja inmadura – 100 %
T5	e2c0	Naranja madura – 0 %
T6	e2c1	Naranja madura – 50 %
T7	e2c2	Naranja madura – 75 %
T8	e2c3	Naranja madura – 100 %

Preparación del aceite esencial

La obtención del aceite esencial se llevó a cabo mediante destilación por arrastre de vapor a partir de la cáscara de frutos de *Citrus sinensis* recolectados en dos fases de madurez, inmadura y madura, provenientes de cultivos locales en Quevedo, provincia de Los Ríos, Ecuador. Los frutos fueron

seleccionados según su estado de madurez, lavados cuidadosamente con agua potable para eliminar impurezas superficiales y posteriormente pelados con utensilios previamente esterilizados. Las cáscaras se sometieron a un proceso de destilación por arrastre de vapor, siguiendo las recomendaciones metodológicas descritas por Briones & Guerrero (2019). El aceite obtenido se almacenó en frascos de vidrio ámbar y se conservó a 4 °C hasta su empleo en las pruebas experimentales.

Los aceites esenciales extraídos fueron caracterizados químicamente mediante cromatografía de gases (CG) con el propósito de identificar y cuantificar los compuestos mayoritarios, particularmente limoneno, cineol y linalol. Para el análisis, se prepararon diluciones de cada muestra (1:100) en solventes de grado analítico como hexano o metanol. Las soluciones se filtraron utilizando membranas de 0,45 µm antes de la inyección. Los análisis se realizaron en un cromatógrafo de gases equipado con detector de ionización de llama o acoplado a espectrometría de masas, empleando una columna capilar diseñada para la separación de terpenos. Las condiciones cromatográficas incluyeron: temperatura del inyector a 250 °C, detector a 280 °C, y un programa de horno que comenzó a 60 °C (2 min), seguido de un incremento de 4 °C por minuto hasta 240 °C, manteniéndose por 5 minutos. Se utilizó helio como gas portador con un flujo constante de 1 mL/min, inyectando 1 µL de muestra en modo split (1:50) según Distefano et al. (2022).

La identificación de los compuestos se efectuó a partir del cálculo de índices de retención de Kovats, empleando como referencia una mezcla de n-alcanos (C8–C20), y la comparación de dichos índices y espectros de masas con bibliotecas estandarizadas (NIST y Wiley) y con información publicada en la literatura científica. La cuantificación se basó en el método de normalización de áreas. Finalmente, los cromatogramas obtenidos permitieron comparar la composición química de los aceites esenciales provenientes de frutos inmaduros y maduros, prestando especial atención a las variaciones en el contenido de limoneno, cineol y linalol (Urrunaga et al., 2022).

Preparación del medio de cultivo y del hongo

El medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) se preparó conforme a las especificaciones del fabricante y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Posteriormente, el medio se distribuyó en placas Petri estériles y se dejó solidificar a temperatura ambiente. Sobre estas placas

se realizó la siembra del hongo, incubándolo a 28 °C durante un periodo de 7 días. Durante la incubación se llevó a cabo el seguimiento del desarrollo del micelio y de la formación de picnidios característicos de la especie (Farahmandfar et al., 2020).

VARIABLES EVALUADAS

1. Caracterización cromatográfica del aceite esencial: Para el análisis de los componentes presentes en el aceite esencial extraído de la cáscara de naranja en los dos estados de madurez evaluados, se tomaron alícuotas de 10 mL por cada tipo de muestra y se remitieron al Laboratorio de Química Analítica de la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL) para su caracterización.

2. Cuantificación del aceite esencial obtenido: El rendimiento del aceite esencial, expresado en mililitros, se determinó registrando el volumen total extraído a partir de 300 g de cáscara de fruta en cada estado de madurez. A partir de estos valores se calculó el promedio correspondiente para cada etapa de madurez.

3. Medición del diámetro del micelio (mm): El crecimiento micelial de *Lasiodiplodia theobromae* se evaluó midiendo el diámetro de las colonias con un calibrador digital. En cada placa Petri se realizaron dos mediciones perpendiculares y se promedió el resultado. Estas mediciones se llevaron a cabo cada 24 horas durante tres días consecutivos. Los resultados de cada tratamiento se expresaron en milímetros, siguiendo el procedimiento propuesto por Oliveira-Da Silva et al. (2017).

4. Crecimiento micelial: El crecimiento micelial experimentado por el hongo entre la primera y la última evaluación, se estableció mediante la diferencia entre el diámetro micelial registrado en éstas, aplicando la siguiente fórmula:

$$CM = DMf - DMi$$

Dónde:

CM: Crecimiento micelial (mm)

DMf: Diámetro micelial en la evaluación final (mm)

DMi: Diámetro micelial en la evaluación inicial (mm)

5. Inhibición del crecimiento micelial: Con base a los valores del diámetro micelial registrado en cada una de las tres evaluaciones, se determinó la inhibición del crecimiento micelial (ICM), utilizando la fórmula descrita por Araya et al. (2019).

$$ICM = \frac{DMC - DMT}{DMC} \times 100$$

Dónde:

ICM: Inhibición del crecimiento micelial (%)

DMC: Diámetro del micelio en el tratamiento control (mm)

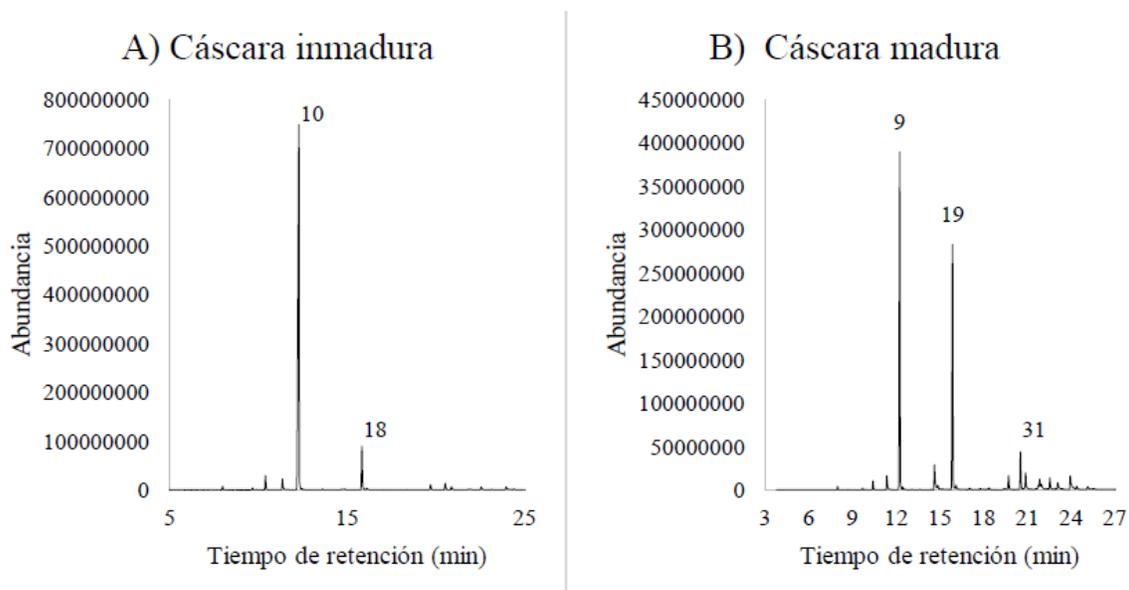
DMT: Diámetro del micelio en el tratamiento (mm)

Resultados

Composición cromatográfica de aceites esenciales de cáscara de naranja Valencia

Las muestras de aceite esencial obtenidas de la cáscara de naranja variedad Valencia (*Citrus sinensis*) en los estados inmaduro (CIM) y maduro (CM) fueron analizadas mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) con el propósito de caracterizar su perfil de compuestos volátiles. Los cromatogramas generados para cada tratamiento se presentan en la Figura 2A, correspondiente a la cáscara inmadura, y en la Figura 1 para la cáscara madura. Estos resultados evidenciaron diferencias notables en la abundancia relativa de los compuestos detectados entre ambos grados de madurez.

Figura 1. Cromatograma del aceite esencia de cascara de naranja inmadura y madura



Composición química del aceite esencial de cáscara inmadura

El análisis del aceite esencial obtenido de la cáscara de naranja Valencia en estado inmaduro (CIM), realizado mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), mostró un perfil químico dominado por monoterpenos de tipo hidrocarburo. Dentro de estos compuestos

destacó el d-limoneno, que alcanzó una proporción del 79,7 % y constituyó el componente principal responsable del aroma característico del aceite. Asimismo, se observó una concentración elevada de linalool (7,4 %), un monoterpeno oxigenado de aroma floral y conocido por su actividad biológica, cuyo valor supera el promedio reportado para aceites esenciales de naranja (< 3 %). Este incremento podría estar asociado a la técnica de extracción empleada, posiblemente la destilación por arrastre de vapor, o a las condiciones fisiológicas del fruto en etapa inmadura, que favorecerían la liberación de alcoholes monoterpénicos. Otros compuestos relevantes identificados fueron β -mirceno (2,2 %), octanal (2,0 %), α -terpineol (1,3 %), terpinen-4-ol (1,0 %), así como los isómeros de citral (geranial, 0,96 % y neral, 0,68 %) y decanal (0,66 %). La presencia de aldehídos alifáticos como el octanal y el decanal aporta notas aromáticas cítricas más intensas al aceite.

Composición química del aceite esencial de cáscara madura

El aceite esencial extraído de la cáscara de naranja Valencia en estado maduro (CM) mostró un perfil químico claramente diferenciado respecto al observado en la fase inmadura (CIM), lo que evidencia modificaciones asociadas al proceso de maduración del fruto y/o a las condiciones de extracción. Aunque el d-limoneno continuó siendo el compuesto mayoritario, su proporción disminuyó de forma notable hasta un 38,6 %, reflejando una marcada reducción en la fracción hidrocarbonada y una transición hacia compuestos más oxigenados. En esta etapa, el linalool destacó como el segundo componente más abundante, alcanzando un 29,3 %, un valor muy superior al reportado habitualmente (< 5 %). Este incremento apunta a un proceso de oxidación del limoneno o a la liberación de metabolitos oxigenados previamente ligados a la matriz vegetal. Otros monoterpenos oxigenados de relevancia en esta muestra fueron el α -terpineol (4,5 %), geranial (1,75 %), neral (1,53 %) y geraniol (1,38 %), todos asociados con funciones de defensa en plantas y con potencial uso en aplicaciones terapéuticas.

Los aldehídos alifáticos como decanal (2,04 %), octanal (1,69 %) y nonanal (0,78 %) se encontraron en mayores concentraciones en comparación con el aceite de frutos inmaduros, lo que indica una actividad oxidativa más intensa sobre las cadenas terpénicas. De forma similar, la presencia de terpinen-4-ol se elevó hasta 1,72 %, posiblemente como resultado de procesos de oxidación secundaria. A diferencia de lo observado en la fase inmadura, los monoterpenos hidrocarbonados minoritarios disminuyeron de manera general: β -mirceno (~0,9 %), α -pineno (~0,3 %) y sabineno (~0,16 %), mientras que otros se detectaron en proporciones inferiores al

0,1 %. Esta tendencia, junto con el incremento de compuestos oxigenados, refleja la conversión progresiva de hidrocarburos durante la maduración.

Además, en las muestras de frutos maduros se identificaron sesquiterpenos en niveles traza, como (E)-cariofileno (0,2 %), α -copaeno (0,06 %) y β -copaeno (0,04 %), compuestos ausentes en los aceites de frutos inmaduros. Su presencia podría relacionarse con la disminución de la fracción de limoneno, que permitió su detección, o con una síntesis inducida por los cambios fisiológicos propios de la madurez avanzada.

En conjunto, el aceite esencial de frutos maduros presentó una composición más diversificada y rica en compuestos oxigenados que la muestra inmadura, lo que amplía su potencial de uso en sectores terapéuticos, cosméticos y alimentarios. La identificación de los compuestos volátiles se realizó mediante la comparación de los índices de retención (RI), obtenidos a partir de una serie estándar de alcanos lineales (C9–C22), con valores reportados en bibliografía especializada.

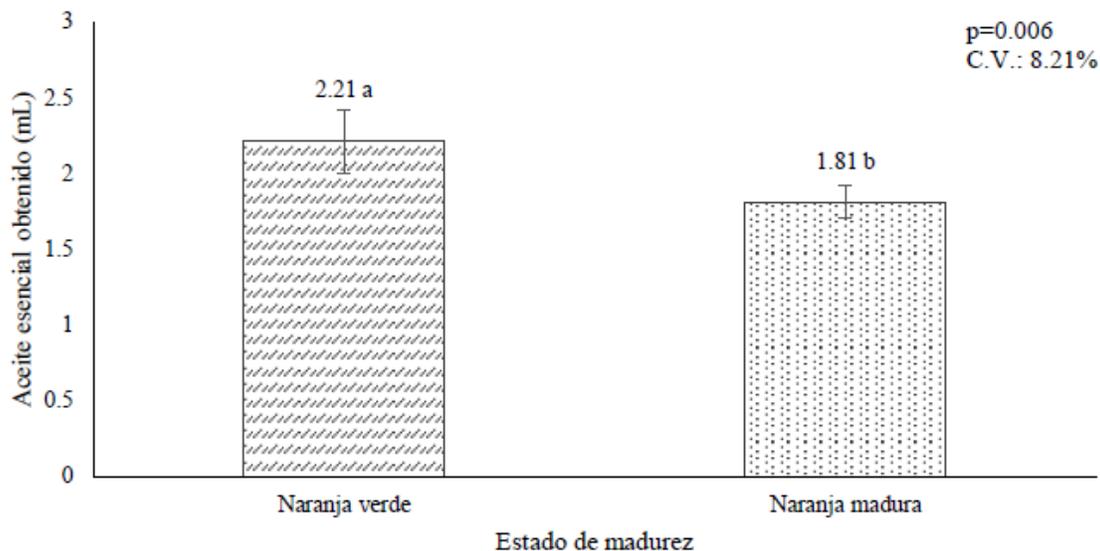
Tabla 3. Componentes volátiles principales en cáscaras inmaduras y maduras

Compuestos	Contenido %	
	Cáscara inmadura	Cáscara madura
Limoneno	79,70	38,60
Linalool	7,40	29,30
β -Myrceno	2,20	0,00
Octanal	2,00	1,69
α -Terpineol	1,30	4,50
Geranial	0,96	1,75
Neral	0,68	1,53
Decanal	0,66	2,04
Geraniol	0,00	1,38

Cantidad de aceite esencial obtenido (mL)

La Figura 2 muestra los valores promedio de aceite esencial extraído a partir de 300 g de cáscara de naranja en los dos estados de madurez evaluados. El análisis de varianza evidenció diferencias altamente significativas entre tratamientos ($p < 0,0001$), con un coeficiente de variación del 8,21 %. La cantidad de aceite esencial estuvo directamente influenciada por el grado de madurez del fruto. Las cáscaras provenientes de frutos inmaduros generaron un mayor volumen promedio (2,21 mL), equivalente a un rendimiento del 0,76 %, mientras que las cáscaras de frutos maduros produjeron 1,81 mL con un rendimiento del 0,65 %. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas.

Figura 2. Total, de aceite esencial obtenido de la cáscara de naranja en dos estados de madurez



Diámetro del micelio (mm)

Los valores promedio del diámetro del micelio de *Lasiodiplodia theobromae* medidos a las 24, 48 y 72 horas de incubación, bajo la aplicación de tres concentraciones de aceite esencial proveniente de cáscaras de naranja en dos estados de madurez, se resumen en la Tabla 4. El análisis de varianza indicó que el estado de madurez no presentó diferencias significativas en ninguno de los tiempos evaluados ($p = 0,2428$; $p = 0,2095$; $p = 0,2751$ para 24, 48 y 72 h, respectivamente). Por el contrario, el factor concentración mostró diferencias altamente significativas a las 24 y 48 horas ($p < 0,0001$) y significativas a las 72 horas ($p = 0,0185$). La interacción entre factores solo fue significativa en la evaluación de las 24 horas ($p = 0,0073$). Los coeficientes de variación estuvieron entre 12,19 % y 22,92 %.

En cuanto al promedio general, los diámetros registrados para los tratamientos según madurez fueron de 3,02 a 3,10 mm a las 24 h, 16,81 a 19,97 mm a las 48 h y 33,93 a 37,38 mm a las 72 h. La comparación entre concentraciones mostró mayores valores en el control (C0: 0 %), con 7,92; 31,21 y 41,00 mm a las 24, 48 y 72 h, respectivamente. A las 24 h, C0 presentó diferencias significativas frente a las demás concentraciones, cuyos promedios se mantuvieron entre 0,00 y 3,58 mm. En la evaluación a las 48 h, C0 (31,21 mm) no difirió de C1: 50 % (21,42 mm), pero sí superó a C2: 75 % (16,14 mm) y C3: 100 % (4,79 mm). A las 72 h, C0 fue similar a C1 (39,17 mm)

y C2 (38,75 mm), y mayor que C3 (23,71 mm). En las interacciones, a las 24 h, E1C0 y E2C0 registraron los valores más altos (8,17 y 7,67 mm), sin diferencias entre ellos y superando al resto. En este periodo no hubo crecimiento en E1C2, E1C3 y E2C3. A las 48 h, E1C0 alcanzó 32,67 mm, siendo estadísticamente superior a los tratamientos con 75 % y 100 %. En la evaluación de 72 h no se observaron diferencias significativas entre interacciones, con promedios entre 18,42 mm y 41,43 mm.

Tabla 4. Diámetro del micelio de *L. theobromae* durante 72 horas de incubación en respuesta a la aplicación de tres concentraciones de aceite esencial obtenidos de dos estados de madurez

Tratamientos	Diámetro micelial <i>L. theobromae</i>		
	24 horas	48 horas	72 horas
Estado de madurez	p=0,2428	p=0,2095	p=0,2751
E1: Naranja inmadura	3,02 a	16,81 a	33,93 a
E1: Naranja madura	3,10 a	19,97 a	37,38 a
Concentraciones	p<0.0001	p<0.0001	p=0.0185
C0: 0 %	7,92 a	31,21 a	41,00 a
C1: 50 %	3,58 b	21,42 ab	39,17 a
C2: 75 %	0,75 c	16,14 b	38,75 ab
C3: 100 %	0,00 d	4,79 c	23,71 b
Interacciones	p=0.0073	p=0.2896	p=0.4768
E1C0: Naranja inmadura+0 %	8,17 a	32,67 a	40,57 a
E1C1: Naranja inmadura+50 %	3,90 b	22,00 abc	39,08 a
E1C2: Naranja inmadura+75 %	0,00 d	9,67 bcd	37,67 a
E1C3: Naranja inmadura+100 %	0,00 d	2,92 d	18,42 a
E2C0: Naranja madura+0 %	7,67 a	29,75 ab	41,43 a
E2C1: Naranja madura+50 %	3,25 bc	20,83 abc	39,25 a
E2C2: Naranja madura+75 %	1,50 c	22,61 abc	39,83 a
E2C3: Naranja madura+100 %	0,00 d	6,67 cd	29,00 a
Promedio	3,06	18,39	35,66
Coefficiente de variación %	12,19	22,92	17,72

Crecimiento micelial

En la Tabla 5 se muestran los valores promedio correspondientes al crecimiento micelial y a la tasa de crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae* durante un período de 72 horas de incubación bajo la aplicación de tres concentraciones de aceite esencial obtenido de cáscaras de naranja en dos estados de madurez. El análisis de varianza indicó que ninguna de las fuentes de variación evaluadas presentó significancia estadística tanto para el crecimiento micelial como para la tasa de

crecimiento ($p > 0,05$), registrándose coeficientes de variación de 18,54 % y 16,84 %, respectivamente.

En relación con el factor estado de madurez, no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos, observándose promedios de crecimiento micelial que oscilaron entre 30,92 mm y 34,28 mm y tasas de crecimiento en el rango de 10,31 a 11,43 mm día⁻¹. De manera similar, para el factor concentración, los resultados no evidenciaron diferencias significativas entre los niveles evaluados, con valores de crecimiento micelial entre 23,71 mm y 38,00 mm y tasas de crecimiento comprendidas entre 7,90 y 12,67 mm día⁻¹. Las interacciones entre ambos factores tampoco mostraron efectos significativos, con promedios de crecimiento micelial que variaron entre 18,42 mm y 38,33 mm, y tasas de crecimiento que fluctuaron entre 6,14 y 12,78 mm día⁻¹.

Tabla 5. Crecimiento micelial y tasa de crecimiento de *L. theobromae* durante 72 horas de incubación en respuesta a la aplicación de tres concentraciones de aceite esencial

Tratamientos	Crecimiento micelial (mm)	Tasa de crecimiento (mm día ⁻¹)
Estado de madurez	p=0,7299	p=0,2809
E1: Naranja inmadura	30,92 a	10,31 a
E1: Naranja madura	34,28 a	11,43 a
Concentraciones	p=0.0577	p=0.0512
C0: 0 %	33,08 a	11,03 a
C1: 50 %	35,59 a	11,86 a
C2: 75 %	38,00 a	12,67 a
C3: 100 %	23,71 a	7,90 a
Interacciones	p=0.4785	p=0.4918
E1C0: Naranja inmadura+0 %	32,40 a	10,80 a
E1C1: Naranja inmadura+50 %	35,18 a	11,73 a
E1C2: Naranja inmadura+75 %	37,67 a	12,56 a
E1C3: Naranja inmadura+100 %	18,42 a	6,14 a
E2C0: Naranja madura+0 %	33,77 a	11,26 a
E2C1: Naranja madura+50 %	36,00 a	12,00 a
E2C2: Naranja madura+75 %	38,33 a	12,78 a
E2C3: Naranja madura+100 %	29,00 a	9,67 a
Promedio	32,60	10,87
Coeficiente de variación %	18,54	16,84

Inhibición del crecimiento micelial

En la Tabla 6 se presentan los valores promedio de la inhibición del crecimiento micelial de *Lasiodiplodia theobromae* obtenidos a las 24, 48 y 72 horas de incubación, tras la aplicación de

tres concentraciones de aceite esencial extraído de cáscaras de naranja en dos estados de madurez. El análisis de varianza mostró que ni el estado de madurez ni la interacción entre factores alcanzaron significancia estadística ($p > 0,05$), mientras que el efecto de las concentraciones fue altamente significativo en las tres mediciones ($p < 0,01$). Los coeficientes de variación oscilaron entre 11,19 % y 70,01 %.

En las tres evaluaciones, los valores promedio de inhibición no difirieron entre los estados de madurez. Para frutos inmaduros (E1) se obtuvieron porcentajes de 63,03 %, 48,60 % y 16,11 % a las 24, 48 y 72 horas, respectivamente, mientras que para frutos maduros (E2) los valores fueron 58,96 %, 31,97 % y 9,70 % en los mismos tiempos.

En cuanto al factor concentración, a las 24 horas la inhibición fue completa en C3: 100 % (100,00 %), sin diferencias significativas frente a C2: 75 % (89,95 %), y superior a C1: 50 % (54,03 %) y C0: 0 % (0,00 %). A las 48 horas, la mayor inhibición correspondió a C3: 100 % (83,96 %), sin diferencia respecto a C2: 75 % (46,64 %), y con valores superiores a C1: 50 % (30,55 %) y C0: 0 %. En la evaluación de 72 horas, C3: 100 % presentó 41,75 % de inhibición, superando significativamente al resto de concentraciones (0,00–5,44 %).

En las interacciones, a las 24 horas se registró inhibición total en E1C2, E1C3 y E2C3 (100,00 %), sin diferencia con E2C2 (79,89 %). A las 48 horas, E1C3 alcanzó 91,55 %, sin diferencias con interacciones que presentaron valores entre 22,61 % y 70,66 %. Para las 72 horas, E1C3 mantuvo el valor más alto (53,77 %), diferenciándose únicamente de E1C0 y E2C0, que no mostraron inhibición (0,00 %).

Tabla 6. Inhibición del crecimiento micelial de *L. theobromae* durante 72 horas de incubación en respuesta a la aplicación de tres concentraciones de aceite esencial

Tratamientos	Inhibición del crecimiento micelial (%)		
	24 horas	48 horas	72 horas
Estado de madurez	p=0,4416	p=0,0503	p=0,6004
E1: Naranja inmadura	63,03 a	48,60 a	16,11 a
E1: Naranja madura	58,96 a	31,97 a	9,70 a
Concentraciones	p<0.0001	p<0.0001	p=0,0023
C0: 0 %	0,00 c	00,00 c	00,00 b
C1: 50 %	54,03 b	30,55 b	4,44 b
C2: 75 %	89,95 a	46,64 ab	5,44 b
C3: 100 %	100,00 a	83,96 a	41,75 a
Interacciones	p=0.5186	p=0,1889	p=0,8171

E1C0: Naranja inmadura+0 %	0,00 c	00,00 c	00,00 b
E1C1: Naranja inmadura+50 %	52,11 b	32,20 ab	3,62 ab
E1C2: Naranja inmadura+75 %	100,00 a	70,66 ab	7,06 ab
E1C3: Naranja inmadura+100 %	100,00 a	91,55 a	53,77 a
E2C0: Naranja madura+0 %	0,00 c	0,00 c	0,00 b
E2C1: Naranja madura+50 %	55,95 b	28,90 abc	5,26 ab
E2C2: Naranja madura+75 %	79,89 ab	22,61 bc	3,83 ab
E2C3: Naranja madura+100 %	100,00 a	76,37 ab	29,72 ab
Promedio	60,99	40,29	12,91
Coefficiente de variación %	11,19	31,20	70,01

Discusión

El análisis de la fracción volátil de los aceites esenciales mostró que el d-limoneno fue el compuesto predominante en la cáscara inmadura (CIM), con un 79,7 % del total, este hallazgo coincide con lo indicado por El Hachlafi et al. (2024), quienes señalan que el limoneno representa entre el 70 % y 90 % del aceite esencial de *Citrus sinensis*, dependiendo del método de extracción. En la cáscara madura (CM) se observó una disminución notable de este monoterpeno hasta el 38,6 %, fenómeno que podría estar relacionado con transformaciones químicas producidas durante la maduración y la hidrodestilación. Esta reducción estuvo acompañada por un incremento de compuestos oxigenados, especialmente linalool (29,3 %), α -terpineol (4,5 %), geraniol (1,38 %) y aldehídos como geranial, neral y decanal. De acuerdo con Njoroge et al. (2005), el linalool raramente supera el 5 % cuando se emplea extracción en frío, lo que sugiere que la hidrodestilación y los cambios bioquímicos durante la maduración favorecen la conversión del limoneno en alcoholes y aldehídos. Estas variaciones en la composición química están relacionadas con la actividad enzimática y metabólica que ocurre durante la maduración, generando aromas suaves y florales (González et al., 2020). En etapas previas, el limoneno tiene un papel protector frente a plagas por su mayor concentración, asimismo, el mayor rendimiento de aceite en la cáscara inmadura puede atribuirse a la mayor acumulación de metabolitos en frutos verdes (Bunse et al., 2022), mientras que en la madurez parte de estos compuestos se transforman o se volatilizan (Córdova et al., 2020). Estudios confirman esta tendencia en cítricos y otras frutas (González & Véliz, 2020; Distefano et al., 2022). Los resultados indican que no se encontraron diferencias significativas en el diámetro del micelio de *L. theobromae* entre los aceites esenciales obtenidos de cáscaras inmaduras y maduras, lo que sugiere que la presencia y concentración de compuestos con actividad antifúngica son comparables en ambas etapas. Este comportamiento coincide con lo descrito por Jiménez et al. (2022), quienes

señalan que, aunque el perfil químico de los aceites cítricos puede variar durante la maduración, la actividad antifúngica se mantiene si los metabolitos activos principalmente monoterpenos y fenilpropanoides. En cambio, las diferencias se observaron entre concentraciones, evidenciando que la eficacia del aceite depende de la dosis aplicada, de forma similar, Palacios et al. (2025) documentaron que la inhibición del crecimiento micelial de hongos fitopatógenos aumenta proporcionalmente con la concentración de aceites ricos en limoneno y linalool, lo que indica un efecto dosis dependiente asociado a la alteración de la membrana celular y el metabolismo del patógeno.

La mayor reducción del crecimiento micelial se registró en las concentraciones más altas, sin diferencias atribuibles al estado de madurez, lo que concuerda con Camargo et al. (2019), quienes demostraron que el tiempo de exposición a compuestos activos intensifica los efectos antifúngicos. La ausencia de diferencias en las últimas evaluaciones sugiere una posible adaptación del hongo o disminución de la eficacia con el tiempo y aunque se observó una tendencia a una menor tasa de crecimiento conforme aumentó la concentración del aceite, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Según Gómez et al. (2019), a bajas concentraciones los aceites esenciales ejercen efectos fungistáticos y, a concentraciones más altas, efectos fungidas; sin embargo, en este estudio, la volatilidad del aceite o la tolerancia del hongo podrían explicar la falta de significancia.

No se detectaron diferencias significativas en la inhibición del crecimiento micelial de *L. theobromae* entre los aceites esenciales obtenidos de cáscaras en los dos estados de madurez, lo que indica que las variaciones en la composición química no fueron suficientes para producir cambios marcados en su efecto antifúngico. Aunque diversos estudios señalan que la madurez de los frutos puede alterar la concentración de metabolitos bioactivos, en este caso parece mantenerse estable la presencia de compuestos secundarios con acción antifúngica en ambos estados. No obstante, la inhibición ligeramente superior registrada con el aceite de naranja inmadura podría relacionarse con una mayor concentración de limoneno y otros terpenos característicos de los frutos en desarrollo, como señalan Melkina et al. (2021).

En contraste, las concentraciones evaluadas sí mostraron diferencias estadísticamente significativas, evidenciando un efecto dependiente de la dosis, en el que la inhibición del crecimiento se intensifica a medida que aumenta la cantidad de aceite. La disminución de la eficacia

a las 72 horas podría estar asociada a la volatilización de compuestos activos o a la capacidad de adaptación del hongo ante una exposición prolongada (Palacios et al., 2025).

Estos hallazgos son consistentes con estudios, como los de Stegmayer et al. (2021), quienes reportan que la actividad antifúngica de aceites esenciales cítricos puede ser limitada en concentraciones bajas y que su efectividad depende de múltiples factores, como el tipo de patógeno, la matriz vegetal y las condiciones ambientales. Por lo tanto, se hace evidente la necesidad de profundizar en la caracterización del aceite de naranja en distintos estados de madurez y su efecto específico sobre patógenos de importancia agrícola.

Conclusiones

Se demostró que la composición química de los aceites esenciales de *Citrus sinensis* varía significativamente con el estado de madurez, con un predominio de d-limoneno en frutos inmaduros y una mayor proporción de compuestos oxigenados en frutos maduros. Sin embargo, estas diferencias no se tradujeron en variaciones significativas en la inhibición del crecimiento de *L. theobromae*.

El rendimiento de extracción fue superior en frutos inmaduros, lo que los posiciona como una fuente más eficiente de aceite esencial. La actividad antifúngica evidenció una clara relación dosis-respuesta: concentraciones del 75 % y 100 % lograron una inhibición marcada del crecimiento micelial durante las primeras 48 horas, mientras que concentraciones menores mostraron efectos reducidos. A las 72 horas, se observó una disminución en la eficacia del tratamiento, posiblemente asociada a la volatilización de compuestos activos o a mecanismos de tolerancia del hongo. Los aceites esenciales de naranja presentan un potencial prometedor como agentes antifúngicos naturales en el manejo alternativo de enfermedades causadas por *L. theobromae*. Su aplicación podría contribuir a reducir la dependencia de fungicidas sintéticos, con beneficios ambientales y para la inocuidad de los alimentos.

Para futuros estudios, se recomienda investigar la optimización de formulaciones estables que mantengan la eficacia de los aceites esenciales a lo largo del tiempo, así como realizar ensayos en condiciones de campo para validar los resultados obtenidos en laboratorio. También es necesario evaluar la fitotoxicidad en cultivos comerciales y estudiar los mecanismos de acción de los compuestos bioactivos presentes en el aceite, con el fin de desarrollar estrategias integradas y sostenibles de control de patógenos agrícolas.

Referencias

1. Araya, C. A., Benavides, I. V., & Torres, S. (2019). Inhibición del crecimiento micelial de hongos asociados a antracnosis en ñame (*Dioscorea alata*). *Agronomía Mesoamericana*, 30(2), 381-393.
2. Berraf-Tebbal, A., Mahamedi, A. E., Aigoun-Mouhous, W., Špetík, M., Čechová, J., Pokluda, R., ... & Alves, A. (2020). *Lasiodiplodia mitidjana* sp. nov. and other *Botryosphaeriaceae* species causing branch canker and dieback of *Citrus sinensis* in Algeria. *PLoS one*, 15(5), e0232448. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232448>
3. Briones-Sornoza, H. R., & Guerrero-Intriago, D. A. (2019). Extracción de aceites esenciales de mandarina (*Citrus reticulata*) y palo santo (*Bursera Graveolens*) por el método de arrastre de vapor: Artículo de investigación. *Revista Científica INGENIAR: Ingeniería, Tecnología e Investigación*. ISSN: 2737-6249., 2(3), 14-23. <https://www.journalingeniar.org/index.php/ingeniar/article/view/12>
4. Bunse, M., Daniels, R., Gründemann, C., Heilmann, J., Kammerer, D. R., Keusgen, M., ... & Wink, M. (2022). Essential oils as multicomponent mixtures and their potential for human health and well-being. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 956541.
5. Camargo Piñeres, Y., Zambrano Montenegro, G., Ortega-Cuadros, M., Gutierrez Montero, D. J., & Yepes, J. A. (2021). Actividad antifúngica in vitro del aceite esencial de *Swinglea glutinosa* Merr sobre *Colletotrichum* sp. patógeno de mango (*Mangifera indica* L.). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 23(1), 62-71. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v23n1.88025>
6. Cordova, C., Guillén, J., & Tuesta, T. (2020). Extracción por microondas libre de solvente del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis*), y el efecto de las condiciones de proceso en su rendimiento, composición y actividad antimicrobiana. *Revista chilena de nutrición*, 47(6), 965-974. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182020000600965>
7. Da Silva, F. O., Itako, A. T., & Júnior, J. B. T. (2017). Mycelial growth assessment by digital image analysis in R software environment. *Idesia (Chile)*, 35, 5â. <https://www.scielo.cl/pdf/idesia/2017nahead/aop0117.pdf>
8. Dehghan, B., Esmailzadeh Kenari, R., & Raftani Amiri, Z. (2020). Nano-encapsulation of orange peel essential oil in native gums (*Lepidium sativum* and *Lepidium perfoliatum*):

- Improving oxidative stability of soybean oil. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(11), e14889. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14889>
9. Distefano, M., Mauro, R. P., Page, D., Giuffrida, F., Bertin, N., & Leonardi, C. (2022). Aroma volatiles in tomato fruits: The role of genetic, preharvest and postharvest factors. *Agronomy*, 12(2), 376. <https://doi.org/10.3390/agronomy12020376>
 10. El Hachlafi, N., Elbouzidi, A., Batbat, A., Taibi, M., Jeddi, M., Addi, M., ... & Fikri-Benbrahim, K. (2024). Chemical composition and assessment of the anti-inflammatory, antioxidant, cytotoxic and skin enzyme inhibitory activities of *Citrus sinensis* (L.) osbeck essential oil and its major compound limonene. *Pharmaceuticals*, 17(12), 1652. <https://doi.org/10.3390/ph17121652>
 11. Farahmandfar, R., Tirgarian, B., Dehghan, B., & Nemati, A. (2020). Comparison of different drying methods on bitter orange (*Citrus aurantium* L.) peel waste: Changes in physical (density and color) and essential oil (yield, composition, antioxidant and antibacterial) properties of powders. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(2), 862-875. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00334-x>
 12. González-Díaz, Y., & Véliz-Jaime, M. Y. (2020). Extracción y caracterización del aceite esencial de mango obtenido de residuos agroindustriales. *Tecnología Química*, 40(3), 488-501.
 13. Graf, M., & Stappen, I. (2022). Beyond the bark: an overview of the chemistry and biological activities of selected bark essential oils. *Molecules*, 27(21), 7295. <https://doi.org/10.3390/molecules27217295>
 14. Jiménez, W. J. J., Guevara, J. A. Z., Mori, J. R. C., & Santi, W. E. M. (2022). Actividad antioxidante y antimicrobiana del aceite esencial de *Citrus sinensis*, *Citrus paradisi* y *Citrus reticulata*. *RECIAMUC*, 6(3), 399-407. [https://doi.org/10.26820/reciamuc/6.\(3\).julio.2022.399-407](https://doi.org/10.26820/reciamuc/6.(3).julio.2022.399-407)
 15. Li, D., Wu, H., Huang, W., Guo, L., & Dou, H. (2018). Microcapsule of sweet orange essential oil encapsulated in beta-cyclodextrin improves the release behaviors in vitro and in vivo. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 120(9), 1700521. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201700521>

16. Marín, V. N., Buccini, D. F., da Silva, V. G., Soliz, I. A. F., & Franco, O. L. (2025). Nanoformulations of bioactive compounds derived from essential oils with antimicrobial activity. *Nano Trends*, 9, 100070. <https://doi.org/10.1016/j.nwnano.2024.100070>
17. Melkina, O. E., Plyuta, V. A., Khmel, I. A., & Zavlilgelsky, G. B. (2021). The mode of action of cyclic monoterpenes (–)-limonene and (+)- α -pinene on bacterial cells. *Biomolecules*, 11(6), 806. <https://doi.org/10.3390/biom11060806>
18. Moreira-Morrillo, A. A., Cedeño-Moreira, Á. V., Canchignia-Martínez, F., & Garcés-Fiallos, F. R. (2021). *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maul [(sin.) *Botryodiplodia theobromae* Pat] en el cultivo de cacao: síntomas, ciclo biológico y estrategias de manejo. *Scientia Agropecuaria*, 12(4), 653-662. <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.068>
19. Moreta Moreira, G., Mendoza Véliz, D., Mayorga Cruz, J., & Pinos Coello, K. (2025). Análisis de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de tomillo frente a *Staphylococcus aureus*, mohos y levaduras en condiciones in vitro. *Polo del Conocimiento*, 10(4), 487-503. <https://doi.org/10.23857/pc.v10i4.9326>
20. Njoroge, S. M., Koaze, H., Karanja, P. N., & Sawamura, M. (2005). Essential oil constituents of three varieties of Kenyan sweet oranges (*Citrus sinensis*). *Flavour and fragrance journal*, 20(1), 80-85. <https://doi.org/10.1002/ffj.1377>
21. Palacios Bravo, E. R., Cárdenas Posligua, J. I., Cedeño Arriaga, E. C., & Díaz Campozano, E. G. (2025). Efecto inhibitorio de los aceites esenciales de limón (*Citrus limon*) y naranja (*Citrus sinensis*) sobre fitopatógenos agrícolas a nivel in vitro. *Dominio De Las Ciencias*, 11(2), 1621–1633. <https://doi.org/10.23857/dc.v11i2.4407>
22. Ricardo-Rodrigues, S., Rouxinol, M. I., Agulheiro-Santos, A. C., Potes, M. E., Laranjo, M., & Elias, M. (2024). The Antioxidant and Antibacterial Potential of Thyme and Clove Essential Oils for Meat Preservation—An Overview. *Applied Biosciences*, 3(1), 87-101. <https://doi.org/10.3390/applbiosci3010006>
23. Siddiqui, S. A., Pahmeyer, M. J., Assadpour, E., & Jafari, S. M. (2022). Extraction and purification of d-limonene from orange peel wastes: Recent advances. *Industrial Crops and Products*, 177, 114484. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114484>
24. Stegmayer, M. I., Fernandez, L. N., Alvarez, N. H., Olivella, L., Gutiérrez, H. F., Favaro, M. A., & Derita, M. G. (2021). Aceites esenciales provenientes de plantas nativas para el

- control de hongos fitopatógenos que afectan a frutales. Fave. Sección ciencias agrarias, 20(1), 317-329.
25. Urrunaga-Ormachea, M., del Carpio-Jiménez, C., Gutierrez-Chaveza, R. G., & Tomaylla-Cruz, C. (2022). Propiedades fisicoquímicas, composición química y actividad antioxidante del aceite esencial de *Citrus jambhiri* (Limón rugoso). *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 88(3), 277-288. <https://doi.org/10.37761/rsqp.v88i3.403>
26. Yang, Y., Di Zeng, G., Zhang, Y., Xue, R., & Hu, Y. J. (2019). Molecular and biochemical characterization of carbendazim-resistant *Botryodiplodia theobromae* field isolates. *Plant disease*, 103(8), 2076-2082. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-19-0148-RE>

© 2025 por los autores. Este artículo es de acceso abierto y distribuido según los términos y condiciones de la licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0) (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>).