



Evaluación de la actividad antifúngica de los aceites esenciales de *Clinopodium tomentosum* (Kunth) Govaerts., *Tagetes minuta* L., y *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb., para el control *in vitro* de *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum*.

Aguirre Carvajal, Kevin Emilio

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del Título de Ingeniero en Biotecnología

Proaño Tuma, Karina Isabel Ph. D.

15 de septiembre del 2020



Document Information

Analyzed document	Kevin Aguirre Tesi v11 (firmas) FORMATO ESPE.docx (D79136644)
Submitted	9/15/2020 2:33:00 AM
Submitted by	PROAÑO TUMA KARINA ISABEL
Submitter email	kiproanio@espe.edu.ec
Similarity	2%
Analysis address	kiproanio.espe@analysis.orkund.com

Sources included in the report

SA	TESIS.docx Document TESIS.docx (D33815116)	1
SA	Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / Tesis_Alexis_Guerrero.docx Document Tesis_Alexis_Guerrero.docx (D45703108) Submitted by: kiproanio@espe.edu.ec Receiver: kiproanio.espe@analysis.orkund.com	10
W	URL: https://agritrop.cirad.fr/563764/1/document_563764.pdf Fetched: 9/15/2020 2:34:00 AM	3
SA	T-UCE-0015-256 tesis ivan aigje.pdf Document T-UCE-0015-256 tesis ivan aigje.pdf (D24308675)	2
W	URL: https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/18259/T-1938.pdf?sequence=1 ... Fetched: 2/26/2020 7:15:16 PM	2
SA	Tesis de Leonard Huanca C..docx Document Tesis de Leonard Huanca C..docx (D62149313)	2
W	URL: https://worldwidescience.org/topicpages/m/metabolitos+esenciales+cbtenidos.html Fetched: 3/3/2020 12:16:34 AM	4
W	URL: https://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1006/732/1/Aguilar-Gast%C ... Fetched: 9/15/2020 2:34:00 AM	1
W	URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7357376/ Fetched: 9/15/2020 2:34:00 AM	1
W	URL: https://repositorio.unbosque.edu.co/bitstream/handle/20.500.12495/2570/%C3%81vila_ ... Fetched: 7/27/2020 11:33:25 PM	1

Firma:



Firmado electrónicamente por:
KARINA
ISABEL

.....
Proaño Tuma, Karina Isabel Ph. D.

DIRECTOR



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGIA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “**Evaluación de la actividad antifúngica de los aceites esenciales de *Clinopodium tomentosum* (Kunth) Govaerts., *Tagetes minuta* L., y *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb., para el control *in vitro* de *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum*” fue realizado por el señor **Aguirre Carvajal, Kevin Emilio** el mismo que ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido, por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.**

Sangolquí, 15 de septiembre del 2020

Firma:



Firmado electrónicamente por:

**KARINA
ISABEL**

.....
Proaño Tuma, Karina Isabel Ph. D.

C.C. 1707245104



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGIA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Aguirre Carvajal, Kevin Emilio**, con cédula de ciudadanía n° 1717398869, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Evaluación de la actividad antifúngica de los aceites esenciales de *Clinopodium tomentosum* (Kunth) Govaerts., *Tagetes minuta* L., y *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb., para el control *in vitro* de *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum*”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 15 de septiembre del 2020

Firma:

A handwritten signature in blue ink is written over a horizontal dotted line. The signature appears to be 'Kevin Emilio Aguirre Carvajal'.

Aguirre Carvajal, Kevin Emilio

C.C. 1717398869



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGIA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo, **Aguirre Carvajal, Kevin Emilio**, con cédula de ciudadanía n° 1717398869, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Evaluación de la actividad antifúngica de los aceites esenciales de *Clinopodium tomentosum* (Kunth) Govaerts., *Tagetes minuta* L., y *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb., para el control *in vitro* de *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum*”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 15 de septiembre del 2020

Firma:

A handwritten signature in blue ink, which appears to read 'Kevin Aguirre', is written over a horizontal dotted line.

Aguirre Carvajal, Kevin Emilio

C.C. 1717398869

Dedicatoria

A mi madre Katya,
por su apoyo, consejo
e infinito amor que me
ayuda a no parar de soñar.

A mi abuela Piedad
por todo su cariño incondicional,
paciencia y cuidado.

A mis tíos Diego y Alejandra,
por ser un pilar importante para
mantener mi equilibrio espiritual
y emocional.

Kevin Emilio Aguirre Carvajal

Agradecimientos

A mi familia, que ha mantenido un constante apoyo en todo mi desarrollo profesional y personal. Aportando sus experiencias para mi beneficio y apoyándome cuando he cometido mis errores.

A mi tutora Dra. Karina Proaño, por brindarme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo y por toda su disciplina, exigencia, paciencia y enseñanzas. A Gabriela Miño por todo su apoyo, amistad y consejos que han sido importantes para culminar este proyecto.

A los docentes, que cada uno de ellos ha aportado valiosas enseñanzas a lo largo de esta etapa académica que nunca olvidaré.

A mis colegas de laboratorio, Paul, Israel y Giuliette que con su amistad han hecho más ameno este capítulo final de nuestras vidas universitarias.

Kevin Emilio Aguirre Carvajal

Índice de contenidos

Carátula	1
Urkund	2
Certificación	3
Responsabilidad de autoría	4
Autorización de publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Índice de contenidos	8
Índice de tablas	12
Índice de figuras	13
Índice de ecuaciones	14
Listado de abreviaturas	15
Resumen	16
Abstract	17
Introducción	18
Formulación del Problema	18
Justificación del problema.....	20
Objetivos de la investigación	22
Objetivo General.....	22
Objetivos específicos.....	22
Marco Teórico	23
Hongos fitopatógenos.....	23
<i>Aspergillus niger</i>	23

<i>Fusarium oxysporum</i>	25
Aceites esenciales.....	27
Extracción de aceites esenciales.	32
Caracterización de aceites esenciales	35
Actividad antifúngica de los aceites esenciales.	37
Plantas con actividad antifúngica.....	39
<i>Clinopodium tomentosum</i> (Kunth) Govaerts... ..	43
<i>Tagetes minuta</i> L... ..	45
<i>Minthostachys mollis</i> (Kunth) Griseb.....	47
Hipótesis.....	49
Materiales y métodos	50
Participantes.....	50
Zona de estudio.....	50
Duración de la investigación	50
Metodología.....	50
Material biológico.....	51
Material vegetal.....	51
Material fúngico.....	51
Extracción de aceites esenciales	51
Detección de actividad antifúngica.....	52
Cultivos monospóricos.....	52

	10
Preparación de solución de esporas	53
Preparación de los aceites esenciales para evaluar el potencial antifúngico.	54
Técnica de difusión en disco de Kirby – Bauer.....	55
Conteo de esporas.....	57
Diseño Experimental	57
Ensayo de sensibilidad - Antibiograma.....	58
Ensayo de conteo de esporas.....	60
Análisis estadístico	61
Resultados	63
Ensayos <i>in vitro</i>	63
Identificación del potencial antifúngico de los aceites esenciales.....	63
Efecto de los aceites esenciales sobre el desarrollo de <i>Aspergillus niger</i> y <i>Fusarium oxysporum</i>	65
Respuesta de sensibilidad de <i>Aspergillus niger</i> a los aceites esenciales mediante antibiograma y conteo de esporas..	65
Respuesta de sensibilidad de <i>Fusarium oxysporum</i> a los aceites esenciales mediante antibiograma y conteo de esporas..	77
Discusión	89
Metabolitos secundarios que generan actividad antifúngica	90
Efecto de los aceites esenciales de <i>T. minuta</i> , <i>M. mollis</i> y <i>C. tomentosum</i> sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>A. niger</i> y <i>F. oxysporum</i>	93
Conclusiones	97

Recomendaciones	99
Bibliografía	100
Anexos	119

Índice de tablas

Tabla 2.1 Concentración de las soluciones utilizadas en el ensayo de selección de aceites esenciales	54
Tabla 2.2 Concentración de las soluciones utilizadas en el ensayo de sensibilidad de aceites esenciales	55
Tabla 2.3 Escala de Duraffourd	56
Tabla 2.4 Tratamientos utilizados para la evaluación de los halos del antibiograma de los aceites esenciales contra los hongos..	59
Tabla 2.5 Factores y variables para el análisis estadístico del ensayo de la técnica de Kirby – Bauer.....	60
Tabla 2.6 Factores y niveles para el análisis estadístico del ensayo de conteo de esporas	61
Tabla 3.1 Medias de diámetros de los halos de inhibición [mm] en <i>Aspergillus niger</i>	68
Tabla 3.2 Concentraciones óptimas para inhibir el crecimiento de <i>Aspergillus niger</i>	72
Tabla 3.3 Porcentajes (%) de inhibición de germinación de esporas en cultivos de <i>Aspergillus niger</i>	73
Tabla 3.4 Estimación de Porcentajes de inhibición de esporas a concentraciones óptimas para inhibir el crecimiento de <i>Aspergillus niger</i>	76
Tabla 3.5 Medias de diámetros de los halos de inhibición [mm] en <i>Fusarium oxysporum</i>	79
Tabla 3.6 Concentraciones óptimas para inhibir el crecimiento <i>Fusarium oxysporum</i>	82
Tabla 3.7 Porcentajes (%) de inhibición de germinación de esporas de <i>Fusarium oxysporum</i>	83
Tabla 3.8 Estimación de Porcentajes de inhibición de esporas a concentraciones óptimas para inhibir el crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i>	87

Índice de figuras

Figura 1.1 Metabolitos secundarios terpenoides con actividad antifúngica	41
Figura 1.2 <i>Clinopodium tomentosum</i>	44
Figura 1.3 <i>Tagetes minuta</i>	46
Figura 1.4 <i>Minthostachys mollis</i>	48
Figura 3.1 Ensayo de selección de aceites esenciales con actividad antifúngica	64
Figura 3.2 Antibiograma en cultivos de <i>Aspergillus niger</i>	66
Figura 3.3 Efecto inhibitorio de los aceites esenciales en <i>Aspergillus niger</i>	69
Figura 3.4 Efecto inhibitorio de los aceites esenciales en la germinación de esporas de <i>Aspergillus niger</i>	74
Figura 3.5 Antibiogramas en cultivos de <i>Fusarium oxysporum</i>	77
Figura 3.6 Efecto inhibitorio de los aceites esenciales en <i>Fusarium oxysporum</i>	80
Figura 3.7 Efecto inhibitorio de los aceites esenciales en la germinación de esporas de <i>Fusarium oxysporum</i>	85

Índice de ecuaciones

Ecuación 2.1: Cálculo concentración de esporas.....	53
Ecuación 2.2: Ajuste de concentración de esporas.....	53
Ecuación 2.3: Porcentaje de inhibición de esporas.....	57
Ecuación 3.1: Formación de halos por <i>T. minuta</i> en <i>A. niger</i>	71
Ecuación 3.2: Formación de halos por <i>M. mollis</i> en <i>A. niger</i>	71
Ecuación 3.3: Formación de halos por <i>C. tomentosum</i> en <i>A. niger</i>	71
Ecuación 3.4: Inhibición de esporulación por <i>T. minuta</i> en <i>A. niger</i>	75
Ecuación 3.5: Inhibición de esporulación por <i>M. mollis</i> en <i>A. niger</i>	75
Ecuación 3.6: Inhibición de esporulación por <i>C. tomentosum</i> en <i>A. niger</i>	75
Ecuación 3.7: Formación de halos por <i>M. mollis</i> en <i>F. oxysporum</i>	82
Ecuación 3.8: Formación de halos por <i>C. tomentosum</i> en <i>F. oxysporum</i>	82
Ecuación 3.9: Inhibición de esporulación por <i>T. minuta</i> en <i>F. oxysporum</i>	86
Ecuación 3.10: Inhibición de esporulación por <i>M. mollis</i> en <i>F. oxysporum</i>	86
Ecuación 3.11: Inhibición de esporulación por <i>C. tomentosum</i> en <i>F. oxysporum</i>	86

Listado de abreviaturas

ANOVA	Análisis de varianza
CO₂	Anhídrido carbónico
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
g	Gramo
°C	Grado centígrado
μL	Microlitro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
PDA	Papa dextrosa agar
sp.	Especie
spp.	Especies

Resumen

A. niger y *F. oxysporum* son hongos fitopatógenos que causan grandes pérdidas en plantaciones de tomate, naranja, plátano, maíz, entre otros. Además, *A. niger* produce micotoxinas que inducen a problemas inmunológicos y hormonales en la salud humana. Para el control de estas plagas se han implementado fungicidas sintéticos, sin embargo se ha evidenciado que generan resistencia y son tóxicos en humanos. Por este motivo, en búsqueda de alternativas a los agroquímicos se realizó un estudio cuyo propósito fue evaluar la actividad antifúngica de los aceites esenciales de *M. mollis*, *C. tomentosum* y *T. minuta* para el control *in vitro* de estos hongos. La evaluación se realizó mediante antibiogramas con los aceites a las concentraciones del 1, 5, 10 y 25 %. En los ensayos se midió el halo y el porcentaje de inhibición de la germinación de esporas. De los resultados obtenidos se evidenció fuertes inhibiciones del crecimiento micelial y reducción de la esporulación en ambos hongos por efecto los aceites esenciales de *M. mollis* y *C. tomentosum* a las concentraciones del 25 %. Además, se observó que en el caso de *M. mollis* se requiere de menor cantidad de aceite para generar sensibilidad, por lo que después de la optimización se estima que se necesitaría de al menos una concentración del 7,33 y 4,41 % para inhibir a *F. oxysporum* y *A. niger* respectivamente. Los resultados sugieren que el aceite esencial de *M. mollis* posiblemente es una buena alternativa para el control de estos hongos fitopatógenos.

- Palabras clave

- **ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA**
- **ACEITE ESENCIAL**
- **INHIBICIÓN**
- **ANTIBIOGRAMA**

Abstract

A. niger and *F. oxysporum* are phytopathogenic fungi that cause large losses in tomato, orange, banana and corn plantations, among others. In addition, *A. niger* produces mycotoxins that induce immunological and hormonal problems in human health. Synthetic fungicides have been implemented to control these pests, however it has been shown that they generate resistance and are toxic in humans. For this reason, in search of alternatives to agrochemicals, a study was carried out to evaluate the antifungal activity of the essential oils of *M. mollis*, *C. tomentosum* and *T. minuta* for the in vitro control of these fungi. The evaluation was carried out by antibiograms with the oils at concentrations of 1, 5, 10 and 25 %. The halo and the percentage of spore germination inhibition were measured in the tests. The results obtained showed strong inhibition of mycelial growth and reduction of sporulation in both fungi due to the effect of the essential oils of *M. mollis* and *C. tomentosum* at concentrations of 25 %. In addition, it was observed that in the case of *M. mollis* less oil is required to generate sensitivity, so after optimization it is estimated that at least a concentration of 7.33 and 4.41 % would be needed to inhibit *F. oxysporum* and *A. niger* respectively. The results suggest that the essential oil of *M. mollis* is possibly a good alternative for the control of these phytopathogenic fungi.

- Keywords

- **ANTIFUNGAL ACTIVITY**
- **ESSENTIAL OIL**
- **INHIBITION**
- **ANTIBIOGRAM**

Introducción

Formulación del Problema

A nivel de Latinoamérica se han reportado pérdidas en la producción de cultivos y semillas de importancia económica debido al ataque de hongos fitopatógenos como *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum* (Martínez & Hernández, 2013; Arrua, 2013; Vásquez & Castaño, 2017).

Aspergillus niger es un hongo saprófito, filamentoso, oportunista y productor de micotoxinas, que afecta a cultivos de jitomate, cítricos y maíz almacenado (Klich, 2002; Carvajal, Berumen, & Guardado, 2012). Además, puede contaminar lácteos y comida en almacenamiento de perros, gatos y ganado (Sharma & Márquez, 2001; Arrua, 2013; Martínez & Hernández, 2013). La contaminación del hongo está principalmente asociada a las condiciones de almacenamiento que a las de cultivo (Bucio, Guzmán, & Peña, 2001). Estudios en México, Colombia y Ecuador han reportado pérdidas de reservas de maíz de entre 30 al 100% de la producción (Torres & Acuña, 1995; Acuña & Díaz, 2005; Fon, Barzola, & Morán, 2016), mientras que en la producción de leche se ha observado pérdidas de hasta el 80% (Sharma & Márquez, 2001; Reyes, y otros, 2008).

Fusarium oxysporum es un hongo saprófito con gran potencial evolutivo (Garcés, 2001; Jiménez, Jiménez, & Navas, 2005), este tiene una amplia gama de hospederos como plátano, manzano, uva, uvilla, babaco, jitomate y algunas especies de Heliconias (Pullupaxi, 2016; Arellano, 2018; Guerrón, 2019). Existen reportes de plantaciones de plátano en Panamá y Asia con pérdidas de entre 2 y 75 millones de dólares respectivamente por causa de *Fusarium* (Lara, 2009; SAGARPA, 2018). En Colombia se reportaron pérdidas del 21 al 47 % de los cultivo de jitomate (Vásquez &

Castaño, 2017). En Ecuador existen reportes de pérdidas del 100 % de plantaciones de babaco (Ochoa & Fonseca, 2000), lo que muestra un amplio rango de hospederos.

En el área fitosanitaria se ha optado por generar nuevas alternativas en contra de estos hongos fitopatógenos. La opción más prometedora es el control biológico que puede ser mediante el uso de microorganismos antagonistas o de metabolitos secundarios (SAGARPA, 2018).

Algunos estudios de sensibilidad realizados con distintos agroquímicos han demostrado cierta resistencia de los hongos a los compuestos utilizados en el agro. *Aspergillus niger* a thiabendazol, anfotericina B e itraconazol (Maldonado, Santa, & Navarro, 2005; San Juan, Fernández, & Almague, 2017) y *Fusarium oxysporum* a benomyl y metil-tiofanato (Thanassoulopoulos, Giannopolitis, & Kitso, 1971; Petkar, Langston, Buck, Stevenson, & Ji, 2016).

En algunos estudios de control biológico se ha empleado con éxito mezclas de *Entrophospora colombiana*, *Trichoderma* sp. y *Pseudomonas fluorescens* para el control de *Fusarium oxysporum* (Avendaño, Arbeláez, & Rondón, 2006). Para el control de *Aspegillus* se ha implementado exitosamente bacterias del género *Bacillus*, *Niocardia corynebacteroides* y *Candida parapsilosis* (Moyne, Shelby, Cleveland, & Tuzun, 2001; Tejada, Ávila, & Casaubón, 2008). Sin embargo, las limitaciones de estas alternativas son que los antagonistas deben poseer una genética estable y deben ser funcionales a bajas concentraciones. Además, es un problema el no aplicar de manera consiente el producto ya que puede generar un desbalance en el ecosistema (Van Driesche, Hoddle, & Center, 2007).

Por otro lado, el uso de metabolitos secundarios ha ganado fuerza en los últimos años. Se ha demostrado el éxito del uso de aceites esenciales de diversas especies de

plantas para el control de plagas. Se ha descrito el uso de especies de *Tagetes* para controlar el crecimiento de fitopatógenos como *Fusarium oxysporum* y *Aspergillus niger* al evidenciar la inhibición de crecimiento micelial (López, Peña, & Beryl, 2018). Otros estudios corroboran la actividad antifúngica de aceites esenciales como es el caso de *Minthostachys mollis* que demostró una amplia capacidad antifúngica frente a *Trichophyton tonsurans*, *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida albicans* y *Botrytis cinerea* con una concentración mínima inhibitoria de aceite esencial al 5 % y una concentración de 20 % contra *Fusarium* spp (Cano, Bonilla, Roque, & Ruiz, 2008; Bustamante, 2018; Quispe, 2017).

Justificación del problema

La infección de hongos como *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum* ha generado graves pérdidas en cultivos de babaco, tomate, maíz, entre otros. Las pérdidas han afectado desde el 20 hasta 100 % de la producción (Fon, Barzola, & Morán, 2016; Herrera, 2016; Vásquez & Castaño, 2017). *Aspergillus niger* inclusive afecta directamente al ser humano debido a que produce micotoxinas muy resistentes, que pueden provocar desbalances hormonales, inmunosupresión, efectos mutagénicos y cancerígenos en pulmón e hígado (Liu & Wu, 2010; Carvajal, Berumen, & Guardado, 2012).

En la actualidad para combatir los efectos negativos de estos hongos se utilizan fungicidas de las familias de benzimidazol, dicarboximidas y fenilpirroles, sin embargo se han detectado efectos adversos medioambientales (Thanassouloupoulos, Giannopolitis, & Kitso, 1971; Iacomi & Avenot, 2004). Las moléculas con hidrocarburos aromáticos, heterociclos y compuestos halogenados que presentan estos fungicidas (Shaharyar, 2017; National Center for Biotechnology Information, 2019; Terralia, 2019), repercuten en problemas de contaminación de suelos y aguas subterráneas, lo que

implica una inversión extra para descontaminación y tratamiento de estos componentes (Loera, Pérez, & López, 2016).

Por otro lado, existen efectos tóxicos para la salud humana. Diferentes investigaciones concluyen que varios de los componentes de los fungicidas como el benomyl están asociados a cáncer cutáneo, que el vinclozolin y fludioxonil están vinculados al cáncer de mama y problemas de fertilidad masculina (Kelce, 1994; Scaglia & Chichizola, 2009; Rocha, 2014; Go & Kim, 2017). Las evidencias presentadas muestran la importancia de encontrar alternativas que permitan proteger la producción, el medio ambiente y la salud humana.

Una posible alternativa a los fungicidas es el uso de aceites esenciales, que son una mezcla hidrófoba de compuestos volátiles, constituida principalmente por monoterpenos y sesquiterpenos. Estos compuestos son producidos naturalmente por las plantas y cuentan con una amplia actividad biológica, entre ellas la antifúngica (Tisserand R, 2013). Según varias investigaciones realizadas en plantas han demostrado que *Tagetes minuta* L., y *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb., tienen un gran potencial para contrarrestar el crecimiento de una amplia variedad de hongos (Cano, Bonilla, Roque, & Ruiz, 2008; López, Peña, & Beryl, 2018). Existen otras especies en las que la caracterización química de su aceite esencial muestra la presencia de compuestos fenólicos de bajo peso molecular y monoterpenos, lo que sugiere una posible capacidad antifúngica como es el caso de *Clinopodium tomentosum* (Kunth) Govaerts (Belmont, 2009; Vera Saltos, 2014). Razón por la cual, la presente investigación pretende describir posibles alternativas para el control de hongos fitopatógenos mediante el uso de aceites esenciales.

Objetivos de la investigación

Objetivo General

Evaluar la actividad antifúngica de los aceites esenciales de *Clinopodium tomentosum* (Kunth) Govaerts, *Tagetes minuta* L., y *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb., para el control *in vitro* de *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum*.

Objetivos específicos

- Seleccionar los aceites esenciales con capacidad antifúngica del banco de extractos del laboratorio de biotecnología vegetal.
- Establecer la concentración óptima de inhibición fúngica de los aceites esenciales para ensayos de difusión en disco.
- Determinar el efecto de inhibición fúngica de los aceites esenciales mediante el conteo de esporas y antibiograma.
- Identificar los metabolitos secundarios que otorgan potencial antifúngico a los aceites esenciales evaluados.

Marco Teórico

Hongos fitopatógenos

Aspergillus niger. Es un hongo oportunista, saprófito, filamentoso, ubicuo y productor de micotoxinas, presente a nivel mundial (Klich, 2002; Carvajal, Berumen, & Guardado, 2012; GEFOR, 2017). Este hongo pertenece al phylum Ascomycota, orden Eurotiales y a la familia Aspergillaceae (NCBI:txid5061, 2020). Este es un hongo que no posee estructuras sexuales, es decir que para su reproducción no interviene la fusión de células haploides. La manera de reproducirse es de forma asexual utilizando su conidio (De García & Caridad, 2012; Krijgsheld & Bleichrodt, 2013).

Aspergillus niger infecta principalmente a frutos, cereales y semillas oleaginosas. Entre algunos ejemplos se encuentran el jitomate, los cítricos y el maíz almacenado, provocando el desarrollo de moho negro y por ende putrefacción de cultivos en campo y almacenamiento (PROCIANDINO, 1993; Arrua, 2013). Las esporas presentes en los cultivos infectados afectan la salud humana con cuadros de inmunosupresión, causando enfermedades como la otomicosis y aspergilioma bronquial (García, García, Domínguez, & Noval, 2001; Ruiz, 2018). Este hongo además produce aflatoxinas y ocratoxinas que pueden estar presentes en productos para el consumo humano, como carnes, lácteos y huevos. (Sharma & Márquez, 2001; Martínez & Hernández, 2013). Las toxinas que produce este hongo están asociadas a desbalances hormonales, inmunosupresión, efectos mutagénicos y cancerígenos en pulmón, hígado y riñones (Liu & Wu, 2010; Carvajal, Berumen, & Guardado, 2012).

Características morfológicas. El micelio de *Aspergillus niger* tiene una textura aterciopelada de un color blanco tanto en la parte frontal como reversa, aunque con el tiempo debido a la esporulación se vuelve de color negro y su entorno se vuelve arenoso (Sun, Lu, & Zeng, 2007; GEFOR, 2017).

El conidióforo es hialino, de pared gruesa, tiene forma de vesícula, es liso y está cubierto por fialides basipetas. La longitud de esta estructura está entre 1 y 3 mm. El conidio es ovoide, rugoso, de color negro y de 2-3 μm de diámetro (Sun, Lu, & Zeng, 2007).

Mecanismos de infección. La manera de infectar *Aspergillus* es simple pero altamente eficaz, es suficiente que esté presente una espora y que la planta tenga una herida provocada por un insecto para que inicie la infección. El conidio germina en el tejido vegetal, utilizándolo como sustrato para obtener sus nutrientes, provocando necrosis en el área afectada. El micelio se desarrolla liberando esporas que afectan otras áreas de la planta, pudiendo observarse un moho negro (Arrua, 2013).

El proceso infeccioso en humanos inmunodeprimidos inicia cuando la espora, debido al tamaño, es capaz de atravesar los cilios de la mucosa del epitelio respiratorio para llegar a los alveolos pulmonares donde se acumulan provocando síntomas como alergias, rinitis y asma. Cuando estas esporas germinan el hongo empieza a crecer generando una masa que provoca un paro respiratorio y la muerte. El único tratamiento para eliminar el aspergilioma es mediante una intervención quirúrgica inmediata (Vidal & Carratalá, 2011).

Aspergillus también puede colonizar el oído externo provocando un cuadro fúngico de otitis, conocido como otomicosis. Los síntomas que provoca son prurito,

dolor, descamación del epitelio y pérdida de audición debido al desarrollo de las hifas (García & Noval, 2001).

Las aflatoxinas que produce este hongo son muy peligrosas, ya que se ha evidenciado que tiene actividad genotóxica. Esta toxina es capaz de modificar el ADN, puesto que su estructura es compatible con los ácidos nucleicos y proteínas uniéndose a ellos mediante enlaces covalentes provocando diferentes mutaciones como el desarrollo de tumores en hígado y pulmones (Martínez & Hernández, 2013).

Fusarium oxysporum. Es un hongo filamentoso y saprófito con gran potencial evolutivo capaz de dar lugar a diferentes razas dependiendo del hospedero que logra infectar. Este hongo pertenece phylum Ascomycota, orden Hypocreales y a la familia Nectriaceae (Vásquez & Castaño, 2017; NCBI:txid5507, 2020)

Este hongo está presente en tierra, aire y agua utilizándolos para movilizarse y así llegar a varios hospederos. Obtiene su fuente de carbono por medio de la degradación de una fuente exógena de sustratos orgánicos, ya que tiene un metabolismo heterótrofo es común encontrarlo en tejidos en descomposición. Debido a que posee un mecanismo de infección muy eficaz tiene la capacidad de infectar varias especies (Garcés, 2001; Jiménez, Jiménez, & Navas, 2005).

La reproducción de *Fusarium oxysporum* puede ser sexual y asexual. La fase sexual consiste en que se combinan dos células haploides donadoras que forman la ascospora, la que desde su interior liberará ocho esporas para que germinen. Por otro lado, la fase asexual no ocurre por fusión de núcleos sino que utiliza los conidios, que se propagan en condiciones favorables para germinar (De García & Caridad, 2012).

Entre las especies que *Fusarium oxysporum* afecta se encuentran frutos como el plátano, el manzano, la uva, la uvilla, el babaco, el jitomate, entre otras (Lezcano, Martínez, & Alonso, 2012; Pullupaxi, 2016; Arellano, 2018; Guerrón, 2019).

Características morfológicas. El hongo puede presentar dos tipos de colonias, pionotal y micelial, que se caracterizan por tener poco y mucho micelio aéreo respectivamente. Tiene un micelio algodonoso, el lado frontal del hongo es de color blanco y en el centro y al reverso predominan los pigmentos púrpuras (Lezcano, Martínez, & Alonso, 2012).

El género *Fusarium* se caracteriza por presentar conidióforos de hifas hialinas con diámetro variable dispuestas en forma de coremium, con ramificaciones irregulares cortas y delgadas y fialides tubulares. Los conidios presentan dos tipos de fialosporas hialina que son los microconidios y las macroconidios (Estupiñán, 2007; Quispe, 2017).

Los microconidios son esporas que se forman alrededor de conidióforos, son de baja ramificación, simples y unicelulares. Tienen forma elipsoidal parcialmente curvada y su textura es lisa. Las dimensiones de esta estructura son de 1 a 16 μm de largo por 1 a 4,5 μm de ancho (Onán, 2013).

Los macroconidios como su nombre lo indica son esporas de mayor tamaño que los microconidios que se forman a partir de fialides. Es una estructura multicelular, multiseptada, en forma de media luna y con una pared delgada. Sus dimensiones son de 27 a 60 μm de largo por 3 a 5 μm de ancho (Estupiñán, 2007; Onán, 2013).

La clamidospora es la estructura más resistente del hongo, la que le permite sobrevivir en condiciones ambientales adversas. Esta espora se forma a partir de la combinación del contenido de las conidias con las hifas, es de forma redondeada y su

resistencia se debe a que posee doble pared en su estructura. Las dimensiones de la espora son 10 μm de ancho y de 5 a 15 μm de diámetro (Onán, 2013; Quispe, 2017).

Mecanismos de infección. Los factores ambientales que benefician al desarrollo del hongo son temperaturas entre 25-28 °C, un suelo ácido con pH 5 y baja humedad (González, Arias, & Peteira, 2012).

La manera en la que *F. oxysporum* coloniza a las plantas es por medio de una infección por raíz, proceso que dura alrededor de 24 horas. Empiezan a crecer las hifas en el ápice de la raíz y la corteza produciéndose la muerte de las células apicales velozmente. El patógeno logra atravesar la hipodermis llegando al xilema. En un periodo de 72 horas se puede observar que ha crecido micelio en la corteza de la raíz. Al sexto día los tejidos vasculares se encuentran totalmente invadidos, extendiéndose por raíz y tallo (González, Arias, & Peteira, 2012).

Los haces vasculares están atrofiados debido a la invasión del hongo, razón por la cual la planta ya no puede recibir nutrientes normalmente. La sintomatología observada son hojas amarillas, caída de hojas, obscurecimiento del tallo, marchitez y finalmente muerte de la planta (González, Arias, & Peteira, 2012; Pullupaxi, 2016).

Aceites esenciales

Los aceites esenciales son una mezcla de metabolitos secundarios sintetizados por las plantas a partir de moléculas residuales que se derivan de rutas primarias. Los metabolitos secundarios no intervienen en funciones fundamentales, de tal manera que su ausencia o escases no son mortales para la planta, pero si son de gran importancia para la supervivencia de las mismas (Sepulveda, 2004).

Los metabolitos secundarios son compuesto orgánicos específicos de una especie, con funciones protectoras contra depredadores herbívoros y agentes

microbianos. Estas sustancias dan el color y olor característico de las plantas, atraen insectos polinizadores y permiten la comunicación abiótica entre especies. La producción de metabolitos secundarios es inducida cuando la planta está bajo ataque de algún depredador o patógeno. La síntesis de estos compuestos orgánicos requiere de diferentes moléculas que son subproductos provenientes de diferentes rutas metabólicas (Taiz & Zeiger, 2006).

Las moléculas precursoras de los metabolitos secundarios son residuos de rutas como el ciclo de Krebs, la vía del shikimato o la glucólisis. Pueden tener una o varias rutas de síntesis, que varía según la especie. Los metabolitos se pueden sintetizar en un órgano de la planta y almacenarse en otro, esto ocurre debido a la movilización del metabolito por el xilema, floema y espacio apoplástico (Toro & Martínez, 2017).

La estructura básica de un metabolito secundario puede presentar diferentes modificaciones dentro de una especie o en varios órganos de la misma planta, permitiendo que exista variabilidad estructural del grupo del metabolito secundario. Todas estas estructuras pueden presentar diferentes modificaciones como hidroxilación, metilación, epoxidación, malonilación, esterificación y glucosilación. Esta característica otorga diferentes propiedades a los aceites esenciales de las plantas (Ocampo, Ríos, & Betancur, 2008).

Las plantas producen una inmensa variedad de metabolitos secundarios, existen más de 200.000 moléculas descritas. Los metabolitos tienen una amplia distribución en el reino vegetal y tienen funciones muy variadas. Por lo tanto, existen diferentes criterios para clasificarlos (Gómez, 2018).

Los metabolitos secundarios se pueden clasificar según su composición química en nitrogenados y no nitrogenados. Entre los metabolitos que contienen nitrógeno se

encuentran los alcaloides, aminoácidos no proteicos, aminos, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos. Entre los metabolitos que no contienen nitrógeno se encuentran los terpenoides, poliacetilenos, policétidos y fenilpropanoides (Sepulveda, 2004).

Adicionalmente, los metabolitos secundarios se los puede clasificar en tres grupos de acuerdo al origen biosintético: terpenos, compuestos fenólicos y alcaloides. Los terpenos, cuentan con más de 40.000 metabolitos secundarios y se derivan de una molécula de cinco carbonos denominada isopreno. Los compuestos fenólicos, se han descubierto más de 8000 metabolitos, parten de la vía del shikimato y forman estructuras aromáticas pero además pueden provenir del acetato y en su estructura se pueden incluir isoprenos. Los alcaloides, se han descrito más de 12.000 moléculas que contienen uno o más átomos de nitrógeno y se derivan principalmente de aminoácidos como los alcaloides verdaderos y protoalcaloides pero también vienen de otras vías biosintéticas en el caso de pseudoalcaloides y alcaloides imperfectos (Toro & Martínez, 2017; Gómez, 2018).

Los terpenos se forman por la unión de unidades isoprenoides que son biosintetizados por la ruta del ácido mevalónico y la vía del metileritrofosfato. La molécula precursora de los terpenos es el pirofosfato de isopentenil (IPP) y dimetilalilpirofosfato (DMAPP) uniéndose consecutivamente para formar los diferentes terpenoides (Marcano & Hasegawa, 2002). La clasificación de los terpenos depende del número de unidades de isopreno. Los terpenos más importantes son los hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos y tetraterpenos.

Los hemiterpenos son los terpenos más simples con una sola unidad de isopreno. Los monoterpenos y sesquiterpenos son componentes de los aceites esenciales y están formados a partir de dos y tres unidades de isopreno respectivamente, como mentona, pulegona y limoneno, estos últimos (actúan

principalmente como fitoalexinas). Los diterpenos se forman de cuatro isoprenos y se caracterizan porque en este grupo se encuentran las giberelinas (hormonas vegetales) y también algunas sustancias resinosas. Los triterpenos están formados por seis moléculas de isopreno que dan lugar a las saponinas y esteroides como son los brassinoesteroides. Finalmente, los tetraterpenos tienen ocho unidades de isopreno e incluyen a carotenos y carotenoides que son pigmentos importantes para la fotosíntesis (Marcano & Hasegawa, 2002; Taiz & Zeiger, 2006).

Los compuestos fenólicos se caracterizan por presentar un anillo aromático que llevan grupos hidroxilo libres o formando glicósidos con diferentes azúcares. La biosíntesis se da por la vía del ácido shikímico y del ácido malónico. Estos metabolitos secundarios están relacionados con la adaptabilidad de la planta, además de participar en la formación de la pared celular, otorgan características como olor, color y sabor a las flores., Cuentan con propiedades farmacológicas importantes como vasoconstrictores, antiinflamatorios, inhibidores de enzimas, antioxidantes y antibióticos. En este grupo de metabolitos secundarios se encuentran los lignanos, flavonoides y cumarinas (Gómez, 2018) entre otros.

Los lignanos son polímeros ampliamente distribuidos en el reino vegetal, son parte de los fitoestrógenos que actúan como antioxidantes y están involucrados en la defensa contra agentes infecciosos (Marcano & Hasegawa, 2002).

Los flavonoides constituyen una enorme clase de metabolitos polifenólicos (flavonoides, isoflavonoides, neoflavonoides y antocianos), responsables de la coloración de flores y frutos que ayudan a atraer polinizadores y protegen la planta frente a las radiaciones UV (Gómez, 2018).

Las cumarinas son benzopiranoonas o ésteres cíclicos que también intervienen en los mecanismos de defensa de la planta contra radiaciones UV y patógenos. Además, se ha descrito que estos metabolitos tienen propiedades anticoagulantes que sirven para tratamientos contra la trombosis como la warfarina (Ocampo, Ríos, & Betancur, 2008).

Los alcaloides son moléculas cíclicas con un átomo de nitrógeno que se forman a partir de aminoácidos y en ocasiones se combinan con moléculas de terpenos. Los alcaloides con mayor actividad biológica provienen principalmente de la lisina, triptófano y fenilalanina. En general, las plantas producen una mezcla compleja de alcaloides que están localizados en los tejidos periféricos y pueden almacenarse en vacuolas específicas al nivel de los laticíferos. Estos metabolitos cuentan con un amplio uso farmacológico, puesto que producen efectos psicoactivos que son empleados para tratar problemas mentales. Además, cuentan con otras propiedades como antibióticos e insecticidas entre otras. El consumo de alcaloides provoca un elevado grado de dependencia, lo que representa un grave problema. Esto se debe a que estructuralmente son similares a algunos neurotransmisores como la dopamina provocando adicción en consumidores. Entre algunos ejemplos de alcaloides destacan: la nicotina que se obtiene del tabaco, utilizado como insecticida y relajante, la benzoilmetilecgonina que se obtiene de la hoja de la coca y actúa como un estimulante y la morfina que se obtiene de la planta del opio como potente analgésico (Cañigüeral & Vanaclocha, 2004).

Sin duda, las plantas son una gran fábrica de biomoléculas con diferentes estructuras químicas y distintas propiedades. Estas moléculas son biosintetizadas para proteger a las plantas cuando está sometida a estrés ambiental o abiótico y a estrés biótico (Benouali, 2016).

Por lo general el contenido de aceite esencial de las plantas es bajo, con rendimientos de extracción del 1 al 3 %, aunque existen algunas excepciones como el clavo de olor y nuez moscada con el 9 al 19 % de rendimiento. Sin embargo, tienen una gran actividad biológica a bajas concentraciones (López & Tránsito, 2004; Benouali, 2016).

Los aceites esenciales son muy utilizados en la industria farmacéutica, cosmecéutica y nutracéutica. En los últimos años se ha incrementado el requerimiento de productos naturales con el objetivo de disminuir los residuos tóxicos o sintéticos (Tisserand, 2007). Los aceites esenciales también son utilizados en la formulación de productos fitosanitarios para combatir infecciones fúngicas, bacterianas o virales en cultivos vegetales, contribuyendo a solucionar problemas de la agricultura ecológica al minimizar los efectos dañinos de los plaguicidas sintéticos como la contaminación o el desarrollo de resistencias (Ortuño, 2006; Giarratana, Muscolino, & Ziino, 2017).

Extracción de aceites esenciales. Para la obtención de aceites esenciales se pueden aplicar diferentes técnicas como extracción con solventes volátiles, mediante fluidos supercríticos y destilación por arrastre de vapor de agua (Martínez, 2003).

En la extracción con solventes volátiles se emplean compuestos orgánicos con polaridad similar. Este proceso se aplica en muestras vegetales molidas y secas, para solubilizar los aceites esenciales. A través de sucesivos lavados, el solvente logra concentrar las moléculas aromáticas. Para eliminar el solvente se aplica una destilación a baja presión. Entre algunos de los disolventes empleados están el éter de petróleo, el metanol, el etanol y el hexano. Las razones por las que no se suele aplicar esta técnica es que no se consigue obtener aceites esenciales puros, lo que representa un problema puesto que los disolventes empleados suelen ser tóxicos y costosos (Martínez, 2003).

La extracción con solventes se puede realizar mediante el método de maceración o enfleurage.

La maceración consiste en colocar la muestra vegetal con el solvente orgánico en un recipiente cerrado, de modo que la solución comience a disolver las moléculas aromáticas solubles. Esta extracción puede durar entre una y dos semanas. El proceso se puede acelerar mediante el calentamiento de la muestra con el disolvente para descomponer la pared celular y así liberar fácilmente los compuestos orgánicos de los tejidos vegetales. Finalmente, para obtener el aceite esencial el solvente es separado del extracto mediante destilación (Luna, 2009). En cambio, el enfleurage consiste en colocar pétalos de flores sobre una capa de grasa. Luego de unos días de contacto entre la grasa y los pétalos, se procede a prensar la mezcla que produce una sustancia oleosa muy aromática que se lava con alcohol. Cuando el alcohol se ha evaporado de la mezcla, queda un aceite esencial de excelente calidad (Ortuño, 2006).

La extracción con fluidos supercríticos es de las técnicas más recientes. El fluido supercrítico más empleado es el anhídrido carbónico (CO_2), ya que es un compuesto no inflamable, no corrosivo, no tóxico, incoloro y relativamente barato. El anhídrido carbónico (CO_2), se elimina fácilmente sin dejar residuos, lo que permite obtener productos con un alto grado de pureza. Además, el CO_2 alcanza el estado supercrítico fácilmente, por tanto se puede trabajar a bajas temperaturas previniendo la degradación térmica de los componentes orgánicos al ser extraídos (Gómez, 2018).

La ejecución de la extracción con fluidos supercríticos implica un proceso unitario que inicia con el gas a temperaturas frías y presurizadas, seguido de un aumento de temperatura y presión para alcanzar el estado supercrítico para poder mezclarse con la materia prima. Se obtiene una mezcla líquida, que es enviada a un separador donde por medio de diferencias de presión y temperatura se separa el

anhídrido carbónico como gas y se obtiene el aceite puro. Las ventajas de esta técnica radican en que el aceite extraído es de muy buena calidad, se obtiene grandes cantidades y el proceso es rápido. Sin embargo, se necesita de un equipo altamente especializado (Pantoja, 2017).

La extracción por arrastre de vapor de agua o también conocida como hidrodestilación es una técnica muy empleada debido a que permite obtener un aceite esencial sin impurezas, es fácil de aplicar y es un método económico. El mayor inconveniente de esta técnica es el tiempo de ejecución y el bajo rendimiento de extracción en contraste con otras técnicas como la extracción con fluidos supercríticos (López & Tránsito, 2004; Wichello, 2005).

La hidrodestilación es el método de extracción de aceites esenciales que se basa en la destilación heterogénea. Para aplicar esta técnica es importante tomar en cuenta que el compuesto volátil debe ser insoluble en el agua. Antes de iniciar la extracción se considera que la presión total del sistema es la suma de las presiones de vapor de cada sustancia, sin embargo la presión de vapor del aceite es tan baja que se la considera inexistente. La presión y temperatura se mantienen constantes en el sistema hasta que uno de los fluidos de la mezcla empieza a disminuir debido a la ebullición de la mezcla, momento en que la temperatura aumenta drásticamente. Por este motivo, es importante tener un sistema completamente hermético para lograr una buena cantidad del extracto vegetal (Luna, 2009).

La destilación por arrastre de vapor de agua consiste en aprovechar la volatilidad de los componentes del aceite. Se colocan trozos de muestra fresca en agua caliente que se lleva a ebullición a presión atmosférica. El calor libera las moléculas volátiles formando una mezcla azeotrópica con el vapor de agua. Esta mezcla pasa por un refrigerante donde se condensa formando dos fases inmiscibles, que debido a las

diferencias de densidad entre el hidrolato y el aceite, se decantan en la trampa Dean-Stark. Se puede implementar una bomba de vacío para reducir la presión del sistema y disminuir la temperatura de ebullición del solvente, con el objetivo de prevenir que los enlaces de las moléculas se rompan y mantener la integridad de los componentes de los aceites esenciales (López & Tránsito, 2004; Gómez, 2018).

El tiempo de extracción mediante la hidrodestilación depende del equipo utilizado y del material vegetal. Para disminuir los tiempos de procesamiento y aumentar la eficiencia de extracción se puede utilizar un microondas para calentar la muestra. A diferencia de los métodos de calentamiento por conducción, las ondas emitidas por el microondas son directamente absorbidas por las partes más ricas en agua de la planta. Este proceso provoca un aumento de temperatura y un incremento de la presión interna del material vegetal. El vapor rompe la pared celular para que las sustancias dentro de las células pueden fluir hacia fuera del tejido (Gómez, 2018).

Caracterización de aceites esenciales. Para la caracterización de los aceites esenciales se emplea la técnica de cromatografía, cuyo fundamento consiste en separar el aceite esencial en diferentes elementos para definir los metabolitos secundarios presentes y estudiarlos individualmente (Sgariglia & Soberón, 2010).

Esta técnica se realiza en un entorno con atmósfera saturada en la que se usan dos fases. La fase móvil sirve como eluyente, que va movilizando los diferentes componentes del aceite por la fase estacionaria. Los componentes son retenidos en la fase estacionaria de acuerdo a su polaridad, permitiendo la separación de los mismos (Sgariglia & Soberón, 2010; Mayolo & Martínez, 2012).

Se puede utilizar fluidos en estado líquido, gaseoso o supercrítico como fase móvil. Como fase estacionaria se pueden emplear sólidos o geles, que no presenten

problemas de miscibilidad con los elementos separados del analito. Según el tipo de fases que se utilizan, se generan diversas técnicas cromatográficas. Entre las técnicas más empleadas está la cromatografía de capa fina, cromatografía líquida de alta eficacia y la cromatografía de gases (Sgariglia & Soberón, 2010).

La cromatografía de capa fina (Thin Layer Chromatography, TLC) es la técnica más utilizada por su simplicidad y bajo costo de operatividad. Consiste en colocar pequeñas dosis del aceite esencial a una distancia determinada de la fase estacionaria, que suele ser una lámina de sílice o alúmina. La fase móvil que se utiliza para caracterizar aceites esenciales por lo general es tolueno:acetato de acetilo (93:7), que recorre la fase estacionaria por acción de capilaridad. Cada componente migra a una cierta altura característica de la sustancia, a la que se denomina migración diferencial. Al finalizar el proceso de acuerdo a las distancias recorridas por cada componente se puede medir el índice de retención (R_f) para identificar que metabolitos se encuentran en el aceite (Burzaco, 1992; Sgariglia & Soberón, 2010).

Es importante mencionar que existen otras técnicas que son variaciones de la técnica mencionada como la cromatografía de gases, alta eficiencia, exclusión, reparto, intercambio iónico, afinidad y bidimensional. Sin embargo, estas técnicas son menos utilizadas porque son más costosas y solo sirven para usos específicos cuando las características fisicoquímicas del analito son difíciles de controlar (Mayolo & Martínez, 2012).

Actividad antifúngica de los aceites esenciales. Los metabolitos secundarios son los que otorgan las diferentes propiedades a los aceites esenciales. Estos metabolitos ayudan a la supervivencia de la planta, actúan como repelente de fitopatógenos y herbívoros, atraen polinizadores, contribuyen a mantener niveles hídricos y producen efectos alelopáticos en su entorno (Martínez, 2003; López & Tránsito, 2004).

Entre las propiedades más importantes de los aceites esenciales se encuentra la actividad antifúngica que es una propiedad biológica de algunas sustancias que les permite inhibir el crecimiento de hongos, se detecta mediante ensayos de difusión, dilución o microdilución (García, 2006).

Los terpenoides son el principal grupo de metabolitos secundarios que otorga propiedades al aceite esencial para inhibir el desarrollo de patógenos. La inhibición se debe a dos razones. La primera es que son liposolubles permitiéndoles a los terpenos dañar la membrana del hongo y las enzimas presentes en su superficie. Sin embargo, dependiendo de la capacidad lipofílica e hidrolítica la potencia de inhibición puede variar o inclusive ser inexistente. La segunda razón es que algunos de estos metabolitos al tener contacto con el aire sufren cambios estructurales, lo que provoca la cristalización del mismo ayudando a la cicatrización de las heridas provocadas por agentes micóticos (Sepulveda, 2004; Quispe, 2017).

Para detectar la actividad antifúngica existen dos estrategias, por dilución y difusión. La técnica de dilución en agar consiste en disolver una concentración determinada del aceite en el medio de cultivo. Se puede emplear medio sólido donde se medirá el crecimiento del micelio del hongo o se puede utilizar medio líquido donde se miden absorbancias. La técnica de difusión consiste en aplicar al medio sólido un disco impregnado con la sustancia a estudiar. El disco libera gradualmente el aceite en el

medio de cultivo y se observan halos de inhibición si el hongo es sensible (Méndez, 2001).

Existen diferentes modificaciones a partir de estas técnicas. El E-test es una técnica que usa el principio de difusión, consiste en usar una tira marcada e impregnada con la sustancia antifúngica para identificar las concentraciones mínimas inhibitorias. La microdilución en cambio, es una adaptación de la técnica de dilución. En esta técnica se utiliza una placa tipo ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) en la que se colocan diferentes concentraciones del antifúngico con el patógeno en medio líquido permitiendo realizar varias mediciones de absorbancias y encontrar la concentración mínima inhibitoria. Estas técnicas son muy eficientes pero requieren de materiales especializados, lo que las vuelve costosas y poco accesibles (Méndez, 2001; Zapata & Cardona, 2012).

Generalmente en ensayos de actividad antifúngica se utiliza la técnica de difusión en disco de Kirby-Bauer. Esta técnica es mundialmente conocida como el antibiograma de disco, descrita por primera vez en el año 1966. Este antibiograma es ampliamente empleado en laboratorios debido a su rapidez y facilidad de aplicación. El propósito de esta prueba es establecer la resistencia o susceptibilidad de bacterias u hongos contra distintos compuestos. La prueba aporta información valiosa acerca del antibiótico o antifúngico que se puede seleccionar para iniciar un tratamiento (Bauer, Kirby, Sherris, & Turck, 1966).

Los principios físicos que describen la técnica de difusión en disco son la difusión y solubilidad. Al colocar el compuesto antimicrobiano en el agar, se absorbe agua en el disco de papel filtro y el reactivo empieza a difundirse en el agar. El movimiento del compuesto por el agar varía según sus propiedades de solubilidad y difusión. La velocidad con la que se mueve el reactivo por el agar es menor que la

velocidad a la que sale el compuesto del disco, provocando que la concentración de antimicrobiano se reduce a medida que aumenta la distancia desde el disco. Además, el peso molecular del reactivo también es importante, las moléculas más grandes se difundirán a una velocidad más lenta que los compuestos de menor peso molecular (Marcel, 2005).

Al usar esta técnica se debe tomar en cuenta factores que pueden influenciar en la reproducibilidad de la misma. Entre estos factores se encuentran: un inóculo con la concentración correcta del patógeno, cultivos que presentan mucha variabilidad genética, exceso de humedad o deshidratación del medio de cultivo (Bernal & Guzmán, 1984; Zapata & Cardona, 2012).

Existen entidades encargadas de estandarizar esta técnica como es el Instituto de Estandarización Clínicos y de Laboratorios (CLSI) y el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobianas (EUCAST). Estas organizaciones aseguran la comparabilidad de resultados para que estos sean reproducibles, como es el caso del método para detección de antifúngicos que consta en el documento M44-A (Pemán, 2007).

Plantas con actividad antifúngica

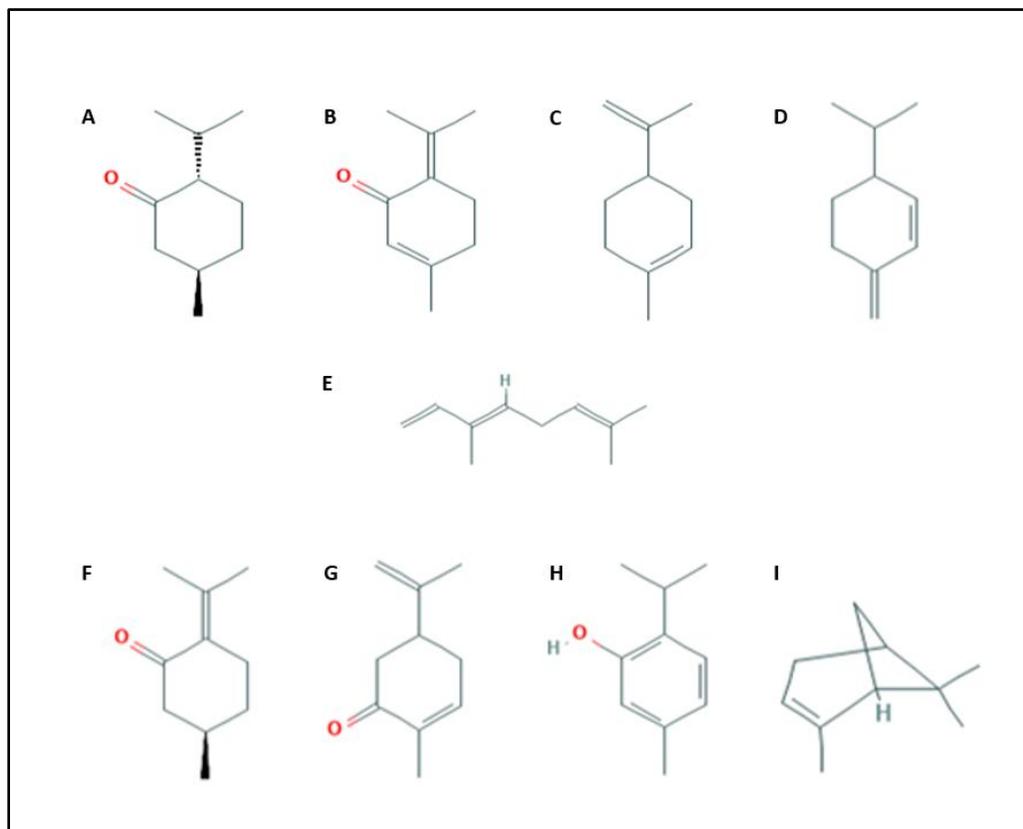
Las plantas sintetizan metabolitos secundarios a partir de moléculas residuales de las rutas primarias que son de gran importancia para la planta para sobrevivir bajo condiciones ambientales adversas (Toro & Martínez, 2017). Los aceites esenciales son metabolitos secundarios que pueden tener diferentes actividades contra los patógenos.

Las plantas con actividad antifúngica se caracterizan por tener aceites esenciales que contienen moléculas terpenoides con la capacidad de interferir en la fisiología de los patógenos. Estos metabolitos terpenoides son altamente liposolubles.

Esta característica permite a las moléculas interactuar con la membrana celular del hongo para desintegrarla. Adicionalmente, interfieren con enzimas vitales que participan en el crecimiento y división del hongo (Pellegrini, Alonso-Salces, Umpierrez, & Rossini, 2017). Estos metabolitos terpenoides presentan otras propiedades de interés agronómico, farmacológico e industriales. Entre los principales terpenos de plantas (Fig 1.1) en los que se ha evidenciado propiedades antifúngicas están: mentona, piperitenona, limoneno, β -felandreno, (Z)- β -ocimeno, pulegona, carvona, timol y α -pineno (Russo, 2011; Rajesh, 2014; Cussa, 2017; Quispe, 2017).

Figura 1.1

Metabolitos secundarios terpenoides con actividad antifúngica



Nota. Principales metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas. A) Mentona, B) Piperitenona, C) Limoneno, D) β-felandreno, E) (Z)-β-ocimeno, F) Pulegona, G) Carvona, H) Timol y I) α-pineno (PubChem, 2020).

La mentona (Fig 1.1 A) es un monoterpene monocíclico con propiedades antibacteriales y fungidas que tiene un estereoisómero conocido como isomentona. Este metabolito debido a sus características aromáticas es ampliamente utilizado en la industria de la perfumería (Sandborn, 1929; Zheng, Kenney, & Lam, 1992; Russo, 2011; Quispe, 2017).

La piperitenona (Fig 1.1 B) y β -felandreno (Fig 1.1 D) son terpenos monocíclicos presentes en plantas con la capacidad de inhibir el desarrollo de bacterias Gram-positiva, Gram-negativo y algunos hongos. Se han observado las mismas características en (Z)- β -ocimeno (Fig 1.1 E), que es un monoterpeneo alifático (López, 2008; Rajesh, 2014; Govindarajan & Benelli, 2016)

El limoneno (Fig 1.1 C) es un metabolito secundario de la familia de los terpenoides que debido a su inocuidad es utilizado en la industria alimenticia y farmacéutica como conservante y disolvente. Además esta molécula es empleada en el diseño de insecticidas y fungicidas (Francia Patente nº WO2004021787A1, 2003; Cussa, 2017). Otra aplicación descubierta en estudios recientes ha demostrado que el limoneno es capaz de promover la actividad de la glutatión S-transferasa, una enzima que se encarga de eliminar sustancias que el cuerpo no necesita y que podrían llegar a ser tóxicas (Zheng, Kenney, & Lam, 1992).

La pulegona (Fig 1.1 F), mejor conocido como pulegium poleo es un monoterpeneo, incoloro y de olor agradable. Este componente es tóxico contra plagas, parásitos, insectos y ratas. Si a esta molécula se la consume en cantidades elevadas puede provocar daños hepáticos y abortos. Debido a sus características aromáticas a esta molécula se la utiliza para la creación de perfumes (Aigaje, 2016; Quispe, 2017).

La carvona (Fig 1.1 G) es un compuesto orgánico terpenoide con dos enantiómeros, (R)-carvona y (S)-carvona. El metabolito (R)-carvona provoca efectos tóxicos contra parásitos y plagas, mientras que, (S)-carvona genera efectos supresores en la alimentación. Ambas moléculas también son utilizadas para el desarrollo de aromatizantes (Quispe, 2017; Merck, 2020; University of Hertfordshire, 2020). Además promueve la detoxificación xenobiótica, lo que indica que esta molécula tiene propiedades anticancerígenas (Zheng, Kenney, & Lam, 1992).

El timol (Fig 1.1 H) es un terpenoide que ha manifestado efectos, insecticidas, antimicrobianos y antifúngicos. El metabolito es muy utilizado en una disolución 5% en etanol para tratar infecciones de hongos. (Cano, Bonilla, Roque, & Ruiz, 2008; Quispe, 2017).

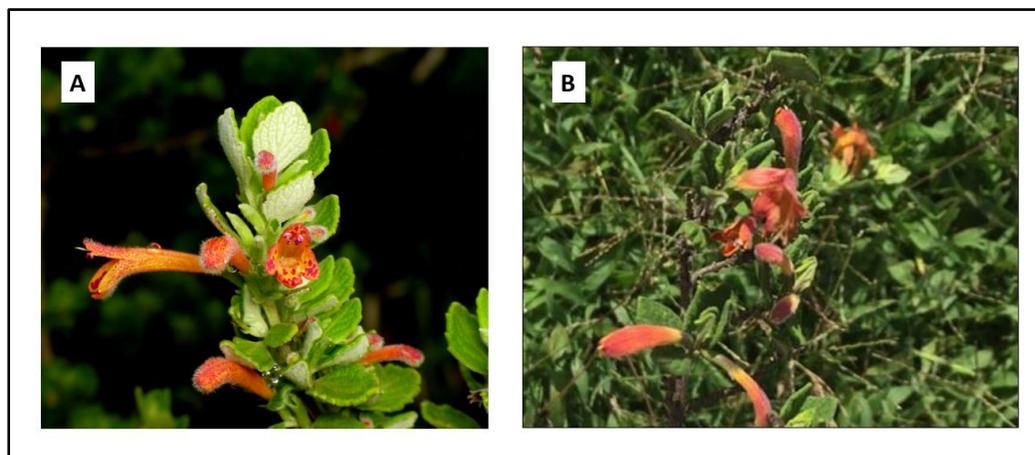
El metabolito α -pineno (Fig 1.1 I) es un terpeno con propiedades muy interesantes. Esta molécula, además de ser antimicrobiana y antifúngica, actúa como broncodilatador y antiinflamatorio. Esto se debe a que disminuye la actividad de la mieloperoxidasa que es un enzima productora de especies reactivas de oxígeno vinculada a cuadros inflamatorios, fibrosis pulmonar idiopática y enfermedad pulmonar obstructiva. Además esta molécula es capaz de inhibir la colinesterasa impidiendo la degradación de la acetil colina, lo que prolonga los tiempos de concentración y mejora la memoria. Inclusive actúa sobre los receptores GABBA ayudando a tratar problemas neurológicos como la epilepsia (Sierra & Vargas, 2006; Russo, 2011).

***Clinopodium tomentosum* (Kunth) Govaerts.** Esta es una especie endémica del Ecuador poco estudiada. Esta especie es conocida como “punin” o “santa maría”. Pertenece al phylum Streptophyta, orden Lamiales y a la familia Lamiaceae (Oña, 2015; NCBI:txid332438, 2020).

Esta planta es perenne y crece a 2500 m.s.n.m. Es una especie con tallo de tipo herbáceo y una altura de hasta 1 m. Las hojas son ovuladas con margen dentado y opuestas. La flor es hermafrodita, tubular y de color rojo anaranjado. El fruto es de tipo esquizocarpo con cuatro núcleos (Fig. 1.2) (Oña, 2015; Urquizo, 2017).

Figura 1.2

Clinopodium tomentosum



Nota. Fotografía de *Clinopodium tomentosum* (Kunth) Govaerts. A) Flor tubular (Romo, 2016). B) Planta completa (Aguirre, 2020).

En Asia esta planta ha sido utilizada por el pueblo palestino en forma de polvo para aplicarlo en heridas logrando evitar infecciones y hemorragias. En Latinoamérica *Clinopodium* ha sido empleada tradicionalmente para evitar dolores de estómago, flatulencias, como antigripal y relajante. En las zonas andinas del Ecuador *Clinopodium tomentosum* es utilizada como antiinflamatoria y antiséptica (Mohammed, Rana, & Salam, 2018; Moncayo, 2020).

El aceite esencial de *Clinopodium tomentosum* está constituido en un 97 % por monoterpenos. Las moléculas que predomina son la pulegona (30 %) e isomentona (40 %), en menor cantidad se encuentran: α -pineno, limoneno, mentona, timol y piperitona (Benzo, Gilardonia, & Gandini, 2007; Vera Saltos, 2014; Moncayo, 2020).

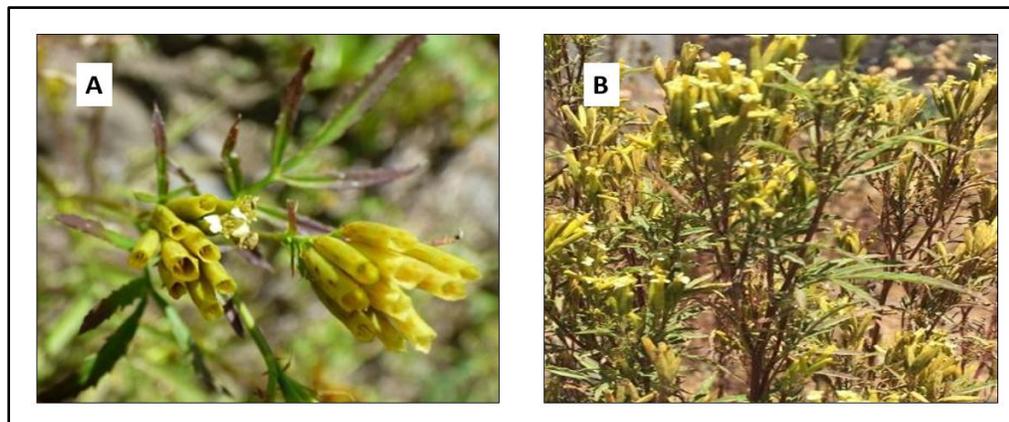
El estudio fitoquímico de esta planta ha permitido encontrar una nueva molécula, el ácido 2-O-benzoil-3-O-cinnamoil tartárico, acompañado de varios compuestos fenólicos como hesperitina, dihidrodehidroconiferil alcohol 9'-O- β -D-glucopiranosido,

blumenol c glucosido, siringaresinol 4'-O- β -D-glucopiranosido, ácido rosmarínico, éster metílico del ácido rosmarínico, pinocembrina 7-rutinósido, ácido clinopodico E, ácido cafeico, éster metílico del ácido cafeico, éster etílico del ácido cafeico y ácido p-coumarico, no se tiene conocimiento sobre su actividad biológica (Vera Saltos, 2014).

Recientemente Amirova, Dimitrova y Marchev (2019) identificaron el potencial anticancerígeno de *Clinopodium*. En condiciones *in vitro* e *in vivo* la aplicación de extractos de *Clinopodium* inhibieron la expresión de la ciclooxigenasa-2, enzima que está vinculada al desarrollo de cáncer. El estudio despertó interés en la búsqueda de moléculas inhibitoras de ciclooxigenasa-2 de origen vegetal, ya que en la actualidad los fármacos anticancerígenos no suelen inhibir esta enzima.

***Tagetes minuta* L.** Es una especie nativa de Sudamérica conocida como “suico”, en Perú y Bolivia se la conoce como “huacatay”, en Argentina como “chinchilla” y en Ecuador como “chincho” o “asnayuyo”. Pertenece al phylum Streptophyta, orden Asterales y a la familia Asteraceae (Visintin & Bernardello, 2005; NCBI:txid169607, 2020).

Esta planta es un arbusto anual que crece a partir de 233 m.s.n.m. El tallo es leñoso de tipo erecto y alcanza alturas hasta 1.80 m. Las hojas superiores son alternas y las inferiores son opuestas con perfil aserrado. Las flores son de color amarillo, presenta involucro cilíndrico y se ubican en una inflorescencia de tipo capítulo pleomorfo. El fruto es simple y en cápsula (Fig. 1.3) (Visintin & Bernardello, 2005; Dávila, 2011; CONABIO, 2020).

Figura 1.3*Tagetes minuta*

Nota. Fotografía de *Tagetes minuta* L. A) Inflorescencia tipo capítulo pleomorfo (Santacreu, 2017). B) Planta completa (Aguirre, 2020).

Ancestralmente la planta ha sido usada como relajante, diurético, diaforético, laxante, hipotensor, espasmolítico, antifúngico, insecticida y estimulante menstrual. Además se utiliza para estabilizar personas con fiebre, ataques de epilepsia, gastritis, indigestión, hemorroides y viruela. Inclusive es muy utilizado en la gastronomía peruana (Bazán & Benites, 2014).

En el aceite esencial de *Tagetes minuta* se encuentran principalmente monoterpenos, cuya presencia varía mucho dependiendo de que parte de la planta se extraiga el aceite. Entre las moléculas más abundante están la dihidrotagetona (67 %), en menor cantidad se encuentran: limoneno, (Z)- β -ocimeno, y tagetona (Dávila, 2011; Bazán & Benites, 2014).

El aceite de *Tagetes* tiene actividad citotóxica debido a la presencia de dihidrotagetona, un monoterpeno capaz de destruir células de fibroblasto. Esta molécula es la principal causante de otorgar propiedades insecticidas al aceite. Existen algunos

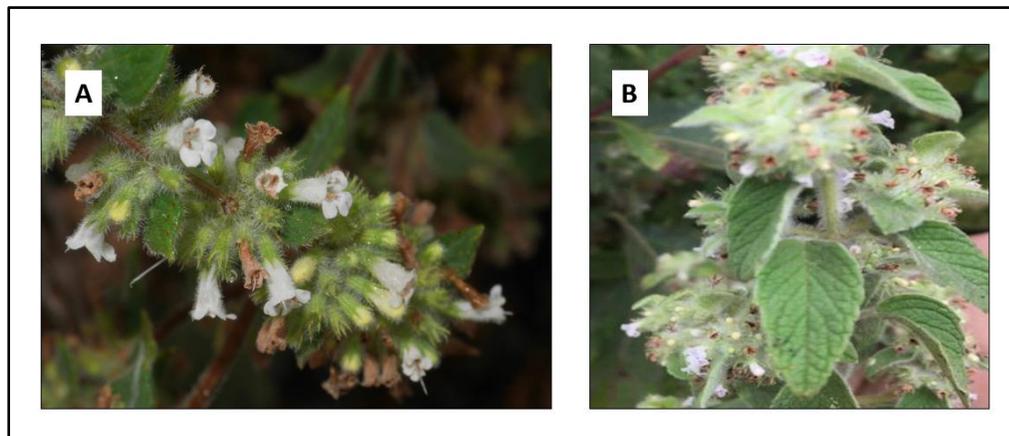
estudios sobre la actividad biológica de los aceites esenciales de *T. minuta* para el bio-control de plagas como *Lucilia cuprina*, que provoca una mortalidad del 97% de los insectos al ponerlos en contacto con el aceite (Chaaban, Vera, & Carvalho, 2019). Otros estudios evidenciaron que el aceite de *T. minuta* es capaz de inhibir en un 100 % la reproducción de parásitos como *Anisakis larvae*. Estos resultados indican que los compuestos orgánicos de *Tagetes* son una alternativa atractiva para la formulación de insecticidas y antiparasitarios (Cussa, 2017; Giarratana, Muscolino, & Ziino, 2017).

***Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb.** Es una especie que se encuentra distribuida en Latinoamérica, conocida comúnmente como “muña”. En Ecuador recibe otros nombres como “poleo de Quito” o “tifo”. Esta planta pertenece al phylum Streptophyta, orden Lamiales y a la familia Lamiaceae (Hernández, 2018; NCBI:txid260606, 2020).

La planta es un arbusto anual que crece en pendientes a alturas entre 2500 a 3500 m.s.n.m y que desprende un aroma mentolado. Su tallo es herbáceo, ramificado y alcanza una altura de 1.2 m. Las hojas son opuestas, aovadas y aserradas. La flor es pequeña, pedicelada, zigomorfa, reunidas en cortos racimos y de color blanco (Fig. 1.4) (Hernández, 2018).

Figura 1.4

Minthostachys mollis



Nota. Fotografía de *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb. A) Flor zigomorfa (Ripley, 2015). B) Planta completa (Aguirre, 2020).

M. mollis es una especie con propiedades insecticidas, antifúngicas, antihelmínticas, antidiarreicas, antiespasmódica, hemostático y carminativa. Es una planta que sirve para aliviar cuadros clínicos como gastritis, vómitos, dolor estomacal, temblores nerviosos y taquicardias. Además, ancestralmente se la ha usado para descongestionar vías respiratorias (Guerrero & Pozo, 2016; Castro, Chavez, & Silva, 2019).

El aceite esencial está principalmente constituido por monoterpenos (Mora & Araque, 2009). Las moléculas más abundantes son la pulegona (55 %) y mentona (30 %). En menor cantidad están presentes α -pineno, isomentona, limoneno, cineol, linalool, timol, β -felandreno y carvona (Guerrero & Pozo, 2016; Hernández, 2018; Castro, Chavez, & Silva, 2019). Estudios farmacológicos realizados por Primo, Rovera y Zanon (2001) detectaron que los componentes de *Minthostachys* poseen características antivirales. En condiciones *in vitro* los virus del herpes y la pseudorabia dejaron de

replicarse en presencia de este aceite esencial. Además Cariddi y Panero (2007) comprobaron la actividad antihistamínica. La aplicación del aceite detuvo la liberación de la β -hexosaminidasa de los basófilos, inhibiendo la respuesta inflamatoria inducida por alérgenos. Este resultado es importante para tratamiento del asma y rinitis que no responden a los antialérgicos comunes como los β -andrenérgicos (Cariddi & Panero, 2007). Se han descrito que muchos de los componentes de este aceite tienen propiedades antifúngicas. Resultados obtenidos por Quispe (2017) comprobaron que el aceite de *M. mollis* presenta actividad antifúngica. En condiciones *in vitro* el crecimiento micelial del hongo *Fusarium* sp. fue inhibido en un 87 % en presencia del aceite esencial.

Hipótesis

Los aceites esenciales de *Clinopodium tomentosum* (Kunth) Govaerts., *Tagetes minuta* L., y *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb., presentan actividad antifúngica para el control *in vitro* de *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum*.

Materiales y métodos

Participantes

Esta investigación ha sido realizada por Kevin Emilio Aguirre Carvajal egresado de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología, bajo la tutoría de la Dra. Karina Proaño Ph. D. jefe del Laboratorio de Biotecnología Vegetal y la asesoría de Blanca Naranjo M. Sc. docente investigadora de la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE. El financiamiento de la investigación estuvo a cargo del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE.

Zona de estudio

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE campus Sangolquí, ubicado en el cantón Rumiñahui, de la Provincia Pichincha en la Av. General Rumiñahui S/N y calle Ambato, Sector Santa Clara, Latitud: 0°18'53"S, Longitud 78°26'36"O.

Duración de la investigación

El tiempo de duración de esta investigación fue de aproximadamente 10 meses. Se inició en el mes de septiembre del 2019 y culminó en julio del 2020.

Metodología

La presente investigación evaluó el efecto de los aceites esenciales de *Clinopodium tomentosum* (Kunth) Govaerts, *Tagetes minuta* L y *Minthostachyys mollis* (Kunth) en el desarrollo micelial y germinación de esporas de *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum* mediante un ensayo *in vitro*.

Material biológico

Material vegetal. El material biológico utilizado en esta investigación fue material vegetal de las especies *Clinopodium tomentosum* (Kunth) Govaerts., *Tagetes minuta* L., y *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb.

La muestra vegetal de *Tagetes minuta* – Chincho se obtuvo en la parroquia de Zambiza en la ubicación -0.149383, -78.435775. La muestra de *Minthostachys mollis* – Tifo se recolectó en la ciudad de Latacunga en las coordenadas -0.747856, -78.608635. La identificación taxonómica de las plantas se realizó en el Herbario de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por el taxónomo Álvaro Pérez.

Adicionalmente se utilizó material vegetal de *Clinopodium tomentosum* (Kunth) Govaerts – Punin disponible en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE he identificado previamente.

Material fúngico. La actividad antifúngica de los aceites esenciales se evaluó en los hongos *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum*. Los hongos *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum* se obtuvieron del cepario de hongos del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE. Para la multiplicación de estos hongos fitopatógenos se utilizó cepas madres en medio de cultivo agar PDA a temperatura de 28 °C, para una buena conservación y actividad del hongo.

Extracción de aceites esenciales

El Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE proporcionó los aceites de Tifo, Punin y Chincho de su banco de extractos. En el caso del aceite de Tifo, fue extraído para esta investigación.

La extracción se llevó a cabo por el método de destilación por arrastre de vapor de agua. Se utilizó 60 gramos de muestra vegetal con agua destilada caliente hasta la mitad de la capacidad del balón de extracción y se colocó sobre una manta de calentamiento a 55 °C hasta ebullición. El vapor de agua generado asciende hasta la trampa de Dean-Stark arrastrando los compuestos volátiles que forman el aceite esencial hasta el refrigerante, donde se condensaron los vapores. El hidrodestilado obtenido desciende a la probeta de la trampa donde por diferencia de densidades se separaron el aceite del hidrolato o hidrodestilado. Finalmente, el aceite se recolectó en un frasco ámbar y se lo conservó en refrigeración a 4 °C.

Detección de actividad antifúngica

Para la detección de la actividad antifúngica se empleó la técnica de difusión en disco de Kirby – Bauer. En esta técnica se mide los halos de inhibición y se realiza el conteo de esporas mediante la cámara de Neubauer.

Cultivos monospóricos. En este ensayo se realizaron cultivos monospóricos de cada hongo para eliminar la variabilidad genética en el diseño experimental.

Se preparó 5 mL de una solución de $1 \times 10^3 \frac{\text{esporas}}{\text{mL}}$ de la cual se tomó 20 μL para depositarlos en la caja Petri con medio de cultivo (PDA+ 30 gotas/L Ac. Láctico 85 %). El inóculo se dispersó en el medio de cultivo empleando la técnica de estriación en el área de microbiología con condiciones asépticas en la cámara de flujo. Este procedimiento se repitió por cada uno de los hongos.

Posteriormente, se limpió el estereoscopio con alcohol al 70 % y sablón para identificar esporas aisladas en las cajas Petri. Las secciones del medio de cultivo donde se ubicaron las esporas fueron recortadas con un bisturí estéril. Cada trozo de agar obtenido se colocó en otra caja Petri con medio de cultivo (PDA+ 30 gotas/L Ac. Láctico

85 %). Para asegurar un área limpia se trabajó con tres mecheros de alcohol. Los cultivos se incubaron por 15 días a 28 °C. Se supervisó diariamente que la espóra germine y que crezca sin contaminación (Brunner & Ayala, 2013).

Preparación de solución de esporas. Luego de obtener los cultivos monospóricos, se procedió a preparar una solución de esporas de *A. niger* y *F. oxysporum* a $1 \times 10^5 \frac{\text{esporas}}{\text{mL}}$ para realizar el ensayo de antibiograma.

En la cámara de flujo se abrieron las cajas Petri inoculadas, donde se añadió 25 mL de agua estéril y se agitó. En el caso *Fusarium oxysporum* se realizó una filtración con una gasa después de la agitación. La solución se guardó en un tubo Falcon en refrigeración a 4 °C. El conteo de esporas se realizó mediante la cámara de Neubauer en los cinco cuadrantes de 1 mm².

Se utilizó la siguiente fórmula para el cálculo de esporas por mL:

$$[\text{esporas}] = \frac{\# \text{esporas contadas}}{5} * 10^4 \quad (2.1)$$

Para ajustar la solución a la concentración deseada se utilizó la siguiente ecuación:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2 \quad (2.2)$$

Preparación de los aceites esenciales para evaluar el potencial antifúngico.

A partir del aceite puro extraído se prepararon soluciones a diferentes concentraciones para realizar los ensayos de selección y sensibilidad mediante la técnica de antibiograma. Las soluciones se prepararon con el aceite esencial concentrado y polisorbato 20 (Tween 20) al 0.1 % (López, Peña, & Beryl, 2018).

En el ensayo de selección de los aceites esenciales se evaluaron soluciones de aceites a concentraciones de 25, 50, 75 y 100 % v/v (Malmorejon, 2018). En la Tabla 2.1 se muestra el detalle de las soluciones de los aceites empleados.

Tabla 2.1

Concentración de las soluciones utilizadas en el ensayo de selección de aceites esenciales

Soluciones	100 %	75 %	50 %	25 %	0 %
Aceite esencial [μL]	500	375	250	125	0
Tween 20 0.1% [μL]	0	125	250	375	500
Volumen Final [μL]	500	500	500	500	500

Nota. Se indica la preparación de las soluciones de aceites esenciales a concentraciones de 100, 75, 50 y 25 % con disolvente Tween 20.

En el ensayo de sensibilidad se evaluaron las soluciones de aceites esenciales a las siguientes concentraciones 25, 10, 5 y 1 % v/v. En la Tabla 2.2 se muestra el detalle de las soluciones de los aceites empleados.

Tabla 2.2

Concentración de las soluciones utilizadas en el ensayo de sensibilidad de aceites esenciales

Soluciones	25 %	10 %	5 %	1 %	C-	C- -	C+
Aceite Esencial [μL]	500	375	250	125	0	0	0
Tween 20 0.1 %	0	125	250	375	500	0	0
Agua	0	0	0	0	0	500	0
Volumen Final [μL]	500	500	500	500	0	500	0
Ridomil Gold 3.5 [g/L]	0	0	0	0	0	0	500

Nota. Se indica la preparación de las soluciones de aceites esenciales concentraciones de 25, 10, 5 y 1 % con disolvente Tween 20.

Técnica de difusión en disco de Kirby – Bauer. Los ensayos de selección y sensibilidad de los aceites esenciales se realizaron a través de la técnica de difusión en disco de Kirby – Bauer con ciertas modificaciones. Se prepararon cajas Petri con 22 mL de medio de cultivo (Müller - Hinton + 30 gotas/L Ac. Láctico 85 % + 2 % Dextrosa Anhidro) y se refrigeraron por 24 horas (Bernal & Guzmán, 1984). Al día siguiente, 2 horas antes de iniciar el ensayo, se sacaron las cajas Petri del refrigerador para que alcancen la temperatura ambiente. A continuación en la cámara de flujo se colocó las cajas entreabiertas por 30 minutos para eliminar el exceso de humedad del agar y se inició el experimento (Sociedad Española de Enfermedades, 2000).

Se añadió al medio solidificado 300 μL de una solución con 1×10^5 esporas/mL. Con ayuda del asa triangular de siembra se dispersó por todo el medio de cultivo y se dejó secar de 3 a 5 minutos antes de colocar los discos (Bernal & Guzmán, 1984; Sociedad Española de Enfermedades, 2000).

Con una pinza estéril se sumergió el disco de papel filtro (6 mm de diámetro) en 500 μ L de la solución de aceite esencial, este procedimiento se repitió para cada una de las diferentes concentraciones analizadas. En cada una de las cajas Petri se colocaron 4 discos, se los dispuso de tal manera que se forme un cuadrado a una distancia mínima de 15 mm de la periferia de la placa. Se selló las cajas Petri con Parafilm y los inóculos se incubaron a 28 °C por 48 horas (Sociedad Española de Enfermedades, 2000).

Cumplido el periodo de incubación se midió el diámetro del halo de inhibición con el programa ImageJ. Los antibiogramas se conservaron por 5 días para dar inicio al ensayo de conteo de esporas (Bernal & Guzmán, 1984).

Los halos de inhibición se clasificaron de acuerdo a la escala de Duraffourd con ciertas modificaciones (Rojas, 2016). En la Tabla 2.3 se detalla los valores analizados.

Tabla 2.3

Escala de Duraffourd

Sensibilidad	Diámetro halo de inhibición [mm]
Nula -	$x = 6$
Sensible +	$6 < x \leq 12$
Muy Sensible ++	$12 < x \leq 18$
Altamente Sensible +++	$x > 18$

Nota. Se indica las categorías de la escala de Duraffourd

Para el control positivo se utilizó Ridomil Gold 3.5 g/L (C+), que es un fungicida de amplio espectro que ha demostrado ser efectivo contra *A. niger* y *F. oxysporum* (Haider & Javaid, 2015; Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la

Alimentación, 2018). Como controles negativos se emplearon soluciones con tween 20 0.1 % (C-) y agua estéril (C- -). Las soluciones se guardaron en refrigeración a 4 °C cubiertas con papel aluminio.

Conteo de esporas. El conteo de esporas se realizó para determinar la inhibición de la germinación de las esporas en las cajas Petri donde se realizaron los ensayos del antibiograma.

En primer lugar, se realizó un raspado con un asa de siembra para desprender el micelio del medio de cultivo, se añadió 5 mL de agua estéril y se agitó con cuidado. La solución del interior de la caja Petri se filtró con una gasa para evitar observar micelio en el microscopio. Utilizando la micropipeta se tomó 1 mL de la solución para depositarlo en un microtubo Eppendorf de 1.5 mL. Se repitió este procedimiento para cada caja Petri del ensayo. Las soluciones obtenidas se conservaron en refrigeración a 4 °C.

A continuación, con ayuda del microscopio óptico a 40X se contabilizaron las esporas en la cámara de Neubauer. Finalmente, el cálculo de porcentaje de inhibición de la germinación de esporas se realizó aplicando la siguiente fórmula (Vásquez, Belmont, Jiménez, & Flores, 2013):

$$\%IE = \frac{\frac{\#Eporas\ control}{mL} - \frac{\#Eporas\ tratamiento}{mL}}{\frac{\#Eporas\ control}{mL}} * 100 \quad (2.3)$$

Diseño Experimental

En esta investigación se empleó un diseño factorial 4x3x2 para el ensayo de sensibilidad y de conteo de esporas. El primer factor es el aceite esencial con tres niveles: aceite esencial de *Clinopodium tomentosum* (Kunth) Govaerts., *Tagetes minuta* L., y *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb. El segundo factor es el tipo de hongo, que

contiene 2 niveles que son *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum*. El tercer factor es la concentración del aceite, con cuatro niveles 25, 10, 5 y 1 %.

Ensayo de sensibilidad - Antibiograma

En este ensayo se evaluó los halos de inhibición producidos por los aceites esenciales: *Clinopodium tomentosum* (Kunth) Govaerts., *Tagetes minuta* L., y *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb en cultivos de *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum* en medio Müller – Hinton.

La unidad experimental para este ensayo fue cada disco de papel filtro utilizado en el antibiograma. Se emplearon 12 réplicas, un total de 3 cajas por tratamiento. Se midió el diámetro del halo de inhibición en milímetros para las concentraciones de 1, 5, 10 y 25 % de los aceites esenciales de *Clinopodium tomentosum* (Kunth) Govaerts., *Tagetes minuta* L., y *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb. En la Tabla 2.4 se muestra los diferentes tratamientos utilizados para evaluar los halos del antibiograma.

Tabla 2.4

Tratamientos utilizados para la evaluación de los halos del antibiograma de los aceites esenciales contra los hongos.

Tratamiento	Código	Aceite Esencial	Dilución	Hongo
T1	AE1D1An	<i>T. minuta</i>	AE al 25 %	<i>A. niger</i>
T2	AE2D1An	<i>C. tomentosum</i>	AE al 25 %	<i>A. niger</i>
T3	AE3D1An	<i>M. mollis</i>	AE al 25 %	<i>A. niger</i>
T4	AE1D2An	<i>T. minuta</i>	AE al 10 %	<i>A. niger</i>
T5	AE2D2An	<i>C. tomentosum</i>	AE al 10 %	<i>A. niger</i>
T6	AE3D2An	<i>M. mollis</i>	AE al 10 %	<i>A. niger</i>
T7	AE1D3An	<i>T. minuta</i>	AE al 5 %	<i>A. niger</i>
T8	AE2D3An	<i>C. tomentosum</i>	AE al 5 %	<i>A. niger</i>
T9	AE1D3An	<i>M. mollis</i>	AE al 5 %	<i>A. niger</i>
T10	AE1D4An	<i>T. minuta</i>	AE al 1 %	<i>A. niger</i>
T11	AE2D4An	<i>C. tomentosum</i>	AE al 1 %	<i>A. niger</i>
T12	AE3D4An	<i>M. mollis</i>	AE al 1 %	<i>A. niger</i>
T13	AE1D1F	<i>T. minuta</i>	AE al 25 %	<i>F. oxysporum</i>
T14	AE2D1F	<i>C. tomentosum</i>	AE al 25 %	<i>F. oxysporum</i>
T15	AE3D1F	<i>M. mollis</i>	AE al 25 %	<i>F. oxysporum</i>
T16	AE1D2F	<i>T. minuta</i>	AE al 10 %	<i>F. oxysporum</i>
T17	AE2D2F	<i>C. tomentosum</i>	AE al 10 %	<i>F. oxysporum</i>
T18	AE3D2F	<i>M. mollis</i>	AE al 10 %	<i>F. oxysporum</i>
T19	AE1D3F	<i>T. minuta</i>	AE al 5 %	<i>F. oxysporum</i>
T20	AE2D3F	<i>C. tomentosum</i>	AE al 5 %	<i>F. oxysporum</i>
T21	AE1D3F	<i>M. mollis</i>	AE al 5 %	<i>F. oxysporum</i>
T22	AE1D4F	<i>T. minuta</i>	AE al 1 %	<i>F. oxysporum</i>
T23	AE2D4F	<i>C. tomentosum</i>	AE al 1 %	<i>F. oxysporum</i>
T24	AE3D4F	<i>M. mollis</i>	AE al 1 %	<i>F. oxysporum</i>

Nota. Se indica los tratamientos del diseño experimental de la presente investigación para los ensayos de sensibilidad y conteo de esporas. Incluye 12 réplicas por tratamiento.

El efecto de los distintos aceites esenciales se determinó mediante un diseño experimental donde la variable de interés fue el área de los halos de inhibición. En la Tabla 2.5 se observa los factores y variables utilizadas para el análisis estadístico.

Tabla 2.5

Factores y variables para el análisis estadístico del ensayo de la técnica de Kirby – Bauer

Hongo	A. esencial	Concentración	Variable Dependiente	Definición
<i>A. niger</i>	<i>M. mollis</i>	25 %	Área del halo de inhibición	Área donde el hongo no creció después de un periodo de incubación de 48h.
<i>F. oxysporum</i>	<i>T. minuta</i>	10 %		
	<i>C. tomentosum</i>	5 %		
		1 %		

Nota. Esta tabla muestra los factores y niveles del diseño experimental para el ensayo de sensibilidad.

Ensayo de conteo de esporas

En este ensayo se evaluó los porcentajes de inhibición de esporas producidos por los aceites esenciales de *Clinopodium tomentosum* (Kunth) Govaerts., *Tagetes minuta* L., y *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb en cultivos de *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum* en medio Müller – Hinton.

La unidad experimental para este ensayo fueron las cajas Petri. Se realizó 3 réplicas por ensayo. Se midió el porcentaje de inhibición de esporas para las concentraciones de 1, 5, 10 y 25 % de los aceites esenciales de *Clinopodium tomentosum* (Kunth) Govaerts., *Tagetes minuta* L., y *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb. Los tratamientos fueron los mismos que los realizados en los ensayo de sensibilidad (Tabla 2.4).

El efecto de los distintos aceites esenciales se determinó mediante un diseño experimental donde la variable de interés fue el porcentaje de inhibición de germinación de esporas. En la Tabla 2.6 se observa los factores y niveles utilizados para el análisis estadístico.

Tabla 2.6

Factores y niveles para el análisis estadístico del ensayo de conteo de esporas

Hongo	A. esencial	Concentración	Variable Dependiente	Definición
<i>A. niger</i>	<i>M. mollis</i>	25 %	% de inhibición de germinación de esporas	Diferencia concentración de esporas del control con el tratamiento dividida para el control.
<i>F. oxysporum</i>	<i>T. minuta</i>	10 %		
	<i>C. tomentosum</i>	5 %		
		1 %		

Nota. Se observa los factores y niveles del diseño experimental para el ensayo de conteo de esporas.

Análisis estadístico

Para determinar el efecto de las diferentes concentraciones de los aceites esenciales de *Clinopodium tomentosum* (Kunth) Govaerts., *Tagetes minuta* L., y *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb en cultivos de *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum* se utilizó el software Infostat para analizar los datos obtenidos de los ensayos *in vitro*.

Se comprobó la normalidad y homocedasticidad de los datos para aplicar la prueba ANOVA en conjunto con la prueba de Tukey con una significancia de 0.05 para encontrar diferencias significativas entre los tratamiento. Los datos que no cumplieron con las condiciones para aplicar estas pruebas se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal – Wallis.

Las hipótesis que se plantearon fueron las siguientes:

- **Ho1:** La inhibición del crecimiento de *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum* es independiente de la concentración del aceite esencial.
- **Ha1:** La inhibición del crecimiento de *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum* es dependiente de la concentración del aceite esencial.
- **Ho2:** La esporulación de *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum* es independiente de la concentración del aceite esencial.
- **Ha2:** La esporulación de *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum* es dependiente de la concentración del aceite esencial.

Para obtener las concentraciones óptimas de inhibición se deben desarrollar modelos mediante regresiones polinómicas. Los modelos matemáticos se deben realizar en función de la población y no de la muestra. En este trabajo se utilizó la función de Infostat "Todas las muestras posibles" para tomar el mayor número de k elementos que genere la población más grande posible. Se generaron 17296 datos en función de los halos de inhibición y 978 datos en función del porcentaje de inhibición de esporas para realizar la regresión polinómica.

Resultados

Ensayos *in vitro*

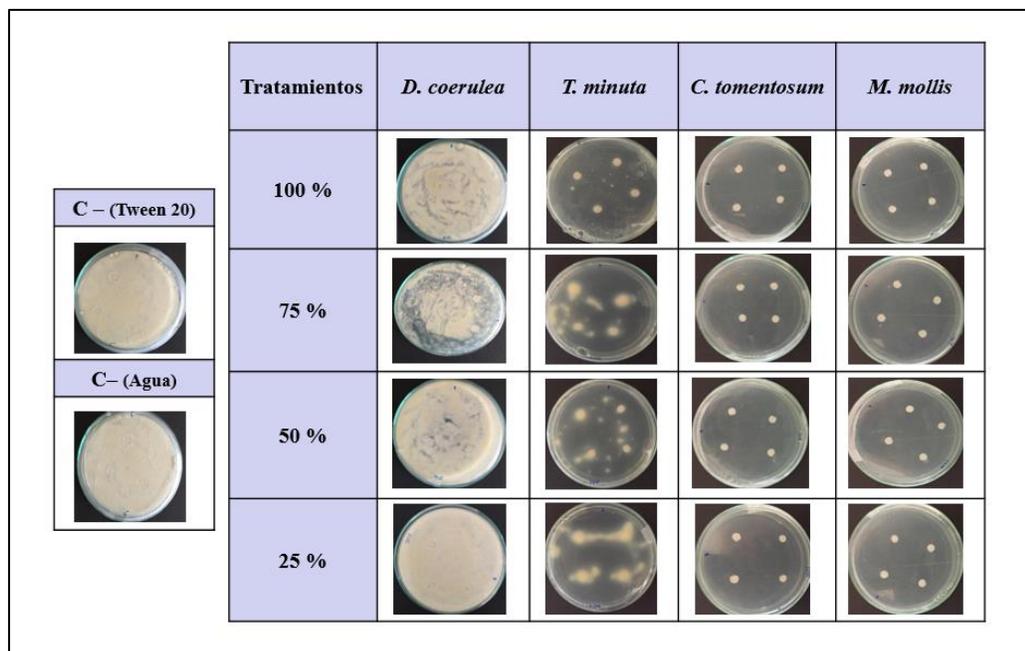
En este capítulo se muestran los datos obtenidos de la experimentación realizada con los aceites esenciales y los hongos evaluados. Los resultados corresponden a la selección de los aceites esenciales con potencial antifúngico y a la identificación de su efecto en los hongos mediante antibiograma y conteo de esporas.

Identificación del potencial antifúngico de los aceites esenciales

En la figura 3.1 se indica el ensayo que se realizó para la identificación del potencial antifúngico de los aceites esenciales. En este ensayo se aplicó los aceites esenciales de *Clinopodium tomentosum*, *Tagetes minuta*, *Minthostachys mollis* y *Dalea coerulea* (100, 75, 50 y 25 % de concentración) en cultivos de *Aspergillus niger* mediante la técnica de difusión de disco. El experimento sirvió para determinar si los aceites esenciales evaluados inhibían el crecimiento del hongo, de esta manera seleccionar los aceites con posible actividad antifúngica.

Figura 3.1

Ensayo de selección de aceites esenciales con actividad antifúngica



Nota. Resumen gráfico después de 2 semanas de aplicar los tratamientos para detectar el potencial antifúngico de los aceites esenciales de *D. coerulea*, *T. minuta*, *M. mollis* y *C. tomentosum* al 25, 10, 5 y 1 %.

En la figura se observa una inhibición del 100% del crecimiento de *Aspergillus niger* luego de la aplicación de los tratamiento con los aceites esenciales de *C. tomentosum*, *T. minuta* y *M. mollis* en todas las concentraciones evaluadas (100, 75, 50 y 25 %) durante las tres semanas de observación. Sin embargo, el aceite esencial de *Dalea coerulea* no inhibió el crecimiento del hongo con las concentraciones aplicadas, el hongo creció a las 48 horas y a las 2 semanas había contaminado la mayor parte del agar. El crecimiento del hongo fue similar al control sin el aceite esencial, por tal razón el trabajando continuó únicamente con los aceites de *Clinopodium tomentosum*, *Tagetes minuta* y *Minthostachys mollis*.

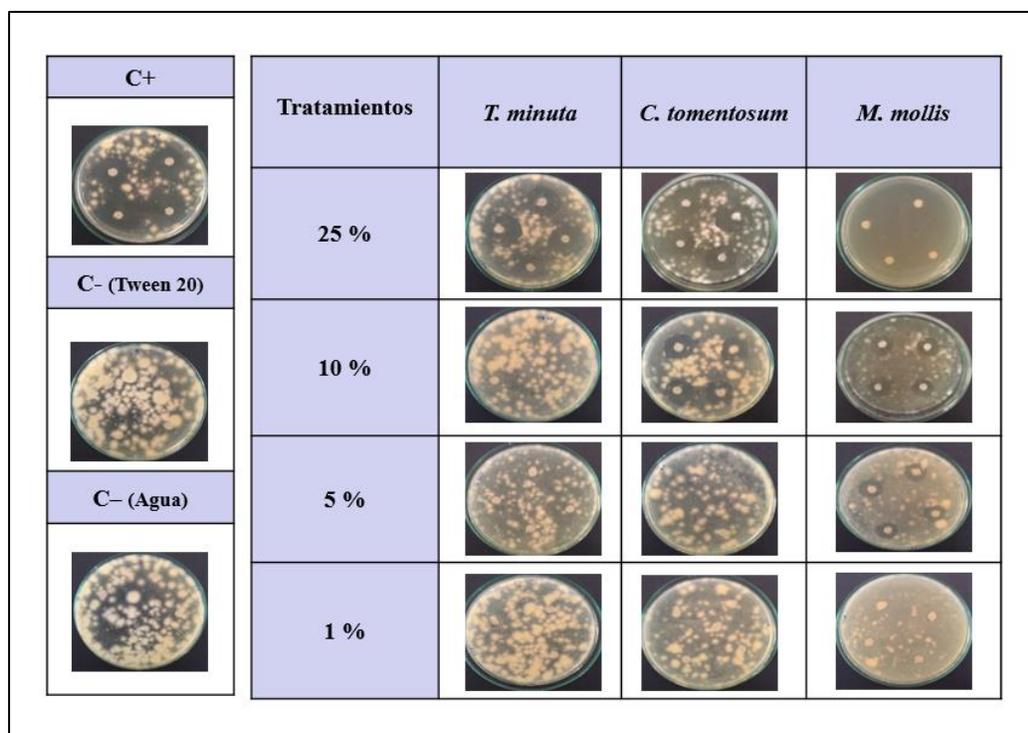
Efecto de los aceites esenciales sobre el desarrollo de Aspergillus niger y Fusarium oxysporum

El efecto de los aceites esenciales se evaluó en los cultivos de *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum* mediante los antibiogramas y conteos de esporas, los cuales determinaron la sensibilidad e inhibición en la germinación de las mismas.

Respuesta de sensibilidad de *Aspergillus niger* a los aceites esenciales mediante antibiograma y conteo de esporas. La sensibilidad de *Aspergillus niger* a los aceites esenciales se evaluó determinando el diámetro de los halos de inhibición que se formaban alrededor del disco, como se puede observar en la figura 3.2. En este ensayo se aplicaron los aceites esenciales de *T. minuta*, *C. tomentosum* y *M. mollis* a las concentraciones del 1, 5, 10 y 25 % en cultivos de *A. niger* mediante la técnica de difusión de disco.

Figura 3.2

Antibiograma en cultivos de Aspergillus niger



Nota. Resultados a las 48 h del antibiograma realizado en *A. niger* con los aceites esenciales de *T. minuta*, *M. mollis* y *C. tomentosum* al 25, 10, 5 y 1 %.

La figura muestra los halos de inhibición que se formaron en los cultivos de *A. niger* con los diferentes tratamientos a diferentes concentraciones y aceites esenciales evaluados. Los halos de inhibición se observaron claramente a la concentración del 25 % del aceite esencial de *T. minuta*, *C. tomentosum* y *M. mollis*. A la concentración del 10 % se observó halos de inhibición únicamente para los aceites *C. tomentosum* y *M. mollis*. En el caso del aceite esencial de *M. mollis* se observó mayor sensibilidad en el hongo, puesto que se visualizaron halos de inhibición exclusivamente a la concentración del 5 %. La inhibición del crecimiento del hongo con el aceite esencial de *M. mollis* a la

menor concentración muestra que el aceite esencial de esta especie está generando sensibilidad en *A. niger* a bajas concentraciones.

Al analizar la inhibición total de este aceite al 25 % y con el objetivo de obtener una medida representativa, se procedió a dividir el área total de la caja de cultivo por la cantidad de discos aplicados en el tratamiento para calcular el diámetro del halo en relación al área del círculo (Anexo 7).

En el control C - del eluyente (Tween 20), el hongo creció normalmente (Fig 3.2), indicativo de que la formación de los halos de inhibición observados son producto del efecto de los aceites esenciales en el crecimiento de *A. niger*.

La Tabla 3.1 muestra las medidas de los halos obtenidos en los antibiogramas realizados con los distintos tratamientos en *A. niger*. Los aceites esenciales de *C. tomentosum* y *M. mollis* a la concentración de 25 % y el control positivo formaron halos de inhibición de aproximadamente 25.71, 35.28 y 24.58 mm de diámetro respectivamente, mientras que *T. minuta* presentó un valor de 17.69 mm. Según el tamaño del halo de inhibición se asigna una de las categorías de la escala de Duraffourd para determinar el nivel de sensibilidad de los tratamientos. En esta escala existen cuatro categorías: resistente (-), sensible (+), muy sensible (++) y altamente sensible (+++) (revisar el detalle de la escala Duraffourd en Tabla 2.2).

Tabla 3.1

Medias de diámetros de los halos de inhibición [mm] en Aspergillus niger

Tratamiento	<i>T. minuta</i>	<i>C. tomentosum</i>	<i>M. mollis</i>	C+	C-	C--
25 %	17.69 ++	25.71 +++	35.28 +++			
10 %	6 -	14.71 ++	16.42 ++	24.58 +++	6 -	6 -
5 %	6 -	6 -	16.80 ++			
1 %	6 -	6 -	6 -			

Nota. Sensibilidad de *A. niger* a los aceites esenciales evaluados. Simbología: Resistente (-), Sensible (+), Muy sensible (++) y Altamente Sensible (+++).

En la tabla se puede observar que el hongo presentó dos categorías de sensibilidad: muy sensible y altamente sensible. Con los tratamientos evaluados se identificó que *A. niger* fue muy sensible a los aceites esenciales de *T. minuta* al 25 %, *C. tomentosum* al 10 % y *M. mollis* al 5 y 10 %. Para los aceites esenciales de *C. tomentosum* y *M. mollis* a la concentración del 25 % y el control positivo se determinó que el hongo es altamente sensible.

Es importante mencionar que *A. niger* presentó resistencia a algunos tratamientos aplicados. Los tratamientos a los que el hongo demostró ser resistente fueron al aceite esencial de *T. minuta* a las concentraciones 10, 5 y 1 % y al aceite de *C. tomentosum* a las concentraciones de 5 y 1 %. En el caso del aceite esencial de *M. mollis* únicamente se observó resistencia a la concentración del 1 %. Estos resultados sugieren que el aceite esencial de *M. mollis* es el mejor tratamiento para generar sensibilidad en el hongo (Tabla 3.1).

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente utilizando la prueba de Kruskal – Wallis con un nivel de significancia de 0.05. El análisis de los supuestos de

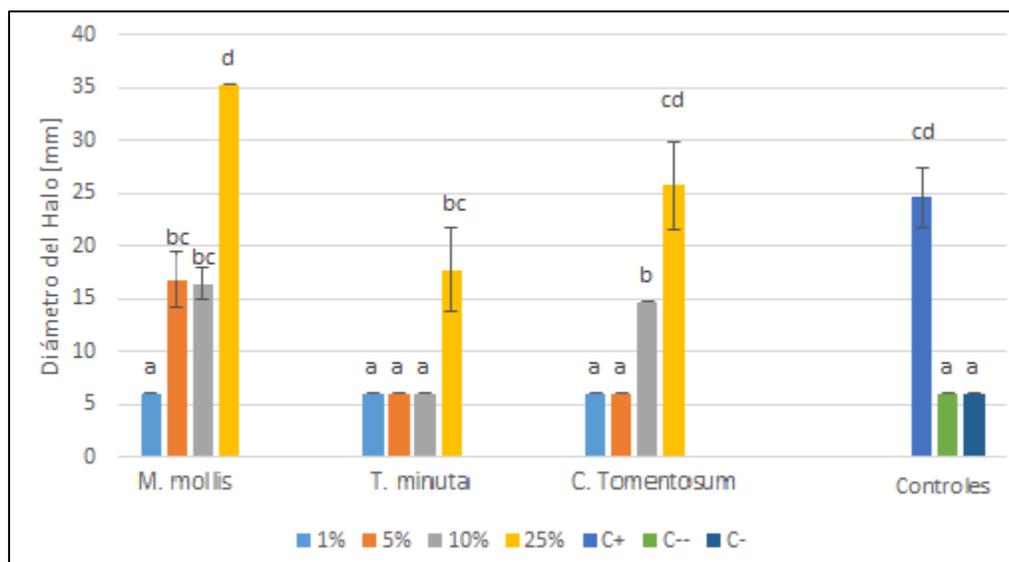
normalidad y de homocedasticidad de los datos, así como el análisis de Kruskal – Wallis se muestra en los Anexos 1 y 2 respectivamente.

La prueba de Kruskal – Wallis manifiesta que el p-valor (0.0001) es menor al nivel de significancia (0.05). Estos datos estadísticos obtenidos permiten tomar la decisión de rechazar la hipótesis nula (H_0) y aceptar la hipótesis alternativa (H_a), es decir que la inhibición del crecimiento de *A. niger* es dependiente de la concentración de los aceites esenciales (Anexo 2).

La figura 3.3 indica la formación de halos de inhibición en cultivos de *A. niger* luego de la aplicación de los aceites esenciales de *T. minuta*, *C. tomentosum* y *M. mollis* a diferentes concentraciones (1, 5, 10 y 25 %).

Figura 3.3

Efecto inhibitorio de los aceites esenciales en Aspergillus niger



Nota. Efecto de los aceites esenciales *M. mollis*, *T. minuta* y *C. tomentosum* a concentraciones de 1, 5, 10 y 25 % en la formación de halos de inhibición en *A. niger*. Los valores con diferente letra muestran diferencias significativas (p-valor > 0.05).

.El análisis estadístico determinó que los tratamientos que formaron mayores halos de inhibición fueron los aceites esenciales de *C. tomentosum* y *M. mollis* a la concentración del 25 % y el control positivo, mientras que *T. minuta* a la misma concentración presentó halos de menor tamaño. A concentraciones del 1, 5 y 10 % de *T. minuta* se observó crecimiento del hongo en el medio de cultivo sin formar halos de inhibición. Estos resultados indican que la concentración del 25 % los aceites esenciales de *C. tomentosum* y *M. mollis* presentan mayor potencial antifúngico que *T. minuta*, siendo su desempeño similar al del control positivo (Fig 3.3).

Adicionalmente, se evidenció que el aceite esencial de *M. mollis* a concentración de 5 % formó un halo de inhibición de aproximadamente 16.80 mm de diámetro, mientras que en *C. tomentosum* y *T. minuta* a la misma concentración no hubo inhibición. El aceite esencial de *M. mollis* a concentración de 5 % tuvo el mismo efecto que *T. minuta* y *C. tomentosum* a concentraciones de 25 y 10 % respectivamente (Fig 3.3), mostrando que se necesita menor cantidad de aceite esencial de *M. mollis* que de *T. minuta* y *C. tomentosum* para generar sensibilidad en el hongo. Este resultado muestra que el aceite esencial de *M. mollis* cuenta con un elevado potencial antifúngico.

Los resultados analizados demuestran la importancia de optimizar la concentración de los aceites esenciales de tal manera que se encuentre la menor concentración a la que se genere un grado de sensibilidad significativo.

La optimización de la concentración del aceite esencial se realizó mediante modelos matemáticos para cada uno de los aceites empleados, que describen la formación de los halos de inhibición en cultivos de *A. niger* según la cantidad del aceite aplicado. En el Anexo 3 se encuentran las pruebas estadísticas donde se evidencia la significancia para cada factor de la ecuación y su respectivo ajuste. Los modelos se detallan a continuación:

Donde:

y : Diámetro del halo

x : Concentración del aceite esencial

- Modelo *T. minuta*

$$y = 0.01x^2 + 0.31x + 4.5 \quad (3.1)$$

- Modelo *M. mollis*

$$y = -0.0016x^2 + 1.16x + 6.92 \quad (3.2)$$

- Modelo *C. tomentosum*

$$y = 0.87x + 4.16 \quad (3.3)$$

Para obtener las concentraciones óptimas de inhibición se fija un parámetro en los modelos para resolver las ecuaciones. El parámetro a fijar es el diámetro del halo de inhibición. De acuerdo a los estándares de CLSI y a Duraffourd se establece que la concentración óptima para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos es aquella capaz de generar un halo de inhibición de al menos 12 mm de diámetro. En la Tabla 3.2 se presentan los valores obtenidos.

Tabla 3.2

Concentraciones óptimas para inhibir el crecimiento de Aspergillus niger

Aceite Esencial	Concentración Óptima
<i>T. minuta</i>	15.97 %
<i>M. mollis</i>	4.41 %
<i>C. tomentosum</i>	9.01 %

Nota. Menor concentración requerida de aceites esenciales a la que *A. niger* es sensible.

Estos análisis muestran que *M. mollis* es el aceite esencial que requiere de menor concentración de extracto (4.41 %) para inhibir el crecimiento del hongo. Se estima que la aplicación de esta concentración formará un halo de inhibición de al menos 12 mm de diámetro. Sugiriendo que el crecimiento del hongo a esta concentración deberá inhibirse en condiciones *in vitro* (Tabla 3.2).

En relación a la esporulación de *A. niger*, la Tabla 3.3 muestra los porcentajes de inhibición en la germinación de esporas por cada tratamiento. En este ensayo se realizó el conteo de esporas en los cultivos del hongo con los aceites esenciales de *T. minuta*, *C. tomentosum* y *M. mollis* a las concentraciones de 1, 5, 10 y 25 %.

Tabla 3.3

Porcentajes (%) de inhibición de germinación de esporas en cultivos de Aspergillus niger

Tratamiento	<i>T. minuta</i>	<i>C. tomentosum</i>	<i>M. mollis</i>	C+	C-	C--
25 %	68.84	56.35	99.18			
10 %	20.91	19.78	60.85	23.17	4.11	0
5 %	11.99	12.16	16.30			
1 %	1.82	1.64	8.04			

Nota. Porcentajes de inhibición en la germinación de esporas de *A. niger* provocada por los aceites esenciales evaluados.

En la tabla se observa que los tratamientos del aceite esencial de *M. mollis* presentan los mejores resultados. La inhibición de la germinación de esporas generada por el aceite de *M. mollis* es superior a la de *T. minuta* y *C. tomentosum* a las concentraciones de 10 y 25 %. El porcentaje de inhibición generado por el aceite de *M. mollis* a estas concentraciones fue del 60.85 y 99.18 % respectivamente.

El análisis estadístico del conteo de esporas se realizó mediante las pruebas ANOVA y de Tukey para comprobar su significancia. Las pruebas estadísticas se realizaron con un nivel de significancias de 0.05.

El análisis de los supuestos de normalidad y de homocedasticidad de los datos, así como el análisis ANOVA y la prueba de Tukey se encuentran en los Anexos 4 y 5 respectivamente.

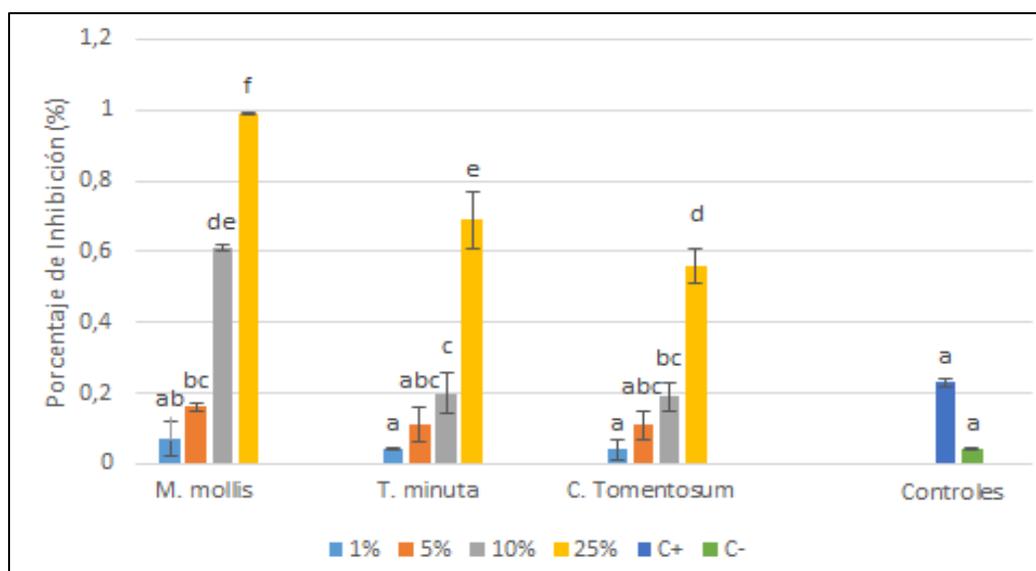
La prueba ANOVA manifiesta que el p-valor (0.0001) es menor al nivel de significancia (0.05). Los datos estadísticos obtenidos permiten rechazar la hipótesis nula (Ho2) y aceptar la hipótesis alternativa (Ha2), es decir que la inhibición de la

germinación de esporas de *A. niger* es dependiente de la concentración de los aceites esenciales (Anexo 5).

En la figura 3.4 se observa el efecto inhibitorio de los aceites esenciales de *T. minuta*, *C. tomentosum* y *M. mollis* a las concentraciones de 1, 5, 10 y 25 % en la germinación de esporas en cultivos de *A. niger*.

Figura 3.4

Efecto inhibitorio de los aceites esenciales en la germinación de esporas de Aspergillus niger



Nota. Efecto inhibitorio de los aceites esenciales *M. mollis*, *T. minuta* y *C. tomentosum* a concentraciones de 1, 5, 10 y 25 % en la esporulación de *A. niger*. Los valores con diferente letra muestran diferencias significativas (p -valor > 0.05).

El análisis estadístico determinó que el tratamiento que generó el mayor porcentaje de inhibición de la germinación de esporas fue el aceite esencial de *M. mollis* al 25 %, inhibiendo la esporulación en un 99.18 %. Además, la concentración del 10 %

generó un efecto similar a los observados con la el 25 % de los aceites esenciales de *T. minuta* y *C. tomentosum*, superando al control positivo (Fig 3.4). Estos resultados muestran la eficacia del aceite esencial de *M. mollis* para inhibir la esporulación de *A. niger* en relación a los otros tratamientos evaluados.

Se evidenció además, que a medida que se aumenta la concentración de los aceites esenciales, aumenta el porcentaje de inhibición en la esporulación de *A. niger* (Fig 3.4). Sugiriendo que la germinación de esporas se inhibe a altas concentraciones. La estimación de la inhibición de esporulación del hongo se realizó mediante modelos matemáticos para cada uno de los aceites empleados. En el Anexo 6 se encuentran las pruebas estadísticas donde se evidencia la significancia para cada factor de la ecuación y su respectivo ajuste. Los modelos se detallan a continuación:

Donde:

y : % de inhibición de esporas

x : Concentración de aceite esencial

- Modelo *T. minuta*:

$$y = 0.03x - 0.02 \quad (3.4)$$

- Modelo *M. mollis*:

$$y = 0.04x + 0.05 \quad (3.5)$$

- Modelo *C. tomentosum*:

$$y = 0.02x \quad (3.6)$$

Para estimar los porcentajes de inhibición de la germinación de esporas, se introdujo en las ecuaciones la concentración óptima de inhibición de cada aceite esencial calculada anteriormente. La Tabla 3.4 presenta los valores obtenidos.

Tabla 3.4

Estimación de porcentajes de inhibición de esporas a concentraciones óptimas para inhibir el crecimiento de Aspergillus niger

Aceite Esencial	Concentración Óptima	Inhibición de esporas
<i>T. minuta</i>	15.97 %	46 %
<i>M. mollis</i>	4.41 %	22 %
<i>C. tomentosum</i>	9.01 %	18 %

Nota. Estimaciones de los porcentajes de inhibición de esporas de *A. niger* mediante modelos matemático desarrollados a concentraciones óptimas que generan sensibilidad.

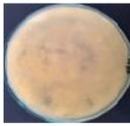
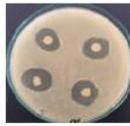
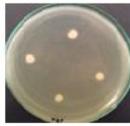
Este análisis muestra los porcentajes de inhibición de esporas a la concentración óptima calculada, para obtener un diámetro de inhibición de al menos 12 mm como valor de referencia de inhibición del hongo.

El porcentaje de inhibición obtenido entre el 18 al 46 % a partir de la concentración óptima de los aceites esenciales indica una clara disminución en la esporulación y por ende inactiva el crecimiento del hongo. El análisis de los resultados indican que el aceite de *M. mollis* a concentración del 4.41 % es la menor concentración empleada que permite inhibición, sugiriendo la eficiencia de este aceite para el control de *A. niger* (Tabla 3.4).

Respuesta de sensibilidad de *Fusarium oxysporum* a los aceites esenciales mediante antibiograma y conteo de esporas. La sensibilidad de *Fusarium oxysporum* a los aceites esenciales fue evaluada determinando el diámetro de los halos de inhibición que se forman alrededor del disco, como se observa en la figura 3.5. En el ensayo se aplicaron los aceites esenciales de *Tagetes minuta*, *Clinopodium tomentosum* y *Minthostachys mollis* a concentraciones de 1, 5, 10 y 25 % en cultivos de *F. oxysporum* mediante la técnica de difusión de disco.

Figura 3.5

Antibiogramas en cultivos de Fusarium oxysporum

C+	Tratamientos	<i>T. minuta</i>	<i>C. tomentosum</i>	<i>M. mollis</i>
	25 %			
C- (Tween 20)	10 %			
C- (Agua)	5 %			
	1 %			

Nota. Resultados a las 48 h del antibiograma realizado en *F. oxysporum* con los aceites esenciales de *T. minuta*, *M. mollis* y *C. tomentosum* al 25, 10, 5 y 1 %.

La figura indica los halos de inhibición que se formaron en los cultivos de *F. oxysporum* con los diferentes tratamientos de concentración y aceites esenciales evaluados. Los halos de inhibición se observaron claramente a la concentración del 25 % del aceite esencial de *C. tomentosum* y *M. mollis*. Al 10 % se observó halos de inhibición únicamente para el aceite esencial de *M. mollis*, indicando que este aceite genera sensibilidad en el hongo a concentraciones menores que *C. tomentosum*.

En el control C- del eluyente (Tween 20), el hongo creció normalmente (Fig 3.5), esto indica que la formación de los halos de inhibición observados son producto del efecto de los aceites esenciales en el crecimiento de *F. oxysporum*.

La Tabla 3.5 muestra las medidas de los halos obtenidos en los antibiogramas realizados con los distintos tratamientos en *F. oxysporum*. Los aceites esenciales de *C. tomentosum* y *M. mollis* a la concentración de 25 % y el control positivo formaron halos de inhibición de aproximadamente 15.79, 35.28 y 14.12 mm de diámetro respectivamente. Al 10 % de concentración se observó halos de inhibición únicamente para el aceite de *M. mollis* con un diámetro de 16.12 mm. Según el tamaño del halo de inhibición se asigna una de las categorías de la escala de Duraffourd para determinar el nivel de sensibilidad de los tratamientos. En esta escala existen cuatro categorías: resistente (-), sensible (+), muy sensible (++) y altamente sensible (+++) (revisar el detalle de la escala Duraffourd en Tabla 2.2).

Tabla 3.5

Medias de diámetros de los halos de inhibición [mm] en Fusarium oxysporum

Tratamientos	<i>T. minuta</i>	<i>C. tomentosum</i>	<i>M. mollis</i>	C+	C-	C--
25 %	6 -	15.79 ++	35.28 +++			
10 %	6 -	6 -	16.12 ++	14.12 ++	6 -	6 -
5 %	6 -	6 -	6 -			
1 %	6 -	6 -	6 -			

Nota. Sensibilidad de *F. oxysporum* a los aceites esenciales evaluados. Simbología: Resistente (-), Sensible (+), Muy sensible (++) y Altamente Sensible (+++).

En la tabla se puede observar que el hongo presentó dos categorías de sensibilidad: muy sensible y altamente sensible. En los tratamientos evaluados se observó que *F. oxysporum* fue muy sensible a los aceites esenciales de *C. tomentosum* al 25 %, *M. mollis* al 10 % y el control positivo. Solamente para el aceite esencial de *M. mollis* al 25 % se determinó que el hongo es altamente sensible.

Es importante mencionar que *F. oxysporum* presentó resistencia a varios tratamientos aplicados. Los tratamientos a los que el hongo demostró ser resistente fueron al aceite esencial *T. minuta* en todas las concentraciones evaluadas y al aceite de *C. tomentosum* a concentraciones de 10, 5 y 1 %. En el caso del aceite esencial de *M. mollis* solo se presentó resistencia a concentración de 1 y 5 %. Estos resultados sugieren que el aceite esencial de *M. mollis* es el mejor tratamiento para generar sensibilidad en el hongo (Tabla 3.5).

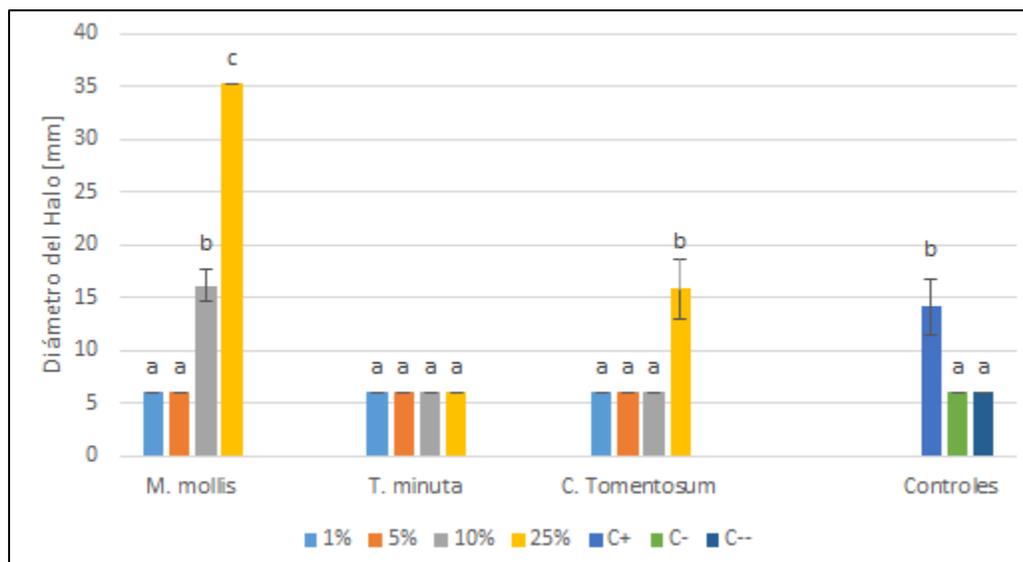
Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente utilizando la prueba de Kruskal – Wallis con un nivel de significancia de 0.05. El análisis de los supuestos de normalidad y de homocedasticidad de los datos, así como el análisis de Kruskal – Wallis se muestran en los Anexos 1 y 2 respectivamente.

La prueba de Kruskal – Wallis manifiesta que el p-valor (0.0001) es menor al nivel de significancia (0.05). Los datos estadísticos permiten rechazar la hipótesis nula (H_0) y aceptar la hipótesis alternativa (H_a), es decir que la inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* es dependiente de la concentración de los aceites esenciales (Anexo 2).

La figura 3.6 se observa la formación de halos de inhibición en los cultivos de *F. oxysporum* luego de la aplicación de los aceites esenciales de *T. minuta*, *C. tomentosum* y *M. mollis* a diferentes concentraciones (1, 5, 10 y 25 %).

Figura 3.6

Efecto inhibitorio de los aceites esenciales en Fusarium oxysporum



Nota. Efecto inhibitorio de los aceites esenciales *M. mollis*, *T. minuta* y *C. tomentosum* a concentraciones de 1, 5, 10 y 25% en la esporulación de *F. oxysporum*. Los valores con diferente letra muestran diferencias significativas (p-valor > 0.05).

El análisis estadístico determinó que el tratamiento que formó el mayor halo de inhibición fue el aceite esencial de *M. mollis* al 25 %, mientras que *C. tomentosum* a la misma concentración y el control positivo presentaron halos de menor tamaño. En el caso del aceite de *T. minuta* en todas las concentraciones evaluadas presentaron crecimiento del hongo en el medio de cultivo sin formar halos de inhibición. Los resultados indican que la concentración del 25 % del aceite esencial de *M. mollis* presenta mayor potencial antifúngico que los de *C. tomentosum* y *T. minuta*, siendo su desempeño superior al del control positivo (Fig 3.6).

Adicionalmente, se evidenció que el aceite esencial de *M. mollis* al 10 % formó un halo de inhibición de aproximadamente 16.12 mm de diámetro, mientras que en *C. tomentosum* a la misma concentración no hubo inhibición (Fig 3.6). Lo que indica que se necesita menor cantidad de aceite esencial de *M. mollis* que de *C. tomentosum* para generar mayor sensibilidad en el hongo. Este resultado muestra la capacidad del aceite esencial de *M. mollis* para inhibir el crecimiento micelial de *F. oxysporum* inclusive a bajas concentraciones.

Los resultados analizados demuestran la importancia de optimizar la concentración de los aceites esenciales de tal manera que se encuentre la menor concentración que provoque un grado de sensibilidad significativo.

La optimización de la concentración del aceite esencial se realizó mediante modelos matemáticos para cada uno de los aceites empleados, estos describen la formación de los halos de inhibición en cultivos de *F. oxysporum* según la cantidad del aceite aplicado. El Anexo 3 indican las pruebas estadísticas donde se evidencia la significancia para cada factor de la ecuación y su respectivo ajuste. Los modelos se detallan a continuación:

Donde:

y : Diámetro del halo

x : Concentración del aceite esencial

- Modelo *M. mollis*:

$$y = 0.0038x^2 + 1.21x + 2.93 \quad (3.7)$$

- Modelo *C. tomentosum*:

$$y = 0.01x^2 + 0.24x + 4.81 \quad (3.8)$$

Para obtener las concentraciones óptimas de inhibición se fija un parámetro en los modelos para resolver las ecuaciones. El parámetro a fijar es el diámetro del halo de inhibición. De acuerdo a los estándares de CLSI y a Duraffourd se establece que la concentración óptima para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos es aquella capaz de generar un halo de inhibición de al menos 12 mm de diámetro. La Tabla 3.6 presenta los valores obtenidos.

Tabla 3.6

Concentraciones óptimas para inhibir el crecimiento Fusarium oxysporum

Aceite Esencial	Concentración Óptima
<i>M. mollis</i>	7.33 %
<i>C. tomentosum</i>	17.38 %

Nota. Menor concentración requerida de aceites esenciales a la que *F. oxysporum* es sensible. No se realizó el modelo para *T. minuta*, puesto que el hongo es resistente a este aceite.

Los análisis muestran que *M. mollis* es el aceite esencial que requiere menor concentración para provocar que el hongo sea muy sensible. Se estima que la aplicación de una concentración de 7.33 % formará un halo de inhibición de al menos 12 mm de diámetro, indicando que a esta concentración el crecimiento del hongo deberá inhibirse en condiciones *in vitro* (Tabla 3.6).

En relación a la esporulación de *F. oxysporum*, en la Tabla 3.7 se observa los porcentajes de inhibición en la germinación de esporas por cada tratamiento. En el ensayo se realizó el conteo de esporas en los cultivos del hongo con los aceites esenciales de *T. minuta*, *C. tomentosum* y *M. mollis* a concentraciones de 1, 5, 10 y 25 %.

Tabla 3.7

Porcentajes (%) de inhibición de germinación de esporas de Fusarium oxysporum

Tratamientos	<i>T. minuta</i>	<i>C. tomentosum</i>	<i>M. mollis</i>	C+	C -	C--
25 %	17.99	37.27	95.10			
10 %	15.79	20.53	42.73	21.15	1.87	0
5 %	16.05	18.82	19.20			
1 %	16.51	18.46	12.40			

Nota. Porcentajes de inhibición de la germinación de esporas de *F. oxysporum* provocada por los aceites esenciales evaluados.

La tabla presenta los tratamientos del aceite esencial de *M. mollis* con los mejores resultados. La inhibición de la germinación de esporas generada por el aceite de *M. mollis* fue superior a la de *T. minuta* y *C. tomentosum* a concentraciones de 10 y 25 %. El porcentaje de inhibición provocado por el aceite de *M. mollis* a estas concentraciones fue del 42.73 y 95.10 % respectivamente.

El análisis estadístico del conteo de esporas se realizó mediante las pruebas ANOVA y de Tukey para comprobar su significancia. Las pruebas estadísticas se realizaron con un nivel de significancias de 0.05.

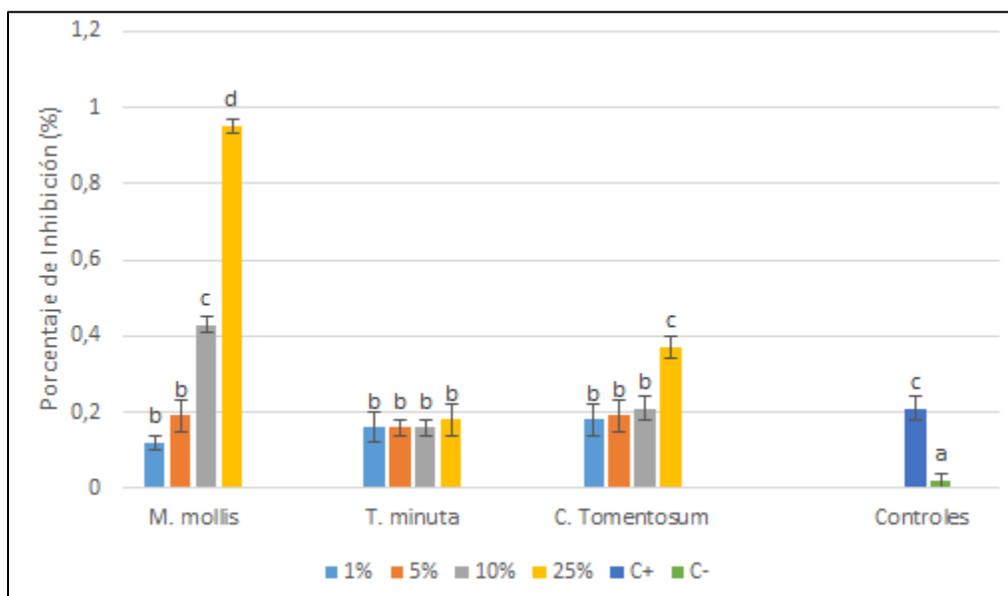
El análisis de los supuestos de normalidad y de homocedasticidad de los datos, así como el análisis ANOVA y la prueba de Tukey se muestra en los Anexos 4 y 5 respectivamente.

La prueba ANOVA manifiesta que el p-valor (0.0001) es menor al nivel de significancia (0.05). Estos datos estadísticos permiten rechazar la hipótesis nula (H_0) y aceptar la hipótesis alternativa (H_a), es decir que la inhibición de la germinación de esporas de *F. oxysporum* es dependiente de la concentración de los aceites esenciales (Anexo 5).

La figura 3.6 indica el efecto inhibitorio de los aceites esenciales de *T. minuta*, *C. tomentosum* y *M. mollis* a concentraciones de 1, 5, 10 y 25 % en la germinación de esporas en cultivos de *F. oxysporum*.

Figura 3.7

Efecto inhibitorio de los aceites esenciales en la germinación de esporas de Fusarium oxysporum



Nota. Efecto inhibitorio de los aceites esenciales *M. mollis*, *T. minuta* y *C. tomentosum* a concentraciones de 1, 5, 10 y 25 % en la esporulación de *F. oxysporum*. Los valores con diferente letra muestran diferencias significativas (p -valor > 0.05).

El análisis estadístico determinó que el tratamiento que generó el mayor porcentaje de inhibición de la germinación de esporas fue el aceite esencial de *M. mollis* a la concentración del 25 %, inhibiendo la esporulación en un 95.10 %. Además, la concentración del 10 % generó un efecto comparable a lo observado con la del 25 % del aceite esencial de *C. tomentosum* y al control positivo (Fig 3.7). Estos resultados muestran la eficacia del aceite esencial de *M. mollis* para inhibir la esporulación de *F. oxysporum* en relación a los otros tratamientos evaluados, inclusive a menor concentración.

Adicionalmente, se evidenció que a medida que se aumenta la concentración de los aceites esenciales aumenta el porcentaje de inhibición en la esporulación de *F. oxysporum*, sugiriendo que la germinación de esporas es mayormente inhibida a altas concentraciones. En el caso de *T. minuta* no se observó esta inhibición, por lo que tras el análisis estadístico no existieron diferencias significativas entre las diferentes concentraciones aplicadas (Fig 3.7).

La estimación de la inhibición de esporulación del hongo se realizó mediante modelos matemáticos para cada uno de los aceites empleados. En el Anexo 6 se encuentran las pruebas estadísticas donde se evidencia la significancia para cada factor de la ecuación y su respectivo ajuste. Los modelos se detallan a continuación:

Donde:

y : % de inhibición de esporas

x : Concentración de aceite esencial

- Modelo *T. minuta*:

$$y = 0.0007x + 0.16 \quad (3.9)$$

- Modelo *M. mollis*:

$$y = 0.04x + 0.06 \quad (3.10)$$

- Modelo *C. tomentosum*:

$$y = 0.01x + 0.15 \quad (3.11)$$

Como vemos en la Ecuación 3.9 la variable regresora está multiplicada por un factor que tiende a cero, es decir que independientemente de la concentración que se

utilice este valor no influencia sobre el porcentaje de inhibición que se puede obtener. Lo que sugiere que el porcentaje de inhibición de la germinación de esporas se mantiene constante a medida que aumenta la concentración del aceite esencial de *T. minuta*.

Para estimar los porcentajes de inhibición de la germinación de esporas, se introdujo en las ecuaciones la concentración óptima de inhibición de cada aceite esencial calculada anteriormente. En la Tabla 3.8 se presentan los valores obtenidos.

Tabla 3.8

Estimación de Porcentajes de inhibición de esporas a concentraciones óptimas para inhibir el crecimiento de Fusarium oxysporum

Aceite Esencial	Concentración Óptima	Inhibición de esporas
<i>M. mollis</i>	7.33 %	35 %
<i>C. tomentosum</i>	17.38 %	32 %

Nota. Estimaciones de los porcentajes de inhibición de esporas de *F. oxysporum* mediante modelos matemático desarrollados a concentraciones óptimas que generan sensibilidad.

El análisis indica que los porcentajes de inhibición de esporas a la concentración óptima calculada, para obtener un diámetro de inhibición de al menos 12 mm como valor de referencia de inhibición del hongo.

El porcentaje de inhibición obtenido entre el 32 al 35 % a partir de la concentración óptima de los aceites esenciales insinúa una clara disminución en la esporulación y por ende en el crecimiento del hongo. Al analizar los resultados se observa que el aceite de *M. mollis* a la concentración del 7.33 % es la menor

concentración empleada que logra la inhibición fúngica, lo que sugiere la eficiencia de este aceite para el control de *F. oxysporum* (Tabla 3.8).

Discusión

Esta investigación se enfoca en la búsqueda de alternativas para el control de *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum*.

Aspergillus niger y *Fusarium oxysporum* son hongos fitopatógenos con una amplia gama de hospederos. A nivel mundial han contaminado numerosas plantaciones de cultivos como tomate, lechuga e inclusive algunos frutos entre los como la naranja, manzano, uva y el plátano, además de granos como maíz y arroz (Torres & Acuña, 1995; Acuña & Díaz, 2005; Arrua, 2013; Fon, Barzola, & Morán, 2016; Vásquez & Castaño, 2017; Parra, Quiroga, & Giménez, 2018).

Aspergillus niger representa un problema adicional, ya que produce micotoxinas que pueden afectar al ser humano. Las toxinas son tan resistentes que se conservan en la carne del animal y en los subproductos como leche, queso y yogurt. Cuando un humano consume estos alimentos contaminados puede experimentar inmunosupresión, desbalances hormonales e inclusive desarrollar cáncer en hígado y pulmón (Liu & Wu, 2010; Carvajal, Berumen, & Guardado, 2012).

Se han desarrollado distintos agroquímicos sintéticos en contra de estos fitopatógenos, pero varias investigaciones muestran que los hongos pueden desarrollar resistencia y que además son tóxicos para el ser humano (Maldonado, Santa, & Navarro, 2005; San Juan, Fernández, & Almague, 2017).

Varias estrategias se han propuesto para resolver este problema, entre estas se ha planteado el uso de microorganismos antagonistas, aunque se ha demostrado que tiene limitaciones por las consecuencias que puede generar su aplicación en el ecosistema (Van Driesche, Hoddle, & Center, 2007).

Debido a las razones mencionadas, esta investigación busca demostrar el efecto *in vitro* de los aceites esenciales de *Tagetes minuta*, *Minthostachys mollis* y *Clinopodium tomentosum* para inhibir el crecimiento de estos hongos contribuyendo como una alternativa para el control de *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum*.

Metabolitos secundarios que generan actividad antifúngica

Las plantas con actividad antifúngica se caracterizan por tener aceites esenciales con terpenoides altamente liposolubles como: mentona, piperitenona, limoneno, β -felandreno, (Z)- β -ocimeno, pulegona, carvona, timol y α -pineno. Estudios sobre metabolitos secundarios han evidenciado que debido a su carácter hidrofóbico estas moléculas interactúan con los lípidos de la pared y membrana celular del hongo para inhibir su desarrollo (Russo, 2011; Rajesh, 2014; Cussa, 2017; Quispe, 2017).

Estos metabolitos secundarios son capaces de atravesar la pared celular del hongo hasta llegar a la membrana celular constituida por ergosterol y quitinas sintetasas. Estos metabolitos son capaces de unirse al ergosterol de la membrana plasmática provocando daños en su fisiología, generando la formación de un poro, que permite un flujo descontrolado de iones, azúcares y agua hasta provocar la destrucción de la célula. Así mismo, estos principios activos son capaces de afectar la enzima quitina sintetasa provocando la inhibición de la producción de quitina, que es vital para el proceso de gemación, formación de hifas y conidióforos, lo que influye directamente en el crecimiento y división celular del hongo (Tapia, 2005; Pellegrini, Alonso-Salces, Umpierrez, & Rossini, 2017).

Los mecanismos de reacción de los monoterpenos para provocar la actividad antifúngica a nivel de membrana se deben a dos principales razones, la afinidad de interacción ergosterol-monoterpeno y la despolarización de la membrana (Arfa,

Combes, Preziosi-Belloy, Gontard, & Chalier, 2006; Rao, Zhang, Muend, & Rao, 2010; Miron, Battisti, & Silva, 2014).

Estudios de Miron, Battisti y Silva (2014), quienes utilizaron la microscopía electrónica de barrido y la microscopía electrónica de transmisión, observaron reducción del espesor y degradación de la membrana en presencia de monoterpenos, la actividad biológica de estos sobre el constituyente de la membrana, ergosterol, puede deberse a que tiene como precursor a una molécula terpenoide (escualeno). Es probable que debido a la relación química entre las dos moléculas, cuenten con afinidad reactiva (Devlin, 2004). Los monoterpenos, por su naturaleza lipofílica, disuelven la membrana celular al romper los enlaces de los fosfolípidos (Torrenegra, Alarcón, & Durán, 2016), grupos fosfatos son liberados para fosforilar doblemente a un carbono del monoterpeno. Mediante una rotura heterolítica el pirofosfato sale de la molécula terpenoide, generando un carbocatión muy reactivo que sufre un ataque nucleofílico del doble enlace de la cadena alifática del ergosterol. De esta manera ergosterol y un monoterpeno quedan unidos pudiendo continuar uniéndose a otros monoterpenos, logrando desestabilizar la membrana celular y provocar la muerte del hongo (Lamarque, 2008; Claramunt & Farrán, 2013).

Estudios de Arfa y colaboradores (2006), sugieren que los monoterpenos oxigenados son más reactivos contra los hongos, puesto que, son capaces de generar un grupo hidroxilo. El monoterpeno mueve al hidroxilo cerca de la membrana donde se disocia liberando un protón (H^+). La acumulación de protones despolariza la membrana, provocando la apertura de los canales de sodio (Na^+) y el aumento de la permeabilidad de la célula hasta que revienta.

Rao y colaboradores (2010), sugieren que los terpenos también podrían provocar la muerte del hongo a nivel transcripcional. Concentraciones entre 0.01 y

0.005 % de carvacrol estimularon la transcripción de genes relacionados a la autofagia de hongos (ATG1, PBN1, COX20, SNX4, LAP4 y STE13) e inhibieron genes relacionados a la división celular fúngica (RPF2, DBP6, LHP1 y URA7).

Por las evidencias científicas existentes, esta investigación evaluó el potencial antifúngico de los aceites esenciales de *Tagetes minuta*, *Minthostachys mollis* y *Clinopodium tomentosum* para inhibir el crecimiento de hongos.

En este trabajo se pudo observar que los aceites esenciales de las plantas evaluadas de *Tagetes minuta*, *Minthostachys mollis* y *Clinopodium tomentosum* lograron inhibir el crecimiento de *Aspergillus niger* al aplicarlos a concentraciones del 25, 50, 75 y 100 %, posiblemente debido a los componentes terpenoides que son capaces de inhibir el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos.

Los resultados concuerdan con investigaciones realizadas por Nasser, Farukh y Saeed (2014) y la caracterización química del aceite esencial de *Tagetes minuta*, donde se identificó la presencia de moléculas con carácter antifúngico como el limoneno y (Z)- β -ocimeno. Estudios realizados por Campo y Ambuludi (2017) sobre el aceite esencial de *Minthostachys mollis* mencionan la identificación de ocho moléculas de importancia antifúngica: mentona, piperitenona, limoneno, β -felandreno, pulegona, carvona, timol y α -pineno. Investigaciones de Moncayo (2020) con el aceite esencial de *Clinopodium tomentosum* detallan la identificación de seis moléculas con potencial antimicótico como mentona, piperitenona, limoneno, pulegona, timol y α -pineno.

Es fundamental recalcar la importancia de realizar ensayos preliminares para la búsqueda de plantas con potencial antifúngico. En relación a los resultados obtenidos con el aceite esencial de *Dalea coerulea*, los ensayos permitieron descartar este aceite debido a que no inhibió el crecimiento del hongo *A. niger* en el medio de cultivo.

Estudios de Benites, Rijo, & Bravo (2016) mencionan haber identificado terpenoides con actividad antifúngica como: limoneno, (*Z*)- β -ocimeno, β -felandreno y α -pineno en *Dalea strobilacea*. Sin embargo, con respecto *Dalea coerulea* no existen evidencias sobre la caracterización química del aceite esencial, por lo que es probable que esta especie no cuente con los mismos principios activos que poseen actividad antifúngica, explicando posiblemente la inactividad en el crecimiento del hongo por el aceite de *Dalea coerulea*.

Al analizar la composición química de los aceites esenciales de *T. minuta*, *M. mollis* y *C. tomentosum* se comprobó que el limoneno se encontraba presente en las tres especies. Este principio activo puede ser la razón de la inhibición del crecimiento de los hongos ya que se lo ha descrito en varias investigaciones por su actividad antifúngica (Nasser, Farukh, & Saeed, 2014; Campo & Ambuludí, 2017; Moncayo, 2020). Investigaciones realizado por Chee, Kim, & Hee Lee (2009) sugieren que extractos de limoneno a concentraciones del 0.5 % provocan fuerte inhibición en el crecimiento micelial de *Trichophyton rubrum*. Así mismo, estudios realizados por Archana y colaboradores (2018) demostraron que este terpenoide es capaz de inducir apoptosis en el hongo *Candida albicans*, por lo que el limoneno es un principio activo candidato para ser estudiado en el control de hongos fitopatógenos.

Efecto de los aceites esenciales de *T. minuta*, *M. mollis* y *C. tomentosum* sobre el crecimiento *in vitro* de *A. niger* y *F. oxysporum*

En esta investigación se evidenció mediante los antibiogramas el efecto de los aceites esenciales de *T. minuta*, *C. tomentosum* y *M. mollis* sobre el crecimiento de los hongos *A. niger* y *F. oxysporum*, mediante la formación de halos de inhibición con los diferentes tratamientos aplicados.

El aceite esencial de *Minthostachys mollis* generó sensibilidad en *Aspergillus niger* a concentraciones de 25,10 y 5 %, mientras que en *Fusarium oxysporum* generó sensibilidad a concentraciones de 25 y 10 %. Estos resultados concuerdan con los demostrados por Stashenko y Durán (2009) quienes evaluaron la actividad antifúngica de *M. mollis* contra especies de *Aspergillus* y observaron fuertes inhibiciones del aceite esencial en el crecimiento micelial. Así mismo, estos resultados concuerdan con estudios realizados por Quispe (2017) quien reportó que *Fusarium* sp. era altamente sensible el aceite esencial de *M. mollis* a partir del 20 % de concentración.

Con el aceite esencial de *Clinopodium tomentosum* se observó sensibilidad en *A. niger* a concentraciones del 25 y 10 %, mientras que en *F. oxysporum* se observó sensibilidad al 25 % de concentración. Estos resultados concuerdan con la investigación realizada por Debbabi & El Mokni (2020), quienes evaluaron el potencial antifúngico del aceite esencial de varias especies de *Clinopodium* y observaron que especies de *Aspergillus* eran sensibles a este aceite en condiciones *in vitro*. Igualmente, estos resultados concuerdan con la investigación de Cárdenas (2014) quien evidenció que el aceite esencial de *Clinopodium* spp. provocó fuerte inhibición en el crecimiento de *Fusarium* sp. Además, Tomaylla, Jiménez y Merma (2020) confirman el potencial antifúngico de especies de *Clinopodium*, ya que el aceite esencial de *Clinopodium brevicalyx* inhibió la reproducción del hongo *Trichophyton rubrum* a concentraciones del 1 al 50 %.

En relación a los tratamiento del aceite esencial de *T. minuta*, solo a la concentración del 25 % se observó que *Aspergillus niger* fue sensible. Los resultados concuerdan con los resultados de Zygadio, Guzmán y Grosso (2011) quienes determinaron que el potencial antifúngico del aceite esencial de *T. minuta* provocó una toxicidad media en el hongo *Alternaria solani*. Corroborado además por López, Peña y

Beryl (2018) al analizar el aceite esencial de *Tagetes* provocaba sensibilidad en hongo *A. niger*, al observarse una reducción del crecimiento micelair del 21 %. En general se observó una menor sensibilidad de *A. niger* y *F. oxysporum* a la aplicación del aceite esencial de *T. minuta* en comparación a los otros aceites eseciales estudiados. Según Nasser, Farukh y Saeed (2014) esto puede deberse a que en *T. minuta* se ha identificado apenas dos terpenoides con actividad antifúngica, mientras que en los demás aceites evaluados se han descrito al menos seis, que pueden interactuar entre si incrementando el potencial antifúngico.

En resumen, en esta investigación se evidenció que el aceite esencial de *M. mollis* presenta el mayor potencial antifúngico, seguido por *C. tomentosum*. Los aceites esenciales de estas dos especies cuentan con similares moléculas terpenoides con actividad antifúngica. Posiblemente el mejor resultado obtenido en *M. mollis* se debe a la carvona, identificado únicamente en esta especie (Campo & Ambuludí, 2017; Moncayo, 2020). Esto sugiere, que la carvona puede provocar que el aceite esencial de *M. mollis* genere mayor sensibilidad en *A. niger* y *F. oxysporum*. La importancia antifúngica de esta molécula concuerdan con la investigación de Morcia y Malnati (2012), quienes identificaron que extractos de carvona a concentraciones entre 0.01 y 0.1 % generaron una fuerte inhibición en el crecimiento miceliar de *F. oxysporum* y *Aspergillus* spp.

El factor que incrementa la inhibición del crecimiento del hongo es la disminución en la germinación de esporas. En relación a los ensayos de concentración de los aceites esenciales realizados sobre la esporulación, se evidenció que a medida que se aumenta la concentración del aceite disminuye la germinación de esporas. Se alcanzaron porcentajes de inhibición de esporas de hasta 99.18 % para *A. niger* y 95.10 % para *F. oxysporum*. Estos resultados concuerdan con el estudio de Vásquez y

colaboradores (2013), quienes evaluaron el efecto de los aceites esenciales de *Chenopodium album* a diferentes concentraciones sobre la germinación de esporas de *Fusarium* spp, observando que a medida que aumentaba la concentración del aceite de *Chenopodium album* este reducía la esporulación del hongo hasta un 100 %. Según Tapia (2005) la inhibición de la germinación de esporas puede deberse a los terpenoides presentes en la muestra, interfiriendo con la función de la quitina sintetasa. Esta enzima posiblemente deja de sintetizar la quitina necesaria para formar conidióforos, lo que influye directamente sobre la cantidad de esporas que se producen y sobre la reproducción del hongo.

Según los resultados obtenidos en esta investigación, el aceite esencial de *M. mollis* es una buena alternativa para el control *in vitro* de hongos fitopatógenos como *A. niger* y *F. oxysporum*, debido a la inhibición en el crecimiento y reducción de la esporulación en los ensayos realizados. Además muestra la importancia de evaluar la actividad antifúngica de aceites esenciales de diferentes plantas para el control de hongos fitopatógenos.

Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos sobre la evaluación de la actividad antifúngica de los aceites esenciales de *Tagetes minuta*, *Clinopodium tomentosum* y *Minthostachys mollis* para el control *in vitro* de *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum*, se puede concluir lo siguiente:

- Los ensayos preliminares a altas concentraciones de 25 al 100 % de aceites esenciales permitieron detectar rápidamente la actividad antifúngica de los metabolitos secundarios de *M. mollis*, *C. tomentosum* y *T. minuta*.
- Las concentraciones óptimas de inhibición de los aceites esenciales de *M. mollis*, *C. tomentosum* y *T. minuta* mediante la técnica de difusión de disco se estimó mediante modelos matemáticos que describen el comportamiento de los datos recopilados.
- Según el modelo matemático, para inhibir el crecimiento del hongo *A. niger* se necesitaría de al menos 4.41, 9.01 y 15.97 % de aceite de *M. mollis*, *C. tomentosum* y *T. minuta* respectivamente. En relación a *F. oxysporum* se necesitaría de al menos 7.33 y 17.38 % de aceite de *M. mollis* y *C. tomentosum* respectivamente.
- Mediante la técnica de antibiograma se evidenció un claro efecto inhibitorio de los aceites esenciales sobre el crecimiento micelial de los hongos. En *A. niger* los aceites esenciales de *M. mollis*, *C. tomentosum* y *T. minuta* al 25 % provocaron la formación de halos de inhibición de 35.28, 25.71 y 17.69 mm de diámetro respectivamente. En *F. oxysporum* la misma concentración de los aceites de *C. tomentosum* y *M. mollis*

indujeron la formación de halos de inhibición de 15.79 y 35.28 mm respectivamente.

- La reducción en la germinación de esporas es un factor fundamental para inhibir el crecimiento de los hongos. La concentración al 25 % de los aceites *M. mollis*, *C. tomentosum* y *T. minuta* inhibió la esporulación en *A. niger* entre un 56 al 99 % y en *F. oxysporum* entre un 18 al 95 %.
- La concentración del 25 % de aceite esencial de *M. mollis* fue el tratamiento que provocó la mayor inhibición del crecimiento micelial y la reducción de la germinación de esporas en los hongos *A. niger* y *F. oxysporum*, mostrando que esta planta posee principios activos con un elevado poder antifúngico.
- Las concentraciones del 5 y 10 % de aceite esencial de *M. mollis* presentaron mayor actividad antifúngica que los aceites de *C. tomentosum* y *T. minuta* a las mismas concentraciones, sugiriendo que el aceite esencial de *M. mollis* es una posible alternativa para el control de hongos fitopatógenos como *A. niger* y *F. oxysporum*.

Este trabajo deja las bases de una metodología estandarizada para evaluar en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la ESPE la actividad antifúngica de aceites esenciales mediante la técnica de difusión de disco.

Recomendaciones

En futuras investigaciones relacionadas con el estudio de la actividad antifúngica de aceites esenciales se recomienda lo siguiente:

- Utilizar concentración de aceites esenciales entre 25 y 15 % para los ensayos de detección de actividad antifúngica para minimizar la cantidad de AE en la fase de selección.
- Realizar la caracterización química de los aceites esenciales para confirmar la presencia de principios activos responsables de la actividad antifúngica reportados en otras investigaciones.
- Evaluar la actividad antifúngica de los aceites esenciales de *Minthostachys mollis* y *Clinopodium tomentosum* con otros hongos, para incrementar las evidencias científicas del potencial antifúngico.
- Validar en el laboratorio el nivel de predicción de los modelos matemáticos desarrollados para estimar la actividad antifúngica de los aceites esenciales de *M. mollis* y *C. tomentosum*.
- Evaluar la actividad antifúngica de los aceites esenciales de *Minthostachys mollis* y *Clinopodium tomentosum* en condiciones *in vivo*.
- Estudiar la ruta metabólica y los genes que intervienen en la síntesis de los principios activos con actividad antifúngica para potenciar mediante transformación genética su producción.

Bibliografía

- Acuña, C., & Díaz, G. (2005). Aflatoxins en maíz: Reporte de caso en la costa atlántica. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, ISSN: 0120-2952.
- Aigaje, A. (2016). *Efectividad antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Tipo) al 25, 50, 100 % frente a *Porphyromonas gingivalis* estudio in vitro (Tesis de Pregrado)*. Quito: Universidad Central del Ecuador.
- Amirova, K., Dimitrova, P., & Marchev, A. (2019). Clinopodium vulgare L. (wild basil) extract and its active constituents modulate cyclooxygenase-2 expression in neutrophils. *Food & Chemical Toxicology*, DOI: 10.1016/j.fct.2018.11.054 .
- Archana, T., Kodgire, S., Kazi, R., Mulange, S., & Patil, R. (2018). Limonene inhibits *Candida albicans* growth by inducing apoptosis. *Medical Mycology*, DOI: 10.1093/mmy/myx074.
- Arellano, M. J. (2018). *Detección de *Fusarium oxysporum* en cultivos de uvilla (*Physalis peruviana* L.) en la Sierra norte y centro del Ecuador (Tesis de Pregrado)*. Quito: Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Arfa, B., Combes, A., Preziosi-Belloy, L., Gontard, N., & Chalier, P. (2006). Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology*, 149-154.
- Arrua, A. (2013). *Aspergillus y Micotoxinas*. *ResearchGate*, <https://www.researchgate.net/publication/260991667>.
- Avendaño, C., Arbeláez, G., & Rondón, G. (2006). Control biológico del marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* en fríjol *Phaseolus*

vulgaris L., mediante la acción combinada de Entrophospora colombiana, Trichoderma sp. y Pseudomonas fluorescens. *Agronomía Colombiana*, 62-67.

Bauer, A., Kirby, W., Sherris, J., & Turck, M. (1966). Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *American Journal of Clinical Phatology*, 493-496.

Bazán, Y., & Benites, J. (2014). *Características farmacognósticas de las hojas y cuantificación de flavonoides totales del extracto fluido de Tagetes minuta L. (Huacatay) provenientes del caserío Pedregal, provicnica Trujillo, región La Libertad (Tesis de Pregrado)*. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo.

Belmont, R. (2009). *Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos*. Yautepec, Morelos: Centro de Desarrollo de Productos Bióticos.

Benites, J., Rijo, P., & Bravo, F. (2016). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of Peruvian Dalea strobilacea Barneby. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, <https://www.researchgate.net/publication/308914394>.

Benouali, D. (2016). *Extraction et identification des huiles essentielles*. Oran: Université des Sciences et de la Technologie D'Oran.

Benzo, M., Gilardonia, G., & Gandini, C. (2007). Determination of the threshold odor concentration of main odorants in essential oils using gas chromatography–olfactometry incremental dilution technique. *Journal of Chromatography*, DOI: 10.1016/j.chroma.2007.02.031.

Bernal, M., & Guzmán, M. (1984). El antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-Bauer. *Biomédica*, file:///C:/Users/Usuario/Downloads/1891-

Texto%20del%20manuscrito%20completo%20(cuadros%20y%20figuras%20insertos)-7206-1-10-20130814.pdf.

- Brunner, C., & Ayala, M. (2013). Obtención y caracterización de cultivos monospóricos de *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales : Clavicipitaceae) para genotipificación. *ResearchGate*, <https://www.researchgate.net/publication/288669838>.
- Bucio, V., Guzmán, O., & Peña, J. (2001). Aflatoxin synthesis in corn fields in Guanajuato, México. . *Revista Iberoamericana de Micología* 18, 83-87.
- Burzaco, A. (1992). *Estudio mediante cromatografía en capa fina de algunas mentas con pulegona: Mentha pulegium L. y Mentha cervina (L.) Fresen.* Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Bustamante, S. (2018). *Evaluación del potencial antifúngico de los extractos etanólicos de Phyllanthus niruri y Minthostachys mollis frente al hongo Botrytis cinerea.* Lima: 57.
- Campo, M., & Ambuludí, L. (2017). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb contra el *Staphylococcus aureus*. *Revista Cubana de Farmacia* , ISSN 1561-2988.
- Cano, C., Bonilla, P., Roque, M., & Ruiz, J. (2008). Actividad antimicótica in vitro y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (Muña). *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 298-301.
- Cañigueral, S., & Vanaclocha, B. (2004). Los Principios Activos de la Fitoterapia. En S. Cañigueral, & B. Vanaclocha, *Fitoterapia* (pág. 29). Barcelona: MASSON S.A.
- Cárdenas, J. (2014). *Control biológico de Fusarium en hortalizas de la parroquia de San Joaquín (Tesis de Pregrado).* Cuenca: Universidad del Azuay.

- Cariddi, L., & Panero, A. (2007). Inhibition of Immediate-Type Allergic Reaction by *Mintostachys verticillata* (Griseb.) Epling Essential Oil. *Journal of Essential Oil Research*, DOI: 10.1080/10412905.2007.9699257.
- Carvajal, M., Berumen, J., & Guardado, E. (2012). The presence of aflatoxin B1-FAPY adduct and human papilloma virus in cervical smears from cancer patients in Mexico. *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assess*, 258-268.
- Castro, E., Chavez, S., & Silva, E. (2019). Aceites esenciales de plantas nativas del Perú: Efecto del lugar de cultivo en las características fisicoquímicas y actividad antioxidante. *Scientia Agropecuaria*, DOI: 10.1016/j.chroma.2007.02.031 .
- Chaaban, A., Vera, M., & Carvalho. (2019). Tissue damage and cytotoxic effects of *Tagetes minuta* essential oil against *Lucilia cuprina*. *Experimental Parasitology*, DOI: 10.1016/j.exppara.2019.01.013 .
- Chee, H. Y., Kim, H., & Hee Lee, M. (2009). In vitro Antifungal Activity of Limonene against *Trichophyton rubrum*. *Mycobiology*, DOI: 10.4489/MYCO.2009.37.3.243.
- Claramunt, R., & Farrán, A. (2013). *Química Biorgánica y Productos Naturales: Unidad 2*. Madrid: UNED.
- CONABIO. (2020). *Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad*.
Obtenido de *Tagetes minuta* L.:
<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/tagetes-minuta/fichas/ficha.htm>
- Cussa, L. (2017). *Toxicidad del aceite esencial de Tagetes minuta* L. (Asteraceae) *obtenido de poblaciones silvestres y cultivadas*. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba.

- Dávila, M. (2011). *Efecto de la densidad de siembra sobre las características agronómicas y rendimiento en Tagetes minuta L. "huacatay", cultivado en la zona de Inca Roca - Distrito de Belén - Iquitos (Tesis de Pregrado)*. Iquitos: Universidad Nacional de la Amazonia Peruana.
- De García, C., & Caridad, M. (2012). Reproducción de hongos. En C. De García, & M. Caridad, *Biología de hongos* (págs. 68-95). Bogota: Universidad de los Andes.
- Debbabi, H., & El Mokni, R. (2020). Chemical Composition, Antifungal and Insecticidal Activities of the Essential Oils from Tunisian Clinopodium nepeta subsp. nepeta and Clinopodium nepeta subsp. glandulosum. *Molecules*, doi: 10.3390/molecules25092137.
- Devlin, T. (2004). Bioquímica . En T. Devlin, *Bioquímica con Aplicaciones Químicas* (pág. 742). New Jersey: Reverté S.A.
- Estupiñán, H. (2007). Efecto del agente causal de la marchitez vascular de la uchuva (physalis peruviana l.) el hongo fusarium oxysporumschlecht, sobre algunas solanáceas y otras especies cultivadas afectadas por formas especiales del microorganismo (Tesis de Pregrado). *Universidad Javriana*, 41-50.
- Fon, F., Barzola, S., & Morán, J. (2016). La prevalencia de Aspergillus spp. y aflatoxinas en Zea mays L.(maíz) almacenado en silos, en Ecuador. *Revista Publicando* , ISSN 1390-9304.
- Garcés, E. (2001). *Fusarium oxysporum. EL honho que nos falta conocer*. Cali: Universidad Nacional de Colombia.
- García. (2006). Actividad Antifúngica. *ResearchGate*, <https://www.researchgate.net/publication/316555184>.

- García, M., & Noval, A. (2001). Otomicosis: aspectos clínicos y microbiológicos. *Revista de Diagnóstico Biológico*, ISSN 0034-7973.
- García, P., García, R., Domínguez, I., & Noval, J. (2001). Otomicosis: aspectos clínicos y microbiológicos. *Revista de Diagnóstico Biológico*, ISSN 0034-7973.
- GEFOR. (2017). *Grupo de estudio para la formación y docencia en Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Obtenido de *Aspergillus niger*: <http://fundacionio.org/gefor/micologia/Aspergillus%20niger.html>
- Giarratana, F., Muscolino, D., & Ziino, G. (2017). Activity of *Tagetes minuta* Linnaeus (Asteraceae) essential oil against L3 *Anisakis* larvae type 1. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, DOI: 10.1016/j.apjtm.2017.05.005.
- Go, R., & Kim, C. (2017). Fludioxonil induced the cancer growth and metastasis via altering epithelial-mesenchymal transition via an estrogen receptor-dependent pathway in cellular and xenografted breast cancer models. *Environmental Toxicology*, DOI: 10.1002/tox.22337.
- Gómez, P. (2018). Productos Naturales : Metabolitos Secundarios y Aceites Esenciales. En P. Gómez, *Productos Naturales : Metabolitos Secundarios y Aceites Esenciales* (págs. 14-47). Bogotá: UNIAGRARIA.
- González, I., Arias, Y., & Peteira, B. (2012). Aspectos generales de la interacción *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*-tomate. *Revista de Protección Vegetal*, ISSN 1010-2752.
- Guerrero, P., & Pozo, K. (2016). *Evaluación de la actividad antioxidante bioautográfica de cinco variedades de aceites esenciales andinos (Tesis de Pregrado)*. Quito: Universidad Politécnica Salesiana.

- Guerrón, C. (2019). *Detección de alternaria alternata y fusarium spp. en el cultivo de uva (vitis spp.) en el Ecuador (Tesis de Pregrado)*. Quito: UDLA.
- Haider, I., & Javaid, A. (2015). Chemical control of collar rot disease of chickpea. *ResearchGate*, <https://www.researchgate.net/publication/276289612>.
- Hernández, M. (2018). *Efecto antifúngico del aceite esencial de Minthostachys Mollis (Muña) sobre las cepas de Cándida Albicans ATCC10231. Estudio In Vitro (Tesis de Pregrado)*. 2018: Universidad Central del Ecuador.
- Herrera, F. (2016). *Aislamiento, Caracterización Molecular y Análisis de Patogenicidad de Alternaria spp. sobre botones de Rosa (Rosa sp) y plantas de brócoli (Brassica oleracea var. Italica). (Tesis de Pregrado)*. Quito: Universidad San Francisco de Quito.
- Iacomí, B., & Avenot, H. (2004). In vitro fungicide sensitivity of Alternaria species pathogenic to crucifers and identification of Alternaria brassicicola field isolates highly resistant to both dicarboximides and phenylpyrroles. *Researchgate*, 481-488.
- Jiménez, M. d., Jiménez, R., & Navas, J. (2005). Evolución de "Fusarium oxysporum" f.sp. "ciceris", el agente de la Fusariosis vascular del garbanzo, en razas patogénicas y patotipos. *Boletín de sanidad vegetal. Plagas*, 59-70.
- Kelce, W. (1994). Environmental hormone disruptors: evidence that vinclozolin developmental toxicity is mediated by antiandrogenic metabolites. *AGRIS*, doi: 10.1006/taap.1994.1117.
- Klich, M. (2002). *Identification of Common Aspergillus Species*. Utrecht. The Netherlands: First edition. Centraalbureau voor Schimmelcultures, 166p. .

- Krijgsheld, P., & Bleichrodt, T. (2013). Development in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 10.3114/sim0006.
- Lamarque, A. (2008). Fundamentos teorico-practicos de quimica organica. En A. Lamarque, *Fundamentos teorico-practicos de quimica organica* (págs. 99-100). Cordova: Encuentro.
- Lara, D. (2009). Uso de bacterias endofíticas para el control biológico del Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. cubense) en el cultivar Gros Michel (AAA). *Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua*, 59.
- Lezcano, J., Martínez, B., & Alonso, O. (2012). Caracterización cultural y morfológica e identificación de diez aislamientos de *Fusarium* procedentes de semillas de *Leucaena leucocephala* cv. Perú almacenadas. *Pastos y Forrajes*, ISSN 0864-0394.
- Liu, Y., & Wu, F. (2010). Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. . *Environmental Health Perspectives* , 118:818-824. .
- Loera, P., Pérez, S., & López, C. (2016). Biodegradación de compuestos aromáticos. *Revista Iberoamericana de Ciencias* , <http://www.reibci.org/publicados/2016/dic/2000101.pdf>.
- López, E., Peña, M., & Beryl, M. (2018). Fungistasis del aceite esencial extraído de una población de *Tagetes lucida* de Hidalgo, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, volumen 9 número 2.
- López, M. (2008). *Toxicidad volátil de monoterpenoides y mecanismos bioquímicos en insectos plaga del arroz almacenado (Tesis de Doctorado)*. Murcia: Universidad de Murcia.

- López, M., & Tránsito, L. (2004). Los aceites esenciales. *Ámbito Farmacéutico Fitoterapia*, 88-91.
- Luna, P. (2009). Aceites esenciales métodos de extracción. *Temas Selectos de Ingeniería en Alimentos*, 24-32.
- Maldonado, A., Santa, R., & Navarro, R. (2005). Aislamiento, identificación y sensibilidad a antifúngicos de hongos patógenos y no patógenos del limón Isolation, identification and antifungal susceptibility of lemon pathogenic and non pathogenic fungi. *Revista Iberoamericana de Micología* 22, 57-59.
- Malmorejon, N. (2018). *Efecto de la concentración del aceite esencial de las hojas del tagetes minuta (huacatay) sobre su actividad antimicrobiana (Tesis de Pregrado)*. Lima: Universidad Alas Peruanas.
- Marcano, D., & Hasegawa, M. (2002). Terpenos. En D. Marcano, & M. Hasegawa, *Fitoquímica Orgánica* (págs. 237-244). Caracas: Universidad Central de Venezuela.
- Marcel, J. (2005). L'antibiogramme et son impact médical. *Antibiotiques*, [https://doi.org/10.1016/S1294-5501\(05\)80166-9](https://doi.org/10.1016/S1294-5501(05)80166-9).
- Martínez. (2003). *Aceites Esenciales*. Medellín: Universidad de Antioquia.
- Martínez, H., & Hernández, S. (2013). El Género *Aspergillus* y sus Micotoxinas en Maíz en México: Problemática y Perspectivas. *Revista mexicana de fitopatología*, ISSN 2007-8080.
- Mayolo, K., & Martínez, L. (2012). Técnicas cromatográficas y su aplicación a estudios de cambios conformacionales, estabilidad y replegamiento de proteínas. *Revista mexicana de ingeniería química*, ISSN 1665-2738.

- Mcpartland, T. (2003). *Francia Patente nº WO2004021787A1*.
- Méndez, J. (2001). Métodos de susceptibilidad antifúngica. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, ISSN 1017-8546.
- Merck. (6 de Junio de 2020). Merck. Obtenido de (S)-(+)-Carvone: https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/S+-Carvone,MDA_CHEM-818410?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F
- Miron, D., Battisti, F., & Silva, F. (2014). Antifungal activity and mechanism of action of monoterpenes against dermatophytes and yeasts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.10.014>.
- Mohammed, A., Rana, J., & Salam, A.-Z. (2018). Chemical profile and bioactive properties of the essential oil isolated from *Clinopodium serpyllifolium* (M.Bieb.) Kuntze growing in Palestine. *Industrial Crops and Products*, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.038>.
- Moncayo, A. (2020). *Caracterización de metabolitos secundarios de naturaleza esteroidea presentes en el aceite esencial y extractos etanólico y clorofórmico de la especie Clinopodium tomentosum(Kunth) Govaerts (Lamiaceae) (Tesis de Pregrado)*. Quito: Universidad Politécnica Salesiana.
- Mora, F., & Araque, M. (2009). Chemical composition and in vitro antibacterial activity of the essential oil of *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb Vaught from the Venezuelan Andes. *Natural Product Communication*, 997-1000.
- Morcía, C., & Malnati, V. (2012). In vitro antifungal activity of terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1,8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens. DOI: 10.1080/19440049.2011.643458 , DOI: 10.1080/19440049.2011.643458 .

- Moyne, A., Shelby, R., Cleveland, T., & Tuzun, S. (2001). Bacillo-mycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *Journal of Applied Microbiology* 90, 622-629.
- Nasser, A., Farukh, S., & Saeed, A.-S. (2014). Composition of Essential Oil from *Tagetes minuta* and its Cytotoxic, Antioxidant and Antimicrobial Activities. *Natural product communications*, <https://www.researchgate.net/publication/265208034>.
- National Center for Biotechnology Information. (12 de Octubre de 2019). *U.S. National Library of Medicine*. Obtenido de Vinclozolin: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vinclozolin>
- NCBI:txid169607. (13 de Enero de 2020). *Taxonomy Browser*. Obtenido de *Tagetes minuta* L.: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>
- NCBI:txid260606. (13 de Enero de 2020). *Taxonomy Browser*. Obtenido de *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb.: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>
- NCBI:txid332438. (13 de Enero de 2020). *Taxonomy Browser*. Obtenido de *Clinopodium tomentosum*: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>
- NCBI:txid5061. (13 de Enero de 2020). *Taxonomy Browser*. Obtenido de *Aspergillus niger*: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=5061&lvl=3&p=has_linkout&p=blast_url&p=genome_blast&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock
- NCBI:txid5507. (10 de Enero de 2020). *Taxonomy Browser*. Obtenido de *Fusarium oxysporum*:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=5507&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>

Ocampo, R., Ríos, A., & Betancur, L. (2008). Curso Práctico de Química Orgánica. En R. Ocampo, A. Ríos, & L. Betancur, *Curso Práctico de Química Orgánica* (pág. 39). Caldas: Universidad de Caldas.

Ochoa, J., & Fonseca, G. (2000). First Report of Fusarium Wilt of Babaco (*Carica x heilbornii* var *pentagona*) in Ecuador. *Revista Plant Disease.*, <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.2.199A>.

Onán, E. (2013). Evaluación de cuatro fungicidas para el control de fusarium oxysporum f. sp. pisi en el cultivo de arveja dulce (*Pisum sativum* L.). (Tesis de Pregrado). *Universidad Rafael Landívar*, 7-9.

Oña, M. (2015). *Identificación de la riqueza florística de la quebrada Guadalupe de la subcuenca del río Illuchi, cantón Latacunga, provincia Cotopaxi, período 2015*. Latacunga: Universidad Técnica de Cotopaxi.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2018). *Producción de Tomate Bajo Condiciones Protegidas*. Obtenido de Tabla 17. Listado de plaguicidas usados para el control de enfermedades en tomate: https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/13469/43123_50544.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Ortuño, M. (2006). Manual Práctico de Aceites Esenciales, Aromas y Perfumes. En M. Ortuño, *Manual Práctico de Aceites Esenciales, Aromas y Perfumes* (págs. 7-21). Madrid: AIYANA.

- Pantoja, A. (2017). Evaluación del Rendimiento, Composición y Actividad Antioxidante de Aceite de Semillas de Mora (*Rubus glaucus*) Extraído con CO₂ Supercrítico. *Información Tecnológica*, doi: 10.4067/S0718-07642017000100005.
- Parra, C., Quiroga, G., & Giménez, A. (2018). Aflatoxina b1 de *Aspergillus* spp generado en arroz, su detección y cuantificación por métodos fluorométricos y HPLC. *Revista Boliviana de Química*, ISSN 0250-5460.
- Pellegrini, M., Alonso-Salces, R., Umpierrez, M., & Rossini, C. (2017). Chemical Composition, Antimicrobial Activity, and Mode of Action of Essential Oils against *Paenibacillus* larvae, Etiological Agent of American Foulbrood on *Apis mellifera* . *Chemistry & Biodiversity*, DOI: 10.1002/cbdv.201600382 .
- Pemán, J. (2007). Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica. *Revista Iberoamericana de Micología*, ISBN: 978-84-611-8776-8.
- Petkar, A., Langston, D., Buck, J., Stevenson, K., & Ji, P. (2016). Sensitivity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* to Prothioconazole and Thiophanate-Methyl and Gene Mutation Conferring Resistance to Thiophanate-Methyl. *Plant disease*, <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-16-1236-RE>.
- Primo, V., Rovera, M., & Zanon, S. (2001). Determination of the antibacterial and antiviral activity of the essential oil from *Mintostachys verticillata* (Griseb.) Epling. *Revista Argentina de Microbiología*, 113-117.
- PROCIANDINO. (1993). *Experiencias del cultivo de maíz en el área andina* . Quito: PROCIANDINO.
- PubChem. (8 de Junio de 2020). *National Center for Biotechnology Information*. Obtenido de PubChem Database: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

- Pullupaxi, M. (2016). "Evaluación de *Trichoderma* para el control de *Fusarium oxysporum* en el cultivo de tomate riñon (*Lycopersicon esculentum*) (Tesis de Pregrado). Cevallos: Universidad Técnica de Ambato.
- Quispe, K. (2017). *Efecto antimicótico del aceite esencial de Minthostachys mollis (muña) en cepas de Fusarium sp (Tesis de Pregrado)*. Puno, Perú: Universidad Nacional del Altiplano.
- Rajesh, J. (2014). Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Plectranthus mollis* (Lamiaceae) de la región de los Ghats occidentales, Karnataka, India. *Revista de Biología Tropical*, ISSN 0034-7744.
- Rao, A., Zhang, Y., Muend, S., & Rao, R. (2010). Mechanism of Antifungal Activity of Terpenoid Phenols Resembles Calcium Stress and Inhibition of the TOR Pathway. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, DOI: 10.1128/AAC.01050-10.
- Reyes, W., Espinoza, V., R. F., Jiménez, C., Palacios, E., Hernández, J., & Ramírez, A. (2008). Occurrence of fungi and mycotoxins in corn silage, Jalisco State, México. *Revista Iberoamericana de Micología* 30, 18.
- Ripley, R. (2015). *Minthostachys mollis*. Naturalista.
- Rocha, S. (2014). Cáncer cutáneo por exposición ocupacional a agentes químicos. *Medicina y Seguridad del Trabajo*, <http://dx.doi.org/10.4321/S0465-546X2014000200013>.
- Rojas, A. (2016). *Efecto sinérgico in vitro del aceite esencial de Minthostachys mollis más fluconazol sobre Candida albicans ATCC 10231 (Tesis de Pregrado)*. Trujillo: Universidad Privada Anterior Orrego.
- Romo, M. (2016). *Clinopodium Tomentosum*. Ecuador: Flickr.

- Ruiz, I. (2018). *Aspergillosis pulmonar (Reporte de caso)*. Matanzas: Hospital Provincial Clínico Quirúrgico Docente José Ramón López Tabrane.
- Russo, E. (2011). Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. . *British Journal of Pharmacology*, 1344-1364.
- SAGARPA. (Mayo de 2018). *Mal de Panamá. Fusarium oxysporum f. sp. cubense (E.F. Sm.) W. C.* Obtenido de Ficha Técnica No. 2: <http://www.cesaveson.com/files/docs/campanas/vigilancia/fichas2016/MALDEPANAMA.pdf>
- San Juan, J., Fernández, C., & Almague, M. (2017). Sensibilidad in vitro de cepas cubanas de *Aspergillus* spp. de origen clínico y ambiental. *Biomédica*, 452-459.
- Sandborn, L. (1929). Menthone. *Organic Syntheses*, DOI: 10.15227/orgsyn.009.0052.
- Santacreu, H. (2017). *Tagetes minuta* L. PlantNet.
- Scaglia, H., & Chichizola, C. (2009). *Impacto de los disruptores endócrinos sobre la salud reproductiva masculina*. La Plata: Laboratorio de Determinaciones Hormonales, Hospital Italiano de Plata.
- Sepulveda, G. (2004). La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, ISSN: 0185-3309.
- Sgariglia, M., & Soberón, R. (2010). CROMATOGRAFÍA: CONCEPTOS Y APLICACIONES. *Revista Arakuku*, ISSN1853-3337.
- Shaharyar, M. (2017). Benzimidazoles: A biologically active compounds. *Arabian Journal of Chemistry*, <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.07.017>.

- Sharma, C., & Márquez, M. (2001). Determination of aflatoxins in domestic pet foods (dog and cat) using immunoaffinity column and HPLC. *Animal Feed Science and Technology* 93, 109-114.
- Sierra, M., & Vargas, R. (2006). Incremento de la actividad de mieloperoxidasa plasmática en pacientes con asma asociada a diabetes mellitus tipo 2. Indicador de mayor desequilibrio homeostático. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, ISSN 0187-7585.
- Sociedad Española de Enfermedades. (2000). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Obtenido de Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos:
<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>
- Stashenko, E., & Durán, C. (2009). Actividad antimicótica, citotoxicidad y composición de aceites esenciales de plantas de la familia Labiatae. *Universidad Industrial de Santander*, 1-8.
- Sun, J., Lu, X., & Zeng, P. (2007). Metabolic peculiarities of *Aspergillus niger* disclosed by comparative metabolic genomics. *Genome Biol*, DOI: 10.1186/gb-2007-8-9-r182.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). Metabolitos Secundarios. En L. Taiz, & E. Zeiger, *Fisiología vegetal* (pág. 533). Los Ángeles: Universtat Jaume.
- Tapia, C. (2005). Mecanismos de acción, reacciones adversas y nuevos antimicóticos. *Medwave*, doi: 10.5867/medwave.2005.04.3548.
- Tejada, Z., Ávila, E., & Casaubón, M. (2008). Biodetoxification of aflatoxin-contaminated chick feed. *Poultry Science*, 1569–1576,.

- Terralia. (2019). *Terralia Información Agrícola*. Obtenido de FLUDIOXONIL Técnico - Syngenta:
https://www.terralia.com/vademecum_de_productos_fitosanitarios_y_nutricionales/view_trademark?trademark_id=3433
- Thanassouloupoulos, C., Giannopolitis, C., & Kitso, G. (1971). Evaluation of Sensitiveness and Development of Resistance of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* to Benomyl. *Journal of Phytopatology*, 114-120.
- Tisserand R, Y. R. (2013). *Essential Oil Safety: A Guide for Health Care Professionals*. Londres: Churchill Livingstone Elsevier.
- Tisserand, R. (2007). El Arte del Aromaterapia. En R. Tisserand, *El Arte del Aromaterapia* (págs. 19, 227). Barcelona: Paidós.
- Tomaylla, C., Jiménez, C. d., & Merma, C. (2020). Actividad anti-Trichophyton rubrum del aceite esencial de Clinopodium brevicalyx y elaboración de una emulsión tópica. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, DOI: <http://dx.doi.org/10.18271/ria.2020.606>.
- Toro, D., & Martínez, Y. (2017). Análisis preliminar de los metabolitos secundarios de polvos mixtos de hojas de plantas medicinales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, ISSN 1028-4796.
- Torrenegra, M., Alarcón, C., & Durán, M. (2016). Composición Química y Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de *Minthostachys mollis*. *Scielo*, 1-6.
- Torres, E., & Acuña, A. (1995). Quantification of aflatoxins in corn distributed in the city of Monterrey, Mexico. . *Food Additives and Contaminants* 12, 383-386.

University of Hertfordshire. (5 de Marzo de 2020). *Pesticide Properties DataBase*.

Obtenido de Carvone :

<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es/Reports/3123.htm>

Urquizo, W. (2017). - *Efecto del aceite esencial de Shanshi (Coriaria thymifolia), Tiglán (Clinopodium tomentosum) y Sinverguenzaza (Euphorbia helioscopia L), sobre el gusano blanco de la papa (Premnotrypes vorax Hustache) (Título de Pregrado)*. Ambato: Universidad Técnica de Ambato.

Van Driesche, R., Hoddle, M., & Center, T. (2007). Control de plagas y malezas por enemigos naturales . *VEDALIA*, 39-40.

Vásquez, D., Belmont, R., Jiménez, A., & Flores, H. (2013). Aceites Esenciales y Extractos Acuáticos para el Manejo in vitro de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *F. solani*. *Revista mexicana de fitopatología*, ISSN 2007-8080.

Vásquez, L., & Castaño, J. (2017). Manejo integrado de la marchitez vascular del tomate [*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (SACC.) W.C. Snyder & H.N. Hansen]: Una revisión. *U.D.C.A Act. & Div. Cient*, 363-374.

Vera Saltos, M. (2014). Phenolic compounds from *clinopodium tomentosum* (Kunth) govaerts (Lamiaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, <http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20140181>.

Vidal, C., & Carratalá, J. (2011). Patogenia de la infección fúngica invasora. *Formación Médica Continuada: Infección Fúngica Invasora*, DOI: 10.1016/j.eimc.2011.09.011.

Visintin, A., & Bernardello, G. (2005). Morfología y Anatomía floral *Tagetes Minuta* L. (Asteraceae). *Arnaldoa* , 8-15.

- Wichello, D. (2005). Extracción de Aceites Esenciales. En D. Wichello, *AROMATERAPIA: Remedios a través del aroma* (págs. 23-28). Barcelona: AMAT.
- Zapata, F., & Cardona, N. (2012). Lo que debemos saber sobre los métodos de sensibilidad a los antifúngicos. *Revista CES Medicina*, 71-89.
- Zheng, G., Kenney, P., & Lam, L. (1992). Anethofuran, Carvone, and Limonene: Potential Cancer Chemoprotective Agents from Dill Weed Oil and Caraway Oil. *Planta Medica*, DOI: 10.1055/s-2006-961480.
- Zygadio, A., Guzmán, C., & Grosso, N. (2011). Antifungal Properties of the Leaf Oils of *Tagetes minuta* L. and *T. filifolia* Lag. *Journal of Essential Oil Research*, DOI: <https://doi.org/10.1080/10412905.1994.9699353>.

Anexos