

# MANUAL PARA LA EJECUCIÓN DE ANÁLISIS FÍSICOS, QUÍMICOS Y MICROBIOLÓGICOS PARA EL DESARROLLO DE PLAGUICIDAS BOTÁNICOS

ISBN: 978-958-15-0623-1



**SENNOVA**

Sistema de Investigación,  
Desarrollo Tecnológico e Innovación

# MANUAL PARA LA EJECUCIÓN DE ANÁLISIS FÍSICOS, QUÍMICOS Y MICROBIOLÓGICOS PARA EL DESARROLLO DE PLAGUICIDAS BOTÁNICOS

Servicio Nacional de Aprendizaje - SENA

Centro de Gestión Industrial

Grupo de Investigación en Procesos Industriales - NEURONA

Semillero de Investigación en Ciencias Ambientales - SIGMA

Bogotá D.C. 2020



Catalogación en la publicación. SENA Sistema de Bibliotecas

Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA). Centro de Gestión Industrial. Grupo de Investigación en Procesos Industriales

Manual para la ejecución de análisis físicos, químicos y microbiológicos para el desarrollo de plaguicidas botánicos / Grupo de Investigación en Procesos Industriales, Semillero de Investigación en Ciencias Ambientales ; editores, Javier Santana Lozano [y otros 4]. -- Bogotá : Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA). Centro de Gestión Industrial, 2020.

1 recurso en línea (63 páginas : PDF)

Referencias bibliográficas: página 63.

Contenido: Guía práctica para determinar las variables de extracción por arrastre de vapor -- Guía práctica para determinar las variables de extracción del hidrodestilador asistido por microondas -- Guía para caracterización del aceite esencial -- Guía práctica para la extracción de residuos de plaguicidas en fresa -- Guía práctica para la identificación de *Botrytis Cinerea*.

ISBN: 978-958-15-0623-1.

1. Plaguicidas--Análisis--Manuales 2. Plaguicidas de origen vegetal--Manuales I. Santana Lozano, Javier, editor II. González Castro, Valery, editor III. Cárdenas Barros, Paola, editor IV. Molina, Karen, editor V. Melo Andrés, editor VI. Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA). Centro de Gestión Industrial. Semillero de Investigación en Ciencias Ambientales.

CDD: 632.95



ISBN: 978-958-15-0623-1

Servicio Nacional de Aprendizaje-SENA

Regional Distrito Capital

Centro de Gestión Industrial

Sistema de investigación, desarrollo tecnológico e innovación - SENNOVA

Grupo de Investigación en Procesos Industriales - Neurona

Semillero de Investigación en Ciencias Ambientales - SIGMA

Evaluación del efecto fungicida de extractos naturales para el control de *Botrytis cinerea*, *Phytophthora cactorum* y *Verticillium albo-atrum* en cultivos de municipio de Sibaté, Cundinamarca.

Código SGPS: SGPS-6706-2019

**EDITORES:**

**Javier Santana Lozano**

Líder semillero SIGMA

**Valery González Castro**

Investigadora SIGMA

**Paola Cárdenas Barros**

Semillerista SIGMA

**Karen Molina**

Semillerista SIGMA

**Andrés Melo**

Semillerista SIGMA

**Foto de portada y Diagramación:**

Nina Alejandra Díaz Ospina

© Servicio Nacional de Aprendizaje SENA

Hecho el depósito que exige la ley.

Este manual, salvo las excepciones previas por la ley, no puede ser reproducido por ningún medio sin previa autorización escrita de los autores. Los textos publicados son de propiedad intelectual de los autores y pueden utilizarse con propósitos educativos, siempre que se cite a los autores y la publicación.

Las opiniones aquí contenidas son de responsabilidad exclusiva de los autores y no reflejan necesariamente el pensamiento del Editor ni del SENA



# Contenido

## CAPÍTULOS

### I. Introducción

### II. Objetivo del Manual

### III. Simbología

### IV. Procedimientos

1. GUÍA PRÁCTICA PARA LA RECOLECCIÓN, ALISTAMIENTO Y EXTRACCIÓN DE MUESTRAS DE MATERIAL VEGETAL CON CONTENIDO DE TIMOL Y CARVACROL ..... 11
  - 1.1. Objetivo
  - 1.2. Alcance
  - 1.3. Definiciones
  - 1.4. Marco Teórico
  - 1.5. Materiales y/o Reactivos
  - 1.6. Procedimiento
    - 1.6.1. Recolección del Material Vegetal
    - 1.6.2. Extracción del Aceite Esencial
    - 1.6.3. Concentración del Aceite Esencial
  - 1.7. Cálculos
  - 1.8. Referencias Bibliográficas
  
2. GUÍA PRÁCTICA PARA DETERMINAR LAS VARIABLES DE EXTRACCIÓN POR ARRASTRE DE VAPOR ..... 22
  - 2.1. Objetivo
  - 2.2. Alcance
  - 2.3. Marco Teórico
  - 2.4. Materiales y/o Reactivos
  - 2.5. Procedimiento
    - 2.5.1. Procedimiento Adecuación del Sistema
    - 2.5.2. Procedimiento de Carga del Sistema
    - 2.5.3. Procedimiento de Operación
    - 2.5.4. Lavado del Florentino
    - 2.5.5. Lavado del Hidrodestilador
  - 2.6. Recomendaciones
  - 2.7. Referencias Bibliográficas
  - 2.8. Anexos

**3. GUÍA PRÁCTICA PARA DETERMINAR LAS VARIABLES DE EXTRACCIÓN DEL HIDRODESTILADOR ASISTIDO POR MICROONDAS ..... 34**

- 3.1. Objetivo
- 3.2. Alcance
- 3.3. Marco Teórico
- 3.4. Materiales y/o Reactivos
- 3.5. Procedimiento
- 3.6. Referencias Bibliográficas
- 3.7. Anexos

**4. GUÍA PRÁCTICA PARA CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL ..... 42**

- 4.1. Objetivo
- 4.2. Alcance
- 4.3. Marco Teórico
- 4.4. Materiales y/o Reactivos
- 4.5. Procedimiento
  - 4.5.1. Opción 1: Procedimiento Dilución Aceite Esencial
  - 4.5.2. Opción 2: Procedimiento Alistamiento de la Muestra y Preparación de Estándares
- 4.6. Referencias Bibliográficas
- 4.7. Anexos

**5. GUÍA PRÁCTICA PARA LA EXTRACCIÓN DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN FRESA ..... 50**

- 5.1. Objetivo
- 5.2. Alcance
- 5.3. Marco Teórico
- 5.4. Materiales y/o Reactivos
- 5.5. Procedimiento
- 5.6. Referencias Bibliográficas

**6. GUÍA PRÁCTICA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BOTRYTIS CINEREA ..... 55**

- 6.1. Objetivo
- 6.2. Alcance
- 6.3. Definiciones
- 6.4. Marco Teórico
- 6.5. Materiales y/o Reactivos
- 6.6. Recomendaciones
  - 6.6.1. Claves Taxonómicas
- 6.7. Recomendaciones
- 6.8. Referencias Bibliográficas
- 6.9. Anexos

# INTRODUCCIÓN

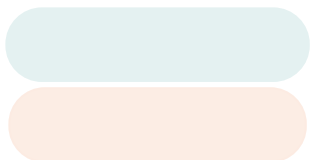
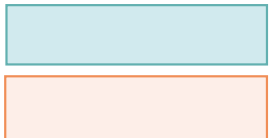

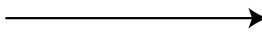


El manual para la ejecución de análisis físicos, químicos y microbiológicos para el desarrollo de plaguicidas botánicos, se encuentra enmarcado dentro del proyecto de investigación titulado “Evaluación del efecto fungicida de extractos naturales para el control de *Botrytis cinerea*, *Phytophthora cactorum* y *Verticillium albo-atrum* en cultivos de municipio de Sibaté, Cundinamarca” cuya finalidad es realizar un control significativo a dichas plagas que afectan la economía local y mitigar los impactos provocados por el uso de productos químicos en el proceso de siembra y obtención del fruto. El desarrollo e implementación del mismo en el campo, abre la posibilidad a pequeños y grandes cultivadores en mercados verdes y dar respuesta a la Política Nacional de Producción y Consumo Sostenible, decretada por el gobierno colombiano.

En ese sentido, se contó con la participación de aprendices pertenecientes a los programas tecnológicos en Control Ambiental y Química Aplicada a la Industria del Centro de Gestión Industrial – SENA, quienes realizaron la validación en bases de datos y revisión en fuentes bibliográficas para su estructuración, como también, la proyección de acuerdo con los equipos, materiales y reactivos que posee el centro de formación en los laboratorios de ambiental y química. Por ende, su finalidad es brindar una herramienta metodológica que permita la ejecución de los análisis contemplados en actividades de los proyectos de investigación y formación según aplique.

# OBJETIVO DEL MANUAL

Definir variables de operación para el desarrollo de análisis físicos, químicos y microbiológicos para el desarrollo de plaguicidas botánicos, según lineamientos definidos por los autores de las bases de datos consultadas y teniendo en cuenta la capacidad instalada con la que cuenta el Centro de Gestión Industrial.

# SIMBOLOGÍA

SÍMBOLO	NOMBRE
	Inicio/Final
	Proceso o actividad
	Flujo del procedimiento
	Flujo de observaciones, anotaciones o recomendaciones
	Conector entre páginas
	Decisión

1.

## GUÍA PRÁCTICA PARA LA RECOLECCIÓN, ALISTAMIENTO Y EXTRACCIÓN DE MUESTRAS DE MATERIAL VEGETAL CON CONTENIDO DE TIMOL Y CARVACROL

Versión 01

## 1.1. OBJETIVO

Establecer el procedimiento según las variables adecuadas para la recolección, alistamiento y extracción de muestras de material vegetal con contenido de Timol y Carvacrol.

## 1.2. ALCANCE

Identificar el paso a paso correspondiente a la preparación de las muestras de material vegetal según las medidas de recolección, alistamiento y extracción de los distintos componentes del aceite esencial específicamente de Timol y Carvacrol para su uso como compuestos antimicrobianos y desinfectantes.

## 1.3. DEFINICIONES

**Carvacrol:** es un compuesto fenólico natural, considerado como posible antioxidante, agente antifúngico y antibacterial, presente en cantidades significativas en los AEs del género *Thymus*, *Origanum*, *Satureja*, *Thymbra* y *Lippia*, especies ampliamente utilizadas como especias y tés herbarios. (Muñoz Acevedo, Castañeda, Blanco, Cardenas, & Reyes, 2007)

**Cromatografía:** es una técnica de separación en la que los componentes de una muestra se separan en dos fases: una fase estacionaria de gran área superficial, y una fase móvil. (TP Laboratorio Químico, s.f.)

**Fase móvil:** es la fase que se mueve en una dirección definida. Puede ser un líquido (cromatografía de líquidos o CEC) o un gas (cromatografía de gases) o un fluido supercrítico (cromatografía de fluidos supercríticos).

**Fase estacionaria:** es una de las dos fases que forman un sistema cromatográfico. Puede ser un sólido, un gel, o un líquido. Si es un líquido, puede estar adherido sobre un sólido. Este sólido puede o no contribuir al proceso de separación. El líquido también se puede unir químicamente al sólido (fase unida químicamente) o inmovilizarse sobre él (fase inmovilizada).

**HPLC:** la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) se utiliza frecuentemente en bioquímica y química analítica para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias a analizar. (Dr. Zaldivar (UNAM), s.f.)

**Monoterpenos:** los terpenos son compuestos orgánicos aromáticos y volátiles que están constituidos por la unión de unidades de un hidrocarburo de 5 átomos de carbono, llamado isopreno. Los compuestos más pequeños y volátiles son los Monoterpenos, se evaporan rápidamente durante el proceso de secado de la planta. (Fundación CANNA, s.f.)

***Origanum vulgare:*** el género *Origanum* comprende más de dos docenas de diferentes especies de plantas, con flores y hojas que presentan un olor característico a “especioso”. Las hojas secas del *Origanum vulgare*, nativo de Europa y del *Lippia graveolens*, planta nativa de México son de uso culinario común.

**Timol:** es un Monoterpenos que se encuentra como compuesto principal de varios aceites esenciales, como el de orégano y tomillo. Hay numerosos estudios que muestran el buen desempeño “in vitro” de este compuesto como antimicrobiano y desinfectante. (Bodgan, Deyá, Romagnoli, 2015)

## 1.4. MARCO TEÓRICO

El método por HPLC es una técnica muy precisa para cuantificar los componentes volátiles y no volátiles de una planta, logrando una buena separación y una rápida determinación del contenido de timol y carvacrol en el aceite esencial de orégano. Este método de determinación por HPLC se realiza con el detector de Fluorescencia de timol y carvacrol en muestras de *Origanum vulgare*, bajo las condiciones adecuadas, utilizando la linealidad, límites de detección y cuantificación, selectividad y precisión.

Las técnicas de cromatografía de HPLC están siendo ampliamente usadas para la separación identificación y cuantificación de compuestos monoterpenos, terpenos y fenólicos, por su versatilidad, precisión y costo relativamente bajo. Con mayor frecuencia, el método que se emplea es la cromatografía de reparto en fase reversa, pues permite una considerable separación de las diferentes clases de compuestos monoterpenos y fenólicos, pues está compuesta de una fase estacionaria la cual es no polar y una fase móvil la cual es relativamente polar. (Monzón, 2017)

La determinación de timol y carvacrol en muestras de orégano y otras plantas, ha sido realizado por muchos autores utilizando métodos de cromatografía HPLC. (Hajimehdipoor, Shekarchi, Khanavi, Adib, & Amri., 2010) El método por HPLC es una técnica muy precisa para cuantificar los componentes volátiles y no volátiles de una planta, logrando una buena separación (Guoliang et al., 2011).

Los compuestos principales en el aceite esencial, el timol y carvacrol se informó que tienen el más alto antioxidante (Hamzeh, 2012; Kucukbay 2014). Adicionalmente, el timol y el carvacrol exhiben diferentes actividades biológicas. Mientras que el timol tiene un antiséptico efecto, el carvacrol tiene características antifúngicas (Tepe 2011).

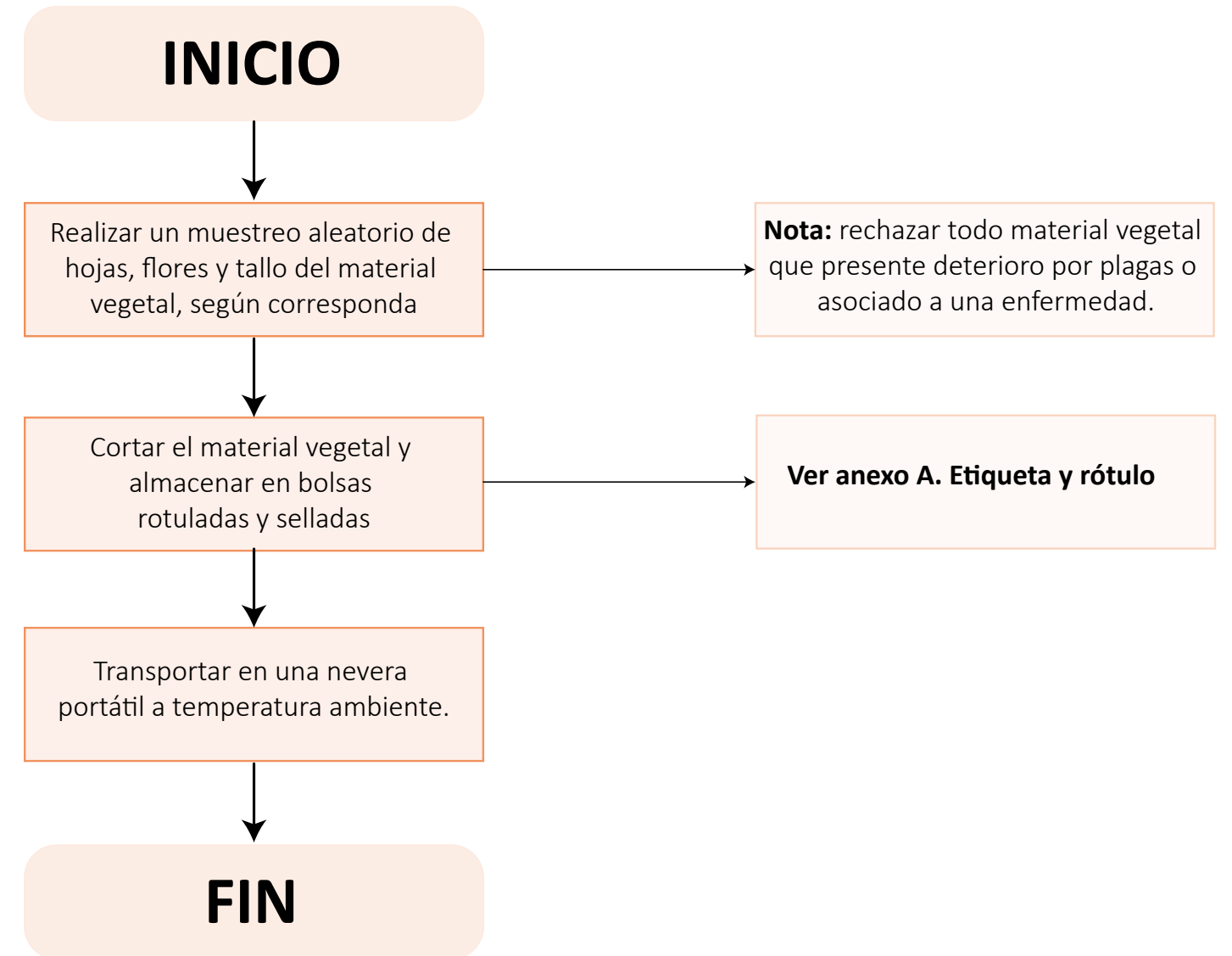
## 1.5. MATERIALES Y/O REACTIVOS

Tabla 1. Materiales y reactivos

Materiales	Reactivos
Beakers de 50, 100, 250 mL	Agua tipo 1
Bureta de 25 mL	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Erlenmeyer de 150, 250 y 500mL	Hexano o cloroformo
Pipetas de 0.5, 1 y 2 mL	
Probetas de 50, 100 y 1000 mL	<b>Equipos</b>
Viales de 1 mL	Micropipetas 10 µL, 100 µL y 1000 µL
Bureta 25 mL	Termobalanza
Matraz aforado de 10, 25, 100, 500 mL	Horno de secado
Recipiente ámbar	Sistema de extracción arrastre por vapor
Embudo de vidrio	
Papel filtro	
<b>Elementos de protección personal</b>	
Bata	
Gafas de seguridad	
Guantes de nitrilo	
Tapabocas	
Zapato de tipo cerrado	

## 1.6. PROCEDIMIENTO

### 1.6.1. Recolección del Material Vegetal

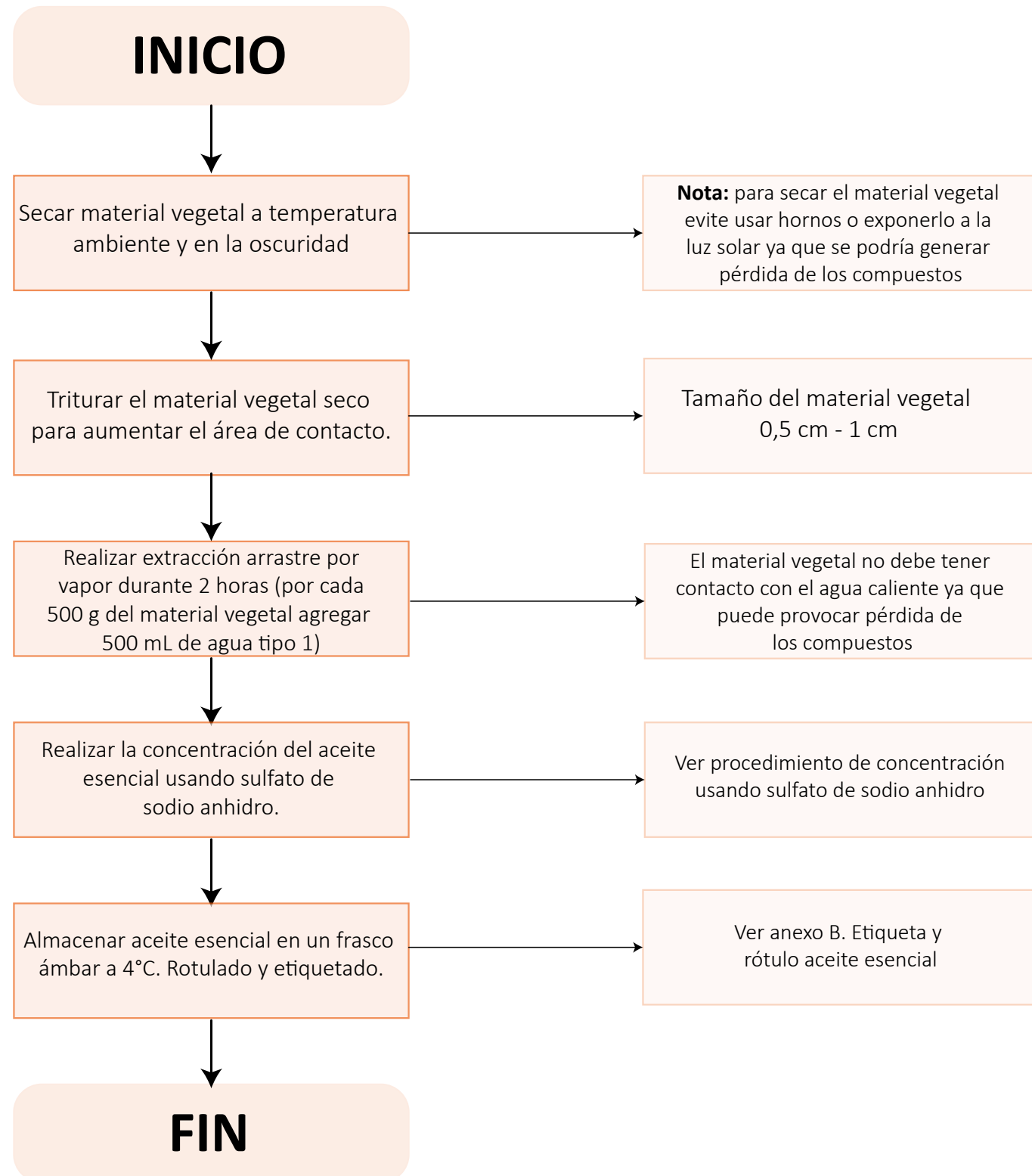


#### Recomendaciones:

- La recolección es preferible hacerla en fase de floración forma manual y en las horas de la mañana para evitar la transpiración y/o pérdida de los compuestos del material vegetal.
- Mantener la muestra en un lugar oscuro para evitar la descomposición y pérdida de los compuestos del material vegetal.
- Realizar una identificación de la especie con un laboratorio y/o instituto acreditado para tal fin.

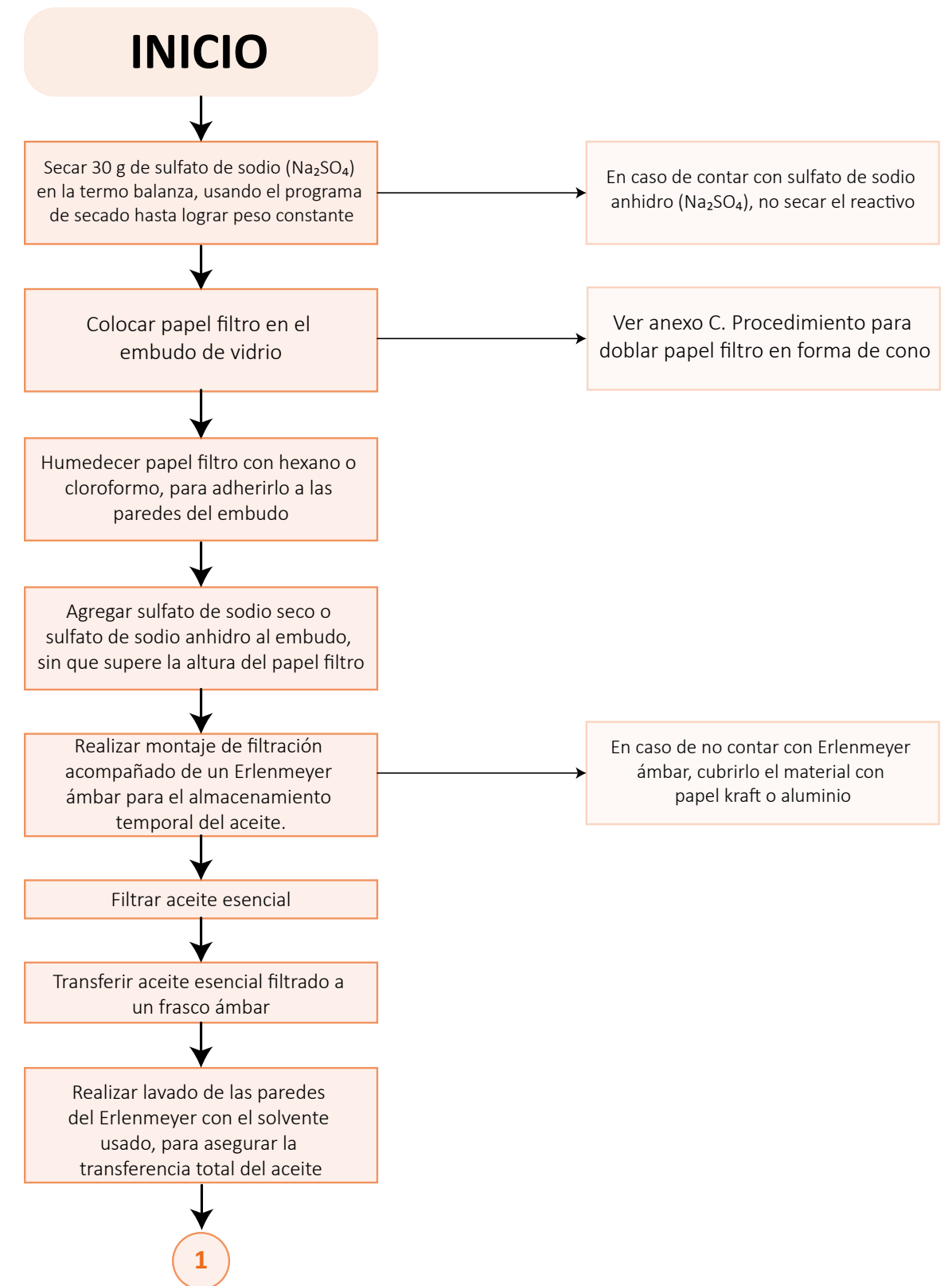


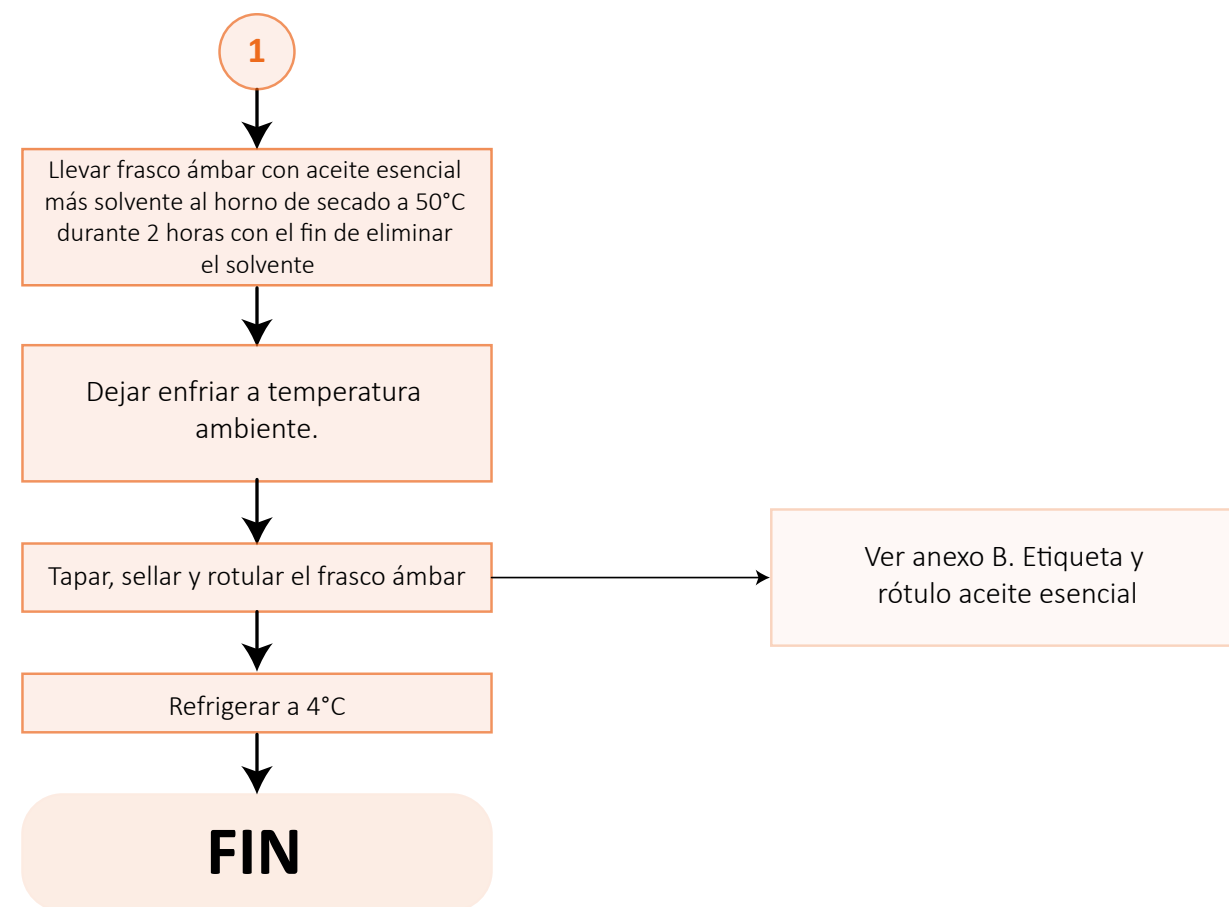
## 1.6.2. Extracción del Aceite Esencial



Fuente: (Tellez, 2017; Téllez et al., 2014)

## 1.6.3. Concentración del Aceite Esencial





## 1.7. CÁLCULOS

El rendimiento del aceite esencial fue calculado dividiendo la cantidad de aceite obtenido de la muestra vegetal entre el peso de masa seca de la misma muestra, como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{g \text{ del extracto}}{g \text{ de material vegetal}} \times 100$$

Fuente: (Tellez, 2017)

## 1.8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo, D., & Navarro, M. (2013). Composición Química del Aceite Esencial de Hojas de Orégano (*Origanum vulgare*) Chemical Composition of the Essential Oil extracted from Oregano Leaves (*Origanum vulgare*). *Información Tecnológica*.
- Bährle-Rapp, M., & Bährle-Rapp, M. (2007). *Origanum vulgare*. In Springer Lexikon Kosmetik und Körperpflege. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-71095-0\\_7234](https://doi.org/10.1007/978-3-540-71095-0_7234)
- Cárdenas Melgarejo, C., Stashenko, E., Castañeda, M., Blanco Velandia, K., Muñoz, A., Kouznetsov, V., & Reyes, J. (2007). Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol. *Scientia et Technica*.
- Guoliang, L., Junyou, S., Yourui, S., Zhiwei, S., Lian, X., Jie, Z., Jinmao, Y., & Yongjun, L. (2011). Supercritical CO<sub>2</sub> cell breaking extraction of *Lycium barbarum* seed oil and determination of its chemical composition by HPLC/APCI/MS and antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.10.012>
- Hajimehdipoor, H., Shekarchi, M., Khanavi, M., Adib, N., & Amri, M. (2010). A validated high performance liquid chromatography method for the analysis of thymol and carvacrol in *Thymus vulgaris* L. volatile oil. *Pharmacognosy Magazine*. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.66927>
- Herráez, A. (2002). *Cromatografía. Fundamentos de Bioquímica y Biología Molecular Aplicada*.
- Miranda, A. (2010). *Cromatografía Líquida (HPLC)*. Complutense University of Madrid.
- Montoya, G., Londoño, J., Yassin, L., Vásquez, G., Rojas, M., & Ramírez, R. (2007). Monoterpenos aromáticos timol y carvacrol: aproximaciones de su posible papel en procesos claves de la patología cardiovascular. *Scientia Et Technica*.
- Sofía, B., Cecilia, D., & Roberto, R. (2015). Evaluación de timol para el control antifúngico sobre películas de pintura. *Revista Materia*. <https://doi.org/10.1590/S1517-707620150003.0073>
- Tellez, L. (2017). CARACTERIZACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES DE SEIS ECOTIPOS DE ORÉGANO (*Origanum vulgare* ssp.) PROCEDENTES DEL VALLE DE URUBAMBA – CUSCO; PERÚ [Universidad Nacional Agraria La Molina]. <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/3479/tellez-monzon-lena-asuncion.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Téllez, L., Arévalo, F., Visitación, L., Altamirano, P., Ccapa, K., Juárez, H., & Chávez, J. (2014). DETERMINACIÓN DE TIMOL Y CARVACROL EN HOJAS DE ORÉGANO POR HPLC FL. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*. <https://doi.org/10.37761/rsqp.v80i4.181>

## 1.9. ANEXOS

### Anexo A. Etiquetas y rótulos muestreo

SEMILLERO SIGMA	
Cód.	RE-ERMV
Versión	1
Actualización	1
Responsable	
Nombre de la muestra	
Lugar de muestreo	
Fecha de recolección	
Composición	
Descripción física	



[Archivo de descarga](#)



### Anexo B. Etiqueta y Rótulo Aceite

SEMILLERO SIGMA	
Cód.	RE-ERA
Versión	1
Actualización	1
Responsable	
Nombre de la muestra	
Fecha de extracción	
Condiciones de almacenamiento	

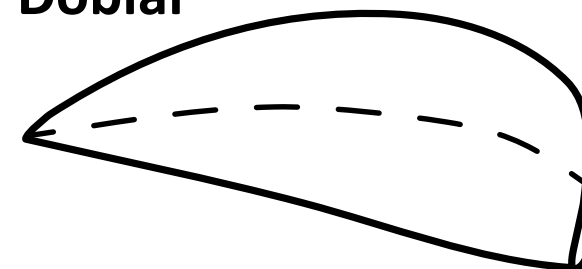


[Archivo de descarga](#)

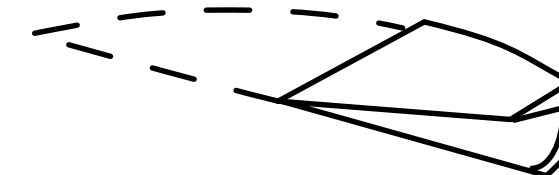


### Anexo C. Procedimiento para doblar papel filtro en forma de cono

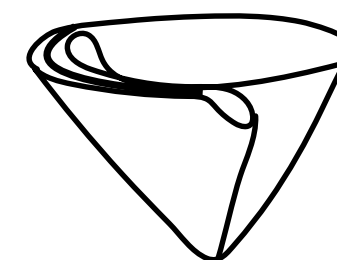
Doblar



Volver a Doblar



Abrir para formar un cono



# 2.

## GUÍA PRÁCTICA PARA DETERMINAR LAS VARIABLES DE EXTRACCIÓN POR ARRASTRE DE VAPOR

Versión 01

### 2.1. OBJETIVO

Reconocer las variables que inciden en la extracción de hidrolatos y aceites esenciales en la técnica de arrastre por vapor del material vegetal.

### 2.2. ALCANCE

Establecer el procedimiento para llevar a cabo la extracción por arrastre de vapor, señalando variables necesarias para el desarrollo conforme a las características del material. Con el fin de obtener un porcentaje de rendimiento óptimo y acorde a las necesidades del proyecto.

### 2.3. MARCO TEÓRICO

La destilación por arrastre de vapor es una técnica utilizada para lograr la separación de compuestos volátiles de otros relativamente no volátiles, principalmente cuando aquellos que son volátiles tienen un punto de ebullición muy alto o es inmiscible en agua. Esta técnica consiste en la inyección de vapor de agua (previamente calentado), directamente en la muestra del material vegetal, produciendo la evaporación de los compuestos volátiles, seguido a esto, dichos vapores son transportados por el condensador de manera que se transforman en un líquido formado por dos fases inmiscibles: fase orgánica (aceite esencial), y fase acuosa. (Camacho & Mario Grau Ríos, 2013).

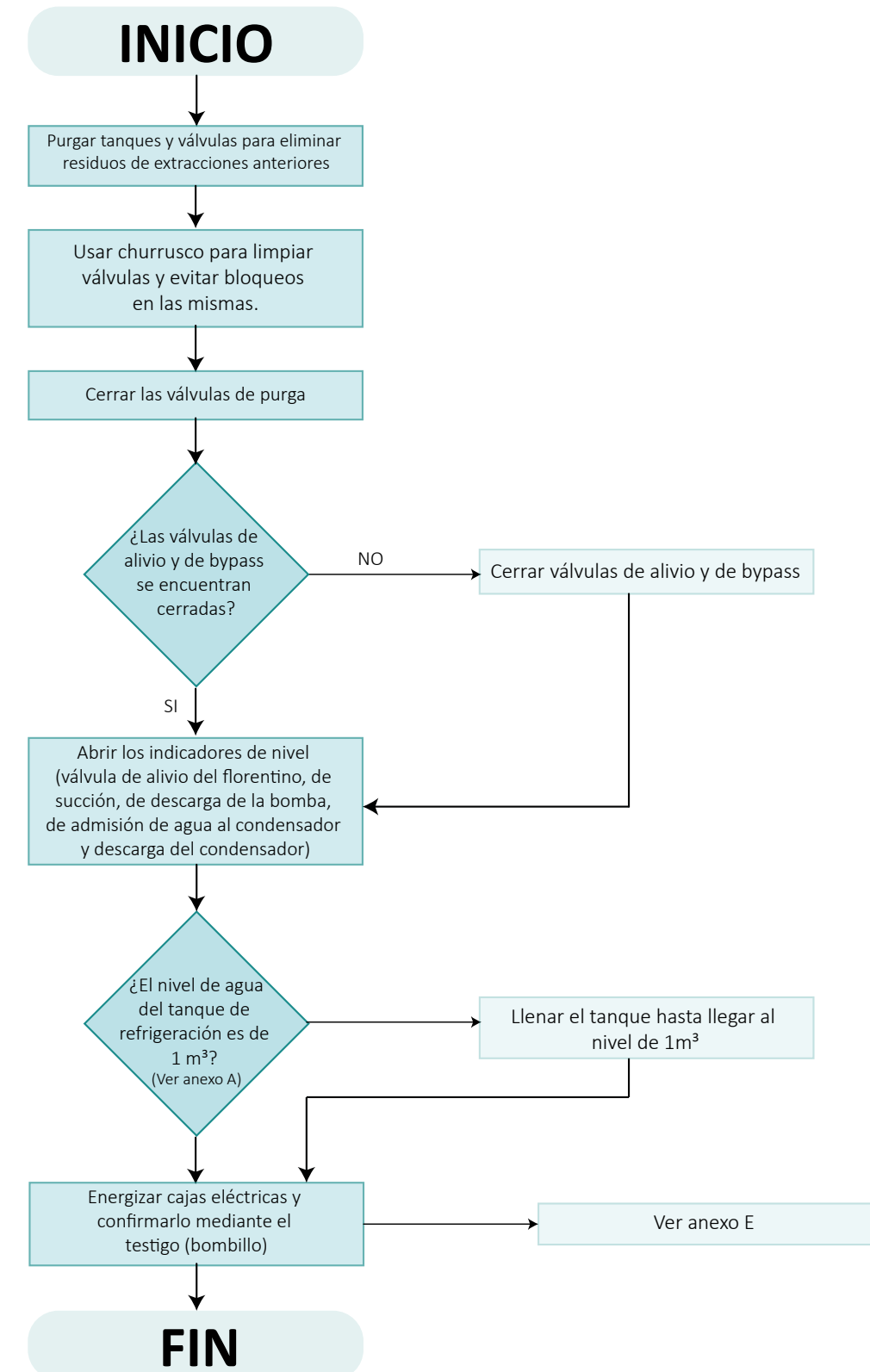
## 2.4. MATERIALES Y/O REACTIVOS

Tabla 2. Materiales y reactivos

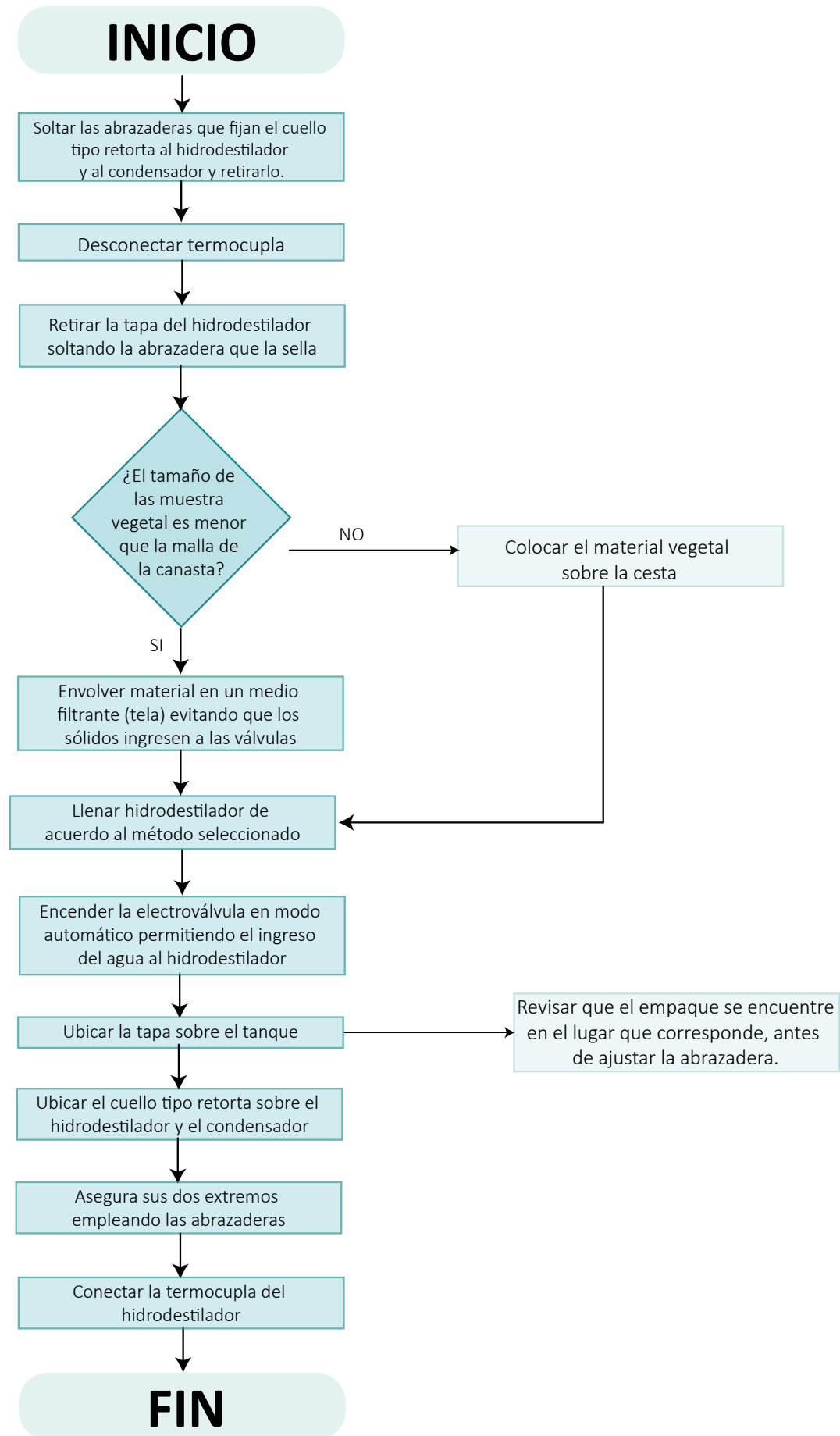
Materiales	Reactivos
Vasos precipitados Frasco Schott Frasco ámbar Tela	Etanol 96% Agua destilada tipo 1 o tipo 2 Sulfato de sodio anhidro
	Equipos
	Condensador Planta de hidrodestilación
Elementos de protección personal	
Bata Gafas de seguridad Guantes de nitrilo Guantes de carnaza Tapabocas Zapato de tipo cerrado	

## 2.5. PROCEDIMIENTO

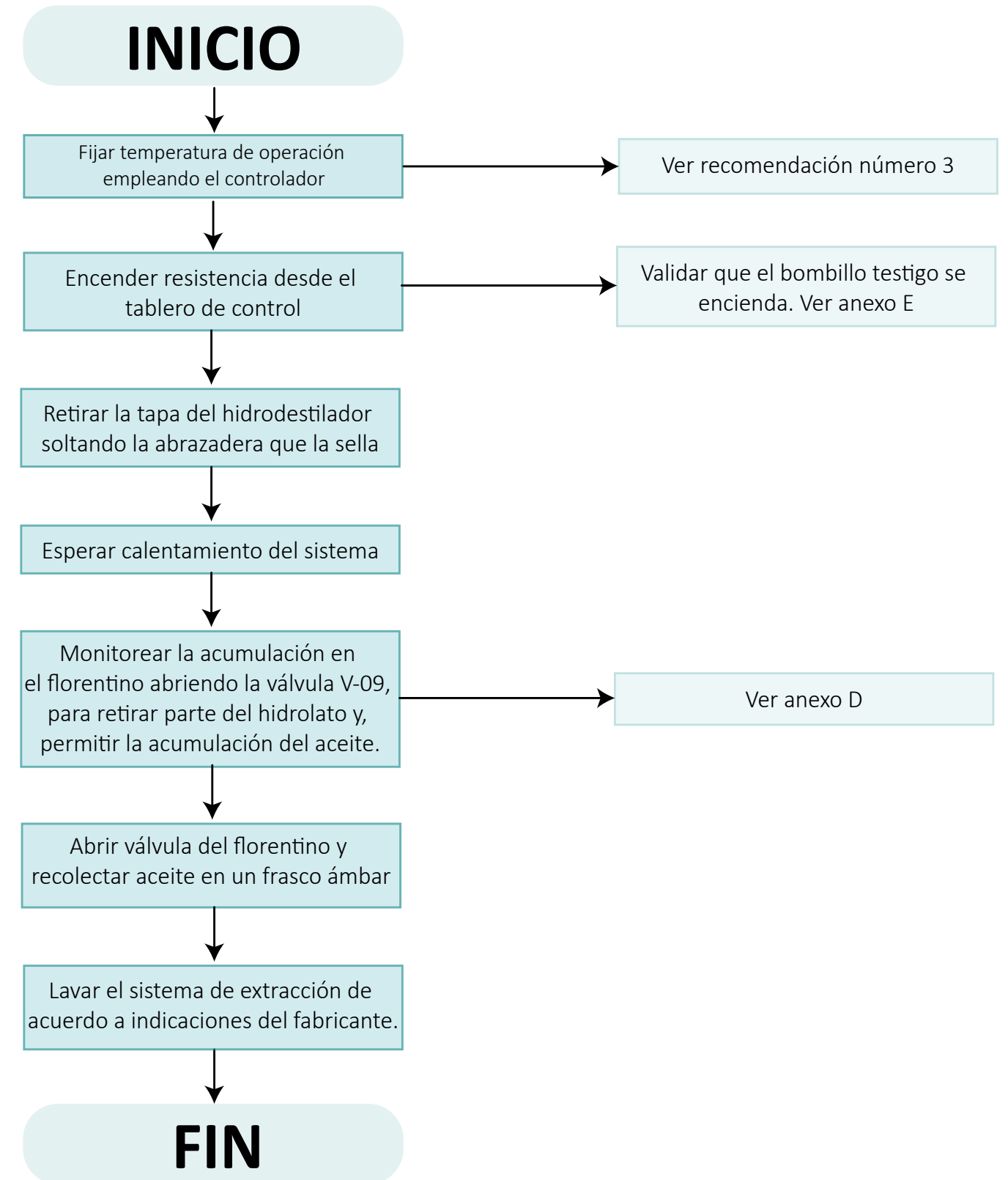
### 2.5.1. Procedimiento Adecuación del Sistema



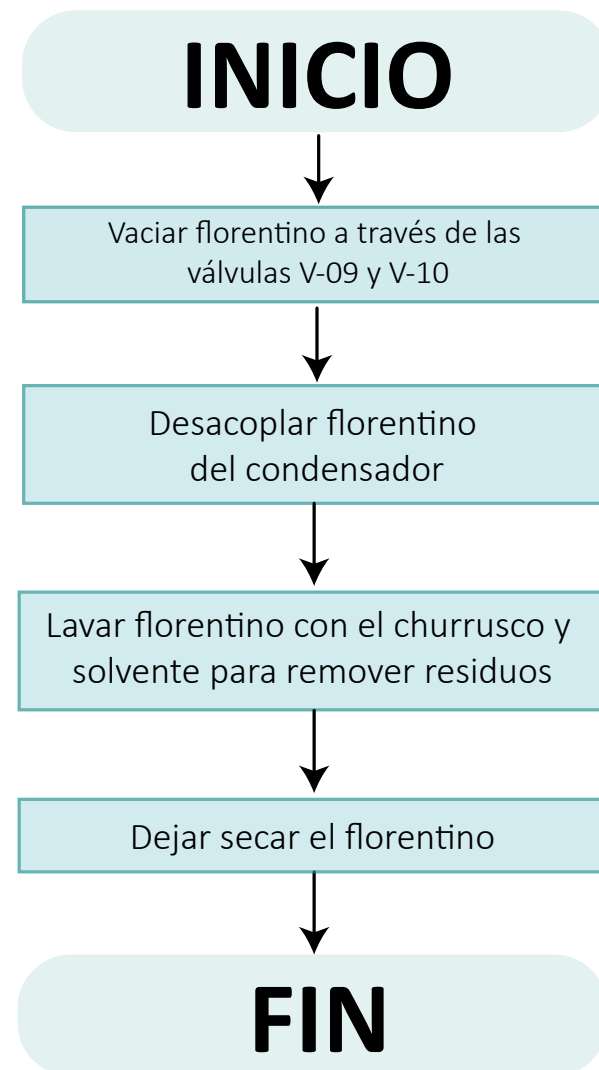
## 2.5.2. Procedimiento de Carga del Sistema



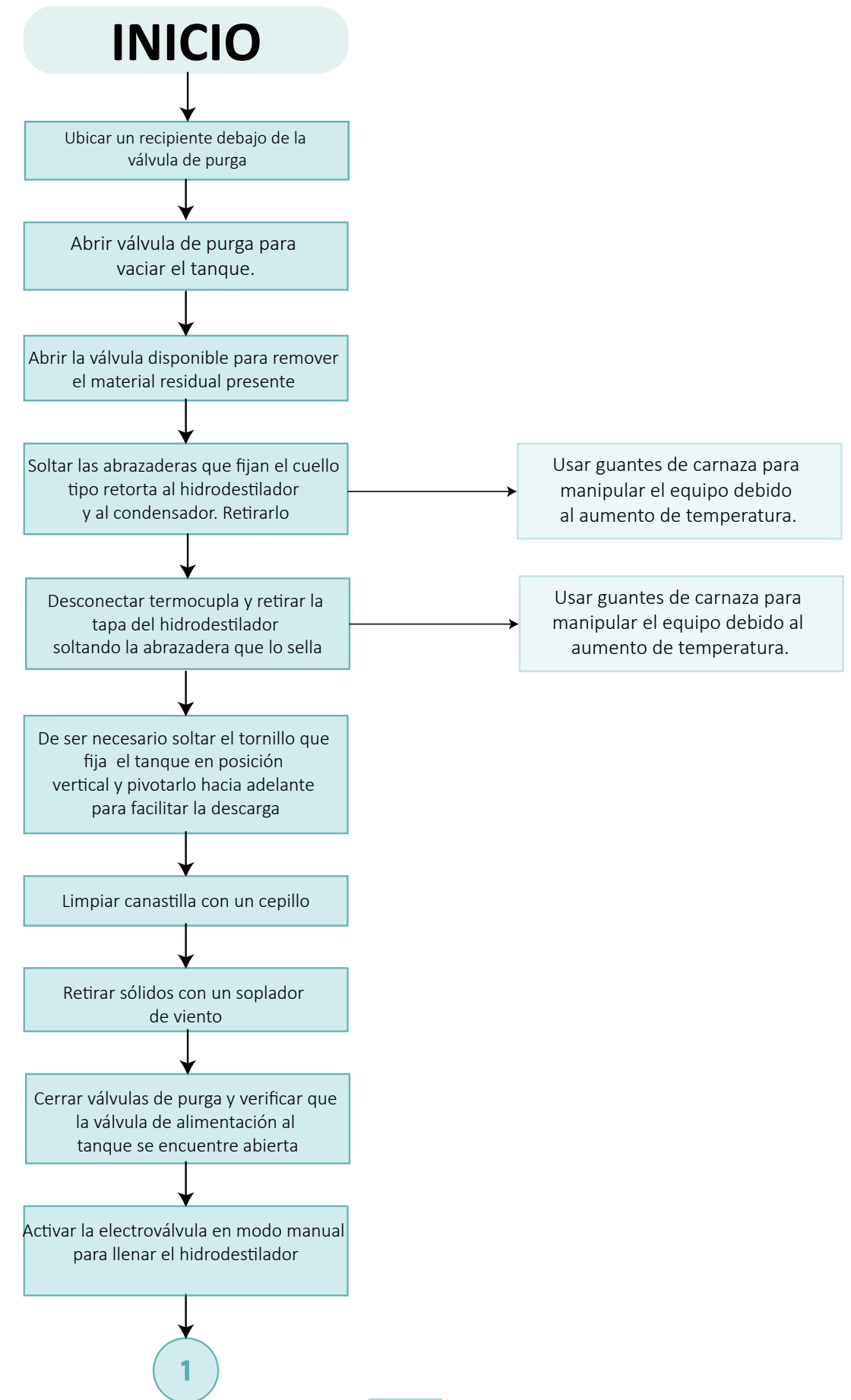
## 2.5.3. Procedimiento de Operación

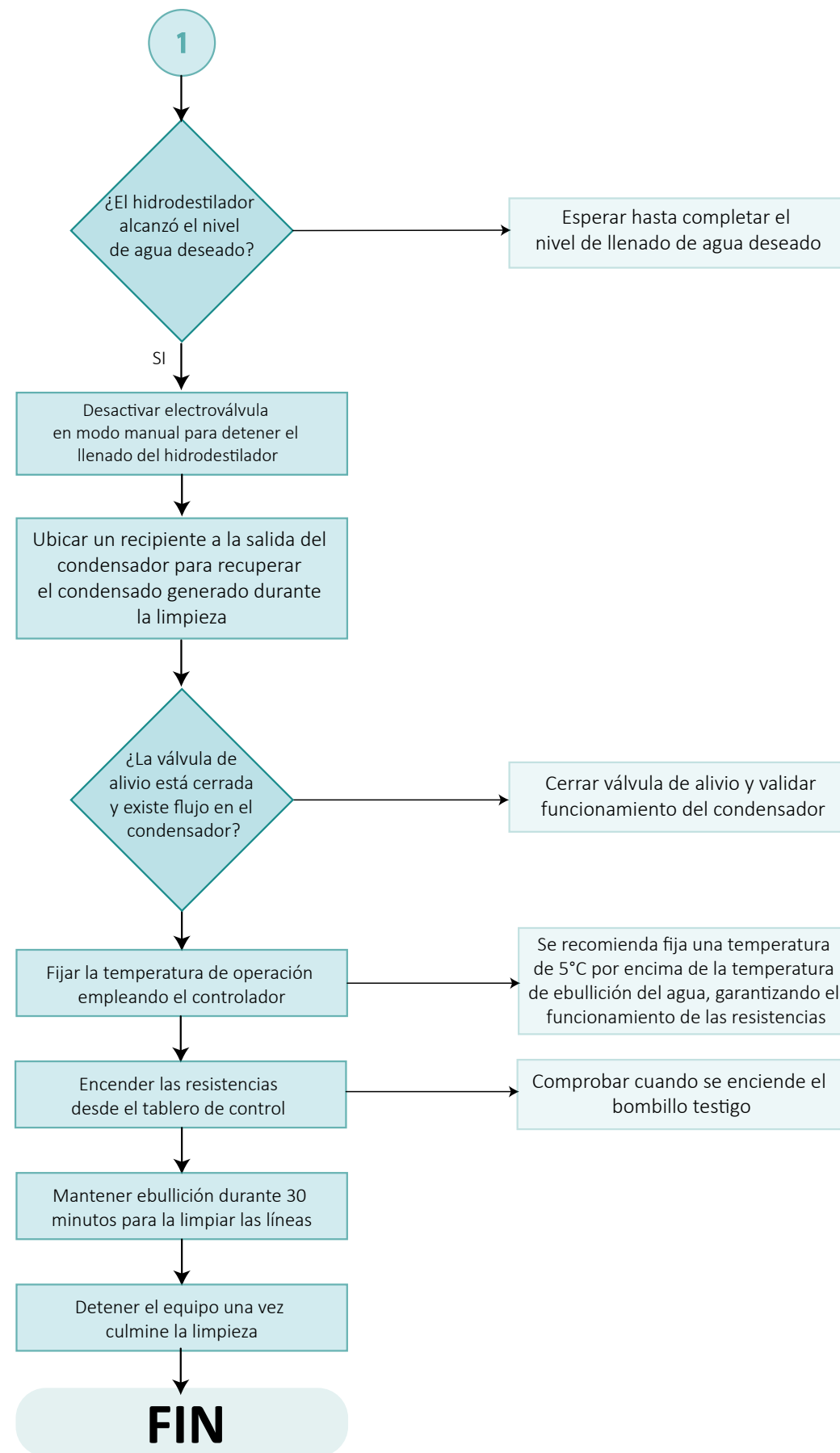


## 2.5.4. Lavado del Florentino



## 2.5.5. Lavado del Hidrodestilador





## 2.6. RECOMENDACIONES

1. Es recomendable mantener una concentración de 5ppm de hipoclorito de sodio en el tanque para evitar formación de algas o malos olores.
2. Se recomienda mantener la operación de la electroválvula en modo automático dentro del proceso para asegurar que las resistencias estén cubiertas de agua durante toda la prueba.
3. Se recomienda fijar una temperatura 5 grados por encima de la temperatura de ebullición del agua para garantizar que las resistencias se mantengan encendidas durante el proceso.

## 2.7. BIBLIOGRAFÍA

- Camacho, E., & Ríos, M. (2013). Ingeniería química [archivo PDF]. Recuperado de [https://www.academia.edu/41616426/Ingenier%C3%ADa\\_Qu%C3%ADmica\\_EUGENIO\\_MU%C3%91OZ\\_CAMACHO\\_MARIO\\_GRAU\\_R%C3%8DOS\\_UNIVERSIDAD\\_NACIONAL\\_DE\\_EDUCACI%C3%93N\\_A\\_DISTANCIA?auto=download](https://www.academia.edu/41616426/Ingenier%C3%ADa_Qu%C3%ADmica_EUGENIO_MU%C3%91OZ_CAMACHO_MARIO_GRAU_R%C3%8DOS_UNIVERSIDAD_NACIONAL_DE_EDUCACI%C3%93N_A_DISTANCIA?auto=download)
- Cerpa, M. (2017). Hidrodestilación de aceites esenciales: Modelado y caracterización [archivo PDF]. Recuperado de <http://www.anipam.es/downloads/43/hidrodestilacion-de-aceites-esenciales.pdf>
- Pino, J. (2015). Aceites esenciales química, bioquímica, producción y usos. La Habana, Cuba: Editorial Universitaria.

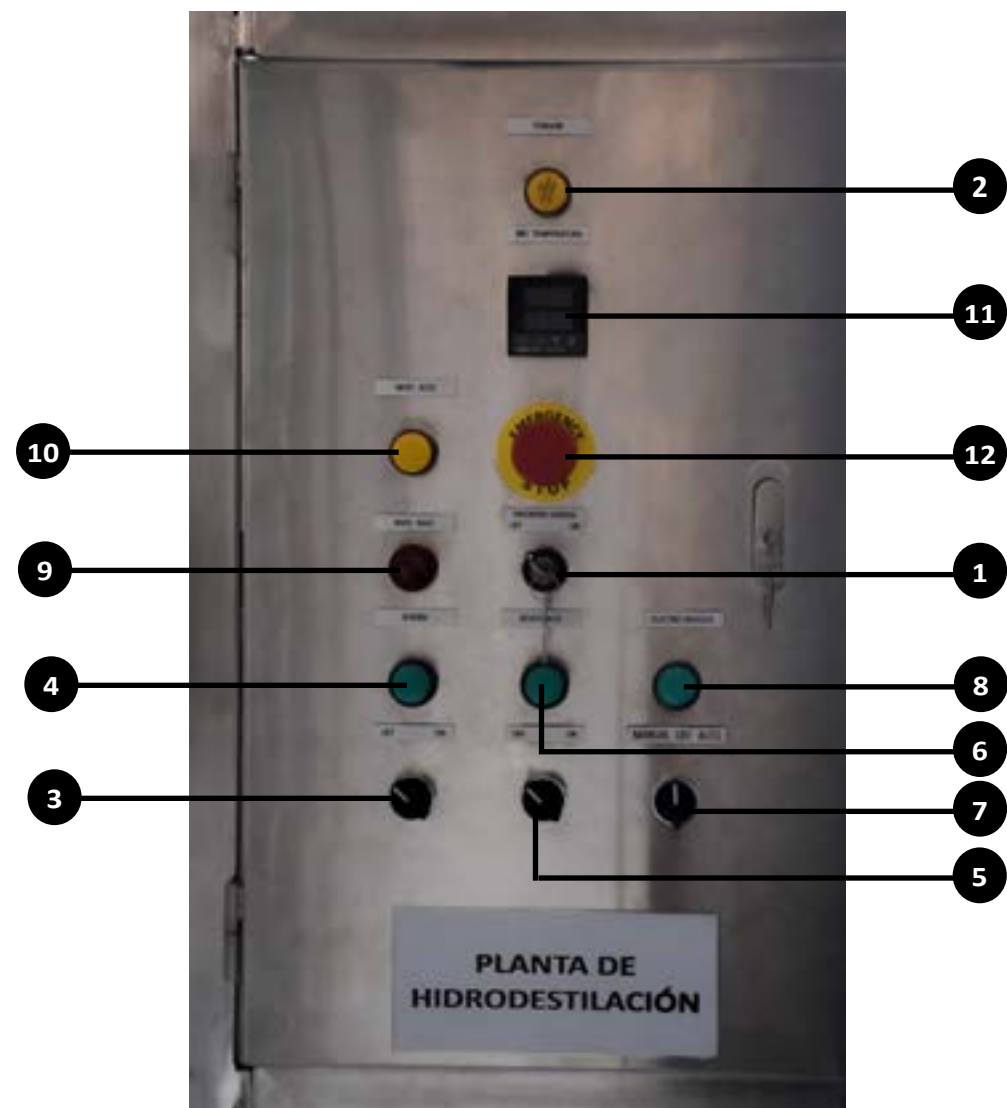


## 2.8. ANEXOS

### Anexo D. Tabla identificación de partes del sistema

SERIE	IDENTIFICACIÓN
V-03; V-04 y V-05	Válvulas de purga tanque hidroddestilador
V-09 y V-010	Válvulas de purga florentino
V-01	Válvula de alivio del hidroddestilador
V-08	Válvula de alivio del florentino
V-12 y V-13	Válvulas de purga del tanque de enfriamiento
LI-02	Nivel de agua del tanque de enfriamiento

### Anexo E. Tablero de control y sus partes



Fuente: Manual de operación planta de hidroddestilación

Nº	NOMBRE
1	Interruptor principal
2	Bombillo testigo encendido del sistema
3	Encendido bomba
4	Bombillo testigo bomba
5	Encendido resistencia
6	Bombillo testigo resistencia
7	Encendido electro válvula
8	Bombillo testigo electro válvula
9	Bombillo testigo nivel baja
10	Bombillo testigo nivel alta
11	Display temperatura
12	Botón parada de emergencia

Fuente: Manual de operación planta de hidroddestilación.

# 3.

## GUÍA PRÁCTICA PARA DETERMINAR LAS VARIABLES DE EXTRACCIÓN DEL HIDRODESTILADOR ASISTIDO POR MICROONDAS

Versión 01

### 3.1. OBJETIVO

Determinar las variables adecuadas para la extracción de hidrolatos y aceite esencial de un material vegetal para ser analizados.

### 3.2. ALCANCE

Esta guía práctica establece el procedimiento para determinar las variables que permitirán la extracción de aceites esenciales de forma eficiente, teniendo en cuenta los factores de incidencia en el proceso como lo es el estado del clima y características físicas del material a utilizar.

### 3.3. MARCO TEÓRICO

La hidrodestilación asistida por microondas es una técnica utilizada para la extracción de aceite esencial con un bajo costo de producción. Se utilizan los mismos equipos empleados en la técnica de arrastre por vapor, solo que este utiliza un microondas convencional, en el cual el aceite esencial que se encuentra generalmente en bolsas (glándulas secretoras) compuestas por diferentes cantidades de agua, son irradiadas por ondas que interactúan selectivamente con agua y causan calentamiento localizado. (Torrenegra et al., 2015)

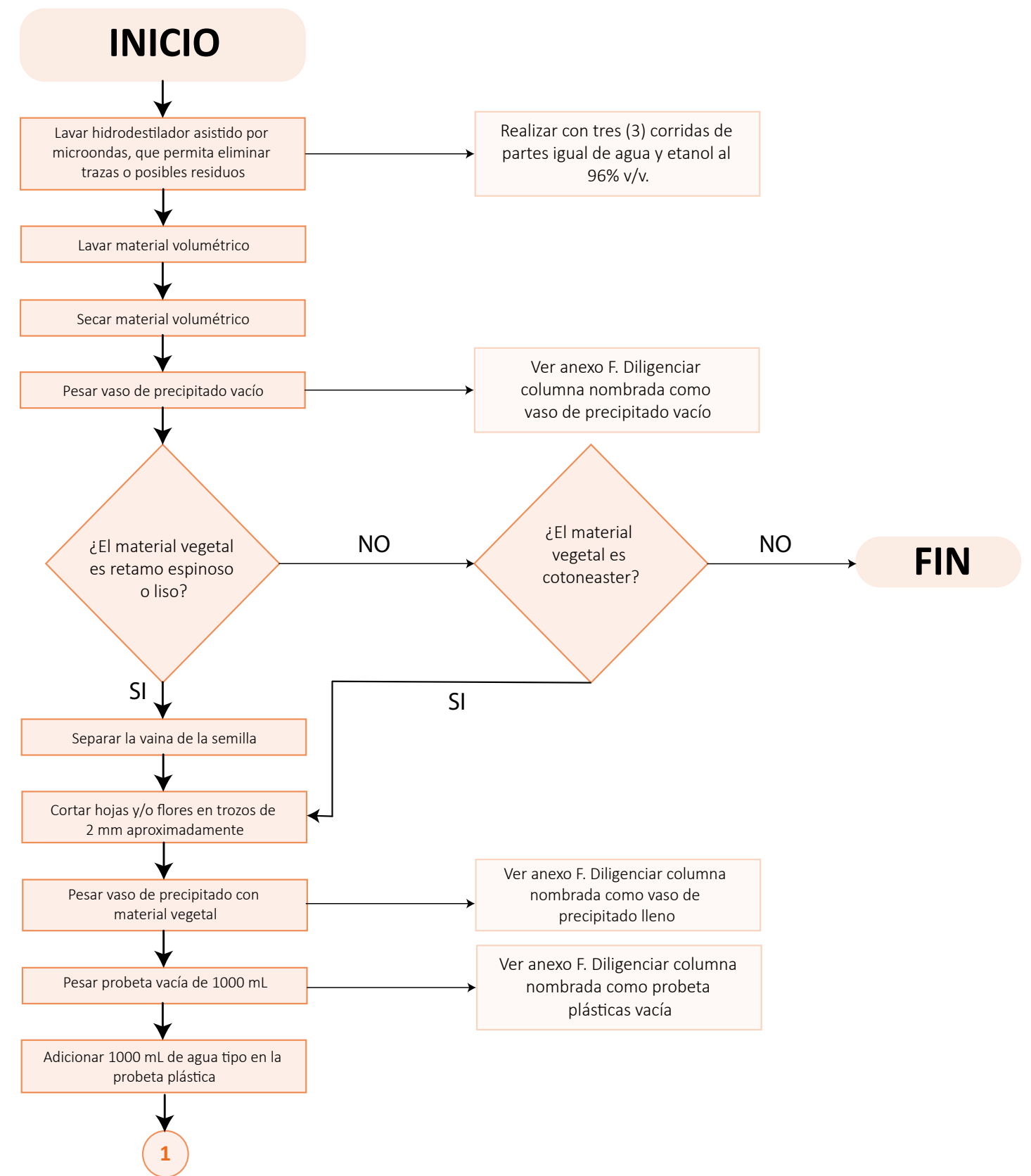
La hidrodestilación asistida por microondas para la extracción de aceites esenciales e hidrolatos ha demostrado ser ambientalmente eficiente, ya que, al emplearse agua como vehículo de extracción, se elimina el uso de solventes tóxicos y dañinos para el ambiente, así como la degradación térmica ocasionada por el uso de vapor de agua. (Darío & Barajas, 2015)

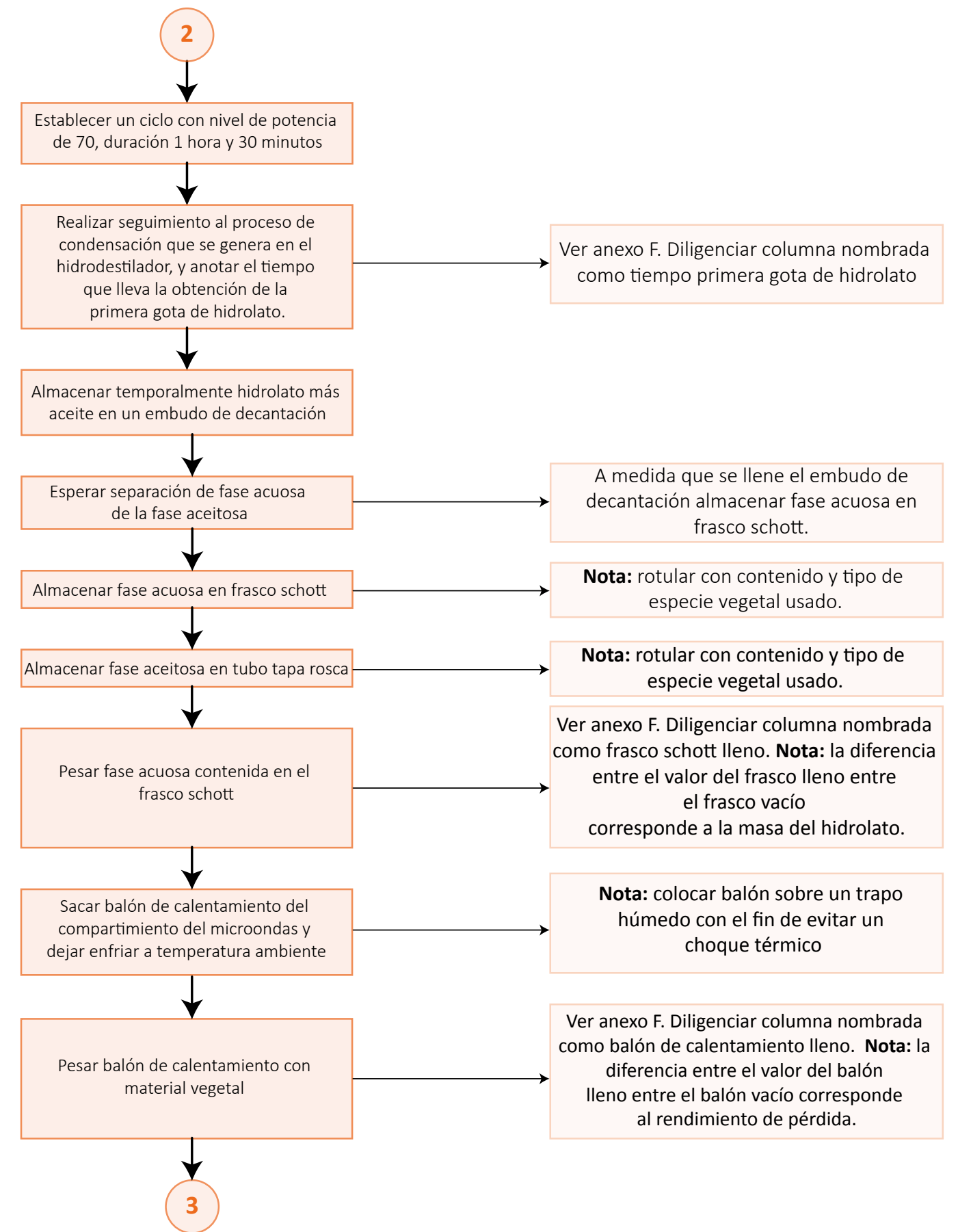
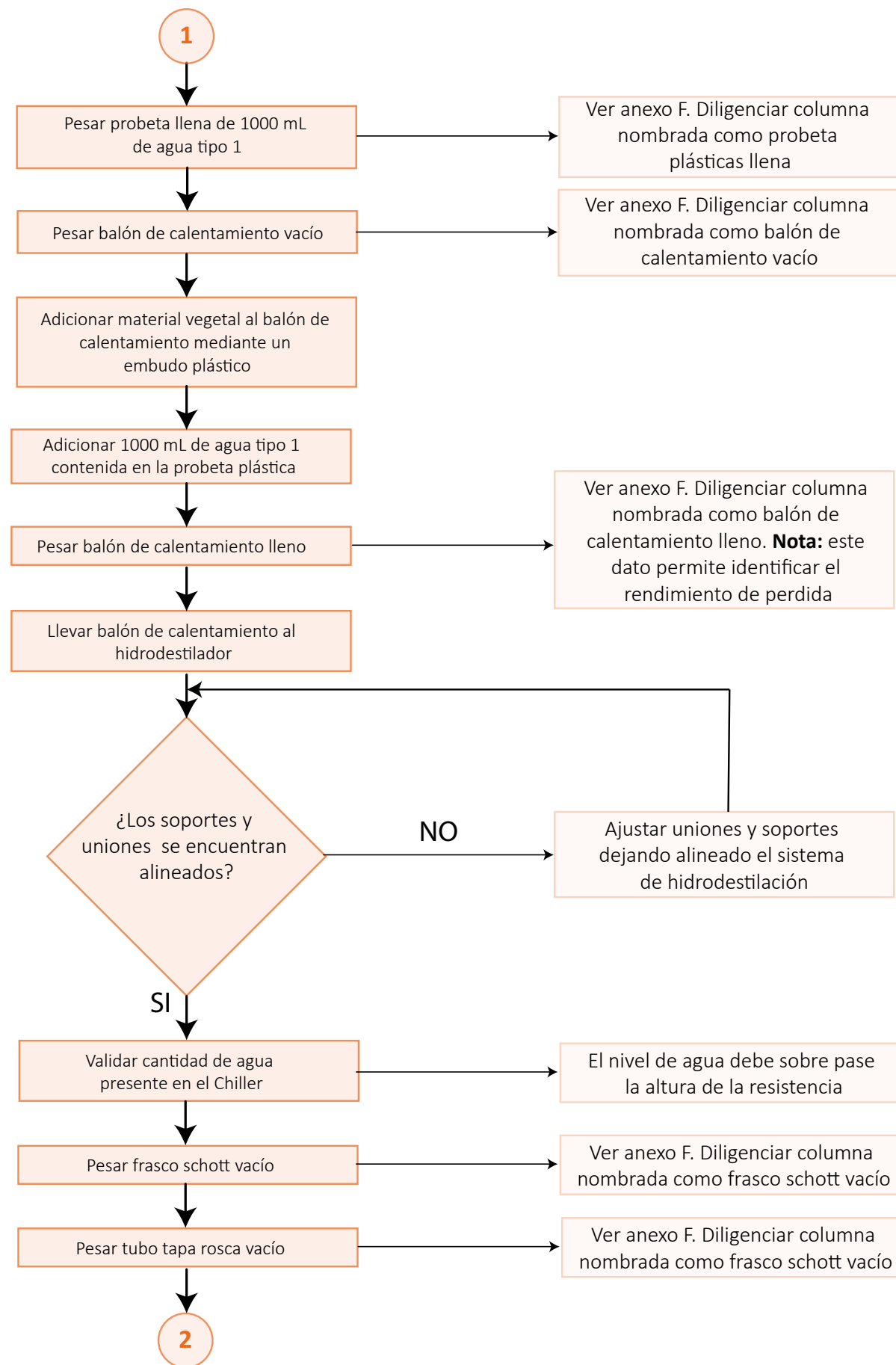
### 3.4. MATERIALES Y/O REACTIVOS

Tabla 3. Materiales y reactivos

Materiales	Reactivos
Balón de calentamiento de 2000 mL Frascos schott 500 mL Embudo de decantación 250 mL Embudo de plástico (grande) Probeta plástica de 1000 mL Embudo de vidrio de 5 mL Vasos de precipitado de 1000 mL Agitador de vidrio Tubos tapa rosca 15 mL Aros metálicos Frascos lavadores Espátula Pipeta Pasteur Mangueras de conexión para el Chiller	Etanol 96% Agua destilada tipo 1 o tipo 2 Sulfato de sodio anhidro
	Equipos
	Destilador asistido por microondas Balanza analítica Chiller
Elementos de protección personal	
Bata Gafas de seguridad Guantes de nitrilo Tapabocas Zapato de tipo cerrado	

### 3.5. PROCEDIMIENTO







# 4.

## GUÍA PRÁCTICA PARA CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL

Versión 01

### 4.1. OBJETIVO

Definir el procedimiento para la caracterización química del aceite esencial.

### 4.2. ALCANCE

Establecer el paso a paso para la caracterización química del aceite esencial, teniendo en cuenta los grupos funcionales de interés (fenoles, alcaloides, terpenos y flavonoides) y las condiciones cromatográficas para configurar en el equipo descritas en la bibliografía.

### 4.3. MARCO TEÓRICO

Con el fin de identificar los compuestos presentes en el material vegetal, se plantea realizar su caracterización mediante un cromatógrafo de gases acoplado al detector de masas el que tiene como finalidad la separación, detección, identificación y cuantificación por porcentaje de abundancia de cada molécula presente mediante la comparación con la base de datos que este equipo posee o por medio de una de calibración con estándares certificados.

Según la Universidad de Burgos, (2020) la espectrometría de masas se define como:

(...) técnica instrumental de análisis, de alta sensibilidad, basada en la ionización de las moléculas y en la separación y registro de los iones producidos según su relación masa/carga ( $m/z$ ) en un sistema a vacío. Los iones que llegan al detector producen una señal eléctrica que es ampliada, procesada y registrada en un ordenador, dando lugar al correspondiente espectro de masas que no es más que una representación gráfica de la abundancia de los iones detectados en función de su relación  $m/z$ .

Por otra parte, la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) se define “un método cromatográfico que se utiliza para separar una mezcla de compuestos en química analítica y bioquímica para identificar, cuantificar o purificar los componentes individuales de la mezcla” (Thomas, 2013). A su vez, se ha determinado que:

(...) tiene la capacidad de separar e identificar compuestos que están presentes en cualquier muestra que se puede disolver en un líquido en concentraciones mínimas de partes por billón. Debido a esta versatilidad, la HPLC se utiliza en una variedad de aplicaciones industriales y científicas, como productos farmacéuticos, ambientales, forenses y químicos (Linde, n.d.)

## 4.4. MATERIALES Y/O REACTIVOS

Tabla 4. Materiales o reactivos opción 1

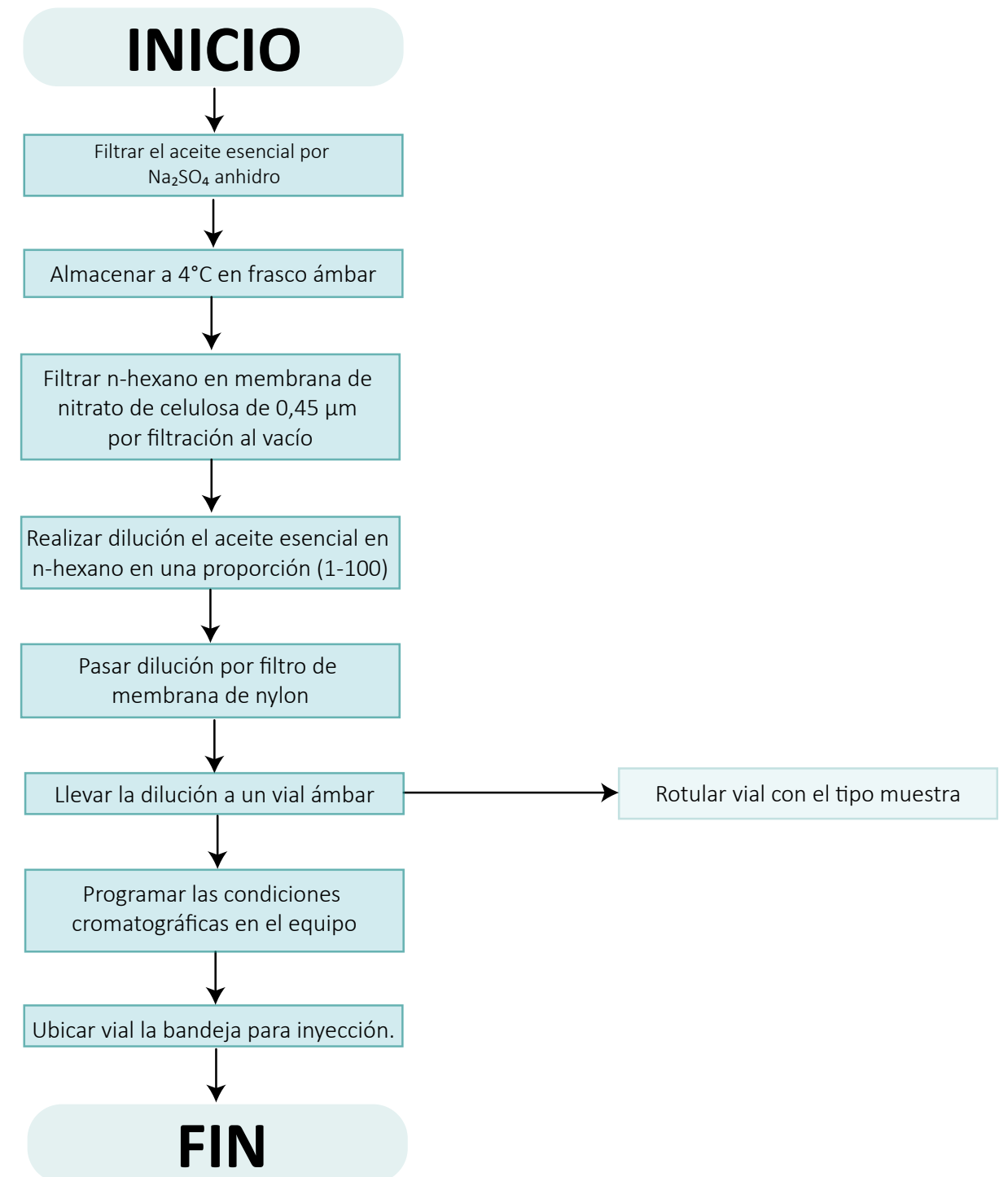
Materiales	Reactivos
Frascos lavador Micropipeta 100 – 1000 µL Micropipeta 10 – 100 µL Micropipeta 0,5 – 10 µL Punta para Micropipeta 100–1000 µL Punta para Micropipeta 10 – 100 µL Punta para Micropipeta 0,5 – 10 µL Viales para inyección HPLC Sistema de filtración al vacío Columna DB-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) Filtro de membrana nitrato de celulosa 0,45 µm	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> n-Hexano grado HPLC Helio
	Equipos
	Cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masas (CG-MS) Sistema de filtración al vacío
Elementos de protección personal	
Bata Gafas de seguridad Guantes de nitrilo Tapabocas Zapato de tipo cerrado	

Tabla 5. Materiales o reactivos opción 2

Materiales	Reactivos
Frascos lavador Micropipeta 100 – 1000 µL Micropipeta 10 – 100 µL Micropipeta 0,5 – 10 µL Punta para Micropipeta 100–1000 µL Punta para Micropipeta 10 – 100 µL Punta para Micropipeta 0,5 – 10 µL Viales para inyección HPLC Sistema de filtración al vacío Columna Poroshell 120 EC-C18 (4.6 x 100 mm, 4 µm) Filtro de membrana nitrato de celulosa 0,45 µm	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Acetonitrilo grado HPLC Agua tipo 1
	Equipos
	Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) Sistema de filtración al vacío
Elementos de protección personal	
Bata Gafas de seguridad Guantes de nitrilo Tapabocas Zapato de tipo cerrado	

## 4.5. PROCEDIMIENTO

### 4.5.1. Opción 1: Procedimiento Dilución Aceite Esencial



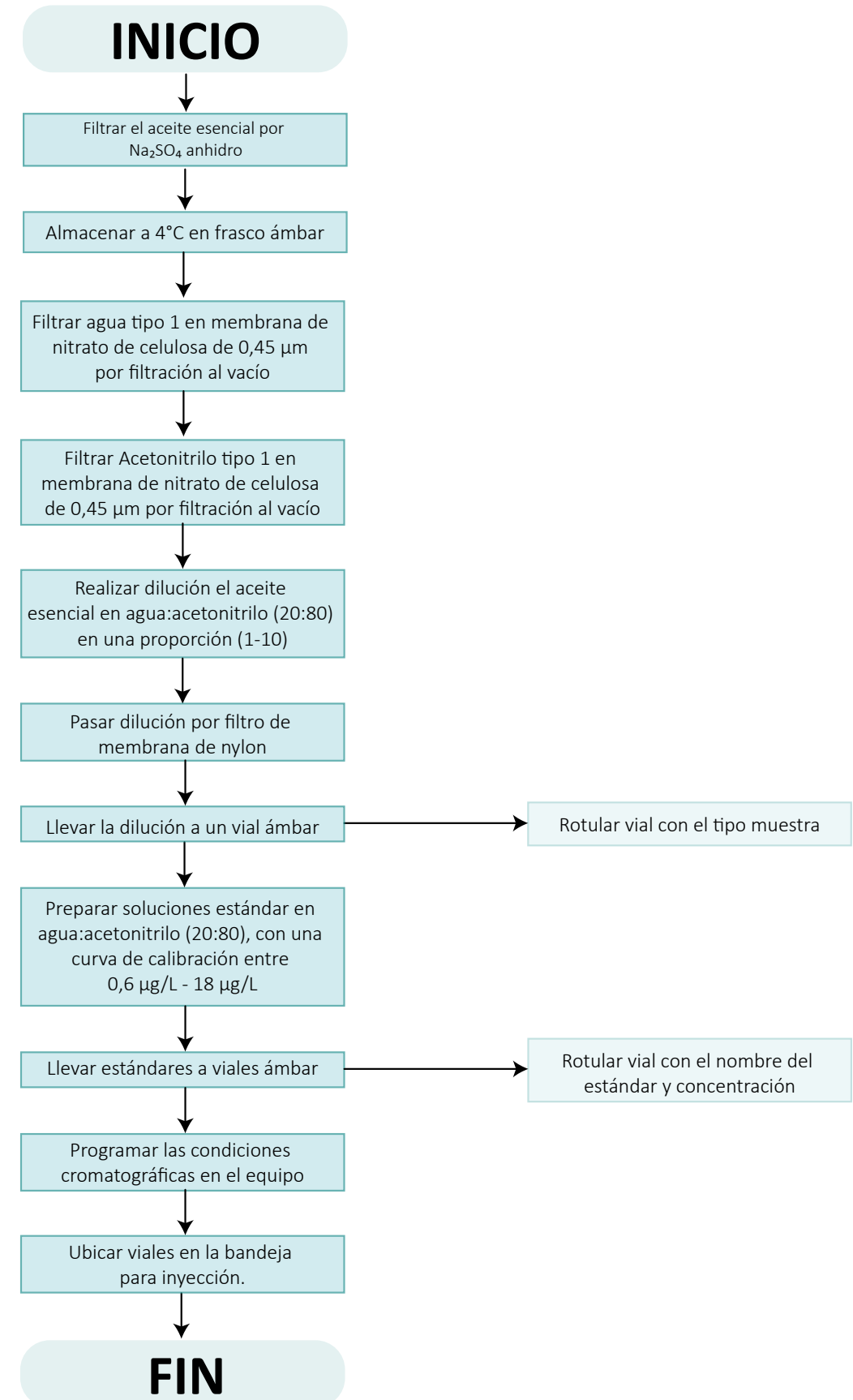
Fuente. (da Camara et al., 2015)

# Condiciones Cromatográficas

<b>Tipo de cromatografía</b>	CG-MS
<b>Gas portador</b>	Helio (1mL/min)
<b>Columna</b>	DB-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm)
<b>Programa de temperatura</b>	50 °C - 250°C (3°C/min)
<b>Temperatura del detector</b>	250°C
<b>Temperatura del inyector</b>	250°C
<b>Modo</b>	Split (1:30)
<b>Volumen de inyección</b>	1μL Disolución (1/100 en n-hexano)

Fuente. (da Camara et al., 2015)

## 4.5.2. Opción 2: Procedimiento Alistamiento de la Muestra y Preparación de Estándares



Fuente. (Téllez et al., 2014)



# Condiciones Cromatográficas

<b>Tipo de cromatografía</b>	HPLC
<b>Fase móvil</b>	Acetonitrilo: Agua (50:50)
<b>Flujo</b>	1 mL/min
<b>Columna</b>	Columna Poroshell 120 EC-C18 (4.6 x 100 mm, 4 µm) <sup>1</sup>
<b>Programa de acondicionamiento</b>	30 min - agua:acetonitrilo (50:50) - flujo 1 mL/min
<b>Tiempo de corrida</b>	15 minutos
<b>Límite de presión</b>	73,1 bar <sup>1</sup>
<b>Volumen de inyección</b>	2 µL <sup>1</sup>
<b>Programa de lavado</b>	5 min - 100% agua - flujo 1 mL/min 5,1 min - agua:acetonitrilo (50:50) - flujo 1 mL/min 10 min - agua:acetonitrilo (50:50) - flujo 2 mL/min 30 - 60 min - agua:acetonitrilo (50:50) - flujo 1 mL/min 60,1 - 90 min - agua:acetonitrilo(30:70) - flujo 1 mL/min <sup>1</sup>
<sup>1</sup> Valores modificados conforme a especificaciones de la columna disponible	

Fuente. (Téllez et al., 2014)

da Camara, C., Akhtar, Y., Isman, M., Seffrin, R., & Born, F. (2015). Repellent activity of essential oils from two species of Citrus against Tetranychus urticae in the laboratory and green house. Crop Protection. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.04.014>

Linde. (n.d.). Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Retrieved July 17, 2020, from [http://hiq.linde-gas.com/en/analytical\\_methods/liquid\\_chromatography/high\\_performance\\_liquid\\_chromatography.html](http://hiq.linde-gas.com/en/analytical_methods/liquid_chromatography/high_performance_liquid_chromatography.html)

Téllez, L., Arévalo, F., Visitación, L., Altamirano, P., Ccapa, K., Juárez, H., & Chávez, J. (2014). DETERMINACIÓN DE TIMOL Y CARVACROL EN HOJAS DE ORÉGANO POR HPLC FL. Revista de La Sociedad Química Del Perú. <https://doi.org/10.37761/rsqp.v80i4.181>

Thomas, G. (2013). Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC): métodos, beneficios y aplicaciones. AZO Materials. <https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=8468>

Universidad de Burgos. (2020). Cromatografía de Gases/Líquidos acoplado a espectrometría de masas de Alta Resolución (MS-AR). <https://www.ubu.es/parque-cientifico-tecnologico/servicios-cientifico-tecnicos/espectrometria/cromatografia-de-gasesliquidos-acoplado-espectrometria-de-masas-de-alta-resolucion-ms-ar>

# 5.

## GUÍA PRÁCTICA PARA LA EXTRACCIÓN DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN FRESA

Versión 01

### 5.1. OBJETIVO

Definir el procedimiento para la extracción de residuos de plaguicidas en fresa fragaria.

### 5.2. ALCANCE

Establecer el paso a paso para la extracción de residuos de plaguicidas en fresa fragaria con el fin de realizar la cuantificación de la misma, teniendo en cuenta la resolución 2906 de 2007, por la cual se establecen los límites máximos permisibles de residuos de plaguicidas, LMR, en alimentos para consumo humano y piensos o forrajes.

### 5.3. MARCO TEÓRICO

La presencia de los residuos de plaguicidas en matrices tales como agua, suelo, fruto y hojas se atribuye a la sobre dosificación de insumos químicos y aplicación inadecuada en los medios de cultivo. Adicionalmente, el mayor impacto es generado hacia la salud humana y en el ecosistema donde se desarrollan este tipo de actividades agroindustriales (Guerrero, 2016). Por tal motivo, para la identificación de la misma y la cuantificación de los componentes activos de dichos insumos se establece el método QuEChERS para potenciar la extracción de los analitos en las muestras anteriormente mencionadas.

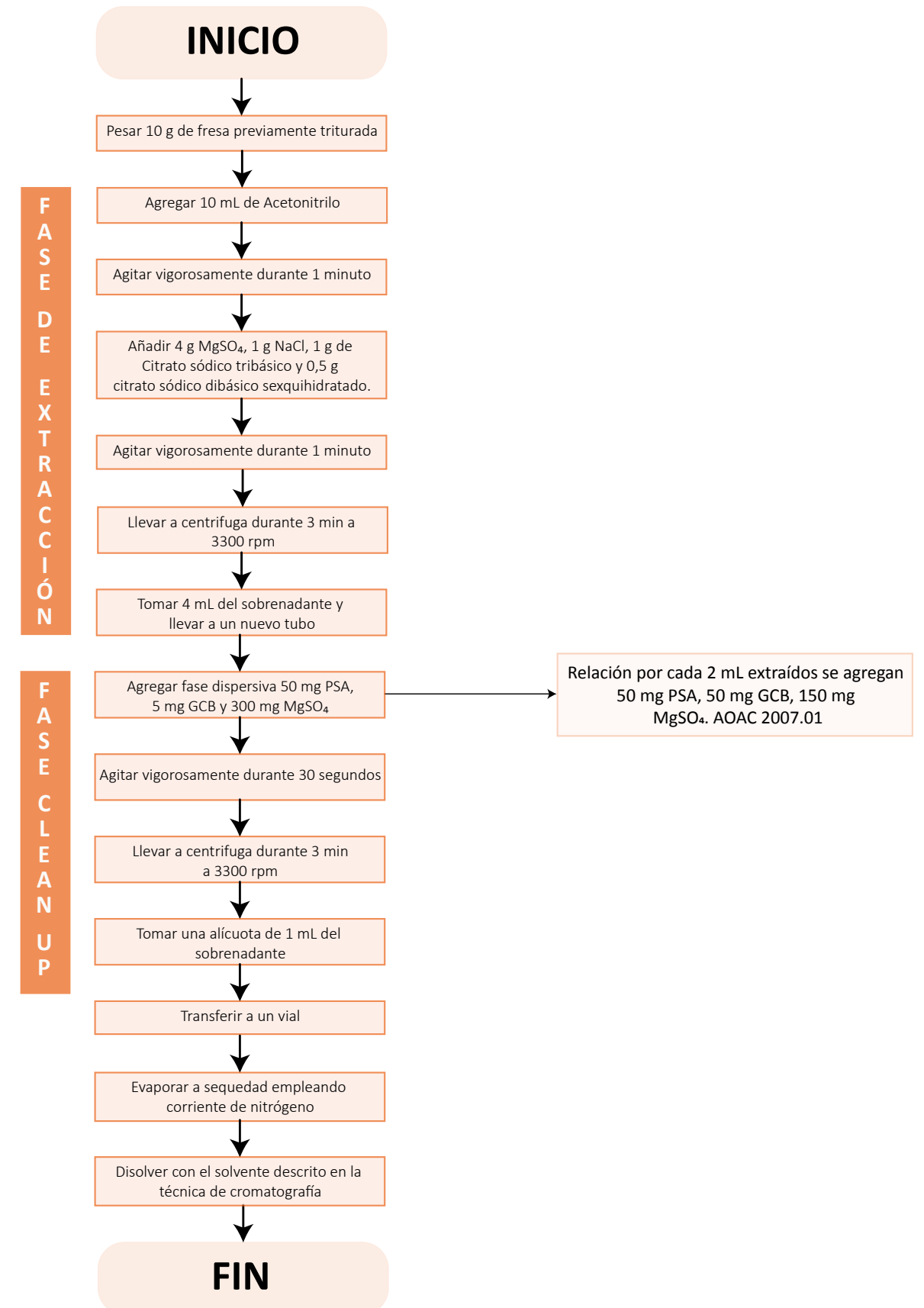
El método QuEChERS consiste básicamente en tres pasos. La primera parte es una extracción líquido-líquido con ACN que incluye simultáneamente un proceso de *salting out* de la muestra en medio acuoso. En segundo lugar, se realiza un procedimiento d-EFS equivalente a una extracción sólido-líquido haciendo uso de diversos adsorbentes para remover la mayoría de componentes coextraídos con los analitos y por último, se realiza el análisis instrumental empleando espectrometría de masas en la detección. Adicionalmente, se han estipulado dos normas tales como la AOAC 2007.01 y UE prEN-15662 (CEN) estipuladas por instituciones de estandarización de métodos las cuales se diferencia básicamente por la cantidad de muestra adiciona y reactivos de extracción y7o limpieza.

## 5.4. MATERIALES Y/O REACTIVOS

Tabla 6. Materiales o reactivos

Materiales	Reactivos
Frascos lavador Microespatula Vidrios de reloj Espátula Micropipeta 100 – 1000 µL Micropipeta 10 – 100 µL Micropipeta 0,5 – 10 µL Punta para Micropipeta 100–1000 µL Punta para Micropipeta 10 – 100 µL Punta para Micropipeta 0,5 – 10 µL Tubos centrifuga 25 mL Viales para inyección HPLC Tamiz 1,4 mm	Acetonitrilo grado HPLC Kit de QuECHERS (4 g MgSO <sub>4</sub> , 1 g NaCl, 1 g Citrato Sódico tribásico dihidrato, 0,5g Citrato Sódico dibásico sexquihidrato) Kit de QuECHERS (150 mg MgSO <sub>4</sub> , 50 mg PSA, 50 mg GCB)
	Equipos
	Centrifuga 25 mL Licuadora Termobalanza
Elementos de protección personal	
Bata Gafas de seguridad Guantes de nitrilo Tapabocas Zapato de tipo cerrado	

## 5.5. PROCEDIMIENTO



Fuente. (AOAC, 2007; López et al., 2010)



# 6.

## GUÍA PRÁCTICA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BOTRYTIS CINEREA

Versión 02

### 6.1. OBJETIVO

Realizar la identificación del hongo Botrytis cinerea aislado de los frutos del cultivo de fresa fragaria.

### 6.2. ALCANCE

La guía práctica para la identificación de Botrytis cinerea busca comprobar por microscopía la identidad del aislamiento realizado a partir de frutos de fresa.

### 6.3. DEFINICIONES

**ÁRTRICO:** conidio que se forma por fragmentación y desarticulación de la hifa conidiógena fértil. (Castaño & Gutiérrez, s.f.)

**ASCOMICETO:** hongo que puede vivir en numerosos sustratos, incluso bajo tierra y es causal de gran cantidad de plagas. (González, 2013)

**BASÍPETA:** referente a una estructura donde los conidios en cadena son producidos sucesivamente y el elemento basal es el más joven. (González, 2013)

**BLÁSTICO:** conidio en el cual hay un desarrollo inicial marcado antes de que este sea delimitado por un septo. (González, 2013)

**BOTRIOSO:** arreglo de los conidios en racimo sobre un ensanchamiento del conidióforo, como en el género Botrytis. (González, 2013)

**CONIDIÓFORO:** hifa especializada, simple o ramificada en la cual se forman los conidios. (Castaño & Gutiérrez, s.f.)

**CONIDIOGENICA:** célula que origina un conidio. (Castaño & Gutiérrez, s.f.)

**CONIDIOMAS:** estructuras multi hifales en donde se producen los conidios. (González, 2013)

**CONIDOS:** mitosporas asexuales, externos que se forman a partir de una célula conidiógena o hifa fértil. (González, 2013)

**ESCLEROCIOS:** masa compacta de micelio endurecido que almacena nutrientes de reserva, se separa del hongo y permanece latente hasta que el medio sea favorable para su crecimiento y reproducción de esporas.

**ESPORODOQUIO:** estroma en forma de cojín cubierto por conidióforos donde se forman los conidios.

**ESTROMA:** estructura somática compacta, formada por hifas entrelazadas en la cual se forma algún tipo de fructificación. (Castaño & Gutiérrez, s.f.)

**HOSPEDERO:** organismo vivo que aloja un parásito. (González, 2013)

**MICELIO:** conjunto de hifas que constituyen el cuerpo de un hongo. (Castaño & Gutiérrez, s.f.)

**NECROSIS:** cambio en el tejido producido por células que han muerto. (Castaño & Gutiérrez, s.f.)

**NECROTROFO:** hongos que matan las células y extrae los nutrientes de su hospedero. (González, 2013)

**PERIDIO:** pared que cubre o encierra un cuerpo fructífero macroscópico o microscópico. (González, 2013)

**Picnidio:** conidiomas en forma de botella, delimitada por un peridio y recubierta interiormente por conidióforos. (González, 2013)

**SINEMA:** conidiomas formado por grupos de conidióforos que se reúnen y forman una estructura alargada. (Castaño & Gutiérrez, s.f.)

1. La adhesión y germinación de las esporas sobre la superficie del huésped;
2. Su penetración en el tejido vegetal, bien a través de heridas o de aberturas naturales, bien directamente mediante la participación de distintas actividades enzimáticas o mediante la participación de diversos procesos mecánicos (incluyendo la diferenciación de estructuras de penetración en algunos sistemas)
3. El establecimiento del patógeno en la zona de penetración, determinando la muerte de las células adyacentes al punto de penetración y dando lugar a la formación de una lesión primaria como consecuencia de la expresión de los mecanismos de defensa de la planta
4. En muchos casos se inicia entonces una fase de latencia durante la cual los mecanismos de defensa de la planta parecen controlar al patógeno que permanece localizado en el área de necrosis correspondientes a las lesiones primarias
5. Transcurrido un tiempo, en algunas lesiones primarias el patógeno es capaz de vencer las barreras defensivas de la planta e inicia la diseminación de la misma en el tejido vegetal circundante a partir de aquéllas, determinando la colonización y la maceración del tejido infectado en un breve periodo de tiempo. Sobre el tejido infectado el patógeno produce una nueva generación de esporas que pueden iniciar un nuevo ciclo de infección. (Ernesto P. Benito, 2017).

El hongo *Botrytis cinerea* se caracteriza por tener colonias que crecen rápidamente y se tornan de gris a marrón oscuro con la madurez. El micelio vegetativo es septado, hialino a oscuro y ancho (Cepero *et al*, 2012).

Las células que producen las estructuras de reproducción se caracterizan por ser ramificados frecuentemente y presentar en la zona apical ensanchamientos que producen conidios en arreglo botrioso. Los conidios son unicelulares normalmente, globosos, ovalados o elipsoides con paredes lisas (Cepero *et al*, 2012).

En esta guía se describe el procedimiento para realizar una observación microscópica e identificación de *Botrytis cinerea* en frutos de cultivos de fresa.

## 6.4. MARCO TEÓRICO

El género *Botrytis* comprende especies patógenas necrógrafas de plantas. La especie *Botrytis cinerea* tiene un rango amplio de hospederos, afecta frutos en postcosecha y plantas ornamentales, puede sobrevivir en el suelo dado que produce esclerocios.

En fitopatología, es esencial la identificación del agente causante de la enfermedad para encontrar tratamientos adecuados. La identificación de hongos se lleva a cabo a partir de la descripción de sus características macroscópicas y microscópicas.

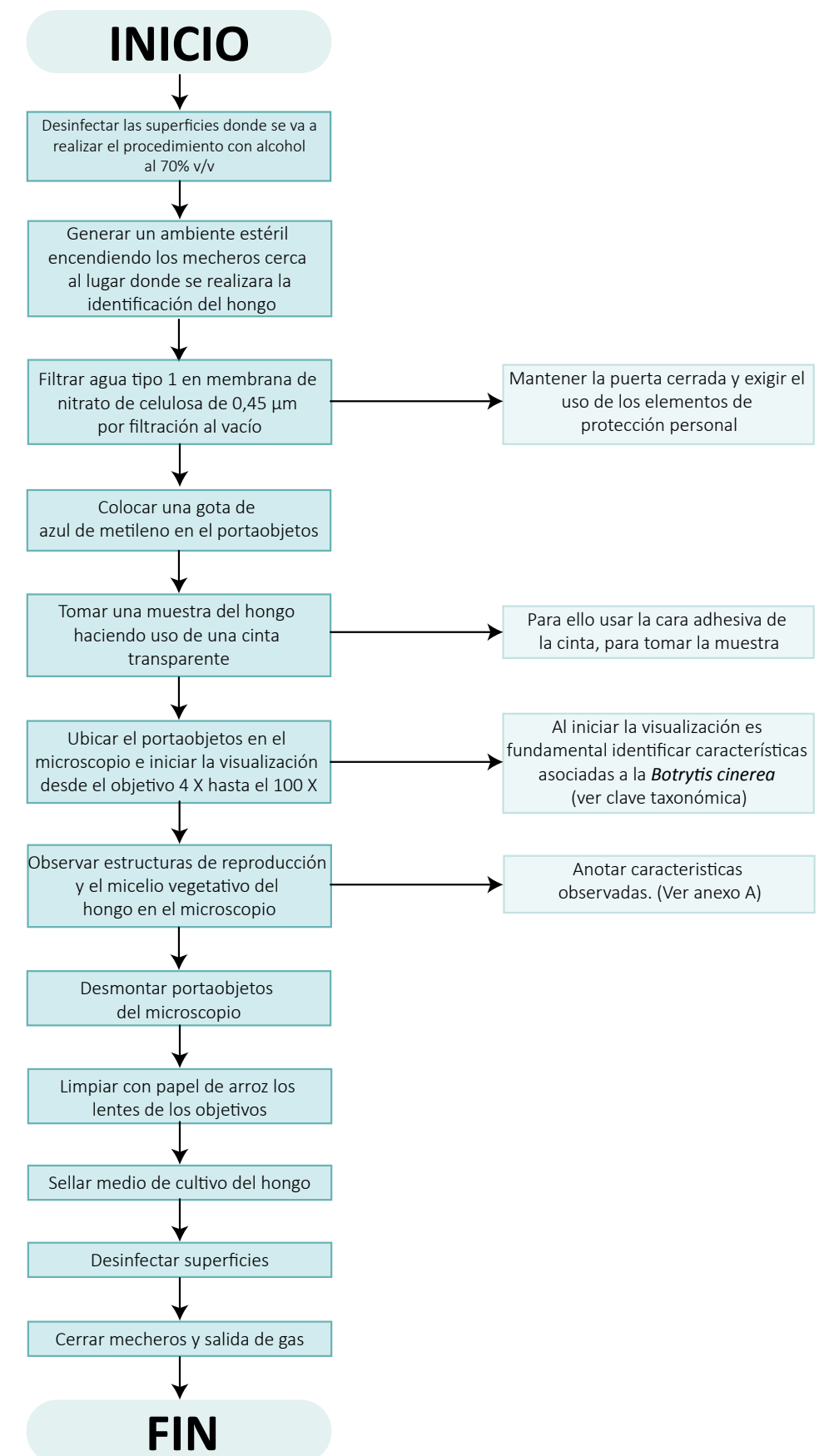
**Ciclo de infección.** Las esporas de *B. cinerea* pueden ser producidas sobre cualquier material vegetal y transportadas grandes distancias por corrientes de aire. Una vez que la spora ha alcanzado la superficie del huésped se inicia el ciclo de infección que, para facilitar su descripción y estudio, puede considerarse dividido en varias fases:

## 6.5. MATERIALES Y/O REACTIVOS

Tabla 7. Materiales o reactivos

Materiales	Reactivos
Asa microbiológica Láminas Cubreobjetos Microscopio Cinta adhesiva Mechero	Azul de lactofenol Agua destilada
Elementos de protección personal	
Bata Gafas de seguridad Guantes de nitrilo Tapabocas Zapato de tipo cerrado	

## 6.6. PROCEDIMIENTO



### 6.6.1. Clave Taxonómica

1. Micelio regularmente aceptado. Conidios presentes en conidiomas o conidióforos que nacen directamente del micelio.
2. Conidios no originados en pignidios, pero si en conidióforos, esporodoquios, sinemas o directamente de la hifa.
3. Conidios no originados en sucesión basípeta, pero si, acrópeta; o por fragmentación de hifas fértiles o solitario o botriosos.
4. Colonias no anaranjadas que no cubren la caja de Petri en pocos días.
5. Conidios tanto árticos como blásticos o solamente blásticos.
6. Conidios no formados en cuartetos por división de una hifa fértil cilíndrica.
7. Estructuras conidio génicas consistentes, solo conidios blásticos.
8. Conidios blásticos originados simultáneamente en hifas o de células hinchadas o en ramificaciones (todos del mismo tamaño).
9. Conidios originados en arreglo botrioso sobre dentículos, en células conidio génicas hinchadas terminalmente. Conidióforos erectos apicalmente ramificados (como árbol). Colonias pardo-grisáceas, algodonosas.

## 6.7. RECOMENDACIONES

- Se puede tomar una parte del cultivo para observación microscópica con una cinta adherente en lugar de usar el asa microbiológica con el fin de conservar intactas las estructuras que se deben observar.
- Desinfectar todo el material que se requiere usar para la identificación del hongo con alcohol al 70% v/v. Para el caso de las asas es necesario flamearlas hasta presente una coloración roja y dejar enfriar a temperatura ambiente cerca al mechero.
- Todo el material de vidrio usado para el desarrollo de la práctica debe estar previamente estéril.
- Para la visualización del hongo en un objetivo a 100X se debe agregar una gota del aceite de inmersión al portaobjetos.

## 6.8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cepero, M, Restrepo, S, Franco, A, Cárdenas, M & N. Vargas. (2012). Biología de Hongos. Universidad de Los Andes. Bogotá, Colombia.


Castaño, V. T., & Gutiérrez, L. F. (s.f.). Universidad de Antioquía. Obtenido de <https://udearroba.udea.edu.co/internos/mod/glossary/view.php?id=279820>

Ernesto P. Benito, M. A. (2017). Factores de patogenicidad de Botrytis Cinerea. Revista Iberoam Mico.

González, V. (8 de Abril de 2013). Biología.laguia. Obtenido de <https://biologia.laguia2000.com/hongos/los-hongos-ascomicetos#:~:text=Los%20ascomicetos%20son%20el%20grupo,el%20caso%20de%20las%20trufas>.

## 6.9. ANEXOS

### Anexo H.

	Encargado				
	Cód.	RE-IBC			
	Versión	1			
	Actualización	1			
Fecha	Características macroscópicas	Imagen	Tipo de objetivo	Características microscópicas	Imagen



[Archivo de descarga](#)





