UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

TEMA:

"DESARROLLO DE UN NANOFORMULADO DE BIOPLAGUICIDA BOTÁNICO DE EXTRACTO DE CÁSCARA DE CÍTRICOS"

TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO EN INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

Línea de investigación: Gestión, producción, productividad, innovación y desarrollo socioeconómico.

AUTORES:

KARLA ALEJANDRA AMAYA PIJAL

ELIAN IGNACIO BASTIDAS LÓPEZ

DIRECTOR:

ING. JOSÉ MANUEL PAÍS CHANFRAU PhD.

Ibarra – Ecuador 2026

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN

A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO	
APELLIDOS Y NOMBRES:	Amaya Pijal Karla Alejandra

DATOS DE CONTACTO	
APELLIDOS Y NOMBRES:	Bastidas López Elian Ignacio

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	Desarrollo de un nanoformulado de bioplaguicida botánico de extracto de cáscara de cítricos.
AUTOR (ES):	Amaya Pijal Karla Alejandra Bastidas López Elian Ignacio
FECHA: DD/MM/AAAA	28/07/2026
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
PROGRAMA:	[X] **PREGRADO** [ ] **POSGRADO**
TITULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniería en Agroindustrias
DIRECTOR /ASESOR:	Ing. José Manuel País Chanfrau PhD.

CONSTANCIAS

Los autores manifiestan que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrollo, sin violar los derechos de autor de terceros, por lo tanto, la obra es original y que son los titulares de los derechos patrimoniales, por lo que asumen la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrán en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 28 días del mes de julio del 2026

AUTORES:

Validar únicamente en FirmaEC.
Firmado electrónicamente por:
KARLA ALEJANDRA
AMAYA PIJAL

……..

Karla Alejandra Amaya Pijal

C.I.: 1004549430

Validar únicamente en FirmaEC.
Firmado electrónicamente por:
ELIAN IGNACIO
BASTIDAS LOPEZ

……..

Elian Ignacio Bastidas López

C.I.: 1004711055

CERTIFICACIÓN DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Ibarra, a los 28 días del mes de julio del 2026

Ing. José Manuel País Chanfrau PhD.

DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

CERTIFICA:

Haber revisado el presente informe final del trabajo de Integración Curricular, el mismo que se ajusta a las normas vigentes de la Universidad Técnica del Norte; en consecuencia, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.

Validar únicamente en FirmaEC.
Firmado electrónicamente por:
JOSE MANUEL PAIS CHANFRAU

(f)……

Ing. José Manuel País Chanfrau PhD.

C.C:0959747320

APROBACIÓN DEL COMITÉ CALIFICADOR

El Comité Calificador del trabajo de Integración Curricular "Desarrollo de un nanoformulado de bioplaguicida botánico de extracto de cáscara de cítricos" elaborado por Amaya Pijal Karla Alejandra y Bastidas López Elian Ignacio previo a la obtención del título de Ingeniero en Agroindustria, aprueba el presente informe de investigación en nombre de la Universidad Técnica del Norte.

Validar únicamente en FirmaEC.
Firmado electrónicamente por:
JOSE MANUEL PAIS CHANFRAU

(f)…….

Ing. José Manuel País Chanfrau PhD.

C.C:0959747320

Validar únicamente en FirmaEC.
Firmado electrónicamente por:
JHOMAIRA LORENA BURBANO GARCIA

(f)…….

Ing. Jhomaira Lorena Burbano García

C.C: 0401198361

PRESENTACIÓN

Yo, AMAYA PIJAL KARLA ALEJANDRA y BASTIDAS LÓPEZ ELIAN IGNACIO como autores de la Tesis Titulada **"DESARROLLO DE UN NANOFORMULADO DE BIOPLAGUICIDA BOTÁNICO DE EXTRACTO DE CÁSCARA DE CÍTRICOS",** nos hacemos responsables de los resultados, discusión, conclusiones y demás parte de la investigación; y ponemos este documento como fuente de apoyo para consultas dirigidas a todos los estudiantes.

AGRADECIMIENTO

Mi más grande agradecimiento es para Dios, por rodearme de personas que me quieren y bendecirme con salud, fuerza y la capacidad para avanzar todos los días superando cada obstáculo del camino.

Agradezco a mi familia por su presencia incondicional, especialmente a mi madre Silvia que me ha dado todo su amor, y a pesar de las dificultades siempre me ha dado fuerza y ha estado conmigo en cada paso que he dado sin dudar de mí.

A mi novio Elian, que ha sido mi mejor amigo y me ha acompañado durante este largo camino motivándome y mostrando su apoyo.

Agradezco mis profesores por su guía constante, su paciencia y sus valiosas enseñanzas durante la ejecución de esta investigación.

Karla Alejandra Amaya Pijal

A mi madre, Yolanda, quien ha sido el motor de mi vida. Gracias por tu amor incondicional y por ese esfuerzo admirable de ser una madre luchadora; este título es tan tuyo como mío, porque sin tu ejemplo de lucha no habría llegado hasta aquí.

A mi amada Karla, mi mejor amiga y compañera de vida, gracias por ser mi refugio y caminar a mi lado en cada etapa de este viaje.

Asimismo, mi profundo agradecimiento a mis profesores por su guía y su paciencia infinita.

Elian Ignacio Bastidas López

DEDICATORIA

A Dios, por ser mi guía y fortaleza en cada paso de este camino, por iluminarme en los momentos de duda y permitirme alcanzar cada uno de mis objetivos. Dedicada con mucho amor y cariño a mi madre Silvia, por su apoyo incondicional y amor eterno, sus enseñanzas han sido mi pilar en la vida y a mi novio Elian, mi mejor amigo, por apoyarme y ser mi fuente de alegrías, por recordarme que soy capaz de alcanzar mis sueños.

Karla Alejandra Amaya Pijal

A mi madre, Yolanda, por ser el pilar de mi vida y mi mayor ejemplo de lucha.

A Karla, por ser mi compañera incondicional en cada paso de este camino.

A Pablo, por su apoyo constante y por creer en mi futuro profesional.

Este logro es de ustedes.

Elian Ignacio Bastidas López

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTO vii

DEDICATORIA viii

ÍNDICE DE FIGURAS xiii

ÍNDICE DE TABLAS xiv

ÍNDICE DE ANEXOS 15

CAPÍTULO I 18

INTRODUCCIÓN 18

1.1. Antecedentes 18

1.2. Planteamiento del problema 20

1.3. Justificación 21

1.4. Objetivos 21

1.4.1. Objetivo general. 21

1.4.2. Objetivos específicos 22

1.5. Hipótesis 22

CAPÍTULO II 23

MARCO TEÓRICO 23

2.1. Bioplaguicidas 23

2.2. Nanoformulado 23

2.3. Nanoemulsiones 23

2.4. Método de obtención 24

2.5. Sonicación 24

2.6. Agitación magnética 25

2.7. Parámetros y características fisicoquímicas 25
2.7.1. Tamaño de partícula 26
2.7.2. Polidispersión 26
2.7.3. Potencial Z 26
2.7.4. Evaluación de Estabilidad 27
2.8. Aplicaciones en la agricultura 27
2.9. Extracto 27
2.10. Cáscara de cítricos 28
2.11. Componentes Principales 28
2.11.1. Fase Oleosa (Extracto de cáscara de limón) 28
2.11.2. Fase Acuosa 29
2.11.3. Emulsionantes 29
2.12. Nanocristales de celulosa 29
2.13. Zeina 30
2.14. D-limoneno 30
2.15. Principio activo 31
2.16. Espectrofotometría UV-Vis 31
2.17. Ensayos in vitro y hongos objetivo 32
2.17.1. Monilinia laxa 32
2.17.2. Rhizopus Stolonifer 33
CAPÍTULO III 34
METODOLOGÍA 34
3.1. Enfoque de la investigación 34

3.2. Tipo de investigación 34

3.3. Diseño de la investigación..... 35

3.4. Ubicación del lugar 35

3.5. Materiales, equipos y software..... 36

3.6. Obtención del material. 37

3.6.1. Materia prima. 37

3.6.2. Extracto de cáscara de limón. 37

3.6.3. Zeína de maíz. 38

3.6.4. Obtención y Reactivación de Cepas Microbianas. 40

3.7. Identificación de los parámetros de sonicación (amplitud y tiempo) para la obtención de una nanoemulsión estable con un tamaño de partícula y polidispersidad deseables. 40

3.7.1. Caracterización de las propiedades fisicoquímicas de las nanoemulsiones desarrolladas, evaluando su estabilidad mediante medición del tamaño de partícula, polidispersidad, potencial z. 42

3.8. Valoración de los parámetros de liberación in vitro mediante ensayos con membrana de diálisis y espectrofotometría UV-Vis analizando la capacidad del nanoformulado para liberar el compuesto..... 43

3.9. Determinación del proceso de obtención de nanoemulsiones estables de D-limoneno, variando las mezclas de aceite, tensoactivo y coestabilizador, para caracterizar sus propiedades fisicoquímicas, estabilidad y perfil de liberación in vitro. 44

3.9.1. Caracterización de las propiedades fisicoquímicas de las nanoformulaciones desarrolladas, evaluando su estabilidad mediante medición del tamaño de partícula, polidispersidad y potencial Z. 48

3.9.2. Liberación del principio activo (D-limoneno), mediante ensayos in vitro en hongos *Rhizopus stolonifer* y *Monilinia laxa*. 49

3.10. Análisis Estadísticos 52

CAPÍTULO IV 53

RESULTADOS Y DISCUSIÓN 53

4.1. Características fisicoquímicas de las formulaciones 53

4.1.1. Tamaño de partícula (Z-Average) 53

4.1.2. Índice de polidispersidad (PDI) 55

4.1.3. Potencial Z y estabilidad coloidal 59

4.1.4. Síntesis comparativa 61

4.2. Análisis por espectrofotometría. 61

4.3. Actividad antifúngica in vitro 62

4.3.1. Cinética de crecimiento micelial 63

4.3.2. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial en el tiempo 64

4.3.3. Comparación entre tratamientos al final del ensayo (144 horas) 66

4.3.4. Análisis estadístico 68

CAPÍTULO V 70

5.1. Conclusiones 70

5.2. Recomendaciones 71

REFERENCIAS 72

ANEXOS 81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Procedimiento para la obtención de Zeina (Parte 1) 38

Figura 2 Procedimiento para la obtención de Zeina (Parte 2) 39

Figura 3 Proceso para el formulado y nanoformulado 1. 41

Figura 4 Proceso de nanoformulado 2; CNCs + Tween 80 + Extracto 45

Figura 5 Proceso de nanoformulado 3; CNCs + Tween 80 + Extracto + Zeina..... 46

Figura 6 Tamaño hidrodinámico (Z-Average) por variante 53

Figura 7 Efecto de dilución y ángulo en Serie 3 (Z-Average)..... 55

Figura 8 Relación tamaño–polidispersidad (Z-Average vs PDI) 56

Figura 9 Espectrograma del control positivo..... 61

Figura 10 Espectrograma de la nanoformulación..... 62

Figura 11 Cinética de crecimiento micelial (Rhizopus stolonifer)..... 63

Figura 12 Cinética de crecimiento micelial (Monilinia laxa)..... 64

Figura 13 % de inhibición (72 - 144 horas) - Rhizopus stolonifer..... 65

Figura 14 % de inhibición (72 - 144 horas) - Monilinia laxa..... 65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Materiales, equipos, reactivos y software..... 36

Tabla 2 Características fisicoquímicas, método, unidades y parámetros 42

Tabla 3 Parámetros y método de liberación del principio activo 44

Tabla 4 Composición de las formulaciones y nanoformulaciones para 5mL..... 47

Tabla 5 Características, descripción, método, unidades y parámetros 48

Tabla 6 Interpretación, técnica y observación (PDI)..... 56

Tabla 7 Análisis de resultados DLS 58

Tabla 8 Análisis de resultados ELS..... 59

Tabla 9 Interpretación, técnica y observación (ZP)..... 60

Tabla 10 Diámetros y porcentajes de inhibición 66

Tabla 11 Análisis de varianza (ANOVA)..... 69

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Recepción, y secado de materia prima. 81

Anexo 2 Obtención del extracto 81

Anexo 3 Desgrasado de harina 81

Anexo 4 Homogenización, filtrado y centrifugación de zeína 82

Anexo 5 Precipitación de la zeína 82

Anexo 6 Secado de zeína 83

Anexo 7 Preparación de material y dosificación de placas 83

Anexo 8 Resiembra e inoculación 84

Anexo 9 Registro fotográfico (Rhizopus stolonifer) 85

Anexo 10 Registro fotográfico (Monilinia laxa) 85

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo desarrollar un nanoformulado de bioplaguicida botánico a partir de extracto de cáscara de cítricos, como alternativa sostenible para el control de hongos fitopatógenos de postcosecha. Se elaboraron nanoemulsiones del extracto mediante sonicación, optimizando su amplitud y tiempo, y se evaluaron tres variantes: una estabilizada únicamente con Tween 80, una incorporando nanocristales de celulosa (CNC) y una tercera con adición de zeína. Las formulaciones fueron caracterizadas fisicoquímicamente mediante dispersión de luz electroforética (tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial Z), y se evaluó su actividad antifúngica in vitro frente a Rhizopus stolonifer y Monilinia laxa durante 144 horas. Los resultados mostraron que los Nanoformulados 1 y 2 alcanzaron tamaños de partícula por debajo del objetivo de 400 nm (135,0 ± 7,8 nm y 233,1 ± 19,8 nm, respectivamente), con índices de polidispersidad moderados, mientras que la incorporación de zeína en el Nanoformulado 3 generó agregación proteica y tamaños de partícula excesivos. El Nanoformulado 2, estabilizado con CNC, presentó la mayor actividad antifúngica frente a Rhizopus stolonifer (≈29% de inhibición), comparable e incluso superior al control positivo, mientras que ninguno de los tratamientos mostró efecto significativo frente a Monilinia laxa. El análisis por espectrofotometría UV-Vis para valorar la liberación in vitro presentó limitaciones metodológicas debido a la complejidad de la matriz de la nanoformulación. Estos resultados evidencian el potencial del nanoformulado desarrollado como bioplaguicida frente a Rhizopus stolonifer, aunque abren la necesidad de investigaciones adicionales para su optimización y para evaluar su espectro de acción frente a otros fitopatógenos.

Palabras clave: nanoemulsión, D-limoneno, bioplaguicida botánico, nanocristales de celulosa, actividad antifúngica.

ABSTRACT

The present study aimed to develop a botanical biopesticide nanoformulation from citrus peel extract, as a sustainable alternative for the control of postharvest phytopathogenic fungi. Nanoemulsions of the extract were prepared by sonication, optimizing amplitude and time, and three variants were evaluated: one stabilized solely with Tween 80, one incorporating cellulose nanocrystals (CNC), and a third with the addition of zein. The formulations were physicochemically characterized by electrophoretic light scattering (particle size, polydispersity index, and Z-potential), and their in vitro antifungal activity was evaluated against Rhizopus stolonifer and Monilinia laxa over 144 hours. The results showed that Nanoformulations 1 and 2 achieved particle sizes below the 400 nm target (135,0 ± 7.8 nm and 233.1 ± 19.8 nm, respectively), with moderate polydispersity indices, whereas the incorporation of zein in Nanoformulation 3 led to protein aggregation and excessive particle sizes. Nanoformulation 2, stabilized with CNC, exhibited the highest antifungal activity against Rhizopus stolonifer (≈29% inhibition), comparable to and even higher than the positive control, while none of the treatments showed a significant effect against Monilinia laxa. UV-Vis spectrophotometric analysis to assess in vitro release presented methodological limitations due to the complexity of the nanoformulation matrix. These results demonstrate the potential of the developed nanoformulation as a biopesticide against Rhizopus stolonifer, although they highlight the need for further research to optimize the formulation and evaluate its spectrum of action against other phytopathogens.

Keywords: nanoemulsion, D-limonene, botanical biopesticide, cellulose nanocrystals, antifungal activity.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

El diseño de la matriz emulsionada requiere la selección óptima de tensioactivos y proporciones. Adak et al. (2020) elaboraron nanoemulsiones (NEs) insecticidas a base de aceite esencial de eucalipto (6% al 10%), estabilizadas con el agente no iónico Tween 80 en relaciones aceite:surfactante de 1:0.5 a 1:1.5, alcanzando tamaños de gota de entre 150 y 400 nm. Por su parte, investigando alternativas biopoliméricas y sostenibles para la protección de cultivos, Baldassarre et al. (2023) describieron la preparación de NEs de aceite esencial de tomillo (Th-EO) estabilizadas con nanocristales de celulosa (CNCs) y Tween 80; en su estudio mantuvieron una relación fija Th-EO:Tween 80 de 2:1 (v:v) y evaluaron relaciones Th-EO:CNC de 1:1 y 6:1 (w:w) para alcanzar concentraciones finales de aceite del 1.5% y 10% (v/v). Asimismo, orientados hacia vectores de transporte lipofílicos en matrices agroalimentarias o farmacéuticas, Bonilla & Bonilla (2021) formularon sistemas estables O/W empleando lecitina de soya grado alimenticio como surfactante, disolviendo previamente el compuesto de interés en una fase oleosa compuesta por mezclas de aceites de soya, maíz, canola y girasol a 60 °C.

El éxito y la homogeneidad de estas formulaciones radican significativamente en los métodos de preparación de alta energía, Campolo et al. (2020) concluyeron que la sonicación y el tipo de surfactante son las variables críticas que afectan las características físicas de NEs con alto contenido de aceite esencial (15% p/p y relación aceite:surfactante 3:1); al evaluar tensioactivos como Tween 20, Tween 80, Span 20 y Span 80, determinaron que el Tween 80 arrojó los mejores resultados de tamaño de gota y homogeneidad. Específicamente, demostraron que una ultrasonicación de periodo corto

(3 min) disminuyó drásticamente el tamaño de gota de ~1420 nm a ~221 nm y redujo el índice de polidispersidad (PDI) de ~0.709 a ~0.251, logrando que los sistemas mantuvieran una buena estabilidad a lo largo de 28 semanas.

En concordancia con los beneficios de este método físico, Bonilla & Bonilla (2021) aplicaron ultrasonido al 33% de potencia durante 3 minutos combinando agitación Vortex® y homogeneización por UltraTurrax®; la caracterización mediante dispersión de luz dinámica (DLS) validó que la nanoemulsión seleccionada (IS2TB) poseía una polidispersión menor a 0.5, confirmando su estabilidad. Finalmente, Singh & Pulikkal (2022) profundizaron en la potencia del método, concluyendo que aplicar una alta potencia de ultrasonido (60%) genera procesos de cavitación y colisión más fuertes que rompen las gotas a escalas significativamente pequeñas y estables. Además, observaron que, si bien un aumento en el tiempo de almacenamiento incrementa levemente el tamaño de partícula, los valores de PDI se mantuvieron casi inafectados (0.49-0.58), ratificando la robustez del sistema durante el almacenamiento prolongado.

Para el desarrollo de sistemas basados en aceites esenciales, la caracterización de sus componentes activos resulta de gran utilidad, en este ámbito, Ramírez & Puente (2019) evaluaron la presencia de D-limoneno mediante un barrido espectrofotométrico UV-Vis en un rango de longitud de onda de 190 a 400 nm (intervalos de 0.5 nm); los autores determinaron picos de absorbancia clave a 190 nm y 270 nm para el componente sintético, y a 190 nm y 290 nm para los aceites esenciales. Este perfil espectral permitió confirmar cualitativamente el componente mayoritario en los extractos, demostrando la viabilidad de los métodos ópticos para la identificación estructural sin requerir una cuantificación másica absoluta.

1.2. Planteamiento del problema

Para mantener y aumentar la productividad requerida, se ha recurrido históricamente al control de plagas mediante plaguicidas sintéticos, los cuales han generado notables aumentos en los rendimientos agrícolas (Tudi et al., 2021). La dependencia creciente y el uso a gran escala de pesticidas sintéticos han evidenciado serios inconvenientes y consecuencias negativas (Ediagbonya et al., 2025). Por ejemplo, la persistencia en el ambiente llegando a suelos y flora no objetivo por diversas condiciones climáticas, consecuentemente, la exposición a plaguicidas sintéticos es la causa de problemas de salud siendo la intoxicación aguda una preocupación de salud pública global (Alengebawy et al., 2021).

Paralelamente a las problemáticas derivadas del uso intensivo de plaguicidas, el sector agroindustrial enfrenta otro desafío de gran magnitud, la gestión de los vastos volúmenes de residuos y subproductos generados, anualmente, se producen alrededor de 1.300 millones de toneladas de residuos agroindustriales (Kour et al., 2023; Sadh et al., 2018). En este contexto, la industria citrícola es un ejemplo relevante, generando cáscaras de limón que constituyen 40-50 % del peso de la fruta (Singh et al., 2020). Estos desperdicios son depositados en vertederos sin considerar su revalorización por su contenido de compuestos bioactivos, entre ellos el D-limoneno (Jiang et al., 2020; Singh et al., 2020). El D-limoneno se ha considerado uno de los insecticidas botánicos más utilizados, debido a sus propiedades citológicas, su efecto repelente y tóxico para insectos (Zeni et al., 2021; Caballero-Gallardo et al., 2023). Además, se ha demostrado que el D-limoneno encapsulado ha presentado mejores resultados debido a la mayor relación de superficie-volumen del nanoencapsulado que es beneficioso para la penetración del compuesto (Lin et al., 2024). Los investigadores han descubierto que el D-limoneno exhibe citotoxicidad contra parásitos, provocando un aumento de la fluidez de la membrana plasmática y la

lisis celular, matando así al parásito y actuando como tratamiento (Arruda et al., 2009; Camargos et al., 2014).

1.3. Justificación

El aprovechamiento de subproductos agroindustriales para la obtención de bioplaguicidas representa una solución innovadora y ambientalmente responsable a la crisis actual generada por los pesticidas sintéticos (Minussi et al., 2024). La cáscara de limón, rica en compuestos fenólicos, flavonoides y aceites esenciales, ha demostrado propiedades antimicrobianas y antioxidantes relevantes para el control biológico de plagas (Saleem y Saeed, 2020). Puesto que, su valorización permite no solo mitigar la carga contaminante de los residuos sino también impulsar una economía circular en el sector agrícola.

No obstante, la eficiencia de estos extractos puede verse limitada por su volatilidad o degradación rápida en condiciones de campo, en este sentido la aplicación de tecnologías de nanoformulación ofrece ventajas clave, como la protección del principio activo, la liberación controlada y una mayor biodisponibilidad (Pathak et al., 2022), incrementando su eficacia como bioplaguicidas.

La presente investigación es, por tanto, pertinente y necesaria, ya que integra el desarrollo científico con la sostenibilidad ambiental proponiendo una alternativa viable para la transición hacia una agricultura más segura, eficiente y sustentable.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general.

Desarrollar un nanoformulado de bioplaguicida botánico de extracto de cáscara de cítricos.

1.4.2. Objetivos específicos

- Identificar los parámetros de sonicación (amplitud y tiempo) para obtener una nanoemulsión estable con un tamaño de partícula y polidispersidad deseables.
- Valorar los parámetros de liberación in vitro mediante ensayos con membrana de diálisis y espectrofotometría UV-Vis analizando la capacidad del nanoformulado para liberar el compuesto.
- Determinar el proceso de obtención de nanoemulsiones estables de D-limoneno, variando las mezclas de aceite y tensoactivo, para caracterizar sus propiedades fisicoquímicas, estabilidad y perfil de liberación in vitro.

1.5. Hipótesis

- **Ha:** El desarrollo de un nanoformulado de bioplaguicida botánico a base de extracto de cáscara de cítricos, resultará en un producto con características fisicoquímicas aceptables y permitirá una liberación controlada del principio activo (D-limoneno).
- **H0:** El desarrollo de un nanoformulado de bioplaguicida botánico a base de extracto de cáscara cítricos, no resultará en un producto con características fisicoquímicas aceptables ni permitirá una liberación controlada del principio activo (D-limoneno).

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Bioplaguicidas

Los biopesticidas se conocen como compuestos derivados de materiales naturales, animales, plantas, microorganismos y minerales. Los bioplaguicidas son dirigidos específicamente contra las plagas objetivo y generalmente constituyen poco o ningún riesgo para las personas o el medio ambiente con el que interactúan (Nava Pérez et al., 2012).

2.2. Nanoformulado

Un nanoformulado es un sistema desarrollado mediante nanotecnología en el que el ingrediente activo se incorpora en estructuras de escala nanométrica derivadas de materiales vegetales con propiedades pesticidas, destinadas a mejorar su estabilidad, dispersión y liberación de los compuestos bioactivos (Luneja & Mkindi, 2025). En el presente trabajo, el nanoformulado de bioplaguicida botánico se obtiene en forma de nanoemulsión a partir de extracto de cáscara de limón.

2.3. Nanoemulsiones

Las nanoemulsiones son dispersiones que típicamente presentan diámetros en el rango de 50 a 1000 nm y con frecuencia se conocen como mini emulsiones, emulsiones finamente dispersas o emulsiones submicrométricas. Las nanoemulsiones consisten en una fase lipídica dispersa en una fase acuosa continua, con cada gota de aceite rodeada por una delgada capa interfacial que consiste en moléculas emulsificantes (Martínez et al., 2020).

Por lo general, las nanoemulsiones son altamente estables a la separación gravitacional debido al tamaño de partícula relativamente pequeño, lo que significa que los efectos del movimiento browniano dominan las fuerzas gravitacionales y previenen la formación del cremado o sedimentación durante un tiempo prolongado de almacenamiento. También tienen una buena estabilidad contra la agregación de las gotitas debido a que el rango de fuerzas atractivas que actúan entre las emulsiones disminuye con la disminución del tamaño de partícula, también el intervalo de repulsión estérica es menos dependiente (Martínez et al., 2020).

2.4. Método de obtención

Anton & Vandamme (citados en Silva et al., 2021) distinguen dos mecanismos fundamentales para la formación de nanoemulsiones.

El primero consiste en métodos de alta energía, como la homogeneización a alta velocidad, la utilización de ultrasonido o la homogeneización a alta presión, esta energía significativa se aplica a la emulsión y resulta en una disminución del tamaño de los glóbulos que se crean, por ende, en un aumento del área interfacial entre la fase dispersa y la fase continua. El segundo mecanismo es el método de baja energía, conocido como emulsificación espontánea, este proceso se caracteriza por la dispersión de los surfactantes en la fase que es contraria o menos afín a ellos.

2.5. Sonicación

El método de ultrasónica es también uno de los métodos más populares para la preparación de nanoemulsiones (NEs) por ser un proceso energéticamente eficiente, un sistema de manipulación fácil y directo, bajo costo de producción y producción de emulsiones estables. En los métodos de sonicación se utilizan ondas ultrasónicas de alta intensidad (frecuencia > 20 kHz) para preparar emulsiones que contienen gotas finas. El

papel clave del uso de ondas ultrasónicas es que produce un campo acústico que resulta en el fenómeno llamado 'cavitación', que es la rápida formación y colapso de burbujas de aire en un sistema líquido bajo presión reducida a temperatura ambiente. Este rápido colapso de burbujas de aire puede generar ondas de choque presurizadas que a su vez producen intensas fuerzas de corte que se propagan por todo el medio generando chorros de líquido. Las fuerzas físicas así generadas pueden mejorar la ruptura de las gotas de aceite facilitando así la formación de nanoemulsión O/W estable con gotas monodispersas de diámetro inferior a 100 nm (Singh & Pulikkal, 2022).

2.6. Agitación magnética

Este es un método muy básico que implica la agitación mecánica de la dispersión con la ayuda de un agitador magnético. Normalmente, el agitador magnético consta de una aguja magnética que se sumerge en el recipiente que transporta la mezcla de nanomaterial y el fluido base y que gira debido al campo magnético giratorio generado con la ayuda de electroimanes presentes en el interior del instrumento agitador. Esto crea una acción de agitación a alta velocidad suficiente para homogeneizar la mezcla (Loos, 2015).

2.7. Parámetros y características fisicoquímicas.

Los parámetros de sonicación determinan la eficiencia con la que la energía ultrasónica fragmenta las gotas de la fase oleosa durante la formación de la nanoemulsión. La amplitud regula la intensidad de la cavitación generada por el equipo: a mayor amplitud, mayor es la energía transmitida al sistema y, en consecuencia, menor el tamaño de gota resultante, aunque un exceso puede generar sobrecalentamiento de la muestra. El tiempo de sonicación determina la duración de la exposición del sistema a dicha energía; tiempos insuficientes no logran romper completamente las gotas, mientras que tiempos

excesivos pueden favorecer la reagregación de las partículas. Los ciclos de pulso (encendido/apagado) permiten disipar el calor generado durante el proceso, evitando la degradación térmica de los componentes sensibles, como el extracto botánico. En conjunto, estos parámetros determinan el tamaño final de gota y el índice de polidispersidad (PDI) de la nanoemulsión, dos de las variables de respuesta evaluadas en el Objetivo 1 de la presente investigación.

2.7.1. Tamaño de partícula

Las nanoemulsiones (NE) son un tipo de emulsiones con un tamaño de gota en fase dispersa de 10 a 100 nm, lo cual es extremadamente pequeño. Este rango de tamaño de gota no se excluye estrictamente, ya que muchos autores reportan diferentes rangos de tamaño de gota: 20 a 200 nm, 10 a 200 nm, 50 a 200 nm, 50 a 1000 nm y <100 nm (para productos farmacéuticos) (Campolo et al., 2020).

2.7.2. Polidispersión

La polidispersidad define la coexistencia de múltiples tamaños de partícula dentro de una dispersión. Para cuantificar esta heterogeneidad se emplea el índice de polidispersidad (PDI), un valor adimensional que varía de 0 a 1; los valores que se aproximan a 0 indican un sistema monodisperso de tamaño uniforme, mientras que los valores cercanos a 1 reflejan una distribución altamente heterogénea y siendo inestable (Mahbubul, 2019).

2.7.3. Potencial Z

La importancia del potencial zeta es que su valor puede estar relacionado con la estabilidad a corto y largo plazo de las emulsiones. Las emulsiones con alto potencial zeta (negativo o positivo) se estabilizan eléctricamente, mientras que las emulsiones con bajo

potencial zeta tienden a coagularse o flocular, lo que posiblemente conduzca a una estabilidad física deficiente (Lu & Gao, 2010).

2.7.4. Evaluación de Estabilidad

La estabilidad de una emulsión se define como la capacidad de la emulsión para resistir cambios en sus propiedades a lo largo del tiempo. Las emulsiones tienden a ser termodinámicamente inestables. La razón es que la emulsificación requiere una cantidad significativa de energía y el sistema tiende a volver a su estado anterior estado termodinámico con menor nivel de energía por separación de fases y área interfacial y reducción de energía (Velayati & Nouri, 2020).

2.8. Aplicaciones en la agricultura

La investigación y el desarrollo sobre bioplaguicidas hace mención sobre su aplicación práctica en el campo y como se enfocan en reducir la contaminación ambiental generada por residuos de plaguicidas químicos, y se los reconoce por su naturaleza biológica y como también promueven el desarrollo sustentable de la agricultura. En busca de la fomentar la modernización en la agricultura, se plantea el desarrollo de nuevos bioplaguicidas que, sin duda, tienen como objetivo reemplazar gradualmente el uso de los plaguicidas químicos. En la agricultura, especialmente en lugares que no están contaminados, los bioplaguicidas se convierten en una buena alternativa para reemplazar a los pesticidas químicos que se han usado tradicionalmente (Pengfei Leng, 2011).

2.9. Extracto

Los productos de desechos agrícolas, las plantas fácilmente disponibles y las plantas tradicionalmente utilizadas representan diferentes fuentes potenciales a considerar. Los pasos a tomar para comercializar un nuevo biopesticida incluyen la

detección, seguido de aislamiento, identificación y ensayo de compuestos activos en los extractos. Una excelente alternativa a los insecticidas químicos sintéticos para proteger los cultivos proviene de aceites vegetales (Samada & Tambunan, 2020).

Los AE y extractos se consideran muy importantes en diversas industrias debido a la gran presencia de compuestos volátiles, aromáticos y bioactivos. Además, estos compuestos eficaces tienen propiedades antioxidantes y antimicrobianas inherentes y desempeñan un papel esencial en las industrias farmacéutica, alimentaria, agrícola, cosmética y sanitaria (Bolouri et al., 2022).

2.10. Cáscara de cítricos

Los AE extraídos de cítricos se han utilizado en muchas aplicaciones industriales, como la perfumería, la farmacología, la industria alimentaria y la química fina. Los AE de cítricos se han probado como pesticidas contra varias plagas. Este interés puede deberse a su fácil disponibilidad en todo el mundo a un coste razonable. Muy frecuentemente, los AE de cítricos son subproductos de la industria del jugo de cítricos, y la técnica de prensado en frío hace que la extracción de AE sea menos costosa que otros métodos (Campolo et al., 2017).

2.11. Componentes Principales

2.11.1. Fase Oleosa (Extracto de cáscara de limón)

En una investigación Lim et al. (2023), El AE es una mezcla de líquido volátil e hidrófobo siendo capaz de ser destilado con vapor de agua, sin embargo, es altamente volátil y su degradación por condiciones del ambiente después de la extracción hace que pierda su valor como compuesto bioactivo complicando su efectividad y conservación a largo plazo siendo así un desafío su uso y aplicaciones en distintos campos.

2.11.2. Fase Acuosa

El agua destilada es agua sometida a un proceso de destilación que elimina contaminantes disueltos mediante ciclos de evaporación y condensación, aprovechando los diferentes puntos de ebullición de sus componentes, lo que permite obtener un grado de pureza adecuado para su uso como fase continua en sistemas emulsionados. En el presente trabajo, el agua destilada constituyó la fase acuosa de las formulaciones, actuando como medio dispersante del extracto y los demás componentes.

2.11.3. Emulsionantes

Los emulsionantes son sustancias que promueven la dispersión y estabilidad de las emulsiones al reducir la tensión interfacial, y obstáculo estérico. Los surfactantes o agentes tensioactivos son una clase de emulsionantes. Los emulsionantes tienen dos componentes polares (hidrófilos) y no polares (hidrófobos). Esta estructura molecular permite que el emulsionante sea soluble tanto en fase oleosa como acuosa (Velayati & Nouri, 2020).

- **Tween 80**

El Tween 80 (polisorbato 80, monooleato de polioxietileno sorbitán) es un tensioactivo no iónico que se utiliza ampliamente como emulsionante en cosméticos, productos farmacéuticos y alimentos. Está aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. para su uso hasta en un 1% en alimentos seleccionados (Chassaing et al., 2015).

2.12. Nanocristales de celulosa

Los nanocristales de celulosa (CNC) son materiales nanométricos renovables y de base biológica que pueden derivarse de plantas o bacterias y, en general, de una variedad

de fuentes ricas en celulosa renovables y altamente disponibles de los polímeros naturales más abundantes (Lizundia et al., 2020).

Además de su origen renovable, los CNC actúan como estabilizantes de tipo Pickering en sistemas emulsionados: se adsorben en la interfase aceite-agua formando una barrera física que dificulta la coalescencia de las gotas, mientras que su carga superficial contribuye a la repulsión electrostática entre ellas, lo que se refleja en el potencial Z de la emulsión (Ni et al., 2026).

2.13. Zeina

La zeína pertenece a la clase característica de proteínas conocidas como prolaminas, que se encuentran específicamente en los cereales (el equivalente de la hordeína en la cebada y la gliadina en el trigo). Casi toda la zeína está presente en el endospermo, mientras que la glutelina se distribuye entre el endospermo y el germen (Shukla & Cheryan, 2001).

Debido a su carácter anfifílico, con dominios hidrofóbicos e hidrofílicos bien definidos, la zeína puede actuar como agente encapsulante y estabilizante en sistemas nanoemulsionados, formando una capa protectora en la interfase que reduce la degradación del compuesto activo encapsulado y aporta estabilidad adicional al sistema (Yan et al., 2022).

2.14. D-limoneno

Los cítricos tienen un alto contenido de aceites esenciales y sirven como una fuente clave de aceites esenciales naturales. El aceite esencial de cítricos tiene una variedad de efectos farmacológicos y un alto valor comercial. El limoneno, el componente principal del aceite esencial de cítricos, incluye principalmente d-limoneno, l-limoneno y dl-limoneno, y el d-limoneno representa hasta el 90% del contenido de aceite esencial de

cítricos. El contenido de limoneno de las diferentes plantas de cítricos varió considerablemente: las naranjas sanguinas contenían un 63% de limoneno, las naranjas dulces un 88%, los limones un 78%, la bergamota un 72%, las naranjas amargas un 48,85% y la mandarina un 69% (todo extraído mediante extracción con disolventes) (Chen et al., 2024).

2.15. Principio activo

El principio activo es el compuesto químico específico o la mezcla de metabolitos secundarios, que ejerce la acción biológica directa (inhibitoria, tóxica o repelente) sobre el organismo plaga. En los bioplaguicidas botánicos como los derivados de cítricos, este agente típicamente el D-limoneno es el responsable de alterar la fisiología celular del patógeno objetivo mientras que los demás elementos de la nanoemulsión actúan exclusivamente como matriz estabilizadora o vehículo para proteger el compuesto y facilitar su entrega controlada (Cantrell et al., 2012).

2.16. Espectrofotometría UV-Vis

La espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis) es una de las técnicas espectroscópicas más directas, la cual ha experimentado un crecimiento notable a lo largo de los años debido al desarrollo de una amplia gama de metodologías y a su aplicación en una infinidad de muestras dentro de diversos campos, tales como las ciencias agrícolas, alimentarias, farmacéuticas y ambientales, entre otros. Esta técnica se basa en medir la absorción de radiación electromagnética en las regiones ultravioleta y visible. Esto proporciona información química valiosa a partir de la posición, intensidad y forma de las bandas, indicando la presencia o ausencia de propiedades estructurales o grupos funcionales específicos. Sin embargo, los espectros UV-Vis suelen presentar solo unas

pocas bandas de absorbancia, las cuales a menudo son bastante anchas y difíciles de asociar con cromóforos individuales (Ríos-Reina & Azcarate, 2023).

2.17. Ensayos in vitro y hongos objetivo

El término in vitro, que proviene del latín y significa literalmente “en vidrio”, se refiere a procesos que pueden llevarse a cabo fuera de la célula viva, en alusión a los matraces y tubos de ensayo de vidrio en los que se llevaron a cabo muchos de los primeros trabajos biológicos (Richards & Hawley, 2011).

2.17.1. Monilinia laxa

La pudrición parda, causada por *Monilinia laxa, Monilinia fructigena* y *Monilinia fructicola*, es una de las enfermedades de postcosecha más comunes y graves que afectan a las frutas de carozo y pepita a nivel mundial. La enfermedad causa síntomas severos: tizón floral, cancros en las ramas y pudrición parda del fruto, dependiendo del órgano afectado. El patógeno ataca principalmente a los árboles frutales de la familia de las rosáceas, como manzanos, perales, cerezos, etc. El impacto de la pudrición parda es notable principalmente después de la cosecha de manzanas. Las pérdidas anuales a nivel mundial debido a las epidemias se estiman en 1700 millones de euros. Bajo condiciones ambientales favorables, la pudrición parda se ha asociado con hasta un 80 % de la incidencia de pérdida de fruta en postcosecha, (Khadiri et al., 2024).

Si bien *Monilinia laxa* afecta principalmente a frutales de la familia Rosaceae, su inclusión en el presente estudio responde a su relevancia como fitopatógeno de importancia económica en postcosecha y a su uso extendido como organismo modelo para evaluar la actividad antifúngica de compuestos bioactivos de amplio espectro, permitiendo así valorar el potencial del nanoformulado más allá de su aplicación específica en cítricos.

2.17.2. Rhizopus Stolonifer

Entre los hongos Zygomycetes, algunas de las especies más conocidas y estudiadas se encuentran dentro del género *Rhizopus*. Estos hongos son generalmente saprófitos y se pueden encontrar viviendo en material orgánico muerto y en descomposición (Lennartsson et al., 2014).

Rhizopus stolonifer es un excelente ejemplo de la enfermedad de podredumbre blanda causada por *Rhizopus*. Esta especie incluso es capaz de estropear los alimentos tras un tratamiento preventivo, ya que sus enzimas son notablemente estables al calor y están activas incluso después de 40 minutos a 100°C (Lennartsson et al., 2014).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

En este capítulo se describen los procesos y métodos realizados durante la investigación.

3.1. Enfoque de la investigación

El presente estudio utiliza un método cuantitativo y cualitativo. Es de carácter cuantitativo ya que hace la recopilación y el análisis de datos numéricos sobre las características fisicoquímicas de las nanoformulaciones (tamaño de partícula, polidispersidad y potencial Z) mediante dispersión de luz (DLS/ELS), así como el cálculo matemático del porcentaje de inhibición micelial medido en milímetros cuadrados a través del software ImageJ.

De manera complementaria, incorpora un análisis cualitativo al evaluar de forma espectral la presencia o ausencia del principio activo y el comportamiento óptico macroscópico de las fases coloidales desarrolladas.

3.2. Tipo de investigación

Conforme a su finalidad, responde a una investigación aplicada, dado que su objetivo es generar una solución práctica para el control de plagas y la revalorización de residuos mediante el desarrollo de un bioplaguicida nanoformulado de extracto de cáscara de limón (*Citrus meyeri*) con potencial de aplicación real en el sector agroindustrial. Asimismo, se clasifica como una investigación relacional y explicativa, debido a que busca indagar sobre la influencia de variables clave en la formulación y el procesamiento de la nanoformulación, explicando las causas físico-químicas de su estabilidad e interacción biológica para dar respuesta a la hipótesis planteada.

3.3. Diseño de la investigación

El diseño metodológico corresponde a un enfoque experimental, ejecutado mediante un diseño completamente al azar (DCA) que se estableció de manera independiente para cada una de las cepas fúngicas evaluadas (*Monilinia laxa* y *Rhizopus stolonifer*), las unidades experimentales se analizaron por triplicado y fueron asignadas aleatoriamente a los diferentes tratamientos y controles.

De este modo la variable independiente estuvo representada por la composición de los nanoformulados (extracto de cáscara, Tween 80, nanocristales de celulosa y zeína), los parámetros de ultrasonicación (amplitud y tiempo), y los controles correspondientes (negativo, positivo y vehículos). Por otro lado, las variables dependientes correspondieron a las propiedades fisicoquímicas de estabilidad coloidal y al porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de los hongos.

Desde la perspectiva temporal y espacial, se trata de una investigación transversal y de laboratorio, ya que la recolección de datos se llevó a cabo en un período de evaluación definido y se desarrolló íntegramente en un entorno aislado y controlado dentro de las instalaciones de la Universidad Técnica del Norte y la Universidad Yachay Tech.

3.4. Ubicación del lugar

El desarrollo de la presente investigación se realizó en las instalaciones de los laboratorios de análisis fisicoquímico y microbiológico de la Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales (FICAYA) de la Universidad Técnica del Norte, ubicado en las calles. Juan Montalvo y Juan de Velasco (Antiguo Hospital San Vicente de Paul), en la ciudad de Ibarra, Imbabura, Ecuador (0°21′46″N 78°07′48″O).

Adicionalmente, los análisis de caracterización fisicoquímica (tamaño de partícula, PDI y potencial Z) se realizaron en las instalaciones de la Universidad Yachay Tech, ubicada en Urcuquí, Imbabura, Ecuador.

3.5. Materiales, equipos y software

Tabla 1 Materiales, equipos, reactivos y software.

Materia Prima	**Insumos**	**Reactivos**	**Equipos**	**Materiales de laboratorio**	**Software**
Extracto de cáscara de limón Maíz seco Cepas de hongos (*Rhizopus Stolonifer y Monilinia laxa*) Medio PDA	Agua destilada Etanol Hexano Éter de petróleo.	Tween 80 Nanocristales de celulosa D-limoneno Benomil Cloranfenicol	Balanza analítica Agitador magnético Plancha de calentamiento Ultrasonido (Homogeneizador) Analizador DLS Cámara de almacenamiento Espectrofotómetro Destilador Recirculador Cabina de flujo laminar Secador de bandejas Molino industrial	Tubos de ensayo graduados Pipetas Gradilla Vasos de precipitación Filtros Matraces Matraces aforados Micropipetas Bolsas de diálisis de celulosa regenerada Regla milimétrica	Software estadístico y programas de hoja de cálculo

3.6. Obtención del material.

Para el desarrollo de los objetivos fue necesaria la obtención del extracto de cáscara de limón y zeína de maíz.

3.6.1. Materia prima.

La materia prima utilizada en esta investigación fue la cáscara de limón Meyer *(Citrus Meyeri Y. Tan),* recolectadas de la empresa CITRONSAFT S.A.S., que se encuentra ubicada en la parroquia Imbaya, en la calle Santiago de Rey.

3.6.2. Extracto de cáscara de limón.

Se emplearon cáscaras de limón Meyer (*Citrus × meyeri*). Las cáscaras se lavaron y se sometieron a un secado inicial por exposición solar durante 6 h; posteriormente, el material se deshidrató a 40 °C en dos periodos de 12 h. Finalmente, la cáscara seca se molió hasta obtener un polvo homogéneo, que constituyó la materia prima para la obtención del extracto.

El proceso de extracción se realizó con el equipo para destilación Soxhlet, donde se colocó la muestra solida triturada, entre 50 - 60g, en la cámara central de destilación, mientras en el matraz redondo se colocó el solvente, 400mL de etanol al 96%, el proceso duro alrededor de 10 horas, posteriormente el extracto fue rotoevaporado durante 2 periodos de 6 horas, con la finalidad de retirar el etanol.

3.6.3. Zeína de maíz.

Figura 1 Procedimiento para la obtención de Zeina (Parte 1)

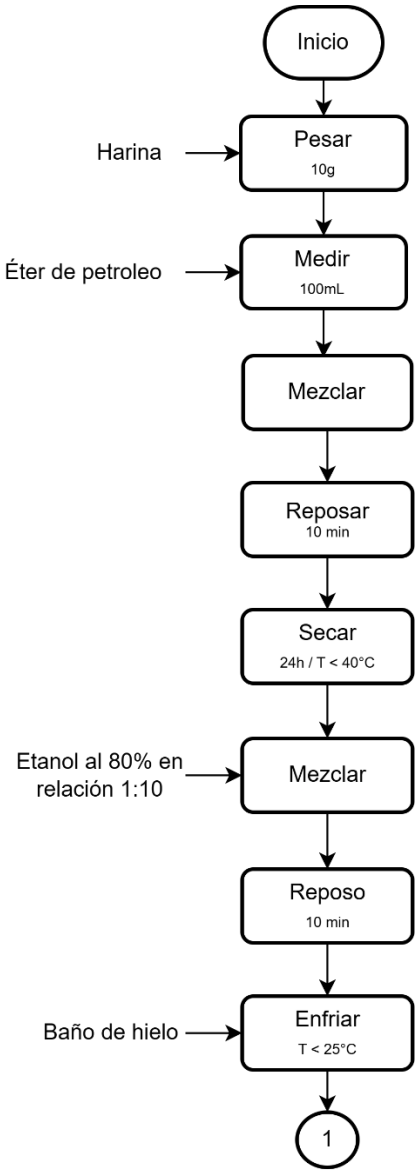
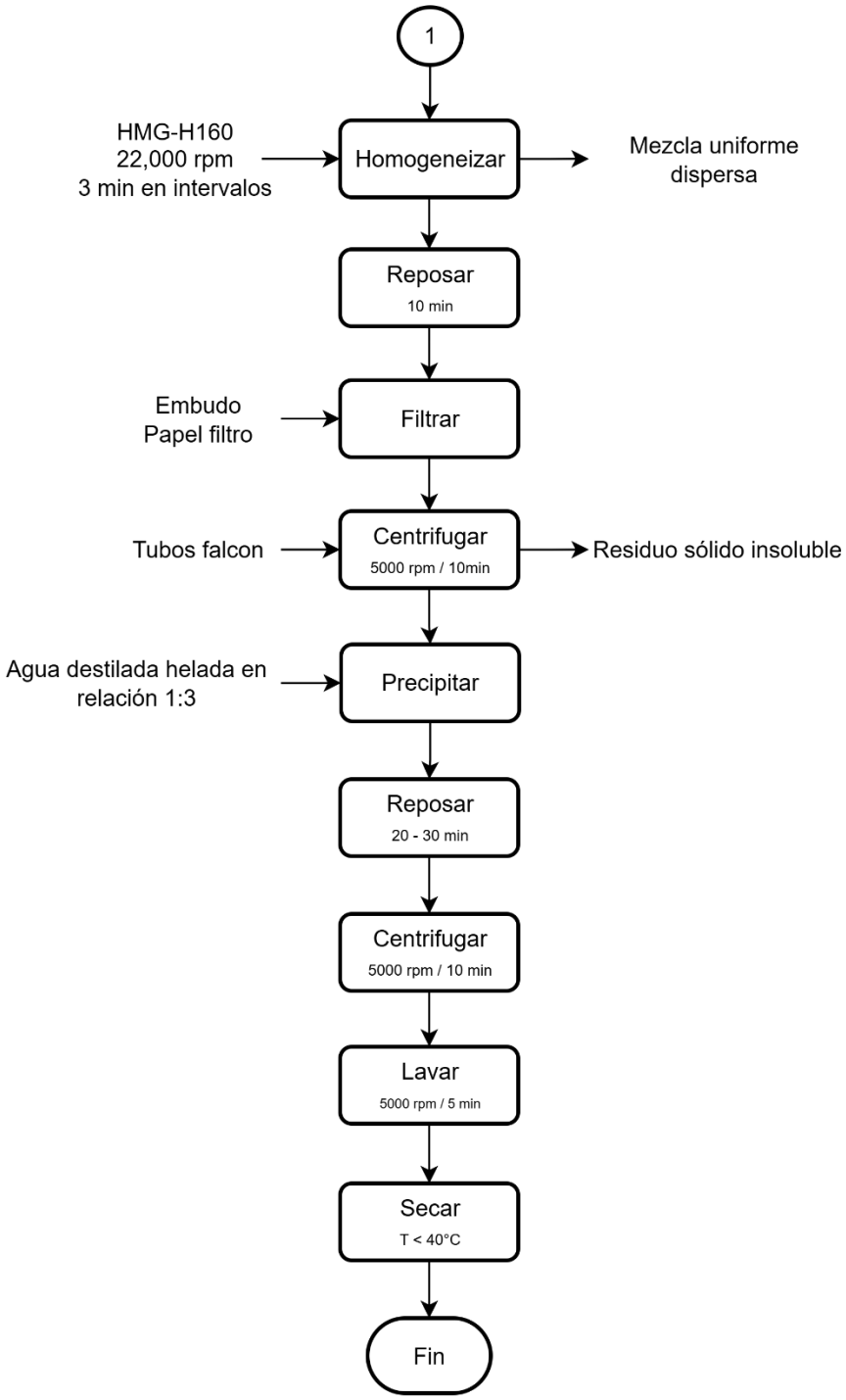


Figura 2 Procedimiento para la obtención de Zeina (Parte 2)



La zeína se obtuvo a partir de harina de maíz mediante desengrasado, solubilización y precipitación. Se desengrasaron 10 g de harina de maíz con 100 mL de éter. La harina desengrasada y seca se mezcló con etanol al 80 % (v/v) y se dejó en reposo 10 min para favorecer la solubilización de la zeína. La mezcla se homogeneizó a 22 000

rpm durante 3 min, en intervalos de 30 s y en baño de hielo, y se dejó reposar 10 min. El sistema se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min y se recuperó el sobrenadante con la zeína solubilizada.

Para la precipitación se añadió agua destilada al sobrenadante en relación 1:3 (v/v), se mantuvo en reposo de 20 a 30 min y se centrifugó a 5000 rpm por 10 min. El pellet se lavó con 7 mL de agua destilada mediante centrifugación a 5000 rpm durante 5 min y se secó a una temperatura no superior a 40 °C hasta peso constante, obteniéndose zeína sólida.

3.6.4. Obtención y Reactivación de Cepas Microbianas.

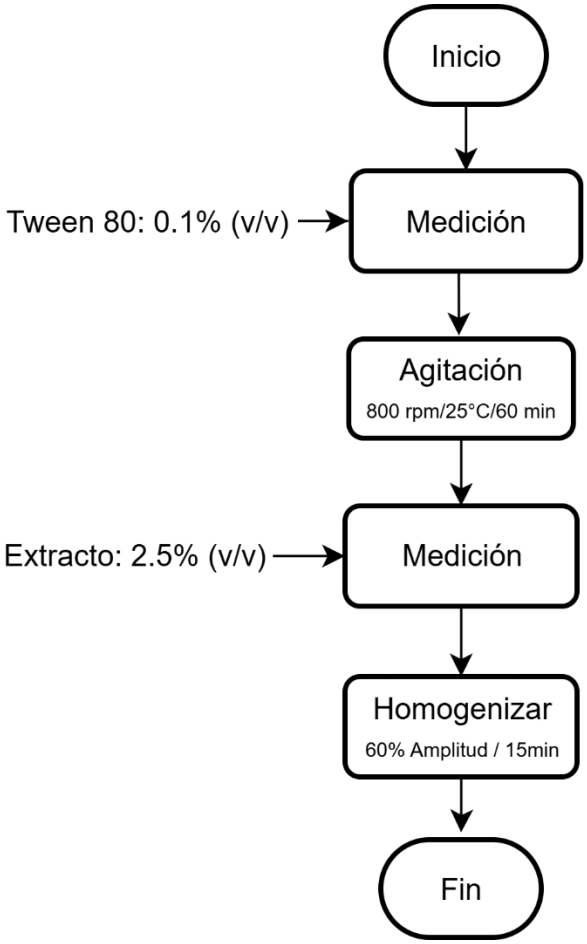
Las cepas de hongos que se utilizaron durante la investigación fueron proporcionadas por el laboratorio de Biotecnología de la Universidad Técnica del Norte, ubicado en el campus del antiguo Hospital San Vicente de Paúl, en la ciudad de Ibarra, Ecuador. Previo a su uso experimental, con la finalidad de garantizar su viabilidad y crecimiento durante la evaluación antimicrobiana in vitro, los hongos fueron reactivados en medio Papa Dextrosa Agar (PDA).

3.7. Identificación de los parámetros de sonicación (amplitud y tiempo) para la obtención de una nanoemulsión estable con un tamaño de partícula y polidispersidad deseables.

Para el desarrollo del nanoformulado base (Nanoformulación 1) se adoptaron los parámetros de ultrasonicación reportados por (Patil, 2025), por su eficacia demostrada en la obtención de nanoemulsiones estables. La formulación se sometió a ultrasonicación con una amplitud del 60 % durante 15 min, aplicando pulsos de 5 s de encendido y 5 s de apagado, y manteniendo el sistema en baño de hielo y agua fría para controlar la

temperatura. A partir de este proceso se determinaron el tamaño de partícula, el índice de polidispersidad (PDI) y el potencial Z; los análisis se realizaron por triplicado.

Figura 3 Proceso para el formulado y nanoformulado 1.



Descripción del proceso

La composición del nanoformulado 1 se describe en la Tabla 4.

Medición: El Tween 80, un emulsionante, se midió al 0.1% en un vaso de precipitación con agua destilada.

Agitación: La mezcla que contiene Tween 80 fue agitado a una velocidad de 800 revoluciones por minuto (rpm) durante 60 minutos a 25°C. Esto asegura la disolución o dispersión adecuada del Tween 80 para formar la fase continua de la emulsión.

Medición: Se midió el extracto de la cáscara al 2.5% del volumen total.

Homogenización: La mezcla homogénea de Tween 80, extracto de cascara de limón y agua destilada fue sometida a un tratamiento de homogenización de alta energía. Esto fue crucial para fragmentar las gotas y crear la nanoemulsión, desaglomerando y mejorando la dispersión (Patil, 2025).

3.7.1. Caracterización de las propiedades fisicoquímicas de las nanoemulsiones desarrolladas, evaluando su estabilidad mediante medición del tamaño de partícula, polidispersidad, potencial z.

La formulación fue caracterizada para determinar sus propiedades fisicoquímicas.

Tabla 2 Características fisicoquímicas, método, unidades y parámetros

Característica fisicoquímica para evaluar	Método de análisis	Unidades	Parámetros
Tamaño de partícula (diámetro hidrodinámico)	Dispersión dinámica de luz (DLS)	Nanómetros (nm)	≤ 400
Índice de polidispersidad (PDI)	Dispersión dinámica de luz (DLS)	Adimensional (0-1)	≤ 0.5
Potencial Z (ZP)	Dispersión electroforética de luz (ELS)	mV	$\|ZP\| \geq 30$

El tamaño de partícula y la polidispersidad se evaluaron mediante dispersión dinámica de luz (DLS), mientras que el potencial Z se determinó por dispersión electroforética de luz (ELS); ambos análisis se realizaron con el equipo disponible en las instalaciones de la Universidad Yachay Tech.

Para la caracterización se trabajó con la temperatura alrededor de 25 °C en el DLS. De la muestra obtenida se realizó la caracterización, para lo cual con ayuda de una pipeta fue tomado alrededor de 3 mL de formulación para el análisis, se colocaron en las cubetas

del DLS y se interpretó los resultados en el equipo. Se llevó un registro de resultados de cada uno de los análisis.

3.8. Valoración de los parámetros de liberación in vitro mediante ensayos con membrana de diálisis y espectrofotometría UV-Vis analizando la capacidad del nanoformulado para liberar el compuesto.

La determinación del D-limoneno se abordó inicialmente por espectrofotometría UV-Vis. Para la cuantificación se intentó construir una curva de calibración expresada en mg/mL; sin embargo, las lecturas de absorbancia presentaron una variación considerable entre repeticiones de una misma muestra, lo que impidió obtener una linealidad confiable. Este comportamiento coincide con lo reportado por García (2019), quien, pese a alcanzar coeficientes de determinación aceptables (R^2 de 91 % y 98 %), evidenció que la dispersión de los datos hacía inviable el cálculo de la concentración absoluta del monoterpeno. En consecuencia, se descartó la cuantificación de masa directa por esta vía.

Como alternativa, el método se orientó hacia un análisis cualitativo mediante un barrido espectral de 190 a 320 nm. El estándar de D-limoneno puro mostró de forma nítida su pico característico a 207 nm, confirmando el adecuado funcionamiento del equipo. No obstante, al analizar los sobrenadantes purificados de las nanoformulaciones (agua destilada, Tween 80 y extracto de cáscara), se registró una marcada interferencia de la matriz: los espectros no presentaron el pico a 207 nm, sino absorbancias erráticas y un desplazamiento del máximo hacia la banda de 230 a 244 nm. Este comportamiento se atribuye a dos fenómenos: por un lado, las micelas residuales de Tween 80 dispersan la luz ultravioleta dentro de la celda de cuarzo, generando lecturas inestables; por otro, los coextractivos propios de la cáscara de limón como flavonoides y compuestos fenólicos

que absorben intensamente en esa región espectral y enmascaran la señal del monoterpeno.

Esta evidencia instrumental demostró que la complejidad química de la nanoemulsión botánica impide aislar y cuantificar el D-limoneno por espectrofotometría UV-Vis directa sin una etapa previa de purificación cromatográfica. Por tanto, el análisis espectrofotométrico permitió confirmar la identidad del D-limoneno en el estándar de referencia y caracterizar el comportamiento óptico de la matriz de las nanoformulaciones, estableciendo que la determinación cuantitativa del monoterpeno en este sistema requiere una etapa previa de separación de sus componentes.

Tabla 3 Parámetros y método de liberación del principio activo

Parámetro	Método
Presencia del principio activo (D-limoneno)	Espectrofotometría UV-Vis
Absorbancia	Espectrofotometría UV-Vis

3.9. Determinación del proceso de obtención de nanoemulsiones estables de D-limoneno, variando las mezclas de aceite, tensoactivo y coestabilizador, para caracterizar sus propiedades fisicoquímicas, estabilidad y perfil de liberación in vitro.

Se desarrollaron tres nanoformulaciones variando sus componentes y, adicionalmente, una formulación de referencia sin nanoemulsionar. La formulación de referencia y la Nanoformulación 1 comparten la misma composición; su diferencia radica en el procesamiento, ya que la primera no se somete a ultrasonicación y la segunda sí. Las composiciones fueron: formulación de referencia (extracto + Tween 80 + agua

destilada); Nanoformulación 1 (extracto + Tween 80 + agua destilada); Nanoformulación 2 (extracto + Tween 80 + nanocristales de celulosa + agua destilada); y Nanoformulación 3 (extracto + Tween 80 + nanocristales de celulosa + zeína + agua destilada).

Figura 4 Proceso de nanoformulado 2; CNCs + Tween 80 + Extracto

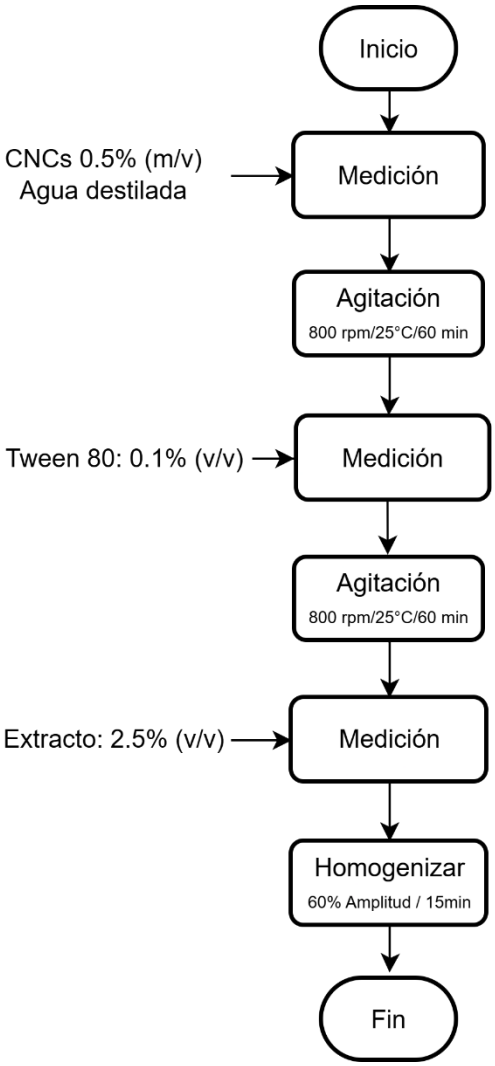
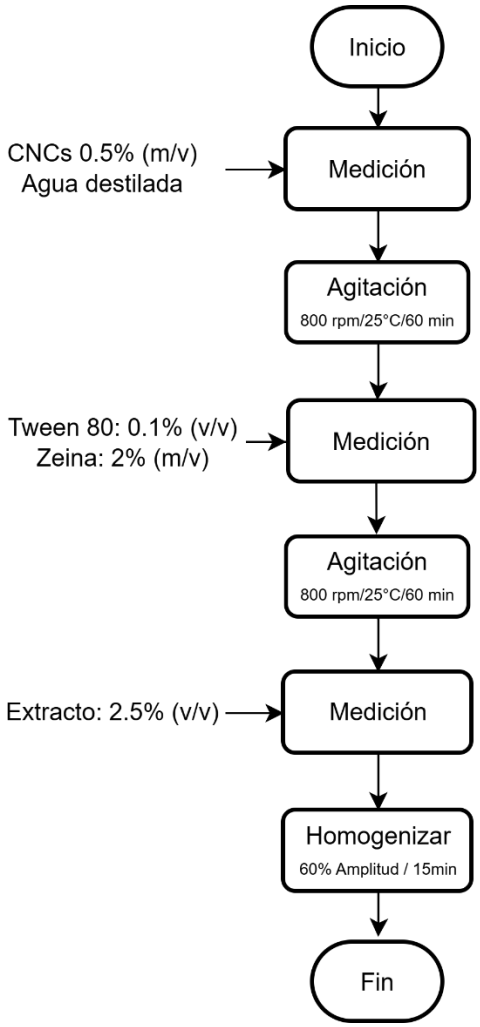


Figura 5 Proceso de nanoformulado 3; CNCs + Tween 80 + Extracto + Zeina



Descripción del proceso

El proceso de obtención de las nanoemulsiones inició con la preparación de la fase acuosa base. Para ello se midieron nanocristales de celulosa (CNCs) a una concentración del 0.5% (m/v) en agua destilada dicha suspensión se sometió a agitación constante a 800 rpm y 25 °C durante 60 minutos garantizando la correcta hidratación y dispersión homogénea de las partículas de celulosa.

La segunda etapa consistió en la incorporación de los agentes estabilizantes marcando la divergencia entre los tratamientos. Se añadió el emulsionante Tween 80 al 0.1% a la mezcla. Exclusivamente para el nanoformulado 3 se incorporó simultáneamente

proteína zeína al 2% (m/v). Ambas variantes experimentales recibieron un segundo ciclo de agitación bajo los parámetros iniciales (800 rpm, 25 °C, 60 min) para asegurar la integración uniforme.

Finalmente, se procedió a la estructuración de la nanoemulsión, se midió el extracto al 2.5% (v/v) y se dosificó sobre la fase estabilizada y se sometió a ultrasonicación.

Cada nanoformulación fue sometida a un volumen total de 5 mL, con la composición que se muestra en la Tabla 4 según corresponde, se realizó el proceso de la Figura 4 y Figura 5 con los parámetros de sonicación según la metodología de Patil (2025) descrita en el Objetivo 1. Para cada una se evaluó la estabilidad mediante la caracterización de tamaño de partícula, PDI y potencial Z.

La actividad antifúngica in vitro se evaluó frente a *Monilinia laxa y Rhizopus stolonifer* mediante la técnica de medio de cultivo envenenado en placas Petri. Se evaluaron las tres nanoformulaciones y la formulación de referencia, incluyendo un control positivo (Benomil), un control negativo (medio PDA sin adición) y tres controles vehículo (Tween 80, nanocristales de celulosa y zeína). El efecto sobre los hongos se determinó a partir del porcentaje de inhibición, calculado en función del área de crecimiento micelial medida con el programa ImageJ.

Tabla 4 Composición de las formulaciones y nanoformulaciones para 5mL.

Componentes	**Formulado**		**Nanoformulado 1**		**Nanoformulado 2**		**Nanoformulado 3**	
		%		%		%		%
Extracto	125µl	2.5	125µl	2.5	125µl	2.5	125µl	2.5
Tween 80	5µl	0.1	5µl	0.1	5µl	0.1	5µl	0.1
CNC	-	-	-	-	25mg	0.5	25mg	0.5
Zeina	-	-	-	-	-	-	100mg	2

3.9.1. Caracterización de las propiedades fisicoquímicas de las nanoformulaciones desarrolladas, evaluando su estabilidad mediante medición del tamaño de partícula, polidispersidad y potencial Z.

Tabla 5 Características, descripción, método, unidades y parámetros

Característica fisicoquímica para evaluar	Descripción breve de la importancia	Método de análisis	Unidades	Parámetros
Tamaño de partícula (diámetro hidrodinámico)	Indica el tamaño promedio de las gotículas de la nanoemulsión, crucial para su clasificación como "nano" y su comportamiento (estabilidad).	Dispersión dinámica de luz (DLS)	Nanómetros (nm)	≤ 400
Índice de polidispersidad (PDI)	Mide la homogeneidad del tamaño de las gotículas. Valores bajos (≤ 0.3) indican una distribución de tamaño uniforme y buena estabilidad.	Dispersión dinámica de luz (DLS)	Adimensional (0-1)	≤ 0.5
Potencial Z (ZP)	Mide la estabilidad electrostática de gotitas y partículas.	Dispersión electroforética de luz (ELS)	Milivoltios (mV)	|ZP| ≥ 30

- Tamaño de partícula índice de polidispersidad (PDI) y potencial Z:

La caracterización se hizo por triplicado, se trabajó con DLS y ELS, a temperatura alrededor de 25°C para las 3 nanoformulaciones, se llevó registro de todos los datos obtenidos.

3.9.2. Liberación del principio activo (D-limoneno), mediante ensayos in vitro en hongos *Rhizopus stolonifer* y *Monilinia laxa*.

El proceso de preparación de medio, tratamientos, grupos de control e inoculación se realizó en una cabina de flujo laminar previamente desinfectada y en condiciones asépticas (Hernández-Lauzardo et al., 2007).

- **Preparación de tratamientos.**

Control positivo (Benomil): Se preparó una solución concentrada a una concentración de 1500 ppm bajo condiciones asépticas (Martínez Hernández, 2017).

Vehículo (Tween 80): Se preparó una solución madre utilizando una proporción de 1 $mL \cdot L^{-1}$ por cada 60 mL de medio.

Vehículo (CNC): Se preparó una solución madre utilizando una proporción de 0.5% por cada 60 mL de medio.

Vehículo (Zeina): Se preparó una solución madre utilizando una proporción de 1% por cada 60 mL de medio.

Tratamiento (Formulado y Nanoformulado): El extracto etanólico de cáscara de limón al 2.5%, se filtró previamente mediante membranas de 0.22 µm y se manejó en todo momento bajo condiciones estériles.

- **Preparación y esterilización del medio base**

Dosificación: Se pesó y preparó el medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) de la marca TM MEDIA, siguiendo las instrucciones del fabricante a una razón de 39 g/L,

para la esterilización se llevó el medio a autoclave bajo condiciones estándar: 121 °C y 15 lb/in² y finalmente se dejó enfriar el medio hasta alcanzar una temperatura aproximada de 45 °C (Larios-Palacios et al., 2020).

- **Preparación del medio envenenado (Formulado y Nanoformulados)**

Se vertió el medio, Papa Dextrosa Agar (PDA), y se dejó enfriar a una temperatura adecuada.

Al medio enfriado, se le incorporó los tratamientos de cáscara de limón (Formulado y Nanoformulado 1,2,3) hasta alcanzar una concentración final del 2,5 % (v/v).

- **Grupos de control**

Para validar el ensayo, se prepararon tres tipos de controles junto con el tratamiento (Gonzales Estrada, 2021) (Larios-Palacios et al., 2020).

Control Negativo: Medio PDA puro, sin adición de extracto ni fungicida.

Control Positivo: Medio PDA con la incorporación del fungicida (Benomil).

Control Vehículo 1: Medio PDA que incluyó únicamente el Tween 80, manteniendo la misma proporción utilizada en el tratamiento.

Control Vehículo 2: Medio PDA que incluyó únicamente el CNC, manteniendo la misma proporción utilizada en el tratamiento.

Control Vehículo 3: Medio PDA que incluyó únicamente la zeína, manteniendo la misma proporción utilizada en el tratamiento.

Las cajas Petri se dejaron reposar a temperatura ambiente hasta que el agar solidificó por completo, finalmente, las placas se rotularon adecuadamente, se sellaron

con parafilm (para evitar contaminación y deshidratación) y se almacenaron en refrigeración hasta el momento de ser utilizadas en los ensayos antifúngicos.

- **Inoculación de cepas**

Se utilizaron cultivos madre de *Monilinia laxa* y *Rhizopus stolonifer* previamente incubados durante 5 a 7 días para asegurar un crecimiento micelial activo, para la extracción del inoculo se emplearon sorbetes estériles para perforar el medio de cultivo de las cepas madre. Con este procedimiento se extrajeron los discos de micelio activo con un diámetro uniforme y se procedió a la inoculación en las placas de ensayo, bajo estrictas condiciones asépticas (Fusaro, 1972), se tomaron los discos de micelio utilizando palillos estériles y cada disco se transfirió y se colocó exactamente en el centro de cada nueva placa Petri (las que contienen los tratamientos y controles).

Las placas inoculadas se sellaron con parafilm para evitar la deshidratación y contaminación y se incubaron a una temperatura controlada de 27 °C (Romo Chacón et al., 2011).

- **Incubación y medición de crecimiento**

El crecimiento micelial se registró por medio de fotografía cada 24 horas, hasta culminar en la hora 144. Las tomas se realizaron estrictamente a la misma hora cada día para garantizar la uniformidad y comparabilidad de las mediciones temporales.

Las fotografías se procesaron con el software ImageJ para medir con alta precisión el área ocupada por el micelio en milímetros cuadrados (mm^2) (Gonzales Estrada, 2021). A partir del área obtenida, se estimó el diámetro de crecimiento y utilizando estos valores, se procedió a calcular el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial mediante la siguiente ecuación: % Inhibición = [(Dc − Dt) / Dc] × 100, donde Dc corresponde al valor promedio del control negativo y Dt al del tratamiento (Sandoval Flores et al., 2018).

3.10. Análisis Estadísticos

Los datos fueron analizados estadísticamente en el software R. Previo al análisis principal, se evaluó el cumplimiento de los supuestos de normalidad a través de las pruebas de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas por medio de Levene. Tras verificar estas condiciones, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor con el fin de evaluar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos. En los casos donde se registraron efectos significativos ($p < 0.05$), se procedió con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para discriminar las diferencias específicas entre los grupos.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

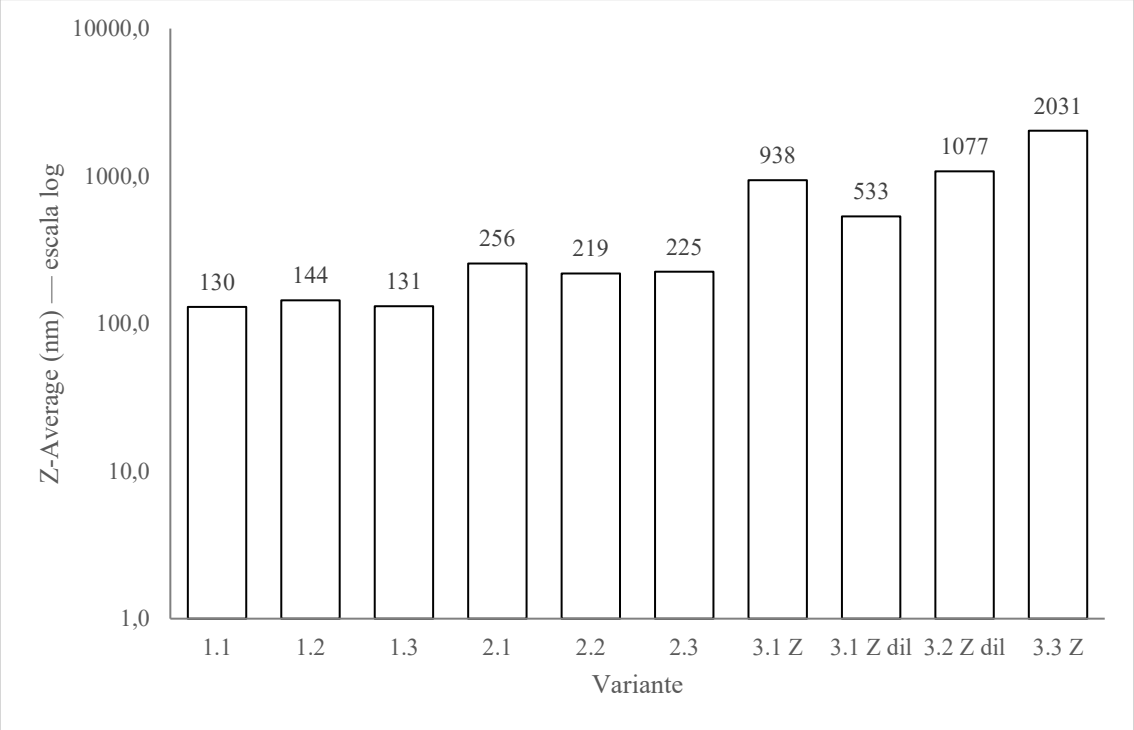
En este capítulo se resumen los resultados más relevantes presentes en la investigación.

4.1. Características fisicoquímicas de las formulaciones

A continuación, se presenta los datos que corresponden al análisis por medio de DLS y ELS de las nanoformulaciones obtenidas.

4.1.1. Tamaño de partícula (Z-Average)

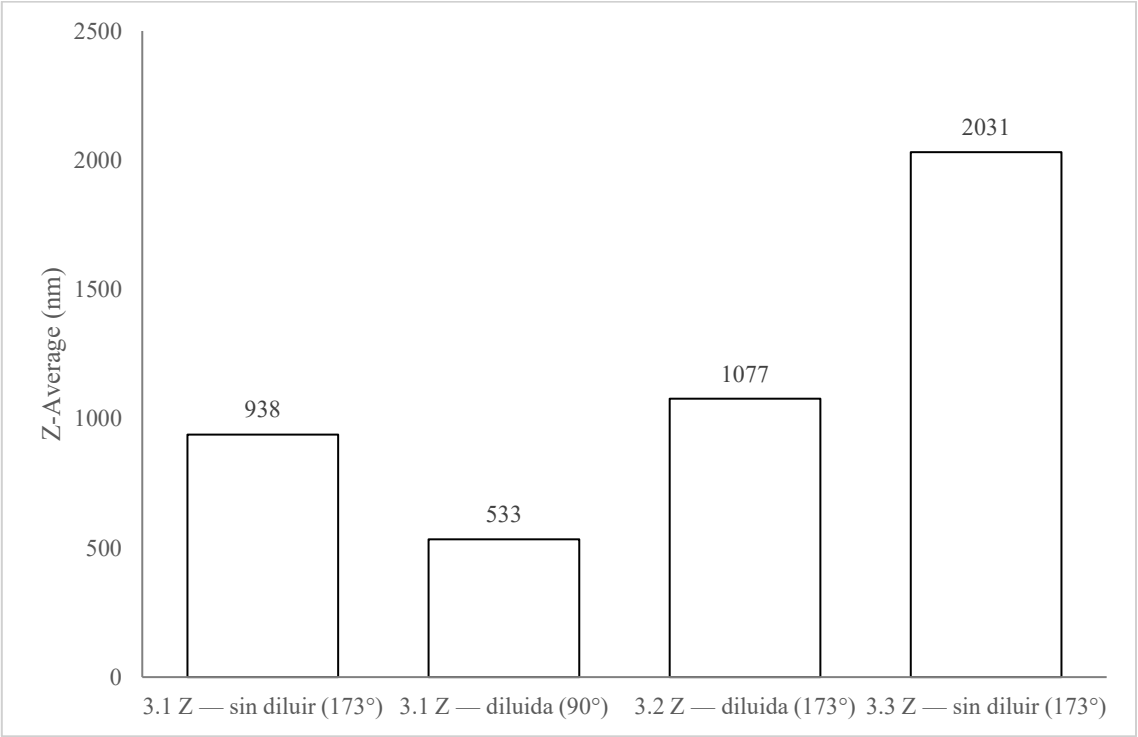
Figura 6 Tamaño hidrodinámico (Z-Average) por variante



Como se observa en la Figura 6 y en la Tabla 7 el Nanoformulado 1 presentó el menor tamaño de partícula (135.0 ± 7.8 nm), seguido del Nanoformulado 2 (233.1 ± 19.8 nm) aunque la diferencia entre ambos fue estadísticamente significativa, ambos se ubican bajo el objetivo de ≤ 400 nm establecido en la Tabla 5

Por otra parte, el Nanoformulado 3 que incorporó zeína al 2 % (m/v), presentó los mayores tamaños de partícula de todas las formulaciones evaluadas como se observa en la Figura 7 (entre 533 y 2031 nm), superando ampliamente el objetivo de ≤ 400 nm. A diferencia de los nanocristales de celulosa, la zeína se incorporó en forma de polvo directamente a la formulación, dependiendo únicamente de la energía de sonicación para reducir su tamaño de partícula, sin una etapa previa de solubilización. Esto es consistente con lo observado durante el proceso experimental, donde al dejar reposar la formulación se evidenciaba precipitación y acumulación de material en el fondo del recipiente, que al agitarse manualmente producía una dispersión de aspecto turbio, en lugar de una nanoemulsión homogénea y estable. Estas observaciones respaldan lo registrado en las mediciones de tamaño hidrodinámico (Tabla 7), donde los valores más elevados se asociaron a la presencia de zeína en alta concentración, y donde la dilución de las muestras redujo notablemente el Z-Average, evidenciando que buena parte del tamaño aparente correspondía a interacciones partícula-partícula y agregación proteica, más que al tamaño real de una nanopartícula individual.

Figura 7 Efecto de dilución y ángulo en Serie 3 (Z-Average)



4.1.2. Índice de polidispersidad (PDI)

Los registros de PDI medio se ubicaron entre 0.09 y 0.34, todos por debajo del objetivo de ≤ 0.5, indicando polidispersidad moderada. El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre nanoformulaciones ($F = 10.91$; $p = 0.007$), debido a que, el Nanoformulado 1 presentó un PDI significativamente menor y más homogéneo que el Nanoformulado 2 ($p = 0.026$) y que el Nanoformulado 3 ($p = 0.007$); estos dos últimos no difirieron significativamente entre sí ($p = 0.681$), lo que significa que estadísticamente son idénticos entre sí.

En la Figura 8 se puede observar la relación entre el tamaño y la polidispersidad, los mismo que son descritos en la Tabla 6.

Figura 8 Relación tamaño–polidispersidad (Z-Average vs PDI)

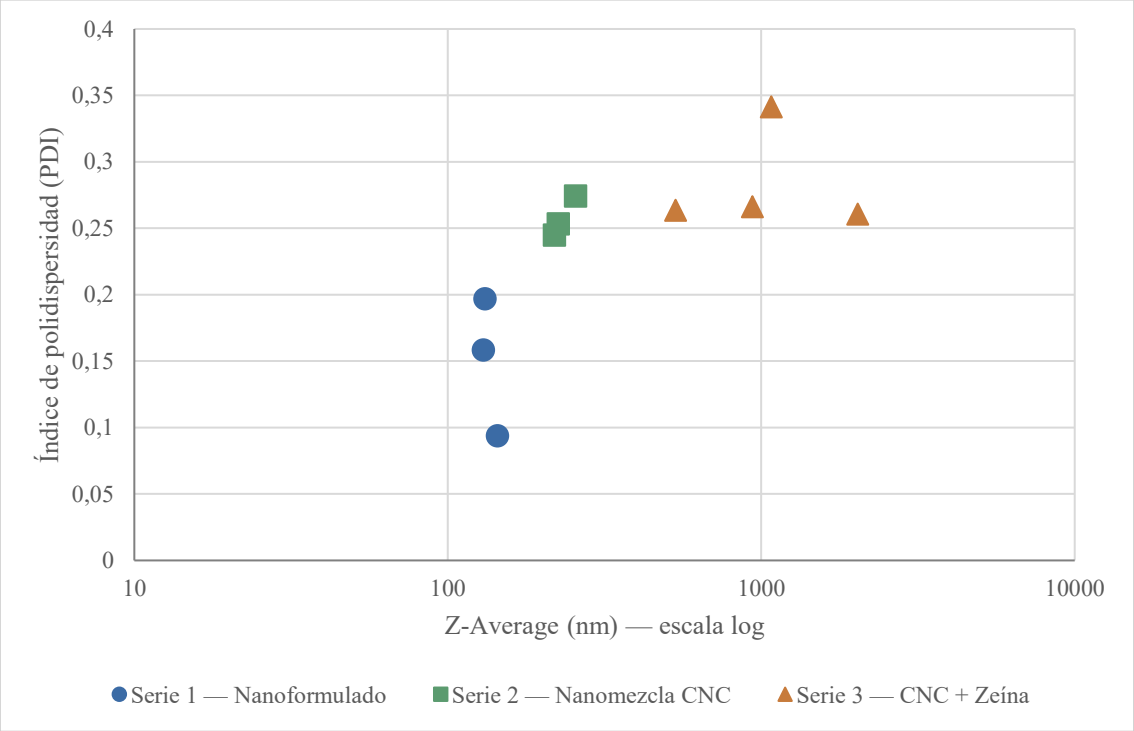


Tabla 6 Interpretación, técnica y observación (PDI)

Interpretación, técnica y observación (PDI)	
Índice de polidispersidad (PI/PDI)	PI < 0.1: población monodispersa; 0.1–0.4: polidispersidad moderada (típico y aceptable en sistemas coloidales/encapsulados); > 0.4: muestra polidispersa, distribución ancha o presencia de agregados. Todas las variantes se ubican en 0.10–0.35, salvo la Serie 3.2 (PI≈0.34), la más polidispersa.
Serie 1 — Nanoformulado 1 (Extracto + Tween 80)	Tamaños más pequeños y homogéneos del estudio: Z-Average ≈ 118–146 nm con PI bajos (0.04–0.22). La formulación base estabilizada solo con Tween 80 produce nanopartículas finas y bien definidas. La variante 1.2 (PI≈0,04 en una réplica) es la más monodispersa.
Serie 2 — Nanoformulado 2 (Extracto + Tween 80 + CNC)	La incorporación de nanocristales de celulosa aumenta el Z-Average a ≈ 216–266 nm manteniendo PI moderado (0.24–0.29). El CNC incrementa el tamaño hidrodinámico aparente respecto a la Serie 1, de forma consistente entre réplicas (buena reproducibilidad).

Serie 3 — Nanoformulado 3 (Extracto + Tween 80 + CNC + Zeina) (sin diluir, 173°)	Las variantes sin diluir (3.1 y 3.3) presentan Z-Average muy elevados (≈ 833–2350 nm) medidos en retrodispersión (173°). Valores en el límite superior de fiabilidad del DLS: sugieren agregación de la zeína y/o efectos de interacción múltiple por alta concentración/turbidez.
Serie 3 — Efecto de la dilución	Al diluir (3.1 dil y 3.2 dil) y/o medir a 90°, el Z-Average desciende notablemente (≈ 510–1090 nm), confirmando que parte del tamaño aparente en las muestras concentradas proviene de interacciones partícula-partícula y dispersión múltiple.

Los tamaños de partícula obtenidos en el presente estudio resultan coherentes, en general, con los rangos reportados en la literatura para sistemas de nanoemulsión. Según Martínez et al. (2020), las nanoemulsiones típicamente presentan diámetros entre 50 y 1000 nm, rango dentro del cual se ubicaron el Nanoformulado 1 (118 - 146 nm) y el Nanoformulado 2 (216 – 266 nm), ambos por debajo del objetivo de ≤ 400 nm planteado para este trabajo. El Nanoformulado 3, en cambio, con valores de hasta 2031 nm en condiciones no diluidas, se ubicó en el límite superior o incluso fuera del rango típicamente reportado para nanoemulsiones estables, lo que refuerza la interpretación de que este sistema presentó fenómenos de agregación en lugar de una reducción a escala nanométrica. En cuanto al índice de polidispersidad, los valores obtenidos (0.09–0.34) se mantuvieron dentro del rango considerado moderado y aceptable para sistemas coloidales (PDI < 0.4), lo que respalda que, salvo el Nanoformulado 3, las formulaciones desarrolladas alcanzaron una distribución de tamaño relativamente homogénea, consistente con lo esperado para nanoemulsiones estabilizadas mediante tensioactivos y estabilizantes tipo Pickering.

Tabla 7 Análisis de resultados DLS

Variante	Composición	Condición	Z-Average medio (nm)	DE Z-Avg (nm)	CV % Z-Avg	PI medio (PDI)	DE PI	D medio total (nm)	DE D medio	Calidad (según PI)
1.1	Extracto + Tween 80	Sin diluir, 90°	129.8	15.8	12.2%	0.159	0.076	153.3	33.9	Polidisp. moderada (0.1-0.4)
1.2	Extracto + Tween 80	Sin diluir, 90°	143.9	3.1	2.2%	0.094	0.078	160.0	20.9	Monodispersa (PI<0.1)
1.3	Extracto + Tween 80	Sin diluir, 90°	131.3	6.9	5.2%	0.197	0.027	156.1	13.3	Polidisp. moderada (0.1-0.4)
2.1	Extracto + Tween 80 + CNC	Sin diluir, 90°	255.6	15.3	6.0%	0.275	0.028	266.3	2.0	Polidisp. moderada (0.1-0.4)
2.2	Extracto + Tween 80 + CNC	Sin diluir, 90°	218.7	4.1	1.9%	0.245	0.010	276.4	16.1	Polidisp. moderada (0.1-0.4)
2.3	Extracto + Tween 80 + CNC	Sin diluir, 90°	224.9	4.1	1.8%	0.254	0.009	271.3	23.1	Polidisp. moderada (0.1-0.4)
3.1 Z	Extracto + Tween 80 + CNC + Zeina	Sin diluir, 173°	938.3	91.7	9.8%	0.266	0.024	378.6	119.8	Polidisp. moderada (0.1-0.4)
3.1 Z dil	Extracto + Tween 80 + CNC + Zeina	Diluida, 90°	533.1	25.4	4.8%	0.264	0.026	409.0	220.6	Polidisp. moderada (0.1-0.4)
3.2 Z dil	Extracto + Tween 80 + CNC + Zeina	Diluida, 173°	1077.2	13.6	1.3%	0.341	0.006	390.2	11.7	Polidisp. moderada (0.1-0.4)
3.3 Z	Extracto + Tween 80 + CNC + Zeina	Sin diluir, 173°	2031.1	495.7	24.4%	0.261	0.020	321.4	77.5	Polidisp. moderada (0.1-0.4)

4.1.3. Potencial Z y estabilidad coloidal

Tabla 8 Análisis de resultados ELS

Variante	Composición	Potencial Z (mV) ± DE	CV % ZP	|ZP| (mV)	Pico 1 ZP medio (mV)	Movilidad media (cm²/Vs)	Conductividad media (mS/cm)	Estabilidad coloidal (según |ZP|)
1.1	Extracto + Tween 80	-25.1 ± 1.0	4.1%	25.1	-25.1	-0.000195	0.432	Estabilidad moderada (20-30 mV)
1.2	Extracto + Tween 80	-22.7 ± 0.7	3.1%	22.7	-22.7	-0.000176	0.434	Estabilidad moderada (20-30 mV)
1.3	Extracto + Tween 80	-20.3 ± 0.4	2.1%	20.3	-20.3	-0.000156	0.432	Estabilidad moderada (20-30 mV)
2.1	Extracto + Tween 80 + CNC	-37.7 ± 1.3	3.3%	37.7	-37.7	-0.000292	0.438	Buena estabilidad (30-40 mV)
2.2	Extracto + Tween 80 + CNC	-37.5 ± 1.4	3.7%	37.5	-37.5	-0.000290	0.456	Buena estabilidad (30-40 mV)
2.3	Extracto + Tween 80 + CNC	-37.8 ± 1.0	2.7%	37.8	-37.8	-0.000292	0.450	Buena estabilidad (30-40 mV)
3.1	Extracto + Tween 80 + CNC + Zeina	-40.6 ± 0.6	1.6%	40.6	-40.6	-0.000314	0.429	Excelente estabilidad (>40 mV)
3.2	Extracto + Tween 80 + CNC + Zeina	-44.3 ± 0.5	1.1%	44.3	-443	-0.000343	0.310	Excelente estabilidad (>40 mV)
3.3	Extracto + Tween 80 + CNC + Zeina	-47.8 ± 0.1	0.1%	47.8	-47.8	-0.000369	0.302	Excelente estabilidad (>40 mV)

En la Tabla 8 se presenta el análisis de Potencial Z realizado mediante ELS y a continuación en la Tabla 9 se interpreta dicho análisis.

Tabla 9 Interpretación, técnica y observación (ZP)

Interpretación, técnica y observación (ZP)	
Escala de estabilidad coloidal (ASTM / Riddick)	Criterio basado en el valor absoluto del potencial zeta |ZP|: 0–5 mV → coagulación o floculación rápida; 5–20 mV → inestabilidad incipiente; 20–30 mV → estabilidad moderada; 30–40 mV → buena estabilidad; >40 mV → excelente estabilidad. Todos los sistemas presentaron ZP negativo, atribuible a grupos carboxilo/fenólicos del extracto, sulfato de los CNC y carga superficial de la zeína.
Serie 1 — Nanoformulado (Extracto + Tween 80)	ZP medio entre −20 y −26 mV (1.1 ≈ −25 mV; 1.2 ≈ −23 mV; 1.3 ≈ −20 mV). Carga negativa moderada conferida por los grupos aniónicos del extracto; el Tween 80 (no iónico) aporta estabilización estérica más que electrostática. Sistema en el rango de inestabilidad incipiente / estabilidad moderada: estable a corto plazo, pero más susceptible a agregación que las series con CNC.
Serie 2 — Nanoformulado 2 con CNC (Extracto + Tween 80 + CNC)	La incorporación de nanocristales de celulosa incrementa marcadamente la carga negativa: ZP ≈ −36 a −39 mV en las tres variantes (2.1, 2.2 y 2.3), con excelente reproducibilidad entre réplicas. Los grupos sulfato/hidroxilo de los CNC elevan |ZP| hasta el rango de buena estabilidad, mejorando la resistencia a la agregación respecto a la Serie 1.
Serie 3 — Nanoformulado 3 (Extracto + Tween	Mayor magnitud de carga del estudio, con tendencia creciente: 3.1 < 3.2 < 3.3; ZP ≈ −40 a −41 mV (3.1), −44 a −45 mV (3.2) y −48 mV (3.3).

80 + CNC + Zeina)	La adición de zeína junto con los CNC desplaza el sistema al rango de excelente estabilidad coloidal (>40 mV). La menor conductividad de la Serie 3.2–3.3 (≈0.30 mS/cm) es coherente con un medio de menor fuerza iónica que favorece una doble capa eléctrica más extendida y mayor |ZP|.

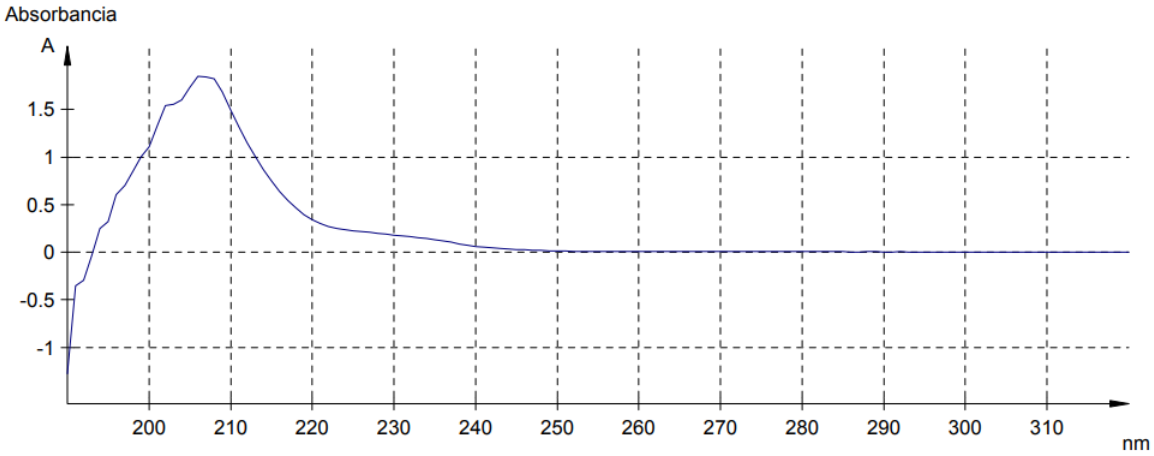
4.1.4. Síntesis comparativa

En conjunto, los resultados presentan correlación entre tamaño y estabilidad electrostática: el Nanoformulado 1 es el más pequeño y homogéneo, pero con la menor carga superficial, mientras que el Nanoformulado 3 alcanza la mayor estabilidad electrostática, pero a costa de un tamaño de partícula fuera del objetivo planteado. El Nanoformulado 2 es el único que cumple simultáneamente los tres criterios de la Tabla 5 con un protocolo de medición consistente entre lotes.

4.2. Análisis por espectrofotometría.

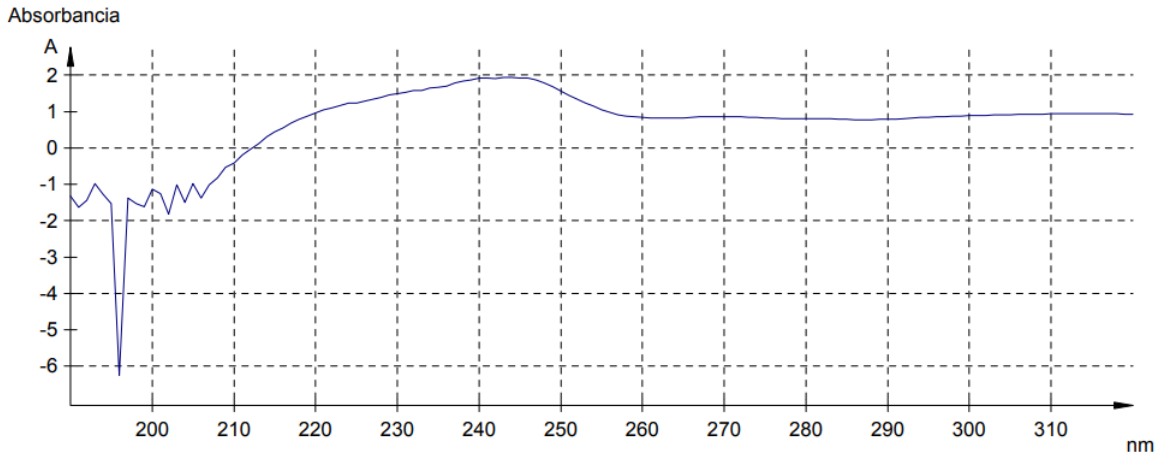
A continuación, se evidencian los resultados obtenidos al someter el control positivo (D-limoneno puro en hexano) y el nanoformulado (agua destilada, Tween 80 y extracto de cáscara) al mismo barrido espectral (190 nm - 320 nm).

Figura 9 Espectrograma del control positivo



En la Figura 9 se observa la firma óptica nítida del D-limoneno (pureza >94%) con un vértice de absorción máxima (λmax) localizado exactamente a 207 nm, validando el funcionamiento del equipo bajo condiciones ideales sin matriz interferente.

Figura 10 Espectrograma de la nanoformulación



Por otro lado, en la Figura 10 el vértice de 207 nm desaparece, registrándose absorbancias negativas severas y un desplazamiento total de la absorción hacia la banda de 230 - 244 nm, aquí se demuestran un colapso en la aplicabilidad de la Ley de Beer-Lambert provocado por la extrema complejidad de la matriz de la nanoformulación.

El comportamiento inestable y la distorsión de los datos expuestos se respaldan por los hallazgos de investigaciones previas por García (2019), donde la variabilidad empírica del limoneno en mezclas complejas no permitió establecer una curva de calibración confiable mediante espectrofotometría directa.

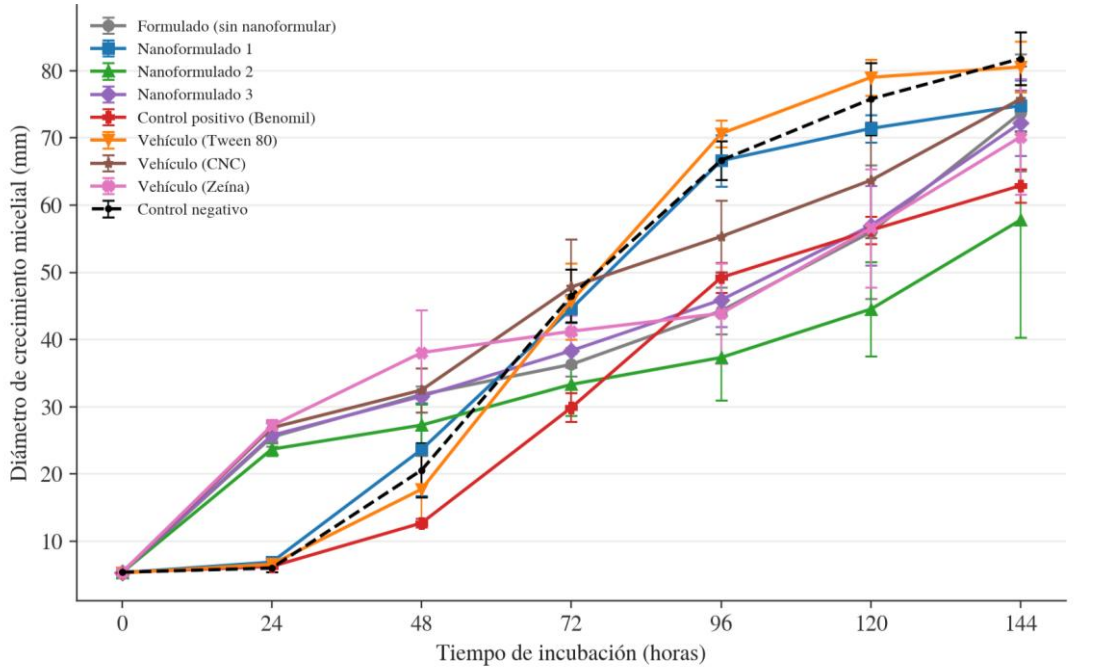
4.3. Actividad antifúngica in vitro

El diámetro de crecimiento micelial y porcentaje de inhibición de los hongos *Rhizopus stolonifer y Monilinia laxa* se registró cada 24 horas durante 144 horas de incubación para los nueve tratamientos (formulado sin nanoformular, los tres nanoformulados, control positivo, control negativo y tres controles vehículo), en cada uno de los hongos evaluados.

4.3.1. Cinética de crecimiento micelial

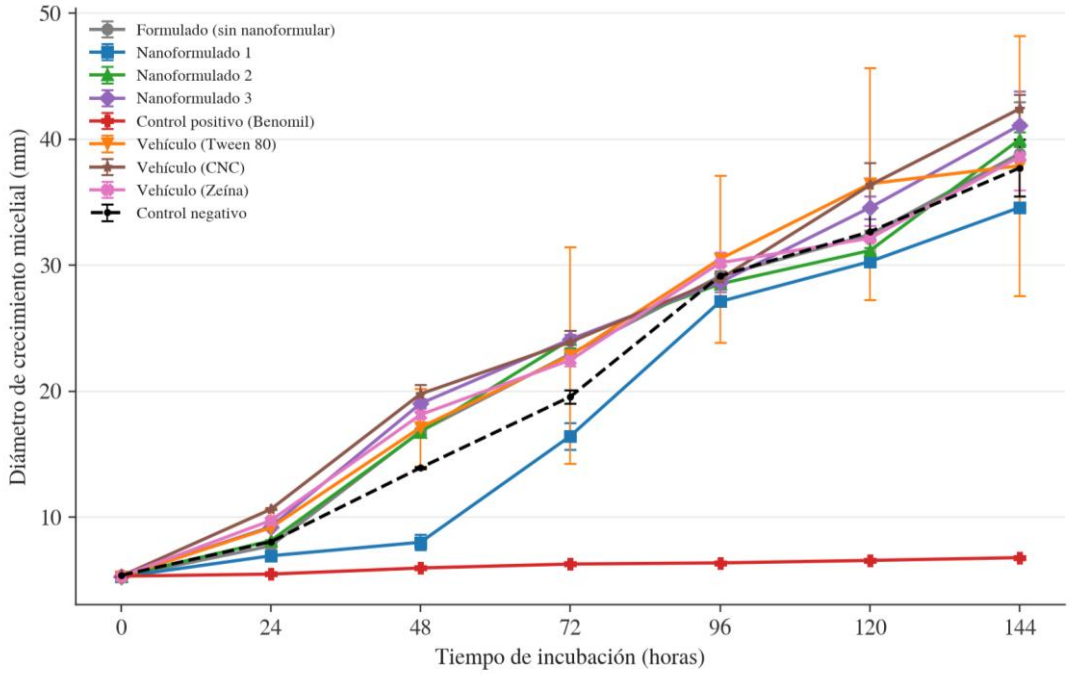
El crecimiento del diámetro promedio (± desviación estándar) se observa en la Figura 11 y Figura 12 a lo largo del tiempo para *Rhizopus stolonifer y Monilinia laxa*, respectivamente.

Figura 11 Cinética de crecimiento micelial (Rhizopus stolonifer)



Los diámetros alcanzados a las 144 horas en los tratamientos, incluido el control positivo, en *Rhizopus stolonifer*, llegaron a diámetros finales entre 58 y 82 mm, con curvas de crecimiento similares entre sí, a excepción del Nanoformulado 2 que mostró un crecimiento menor durante todo el ensayo.

Figura 12 Cinética de crecimiento micelial (Monilinia laxa)

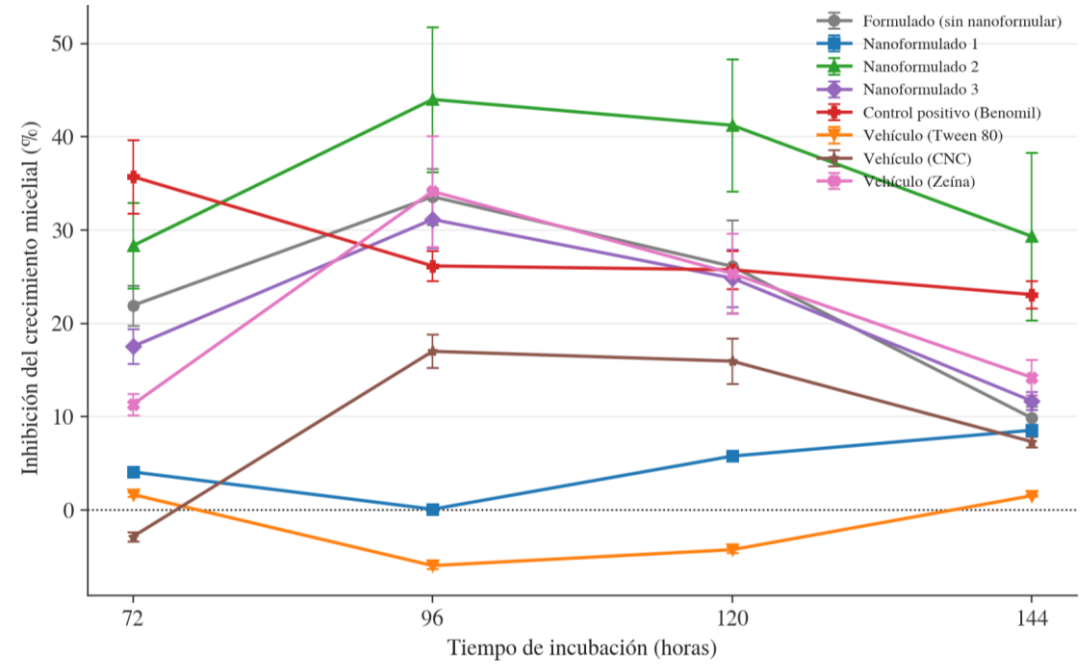


Por otro lado, en *Monilinia laxa*, se observaron separaciones claras, el control positivo (Benomil) mantuvo el diámetro prácticamente estable de 6 a 7 mm durante las 144 horas, mostrando una inhibición casi total del crecimiento, mientras que el formulado, los tres nanoformulados y los controles vehículo mostraron curvas de crecimiento muy similares entre sí y respecto al control negativo.

4.3.2. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial en el tiempo

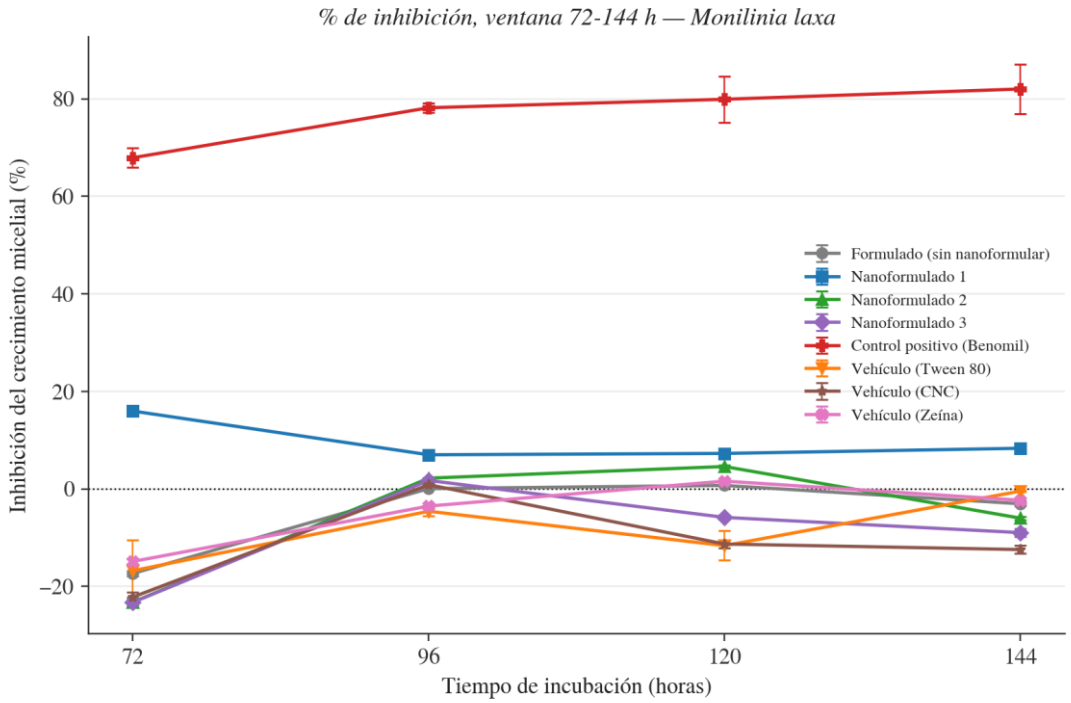
El porcentaje de inhibición se calculó teniendo como referencia al control negativo del mismo tiempo de lectura. Dado que no se percibe un notorio crecimiento micelial en las primeras lecturas de 0 a 48 horas, las pequeñas diferencias entre réplicas generan variaciones porcentuales muy amplias, incluso valores por debajo de 0 %, lo cual reduce la interpretación de las lecturas tempranas. Por esto, se presenta a continuación las lecturas de 72 a 144 horas, donde el crecimiento ya es notorio y el indicador se estabiliza como se observa en la Figura 13 y Figura 14

Figura 13 % de inhibición (72 - 144 horas) - Rhizopus stolonifer



En *Rhizopus stolonifer*, el Nanoformulado 2 mostró el mayor porcentaje de inhibición en la mayoría de las lecturas, superando incluso al control positivo hacia el final del ensayo.

Figura 14 % de inhibición (72 - 144 horas) - Monilinia laxa



En *Monilinia laxa*, el control positivo mantuvo una inhibición sostenida y creciente, superior 55 % desde las 72 horas, mientras que el Nanoformulado 1 mostro levemente inhibición, el formulado y los dos nanoformulados restantes oscilaron alrededor de 0 %, sin un efecto inhibitorio claro sobre este hongo.

4.3.3. Comparación entre tratamientos al final del ensayo (144 horas)

La Tabla 10 resume el diámetro y el porcentaje de inhibición promedio (± desviación estándar) de cada tratamiento a las 144 horas para ambos hongos.

Tabla 10 Diámetros y porcentajes de inhibición

	Rhizopus stolonifer		***Monilinia laxa***	
Tratamiento	**Diámetro (mm) ± DE**	**% Inhibición ± DE**	**Diámetro (mm) ± DE**	**% Inhibición ± DE**
Formulado (sin nanoformular)	73.7 ± 8.7	9.9 ± 1.3	38.9 ± 4.1	-3.1 ± 0.4
Nanoformulado 1	74.8 ± 3.8	8.5 ± 0.6	34.6 ± 0.2	8.3 ± 0.5
Nanoformulado 2	57.8 ± 17.5	29.3 ± 9	40 ± 0.6	-6 ± 0.4
Nanoformulado 3	72.3 ± 4.9	11.7 ± 1	41.1 ± 2.7	-9 ± 0.8
Control positivo (Benomil)	62.9 ± 2.5	23.1 ± 1.4	6.8 ± 0.1	82 ± 5.1
Vehículo (Tween 80)	80.6 ± 3.8	1.5 ± 0.1	37.9 ± 10.3	-0.5 ± 0.1
Vehículo (CNC)	75.8 ± 4.9	7.3 ± 0.6	42.4 ± 1.1	-12.4 ± 0.8
Vehículo (Zeína)	70.2 ± 8.6	14.2 ± 1.9	38.6 ± 2.6	-2.3 ± 0.2
Control negativo	81.8 ± 4	0 ± 0	37.7 ± 2.3	0 ± 0

A las 144 horas el Nanoformulado 2, estabilizado con nanocristales de celulosa, presentó la mayor actividad antifúngica frente a Rhizopus stolonifer, lo cual se puede explicar debido a su mecanismo de estabilización tipo Pickering. Los CNC poseen un

carácter anfifílico, con regiones que interactúan con la fase acuosa y regiones afines a la fase oleosa, lo que les permite adsorberse en la interfase aceite-agua y formar una barrera física alrededor de las gotas de la nanoemulsión, protegiéndolas de la coalescencia y manteniéndolas dispersas y de menor tamaño en el medio de cultivo (Ni et al., 2026). Esta cubierta actuaría como una especie de barrera física que retarda la difusión del D-limoneno hacia el exterior, favoreciendo una liberación más sostenida del compuesto activo en el tiempo, y a la vez limitaría su contacto directo con el aire, reduciendo su oxidación y preservando su actividad antifúngica. Esta mayor estabilidad coloidal y liberación controlada favorecerían un contacto más prolongado y homogéneo del D-limoneno con el micelio del hongo, lo que sería consistente con que el porcentaje de inhibición del Nanoformulado 2 (≈29 %) resultara comparable, e incluso ligeramente superior, al del control positivo (≈23.1 %).

A diferencia de lo observado en Rhizopus stolonifer, ninguno de los tratamientos derivados del extracto de cáscara de limón, incluyendo los tres nanoformulados y el formulado sin nanoformular, mostró actividad inhibitoria frente a Monilinia laxa a lo largo de las 144 horas de ensayo, manteniéndose en valores cercanos al 0 % de inhibición desde las primeras lecturas. Este resultado no se atribuye a una pérdida de efecto en el tiempo, ya que el control positivo (Benomil) mantuvo una inhibición sostenida y creciente sobre este mismo hongo durante todo el ensayo, alcanzando niveles superiores al 55 % desde las 72 horas. Esto sugiere que la ausencia de efecto no se debe a un problema temporal de la formulación, sino a una resistencia intrínseca de Monilinia laxa frente al D-limoneno y los demás compuestos presentes en el extracto de cáscara de cítricos. Esta diferencia podría explicarse por las particularidades fisiológicas de este patógeno, propio de frutales de la familia de las rosáceas, cuya composición de pared celular y membrana

es diferente a la de Rhizopus stolonifer, lo que sugiere que el espectro de acción del extracto de cítricos evaluado sería más afín a este último género fúngico.

De este modo se reconoce que, Rhizopus stolonifer, al final del ensayo (144 horas) ni siquiera el control positivo (Benomil) se diferenció estadísticamente del control negativo, a diferencia de lo observado en Monilinia laxa, donde el fungicida mantuvo una diferencia significativa durante todo el período evaluado. Esta ausencia de diferencia no debería interpretarse como una pérdida de eficacia del fungicida, sino que estaría más relacionada con la elevada velocidad de crecimiento característica de Rhizopus stolonifer, que le permite colonizar la totalidad de la caja Petri en pocos días. Hacia las 144 horas, la mayoría de los tratamientos, incluido el control positivo, alcanzaron diámetros finales similares (entre 58 y 82 mm), con curvas de crecimiento muy parecidas entre sí, a excepción del Nanoformulado 2. Esto sugiere que, para este hongo en particular, las diferencias entre tratamientos son más evidentes y estadísticamente detectables en las primeras etapas del ensayo, antes de que el crecimiento acelerado del hongo sature el espacio disponible en el medio de cultivo y homogenice los diámetros finales entre grupos.

4.3.4. Análisis estadístico

Previo al análisis de varianza se evaluaron los supuestos de normalidad (Shapiro-Wilk, por grupo) y homogeneidad de varianzas (Levene), la cual no se rechazó en ningún tiempo de lectura para ninguno de los dos hongos ($p > 0.05$). El análisis de varianza (ANOVA) de un factor mostró diferencias globales significativas entre tratamientos en todos los tiempos de lectura a partir de las 24 horas, para ambos hongos como se observa en la Tabla 11.

Tabla 11 Análisis de varianza (ANOVA)

Hongo	Tiempo (h)	F	valor p (ANOVA)
Rhizopus stolonifer	0	0.31	0.953
Rhizopus stolonifer	24	415.37	< 0.001
Rhizopus stolonifer	48	11.89	< 0.001
Rhizopus stolonifer	72	7.53	< 0.001
Rhizopus stolonifer	96	21.11	< 0.001
Rhizopus stolonifer	120	8.93	< 0.001
Rhizopus stolonifer	144	2.94	0.027
Monilinia laxa	0	1.87	0.128
Monilinia laxa	24	25.67	< 0.001
Monilinia laxa	48	60.72	< 0.001
Monilinia laxa	72	11.87	< 0.001
Monilinia laxa	96	33.39	< 0.001
Monilinia laxa	120	24.27	< 0.001
Monilinia laxa	144	22.39	< 0.001

Sin embargo, la prueba de Tukey mostró diferencias en menos tratamientos de los que sugería el ANOVA al final del ensayo (144 horas):

- En *Rhizopus stolonifer*, solo el Nanoformulado 2 se diferenció significativamente del control negativo ($p = 0.031$) y del control vehículo Tween 80 ($p = 0.046$). Ningún otro tratamiento, incluido el control positivo (Benomil) mostró diferencia estadísticamente significativa frente al control negativo en este tiempo.
- En *Monilinia laxa*, el control positivo (Benomil) se diferenció significativamente de todos los demás grupos, incluido el control negativo ($p < 0.001$). Ninguno de los nanoformulados ni el formulado sin nanoformular mostró diferencia significativa frente al control negativo.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Los parámetros de ultrasonicación adoptados (amplitud del 60 %, 15 min y pulsos de 5 s en baño de hielo) permitieron obtener nanoemulsiones estables a partir del extracto de cáscara de limón. El Nanoformulado 1 presentó el menor tamaño de partícula (135.0 nm) y el índice de polidispersidad más bajo y homogéneo, mientras que el potencial Z negativo (entre −20 y −25 mV) evidenció una estabilidad coloidal moderada de los sistemas.

La espectrofotometría UV-Vis permitió confirmar la identidad del D-limoneno en el estándar de referencia mediante su pico característico a 207 nm. En las nanoformulaciones, la interferencia generada por las micelas del tensoactivo y por los coextractivos fenólicos de la cáscara impidió una lectura directa, estableciendo que la determinación del monoterpeno en esta matriz requiere una etapa previa de separación.

De las cuatro formulaciones evaluadas, el Nanoformulado 2, estabilizado con nanocristales de celulosa, presentó la mayor actividad antifúngica frente a Rhizopus stolonifer, con un porcentaje de inhibición (≈29 %) comparable e incluso ligeramente superior al del control positivo. Frente a Monilinia laxa, en cambio, ninguno de los tratamientos derivados del extracto mostró inhibición significativa. El Nanoformulado 3, que incorporó zeína, presentó un aumento de tamaño y una menor estabilidad.

Con base en estos resultados, la hipótesis se acepta de forma parcial: el nanoformulado de extracto de cáscara de limón presenta actividad antifúngica in vitro frente a Rhizopus stolonifer, particularmente en el Nanoformulado 2, mientras que no se evidenció efecto frente a Monilinia laxa.

5.2. Recomendaciones

• Completar la determinación cuantitativa del D-limoneno mediante una técnica de separación que evite la interferencia de la matriz, con el fin de correlacionar la concentración del principio activo con la actividad antifúngica observada.

• Optimizar la concentración de zeína en el Nanoformulado 3, dado que en la proporción evaluada incrementó el tamaño de partícula y comprometió la estabilidad del sistema.

• Evaluar un rango de concentraciones del extracto y del Nanoformulado 2 para establecer una relación dosis-respuesta frente a Rhizopus stolonifer.

• Extender la evaluación a ensayos de aplicación en fruta en condiciones de postcosecha y a otros patógenos de importancia en cítricos.

• Realizar un seguimiento de la estabilidad de las formulaciones durante el almacenamiento (por ejemplo, a 0, 7, 14 y 28 días).

REFERENCIAS

Adak, T., Barik, N., Patil, N. B., Govindharaj, G.-P.-P., Gadratagi, B. G., Annamalai, M., Mukherjee, A. K., & Rath, P. C. (2020). Nanoemulsión de aceite de eucalipto: Una alternativa a los pesticidas sintéticos contra dos importantes insectos de almacenamiento (*Sitophilus oryzae* (L.) și *Tribolium castaneum* (Herbst)) de arroz. *Industrial Crops and Products*, *143*, 111849. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111849

Alengebawy, A., Abdelkhalek, S. T., Qureshi, S. R., & Wang, M.-Q. (2021). Heavy Metals and Pesticides Toxicity in Agricultural Soil and Plants: Ecological Risks and Human Health Implications. *Toxics*, *9*(3), Article 3. https://doi.org/10.3390/toxics9030042

Arruda, D. C., Miguel, D. C., Yokoyama-Yasunaka, J. K. U., Katzin, A. M., & Uliana, S. R. B. (2009). Inhibitory activity of limonene against *Leishmania* parasites *in vitro* and *in vivo*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *63*(9), 643-649. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2009.02.004

Baldassarre, F., Schiavi, D., Di Lorenzo, V., Biondo, F., Vergaro, V., Colangelo, G., Balestra, G. M., & Ciccarella, G. (2023). Cellulose Nanocrystal-Based Emulsion of Thyme Essential Oil: Preparation and Characterisation as Sustainable Crop Protection Tool. *Molecules*, *28*(23), Article 23. https://doi.org/10.3390/molecules28237884

Bolouri, P., Salami, R., Kouhi, S., Kordi, M., Asgari Lajayer, B., Hadian, J., & Astatkie, T. (2022). Applications of Essential Oils and Plant Extracts in Different Industries. *Molecules*, *27*(24), Article 24. https://doi.org/10.3390/molecules27248999

Bonilla, P., & Bonilla, M. (2021). La Nanoemulsion de liberación controlada de ibuprofeno con lecitina de soya. *Química Central*, *7*(2), Article 2. https://doi.org/10.29166/quimica.v7i2.3283

Caballero-Gallardo, K., Fuentes-Lopez, K., Stashenko, E. E., & Olivero-Verbel, J. (2023). Chemical Composition, Repellent Action, and Toxicity of Essential Oils from Lippia origanoide, Lippia. alba Chemotypes, and Pogostemon cablin on Adults of Ulomoides dermestoides (Coleoptera: Tenebrionidae). *Insects*, *14*(1), 41. https://doi.org/10.3390/insects14010041

Camargos, H. S., Moreira, R. A., Mendanha, S. A., Fernandes, K. S., Dorta, M. L., & Alonso, A. (2014). Terpenes Increase the Lipid Dynamics in the Leishmania Plasma Membrane at Concentrations Similar to Their IC50 Values. *PLOS ONE*, *9*(8), e104429. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104429

Campolo, O., Giunti, G., Laigle, M., Michel, T., & Palmeri, V. (2020). Essential oil-based nano-emulsions: Effect of different surfactants, sonication and plant species on physicochemical characteristics. *Industrial Crops and Products*, *157*, 112935. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112935

Cantrell, C. L., Dayan, F. E., & Duke, S. O. (2012). Natural Products As Sources for New Pesticides. *Journal of Natural Products*, *75*(6), 1231-1242. https://doi.org/10.1021/np300024u

Chassaing, B., Koren, O., Goodrich, J., Poole, A., Srinivasan, S., Ley, R. E., & Gewirtz, A. T. (2015). Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature*, *519*(7541), 92-96. https://doi.org/10.1038/nature14232

Chen, X., Ding, Y., Guan, H., Zhou, C., He, X., Shao, Y., Wang, Y., Wang, N., Li, B., Lv, G., & Chen, S. (2024). The Pharmacological Effects and Potential

Applications of Limonene From Citrus Plants: A Review. *Natural Product Communications*, *19*(5), 1934578X241254229. https://doi.org/10.1177/1934578X241254229

Ediagbonya, T. F., Areo, I. O., Mupenzi, C., Mind'je, R., Kamuhanda, J. K., & Kabano, S. (2025). Reduced pesticide dependency through crop management. *Discover Applied Sciences*, *7*(7), 776. https://doi.org/10.1007/s42452-025-07248-y

Gonzales Estrada, E. (2021). *Inhibición del crecimiento micelial de Rhizopus stolonifer por efecto de compuestos volátiles de Trichoderma harzianum* [Tesis de Licenciatura en Biología, Escuela de Estudios Superiores del Jicarero, Universidad Autónoma del Estado de Morelos]. https://riaa.uaem.mx/xmlui/handle/20.500.12055/3214

Hernández-Lauzardo, A. N., Hernández-Martínez, M., Velázquez-del Valle, M. G., Guerra-Sánchez, M. G., & Melo-Giorgana, G. E. (2007). Actividad Antifúngica del Quitosano en el Control de Rhizopus stolonifer (Ehrenb.:Fr.) Vuill. Y Mucor spp. *Revista mexicana de fitopatología*, *25*(2), 109-113.

Jiang, Y., Lan, W., Sameen, D. E., Ahmed, S., Qin, W., Zhang, Q., Chen, H., Dai, J., He, L., & Liu, Y. (2020). Preparation and characterization of grass carp collagen-chitosan-lemon essential oil composite films for application as food packaging. *International Journal of Biological Macromolecules*, *160*, 340-351. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.202

Khadiri, M., Boubaker, H., Lahmamsi, H., Taoussi, M., Ezzouggari, R., Askarne, L., Farhaoui, A., Barka, E. A., & Lahlali, R. (2024). Challenges in apple preservation: Fungicide resistance and emerging biocontrols. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *129*, 102205. https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2023.102205

Kour, R., Singh, S., Sharma, H. B., Naik, T. S. S. K., Shehata, N., N, P., Ali, W., Kapoor, D., Dhanjal, D. S., Singh, J., Khan, A. H., Khan, N. A., Yousefi, M., & Ramamurthy, P. C. (2023). Persistence and remote sensing of agri-food wastes in the environment: Current state and perspectives. *Chemosphere*, *317*, 137822. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.137822

Larios-Palacios, O. E., López-Vázquez, É. Y., Rodríguez, A. C., Ruíz-Espinoza, F. de J., Solano-Vidal, R., & Serrato-Cruz, M. Á. (2020). Evaluación in vitro de métodos contra Botrytis cinerea. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, *11*(3), 593-606. https://doi.org/10.29312/remexca.v11i3.2077

Lennartsson, P. R., Taherzadeh, M. J., & Edebo, L. (2014). Rhizopus. En C. A. Batt & M. L. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)* (pp. 284-290). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00391-8

Lin, H., Li, Z., Sun, Y., Zhang, Y., Wang, S., Zhang, Q., Cai, T., Xiang, W., Zeng, C., & Tang, J. (2024). D-Limonene: Promising and Sustainable Natural Bioactive Compound. *Applied Sciences*, *14*(11), 4605. https://doi.org/10.3390/app14114605

Lizundia, E., Puglia, D., Nguyen, T.-D., & Armentano, I. (2020). Cellulose nanocrystal based multifunctional nanohybrids. *Progress in Materials Science*, *112*, 100668. https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2020.100668

Loos, M. (2015). Chapter 6—Processing of Polymer Matrix Composites Containing CNTs. En M. Loos (Ed.), *Carbon Nanotube Reinforced Composites* (pp. 171-188). William Andrew Publishing. https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-3195-4.00006-0

Lu, G. W., & Gao, P. (2010). CHAPTER 3—Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery. En V. S. Kulkarni (Ed.), *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems* (pp. 59-94). William Andrew Publishing. https://doi.org/10.1016/B978-0-8155-2025-2.10003-4

Luneja, R. L., & Mkindi, A. G. G. (2025). Advances in botanical-based nanoformulations for sustainable cotton insect pest management in developing countries. *Frontiers in Agronomy*, *7*. https://doi.org/10.3389/fagro.2025.1558395

Mahbubul, I. M. (2019). 1—Introduction to Nanofluid. En *Preparation, Characterization, Properties and Application of Nanofluid* (pp. 1-13). William Andrew Publishing. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813245-6.00001-0

Martínez Hernández, E. (2017). *Actividad antifúngica de extractos vegetales contra botrytis cinerea en Fresa* [Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.]. http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/42911

Martínez, E. S. M., Pimentel, M. A. R. S. R. C., Méndez, E. M. A., Flores-Miranda, G. A., Aguilar-Méndez, M. A., Calderon-Dominguez, G., Yáñez-Fernández, J., Pichardo, M. L. H., González, E. R., Vela, A. F., Vargas, L. A. V., Medina, H. B., Lazo, M. en C. C. R., Cruz-Leal, S., Mendoza, C. F., Cuenca-Álvarez, R., López-Gayou, V., Amaro, O. G., Moreno, J. F., … Camacho-Díaz, B. H. (2020). Avances de investigación en Nanociencias, Micro y Nanotecnologías. En *OmniaScience Monographs*. https://www.omniascience.com/books/index.php/monographs/catalog/book/112

Minussi, G. do A., Santos, A. A. dos, Scapini, T., Bonatto, C., Fenner, E. D., Dresch, A. P., Santos, B. C. S. dos, Bender, J. P., & Júnior, S. L. A. (2024). Transforming orange waste with yeasts: Bioprocess prospects. *Revista Brasileira de Ciências Ambientais*, *59*, e1859-e1859. https://doi.org/10.5327/Z2176-94781859

Nava Pérez, E., García Gutiérrez, C., Camacho Báez, J. R., & Vázquez Montoya, E. L. (2012). Bioplaguicidas: Una opción para el control biológico de plagas. *Ra Ximhai*, *8*(4 Especial), 17-29. https://doi.org/10.35197/rx.08.03.e2.2012.03.en

Ni, H., Li, K., Li, J., Li, S., Bai, H., Dong, W., Zhang, F., Yan, X., & Guo, J. (2026). Cellulose Nanocrystal-Based Pickering Emulsions as Advanced Biomaterials for Food Bioactive Delivery: Chemical Modification, Synergistic Stabilization, and Functional Applications. *Foods*, *15*(13), 2286. https://doi.org/10.3390/foods15132286

Pathak, V. M., Verma, V. K., Rawat, B. S., Kaur, B., Babu, N., Sharma, A., Dewali, S., Yadav, M., Kumari, R., Singh, S., Mohapatra, A., Pandey, V., Rana, N., & Cunill, J. M. (2022). Current status of pesticide effects on environment, human health and it's eco-friendly management as bioremediation: A comprehensive review. *Frontiers in Microbiology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.962619

Patil, R. (2025). *Development and Efficacy Comparison of Nano Formulation with Custard Apple Seed Oil against Pulse Beetle* [Tesis de Maestría en Tecnología (M.Tech.) en Ingeniería Agrícola (Ingeniería de Alimentos y Procesado)]. Maharana Pratap University of Agriculture and Technology.

Pengfei Leng. (2011). Applications and development trends in biopesticides. *AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY*, *10*(86). https://doi.org/10.5897/AJBX11.009

Ramírez Paz y Puente, G. A., Rosales Islas, V., Escalante Vega, A., Espíritu Gómez, G., Martínez Sereno, M. I., & Molina González, M. G. (2019). *Efecto inhibitorio de los aceites esenciales de Citrus sinensis sobre Streptococcus mutans y Staphylococcus epidermidis*. https://hdl.handle.net/11191/7892

Richards, J. E., & Hawley, R. S. (2011). Chapter 2 - The Double Helix: How Cells Preserve Genetic Information. En *The Human Genome (Third Edition)* (pp. 41-79). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-091865-5.00002-3

Ríos-Reina, R., & Azcarate, S. M. (2023). How Chemometrics Revives the UV-Vis Spectroscopy Applications as an Analytical Sensor for Spectralprint (Nontargeted) Analysis. *Chemosensors*, *11*(1), 8. https://doi.org/10.3390/chemosensors11010008

Romo Chacón, A., Berlanga Reyes, D. I., Guerrero Prieto, V. M., & Martínez Campos, R. (2011). Manejo de Erwinia amylovora con Aceite Esencial de Orégano (Lippia berlandieri) y Estudio de Resistencia a Estreptomicina en Arboles de Manzano cv. 'Golden Delicious'. *Revista Mexicana de Fitopatología*, *29*(1), 119-132.

Sadh, P. K., Duhan, S., & Duhan, J. S. (2018). Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: A review. *Bioresources and Bioprocessing*, *5*(1), 1. https://doi.org/10.1186/s40643-017-0187-z

Saleem, M., & Saeed, M. T. (2020). Potential application of waste fruit peels (orange, yellow lemon and banana) as wide range natural antimicrobial agent. *Journal of King Saud University – Science*, *32*(1), 805-810. https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.02.013

Samada, L. H., & Tambunan, U. S. F. (2020). Biopesticides as Promising Alternatives to Chemical Pesticides: A Review of Their Current and Future Status. *OnLine Journal of Biological Sciences*, *20*(2), 66-76. https://doi.org/10.3844/ojbsci.2020.66.76

Sandoval Flores, M. G., Jiménez Mejía, R., Santoyo, G., Alva Murillo, P. N., López Meza, J. E., Loeza Lara, P. D., Sandoval Flores, M. G., Jiménez Mejía, R., Santoyo, G., Alva Murillo, P. N., López Meza, J. E., & Loeza Lara, P. D. (2018).

Chitosan-fatty acids composite reduce Botrytis cinerea infection on postharvest strawberry. *Nova scientia*, *10*(21), 207-227. https://doi.org/10.21640/ns.v10i21.1599

Shukla, R., & Cheryan, M. (2001). Zein: The industrial protein from corn. *Industrial Crops and Products*, *13*(3), 171-192. https://doi.org/10.1016/S0926-6690(00)00064-9

Silva, F. A., Oyarzún, P. A., Silva, F. A., & Oyarzún, P. A. (2021). Una visión actualizada sobre la síntesis, escalado y aplicaciones de las nanoemulsiones dobles. *Entre Ciencia e Ingeniería*, *15*(30), 30-40. https://doi.org/10.31908/19098367.2095

Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A., & Singh, N. (2020). Phenolic composition, antioxidant potential and health benefits of citrus peel. *Food Research International*, *132*, 109114. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109114

Singh, I. R., & Pulikkal, A. K. (2022). Preparation, stability and biological activity of essential oil-based nano emulsions: A comprehensive review. *OpenNano*, *8*, 100066. https://doi.org/10.1016/j.onano.2022.100066

Tudi, M., Daniel Ruan, H., Wang, L., Lyu, J., Sadler, R., Connell, D., Chu, C., & Phung, D. T. (2021). Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *18*(3), Article 3. https://doi.org/10.3390/ijerph18031112

Velayati, A., & Nouri, A. (2020). Emulsification and emulsion flow in thermal recovery operations with a focus on SAGD operations: A critical review. *Fuel*, *267*, 117141. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117141

Yan, X., Li, M., Xu, X., Liu, X., & Liu, F. (2022). Zein-based nano-delivery systems for encapsulation and protection of hydrophobic bioactives: A review. *Frontiers in Nutrition*, *9*. https://doi.org/10.3389/fnut.2022.999373

Yu, M., Yuan, W., Li, D., Schwendeman, A., & Schwendeman, S. P. (2019). Predicting drug release kinetics from nanocarriers inside dialysis bags. *Journal of Controlled Release*, *315*, 23-30. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.09.016

Zeni, V., Benelli, G., Campolo, O., Giunti, G., Palmeri, V., Maggi, F., Rizzo, R., Lo Verde, G., Lucchi, A., & Canale, A. (2021). Toxics or Lures? Biological and Behavioral Effects of Plant Essential Oils on Tephritidae Fruit Flies. *Molecules*, *26*(19), 5898. https://doi.org/10.3390/molecules26195898

García, H. (2019). Efecto de la temperatura y tipo de simulante de alimento en la cinética de liberación de limoneno a partir de envase activo de PEBD.

Campolo, O., Cherif, A., Ricupero, M., Siscaro, G., Grissa-Lebdi, K., Russo, A., Cucci, L. M., Di Pietro, P., Satriano, C., Desneux, N., Biondi, A., Zappalà, L., & Palmeri, V. (2017). Citrus peel essential oil nanoformulations to control the tomato borer, Tuta absoluta: Chemical properties and biological activity. *Scientific Reports*, *7*(1), 13036. https://doi.org/10.1038/s41598-017-13413-0

Lim, X.-Y., Li, J., Yin, H.-M., He, M., Li, L., & Zhang, T. (2023). Stabilization of Essential Oil: Polysaccharide-Based Drug Delivery System with Plant-like Structure Based on Biomimetic Concept. *Polymers*, *15*(16), Article 16. https://doi.org/10.3390/polym15163338

Fusaro, R. M. (1972). Inoculation Technique for Fungus Cultures. *Applied Microbiology*, *23*(1), 174-176. https://doi.org/10.1128/am.23.1.174-176.1972

ANEXOS

Anexo 1 Recepción, y secado de materia prima.



Anexo 2 Obtención del extracto



Anexo 3 Desgrasado de harina



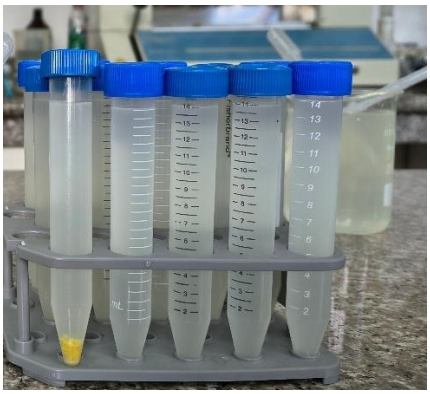
Anexo 4 Homogenización, filtrado y centrifugación de zeína



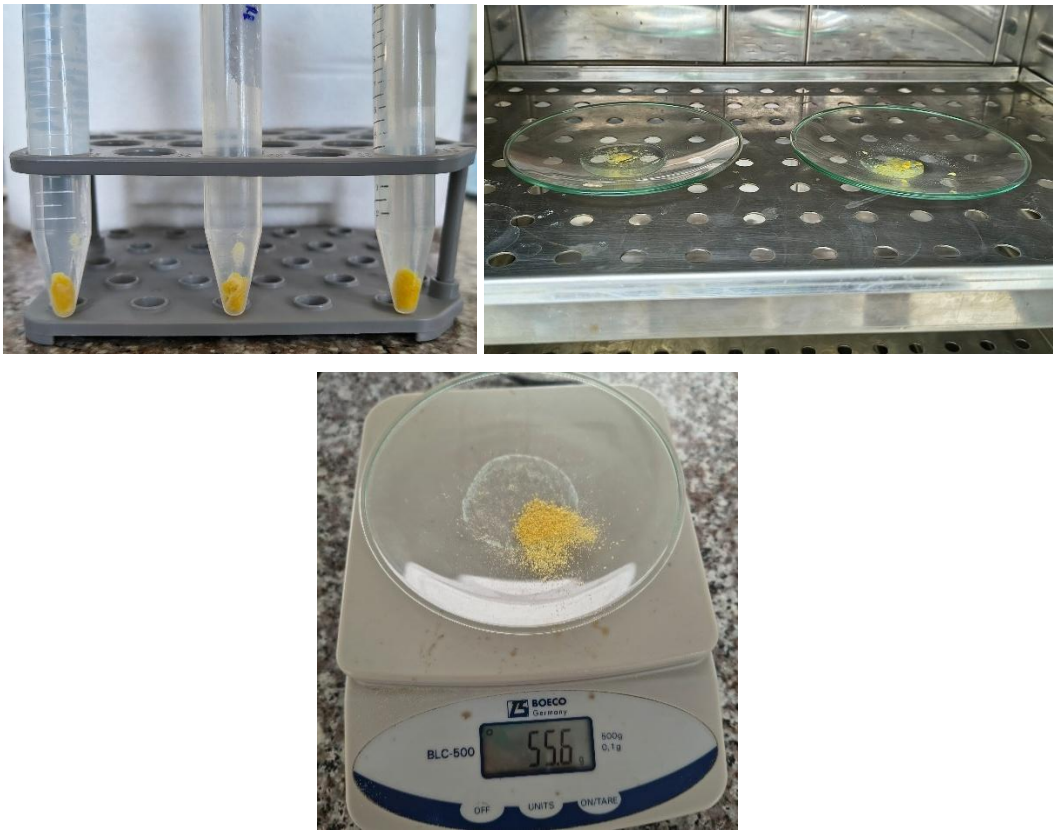


Anexo 5 Precipitación de la zeína



Anexo 6 Secado de zeína



Anexo 7 Preparación de material y dosificación de placas



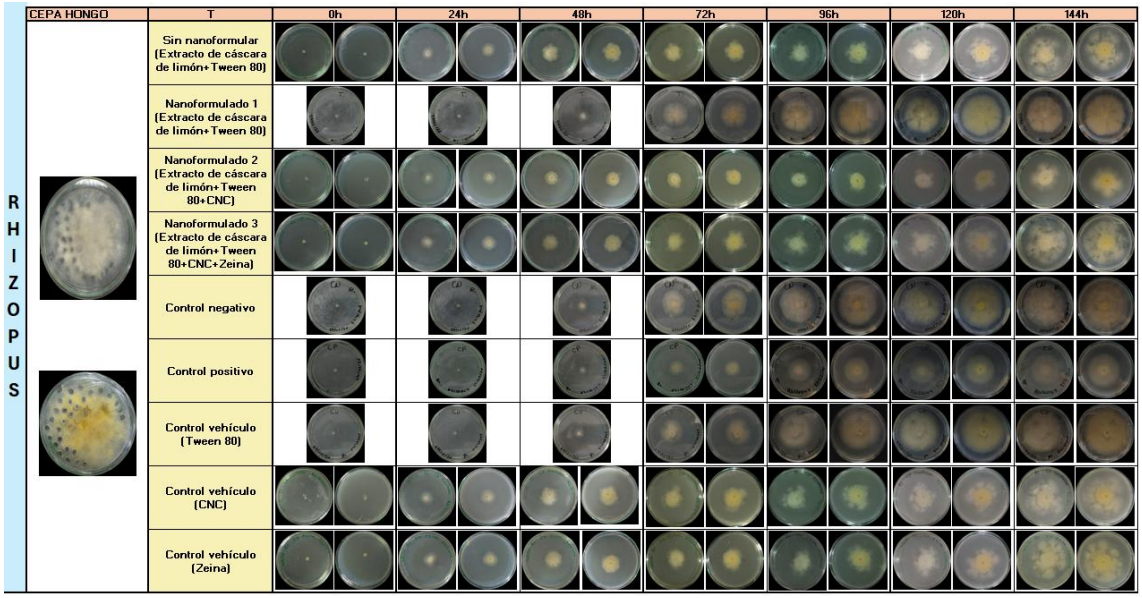
Anexo 8 Resiembra e inoculación







Anexo 9 Registro fotográfico (Rhizopus stolonifer)



Anexo 10 Registro fotográfico (Monilinia laxa)

