



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y  
VINCULACIÓN CON LA COLECTIVIDAD**

**MAESTRÍA EN AGRICULTURA SOSTENIBLE  
II PROMOCIÓN**

**TESIS DE GRADO MAESTRÍA EN AGRICULTURA  
SOSTENIBLE**

**TEMA: “ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS AMAZÓNICAS  
PARA EL CONTROL DE FITOPATÓGENOS DE CULTIVOS  
CONVENCIONALES DE LA PROVINCIA DE PASTAZA”.**

**AUTORAS: CABRERA MARTÍNEZ PAOLA FERNANDA  
YAGUACHE CAMACHO BÉLGICA DOLORES**

**DIRECTORA: DRA. LAURA SCALVENZI, PHD.**

**SANGOLQUÍ, MAYO 2015**

**UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS ESPE**  
**VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN**  
**CON LA COLECTIVIDAD**  
**CERTIFICADO**

**DRA. LAURA SCALVENZI**  
**DIRECTORA**

**CERTIFICA**

Que el trabajo de investigación titulado “ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS AMAZÓNICAS PARA EL CONTROL DE FITOPATÓGENOS DE CULTIVOS CONVENCIONALES DE LA PROVINCIA DE PASTAZA”, realizado por la Ing. Paola Fernanda Cabrera Martínez y la Ing. Bélgica Dolores Yaguache Camacho, egresadas de la Maestría en Agricultura Sostenible, II Promoción, ha sido dirigido y revisado periódica y minuciosamente, asegurando coherencia y apego con las normas estatutarias establecidas por la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE.

Debido a que el trabajo cumple con los requisitos de veracidad, objetividad y precisión de una investigación científica, que permitirá al Departamento de Ciencias de la Vida, alinear su planificación estratégica y mantener sus servicios a usuarios, con altos estándares de calidad y prestigio, contribuyendo con insumos, a la toma de decisiones futuras del Departamento, se recomienda su publicación.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene archivos en formato portátil de Acrobat (PDF).

Autorizan a las autoras entregar la información a la Unidad de Gestión de Postgrado, y la sustentación pública a las instancias académicas correspondientes.

Sangolquí, Mayo del 2015



**DRA. LAURA SCALVENZI**  
**DIRECTORA**

## DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

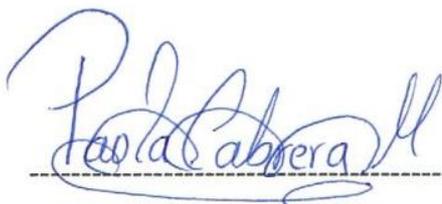
Nosotras, Paola Fernanda Cabrera Martínez y Bélgica Dolores Yaguache Camacho

### **Declaramos que:**

El proyecto de grado denominado “ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS AMAZÓNICAS PARA EL CONTROL DE FITOPATÓGENOS DE CULTIVOS CONVENCIONALES DE LA PROVINCIA DE PASTAZA”, ha sido desarrollado en base a una investigación exhaustiva, respetando los derechos intelectuales de terceros, conforme las citas bibliográficas, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía.

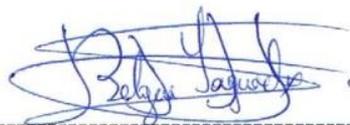
En virtud de esta declaración, nos responsabilizamos del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, Mayo del 2015



Ing. Paola Fernanda Cabrera Martínez

C.C 0604120253



Ing. Bélgica Dolores Yaguache Camacho

C.C 1103457824

## AUTORIZACIÓN

Nosotras, Paola Fernanda Cabrera Martínez y Bélgica Dolores Yaguache Camacho

### **Autorizamos:**

A la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo “ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS AMAZÓNICAS PARA EL CONTROL DE FITOPATÓGENOS DE CULTIVOS CONVENCIONALES DE LA PROVINCIA DE PASTAZA”, cuyo contenido, ideas y criterios son de nuestra exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, Mayo del 2015



Ing. Paola Fernanda Cabrera Martínez



Ing. Bélgica Dolores Yaguache Camacho

## DEDICATORIA

La presente investigación está dirigida a profesionales, agricultores y demás personas que se sientan identificados con una de las labores más loables, como es el trabajo en el campo, a quienes con mucho esfuerzo y amor labran el suelo, siembran semillas y cosechan variados frutos; a quienes diariamente luchan contra adversidades como lluvia, sol, presencia de plagas en los cultivos, con la firme finalidad de hacer real el dicho “quien siembra cosecha”. A todos quienes hacen posible que en cada mesa se encuentren exquisitos frutos y sabrosos manjares, que sirven de alimento a una pequeña familia o una gran población. Esperamos que la información generada en esta investigación sirva para hacer más fácil y llevadera la diaria labor de cultivar la tierra.

Bélgica y Paola

## AGRADECIMIENTO

Queremos dejar constancia de nuestro sincero agradecimiento a todas la personas que colaboraron en el desarrollo de nuestro trabajo investigativo, a la Universidad Estatal Amazónica representada en la persona del Dr. Julio Cesar Vargas Burgos, por acogernos y brindar las facilidades para la ejecución de la investigación. Nuestra gratitud muy sincera a nuestra amiga y Directora de tesis, Dra. Laura Scalvenzi, por su ayuda incondicional y desinteresada, por su apoyo metodológico y científico en el trabajo práctico y redacción del informe. A Andrea Riofrío, Andrea Tapuy y Daysi Changoluisa por la facilidad y el apoyo brindado durante la realización de la fase de laboratorio.

Finalmente, no podíamos dejar pasar la oportunidad de decir mil gracias a Dios, a nuestros padres y hermanos, por caminar siempre junto a nosotras, con sus sabios consejos, palabras de aliento y amor, que nos impulsan día a día a alcanzar las metas propuestas.

Bélgica y Paola

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO 1	
INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO 2 .....	
MARCO TEÓRICO .....	4
2.1 Sustancias Naturales en Agricultura Orgánica .....	4
2.2 Composición química de los Aceites Esenciales .....	7
2.2.1 <i>Hidrocarburos terpénicos</i> .....	8
2.2.1.1 <i>Monoterpenos</i> .....	9
2.2.1.2 <i>Sesquiterpenos</i> .....	9
2.2.1.2 <i>Diterpenos</i> .....	10
2.2.2 <i>Hidrocarburos oxigenados</i> .....	10
2.3 Aceites Esenciales en la lucha contra patógenos vegetales .....	12
2.3.1 <i>Citrus limon</i> L. ....	15
2.3.2 <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf .....	17
2.3.3 <i>Ocotea quixos</i> (Lam.) Kosterm .....	19
2.3.4 <i>Piper aduncum</i> L. ....	21
2.3.5 <i>Thymus vulgaris</i> L. ....	23
2.4 Fitopatógenos de Cultivos Tradicionales Tropicales .....	24
2.4.1 <i>Aspergillus oryzae</i> .....	25
2.4.2 <i>Cladosporium cladosporioides</i> .....	26
2.4.3 <i>Fusarium solani</i> .....	27
2.4.4 <i>Moniliophthora roreri</i> .....	28
2.4.5 <i>Phytophthora</i> sp. ....	29
2.4.6 <i>Rhizopus stolonifer</i> .....	30
CAPÍTULO 3 .....	
MATERIALES Y MÉTODOS .....	32
3.1 Lugar de la Investigación .....	32

3.2 Factores en estudio .....	34
3.2.1 <i>Especies vegetales</i> .....	34
3.2.1.1 <i>Citrus limon</i> L. (Limón rugoso) .....	35
3.2.1.2 <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf (Hierba luisa) .....	36
3.2.1.3 <i>Ocotea quixos</i> (Lam.) Kosterm (Ishpingo) .....	37
3.2.1.4 <i>Piper aduncum</i> L. (Matico) .....	38
3.2.2 Hongos fitopatógenos .....	39
3.2.2.1 <i>Aspergillus oryzae</i> .....	40
3.2.2.2 <i>Cladosporium cladosporioides</i> .....	41
3.2.2.3 <i>Fusarium solani</i> .....	42
3.2.2.4 <i>Moniliophthora roreri</i> .....	42
3.2.2.5 <i>Phytophthora</i> sp. ....	43
3.2.2.6 <i>Rhizopus stolonifer</i> .....	44
3.2.3 Instrumentos/Materiales .....	45
3.2.3.1 Destilación de aceites esenciales de plantas amazónicas .....	45
3.2.3.2 Aceites Esenciales: caracterización química, características químico-físicas .....	46
3.2.3.3 Estudio in vitro de la actividad antifúngica de aceites esenciales .....	46
3.2.4 Métodos .....	47
3.2.4.1 Destilación de aceites esenciales de plantas amazónicas .....	47
3.2.4.2 Determinación de las características químicas, físicas y organolépticas .....	49
3.2.4.2.1 Parámetros químicos .....	49
3.2.4.2.2 Parámetros físicos .....	49
3.2.4.2.3 Parámetros organolépticos .....	50
3.2.4.2.4 Rendimiento del aceite esencial .....	50
3.2.4.3 Estudio in vitro de la Actividad Antifúngica de Aceites Esenciales .....	51
3.2.4.3.1 Aislamiento, identificación y conservación de hongos fitopatógenos .	51
3.2.4.3.2 Actividad antifúngica in vitro de los aceites esenciales .....	53
3.2.5 Toma de datos y análisis estadístico .....	54

CAPÍTULO 4 .....	58
RESULTADOS .....	58
4.1 Destilación de Aceites Esenciales de Plantas Amazónicas .....	58
4.2 Caracterización Química y Químico-Física de los Aceites Esenciales .....	58
4.2.1 Aceite Esencial de Citrus limon L. ....	58
4.2.2 Aceite Esencial de Cymbopogon citratus (DC.) Stapf .....	59
4.2.3 Aceite Esencial de Ocotea quixos (Lam.) Kosterm .....	60
4.2.4 Aceite Esencial de Piper aduncum L. ....	62
4.2.5 Aceite Esencial de Thymus vulgaris L. ....	63
4.2.6 Parámetros Físicos de los Aceites Esenciales .....	63
4.2.7 Caracterización Organoléptica de los Aceites Esenciales .....	64
4.3 Estudio <i>in vitro</i> de la Actividad Antifúngica de los Aceites Esenciales .....	65
4.3.1 Efecto del Aceite Esencial sobre el Crecimiento de los Hongos .....	65
4.3.1.1 Efecto de los Aceites Esenciales sobre el Crecimiento del Hongo Aspergillus oryzae .....	65
4.3.1.2 Efecto de los Aceites Esenciales sobre el Crecimiento del Hongo Cladosporium cladosporioides .....	68
4.3.1.3 Efecto de los Aceites Esenciales sobre el Crecimiento del Hongo Fusarium solani .....	71
4.3.1.4 Efecto de los Aceites Esenciales sobre el Crecimiento del Hongo Moniliophthora roreri .....	73
4.3.1.5 Efecto de los Aceites Esenciales sobre el Crecimiento del Hongo Phytophthora sp. ....	76
4.3.1.6 Efecto de los Aceites Esenciales sobre el Crecimiento del Hongo Rhizopus stolonifer .....	79
4.3.2 Inhibición del Crecimiento de los Hongos Fitopatógenos por Efecto de los Aceites Esenciales .....	81
4.3.2.1 Inhibición del Crecimiento de Aspergillus oryzae por Efecto de los Aceites Esenciales .....	82
4.3.2.1.1 Inhibición del Crecimiento de Aspergillus oryzae .....	83

4.3.2.2 <i>Inhibición del Crecimiento de Cladosporium cladosporioides por Efecto de los Aceites Esenciales</i> .....	85
4.3.2.2.1 <i>Inhibición del Crecimiento de Cladosporium cladosporioides</i> .....	87
4.3.2.3 <i>Inhibición del Crecimiento de Fusarium solani por Efecto de los Aceites Esenciales</i> .....	89
4.3.2.3.1 <i>Inhibición del Crecimiento de Fusarium solani</i> .....	90
4.3.2.4 <i>Inhibición del Crecimiento de Moniliophthora roreri por Efecto de los Aceites Esenciales</i> .....	92
4.3.2.4.1 <i>Inhibición del Crecimiento de Moniliophthora roreri</i> .....	94
4.3.2.5 <i>Inhibición del Crecimiento de Phytophthora sp. por Efecto de los Aceites Esenciales</i> .....	96
4.3.2.5.1 <i>Inhibición del Crecimiento de Phytophthora sp</i> .....	98
4.3.2.6 <i>Inhibición del Crecimiento de Rhizopus stolonifer por Efecto de los Aceites Esenciales</i> .....	100
4.3.2.6.1 <i>Inhibición del Crecimiento de Rhizopus stolonifer</i> .....	101
CAPÍTULO 5 .....	104
DISCUSIÓN .....	104
5.1 Rendimiento de Destilación y Caracterización Química de Aceites Esenciales de plantas Amazónicas .....	104
5.1.1 <i>Citrus limon</i> .....	104
5.1.2 <i>Cymbopogon citratus</i> .....	105
5.1.3 <i>Ocotea quixos</i> .....	105
5.1.4 <i>Piper aduncum</i> .....	106
5.2 Estudio <i>in vitro</i> de la Actividad Antifúngica de Aceites Esenciales .....	108
5.2.1 <i>Efecto de los aceites esenciales sobre el crecimiento de Aspergillus oryzae</i> .....	108
5.2.2 <i>Efecto de los aceites esenciales sobre el crecimiento de Cladosporium cladosporioides</i> .....	109
5.2.3 <i>Efecto de los aceites esenciales sobre el crecimiento de Fusarium solani</i> .....	111
5.2.4 <i>Efecto de los aceites esenciales sobre el crecimiento de Moniliophthora roreri</i> .....	113

	x
5.2.5 <i>Efecto de los aceites esenciales sobre el crecimiento de Phytophthora sp.</i>	115
5.2.6 <i>Efecto de los aceites esenciales sobre el crecimiento de Rhizopus stolonifer</i> .....	116
CAPÍTULO 6 .....	118
CONCLUSIONES .....	118
CAPÍTULO 7 .....	120
RECOMENDACIONES .....	120
BIBLIOGRAFÍA .....	121
ANEXOS .....	133

**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1. <i>Principales compuestos hidrocarburos oxigenados.</i> .....	11
Tabla 2. <i>Plantas amazónicas seleccionadas para la extracción de aceites esenciales.</i> .....	35
Tabla 3. <i>Hongos fitopatógenos utilizados en el ensayo de la actividad antifúngica y su procedencia</i> .....	40
Tabla 4. <i>Cantidades de hojas destiladas por cada planta objeto de estudio.</i> ...	48
Tabla 5. <i>Cuantificación de parámetros utilizados en el ensayo de la actividad biológica.</i> .....	55
Tabla 6. <i>Tratamientos para evaluar la actividad biológica sobre Aspergillus oryzae, Cladosporium cladosporioides, Fusarium solani, Moniliophthora roreri, Phytophthora sp. y Rhizopus stolonifer, por el método de difusión en agar</i> .....	56
Tabla 7. <i>Escala de interpretación del porcentaje de inhibición del crecimiento de la colonia fitopatógena</i> .....	57

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. <i>Cantidades de hojas destiladas por cada planta objeto de estudio.</i> .....	58
Cuadro 2. <i>Composición química del aceite esencial de Citrus limon.</i> .....	59
Cuadro 3. <i>Composición química del aceite esencial de Cymbopogon citratus.</i> .....	60
Cuadro 4. <i>Composición química del aceite esencial de Ocotea quixos.</i> ...	61
Cuadro 5. <i>Composición química del aceite esencial de Piper aduncum.</i> ...	62
Cuadro 6. <i>Composición química del aceite esencial de Thymus vulgaris.</i> .	63
Cuadro 7. <i>Densidad de los aceites esenciales.</i> .....	63
Cuadro 8. <i>Características organolépticas de los aceites esenciales.</i> .....	64
Cuadro 9. <i>Análisis de varianza (ADEVA) de la actividad antifúngica de los aceites esenciales sobre el crecimiento de Aspergillus oryzae, a los 10 días de incubación.</i> .....	82
Cuadro 10. <i>Rangos de significación (Tukey 5%) para la actividad antifúngica de los aceites esenciales (A) a cinco concentraciones (C) frente a Aspergillus oryzae.</i> .....	83
Cuadro 11. <i>Análisis de varianza (ADEVA) de la actividad antifúngica de los aceites esenciales sobre el crecimiento de Cladosporium cladosporioides, a los 10 días de incubación.</i> .....	86
Cuadro 12. <i>Rangos de significación (Tukey 5%) para la actividad antifúngica de los aceites esenciales (A) a cinco concentraciones (C) frente Cladosporium cladosporioides.</i> .....	86
Cuadro 13. <i>Análisis de varianza (ADEVA) de la actividad antifúngica de los aceites esenciales sobre el crecimiento de Fusarium solani, a los 10 días de incubación.</i> .....	89
Cuadro 14. <i>Rangos de significación (Tukey 5%) para la actividad antifúngica de los aceites esenciales (A) a cinco concentraciones (C) frente Fusarium solani.</i> .....	90
Cuadro 15. <i>Análisis de varianza (ADEVA) de la actividad antifúngica de los aceites esenciales sobre el crecimiento de Moniliophthora roreri, a los 10 días de incubación.</i> .....	93

Cuadro 16. Rangos de significación (Tukey 5%) para la actividad antifúngica de los aceites esenciales (A) a cinco concentraciones (C) frente <i>Moniliophthora roreri</i> . .....	94
Cuadro 17. Análisis de varianza (ADEVA) de la actividad antifúngica de los aceites esenciales sobre el crecimiento de <i>Phytophthora sp.</i> , a los 10 días de incubación. ....	97
Cuadro 18. Rangos de significación (Tukey 5%) para la actividad antifúngica de los aceites esenciales (A) a cinco concentraciones (C) frente <i>Phytophthora sp.</i> . ....	97
Cuadro 19. Análisis de varianza (ADEVA) de la actividad antifúngica de los aceites esenciales sobre el crecimiento de <i>Rhizopus stolonifer</i> a los 10 días de incubación. ....	100
Cuadro 20. Rangos de significación (Tukey 5%) para la actividad antifúngica de los aceites esenciales (A) a cinco concentraciones (C) frente <i>Rhizopus stolonifer</i> . ....	101

## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Estructura molecular del isopreno .....	8
<i>Figura 2.</i> Estructura química de algunos monoterpenos: (A) Limoneno, (B) $\alpha$ -fellandrene, (C) $\beta$ -pinene, (D) $\beta$ -mirceno .....	9
<i>Figura 3.</i> Estructura química de algunos sesquiterpenos: (A) $\beta$ -cariofileno, (B) $\alpha$ -cadineno, (C) camazuleno .....	10
<i>Figura 4.</i> Estructura química del diterpeno canforeno .....	10
<i>Figura 5.</i> Planta de <i>Thymus vulgaris</i> L. ....	15
<i>Figura 6.</i> Planta de <i>Citrus limon</i> L. ....	17
<i>Figura 7.</i> Planta de <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf .....	19
<i>Figura 8.</i> Planta de <i>Ocotea quixos</i> (Lam.) Kosterm .....	21
<i>Figura 9.</i> Planta de <i>Piper aduncum</i> L. ....	23
<i>Figura 10.</i> Ubicación de la localidad de estudio: Ciudad de Puyo, cantón Pastaza, provincia de Pastaza, Ecuador .....	32
<i>Figura 11.</i> Ubicación del sitio de estudio: Universidad Estatal Amazónica, Ciudad de Puyo, Cantón Pastaza, Provincia de Pastaza, Ecuador .....	33
<i>Figura 12.</i> Ubicación de la Granja UEMAC, cantón Santa Clara, Provincia de Pastaza, Ecuador .....	34
<i>Figura 13.</i> Planta de <i>Citrus limon</i> L. ....	36
<i>Figura 14.</i> Planta de <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf .....	37
<i>Figura 15.</i> Planta de <i>Ocotea quixos</i> (Lam.) Kosterm .....	38
<i>Figura 16.</i> Planta de <i>Piper aduncum</i> L. ....	39
<i>Figura 17.</i> (A) Micelio, (B) conidióforos y conidios de <i>Aspergillus oryzae</i> .....	40
<i>Figura 18.</i> (A) Micelio, (B) hifas y conidios de <i>Cladosporium cladosporioides</i> .....	41
<i>Figura 19.</i> (A) Micelio, (B) conidios de <i>Fusarium solani</i> .....	42
<i>Figura 20.</i> (A) Micelio, (B) hifas y conidios de <i>Moniliophthora roreri</i> ...	42
<i>Figura 21.</i> (A) Micelio y (B) hifas de <i>Phytophthora</i> sp. ....	43

<i>Figura 22.</i> (A) Micelio, (B) esporangioforos y esporangios de <i>Rhizopus stolonifer</i> .....	44
<i>Figura 23.</i> Destilador utilizado en el proceso de extracción de aceites esenciales .....	45
<i>Figura 24.</i> Calculo de la densidad del aceite esencial: (A) toma de temperatura, (B) peso de 100 $\mu$ L, (C) muestra de los aceites esenciales ...	45
<i>Figura 25.</i> Presentación comercial KwikStik© de las cepas puras de hongos fitopatógenos, utilizadas en el estudio .....	51
<i>Figura 26.</i> Activación de las cepas ATCC: (A) cepas puras en sus respectivas confecciones comerciales, (B) siembra de los hongos en PDA, (C) etiquetado cajas Petri .....	51
<i>Figura 27.</i> Aislamiento de hongos fitopatógenos, a partir de mazorcas enfermas de <i>T. cacao</i> : (A) frutos de cacao con síntomas de enfermedad, (B) aislamiento y purificación de cepas, (C) placas para identificación morfológica .....	52
<i>Figura 28.</i> Siembra e incubación de hongos: (A) toma de cilindros con micelio del hongo, (B) colocación del cilindro en el centro de la caja Petri en contacto con el tratamiento, (C) cada tratamiento con tres repeticiones	53
<i>Figura 29.</i> Aceite esencial de (A) <i>C. limon</i> , (B) <i>C. citratus</i> , (C) <i>O. quixos</i> , (D) <i>P. aduncum</i> , obtenido por destilación .....	64
<i>Figura 30.</i> Efecto del aceite esencial de <i>Citrus limon</i> sobre el crecimiento de <i>Aspergillus oryzae</i> .....	66
<i>Figura 31.</i> Efecto del aceite esencial de <i>Cymbopogon citratus</i> sobre el crecimiento de <i>Aspergillus oryzae</i> .....	66
<i>Figura 32.</i> Efecto del aceite esencial de <i>Ocotea quixos</i> sobre el crecimiento de <i>Aspergillus oryzae</i> .....	67
<i>Figura 33.</i> Efecto del aceite esencial de <i>Piper aduncum</i> sobre el crecimiento de <i>Aspergillus oryzae</i> .....	68
<i>Figura 34.</i> Efecto del aceite esencial de <i>Citrus limon</i> sobre el crecimiento de <i>Cladosporium cladosporioides</i> .....	68
<i>Figura 35.</i> Efecto del aceite esencial de <i>Cymbopogon citratus</i> sobre el	69

crecimiento de <i>Cladosporium cladosporioides</i> .....	
<i>Figura 36.</i> Efecto del aceite esencial de <i>Ocotea quixos</i> sobre el crecimiento de <i>Cladosporium cladosporioides</i> .....	70
<i>Figura 37.</i> Efecto del aceite esencial de <i>Piper aduncum</i> sobre el crecimiento de <i>Cladosporium cladosporioides</i> .....	70
<i>Figura 38.</i> Efecto del aceite esencial de <i>Citrus limon</i> sobre el crecimiento de <i>Fusarium solani</i> .....	71
<i>Figura 39.</i> Efecto del aceite esencial de <i>Cymbopogon citratus</i> sobre el crecimiento de <i>Fusarium solani</i> .....	72
<i>Figura 40.</i> Efecto del aceite esencial de <i>Ocotea quixos</i> sobre el crecimiento de <i>Fusarium solani</i> .....	72
<i>Figura 41.</i> Efecto del aceite esencial de <i>Piper aduncum</i> sobre el crecimiento de <i>Fusarium solani</i> .....	73
<i>Figura 42.</i> Efecto del aceite esencial de <i>Citrus limon</i> sobre el crecimiento de <i>Moniliophthora roreri</i> .....	74
<i>Figura 43.</i> Efecto del aceite esencial de <i>Cymbopogon citratus</i> sobre el crecimiento de <i>Moniliophthora roreri</i> .....	74
<i>Figura 44.</i> Efecto del aceite esencial de <i>Ocotea quixos</i> sobre el crecimiento de <i>Moniliophthora roreri</i> .....	75
<i>Figura 45.</i> Efecto del aceite esencial de <i>Piper aduncum</i> sobre el crecimiento de <i>Moniliophthora roreri</i> .....	76
<i>Figura 46.</i> Efecto del aceite esencial de <i>Citrus limon</i> sobre el crecimiento de <i>Phytophthora</i> sp .....	76
<i>Figura 47.</i> Efecto del aceite esencial de <i>Cymbopogon citratus</i> sobre el crecimiento de <i>Phytophthora</i> sp. ....	77
<i>Figura 48.</i> Efecto del aceite esencial de <i>Ocotea quixos</i> sobre el crecimiento de <i>Phytophthora</i> sp. ....	78
<i>Figura 49.</i> Efecto del aceite esencial de <i>Piper aduncum</i> sobre el crecimiento de <i>Phytophthora</i> sp. ....	78
<i>Figura 50.</i> Efecto del aceite esencial de <i>Citrus limon</i> sobre el crecimiento de <i>Rhizopus stolonifer</i> .....	79

<i>Figura 51. Efecto del aceite esencial de Cymbopogon citratus sobre el crecimiento de Rhizopus stolonifer</i> .....	80
<i>Figura 52. Efecto del aceite esencial de Ocotea quixos sobre el crecimiento de Rhizopus stolonifer</i> .....	80
<i>Figura 53. Efecto del aceite esencial de Piper aduncum sobre el crecimiento de Rhizopus stolonifer</i> .....	81
<i>Figura 54. Crecimiento del micelio de Aspergillus oryzae a 500 µL/mL de concentración del aceite esencial de (A) C. limon, (B) C. citratus, (C) O. quixos, (D) P. aduncum (E) T. vulgaris-Control (+) y, (F) PDA-Control (-), a los diez días de incubación</i> .....	84
<i>Figura 55. Porcentaje de inhibición del crecimiento de Aspergillus oryzae por acción de los aceites esenciales</i> .....	85
<i>Figura 56. Crecimiento del micelio de Cladosporium cladosporioides a 100 µL/mL de concentración del aceite esencial de (A) C. limon, (B) C. citratus, (C) O. quixos, (D) P. aduncum (E) T. vulgaris-Control (+) y, (F) PDA-Control (-), a los diez días de incubación</i> .....	88
<i>Figura 57. Porcentaje de inhibición del crecimiento de Cladosporium cladosporioides por acción de los aceites esenciales</i> .....	88
<i>Figura 58. Crecimiento del micelio de Fusarium solani a 200 µL/mL de concentración del aceite esencial de (A) C. limon, (B) C. citratus, (C) O. quixos, (D) P. aduncum (E) T. vulgaris-Control (+) y, (F) PDA-Control (-), a los diez días de incubación</i> .....	91
<i>Figura 59. Porcentaje de inhibición del crecimiento de Fusarium solani por acción de los aceites esenciales</i> .....	92
<i>Figura 60. Crecimiento del micelio de Moniliophthora roreri a 200 µL/mL de concentración del aceite esencial de (A) C. limon, (B) C. citratus, (C) O. quixos, (D) P. aduncum (E) T. vulgaris-Control (+) y, (F) PDA-Control (-), a los diez días de incubación</i> .....	95
<i>Figura 61. Porcentaje de inhibición del crecimiento de Moniliophthora roreri por acción de los aceites esenciales</i> .....	96
<i>Figura 62. Crecimiento del micelio de Phytophthora sp a 50 µL/mL de concentración del aceite esencial de (A) C. limon, (B) C. citratus, (C) O.</i>	99

<i>quixos</i> , (D) <i>P. aduncum</i> (E) <i>T. vulgaris</i> -Control (+) y, (F) PDA-Control (-) a los diez días de incubación .....	
<i>Figura 63.</i> Porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>Phytophthora</i> sp por acción de los aceites esenciales .....	99
<i>Figura 64.</i> Crecimiento del micelio de <i>Rhizopus stolonifer</i> a 500 $\mu$ L/mL de concentración del aceite esencial de (A) <i>C. limon</i> , (B) <i>C. citratus</i> , (C) <i>O. quixos</i> , (D) <i>P. aduncum</i> (E) <i>T. vulgaris</i> -Control (+) y, (F) PDA-Control (-) a los diez días de incubación .....	102
<i>Figura 65.</i> Porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>Rhizopus stolonifer</i> por acción de los aceites esenciales .....	103
<i>Figura 66.</i> Porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>Aspergillus oryzae</i> por acción de los aceites esenciales .....	109
<i>Figura 67.</i> Porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>Cladosporium cladosporioides</i> por acción de los aceites esenciales .....	111
<i>Figura 68.</i> Porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>Fusarium solani</i> por acción de los aceites esenciales .....	113
<i>Figura 69.</i> Porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>Moniliophthora roreri</i> por acción de los aceites esenciales .....	114
<i>Figura 70.</i> Porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>Phytophthora</i> sp. por acción de los aceites esenciales .....	116
<i>Figura 71.</i> Porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>Rhizopus stolonifer</i> por acción de los aceites esenciales .....	117

## RESUMEN

El control de fitopatógenos en la Amazonía se torna cada vez más difícil, siendo la principal alternativa el uso y abuso de pesticidas sintéticos, frente a esta problemática se ha planteado la investigación *Aceites Esenciales de Plantas Amazónicas para el Control de Fitopatógenos de Cultivos Convencionales de la Provincia de Pastaza*. El estudio evaluó la actividad antifúngica e identificó las concentraciones mínimas inhibitorias de aceite esencial obtenido mediante destilación por arrastre de vapor, de cuatro especies vegetales *Citrus limon* L., *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm y *Piper aduncum* L., sobre el crecimiento de seis fitopatógenos *Aspergillus oryzae*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium solani*, *Rhizopus stolonifer*, *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora* sp.; las concentraciones evaluadas a nivel de laboratorio fueron 10  $\mu\text{L/mL}$ , 50  $\mu\text{L/mL}$ , 100  $\mu\text{L/mL}$ , 200  $\mu\text{L/mL}$  y 500  $\mu\text{L/mL}$  de cada aceite, previamente solubilizados en DMSO (Dimetilsulfóxido). Para comprobar la efectividad del aceite se usaron controles negativos PDA y PDA con DMSO, los controles positivos fueron *Thymus vulgaris*, a las cinco concentraciones. Los aceites esenciales mostraron una actividad antifúngica dosis-dependiente, sobre los fitopatógenos; sin embargo, el poder inhibitorio sobre el crecimiento del micelio varió en porcentaje, dependiendo de la especie vegetal productora de aceite y del patógeno a controlar. Los aceites esenciales con mayor actividad antifúngica fueron *C. citratus*, *P. aduncum* y *O. quixos*.

### **PALABRAS CLAVES:**

**ACEITES**

**ESENCIALES**

**PLANTAS**

**AMAZÓNIA**

**CONTROL**

**FITOPATÓGENOS**

## ABSTRACT

Phytopathogen control in the Amazon region has turned increasingly difficult, the main alternative consists in the excessive use of synthetic pesticides, faced with this problem, the following research has been set up: “Amazonian Plants Essential Oils for Control of Phytopathogenic Conventional Crops in the Province of Pastaza”. The study evaluated the antifungal activity against six phytopathogens (*Aspergillus oryzae*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium solani*, *Rhizopus stolonifer*, *Moniliophthora roreri* and *Phytophthora sp.*) and identified the minimum inhibitory concentrations of essential oil obtained by steam distillation of four plants: *Citrus limon* L., *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm, and *Piper aduncum* L. The essential oil concentrations were 10  $\mu\text{L}$  / mL, 50  $\mu\text{L}$  / mL, 100  $\mu\text{L}$  / mL,  $\mu\text{200}$  L / mL and 500  $\mu\text{L}$  / mL; essential oils were previously solubilized in DMSO (dimethylsulfoxide). To test the effectiveness of essential oils, negative control was used PDA and PDA with DMSO; as positive control was used *Thymus vulgaris*. The essential oils showed a dose-dependent antifungal activity against plant pathogens. However, the mycelial growth inhibitory effect of essential oil concentrations was different according to plant species and to pathogen to be controlled. The essential oils with higher antifungal activity were *C. citratus*, *P. aduncum* and *O. quixos*.

### KEYWORDS:

**ESSENTIAL**

**OILS**

**AMAZONIA**

**PLANTS**

**CONTROL**

**PHYTOPATHOGENICS.**

## CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN

Ecuador un país biodiverso, tiene las más variadas formas de vida expresadas en su flora, fauna, microorganismos y de ecosistemas que se forman gracias a las particulares condiciones geográficas de ubicación, relieve y clima; es considerado uno de los 12 países biológicamente más diversos del mundo (Ávila *et al.*, 2007). La Estrategia Nacional de Biodiversidad de Ecuador se fundamenta en la convicción de que conservar y utilizar sustentablemente la diversidad biológica es una fuente de riqueza, que abre oportunidades para aliviar la pobreza, reactivar y sustentar el desarrollo de la economía del país y favorecer el desarrollo social y calidad de vida de su población (Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2010).

La Amazonía constituye la región con más alta biodiversidad, alberga especies nativas y endémicas. En el corazón de la Amazonía, Pastaza es una provincia que por sus condiciones climáticas y geográficas alberga ecosistemas de gran biodiversidad, diversidad faunística, florística y cultural, convirtiéndola en un centro potencial de desarrollo, en donde las comunidades rurales viven de sus recursos naturales. Muchas de las especies vegetales de la Amazonía tienen elevado potencial económico y productivo aún desconocido. Las actividades humanas irracionales como, la deforestación, extracción de madera con fines comerciales, la creación de pastizales, el avance de la frontera agrícola, una agricultura dependiente de agroquímicos y, la urbanización, representan los mayores problemas que son comunes a toda la región Amazónica. Las razones arriba mencionadas, convierten a la Amazonía en un ecosistema frágil, cuyos efectos se manifiestan en la degradación general del hábitat como por ejemplo la pérdida de fertilidad del suelo, la desertificación, destrucción de la biodiversidad, contaminación, resistencia de plagas y enfermedades, como principales (Estrada, 2007).

Frente a esta situación los agricultores de la provincia enfrentan un gran reto: producir utilizando técnicas de bajo impacto ambiental que garanticen la producción y cuidado del medio ambiente. En Pastaza se manejan tanto cultivos extensivos como la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), el cacao (*Theobroma cacao* L.), la papa china (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) y la palma africana (*Elaeis*

*guineensis* Jacq.); además, cultivos manejados en sistemas agroforestales o sistema “chacra” básicamente destinados al autoconsumo (Estrada, 2007). Ambas realidades enfrentan el problema de las patologías vegetales que afectan los cultivos cuyo efecto es, muy a menudo, la pérdida de gran parte del cultivo. Por lo anteriormente citado, el biocontrol es considerado una alternativa prometedora para disminuir el efecto patogénico de los microorganismos, sea utilizando aplicaciones directas o como principio para la elaboración de formulaciones químicas; dentro de las estrategias de biocontrol se encuentran los aceites esenciales derivados de plantas, cuya característica principal es el fuerte aroma y propiedades antimicrobianas (Bruni *et al.*, 2004).

Estas propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales pueden ser usadas para el control de enfermedades en cultivos convencionales; lo que ayudaría a disminuir la dependencia de fungicidas sintéticos (agroquímicos), cuyo uso ha revelado también desventajas como la contaminación de los suelos y el desarrollo de resistencia por parte de los patógenos.

Los aceites esenciales son sustancias volátiles de acentuado y característico olor, mezclas complejas de compuestos químicos y aislados por medios físicos (prensado y destilación); estas sustancias se pueden obtener por varias rutas biosintéticas, existen numerosas sustancias químicas y una enorme variación en la composición de los aceites. Ciertas plantas poseen la capacidad de producir aceites esenciales y pueden estar presentes en diferentes partes de la misma, como en las flores, en las hojas, en la madera, en la raíz, en la resina que exudan, en la cascara de los frutos. Dentro de los tejidos vegetativos se encuentran almacenados en: 1) las capas epidérmicas de los pétalos que producen el aroma de las flores, 2) estructuras anatómicas de la planta como células secretoras, cavidades o tricomas glandulares (Baser y Buchbauer, 2010).

De acuerdo a las comprobadas actividades biológicas de los aceites esenciales y debido a la necesidad de encontrar nuevos principios activos en capacidad de controlar agentes patógenos, se está desarrollando mucho la investigación encaminada a estudiar los aceites esenciales como fuente de nuevos principios activos, a ser aplicados en la agroquímica y medicina. La Amazonía posee especies vegetales cuyas propiedades no han sido estudiadas por completo, y otras aún siguen

siendo desconocidas (Estrada, 2007); esto representa un gran potencial para el descubrimiento de nuevos principios activos, con aplicaciones en varios sectores como la medicina, la cosmética, la alimentación, los integradores alimenticios y finalmente los agroquímicos.

Considerando estos antecedentes y con el fin de generar conocimiento en cuanto a las posibles propiedades antifúngicas, se han seleccionado especies vegetales, en base al conocimiento ancestral de las comunidades, cuyos derivados posiblemente puedan tener propiedades antimicrobianas, por poseer principios activos fungicidas. Este trabajo se basa en estudiar el uso alternativo de aceites esenciales extraídos de plantas amazónicas, a través de la identificación y evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* de estos, para comprobar su capacidad de inhibir el crecimiento de hongos patógenos vegetales.

En lo particular se pretende alcanzar los siguientes objetivos específicos:

- Seleccionar las especies vegetales en base a un diagnóstico previo
- Identificar taxonómicamente las plantas a investigar
- Obtener aceites esenciales procedentes de las plantas seleccionadas
- Caracterizar los aceites esenciales en base a parámetros químicos, físicos y organolépticos
- Evaluar *in vitro* la actividad biológica de los aceites esenciales contra hongos fitopatógenos.
- Determinar los aceites esenciales que tienen mayor efecto en la inhibición de hongos fitopatógenos y su dosificación

En el presente trabajo de investigación se ha dado como hipótesis la siguiente: los aceites esenciales extraídos de plantas amazónicas poseen actividad antifúngica frente a los microorganismos seleccionados (hongos fitopatógenos).

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Sustancias Naturales en Agricultura Orgánica

Los recursos naturales son propiedad de la humanidad presente y futura, donde los recursos vegetales a través del tiempo han sido la base de la medicina y la alimentación, que han hecho posible el mantenimiento de la vida. La OMS (Organización Mundial de la Salud, 1998) menciona que alrededor del 80% de la población mundial depende de la medicina tradicional para curarse y, que el 85% de la medicina tradicional involucra el uso de plantas medicinales. Sin embargo, se calcula que solo se ha descubierto el 10% de la potencialidad alimenticia y curativa del reino vegetal. En América Latina, especialmente la cordillera de los Andes y la región amazónica poseen una alta diversidad de plantas con valor etnobotánico, en su mayoría desconocido. Las plantas elaboran sus principios activos que tienen actividad benéfica o perjudicial sobre el organismo, propiedades que deben ser investigadas y utilizadas por el agricultor, para hacer de la agricultura una actividad sostenible y sustentable, aprovechando las bondades las plantas sin olvidar el respeto a las leyes de la naturaleza (Torres *et al.*, 2008).

En la naturaleza se conocen algunas plantas que muestran gran resistencia al ataque de patógenos, como ejemplo el *Ginkgo biloba* L. Esta resistencia, así como aquella de muchas otras plantas, se atribuye a que con la evolución las plantas han fortalecido su mecanismo natural de defensa. Desde el punto de vista químico esta resistencia se debe a la presencia de metabolitos con propiedades antifúngicas, tanto de bajo peso molecular así como moléculas más grandes como las proteínas (Montes *et al.*, 2000).

Anteriormente se distinguían las inhibitinas y las fitoalexinas, como compuestos capaces de defender la planta de los ataques de los patógenos. Las primeras se encuentran de forma estructural en la planta, mientras las segundas se producen en respuesta al ataque de patógenos. Sin embargo, hoy en día se suele considerar a todos los compuestos activos en términos de defensa de la planta, dentro de un solo grupo:

metabolitos antifúngicos de bajo peso molecular (Montes *et al.*, 2000).

Otras moléculas producidas por las plantas se conocen como fitodefensinas, de naturaleza peptídica y ricas en cisteína, mismas que poseen la capacidad de inhibir el crecimiento de los hongos, produciendo en ellos cambios morfológicos y daños en las estructuras celulares (Alzate *et al.*, 2009).

Los metabolitos secundarios le permiten a la planta sobrevivir en un medio, pues actúan como mecanismos de defensa necesarios contra plagas y microorganismos (bacterias, virus y hongos); según su mecanismo de acción los metabolitos secundarios son considerados como repelentes de insectos al emanar olores fuertes que ahuyenta al insecto plaga, otros ejercen un efecto contrario y atraen a insectos benévolos siendo indispensables en la polinización y la reproducción. Otros son de efecto antialimentario, pues quitan al depredador el apetito para tragar la planta; en fin se han atribuido grandes beneficios a estos compuestos de origen vegetal generados por varias rutas biosintéticas (Stashenko, 2009).

La mayoría de sustancias de origen vegetal que muestran actividad antimicrobiana son compuestos fenólicos, terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos e isoflavonoides, los cuales en su mayoría son identificados como metabolitos secundarios de bajo y mediano peso molecular y enzimas hidrolíticas (glucanasas, citinasas). En diversas investigaciones a nivel mundial se ha establecido que muchas plantas aromáticas poseen actividad antibacteriana, antimicótica, antiparasitaria, antiviral e inclusive con efectos insecticidas (Lagos, 2012).

Montes *et al.* (2000) recopila las experiencias de 12 años de investigaciones sobre plantas con propiedades antifúngicas. En el estudio se han evaluado alrededor de 206 especies de plantas de diferentes familias (frutales, hortalizas, flores, planta forestales, arvenses y ruderales), entre ellas: canela (*Cinnamomun zeylanicum*), clavo (*Syzygium aromaticum*), cebolla (*Allium cepa* L.), ajo (*Allium sativum* L.), pimienta negra (*Piper nigrum*), orégano (*Origanum vulgare*), epazote (*Teloxys ambrosiodes*), albahaca (*Ocimum basilicum*), laurel (*Litsea glauscecens*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y yerbabuena (*Mentha piperita*). Estas plantas poseen propiedades antifúngicas comprobadas científicamente, para ello se han utilizado productos vegetales en diferentes formulaciones como extracto acuosos y hexánicos, polvos, aceites esenciales y metabolitos secundarios antifúngicos, contra 26 especies de hongos

fitopatógenos de diversos géneros: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cercospora*, *Claviceps*, *Colletotrichum*, *Didymella*, *Erysiphe*, *Fusarium*, *Hemileia*, *Monilinia*, *Oidium*, *Penicillium*, *Phyllachora*, *Phytophthora*, *Pseudoperonospora*, *Puccinia*, *Stemphyllium*, y *Uromyces*. La investigación ha incluido germinación de esporas, desarrollo del micelio, esporulación, pruebas de invernadero e incluso pruebas de campo. Los resultados indican que entre el 32% y 51% de las especies de plantas estudiadas provocaron respuestas en el patógeno, que van desde la estimulación biológica hasta su total inhibición. Por ejemplo el 32% de 74 especies evaluadas inhibió la germinación de esporas de *Uromyces appendiculatus*; en el caso de *Alternaria porri*, de 49 especies estudiadas el 51% mostraron algún efecto sobre el patógeno.

Otros estudios también han demostrado que una amplia variedad de extractos vegetales tienen actividad antifúngica inhibiendo la formación del micelio y la esporulación del patógeno. Estudios de Chávez (2011) han comprobado que los extractos de semillas de paraíso blanco (*Moringa oleifera*), los aceites esenciales de tomillo (*Thymus compactum*) y orégano (*Origanum compactum*), los vapores de mentol obtenidos de la menta (*Mentha x piperita*) y de lanilol obtenidos de la albahaca (*Ocimum basilicum*), así como los polvos de raíces de kava (*Piper minthysticum*), mostraron actividad antifúngica inhibiendo la formación de micelio y esporulación de *Rhizopus stolonifer*.

Bejarano y Centeno (2009) en busca del control de hongos aflatoxigénicos realizaron un estudio utilizando el extracto de *Citrus limon*, los resultados demostraron claramente el efecto inhibitorio que ejercía sobre los hongos *Aspergillus flavus*, *A. niger* y *Penicillium citrinum* inhibiendo su crecimiento durante los siete días de incubación; el mecanismo de acción del extracto se atribuyó a la presencia de componentes químicos como el limoneno, myrcereno,  $\alpha$ -pineno y linanol, los cuales han demostrado su actividad antiaflatoxigénica.

Otros estudios sobre el extracto de limón en el control de hongos fitopatógenos han mostrado la inhibición completa del crecimiento *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides* (Landeró, 2013).

En los resultados presentados por Montes *et al.* (2000) sobre el estudio de diferentes formulaciones de extractos vegetales contra fitopatógenos, se ha

demostrado que para el tratamiento de semillas los productos más eficientes fueron los aceites esenciales; por ejemplo en la semilla de maíz (*Zea mays* L.) se observó, que el desarrollo de *Aspergillus flavus* fue inhibido por el efecto de los aceites esenciales de canela, clavo, orégano, epázote, albahaca, tomillo y yerbabuena.

## 2.2 Composición Química de los Aceites Esenciales

La composición química de un aceite esencial depende de varios factores como, el tipo de planta, su variedad, híbrido o quimiotipo, tratamiento postcosecha, tipo y duración del proceso de extracción del aceite, así como de las condiciones agroecológicas del lugar de cultivo, entre otros. Además son productos muy estables que pueden ser guardados por años en condiciones de baja temperatura, oscuridad y ausencia de oxígeno. Estas sustancias volátiles tienen diversas funciones ecológicas, actúan como atrayente de polinizadores, defienden la planta contra los depredadores y muchos de sus componentes interactúan con el ambiente mediante lenguaje químico (Baser y Buchbauer, 2010).

Los aceites esenciales poseen un amplio espectro de propiedades, entre estas la propiedad biocida contra una amplia gama de organismos como bacterias, hongos, virus, protozoos, insectos y plantas; por esta razón son usados en el campo agrícola, como materia prima para la fabricación de productos bactericidas, fungicidas e insecticidas. Entre las especies más estudiadas por las propiedades antifúngicas de sus aceites, se encuentran *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, *Eucalyptus globulus* Labill, *Thymus vulgaris* L. (Stashenko, 2009).

También son conocidas las propiedades farmacológicas, antiinflamatorias, antioxidantes y anticancerígenas de los aceites esenciales; dichas propiedades pueden ayudar a prevenir o tratar enfermedades, por estas razones su uso también se enfoca en la medicina humana, en donde se los ha estudiado por los escasos efectos secundarios y baja toxicidad que pueden causar. Adicionalmente, presentan una mejor biodegradabilidad comparado con los antibióticos de síntesis, y su utilización provee de una fuente de medicación más económica y natural con pocos efectos adversos; estas características son más fácilmente aceptadas por la población (Lagos, 2012).

Los aceites esenciales están constituidos por una serie de compuestos químicos, principalmente por terpenos, que proceden de la condensación del isopreno y pueden o no tener oxígeno. Son de bajo peso molecular y típicamente son apolares o medianamente polares (Stashenko, 2009).

La vía metabólica que lleva a la biosíntesis de los terpenos es aquella del ácido mevalónico, un derivado del acetil-CoA, a partir del cual se sintetizan, por unión de compuestos a cinco átomos de carbono isómeros del isopreno, los monoterpenos ( $2C_5$ ), sesquiterpenos ( $3C_5$ ), diterpenos ( $4C_5$ ) y politerpenos ( $nC_5$ ). Los aceites esenciales están formados sobre todo por mono y sesquiterpenos, responsables de su estado físico líquido y de su volatilidad; raramente se encuentran diterpenos que no son volátiles. Los terpenos pueden ser divididos en dos grupos fundamentales, hidrocarburos terpénicos y sus derivados oxigenados (alcoholes, fenoles, aldehídos, cetonas, éteres, peróxidos). Está estimado que hay más de 1000 estructuras de monoterpenos y 3000 sesquiterpenos; otros componentes poco frecuentes en los aceites esenciales son compuestos alifáticos y aromáticos no terpenoides como fenil propanoides, compuestos nitrogenados y azufrados (Lagos, 2012). La estructura molecular del isopreno se representa en la Figura 1.



**Figura 1.** Estructura molecular del isopreno (Fuente: Lagos, 2012)

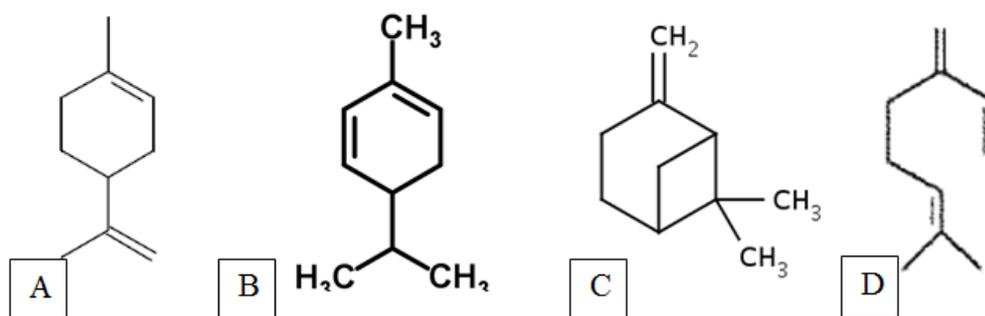
### ***2.2.1 Hidrocarburos Terpénicos***

Los hidrocarburos terpénicos son los compuestos mayoritarios presentes en los aceites esenciales que carecen de oxígeno, derivan de unidades de isopreno (formadas por 5 carbonos). Principalmente encontramos en los aceites monoterpenos ( $C_{10}$ ), aunque también son comunes los sesquiterpenos ( $C_{15}$ ) y los diterpenos ( $C_{20}$ ). Pueden ser alifáticos, cíclicos o aromáticos.

### 2.2.1.1 Monoterpenos

Los monoterpenos (Figura 2) son terpenos de 10 átomos de carbono, el equivalente a dos moléculas de isopreno, derivados biosintéticamente de geranilpirofosfato (GPP), son los compuestos más abundantes en los aceites esenciales, y precursores de los más complejos, que son los terpenos oxidados. Se denominan terminando en – eno (Martínez, 2001).

Entre los más comunes se encuentran el limoneno presente en cítricos (*Citrus* sp.) e hinojo (*Foeniculum vulgare* Mill.), el pineno en eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill.), albahaca (*Ocimum basilicum* L.) y romero (*Rosmarinus officinalis* L.), el canfeno se encuentra en el jengibre (*Zingiber officinale*), alcanfor (*Cinnamomum camphora* Seib.) y trementina (*Pistacia terebinthus* L.); el fellandreno está presente en eucalipto (*Eucalyptus* sp.), canela (*Ocotea quixos* Lam. Kosterm), limón (*Citrus limón* L.) e hinojo (*Foeniculum vulgare* P. Mill.).

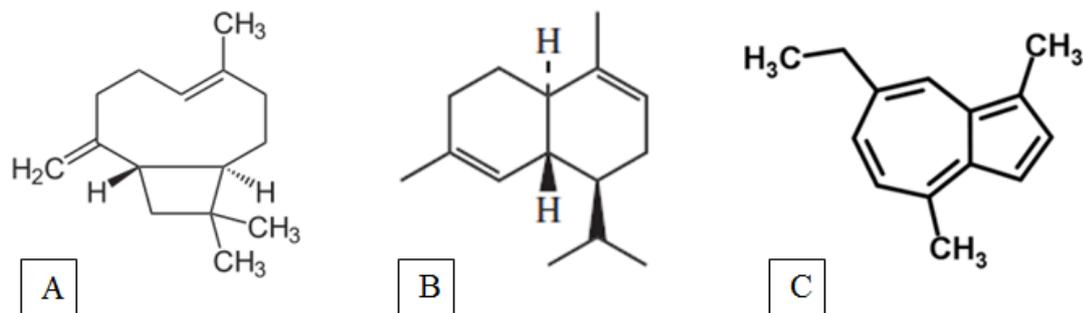


**Figura 2. Estructura química de algunos monoterpenos: (A) Limoneno, (B)  $\alpha$ -fellandrene, (C)  $\beta$ -pinene, (D)  $\beta$ -mirceno (Fuente: Baser y Buchbauer, 2010)**

### 2.2.1.2 Sesquiterpenos

Los sesquiterpenos (Figura 3) son terpenos de 15 átomos de carbonos, formados por un monoterpeno y un isopreno o el equivalente a 3 moléculas de isopreno (Martínez, 2001). Muchos de estos compuestos presentes en los aceites esenciales, la planta los usa como defensa al ataque de microbios, pues funcionan como fitoalexinas (compuestos antibióticos), además los emplean como inhibidores de la alimentación de herbívoros (Montes, 2009). Entre los sesquiterpenos más comunes se encuentran: cadineno en el limon (*Citrus limon* L.),  $\beta$ -cariofilleno en canela

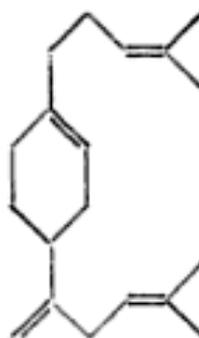
(*Cinamomum zeylanicum*) y clavo de olor (*Syzygium aromaticum* L.), el  $\alpha$ -cariofilleno en lúpulo (*Humulus lupulus* L.), álamo (*Populus alba* L.) y abedul (*Betula* sp.), el camazuleno en la manzanilla (*Matricaria camomilla* L.).



**Figura 3. Estructura química de algunos sesquiterpenos: (A)  $\beta$ -cariofileno, (B)  $\alpha$ -cadineno, (C) camazuleno (Fuente: Baser y Buchbauer, 2010)**

### 2.2.1.3 Diterpenos

Los diterpenos están constituidos por 20 átomos de carbonos y entre ellos se recuerdan: *p*-canforeno (alcanfor), cupreseno (ciprés). En la Figura 4 se representa la estructura química del diterpeno canforeno.

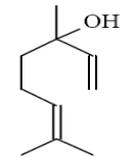
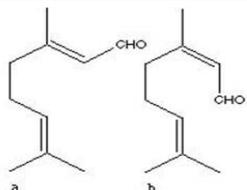
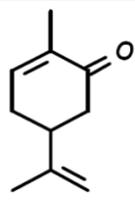
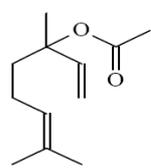
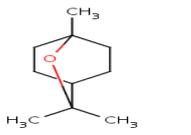
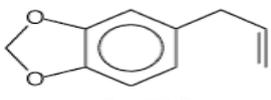
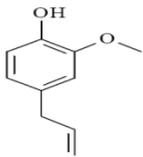


**Figura 4. Estructura química del diterpeno canforeno (Fuente: Baser y Buchbauer, 2010)**

### 2.2.2 Hidrocarburos Oxigenados

Los hidrocarburos oxigenados son hidrocarburos que a más de tener carbono e hidrógeno en su estructura están constituidos también por oxígeno, es decir terpenos que se han unido a un grupo funcional, entre los que destacan los alcoholes, aldehídos y cetonas, y en menor grado los ácidos carboxílicos, los ésteres y los éteres (Stashenko, 2009), como se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.****Principales compuestos hidrocarburos oxigenados.**

Compuesto	Grupo funcional	Ejemplo	Propiedades
Alcohol: Llevan el grupo hidroxilo (- OH) unido al esqueleto C10. Terminan en -ol.	 LINALOL	Mentol, geraniol, linalol	Antimicrobiano, antiséptico, tónico, espasmolítico
Aldehído: Son compuestos muy reactivos. Se nombran acabados en -al. Los encontrados en los cítricos.	 a b	Citral, citronelal, geraniol	Antiviral, antimicrobiano
Cetona: Se producen por la oxidación de alcoholes y son moléculas bastante estables. Terminan en -ona.	 CARVONA	Alcanfor, tuyona, pulegona, carvona	Mucolítico, regenerador celular, neurotóxico
Éster: La mayoría de los ésteres se forman por reacción de un alcohol terpénico con ácido acético.	 ACETATO DE LINALILO	Metil salicilato	Antifúngico, espasmolítico, sedativo
Éteres: Los éteres u óxidos monoterpénicos son reactivos e inestables.	 1,8 - SINEOL	Cineol, ascaridol,	Expectorante, estimulante
Éter fenólico: Constituido por Anillo - O - C	 SAFROL	Safrol, anetol, miristicina, apiol, estragol	diurético, carminativo, estomacal, expectorante
Fenol: Se encuentran en pocas especies pero son muy potentes e irritantes.	 EUGENOL	Timol, eugenol, carvacrol	Antimicrobiano irritante, estimulante inmunológico, anestésico.

Fuente: Bruneton, 2001

La composición del aceite esencial cambia en las diferentes partes de la planta, debido al polimorfismo fitoquímico entre los diferentes órganos de la misma; existen también diferencias en la composición entre las glándulas de aceite, relacionadas con la edad de la planta o pueden ser el resultado de las reacciones de la planta a condiciones ambientales específicas. La presencia de esencias en la planta es altamente dependiente de las condiciones climáticas, especialmente de la duración del día, la irradiación, la temperatura y el abastecimiento de agua (Baser y Buchbauer, 2010).

### **2.3 Aceites Esenciales en la lucha contra Patógenos Vegetales**

Los aceites esenciales son conocidos por su actividad antimicrobiana y aunque el mecanismo de acción no este identificado, se estima que coincide con la destrucción de la membrana microbiana por los constituyentes lipofílicos que poseen; además otros estudios reportan efectos como el cambio en la morfología del hongo, daños sobre las estructuras reproductivas (conidias, macroconidias e hifas), así como la disminución en la producción de micotoxinas (Alzate *et al.*, 2009).

La evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales debe tomar en cuenta la volatilidad, insolubilidad en agua y complejidad química de la esencia; el ensayo se realiza mediante dos técnicas principales: 1) método de difusión en disco (disco de papel), 2) método de dilución (agar o caldo líquido) (Gûiza y Rincón, 2007).

La actividad biológica de los aceites esenciales, así como de sus componentes solos o en combinación puede ser antibacteriana, antiviral, antifúngica e incluso insecticida. El estudio de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales ha sido motivo de varias investigaciones que buscan datos específicos como, método de extracción, rendimiento, dosis, concentración mínima inhibitoria (CMI), tipo de aceite esencial o componente químico con poder antimicrobiano, susceptibilidad del patógeno a la acción del aceite, entre otras (Stashenko, 2009).

Los ensayos de la actividad biológica de los aceites esenciales sobre fitopatógenos incluyen el uso de especies vegetales nativas con presencia de aceite, y su efecto sobre hongos patógenos de importancia económica en la agricultura. Así, se ha prestado gran atención a especies del género *Fusarium*, entre ellas las

investigación realizada por Hashem *et al.* (2010), presentaron como resultados el efecto inhibitorio de los aceites esenciales de geranio y albahaca sobre el crecimiento del micelio de *Fusarium* sp.. Criollo *et al.* (2012) probaron tres mezclas binarias de romero (*Rosmarinus officinalis* L.), arrayán (*Luma apiculata* Burret) y menta (*Mentha pulegium* L.) y, una mezcla terciaria con los tres aceites; las mezclas fueron diluidas (1:1) en el medio mínimo Czapeck y sobre ellas se inoculó la cepa de *Fusarium* sp. durante 96 horas; los resultados mostraron que las mezclas ejercieron un poder inhibitorio en el que las concentraciones mínimas de inhibición fueron 125  $\mu\text{L}/\text{mL}$  y 62,5  $\mu\text{L}/\text{mL}$ .

Barrera y García (2008) evaluaron la actividad antifúngica de nueve aceites esenciales [epazote (*Teloxys ambrosioides*), hierba buena (*Mentha piperita*), ruda (*Ruta chalepensis*), tomillo (*Thymus vulgaris*), canela (*Cinamomun zeylanicum*), clavo (*Syzygium aromaticum*), ajo (*Allium sativum*), limon mexicano (*Citrus aurantifolia*) y eucaliptus (*Eucaliptus globulus*)] y diez compuestos puros comerciales (aldehído cinámico, ácido trans-cinámico, carvacrol, cienol, citral, citronelol, geraniol, linalol, mentol y timol). En el estudio se evaluaron concentraciones de 100, 150, 200, 250 y 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de los aceites esenciales y sus componentes puros para medir el eventual efecto antifúngico sobre *F. oxysporum*. Los resultados mostraron que los aceites esenciales de *C. zeylanium* y *S. aromaticum* y *T. vulgaris* poseían mayor inhibición del crecimiento del micelio; los dos primeros lo hacían dependiente de la dosis usada y *T. vulgaris* mostró una inhibición del crecimiento del hongo a todas las dosis evaluadas. Los compuestos carvacrol, timol y aldehído cinámico, a todas las concentraciones estudiadas inhibieron completamente el crecimiento del micelio; el citral, citronelol, geraniol y linalol presentaron nulo crecimiento micelial a partir de dosis inferiores a 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Otros estudios sobre el hongo fitopatógeno *Fusarium* sp. determinaron óptimas propiedades antifúngicas del aceite esencial de *Piper auritum* y fungistáticas de *P. aduncum* subsp. *ossanum* (Duarte *et al.*, 2013); de la misma manera el aceite esencial de *Eucalyptus tereticornis* mostró una inhibición completa del crecimiento de *F. oxysporum* a una concentración de 3000 ppm, registrando un dato mejor que el fungicida comercial Dithane, activo a 10000 ppm, usado como patrón.

Otros hongos de interés que han sido estudiados son *Colletotrichum* sp. y *Botrytis cinerea*, patógenos de un gran número de hortalizas. La actividad antifúngica del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* fue evaluada por Alvarado *et al.* (2012), sobre cepas de *Colletotrichum* sp. del tomate de árbol; los resultados mostraron que el aceite esencial inhibió el crecimiento del hongo de forma dosis dependiente, llegando a ser la CIM (concentración inhibitoria mínima) de 62,5  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Otros investigadores, Silva *et al.* (2013) mencionan que al adicionar aceite de hoja de canela disminuyó la presencia del micelio de *B. cinerea* en frutos de fresa, pues el índice de daño decreció conforme aumentó la concentración aplicada.

Los estudios arriba mencionados, han permitido que el uso de aceites esenciales haya cobrado importancia dentro de la agricultura. Pues son considerados fuentes botánicas potenciales para encontrar o desarrollar nuevos agroquímicos que sean amigables con el medio ambiente, que posean baja toxicidad para animales de sangre caliente, alta volatilidad y toxicidad para plagas de granos almacenados y para microorganismos patógenos de las plantas (Prieto *et al.*, 2010).

El estudio de los aceites esenciales ha sido ampliamente difundido y utilizado no solo con miras a aplicaciones a campo abierto, sino también dentro de la propagación *in vitro*; se cita por ejemplo el trabajo realizado por Serrano *et al.* (2012), que con la finalidad de reducir la contaminación en medio de cultivo de propagación *in vitro* de orquídeas, utilizó concentraciones de 3  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , 6  $\mu\text{L}/\text{mL}$  y 9  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de aceite esencial de menta (*Mentha pulegium*) y cedrón (*Alloysia tryphylla*). Los resultados mostraron que el aceite de *M. pulegium* a la mayor concentración, alcanzó el 50% de inhibición, por otra parte el aceite esencial de *A. tripilla*, a todas las concentraciones evaluadas, presentó el 100% de inhibición en el mismo periodo de tiempo.

La capacidad de producir y acumular aceites esenciales no es característica de todas las plantas, más bien varía dentro del reino vegetal. Las familias de plantas que secretan aceites esenciales no están restringidas a un solo grupo taxonómico, sino se extienden dentro de diferentes clases botánicas. Dentro de las gimnospermas se citan las familias Cupressaceae y Pinaceae, mientras en las angiospermas se recuerdan las familias Apiaceae, Asteraceae, Geraniaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myristicaceae, Myrtaceae, Oleaceae, Poaceae, Rosaceae, Zingiberaceae, como aquellas familias que producen los aceites esenciales de mayor interés económico. Aparte del grupo

fitoquímico de sustancias típicas para un taxón, el perfil químico depende además del genotipo específico de la planta, de su etapa de desarrollo, así como de las condiciones climáticas en las que se encuentra (Baser y Buchbauer, 2010).

Las regiones tropicales albergan entre el 80% y 90% de todas las especies vegetales; las características aromáticas de la mayoría de estas plantas son todavía desconocidas, por ello las plantas tropicales representan un abanico extremadamente grande para investigar nuevos aceites esenciales (Gassenmeier *et al.*, 2001).

Las plantas objeto de estudio de la presente tesis han sido el limón (*Citrus limon* L.), la hierba luisa (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf), la canela o ishpink (*Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm) y el matico (*Piper aduncum* L.). A continuación se describen brevemente las propiedades de los aceites esenciales de dichas plantas.

### 2.3.1 *Citrus limon* L.



**Figura 5. Planta de *Citrus limon* L. (Fuente: Andrade, 2005)**

El género *Citrus* incluye varias especies entre ellas las naranjas (*C. sinensis*, *C. aurantium*), los limones (*C. limon*), las mandarinas (*C. reticulata*, *C. reshni*) y los pomelos (*C. paradisi*), pertenecientes a la familia *Rutaceae*. Son plantas grandes arbustos o arbolillos perennes que toman el nombre de cítricos (Bernal *et al.*, 2011).

El género *Citrus* fue introducido del Sur-Este de Asia y hoy en día se cultiva en todo el área sub-tropical, donde el clima es lo suficientemente cálido y húmedo. Los mayores productores mundiales son India, Méjico, Argentina, Brasil y España. En el

Ecuador se cultiva en las regiones Litoral, Sierra y Oriente. Los sitios representativos de cultivos de limón en la costa ecuatoriana son Portoviejo, Balzar, Vinces y la Península de Santa Elena; de manera habitual es cultivado en toda la Amazonía (Daste, 2010).

Los cítricos poseen propiedades curativas, antisépticas, anticancerígenas y antitumorales. El limon *C. limon* (Figura 5) es conocido por su alto poder antiséptico y bactericida (Daste, 2009).

El estudio de la composición química del aceite esencial *C. limon* realizada por varios autores, incluye resultados que varían en su composición específica. Calle (2010) en un estudio realizado sobre el limon procedente de la Universidad Politécnica de Valencia (España) determinó que el aceite de *C. limon* poseía una predominancia de monoterpenos hidrocarbonados (55.57%), seguidos de los oxigenados (41.50%); los compuestos más representativos cualitativa y cuantitativamente fueron geraniol (25.96%) y neral (18.71%) entre los monoterpenos oxigenados y, limoneno (25.48%) y  $\beta$ -pineno (9.45%) entre los no oxigenados. Los componentes sesquiterpénicos correspondían al  $\beta$ -cariofileno y su óxido.

Mejía y Rengifo (2000) afirmaron que los principales constituyentes del limón son el citral, linalol, pectina, ácidos cítrico y málico, candineno, felandreno, d-limoneno, citronelal.

Bejarano y Centeno (2009) mencionan que el aceite esencial de *C. limon* (muestras provenientes de Caracas, Venezuela) mostraron actividad inhibitoria sobre hongos fitopatógenos, atribuyendo su efecto a una gran variedad de sustancias fitoquímicas tales como el E-citral, Z-citral,  $\alpha$ -pineno, genariol, mirceno y 1- $\beta$  pineno. Finalmente Landero (2013) afirma que el aceite esencial de *C. limon* tuvo diferentes compuestos químicos, entre ellos se destacaron los terpenos, el citral y el limoneno que poseían gran actividad fungitóxicas.

En el campo de la salud humana se ha comprobado el efecto bactericida asociadas con el acné, manchas en la piel y para aliviar las picaduras de insectos; en el cuero cabelludo disminuye la caspa y la dermatitis seborreica. También se ha observado que calma la gripe, tos, bronquitis y resfríos. El aceite de limon y sus derivados se utilizan en la industria farmacéutica, perfumería y cosmética. Se ha

descrito que *C. limon* posee propiedades repelentes de insectos que se pueden utilizar en la agricultura (Castro, 2013).

En el ámbito farmacéutico se ha determinado la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Citrus sinensis* L. frente a las bacterias patógenas humanas *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis* (Juárez *et al.*, 2010). Considerando las propiedades antibacterianas e insecticidas de los aceites esenciales del género *Citrus*, resulta de interés estudiar también las propiedades antifúngicas (Calle, 2010; Juárez *et al.*, 2010).

### 2.3.2 *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf



**Figura 6. Planta de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (Fuente: Del Pozo, 2006)**

El género *Cymbopogon* forma parte de las 120 especies que pertenecen a la familia Poaceae, originaria de la India, Ceilán y la península Malaya, en las regiones de Asia Suroriental y África ecuatorial. Se encuentra distribuida en todas las zonas pantropicales y subtropicales (Berdonces 2010; Del Pozo, 2006).

*Cymbopogon citratus* (Figura 6) es una especie tropical conocida como caña santa, limonaria, limoncillo, hierba de calentura, hierba limón y otros; en el Ecuador *C. citratus* se conoce con el nombre hierba luisa (Soto *et al.*, 2002). La hierba luisa

es una planta perenne, vivaz que crece hasta 1 m de altura, posee un agradable y característico olor a lima o limón. La hierba luisa se caracteriza por su contenido de aceite esencial, es cultivada en numerosos países tropicales como materia prima para la obtención de aceite esencial y para usos alimenticios (bebidas) y medicinales (antibacterianas, antimicóticos) (Vargas y Bottia, 2008; Borja, 2007).

La composición química del aceite esencial de esta especie es compleja, los principales compuestos identificados son los monoterpenos borneol, canfeno, canfor, car-3-eno, cineal, citral a, citral b, citronelol, fenchone, geranial, geranio, acetato de geraniol, 6-metil-hepta-5-en-2-ona, limoneno, linaldol, oxido de linaldol, mentol,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, terpineol, terpinoleno, triterpenos, cymbopogonol, cymbopogona, cymbopogonol, sesquiterpeno, oxi-bisaboleno, b-cardineno, farnesol, humuleno, alcanos-3-metil-hepta-2-ona, metil-heptenona, hexacosan 10-1, triacontan-1-1, b-sitosterol. La caracterización del aceite esencial de las hojas de *C. citratus* provenientes de Huanuco-Perú mostrarán un elevado contenido de citral que representa entre el 50 al 75% del total de la esencia (Borja, 2007). Otro análisis realizado por Mendoza y Taborda (2010) reveló que el citral (41.8% de geranial y 34.9% de neral) es el principal constituyente del aceite esencial extraído de hojas provenientes de Santa María, Colombia. Los investigadores Vargas y Bottia (2008) analizaron químicamente el aceite esencial de *C. citratus* de plantas provenientes de Santander-Colombia, los resultados revelaron que los principales componentes son los monoterpenos piperitona, nerol y  $\beta$ -Mirceno, que representan el 77.5% de la esencia.

La actividad antifúngica del aceite esencial de *C. citratus* ha sido ampliamente reportada en literatura sobre todo contra hongos fitopatógenos (*Fusarium culmorum*), dermatofitos (*Trichophyton mentagrophytes*), contra hongos que afectan a los productos agrícolas (*Aspergillus niger*, *A. ochraceus*) en la post-cosecha y también contra bacterias (*Beneckea natriegens*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella pullorum* y *Staphylococcus aureus*). Se estima que la acción antifúngica sea debida especialmente a los componentes presentes en mayor concentración en el aceite esencial, que son el citral, el geranial, el neral y el mircene (Sacchetti *et al.*, 2005; Vargas y Bottia, 2008).

Sánchez *et al.* (2007) evaluó la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *C. citratus* frente a cepas de hongos y bacterias aisladas de cultivos *in vitro* de especies vegetales; concentraciones de 5 µL/20 mL inhibieron el crecimiento del 100% de las cepas de los hongos *Aspergillus niger*, *Aspergillus sp.*, *Helminthosporium sp.*, *Penicillium sp.*, *Rhizopus sp.*, y, de las bacterias *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium sp.*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri* y *Staphylococcus aureus*. El 75% de las cepas bacterianas fueron controladas a una concentración de 0.03% de aceite esencial.

El aceite esencial de *C. citratus* por su alto contenido de citral presenta una gran efectividad frente a *A. niger*, *A. ochraceus*, *Beneckea natriegens*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium perfringens*, *F. culmorum*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella pullorum*, y entre otros (Vargas y Bottia, 2008). Otros estudios también comprobaron el poder antibacteriano y antifúngico del aceite esencial; los resultados mostraron que el aceite de hierba luisa tuvo mayor actividad antimicótica que antibacteriana, inhibiendo completamente el crecimiento de la levadura *Candida albicans* ATCC 10231 y del hongo *Aspergillus niger* ATCC 16404. Otras investigaciones reportan que el aceite esencial de *C. citratus* detiene el crecimiento del micelio de fitopatógenos como *Aspergillus flavus* (Del Pozo, 2006) y del agente causal de la antracnosis de la maracuyá *Colletotrichum sp.* (Alvarado *et al.*, 2012).

### 2.3.3 *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm



**Figura 7. Planta de *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm (Fuente: Cazorla, 2013)**

La familia Lauraceae está formada de 2750 especies reunidas en 50 géneros (Ferrer-Pereira, 2009). Son árboles que se encuentran distribuidos en las zonas tropicales de todo el mundo, los centros de alta diversidad se encuentran en América del norte y del sur, sudeste de Asia y Madagascar, algunas especies se encuentran en las zonas subtropicales e incluso en zonas templadas. (Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas Sinchi, 2006).

Son árboles perennes generalmente de gran tamaño que al ser cortados liberan un olor fuerte que varía desde dulce a fétido según la especie. *Ocotea quixos* (Figura 7) es un árbol tropical considerado una especie endémica del bosque húmedo de la Amazonía ecuatoriana, se conoce con diferentes nombres entre los que se destacan, canelón, ishpink, ishpingu y/o ishpingo (Ríos *et al.*, 2007; Cazorla, 2013).

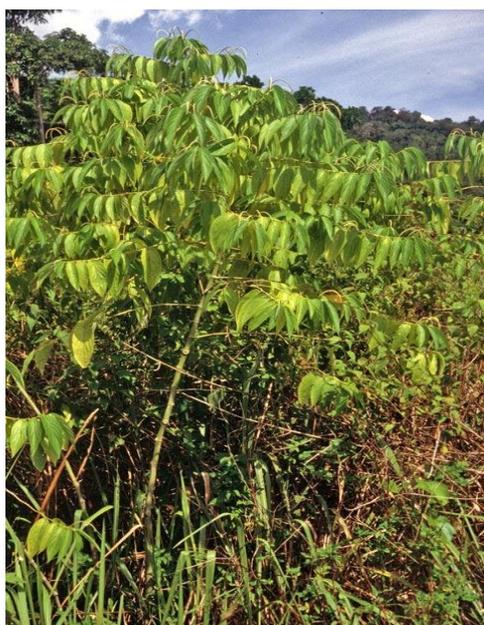
El ishpingo es una planta rica en aceite esencial, entre sus principales componentes se encuentran: canfeno, benzaldehído, terpinolen, cimeno, linalol, hidroxicinemaldehído, bornil alcohol, 4 terpineol, cinemaldehído, acetol, ciclosativeno, a copaeno, cinamato de metil (Ferrer-Pereira, 2009). El aceite esencial se encuentra distribuido en diferentes órganos de la planta y, gracias a sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas, ha sido motivo de estudio de varios investigadores. Noriega y Dacarro (2008) han extraído el aceite de hojas frescas de *O. quixos* provenientes del bosque de la provincia de Morona Santiago, han identificado un 83,89% de compuestos por cromatografía de gases (CG-MS), siendo los principales cariofileno (19.029%), humuleno (14.323%) y eremofileno (11.407%); mismos que sobresalen de un total de 62 componentes, de ellos 30 identificados, además evaluaron la actividad antifúngica del aceite esencial sobre hongos y bacterias. Los resultados comprobaron que el aceite esencial de *O. quixos* poseyó alta capacidad de inhibir el crecimiento de cepas, destacando la concentración mínima inhibitoria (MIC) de 12.50  $\mu\text{L}/\text{mL}$  para *Candida albicans* y *Escherichia coli*, 6.25  $\mu\text{L}/\text{mL}$  para *Staphylococcus epidermis*, 3.12  $\mu\text{L}/\text{mL}$  para *S. aureus*, 0.39  $\mu\text{L}/\text{mL}$  para *Streptococcus piogenes* y menor a 0.10  $\mu\text{L}/\text{mL}$  para controlar el crecimiento de *S. mutans*.

En otro estudio Bruni *et al.* (2004), al estudiar la composición del aceite esencial de *O. quixos* de cálices secos colectados en Macas-Ecuador, identificaron 44 de los

55 componentes, que constituye más del 98% de la fracción volátil. Además determinaron que el aceite es rico en monoterpenos oxigenados alcanzando el 48.8%, con un alto contenido de aldehídos de 32.2% y que la concentración de sesquiterpenos es baja alcanzando el 13.7%, identificaron cantidades importantes de  $\beta$ -selineno (2.06%),  $\beta$ -cariofileno (1.85%), un-humuleno (1.79%) y copaeno (1.26%). Finalmente, el alto contenido de trans-cinamaldehído (29.7%) y cinamato de metilo (21.7%) hizo creer que son los compuestos responsables del aroma del ishpink.

También comprobaron la actividad antibacteriana del aceite esencial de *O. quixos* contra bacterias Gram+ (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*) y Gram- (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), así como la actividad antifúngica dependiente de la concentración del aceite contra *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae* (levaduras), *Pythium ultimum* (fitopatógeno) y *Trichophyton mentagrophytes* (dermatofito); los efectos del aceite esencial de *O. quixos* fueron comparados con *T. vulgaris*. Los mejores resultados del aceite esencial de *O. quixos* fueron contra *P. ultimum* con un porcentaje de inhibición de crecimiento del micelio del 85% a 500 mg/mL.

#### 2.3.4 *Piper aduncum* L.



**Figura 8. Planta de *Piper aduncum* L. (Fuente: Abreu *et al.*, 2012)**

La familia Piperaceae está formada por 10 géneros y unas 3000 especies, distribuidas en zonas pantropicales a nivel mundial. Generalmente son pequeños árboles, arbustos y trepadoras leñosas, con presencia de glándulas aromáticas, que poseen propiedades antimicóticas y antibacterianas de sus aceites (Flores, 2006). *Piper aduncum* L., conocida comúnmente como “matico” (Figura 8), es un árbol que se encuentra distribuido en zonas tropicales del Ecuador; en la Amazonía los pueblos indígenas le otorgan varias propiedades curativas (Rios *et al.*, 2007; Albarracín y Gallo, 2003), mismas que dependen de los compuestos químicos presentes en su aceite, entre ellas, la actividad antimicrobiana (Apiol, dilapiol, miristicina y piperitona), antidepresiva (miristicina), y repelente (piperitona). También se usan como sinergistas (dilapiol y miristicina) de insecticidas organofosforados y carbamatos (Albarracín y Gallo, 2003).

El aceite esencial de *Piper aduncum* (matico) ha sido estudiado por varios autores, los resultados reportados indican una variación en la composición química. Guerrini *et al.* (2009) mencionan que el dilapiol estuvo presente en un 45.9% en el aceite de matico de origen ecuatoriano. En estudios realizados por Pino *et al.* (2011), obtuvieron como principales constituyentes el canfeno, alcanfor, piperitona y viridifloral, e indicaron que en especies procedentes de diferentes países el dilapiol es el principal compuesto, fluctuando su contenido entre 25.8% y 90%. En variedades brasileñas el contenido de dilapiol estuvo entre el 74.5% y 88.4%, sumándose trazas de alcanfor; en variedades de Costa Rica el contenido de dilapiol varió de 32.9% a 61.8%, piperitona 2.2% a 13.5%, cineol 0.1% a 8.6%. Muestras procedentes de Panamá tuvieron un alto contenido de sesquiterpenos comparado a muestras procedentes de Bolivia donde predominan los monoterpenos.

El aceite esencial de *Piper aduncum* tuvo actividad antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Cryptococcus neoformans*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium smegmatis*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Staphylococcus aureus*, y una menor actividad contra *Aspergillus flavus* y *Trochophyton mentagrophytes*.

En una investigación se determinó que su compuesto dilapiol, redujo el crecimiento de larvas de insectos que atacan al maíz y ha demostrado actividad antifúngica contra *Aspergillus niger* y *Helminthosporium oryzae* (Albarracín y Gallo, 2003).

Además, Guerrini *et al.* (2009) evaluaron la actividad antifúngica de los aceites esenciales de *P. aduncum* a concentraciones de 50 µg/mL, 100 µg/mL y 500 µg/mL sobre hongos fitopatógenos, dermatofitos y algunas bacterias. Entre los hongos patógenos estudiados se encuentran: *Botrytis cinérea*, *Magnaporthe grisea* ATCC 64413, *Nanizzia cajetani*, *Pythium ultimum*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton tonsurans*. Entre las bacterias evaluadas están las Gram (-) (*Escherichia coli* ATCC 4350, *Klebsiella oxytoca* ATCC 29516, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 17934, *Proteus mirabilis* ATCC 29852) y las Gram (+) (*Bacillus subtilis* ATCC 7003, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Micrococcus luteus* ATCC 9622, *Staphylococcus aureus* ATCC 2921). Los mejores resultados se obtuvieron a la concentración de 500 µg/mL, contra las cepas de hongos, inhibiendo completamente el crecimiento del micelio.

### 2.3.5 *Thymus vulgaris* L.

Los estudios de actividad antifúngica de los aceites esenciales de esta tesis, se realizaron comparando los datos con el aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris* L.) (Figura 9).



**Figura 9. Planta de *Thymus vulgaris* L. (Fuente: Lagos, 2012)**

El tomillo ha sido una de las especies más ampliamente estudiadas y la actividad biológica de su aceite esencial está relacionada con sus principales componentes: timol y carvacrol. El timol tiene efectos antibacterianos, antifúngico y antivírico, y se lo puede utilizar como repelente de insectos; todos estos efectos del aceite esencial

del tomillo han sido demostrados por diversos investigadores (Lagos, 2012).

La determinación cualitativa y cuantitativa de los metabolitos secundarios presentes en el aceite esencial de tomillo realizada por Lagos (2012), utilizando la técnica de Cromatografía de Gases con detección de masas, ha caracterizado el aceite en un 100% y se han identificado ocho componentes, entre los principales el monoterpeno Thymol (33.75%), seguido del Benzene, 1-methyl-3-(1-methylethyl)- (26.67%) y 1,4-Cyclohexadine, 1-methyl-4-(1-methylethyl)- (23.03%). Otros estudios fitoquímicos sobre la composición química del aceite esencial de tomillo han determinado que el timol, un fenol monoterpénico, es el compuesto principal (hasta un 70%), seguido del carvacrol (hasta un 65%), *p*-cimeno,  $\gamma$ -terpineno, limoneno, borneol y linalol (Lagos, 2012).

La actividad antifúngica del aceite esencial de tomillo ha sido estudiada por varios investigadores sobre diversos fitopatógenos. El efecto del timol, constituyente mayoritario del aceite esencial de *Thymus vulgaris*, a una concentración de 125 mg/L inhibió completamente el crecimiento del micelio del hongo *Colletotrichum acutatum* (agente causal de la antracnosis del tomate de árbol) y la germinación de esporas se evitó en un 100% con concentraciones de 100 mg/L y 125 mg/L. Varias investigaciones se realizaron sobre el efecto inhibitorio del aceite esencial de *T. vulgaris*, y por ello se suele considerarlo como patrón en estudio de bioactividad (Baser & Buchbauer, 2010)

#### ***2.4 Fitopatógenos de Cultivos Tradicionales Tropicales***

Los cultivos tropicales están expuestos al ataque de una amplia gama de microorganismos específicos que afectan a una especie vegetal, mientras que otros son polífagos y causan daño a diferentes cultivos. Los géneros de hongos de importancia en la agricultura (agronomía y alimentaria) afectan a los cultivos en diferentes etapas de desarrollo (siembra a cosecha), como en las posteriores etapas de recolección, almacenamiento y distribución, ya sea al fruto, tallo, hojas, raíces, tubérculos y semillas. La gran diversidad de hongos fitopatógenos se agrupan en algunos géneros y especies de importancia económica, que día a día se torna más difíciles de controlar (Muñoz, 2008).

Los productos vegetales son atacados por un grupo de hongos de aproximadamente 40 especies, entre ellos se destacan: *Alternaria*, *Botrytis*, *Coletotrichum*, *Diplodia*, *Fusarium*, *Monilinia*, *Penicillium*, *Phomopsis*, *Phytophthora*, *Rhizopus* y *Sclerotinia*. Existen hongos fitopatógenos que producen micotoxinas o alérgenos que contaminan el producto vegetal, causando indirectamente trastornos patológicos, alérgicos o tóxicos en los consumidores, los más representativos corresponde a los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* (Muñoz, 2008).

La Amazonía alberga diversidad de cultivos nativos y exóticos de importancia alimenticia, medicinal, cultural, que se han visto afectados por la acción de patógenos. Entre los principales hongos del trópico, se destacan aquellos huéspedes de cultivos tropicales de importancia económica a nivel regional y nacional. El Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias del Ecuador (2014) reporta que el cultivo de la naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) en el Ecuador es atacado por la enfermedad conocida con el nombre de fusariosis, causada por el hongo *Fusarium oxysporum*; otro cultivo importante es el cacao (*Theobroma cacao* Mill.), que se enfrenta al ataque de una amplia gama de patógenos, entre ellos: *Colletotrichum* sp., *Crinipellis pernicioso*, *Curvularia lunata*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium* sp, *Fusarium solani*, *Gliocladium* sp., *Glomerella* sp., *Moniliophthora roreri* (más frecuente), *Moniliophthora pernicioso*, *Nigrospora* sp., *Penicillium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Rhizopus* sp, *Rhizoctonia solani*, *Thanetophurus cucum*es y *Verticillium* sp. (Maridueña *et al.*, 2010; Maridueña, 2011).

#### **2.4.1 *Aspergillus oryzae***

El género *Aspergillus* de la familia Trichocomaceae encierra aproximadamente 900 especies distribuidas a nivel mundial, quienes se desarrollan en ambientes húmedos con una temperatura promedio de 37°C. Las esporas de *Aspergillus* se pueden desarrollar en ambientes sin oxígeno, crecen bien sobre materiales ricos en carbono de donde obtienen su alimento, aunque también se adaptan a ambientes con pocos nutrientes y escasa humedad; se puede encontrar creciendo en abonos, hojas caídas, en vegetación en descomposición, como también se desarrollan en plantas y árboles que aún viven (Villagómez *et al.*, 2003), se encuentran con frecuencia en

cereales, forrajes y algodón (Gassiot *et al.*, 2009); en general desarrollan bastante bien en fuentes que contengan almidón. Este hongo produce toxinas que pueden causar patologías en los animales (mamíferos y aves) y el hombre. Las micotoxinas junto con las estructuras del hongo contaminan los productos, disminuyendo el valor comercial de los mismos; los cultivos y alimentos como el árbol de nuez (*Juglans* sp.), maíz (*Zea mays* L.), maní (*Arachis hipogaeae* L.), trigo (*Triticum vulgare* L.) y semillas oleaginosas, están contaminados por micotoxinas aflatoxinas que son muy tóxicas y altamente cancerígenas (Villagómez *et al.*, 2003). Las esporas de *Aspergillus* también causan daño al hombre si son inhaladas directamente (Gassiot *et al.*, 2009).

En el campo agrícola, la especie *A. oryzae* ataca las mazorcas de cacao (*Theobroma cacao* L.), sobre todo si tienen alto contenido de humedad, este hongo filamentoso genera masas pulverulentas de esporas que cubren granos y raquis (CIMMYT, 2004).

El uso de fungicidas sintéticos en granos almacenados ha sido la principal alternativa de control de *Aspergillus* (Villagómez *et al.*, 2003). Se ha evaluado también la actividad de los productos naturales (extractos y esencias) para el control del patógeno y de las micotoxinas que produce, como ejemplo se menciona el uso del aceite esencial de Tomillo (*Thymus vulgaris*) para inhibir completamente el crecimiento y producción de las aflatoxinas de *A. parasiticus* (Barrera y García, 2008).

#### ***2.4.2 Cladosporium cladosporioides***

El género *Cladosporium* pertenece a la familia Davidiellaceae, es un género cosmopolita que encierra alrededor de 40 especies. El hongo se desarrolla bien en ambientes húmedos con alrededor del 80% de humedad y con una temperatura de 18 a 28°C, aunque algunas especies son consideradas xerófilas (soportan niveles de sequedad) y otras pueden tolerar -6°C de temperatura. Las esporas del hongo se pueden depositar en diferentes medios, entre ellos: aire, suelo, alimentos, textiles y demás materiales orgánicos (Braun y Konstanze, 2007; Crous *et al.*, 2007).

Las especies de *Cladosporium* pueden ser endófitas, patógenas o saprófitas; las especies saprófitas se desarrollan sobre el suelo y en plantas muertas sean herbáceas

o leñosas, o como invasores secundarios de manchas foliares necróticas; las endófitas y patógenas pueden vivir en plantas especialmente en tallos y hojas senescentes. Las esporas de *Cladosporium* son fácilmente transportadas por el aire y pueden viajar grandes distancias por largo tiempo (Borrego, 2012).

*C. cladosporioides* es un hongo que ataca a una gran diversidad de cultivos en postcosecha; causa lesiones superficiales, donde el área infectada presenta manchas que se cubren de una capa fungosa de color verde oliváceo (Rodríguez, 2008), esta enfermedad se ve favorecida por una alta humedad y una mala manipulación durante el almacenamiento de los frutos (Agrios, 2004).

En las pasifloráceas es causante de la enfermedad denominada Roya, de importancia comercial especialmente en el cultivo de la maracuyá (*Passiflora edulis*), ya que disminuye los rendimientos y calidad del fruto. Los síntomas de la enfermedad se presentan como pequeñas lesiones circulares en las hojas y frutos, que evolucionan hasta convertirse en costras de tamaño variable, que se distribuyen por todo el fruto (Delgado *et al.*, 2012).

El manejo de la enfermedad se basa en tratamientos preventivos que consisten en eliminar los frutos como principal inóculo de la enfermedad (Borrego, 2012), también se emplean medios culturales, químicos y biológicos para el control de *Cladosporium* (Terrerros, 2004). El uso de aceites esenciales ha tomado importancia en el control de patógenos, así para el control de la pudrición blanda Ochoa *et al.* (2012) ha utilizado esencial de *Thymus vulgaris* proveniente de Puebla (México), los resultados mostraron que el aceite a una concentración de 0.125 µL/mL ejerció una alta actividad antifúngica que inhibió el crecimiento de *Cladosporium cladosporioides*.

#### 2.4.3 *Fusarium solani*

*Fusarium* es uno de los géneros que integran la familia Hypocreaceae, agrupa aproximadamente 70 especies de distribución cosmopolita que tienen la capacidad de crecer a 37°C (Tapia y Amaro, 2014).

Las especies de *Fusarium* se encuentran ampliamente distribuidas en el suelo, comprenden especies patógenas y saprófitas; son las responsables de enfermedades vasculares en diversos cultivos y especies ornamentales, que disminuyen

considerablemente la productividad si no se controla a tiempo. Los síntomas de la enfermedad son hojas amarillentas que posteriormente mueren, decaimiento del tejido vegetal y muerte de la planta (Muñoz, 2008; Criollo *et al.*, 2012).

*F. solani* es un hongo que ataca plantas hortícolas, provocando infección en el tejido conductor de las mismas, los síntomas se manifiestan principalmente en plantas que han alcanzado la fructificación, en ellas se observa una lesión necrótica de color pardo en el tejido cortical de la base que asciende en forma unilateral a lo largo del tallo, con la consecuente defoliación. En estados avanzados de la enfermedad se produce la destrucción de la corteza en la zona basal y una constricción del tallo a lo largo de la mancha; este patógeno ha sido reportado como huésped de diversas especies, entre ellas: aguacate, judía, cítricos, cocotero, guisante, orquídeas, fruta de la pasión, calabacín, pimiento (Valencia, 2009).

Las enfermedades ocasionadas por las diferentes especies de *Fusarium* son difíciles de controlar, su control incluye principalmente la utilización de fungicidas sintéticos y prácticas culturales. La resistencia a estos antifúngicos ha obligado a buscar en los vegetales nuevas alternativas de biocontrol, entre ellas el uso de aceites esenciales. Entre las investigaciones realizadas se mencionan los resultados obtenidos por Barrera y García (2008), en ellos el aceite esencial de *Thymus vulgaris* mostró los mejores resultados al inhibir completamente el desarrollo del micelio a una concentración mínima de 200 µg/ml, mientras que los aceites de *Cinnamomum zeylanicum*, *Syzygium aromaticum* y *Teloxys ambrosioides* mostraron una inhibición dosis dependiente; por otra parte Duarte *et al.* (2013) menciona en su estudio que el aceite de *Piper auritum* inhibió completamente el crecimiento del hongo, mientras que *P. aduncum* mostró alto poder fungistático frente a cepa de *Fusarium*.

#### ***2.4.4 Moniliophthora roreri***

*Moniliophthora* es un Deuteromicete que encierra cinco grupos genéticos de *Monilia*, distribuidos en la cordillera oriental, central y occidental de América del sur. Todos los grupos de *Monilia* están presentes en el Ecuador, tres endémicos, uno en la periferia y el quinto en el centro del país (Villavicencio, 2010).

*Moniliophthora roreri* es un hongo que se reporta en un rango altitudinal comprendido entre 0 y 1520 msnm, y una temperatura de 18 a 28°C, aunque la infección aumenta en condiciones de alta humedad relativa y temperatura de 25°C (Ayala, 2008; Sánchez y Garcés, 2012).

Se trata de un hongo que prefiere como hospedero a las Malváceas, específicamente del género *Theobroma*: *T. cacao*, *T. angustifolium*, *T. bicolor*, *T. gileri*, *T. grandiflora*, *T. mammosum*, *T. simiarum* y *T. sylvestre* (Sánchez y Garcés, 2012). En la especie *Theobroma cacao* L., es responsable de la enfermedad conocida como Moniliasis que mayores pérdidas en producción de cacao ha ocasionado en Ecuador (Ayala y Navia 2010). La moniliasis es una de las enfermedades más importantes en el cultivo de cacao, los síntomas de la enfermedad son evidentes en los frutos en diferentes etapas de desarrollo, ocasionando necrosis, deformación, posteriormente el fruto se torna de tonalidad crema-oscuro al cubrirse con las esporas del hongo, internamente puede llegar a dañar todas las almendras de la mazorca, sin importar la edad del fruto (Sánchez y Garcés, 2012; Osorio, 2010).

El difícil control de la moniliasis requiere de estrategias culturales, genéticas, químicas y biológicas (Sánchez y Garcés, 2012). Los productos naturales como los aceites esenciales forman parte de la alternativa de control de la enfermedad. Lozada *et al.*, (2012) evaluó la actividad antifúngica de diferentes concentraciones de aceite esencial de *Lippia organoides*, *L. citriodora* y *L. alba*, logrando inhibir el 100% de la germinación y la inhibición del crecimiento del micelio del hongo cuando se usaron concentraciones de 800 a 1000 µg/mL, a menores concentraciones el aceite esencial de *L. organoides* mostró el mejor efecto antifúngico.

#### **2.4.5 *Phytophthora* sp.**

El género *Phytophthora* es un hongo oomiceto que vive en el suelo sobre restos de materia orgánica descompuesta o en descomposición. El patógeno se desarrolla en ambientes con alto contenido de humedad, como referencia *Phytophthora palmivora* requiere de 27.5 a 30°C de temperatura (puede tolerar extremos de 11°C y 35°C) y humedad relativa del 95 a 100% (Huilcapi, 2012; Ronquillo, 2012).

*Phytophthora* es un patógeno que ataca a diversos cultivos de interés comercial

como alfalfa, papa, pimiento, tomate, soya, incluso puede causar daño a especies silvestres en su medio ambiente. En todos los suelos existe inóculo del patógeno en mayor o menor cantidad. *Phytophthora* afecta el sistema radicular de las plantas, ocasionando pudrición radical con una tonalidad rojiza característica, que provoca la muerte de las raíces y consecuentemente el debilitamiento y la muerte de las plantas. Cuando ataca a plantas recién trasplantadas, a menudo no llegan a brotar o mueren en las semanas siguientes. En plantas establecidas, los primeros síntomas aparecen en hojas que inicialmente presentan amarillamiento entre los nervios, volviéndose totalmente amarillas después. Generalmente, estas plantas siguen vegetando hasta que empieza a madurar la cosecha, entonces, el sistema radicular no es capaz de alimentar a la parte aérea y esta muere de repente (Pérez *et al.*, 2011).

En el Ecuador, una de las principales enfermedades en el cultivo cacao es la mazorca negra causada por *Phytophthora palmivora*, hongo que ataca a diferentes órganos de la planta, pero el daño principal sufren las mazorcas, reduciendo la producción considerablemente (Maridueña, 2011). En el tomate (*Solanum lycopersicum*), el hongo *Phytophthora infestans* es responsable de la enfermedad conocida como tizón tardío, que a pesar de la tecnificación y manejo del cultivo se ha vuelto incontrolable, pudiendo acabar con la plantación de la hortaliza, con ello ocasionar pérdidas cuantiosas para el agricultor y escases del producto en el mercado (Rivas, 2010).

El control de *Phytophthora* incluye prácticas culturales, químicas, biológicas. Las propiedades fungicidas y fungistáticas de los aceites esenciales han sido utilizadas para controlar el crecimiento del micelio del fitopatógeno. Carrillo *et al.* (2010) menciona que los aceites de *Thymus vulgaris* y *Menta piperita* (4 µL/UE) controlaron el micelio del patógeno *P. infestans* (Mont.) reduciendo su crecimiento en 92.1 y 89.9%, respectivamente.

#### **2.4.6 *Rhizopus stolonifer***

*Rhizopus* es un género cosmopolita que agrupa varias especies capaces de subsistir en diferentes ecosistemas; su versatilidad le permite sobrevivir a temperaturas extremas de hasta 4 y 38°C, y desarrollarse en un amplio rango de

humedades relativas. En el campo agrícola la especie considerada de mayor importancia es *Rhizopus stolonifer*, hongo causante de la pudrición blanda, enfermedad que ataca a los frutos en postcosecha; este patógeno se encuentra naturalmente en la cutícula de los frutos como papaya, fresa, tomate cucurbitáceas, ajo, camote, zanahoria, yuca, entre otros, también se encuentra presente en cultivos hortícolas como el maní, frejol, ají y en las Brasicáceas. *R. stolonifer* es considerado como uno de los fitopatógenos más destructivos y severos en el mundo, debido a las grandes pérdidas monetarias que ocasiona (Chávez, 2011).

El hongo *Rhizopus stolonifer*, es de fácil transmisión por herida, debido a que las esporas se encuentra comúnmente en el aire (Northover y Zhou, 2002).

En los frutos los síntomas característicos de la enfermedad son decoloración marrón claro, ablandamiento del tejido y una segregación acuosa; luego el tejido infectado toma un aspecto algodonoso de color blanco con puntuaciones negras, que corresponde al micelio y esporangios del patógeno (Guédez *et al.*, 2010).

Las estrategias de control de *Rhizopus* incluye el uso de fungicidas químicos, prácticas culturales, también se ha brindado atención a la utilización de productos naturales, como los extractos vegetales y el uso de aceites esenciales (Chávez, 2011).

Alvarado (2011), al evaluar el efecto antifúngico de los aceites esenciales sobre el patógeno, determinó que las concentraciones de 0.3 mg/mL de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), clavo (*Syzygium aromaticum*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) inhibieron por completo el crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* aislado de plantas de tomate proveniente de Yautepec-México.

## CAPÍTULO 3

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Lugar de la Investigación

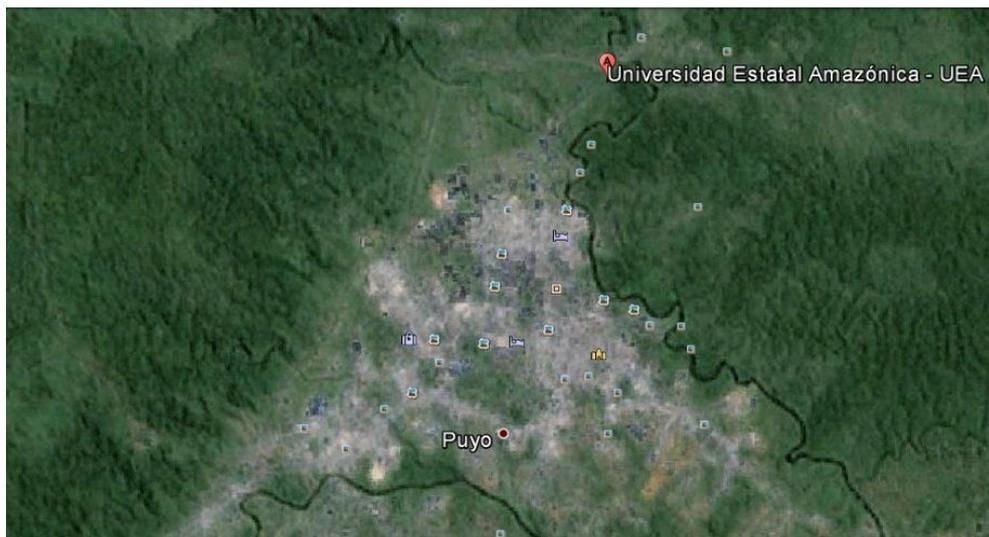
La investigación fue realizada en la provincia de Pastaza en la ciudad de Puyo (cantón Pastaza) y Santa Clara (cantón Santa Clara) (Figura 10). Pastaza se sitúa al este del país, en la zona central de la Región Amazónica a  $76^{\circ} 40'$  y  $78^{\circ} 10'$  W de longitud y  $01^{\circ}10'2^{\circ} 35'$  S de latitud, siendo Puyo la ciudad capital (Gobierno Autónomo Descentralizado Provincial de Pastaza, 2012). El Cantón Pastaza goza de un clima tropical húmedo, con una temperatura promedio que oscila entre los 17 y  $26^{\circ}\text{C}$ , una altitud de 953 msnm; La altitud a la que se encuentra el cantón y las especiales condiciones climáticas del bosque tropical amazónico, hacen que Puyo sea una ciudad de altos índices de lluvia que a veces sobrepasan los 4400 mm al año, y por esta razón existe una gran evapotranspiración generada por la vegetación tropical (Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal de Pastaza, 2012).

La fase experimental se desarrolló en los laboratorios de química y biología de la Universidad Estatal Amazónica (UEA) (Anexo1), ubicada en la ciudad del Puyo (Figura 11); durante el período comprendido entre octubre de 2013 a junio de 2014.



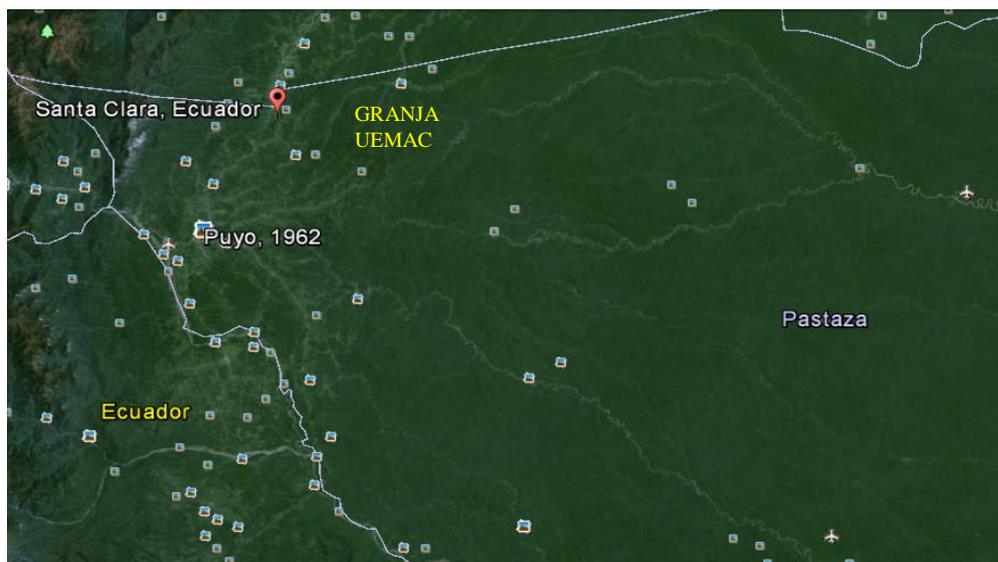
**Figura 10.** Ubicación de la localidad de estudio: Ciudad de Puyo, cantón Pastaza, provincia de Pastaza, Ecuador

(Fuente: <https://www.google.com.ec/search?newwindow=1&biw=1242&bih=>)



**Figura 11. Ubicación del sitio de estudio: Universidad Estatal Amazónica, Ciudad de Puyo, Cantón Pastaza, Provincia de Pastaza, Ecuador (Fuente: Google Earth - Universidad Estatal Amazónica, Puyo, Pastaza)**

La colecta de plantas para el estudio se realizó en los cantones de Pastaza y Santa Clara, en los predios de la UEA y en la Granja de la Unidad Educativa Mons. “Antonio Cabri” UEMAC, respectivamente (Anexo 3). La Unidad Educativa está ubicada en el barrio las Playas, de la ciudad y cantón de Santa Clara, Provincia de Pastaza (Figura 12). Santa Clara se localiza en el Km 40 sobre el margen izquierdo de la vía Puyo Tena, en las siguientes coordenadas: Latitud: 01°20'42" S, Longitud: 77°47'47" W. Las condiciones meteorológicas del cantón son clima tropical-húmedo, con una temperatura promedio de 20 a 27°C, humedad relativa de 87 a 89%, precipitación 3000 mm/año, altitud 953 msnm, heliofanía 980 horas luz/año, zona ecológica Bosque húmedo Tropical - Montano bajo y, topografía irregular (Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal de Santa Clara, 2011).



**Figura 12.** Ubicación de la Granja UEMAC, cantón Santa Clara, Provincia de Pastaza, Ecuador (Fuente: Google Earth - Santa Clara, Pastaza)

La extracción de los aceites esenciales y la actividad biológica sobre los hongos fitopatógenos se evaluó en los laboratorios de la Universidad Estatal Amazónica (Anexo 4). La caracterización química por cromatografía de gases acoplada a la masa (GC-MS) de los aceites esenciales objeto de estudio, se realizó en laboratorios de la Universidad de Ferrara (Italia), como parte del convenio que mantiene con la Universidad Estatal Amazónica, mismo que se enmarca dentro del proyecto “Caracterización química y actividad biológica de aceites esenciales obtenidos de plantas Amazónicas”.

### **3.2 Factores en estudio**

#### ***3.2.1 Especies Vegetales***

El trabajo de investigación se fundamentó sobre el estudio de los aceites esenciales de cuatro plantas amazónicas, pertenecientes a cuatro distintas familias botánicas: *Citrus limon* L. (Rutaceae), *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (Poaceae), *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm (Lauraceae) y *Piper aduncum* L. (Piperaceae).

La selección de las especies vegetales se realizó en base a los siguientes criterios: a) procedencia de familias botánicas que tienen aceite esencial, b) poseer

aceite esencial con propiedades biológicas y c) tener usos tradicionales por parte de las poblaciones indígenas amazónicas.

Las muestras se recolectaron en la Provincia de Pastaza en Puyo y Santa Clara, y fueron identificadas taxonómicamente (Tabla 2) por el Dr. David Neil y conservadas en el herbario de la Universidad Estatal Amazónica (ECUAMAZ-UEA)

**Tabla 2.**

***Plantas amazónicas seleccionadas para la extracción de aceites esenciales.***

Nombre científico	Familia	Nombre común	Procedencia	Estado de la planta
<i>Citrus limon</i> L.	Rutaceae	Limón	Unidad Educativa Antonio Cabri – Cantón Santa Clara	Semicultivado
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	Poaceae	Hierba luisa	Unidad Educativa Antonio Cabri – Cantón Santa Clara	Semicultivado
<i>Ocotea quixos</i> (Lam.) Kosterm	Lauraceae	Ishpingo-Canela	Unidad Educativa Antonio Cabri – Cantón Santa Clara	Semicultivado
<i>Piper aduncum</i> L.	Piperaceae	Matico	Universidad Estatal Amazónica – Cantón Puyo	Silvestre

**3.2.1.1 *Citrus limon* L. (Limón rugoso)**

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Sapindales
Familia	Rutaceae
Género	<i>Citrus</i>
Especie	<i>Citrus limon</i> L. (Chávez y Arboleda, 2011)



**Figura 13. Planta de *Citrus limon* L.**

*Citrus limon* L. (Figura 13) es un árbol pequeño, espinoso perteneciente a la familia Rutaceae, de hojas ovadas, acuminadas, aserradas, con peciolo estrechamente alado o marginado, y la yema de las flores rojizas; las flores son de color blanco-purpúreas. Fruto oval con 8-10 segmentos, pose un alto contenido en vitamina C y ácido cítrico, el cual les proporciona el sabor ácido característico (Mejía y Rengifo, 2000).

### **3.2.1.2 *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (Hierba luisa)**

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Subclase	Commelinidae
Orden	Poales
Familia	Poaceae
Genero	<i>Cymbopogon</i>
Especie	<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf (Borja, 2008)



**Figura 14. Planta de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf**

*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (Figura 14) es una planta herbácea, rizomatosa, perenne, aromática y robusta, que se propaga por esquejes y pertenece a la familia Poaceae; la planta es conocida con el nombre común de Hierba Luisa. Forma macollos compactos hasta de 2 m de alto. Tiene hojas muy aromáticas, linear-lanceoladas de 20 a 100 cm de largo, 0.5 a 1.5 cm de ancho, nervio central fuerte, nerviaciones paralelas, ásperas, de color verde claro que brotan desde el suelo formando matas densas y el borde es escabroso. Las flores se reúnen en espiguillas de 30-60 cm de longitud formando racimos (Mejía y Rengifo, 2000).

### **3.2.1.3 *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm (Ishpingo)**

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Laurales
Familia	Lauraceae
Género	<i>Ocotea</i>
Especie	<i>Ocotea quixos</i> (Lam.) Kosterm (Cazorla, 2013)



**Figura 15. Planta de *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm**

*Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm, pertenece a la familia Lauraceae. La planta se caracteriza por ser un árbol perenne que alcanza hasta los 10 metros de altura, con lámina de la hoja de 14.5-23.5 cm de longitud por 3.5-6 cm de ancho, y por tener el característico olor a canela; la flor es blanco-verdosa, el cáliz persistente de seis sépalos y el fruto ovalado es de 4 cm de longitud. La especie florece y fructifica cada dos años cuando alcanza mínimo los veinte años de edad (Noriega y Dacarro, 2008).

#### **3.2.1.4 *Piper aduncum* L. (Matico)**

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Magnoliidae
Orden	Piperales
Familia	Piperaceae
Género	<i>Piper</i>
Especie	<i>Piper aduncum</i> L. (Flores, 2006).



**Figura 16. Planta de *Piper aduncum* L.**

*Piper aduncum* L. (Figura 16) es un árbol de la familia Piperaceae, de 6 -7 metros de altura con tallo leñoso verde, con nudos hinchados, ramificado y verde o gris pálido, con hojas de color verde claro, peciolo corto, alternas y en forma de lanza con el ápice en punta. Las hojas se caracterizan por tener de 12-20 cm de largo y 5-8 de ancho, superficie escabrosa, nervadura secundaria mayor levantada desde la mitad inferior de la vena media. La especie presenta inflorescencia en espiga simple, densa o compuesta con pequeñas flores hermafroditas, de color blanco, 4 mm de grosor y 12 cm de largo. Su fruto es una pequeña drupa con semillas negras (Mejía y Rengifo, 2000).

### **3.2.2 Hongos Fitopatógenos**

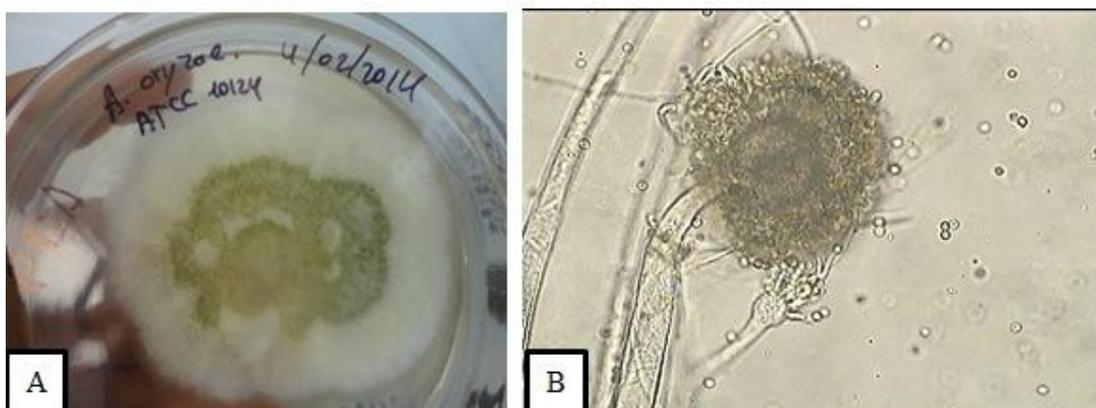
La actividad biológica de los aceites esenciales se evaluó sobre seis hongos fitopatógenos, comunes a los cultivos tradicionales de la Amazonía. Las cepas utilizadas fueron: *Aspergillus oryzae*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium solani*, *Rhizopus stolonifer*, *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora* sp., como se muestra en la Tabla 3. Las cuatro primeras son cepas ATCC (American Type Culture Collection), mientras las otras han sido aisladas y purificadas a partir de material vegetal enfermo, en los laboratorios de la UEA.

**Tabla 3.**

***Hongos fitopatógenos utilizados en el ensayo de la actividad antifúngica y su procedencia***

Especie	Familia	Procedencia
<i>Aspergillus oryzae</i>	Trichocomaceae	ATCC 10124
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Davidiellaceae	ATCC 16022
<i>Fusarium solani</i>	Hypocreaceae	ATCC 36031
<i>Moniliophthora roreri</i>	Marasmiaceae	Cultivares de cacao – UEMAC
<i>Phytophthora</i> sp.	Pythiaceae	Cultivares de cacao – UEMAC
<i>Rhizopus stolonifer</i>	Mucoraceae	ATCC 6227 a

### 3.2.2.1 *Aspergillus oryzae*

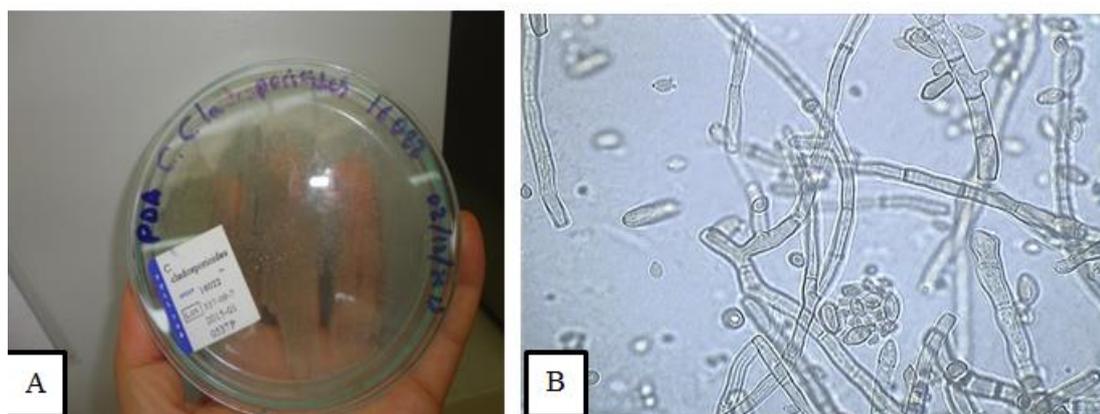


**Figura 17. (A) Micelio, (B) conidióforos y conidios de *Aspergillus oryzae***

Según Arias y Piñeros (2008), *Aspergillus* pertenece a la división Deuteromycetes, clase Hyphomycetes, orden Hyphomycetales y familia Moniliaceae. Este hongo se caracteriza por formar un micelio vegetativo de hifas septadas, ramificadas, incoloras; las estructuras de reproducción son los conidios, desarrolladas como pedicelos y cabezuelas que se originan de hifas especializadas de paredes gruesas, las cuales producen conidióforos que sostienen a los conidios. La colonia al inicio es plana, de color blanco y luego toma un aspecto algodonoso, a

medida que envejece, esporula y se va tornando de aspecto verdoso. Los conidióforos de *A. oryzae* son de paredes gruesas, hialinos, con vesículas subglobosas de 40 a 80  $\mu\text{m}$  de diámetro, con fiálides de 10-15 x 3-5.0  $\mu\text{m}$  que crecen sobre las vesículas o las métulas, posee además conidios globosos a subglobosos de 3.5-4.0  $\mu\text{m}$ , de color verde (Figura 17).

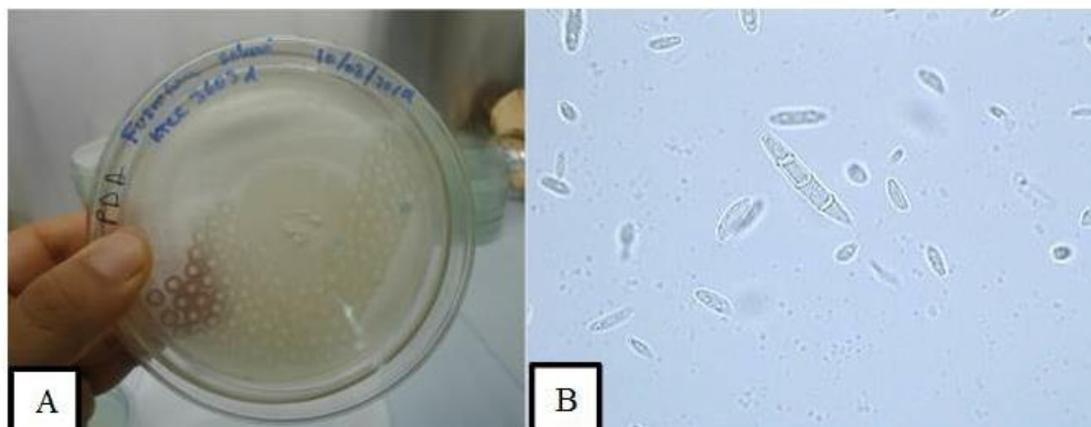
### 3.2.2.2 *Cladosporium cladosporioides*



**Figura 18. (A) Micelio, (B) hifas y conidios de *Cladosporium cladosporioides***

Según Terreros (2004), *Cladosporium* pertenece a la clase Deuteromycetes, orden Moniliales, familia Davidiellaceae. Es un hongo imperfecto que se reproduce únicamente a través de esporas asexuales, mismas que se encuentran sobre o en el interior de las hifas. El micelio es septado nudoso, oscuro y ancho en estado maduro; sin embargo cuando es joven carece de septas y es de color claro. El micelio puede ser dicotómico o tricotómico, las terminaciones son redondeadas. Posee conidióforos oscuros, septados, fasciculares, simples o agrupados; en las partes terminales se encuentran los conidios espinosos, grandes, de forma elíptica u oblonga, con presencia de septas, sin constricciones, por lo general de color oscuro, con una a seis células de tabique transversal; las esporas más simples son las que poseen dos septas. Arias y Piñeros (2008) mencionan que las colonias son planas, aterciopeladas, de color oscuro al centro y un poco más claro a la periferia (Figura 18).

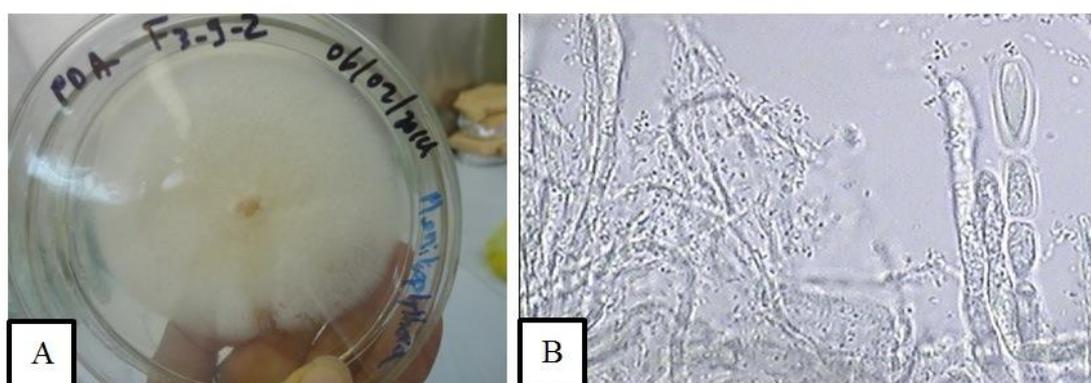
### 3.2.2.3 *Fusarium solani*



**Figura 19. (A) Micelio, (B) conidios de *Fusarium solani***

Según Agrios (2012) y Valencia (2009), *F. solani* (Figura 19) es un hongo con micelio de rápido crecimiento, de color crema amarillento, que conforme madura va tomando tintes púrpura. Posee tres tipos de esporas asexuales: a) microconidias, se forman sobre microconidióforos largos, están formadas por una a dos células cilíndricas, son las esporas más abundantes en todas las condiciones; b) las macroconidias, se forman sobre conidióforos largos, son esporas alargadas, encorvadas hacia los extremos, son típicas de *Fusarium*; c) las clamidosporas, formadas por una a dos células, son de pared gruesa y forma redonda, se ubican en la parte terminal o intercalar del micelio.

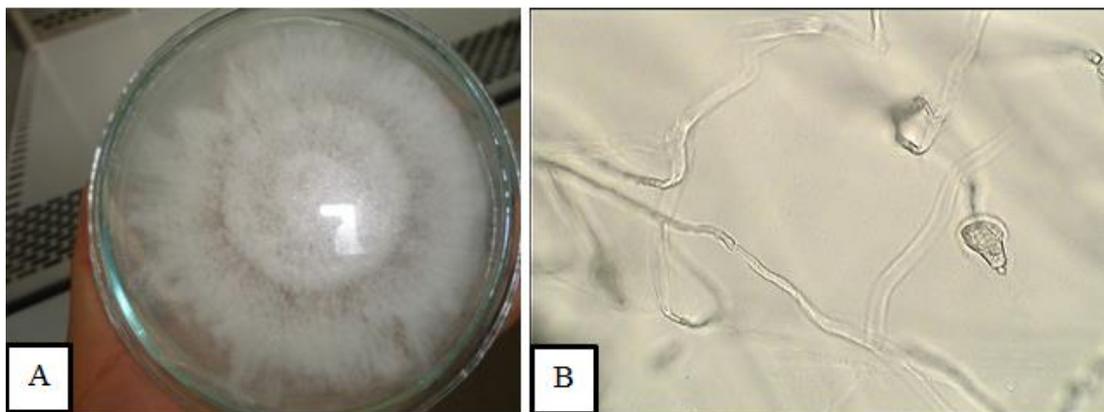
### 3.2.2.4 *Moniliophthora roreri*



**Figura 20. (A) Micelio, (B) hifas y conidios de *Moniliophthora roreri***

Osorio (2010) menciona que *Moniliophthora* presenta tres tipos de micelio, las hifas son sinuosas, ramificadas e inicialmente intercelulares, externamente las hifas son gruesas con 4-5  $\mu\text{m}$  de ancho, levemente comprimidas en septas. Los conidióforos son hialinos, simples o ramificados, por lo general no se mantienen erectos, son bifurcados en su parte distal y con una constricción que le separa de la hifa que le dio origen. Los conidios son globosos, elipsoidales (Figura 20).

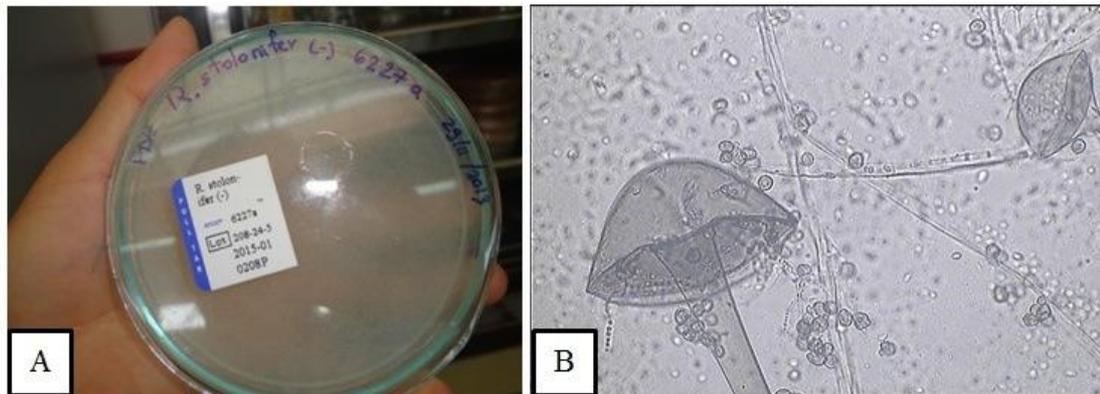
### 3.2.2.5 *Phytophthora* sp.



**Figura 21. (A) Micelio y (B) hifas de *Phytophthora* sp.**

Agrios (2012) y Rivas (2010) afirman que *Phytophthora* (Figura 21) es un hongo con micelio filamentos, hialino, ramificado, no septado excepto en cultivos muy viejos; el diámetro del micelio está entre 5 y 8  $\mu\text{m}$ , puede variar por la composición física y química del medio. La fase asexual la constituyen los esporangios que se desarrollan en las partes terminales de las bifurcaciones de los esporangióforos; los esporangios encierran de 3 a 8 zooporas asexuales biflageladas en forma de pirámide; las esporas poseen flagelos para su movilización.

### 3.2.2.6 *Rhizopus stolonifer*



**Figura 22. (A) Micelio, (B) esporangioforos y esporangios de *Rhizopus stolonifer***

*Rhizopus* (Figura 22) pertenece a la clase de los Zygomycetes, este hongo posee un micelio aéreo, cenocítico, filamentoso, de color blanco; sobre el micelio se desarrollan los esporangios de color negro, visibles a simple vista. Las estructuras que le caracterizan son: rizoides amplios y complejos, esporangióforos erectos, esporangios redondeados y esporangiosporas. Dichas estructuras son todas de color negro y le dan el aspecto característico (Chávez, 2011).

El ciclo biológico comprende la fase asexual y la sexual. La primera ocurre con la formación de largos esporangióforos aéreos que terminan en pequeños esporangios esféricos. Los esporangios maduros toman una coloración negruzca dando el color característico, en su interior encierran las esporangiosporas, mismas que se liberan cuando la membrana que les contiene se rompe; si la célula encuentra las condiciones necesarias de humedad germina dando lugar a la formación de un nuevo micelio. La fase sexual se da cuando hifas especializadas forman estructuras llamadas progametangios que terminan en gametangios; al fusionarse dos gametangios dan origen a células de pared celular gruesa, rugosa y de color negro, que toma el nombre de zigospangio que contiene una única zigospora (Agrios, 2012).

### 3.2.3 Instrumentos/Materiales

#### 3.2.3.1 Destilación de aceites esenciales de plantas amazónicas

Los aceites esenciales de las plantas estudiadas se obtuvieron mediante destilación por arrastre de vapor, usando un destilador de acero inoxidable apto para este tipo de destilación (Figura 23).



**Figura 23. Destilador utilizado en el proceso de extracción de aceites esenciales**

El equipo consta de un cilindro central, destinado a contener la materia prima vegetal, con capacidad de 30 litros. Dentro del cilindro central se encuentran dos rejillas, una en la parte inferior que soporta el material vegetal y lo separa del agua y otra en la parte superior que se coloca sobre dicho material. La parte superior está constituida por una tapa, de cuyo centro se extiende un tubo en forma de cuello de cisne por el cual pasan los vapores de agua y aceite esencial. Dichos vapores atraviesan un tubo de doble camisa llamado condensador o refrigerante, en el cual ocurre la condensación de los dos vapores por enfriamiento con agua; de hecho el

condensador se encuentra conectado con dos mangueras que permiten el ingreso y la salida de agua de enfriamiento. Los dos líquidos condensados se pueden recoger en una bureta graduada y, gracias a la diferencia de densidad entre agua y aceite, se pueden fácilmente separar mediante el uso de un embudo separador.

Para poner en funcionamiento el destilador se requiere de una fuente de calor, para lo cual se usó una hornilla a gas.

### **3.2.3.2 Aceites Esenciales: caracterización química, física y organoléptica**

La caracterización química de los aceites esenciales fue realizada mediante un gascromatógrafo Varian GC-3800 acoplado con un espectrofotómetro de masa Varian MS-4000 conectado con el database NIST. Los componentes del aceite fueron identificados comparando sus índices de retención y espectros de masa con aquellos presentes en el database NIST, y con aquellos presentes en la literatura. La cantidad de cada compuesto fue calculada integrando el área adscrita por cada pico. La columna cromatográfica utilizada fue la Varian FactorFour VF-5ms poli-5% phenyl-95%-dimethyl-siloxane de 30 m de largo, 0.25 mm de diámetro interno y espesor de 0.25  $\mu\text{m}$ .

La densidad de los aceites esenciales se calculó determinando el peso de un volumen conocido de aceite, para ello se utilizó una balanza analítica y una micropipeta, respectivamente. El rendimiento del aceite esencial se obtuvo calculando el peso del material vegetal utilizado para la destilación, y finalmente midiendo el volumen del aceite obtenido con ayuda de un cilindro graduado.

### **3.2.3.3 Estudio *in vitro* de la actividad antifúngica de aceites esenciales**

El estudio *in vitro* de la actividad antifúngica de los aceites esenciales se realizó utilizando el método de la difusión en agar, sobre los seis hongos fitopatógenos mencionados anteriormente. Como medio de cultivo *in vitro* se utilizó PDA (Potato Dextrose Agar), siguiendo las indicaciones reportadas en la etiqueta. Se utilizó la

balanza digital para pesar la cantidad de medio utilizado, Erlenmeyer, vasos de precipitación, agitador magnético, autoclave para esterilizar el medio de cultivo, Baño María para mantener en estado líquido el medio antes de su uso, cajas Petri y cámara de flujo laminar para garantizar la total asepsia del proceso.

Previamente a la fase de estudio se obtuvieron las cepas puras de hongos, unas aisladas de material vegetal infectado y otras adquiridas con marca ATCC; estas últimas fueron activadas utilizando el método ATCC. Después de su revitalización, todos los hongos fueron conservados en glicerol al 50 % en ULTRAcongelador a una temperatura de  $-86^{\circ}\text{C}$ . El estudio de la actividad biológica inició reactivando las cepas de los hongos en medio de cultivo PDA, y colocadas en incubadora a  $27^{\circ}\text{C}$ , hasta alcanzar el desarrollo completo de la colonia. Posteriormente con un sacabocado de 4 mm de diámetro y con el uso de un asa estéril se procedió a disponer los discos del inóculo en el medio de cultivo ya solidificado, tal como prevé el método de la difusión en agar.

### **3.2.4 Métodos**

#### **3.2.4.1 Destilación de aceites esenciales de plantas amazónicas**

Los aceites esenciales objeto de estudio se obtuvieron mediante destilación por arrastre de vapor. Esta técnica consiste en separar los aceites esenciales de los tejidos vegetales donde están almacenados, mediante el transporte por parte del vapor de agua. Este tipo de destilación aprovecha la característica del aceite de no ser miscible con el agua y permite separar sustancias termolábiles (Fontecha y Lizarazo, 2007).

El material vegetal destilado fue, en el caso de las cuatro plantas, la hoja en estado fresco. En la Tabla 4 se detallan las cantidades de hojas destiladas por cada especie.

**Tabla 4.***Cantidades de hojas destiladas por cada planta objeto de estudio.*

Nombre científico	Familia	Nombre común	Cantidad de materia prima (kg)
<i>Citrus limon</i>	Rutaceae	Limón	4
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	Poaceae	Hierba luisa	10
<i>Ocotea quixos</i> (Lam.) Kosterm	Lauraceae	Ishpingo- Canela	6
<i>Piper aduncum</i> L.	Piperaceae	Matico	6

El proceso de destilación se realizó colocando agua en el destilador hasta alcanzar los pedestales del fondo (aproximadamente 3 litros), luego las hojas previamente lavadas y pesadas, fueron distribuidas uniformemente en el contenedor evitando espacios vacíos. Consecutivamente se colocó la tapa y se abrió el paso de agua para garantizar el enfriamiento del condensador. Posteriormente se prendió la hornilla y se esperó durante dos horas, tiempo de duración adecuado para una normal destilación.

Dentro del condensador los vapores se enfrían y vuelven a la fase líquida, esto se logra mediante la circulación de agua a baja temperatura alrededor del conducto, por donde fluye la mezcla de vapor de agua y vapor de aceite. El aceite esencial destilado se recibe en una bureta graduada, mismo que permite separar el aceite gracias al estado difásico que se forma con el agua por la diferencia de densidad. El aceite esencial es almacenado en frascos ámbar a 4°C y sometido a las posteriores pruebas químicas, físicas y organolépticas.

Finalizada la destilación se procede a limpiar el equipo con vapor fluyente, es decir dejando fluir el vapor de agua por el destilador, sin enfriar el condensador. Eso permite eliminar eventuales trazas de aceite esencial que hayan quedado en las partes internas del equipo, las mismas que son eliminadas en estado de vapor.

### 3.2.4.2 Determinación de las características química, físicas y organoléptica de los aceites esenciales.

Los aceites esenciales obtenidos fueron sometidos a caracterizaciones: química, químico-físicas y organolépticas.

#### 3.2.4.2.1 Parámetros químicos

Los aceites esenciales se caracterizaron químicamente mediante análisis de cromatografía de gases acoplada a la masa (GC-MS).

El análisis GC/MS de los aceites esenciales se realizó bajo las siguientes condiciones de operación: temperatura inyector 300°C, temperatura FID 300°C, velocidad de flujo del carrier (helio) 1 mL/min y la proporción de split 1:50.

Después de haber introducido 1 µL de la solución constituida por 1 µL de aceite disuelto en 1 mL de cloruro de metileno en el inyector del gascromatógrafo, el análisis ha sido realizado llevando la temperatura desde los 55°C iniciales a los 100°C, a una velocidad de 1°C/min, de 100°C a 250°C a una velocidad de 5°C/min, manteniendo luego dicha temperatura durante 15 minutos. La duración total del análisis fue de 90 minutos.

#### 3.2.4.2.2 Parámetros físicos

##### ➤ Densidad del aceite esencial

La densidad del aceite se verificó determinando el peso de 100 µL o 0,1 cm<sup>3</sup> de cada muestra, a una temperatura de 20°C. Aplicando la fórmula:

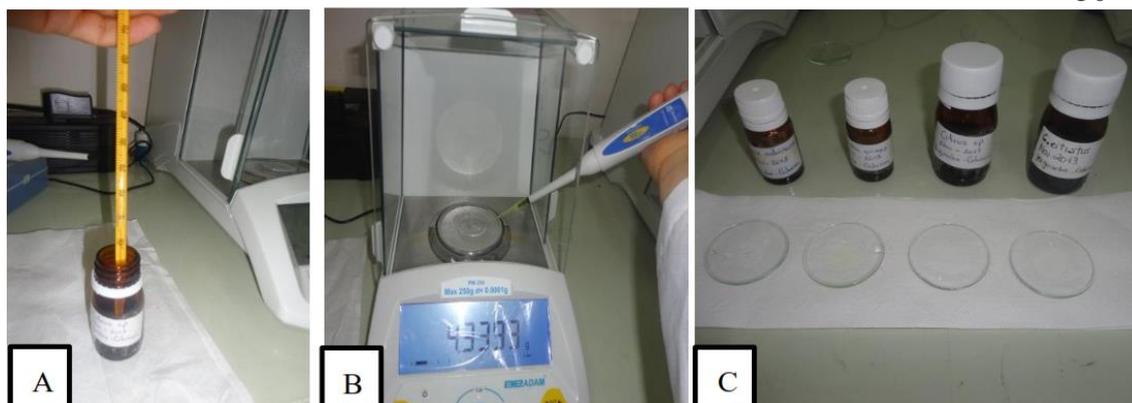
$$D_a = \frac{m_a}{v_a}$$

Donde:

$D_a$  = Densidad absoluta del aceite esencial obtenido

$m_a$  = Masa en g del aceite esencial

$v_a$  = Volumen en mL del aceite esencial



**Figura 24. Determinación de la densidad del aceite esencial: (A) toma de temperatura, (B) peso de 100 µL, (C) muestra de los aceites esenciales**

#### **3.2.4.2.3 Parámetros organolépticos**

Mediante el uso de los órganos de los sentidos y la referencia bibliográfica de Lagos (2012), se determinaron la apariencia, el color y el olor de cada aceite esencial objeto de estudio.

#### **3.2.4.2.4 Rendimiento del aceite esencial**

El rendimiento del aceite esencial se determinó por el método gravimétrico-volumétrico (Lagos, 2012), para ello se calculó la relación entre el volumen en mililitros del aceite esencial obtenido y el peso fresco en gramos de la planta destilada.

Se aplicó la siguiente fórmula:

$$\%RAE = \frac{\text{Vol.}_{AE} \text{ (ml)}}{\text{P}_{\text{muestra}} \text{ (g)}} \times 100$$

Donde:

% RAE = Porcentaje de rendimiento del aceite esencial

Vol. AE = Volumen en mL del aceite esencial obtenido

P muestra = Peso en g de la muestra vegetal destilada

### 3.2.4.3 Estudio *in vitro* de la Actividad Antifúngica de Aceites Esenciales

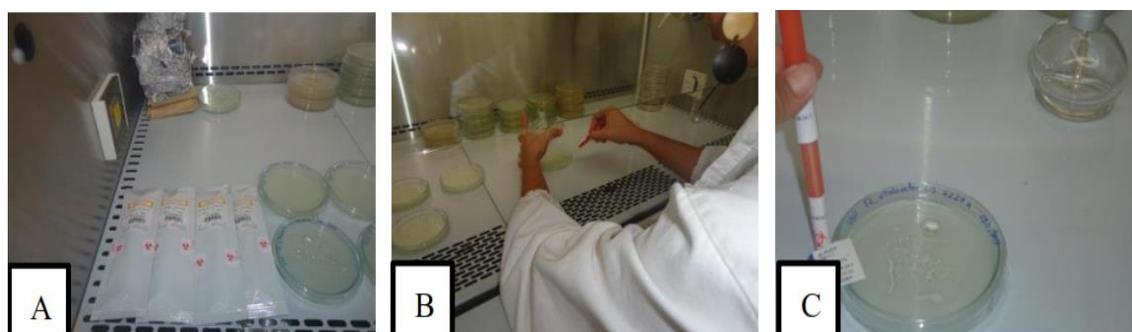
El estudio *in vitro* de la actividad antifúngica de los aceites esenciales se realizó sobre seis distintos hongos fitopatógenos. De estos, cuatro proceden de la colección ATCC *Aspergillus oryzae*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium solani*, y *Rhizopus stolonifer* y los otros dos *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora* sp. fueron aislados e identificados de material vegetal enfermo procedente de cultivo de Cacao (*Theobroma cacao* L.) de la Región Amazónica del Ecuador.

#### 3.2.4.3.1 Aislamiento, identificación y conservación de hongos fitopatógenos

Las cepas puras ATCC fueron activadas de acuerdo al protocolo establecido por la misma colección. Cada especie fue adquirida en la presentación KwikStik® (Figura 25). De acuerdo al respectivo protocolo, y en condiciones estériles de trabajo, se procedió a la hidratación, siembra en PDA e incubación a 27°C durante 5-7 días, por cada especie (Figura 26).



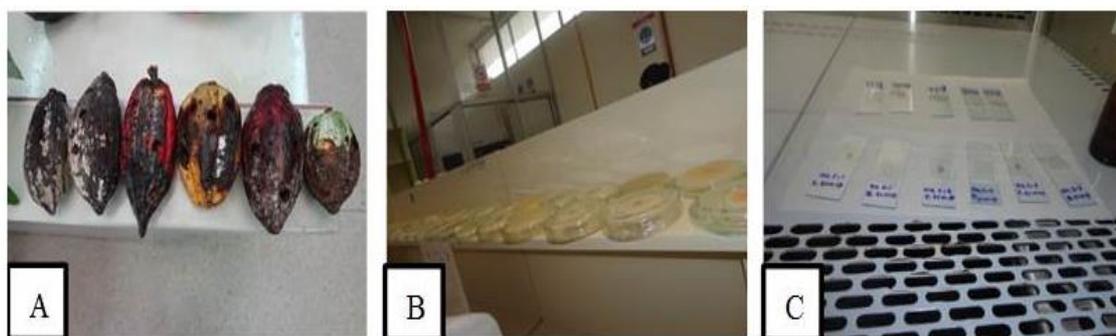
**Figura 25.** Presentación comercial KwikStik® de las cepas puras de hongos fitopatógenos, utilizadas en el estudio



**Figura 26.** Activación de las cepas ATCC: (A) cepas puras en sus respectivas confecciones comerciales, (B) siembra de los hongos en PDA, (C) etiquetado cajas Petri

Luego de la fase de activación, se procedió a la conservación de los hongos para la posterior utilización en el estudio *in vitro* de la actividad antifúngica. Mediante la ayuda de un sacabocado estéril, de 4 mm de diámetro, se seccionaron discos de agar con micelio de 5-7 días, que luego se suspendieron en 1 mL de solución de glicerol al 50% en tubo Eppendorf y se conservaron en ultracongelador a - 86°C.

Los hongos fitopatógenos *Moniliphthora roreri* y *Phytophthora* sp. fueron aislados de frutos de *T. cacao*, con evidentes síntomas de enfermedades. El protocolo de aislamiento utilizado fue el de Mata *et al.* (2009), que consistió en lavar los frutos con agua corriente y destilada por 5 minutos, luego fueron seccionadas porciones de 1 cm de diámetro de la corteza, se esterilizaron externamente con la finalidad de eliminar contaminantes epífitos, mediante inmersión sucesiva en una solución de alcohol al 75% y agua destilada para el enjuague. Posteriormente se procedió a inocular en agar PDA cinco fragmentos estériles de tejido vegetal, a fin de dejar crecer los hongos endófitos, es decir presentes en la parte interna del material vegetal. Durante los cinco días siguientes se realizó un control diario del crecimiento micelial y se procedió a repicar solo las cepas correspondientes a las características morfológicas de los dos hongos objetos de estudio, hasta obtener cultivos puros de cada cepa (Figura 27).



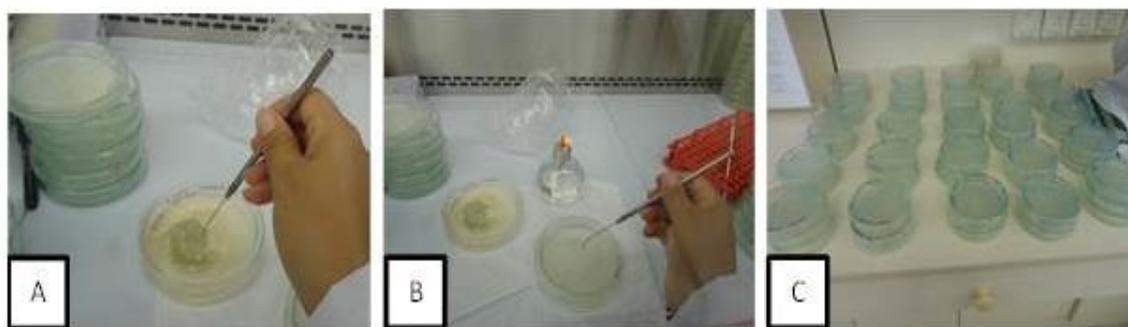
**Figura 27. Aislamiento de hongos, a partir de mazorcas enfermas de *T. cacao*: (A) frutos de cacao con síntomas de enfermedad, (B) aislamiento y purificación de cepas, (C) placas para identificación morfológica**

La identificación se realizó mediante la observación al microscopio de las estructuras morfológicas de los hongos y con la ayuda de la clave dicotómica de APS PRESS (The America Phytopathological Society, 1998).

### 3.2.4.3.2 Actividad antifúngica in vitro de los aceites esenciales- Método de Difusión en Agar.

La actividad de los aceites esenciales sobre los hongos fitopatógenos se realizó por el método de la difusión en agar.

Se estudió la actividad antifúngica de cinco diferentes concentraciones de cada aceite esencial, previamente solubilizados en DMSO (Dimetilsulfóxido): 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$  y 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . El aceite esencial se agregó al medio de cultivo PDA todavía en estado líquido a 46°C y se sembró en cajas Petri estériles. Cada concentración representó un tratamiento y cada tratamiento se realizó por triplicado (Figura 28).



**Figura 28. Siembra e incubación de hongos: (A) toma de cilindros con micelio del hongo, (B) colocación del cilindro en el centro de la caja Petri en contacto con el tratamiento, (C) cada tratamiento con tres repeticiones**

Después de solidificado el medio de cultivo con la correspondiente concentración de aceite esencial, se dispuso en el centro del medio un cilindro de agar del inóculo, previamente preparado a partir de las cepas madres conservadas a -86°C. Como control positivo se consideró el aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris* L.) a las siguientes concentraciones reportadas en la literatura: 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$  y 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$  (Sacchetti *et al.*, 2005). Como controles negativos se consideraron PDA sin adjunta de aceite esencial y PDA con DMSO a la concentración mayor utilizada en las diluciones de los aceites esenciales. Todos los controles al igual que los tratamientos se evaluaron por triplicado, como se muestra en el Anexo 5. Los hongos se incubaron a 25°C y por diez días, durante los cuales se midió el diámetro de la colonia fúngica.

### 3.2.5 Toma de datos y análisis estadístico

En la presente investigación se determinó la actividad antifúngica de cuatro aceites esenciales (*Citrus limon*, *Cymbopogon citratus*, *Ocotea quixos* y *Piper aduncum*) contra seis hongos fitopatógenos (*Aspergillus oryzae*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium solani*, *Moniliophthora roreri*, *Phytophthora* sp. y *Rhizopus stolonifer*), mediante el método de difusión en Agar. Se utilizó el Diseño Completamente Aleatorio (Stell y Torrie, 1985) con 20 tratamientos (cuatro aceites a cinco concentraciones 500 µL/mL, 200 µL/mL, 100 µL/mL, 50 µL/mL y 10 µL/mL) y tres repeticiones; más controles negativos (PDA y PDA+DMSO) y positivos (*Thymus vulgaris* a las mismas concentraciones que los aceites); todos por triplicado, dando un total de 81 unidades experimentales (cajas Petri) por hongo y 486 unidades experimentales por ensayo (Anexo 5 y 6), todo esto bajo un ambiente controlado de laboratorio. Los datos fueron procesados en el programa estadístico Statistix 9.0, con él se determinó el análisis de varianza (ADEVA), el coeficiente de variación y la prueba de Tukey (5%), para evaluar el efecto de los aceites esenciales sobre los hongos fitopatógenos. Los tratamientos a base de aceite esencial se expresaron en µL/mL.

Además, con los datos registrados se creó una base de datos en el programa Excel. Finalmente se realizaron dos tipos de gráficos, de líneas y barras, el primero permitió visualizar el comportamiento del hongo durante el periodo de incubación (10 días) y el segundo el efecto inhibitorio expresado en porcentaje acompañado de la desviación estándar, que ejercieron los aceites esenciales sobre el fitopatógeno finalizado el periodo de incubación.

El porcentaje (%) de inhibición del crecimiento del micelio se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{Dc (\text{patrón PDA} + \text{DMSO}) - Dc (\text{tratamiento})}{Dc (\text{patrón PDA} - \text{DMSO})} \times 100\%$$

Dónde: Dc = diámetro de la colonia (mm)

• *Especificaciones del ensayo:*

En la tabla 5 se detallan los parámetros del ensayo de la actividad biológica.

**Tabla 5.**

*Cuantificación de parámetros utilizados en el ensayo.*

Parámetro	Cantidad
Hongos fitopatógenos	6
Aceites esenciales	4
Concentraciones de aceite esencial	5
Controles (+)	5
Controles (-)	2
Tratamiento/hongo	20
Repeticiones	3
*Unidades experimentales/hongo	81
*Unidades experimentales/ensayo	486
*Una unidad experimental es una caja Petri con su respectivo tratamiento	

• *Tratamientos en estudio:*

Los tratamientos resultaron de las combinaciones de los aceites esenciales (A) de cinco especies vegetales: *Citrus limon*, *Cymbopogon citratus*, *Ocotea quixos* y *Piper aduncum*; a cinco concentraciones (C): 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$  y 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), evaluados sobre el crecimiento del micelio de seis hongos fitopatógenos (*Aspergillus oryzae*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium solani*, *Moniliophthora roreri*, *Phytophthora* sp. y *Rhizopus stolonifer*). Los tratamientos se detallan en la Tabla 6.

**Tabla 6.**

**Tratamientos para evaluar la actividad biológica sobre *Aspergillus oryzae*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium solani*, *Moniliophthora roreri*, *Phytophthora* sp. y *Rhizopus stolonifer*, por el método de difusión en agar**

Tratam	Aceites esenciales		Concentración (µl/mL)		Interacción	
T1	<i>Citrus limon</i>	A1	10	C1	<i>C. limon</i> x 10 µl/mL	A1C1
T2	<i>Citrus limon</i>	A1	50	C2	<i>C. limon</i> x 50 µl/mL	A1C2
T3	<i>Citrus limon</i>	A1	100	C3	<i>C. limon</i> x 100 µl/mL	A1C3
T4	<i>Citrus limon</i>	A1	200	C4	<i>C. limon</i> x 200 µl/mL	A1C4
T5	<i>Citrus limon</i>	A1	500	C5	<i>C. limon</i> x 500 µl/mL	A1C5
T6	<i>Cymbopogon citratus</i>	A2	10	C1	<i>C. citratus</i> x 10 µl/mL	A2C1
T7	<i>Cymbopogon citratus</i>	A2	50	C2	<i>C. citratus</i> x 50 µl/mL	A2C2
T8	<i>Cymbopogon citratus</i>	A2	100	C3	<i>C. citratus</i> x 100 µl/mL	A2C3
T9	<i>Cymbopogon citratus</i>	A2	200	C4	<i>C. citratus</i> x 200 µl/mL	A2C4
T10	<i>Cymbopogon citratus</i>	A2	500	C5	<i>C. citratus</i> x 500 µl/mL	A2C5
T11	<i>Ocotea quixos</i>	A3	10	C1	<i>O. quixos</i> x 10 µl/mL	A3C1
T12	<i>Ocotea quixos</i>	A3	50	C2	<i>O. quixos</i> x 50 µl/mL	A3C2
T13	<i>Ocotea quixos</i>	A3	100	C3	<i>O. quixos</i> x 100 µl/mL	A3C3
T14	<i>Ocotea quixos</i>	A3	200	C4	<i>O. quixos</i> x 200 µl/mL	A3C4
T15	<i>Ocotea quixos</i>	A3	500	C5	<i>O. quixos</i> x 500 µl/mL	A3C5
T16	<i>Piper aduncum</i>	A4	10	C1	<i>P. aduncum</i> x 10 µl/mL	A4C1
T17	<i>Piper aduncum</i>	A4	50	C2	<i>P. aduncum</i> x 50 µl/mL	A4C2
T18	<i>Piper aduncum</i>	A4	100	C3	<i>P. aduncum</i> x 100 µl/mL	A4C3
T19	<i>Piper aduncum</i>	A4	200	C4	<i>P. aduncum</i> x 200 µl/mL	A4C4
T20	<i>Piper aduncum</i>	A4	500	C5	<i>P. aduncum</i> x 500 µl/mL	A4C5
T21 (t+2)	<i>Thymus vulgaris</i>	A5	10	C1	<i>T. vulgaris</i> x 10 µl/mL	A5C1
T22 (t+2)	<i>Thymus vulgaris</i>	A5	50	C2	<i>T. vulgaris</i> x 50 µl/mL	A5C2
T23 (t+3)	<i>Thymus vulgaris</i>	A5	100	C3	<i>T. vulgaris</i> x 100 µl/mL	A5C3
T24 (t+4)	<i>Thymus vulgaris</i>	A5	200	C4	<i>T. vulgaris</i> x 200 µl/mL	A5C4
T25 (t+5)	<i>Thymus vulgaris</i>	A5	500	C5	<i>T. vulgaris</i> x 500 µl/mL	A5C5
T26 (t-1)	PDA					
T27 (t-2)	PDA+DMSO					

• *Variable en estudio*

La variable analizada fue el diámetro de crecimiento de la colonia fitopatógena, la misma que se determinó con ayuda de un vernier y se registró en milímetros. Los datos se tomaron durante diez días consecutivos, contados a partir del siguiente día de sembrado el hongo.

Las muestras que presentaron resultados positivos a la investigación son aquellas en el que los aceites esenciales inhiban o controlen el crecimiento de la colonia fitopatógena. Para interpretar los resultados se tomó como referencia el comportamiento del hongo con respecto al patrón (PDA+DMSO) (Tabla 7).

**Tabla 7.**

*Escala de interpretación del crecimiento de la colonia fitopatógena.*

Escala	Interpretación
I. Nula (-)	El hongo crece sin dificultad
II. Buena (+)	El hongo crece lentamente
III. Muy buena (++)	El crecimiento del hongo se ve limitado
IV. Óptima/parecida patrón (+++)	Inhibición del crecimiento del micelio

Nota: Interpretación de los resultados con respecto al patrón

## CAPÍTULO 4 RESULTADOS

### 4.1 Destilación de Aceites Esenciales de Plantas Amazónicas

En el Cuadro 1 se detallan los datos obtenidos en cuanto al volumen de aceites esenciales destilados y al rendimiento en porcentaje; como se puede observar *Citrus limon* ha tenido un rendimiento de 0.44%, *Cymbopogon citratus* de 0.58%, *Ocotea quixos* de 0.16% y *Piper aduncum* alcanzó un rendimiento de 0.12%.

#### Cuadro 1.

*Cantidades de hojas destiladas por cada planta objeto de estudio.*

Especie	Cantidad de materia prima (g)	Volumen aceite esencial (mL)	Rendimiento (%)
<i>Citrus limon</i> L.	4000	17.6	0.44
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	10000	57.6	0.58
<i>Ocotea quixos</i> (Lam.) Kosterm	6000	9.8	0.16
<i>Piper aduncum</i> L.	6000	7.2	0.12

### 4.2 Caracterización Química y Químico-Física de los Aceites Esenciales

#### 4.2.1 Aceite Esencial de *Citrus limon* L.

Mediante gas-cromatografía acoplada a la espectroscopia de masa se cuantificaron y determinaron químicamente los compuestos de los cuatro aceites esenciales estudiados.

La composición química del aceite esencial de *Citrus limon* se observa en el Cuadro 2. El aceite esencial se ha caracterizado en un 99.06% y se han identificado 36 diferentes compuestos químicos; los más abundantes han sido los monoterpenos limonene (28.14%), citronellal (20.27%), linalol (15.95%) y sabinene (13.97%).

**Cuadro 2.****Composición química del aceite esencial de *Citrus limon*.**

No.	Compuesto identificado	RT (min)	Área %	RI
1	$\alpha$ -pinene	8.296	0.63	929
2	<b>Sabinene</b>	10.438	<b>13.97</b>	968
3	$\beta$ -pinene	10.711	1.14	973
4	Myrcene	11.471	1.37	987
5	$\alpha$ -terpinene	13.331	0.20	1014
6	<i>p</i> -cymene	13.923	0.15	1021
7	<b>Limonene</b>	14.316	<b>28.14</b>	1026
8	1,8-cineole	14.488	0.18	1028
9	cis-Z-ocimene	14.884	0.44	1032
10	trans-E-ocimene	15.719	3.06	1042
11	$\gamma$ -terpinene	16.622	0.52	1053
12	trans-sabinene hydrate	17.670	0.39	1066
13	Terpinolene	18.984	0.20	1081
14	<b>Linalool</b>	20.637	<b>15.95</b>	1101
15	<b>Citronellal</b>	26.028	<b>20.27</b>	1151
16	4-terpineol	28.622	0.66	1175
17	$\alpha$ -terpineol	30.366	0.61	1192
18	n-decanal	32.013	0.15	1206
19	cis-sabinene hydrate acetate	33.955	0.22	1223
20	Citronellol	34.487	1.58	1227
21	Neral	35.527	2.28	1236
22	Geranial	39.151	2.75	1267
23	Thymol	42.190	0.21	1292
24	citronellyl acetate	48.070	0.38	1363
25	neryl acetate	48.663	0.38	1370
26	linalyl isobutyrate	49.904	0.16	1386
27	trans-E-methyl cinnamate	49.990	0.15	1387
28	Isocarvophyllene	51.487	0.44	1411
29	$\beta$ -carvophyllene	51.507	0.49	1412
30	trans- $\alpha$ -bergamotene	52.328	0.16	1432
31	germacrene D	54.175	0.15	1477
32	Bicyclogermacrene	54.730	0.30	1491
33	trans-methyl isoeugenol	54.981	0.61	1497
34	cis- $\alpha$ -bisabolene	55.270	0.27	1505
35	germacrene B	56.842	0.17	1557
36	carvophyllene oxide	57.577	0.29	1581
	<b>TOTAL</b>		<b>99.06</b>	

RT= Tiempo de Retención      Área % = Presencia del compuesto en %      RI = Índice de retención

#### 4.2.2 Aceite Esencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf

La caracterización del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* se ha realizado en un 97.44%; se han identificado 25 diferentes compuestos químicos, los más abundantes fueron los monoterpenos geraniol (32.23%), neral (21.09%) y geranial (21.02%). La composición química del aceite esencial de *C. citratus* se observa en el Cuadro 3.

**Cuadro 3.****Composición química del aceite esencial de *Cymbopogon citratus*.**

No.	Compuesto identificado	RT (min)	Área %	RI
1	6-methyl-5-Hepten-2-one	11.164	0.83	981
2	cis-Z-ocimene	14.784	0.21	1031
3	trans-E-ocimene	15.609	0.13	1041
4	Linalool	20.427	0.49	1099
5	2,2-dimethyl-3,4-octadienal	20.715	0.17	1102
6	Citronellal	25.783	4.35	1149
7	trans-verbenol	26.803	1.05	1158
8	n-decanal	31.841	0.36	1205
9	Nerol	33.823	0.31	1222
10	Citronellol	34.422	6.73	1227
11	<b>Neral</b>	35.514	<b>21.09</b>	1236
12	<b>Geraniol</b>	37.311	<b>32.23</b>	1251
13	<b>Geranial</b>	39.196	<b>21.02</b>	1267
14	citronellyl acetate	47.964	0.37	1361
15	linalyl isobutyrate	49.812	2.21	1385
16	$\beta$ -carvophyllene	51.414	2.99	1409
17	$\alpha$ -carvophyllene	53.048	0.42	1449
17	germacrene D	54.106	0.26	1475
19	$\alpha$ -muurolene	54.844	0.12	1493
18	germacrene A	55.073	0.12	1499
19	$\gamma$ -cadinene	55.319	0.21	1507
20	$\delta$ -cadinene	55.526	0.59	1514
21	Caryophyllene oxide	57.508	0.55	1579
22	tau-cadinol	59.239	0.11	1643
23	$\alpha$ -muurolol	59.291	0.19	1645
25	$\alpha$ -cadinol	59.593	0.34	1657
	<b>TOTAL</b>		<b>97.44</b>	

RT= Tiempo de Retención      Área % = Presencia del compuesto en %      RI = Índice de retención

**4.2.3 Aceite Esencial de *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm**

La composición química del aceite esencial de *Ocotea quixos* se ha determinado en un 97.38%; se han identificado 51 diferentes compuestos químicos, entre los más abundantes se destacaron el trans-cinnamaldehyde (16.62%), trans-methyl isoeugenol (11.94%),  $\beta$ -caryophyllene (10.59%) y  $\alpha$ -pinene (9.39%) (Cuadro 4).

**Cuadro 4.****Composición química del aceite esencial de *Ocotea quixos*.**

No.	Compuesto identificado	RT (min)	Área %	RI
1	$\alpha$ -thuiene	7.945	0.30	922
2	<b><math>\alpha</math>-pinene</b>	8.316	<b>9.39</b>	929
3	Camphene	9.155	0.51	945
4	Benzaldehyde	9.933	1.05	959
5	Sabinene	10.443	2.10	968
6	$\beta$ -pinene	10.729	6.06	973
7	Myrcene	11.489	0.36	987
8	$\alpha$ -terpinene	13.351	0.33	1014
9	p-cymene	13.939	0.22	1021
10	Limonene	14.270	1.40	1025
11	1,8-cineole	14.494	0.44	1028
12	$\gamma$ -terpinene	16.641	0.53	1053
13	Terpinolene	19.004	0.16	1082
14	Linalool	20.566	0.40	1100
15	Benzenepropanal	26.826	0.28	1159
16	4-terpineol	28.629	0.70	1175
17	$\alpha$ -terpineol	30.375	0.32	1192
18	cis-cinnamaldehyde	33.057	0.18	1215
19	<b>trans-cinnamaldehyde</b>	39.509	<b>16.62</b>	1270
20	$\delta$ -cubebene	47.242	0.44	1352
21	$\alpha$ -copaene	49.163	3.22	1376
22	methyl cinnamate	49.979	3.18	1387
23	<b><math>\beta</math>-carvophyllene</b>	51.525	<b>10.59</b>	1412
24	trans-cinnamyl acetate	53.017	1.69	1449
25	$\alpha$ -carvophyllene	53.129	1.76	1451
26	trans- $\beta$ -farnesene	53.295	0.26	1455
27	cis-cadina-1(6),4-diene	53.880	0.32	1470
28	$\gamma$ -muurolene	54.010	0.17	1473
29	germacrene D	54.172	0.36	1477
30	trans-muurola-4(14),5-diene	54.579	0.27	1487
31	Bicyclogermacrene	54.748	2.14	1491
32	<b>trans-methyl isoeugenol</b>	55.022	<b>11.94</b>	1498
33	cis- $\alpha$ -bisabolene	55.293	0.22	1506
34	$\gamma$ -cadinene	55.488	0.17	1512
35	$\delta$ -cadinene	55.605	1.59	1516
36	trans-calamenene	55.719	0.43	1520
37	trans- $\gamma$ -bisabolene	55.892	0.57	1526
38	trans-cadina-1(2)-4-diene	56.049	0.24	1531
39	$\alpha$ -calacorene	56.342	0.56	1540
40	(-)-Spathulenol	57.449	0.49	1577
41	Carvophyllene oxide	57.588	7.10	1582
42	Guaiol	58.049	1.33	1597
43	humulene 1,2-epoxide	58.400	0.54	1610
44	1-epi-cubenol	58.902	0.63	1630
45	carvophylla-4(14),8(15)-dien-5- $\alpha$ -ol	59.171	1.84	1640
46	Cubenol	59.304	0.34	1645
47	$\alpha$ -muurolol	59.432	0.16	1650
48	Valerianol	59.667	1.03	1659
49	caryophyllene oxide	60.054	0.97	1675
50	$\alpha$ -bisabolol	60.465	0.23	1690
51	benzyl benzoate	62.405	1.25	1774
	<b>TOTAL</b>		<b>97.38</b>	

RT= Tiempo de Retención

Área % = Presencia del compuesto en %

RI = Índice de retención

#### 4.2.4 Aceite Esencial de *Piper aduncum* L.

El aceite esencial *Piper aduncum* (Cuadro 5) se ha caracterizado en un 95.66%, se han identificado 45 diferentes compuestos químicos, los más abundantes fueron dilapiol (45.92%), *E*-ocimene (10.39%), y piperitone (8.47%).

#### Cuadro 5.

##### Composición química del aceite esencial de *Piper aduncum*.

No.	Compuesto identificado	RT (min)	Área (%)	RI
1	$\alpha$ -Thuiene	5.223	0.35	930
2	$\alpha$ -Pinene	5.395	1.35	939
3	Camphene	5.848	0.05	954
4	$\beta$ -Pinene	6.935	1.27	979
5	Myrcene	7.867	0.73	991
6	$\alpha$ -Phellandrene	8.295	1.06	1003
7	3-Carene	8.578	0.07	1005
8	$\alpha$ -Terpinene	8.953	0.82	1017
9	<i>p</i> -Cymene	9.367	0.73	1025
10	Limonene	9.544	1.6	1027
11	1,8-Cineole	9.610	1.3	1031
12	<i>Z</i> -Ocimene	10.534	2.23	1037
13	<b><i>E</i>-Ocimene</b>	11.197	<b>10.39</b>	1050
14	$\gamma$ -Terpinene	11.569	2.42	1060
15	Sabinene hydrate <i>cis</i>	12.011	0.42	1070
16	Isoterpinolene	13.449	0.12	1088
17	Terpinolene	13.558	0.82	1089
18	<i>p</i> -Cymenene	13.997	0.69	1093
19	Linalool	14.830	1.82	1097
20	Sabinene hydrate <i>trans</i>	15.232	0.24	1122
21	<i>allo</i> -Ocimene	17.222	0.36	1132
22	Camphor	17.478	0.05	1146
23	Terpinen-4-ol	20.933	3.14	1177
24	$\alpha$ -Terpineol	22.349	0.06	1189
25	<i>cis</i> -Piperitol	22.744	0.05	1196
26	<i>trans</i> -Piperitol	24.169	0.13	1208
27	<b>Piperitone</b>	28.632	<b>8.47</b>	1253
28	$\delta$ -Elemene	38.118	0.08	1338
29	$\alpha$ -Ylangene	40.549	0.08	1375
30	$\alpha$ -Copaene	41.901	0.27	1377
31	$\beta$ -Cubebene	43.816	0.05	1388
32	$\beta$ -Elemene	44.161	0.45	1391
33	$\alpha$ -Gurjunene	45.463	0.13	1410
34	$\beta$ -Carvophyllene	46.271	2.57	1419
35	$\beta$ -Copaene	47.582	0.09	1432
36	Aromadendrene	48.396	0.05	1441
37	$\alpha$ -Humulene	50.021	0.65	1455
38	$\gamma$ -Muurolene	53.341	1.01	1480
39	Bicyclogermacrene	55.093	1.45	1498
40	$\alpha$ -Muurolene	56.063	0.07	1500
41	$\delta$ -Amorphene	56.554	0.14	1512
42	Cubebol	56.975	0.84	1515
43	Myristicin	57.834	0.89	1519
44	Humulene epoxyde II	61.638	0.18	1608
45	<b>Dillapiol</b>	62.985	<b>45.92</b>	1678
	<b>TOTAL</b>		<b>95.66</b>	

RT= Tiempo de Retención

Área % = Presencia del compuesto en %

RI = Índice de retención

#### 4.2.5 Aceite Esencial de *Thymus vulgaris* L.

La composición química del aceite esencial de *Thymus vulgaris* se observa en el Cuadro 6. El aceite esencial se ha caracterizado en un 82.11%, se han identificado 8 diferentes compuestos químicos, los más abundantes fueron timol (32.62%), *p*-cimeno (24.81%), y 1,2-ácido dicarboxibenzenico (9.21%).

#### Cuadro 6.

##### Composición química del aceite esencial de *Thymus vulgaris*.

No.	Compuesto identificado	RT (min)	Área %	RI
1	<b><i>p</i> cimeno</b>	13.91	<b>24.81</b>	1020
2	$\alpha$ -terpineno	16.50	6.62	1054
3	Linalool	20.44	1.19	1095
4	<b>Timol</b>	42.22	<b>32.62</b>	1289
5	Carvacrol	43.07	0.78	1298
6	trans cariofileno	51.32	4.37	1417
7	Óxido de cariofileno	57.50	2.51	1582
8	<b>1,2-ácido dicarboxibenzenico (2-etil hexil) mono ester</b>	76.08	<b>9.21</b>	No reportado
	<b>TOTAL</b>		<b>82.11</b>	

RT= Tiempo de Retención      Área % = Presencia del compuesto en %      RI = Índice de retención

#### 4.2.6 Parámetros Físicos de los Aceites Esenciales

La densidad de los aceites esenciales se detalla en el Cuadro 7. Como se puede observar los valores de densidad alcanzados fueron de 0.808 g/mL para *Citrus limon*, 0.824 g/mL en el caso de *Cymbopogon citratus*, 0.905 g/mL para *Ocotea quixos* y *Piper aduncum* alcanzó 1.032 g/mL.

#### Cuadro 7.

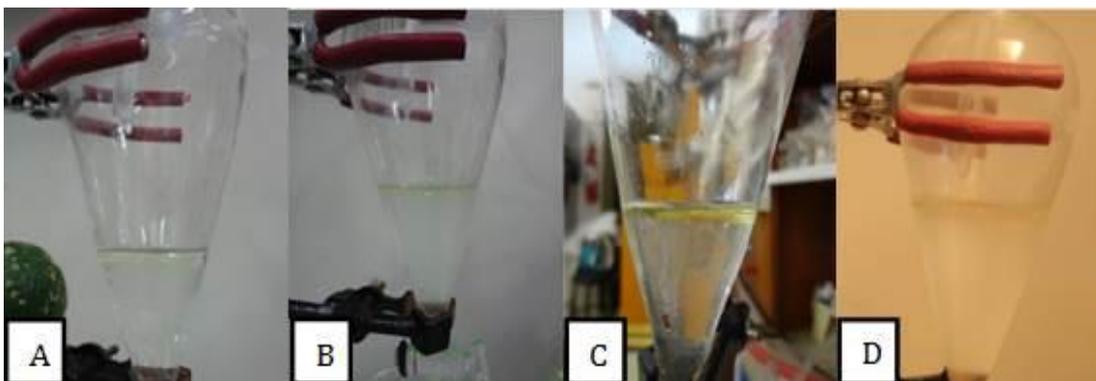
##### Densidad de los aceites esenciales.

Especie	Masa (g)	Volumen (mL)	Densidad (g/mL)
<i>Citrus limon</i> L.	1	0.808	0.808
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	1	0.824	0.824
<i>Ocotea quixos</i> (Lam.) Kosterm	1	0.905	0.905
<i>Piper aduncum</i> L.	1	1.032	1.032

Nota: Datos tomados a una temperatura de 20°C

#### 4.2.7 Caracterización Organoléptica de los Aceites Esenciales

Las características de olor, color y sabor de los aceites esenciales se detallan en el Cuadro 8. Como se observa el color presentó una variación de ligeramente amarillento a amarillo (Figura 29), los aceites han guardado el olor característico de la especie y el sabor varió de levemente astringente hasta fuertemente astringente.



**Figura 29.** Aceite esencial de (A) *C. limon*, (B) *C. citratus*, (C) *O. quixos*, (D) *P. aduncum*, obtenido por destilación

#### Cuadro 8.

##### *Características organolépticas de los aceites esenciales.*

Especie	Color	Olor	Sabor
<i>Citrus limon</i> L.	Ligeramente amarillento	Mediano - característico de la planta	Medianamente Astringente
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	Amarillo pálido	Fuerte - característico de la planta	Muy Fuertemente Astringente
<i>Ocotea quixos</i> (Lam.) Kosterm	Amarillo	Fuerte - característico de la planta	Fuertemente Astringente
<i>Piper aduncum</i> L.	Amarillo pálido	Leve - característico de la planta	Levemente Astringente

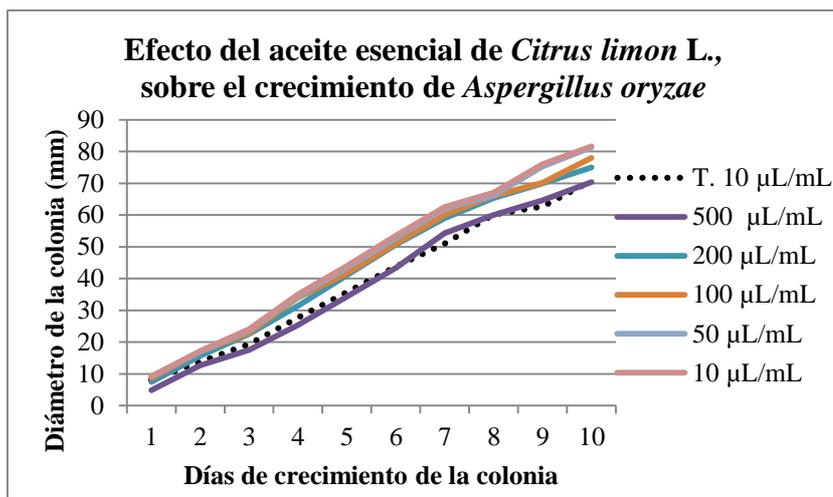
### 4.3 Estudio *in vitro* de la Actividad Antifúngica de los Aceites Esenciales

#### 4.3.1 Efecto del Aceite Esencial sobre el Crecimiento de los Hongos

Los resultados de la actividad biológica *in vitro* de los aceites esenciales sobre los hongos fitopatógenos (Anexo 6) se muestra en las figuras de líneas y de barras a continuación. En los gráficos de líneas se observa el crecimiento de la colonia fitopatógena en un periodo de diez días, que correspondió a la duración del ensayo. En los gráficos de barras se muestra la capacidad inhibitoria (expresada en porcentaje y acompañada de la desviación estándar) que los aceites esenciales, a las diferentes concentraciones consideradas, ejercieron sobre el crecimiento del micelio una vez transcurridos diez días de sembrada la cepa (datos procedentes del Anexo 7). Cabe destacar que los coeficientes de variación de los datos obtenidos por ser inferiores al 5%, indican que los promedios del diámetro de crecimiento de la colonia son representativos (Anexo 8).

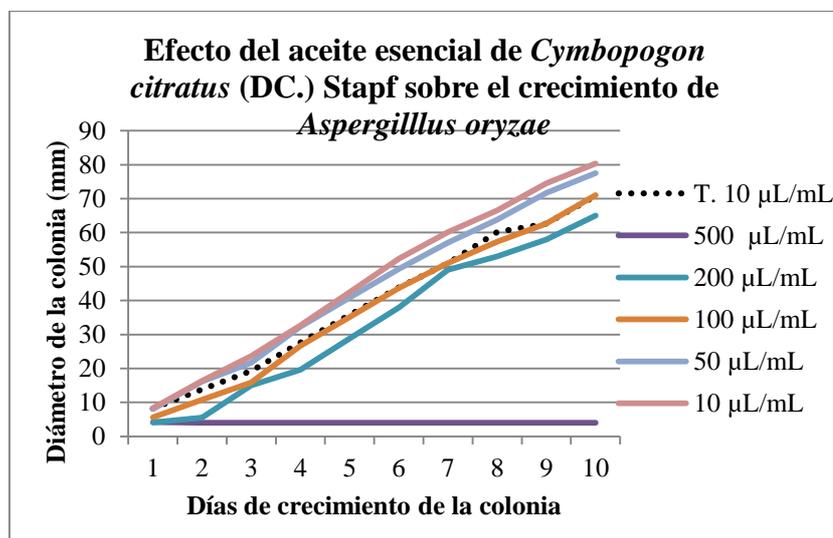
##### 4.3.1.1 Efecto de los Aceites Esenciales sobre el Crecimiento del hongo *Aspergillus oryzae*

El aceite esencial de *C. limon* a ninguna de las concentraciones estudiadas tuvo la capacidad de inhibir el crecimiento del hongo, de hecho se observó un crecimiento parecido del micelio (70-80 mm) con todas las concentraciones consideradas. También el aceite esencial de *T. vulgaris* (control positivo) a la concentración mínima de 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , no ha demostrado ningún efecto de control sobre el crecimiento *in vitro* de *A. oryzae* (Figura 30).



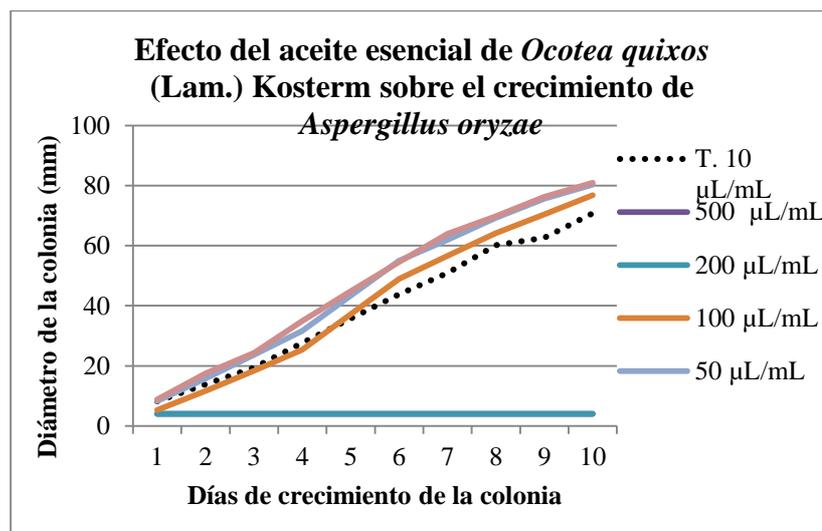
**Figura 30.** Efecto del aceite esencial de *Citrus limon* sobre el crecimiento de *Aspergillus oryzae*

En la Figura 31 se observa que el aceite esencial de *C. citratus* a la máxima concentración (500 µL/mL) ha tenido la capacidad de inhibir el crecimiento de *A. oryzae*, de forma mejor que el control. Las concentraciones de 100 µL/mL y 200 µL/mL tuvieron un comportamiento similar al control positivo (*T. vulgaris* a la concentración de 10 µL/mL); las concentraciones menores a 100 µL/mL del aceite de *C. citratus* no mostraron efecto sobre el crecimiento del micelio de *A. oryzae*.



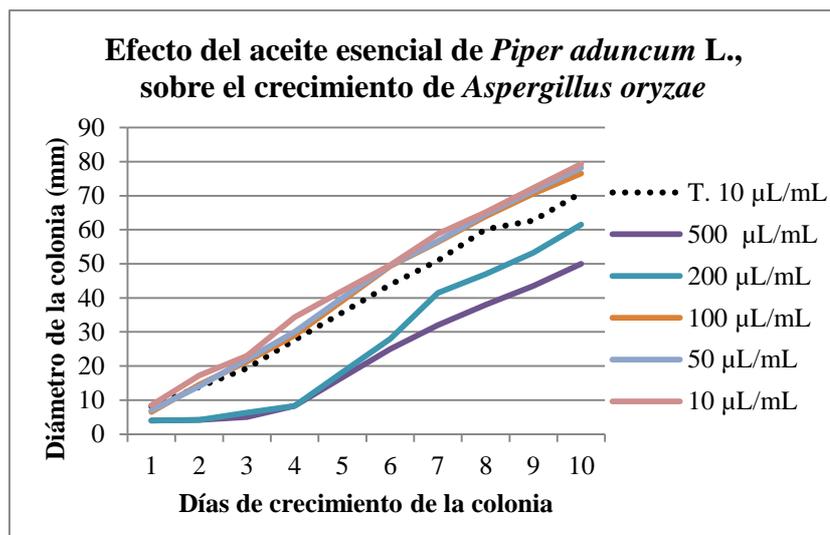
**Figura 31.** Efecto del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* sobre el crecimiento de *Aspergillus oryzae*

La Figura 32 muestra que *A. oryzae* detuvo su crecimiento micelial a las concentraciones de 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$  y 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$  del aceite esencial de *O. quixos* (tendencias superpuestas en el gráfico), indicando un efecto inhibitorio superior a aquel del control positivo (aceite esencial *T. vulgaris* a 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ). Las concentraciones inferiores o iguales a 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$  no han tenido efecto sobre el crecimiento del hongo fitopatógeno, que de hecho alcanzó un diámetro del micelio entre 75-80 mm.



**Figura 32.** Efecto del aceite esencial de *Ocotea quixos* sobre el crecimiento de *Aspergillus oryzae*

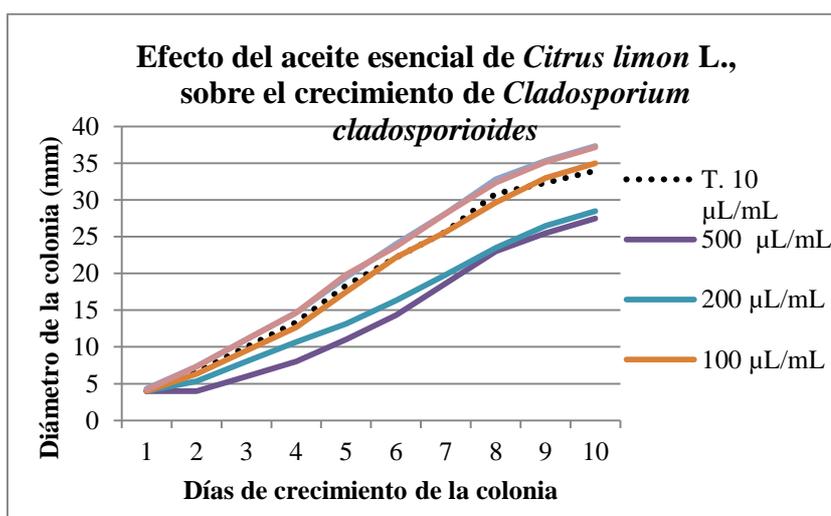
El aceite esencial de *P. aduncum* a las concentraciones de 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$  y 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$  tuvo efecto sobre el desarrollo del micelio de *A. oryzae*. En particular logró disminuir su crecimiento hasta un diámetro micelial de 50-60 mm, mostrando un comportamiento mejor que el control positivo (aceite esencial *T. vulgaris* a 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), con el cual se alcanzaron diámetros de 70 mm. Estos resultados se observan en la Figura 33.



**Figura 33.** Efecto del aceite esencial de *Piper aduncum* sobre el crecimiento de *Aspergillus oryzae*

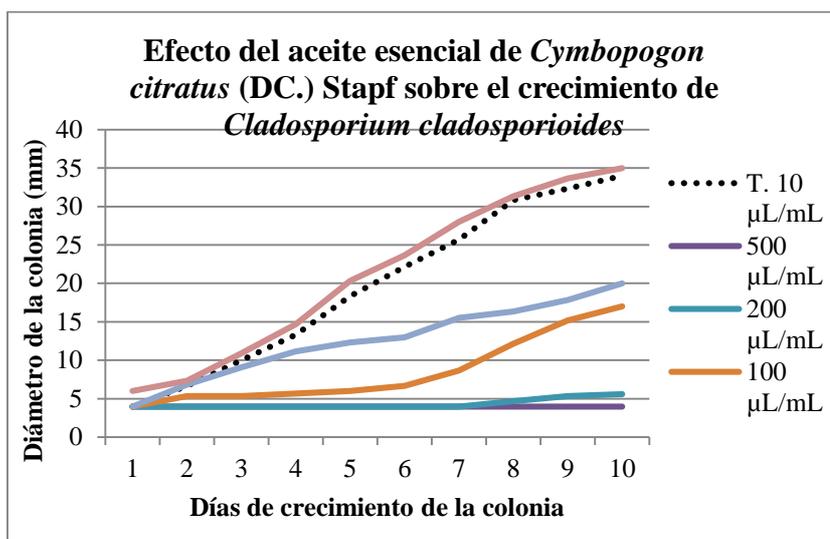
#### 4.3.1.2 Efecto de los Aceites Esenciales sobre el Crecimiento del hongo *Cladosporium cladosporioides*

La Figura 34 muestra que el aceite esencial de *C. limon* ha tenido efecto inhibitorio sobre el crecimiento del hongo fitopatógeno *C. cladosporioides*, en lo específico a las concentraciones de 200 µL/mL y 500 µL/mL. Las colonias a los 10 días alcanzaron un diámetro alrededor de los 25 mm, valor inferior a aquel obtenido con el aceite esencial de *T. vulgaris* (10 µL/mL) correspondiente a 34 mm.



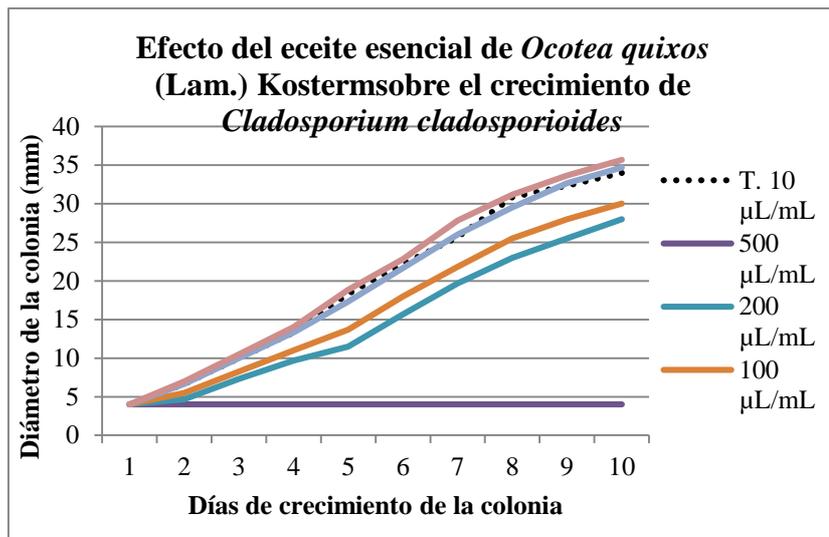
**Figura 34.** Efecto del aceite esencial de *Citrus limon* sobre el crecimiento de *Cladosporium cladosporioides*

La Figura 35 muestra que el aceite esencial de *C. citratus* a las concentraciones estudiadas ha poseído la capacidad de inhibir el crecimiento de *C. cladosporioides* mejor que el control positivo (*T. vulgaris*, 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ). Las concentraciones desde 50 hasta 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$  inhibieron el crecimiento de la colonia dejandola alcanzar los 5 mm de diámetro; a concentraciones de 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$  y 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$  *C. cladosporioides* creció hasta 20 mm; y, a 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de concentración mostró un comportamiento similar al patrón dejando que la colonia alcance los 35 mm de diámetro, todos estos resultados a los diez días de sembrado.



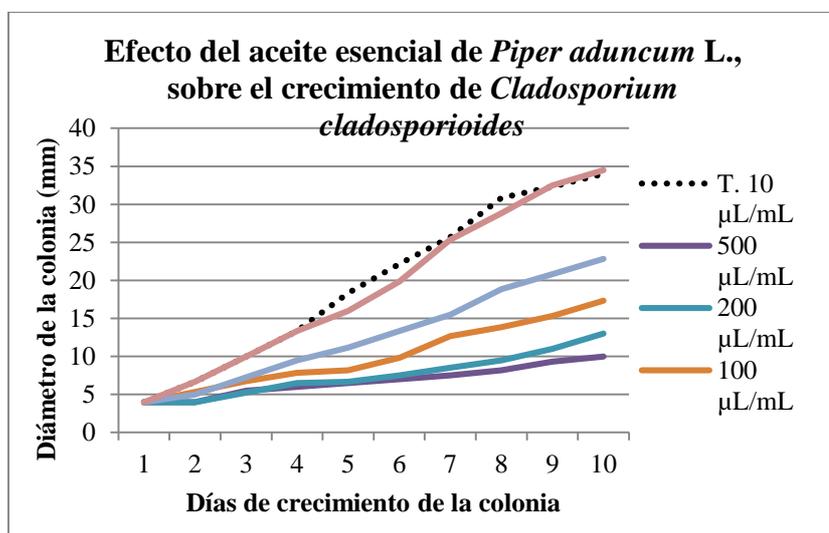
**Figura 35.** Efecto del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* sobre el crecimiento de *Cladosporium cladosporioides*

En la Figura 36 se observa que el aceite esencial de *O. quixos* a la máxima concentración (500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) inhibió el crecimiento del hongo, a las concentraciones de 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$  y 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$  el micelio creció hasta los 30 mm de diámetro. A estas concentraciones se observa un comportamiento inhibitorio superior al patrón. Las concentraciones de 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$  y 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$  tuvieron efecto parecido al del patrón.



**Figura 36.** Efecto del aceite esencial de *Ocotea quixos* sobre el crecimiento del hongo *Cladosporium cladosporioides*

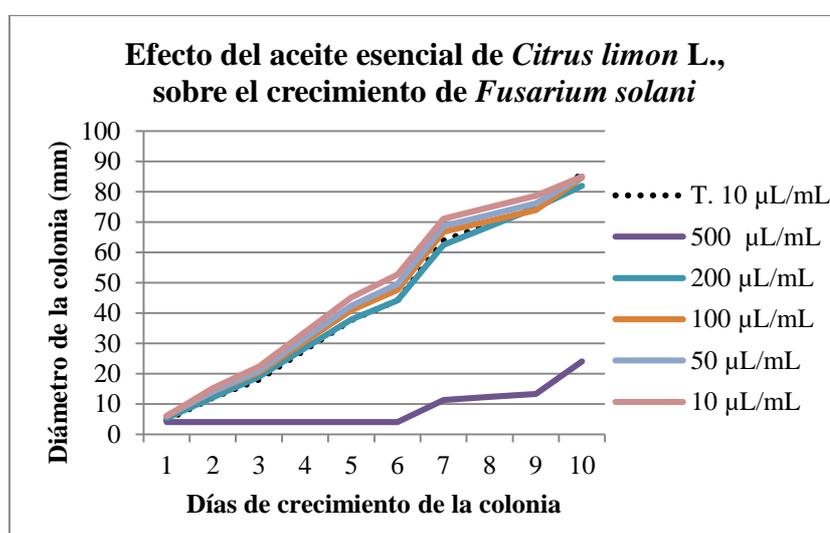
El aceite esencial de *P. aduncum* ha tenido la capacidad de inhibir el crecimiento de *C. cladosporioides*, puesto que desde la concentración 50 hasta 500  $\mu\text{L/mL}$  ejerció un efecto de control sobre el crecimiento del micelio, comparado con el patrón *T. vulgaris* (10  $\mu\text{L/mL}$ ); a mayores concentraciones aumentó la capacidad inhibitoria, (Figura 37).



**Figura 37.** Efecto del aceite esencial de *Piper aduncum* sobre el crecimiento de *Cladosporium cladosporioides*

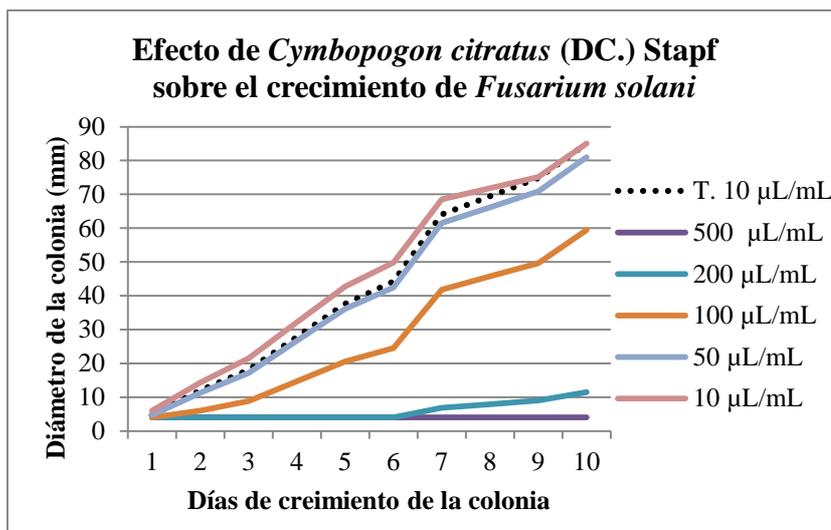
#### 4.3.1.3 Efecto de los Aceites Esenciales sobre el Crecimiento del hongo *Fusarium solani*

El aceite esencial de *Citrus limon* a la concentración de 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$  controló el crecimiento del hongo, permitiendo que se desarrolle hasta los 25 mm de diámetro en el periodo de diez días de incubación. En concentraciones de 10 a 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$  no ejerció efecto inhibitorio sobre *F. solani*, adicionalmente a dichas concentraciones mostró un comportamiento similar al patrón *T. vulgaris* (10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) y el micelio del hongo alcanzó un diámetro superior a 80 mm (Figura 38).



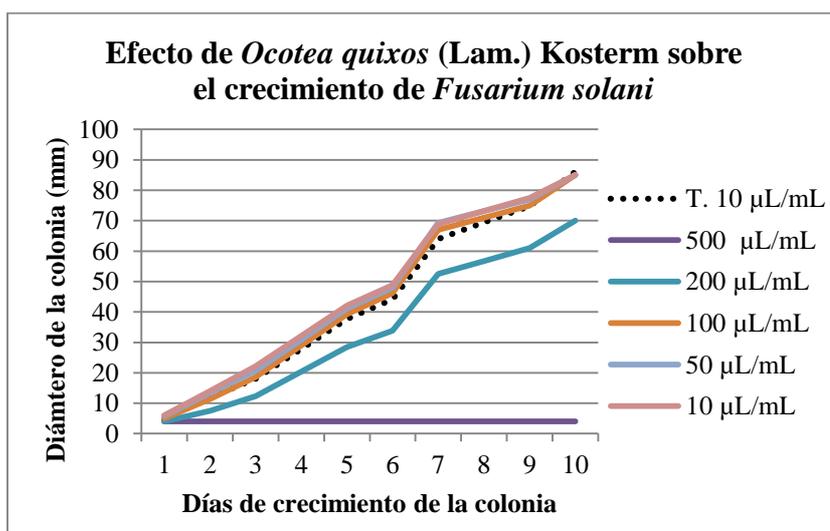
**Figura 38.** Efecto del aceite esencial de *Citrus limon* sobre el crecimiento de *Fusarium solani*

Las concentraciones de 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$  y 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de *C. citratus* controlaron el crecimiento de *F. solani*. En lo específico, la concentración de 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$  permitió inhibir completamente el crecimiento micelial; situación muy similar se observó a la concentración de 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , a la cual no se registró ningún crecimiento del hongo, durante los seis primeros días después de la siembra. Las concentraciones inferiores o iguales de 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$  del aceite no ejercieron efecto alguno sobre el crecimiento del hongo, puesto que su crecimiento sobrepasó los 80 mm de diámetro de la colonia; similar efecto se observa en el patrón (*T. vulgaris* 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) (Figura 39).



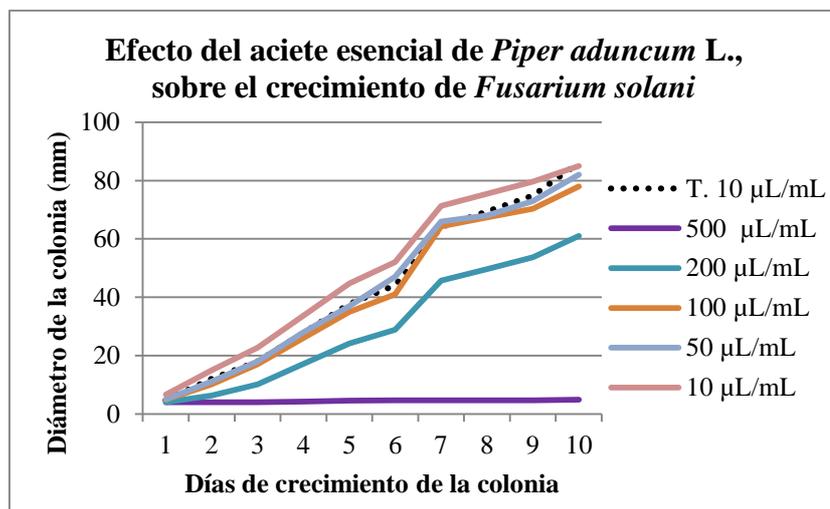
**Figura 39.** Efecto del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* sobre el crecimiento de *Fusarium solani*

La Figura 40 indica la acción de *O. quixos* sobre *F. solani*; se observa que la mayor concentración (500 µL/mL) del aceite esencial tuvo la capacidad de inhibir completamente el crecimiento del hongo. A menor concentración disminuyó el efecto inhibitorio del aceite, así a 200 µL/mL la colonia alcanzó 50 mm de diámetro. Las concentraciones de aceite de *O. quixos* que presentaron menor efecto inhibitorio fueron las de 50 µL/mL y 100 µL/mL, similares al comportamiento del patrón *T. vulgaris* (10 µL/mL).



**Figura 40.** Efecto del aceite esencial de *Ocotea quixos* sobre el crecimiento de *Fusarium solani*

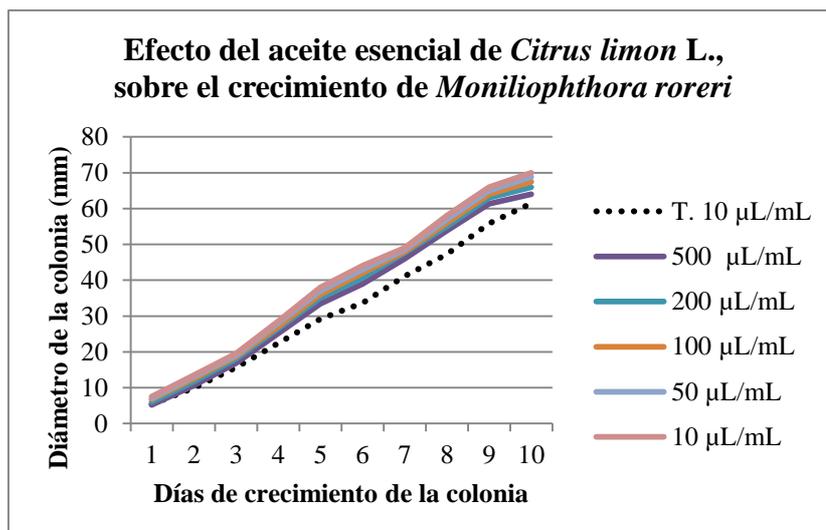
El aceite esencial de *P. aduncum* a una concentración de 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$  mostró la capacidad de inhibir el crecimiento de *F. solani*; a medida que disminuyó su concentración disminuyó su efecto inhibitorio, de tal forma que a 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$  y 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$  poseió un efecto similar a *T. vulgaris* a una concentración de 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , utilizado como patrón. Estos resultados se pueden observar en la Figura 41.



**Figura 41.** Efecto del aceite esencial de *Piper aduncum* sobre el crecimiento de *Fusarium solani*

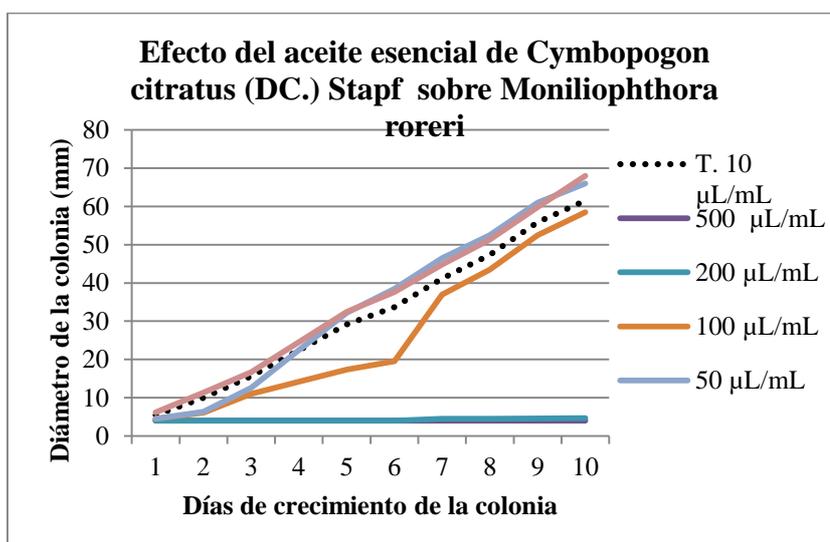
#### 4.3.1.4 Efecto de los Aceites Esenciales sobre el Crecimiento del hongo *Moniliophthora roreri*

El aceite esencial de *C. limon* a ninguna de las concentraciones evaluadas ha tenido la capacidad de inhibir el crecimiento de *M. roreri*, puesto que el diámetro de la colonia luego de transcurridos diez días superó al patrón (*T. vulgaris* 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), y alcanzó los 70 mm de diámetro, tal como se muestra en la Figura 42.



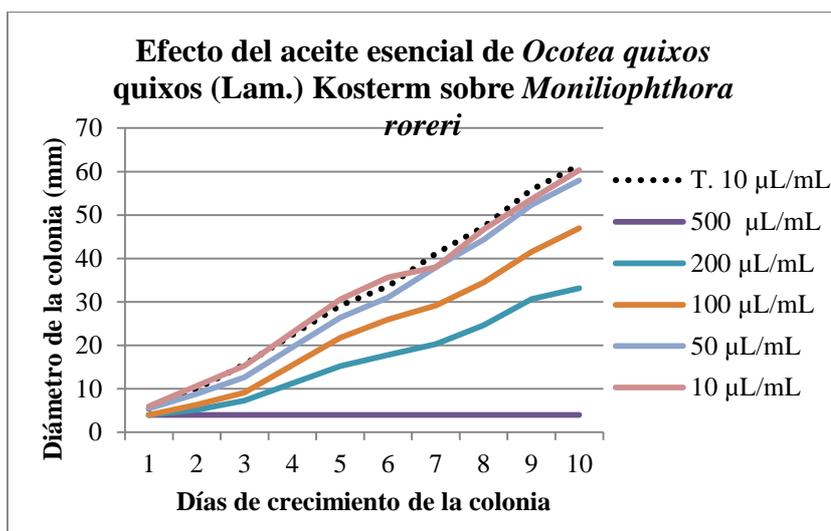
**Figura 42.** Efecto del aceite esencial de *Citrus limon* sobre el crecimiento de *Moniliophthora roreri*

En la Figura 43 se observa que el crecimiento del micelio de *M. roreri* se ve controlado ante la acción del aceite esencial de *C. citratus* a la concentración de 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$  y 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$  (tendencias superpuestas en el gráfico). Conforme las concentraciones de los aceites disminuyeron, disminuyó también la capacidad de inhibir el crecimiento del hongo, por ello las concentraciones de aceite menos eficientes en el control del patógeno fueron 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$  y 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$ .



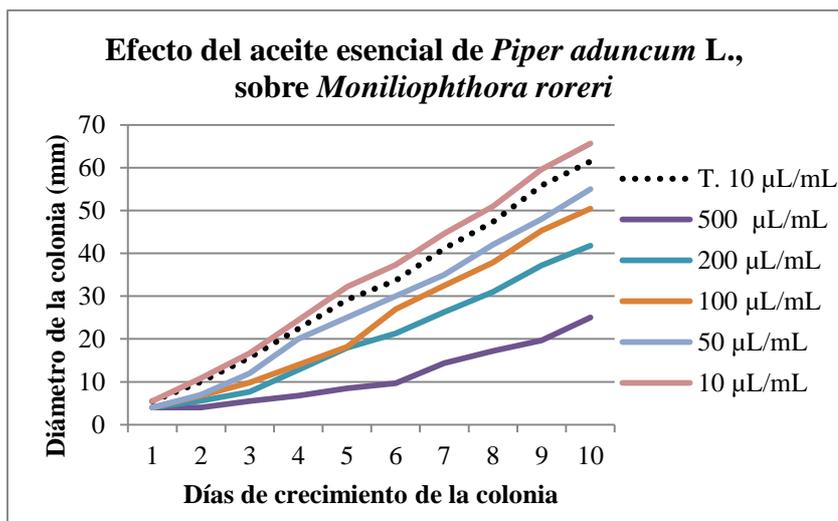
**Figura 43.** Efecto del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* sobre el crecimiento de *Moniliophthora roreri*

El aceite esencial de *O. quixos* a la concentración de 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$  mostró la capacidad de inhibir por completo el crecimiento de *M. roreri*; a medida que disminuyó la concentración del aceite disminuyó también su capacidad inhibitoria. Las concentraciones iguales o inferiores de 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$  del aceite esencial revelaron un efecto similar al patrón, dejando crecer el hongo hasta 60 mm de diámetro durante los diez días del ensayo. Los resultados se muestran en la Figura 44.



**Figura 44.** Efecto del aceite esencial de *Ocotea quixos* sobre el crecimiento de *Moniliophthora roreri*

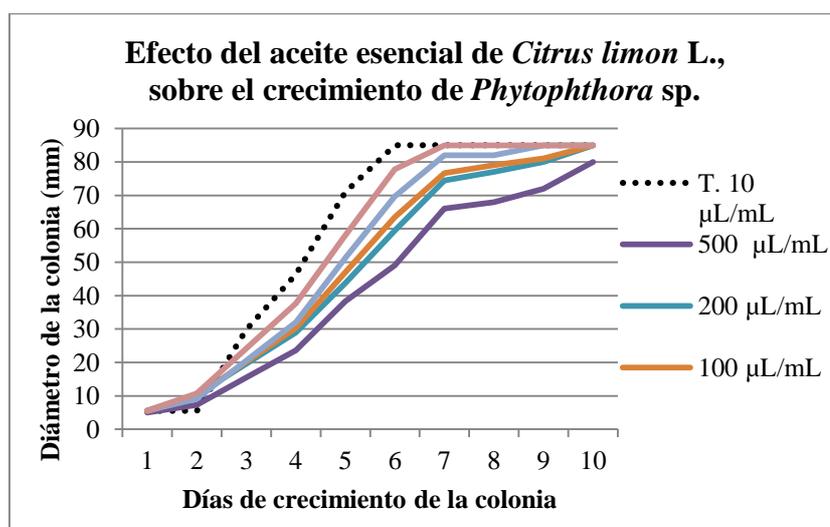
El aceite esencial de *Piper aduncum* a ninguna de las concentraciones estudiadas ha mostrado la capacidad de inhibir por completo el crecimiento de *M. roreri*, aunque a la concentración de 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$  la colonia alcanzó su menor diámetro (25 mm). A las concentraciones entre 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$  y 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$  la colonia creció hasta los 55 mm, alcanzado dimensiones menores que la del patrón (aceite esencial de *T. vulgaris* 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ). Por su parte la concentración de 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$  poseió un comportamiento similar al patrón, alcanzando los 65 mm respecto a los 60 mm (Figura 45).



**Figura 45.** Efecto del aceite esencial de *Piper aduncum* sobre el crecimiento de *Moniliophthora roreri*

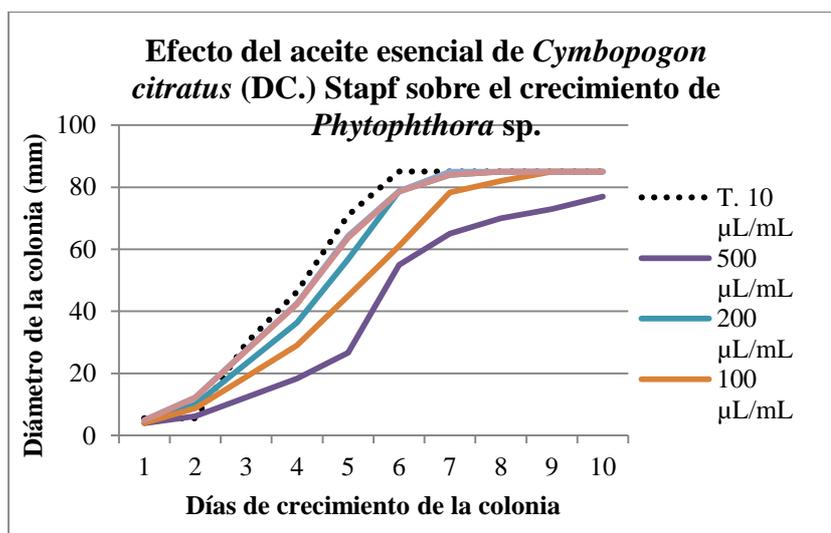
#### 4.3.1.5 Efecto de los Aceites Esenciales sobre el Crecimiento de *Phytophthora* sp.

El aceite esencial de *C. limon* a ninguna de las concentraciones evaluadas ha tenido capacidad de inhibir el crecimiento de *Phytophthora* sp., pues, a la máxima concentración (500 µL/mL) el micelio del hongo creció hasta 80 mm de diámetro en diez días; el patrón presentó un comportamiento similar a la mínima concentración (10 µL/mL) de aceite de *C. limon* con la diferencia que el primero alcanzó el máximo diámetro (85 mm) a los seis días y el segundo a los siete días. Estos resultados se observan en la Figura 46.



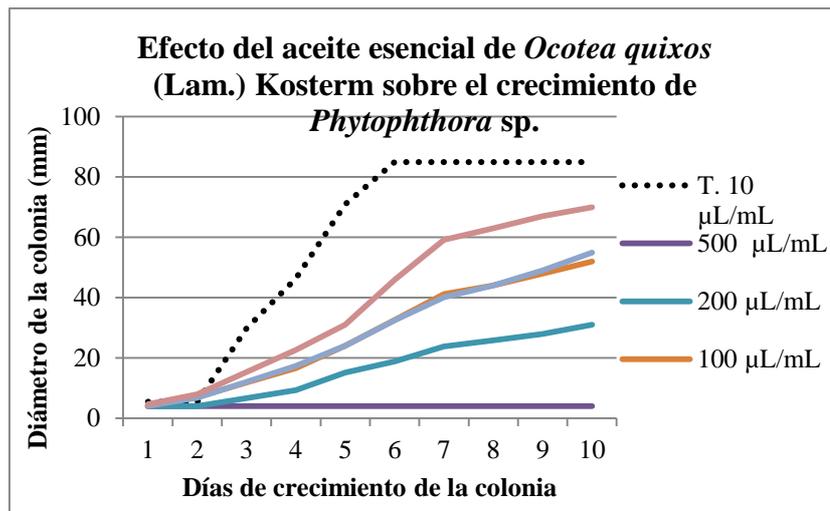
**Figura 46.** Efecto del aceite esencial de *Citrus limon* sobre el crecimiento de *Phytophthora* sp.

La Figura 47 muestra la acción que ejerció *C. citratus* sobre *Phytophthora* sp. A ninguna de las concentraciones del aceite esencial se ha registrado una significativa disminución en el crecimiento del micelio, sino un crecimiento levemente inferior comparado con aquel del patrón (*T. vulgaris* 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ). A la mayor concentración (500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) el hongo registró el menor crecimiento, alcanzando los 75 mm de diámetro envece que los 85 mm de las demás concentraciones.



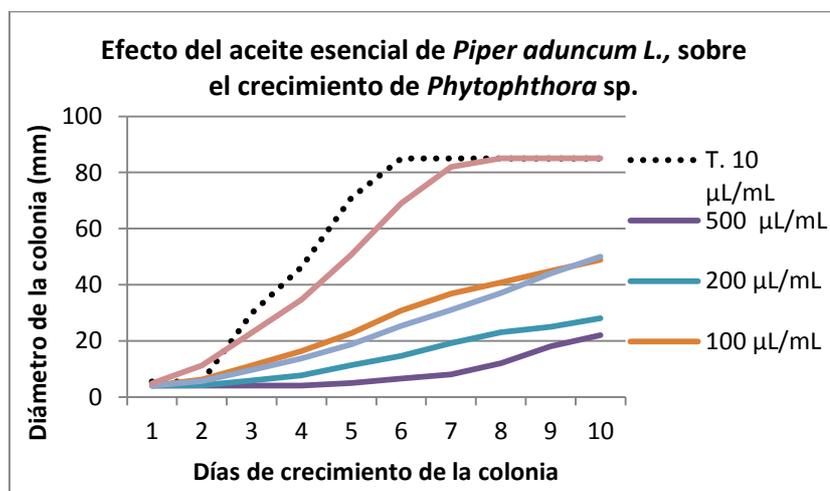
**Figura 47.** Efecto del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* sobre el crecimiento de *Phytophthora* sp.

La Figura 48 muestra que *O. quixos* a una concentración de 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$  inhibió completamente el crecimiento del micelio, a 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$  la colonia creció hasta 30 mm, y, a 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$  el micelio alcanzó los 70 mm de diámetro en diez días. Todas las concentraciones han tenido la capacidad de inhibir el crecimiento del hongo si comparamos con el patrón a la concentración de 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$  que dejó que el hongo alcance el diámetro máximo de 85 mm en tan solo seis días.



**Figura 48.** Efecto del aceite esencial de *Ocotea quixos* sobre el crecimiento de *Phytophthora* sp.

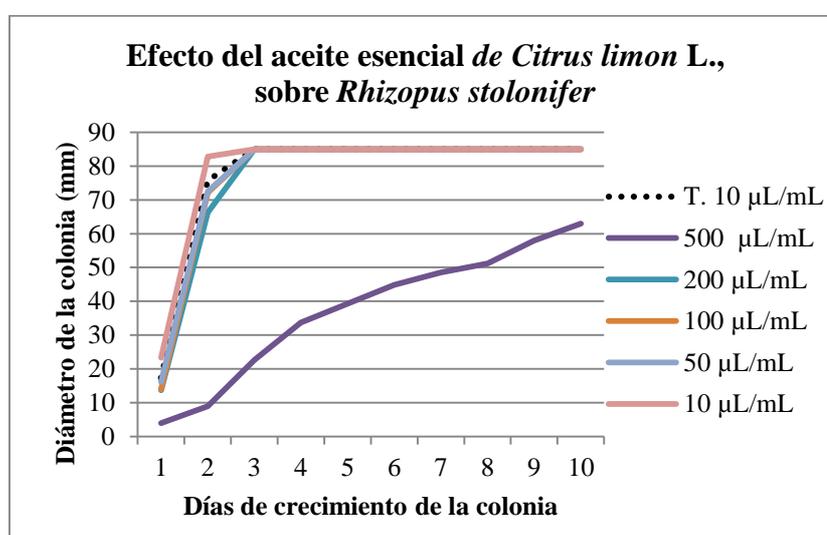
En la Figura 49 se observa que el aceite esencial de *P. aduncum* a las concentraciones de 50 a 500 µL/mL tuvo capacidad inhibitoria sobre el crecimiento de *Phytophthora* sp., haciendo registrar diámetros de crecimiento mucho inferiores que los del patrón. A la mínima concentración del aceite (10 µL/mL) se observó un crecimiento similar (80 mm) al patrón *T. vulgaris* (10 µL/mL). Se observa además, que a la concentración de 500 µL/mL de aceite esencial de *P. aduncum*, la colonia fitopatógena creció hasta alcanzar los 21 mm de diámetro; a 200 µL/mL el hongo creció hasta 19 mm y, a 50 µL/mL y 100 µL/mL el hongo se comportó de manera similar y se extendió hasta los 50 mm de diámetro; estos resultados una vez transcurridos diez días del ensayo.



**Figura 49.** Efecto del aceite esencial de *Piper aduncum* sobre el crecimiento de *Phytophthora* sp.

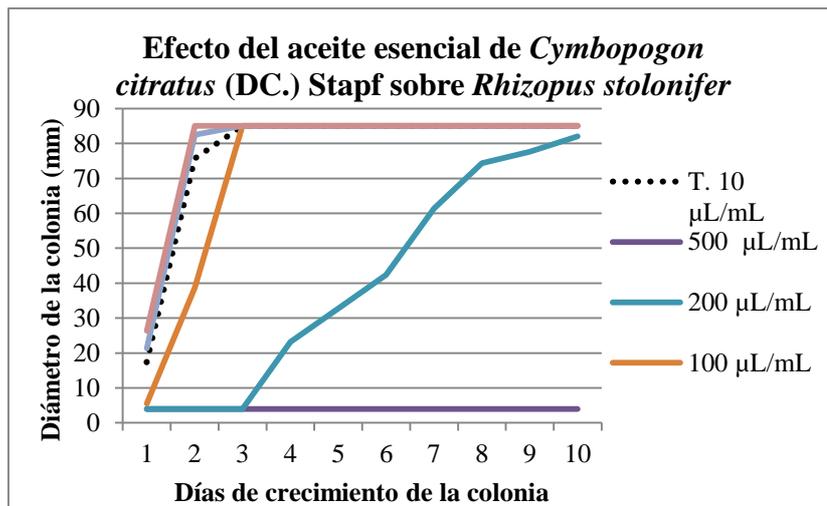
#### 4.3.1.6 Efecto de los Aceites Esenciales sobre el Crecimiento del hongo *Rhizopus stolonifer*

En la Figura 50 se observa que el aceite de *C. limon* a ninguna de las concentraciones estudiadas ha tenido la capacidad de inhibir el crecimiento de *R. stolonifer*; de hecho a la máxima concentración (500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) de aceite esencial, el hongo alcanzó los 63 mm de diámetro una vez transcurridos diez días; a las concentraciones de 10 a 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , al igual que en el patrón, el hongo alcanzó 85 mm de diámetro a partir de los tres días.



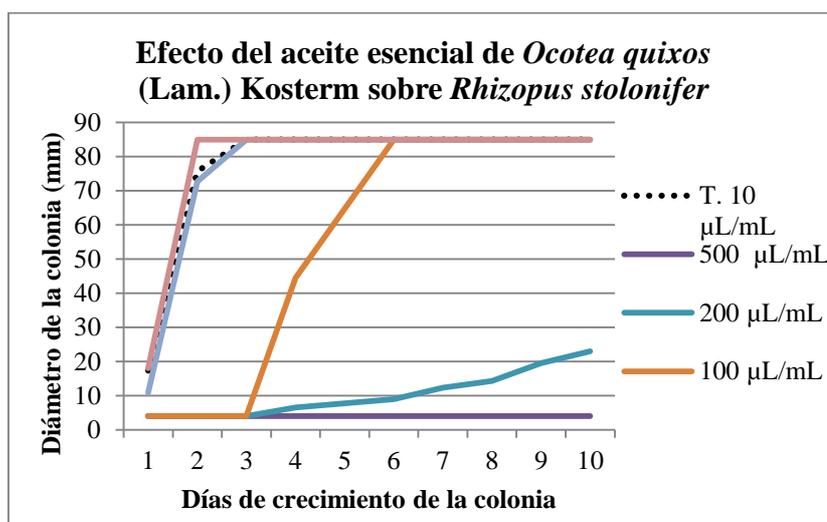
**Figura 50.** Efecto del aceite esencial de *Citrus limon* sobre el crecimiento de *Rhizopus stolonifer*

El aceite esencial de *C. citratus* a la concentración de 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$  inhibió completamente el crecimiento de *R. stolonifer*; a la concentración de 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$  el hongo alcanzó gradualmente un diámetro de 82 mm en el transcurso de los diez días de ensayo; las concentraciones menores ejercieron un efecto similar al patrón (*T. vulgaris* 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), pues el hongo alcanzó el diámetro máximo (85 mm) al segundo día de sembrada la cepa; estos resultados se pueden observar en la Figura 51.



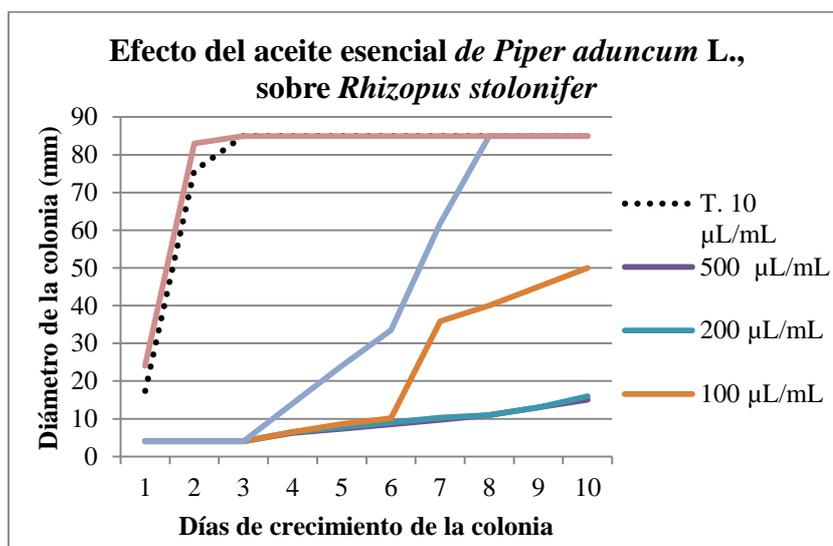
**Figura 51.** Efecto del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* sobre el crecimiento de *Rhizopus stolonifer*

En la Figura 52 se observa que a las concentraciones de 100 a 500  $\mu\text{L/mL}$ , el aceite esencial de *O. quixos* controló completamente el crecimiento del micelio durante los tres primeros días desde el inoculo; luego a 500  $\mu\text{L/mL}$  se inhibió completamente el crecimiento del micelio, a una concentración de 200  $\mu\text{L/mL}$  se controló su crecimiento hasta alcanzar 22 mm de diámetro y, a 100  $\mu\text{L/mL}$  el micelio creció hasta 85 mm de diámetro a los seis días de sembrado. Las concentraciones menores tuvieron un efecto similar al patrón (*T. vulgaris*, 10  $\mu\text{L/mL}$ ) y ya, desde el segundo día del inoculo las colonias alcanzaron su máximo diametro, equivalente a 85 mm.



**Figura 52.** Efecto del aceite esencial de *Ocotea quixos* sobre el crecimiento de *Rhizopus stolonifer*

El aceite esencial de *P. aduncum* a las concentraciones de 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$  y 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$  mostró efecto de control sobre el crecimiento de *R. stolonifer*, dejando crecer la colonia hasta 12 mm de diámetro en diez días. En cambio a las concentraciones de 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$  y 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$  se observó una inhibición completa de crecimiento hasta los tres días, y posteriormente se registró un aumento del diámetro de las colonias (respectivamente hasta 85 y 50 mm). La menor concentración de *P. aduncum* (10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) presentó un efecto similar al patrón, y no mostró ningún efecto de control sobre *R. stolonifer*. Los resultados se observan en la Figura 53.



**Figura 53.** Efecto del aceite esencial de *Piper aduncum* sobre el crecimiento de *Rhizopus stolonifer*

#### 4.3.2 Inhibición del Crecimiento de los Hongos Fitopatógenos por Efecto de los Aceites Esenciales

Los resultados del análisis de varianza (probabilidad y valor F) de los promedios de crecimiento del micelio de los fitopatógenos, a los diez días de incubación, muestran la significancia entre los tratamientos, mientras que el coeficiente de variación (menor al 5%) otorga confiabilidad a los datos.

#### 4.3.2.1 Inhibición del Crecimiento de *Aspergillus oryzae* por Efecto de los Aceites Esenciales

En el Cuadro 9 se muestran los resultados del análisis de varianza de los promedios del diámetro de crecimiento de *Aspergillus oryzae* bajo el efecto cuatro aceites (*C. limon*, *C. citratus*, *O. quixos* y *P. aduncum*), a diferentes concentraciones, a niveles de significancia del 5% y 1%, con 26 y 54 grados de libertad. El valor de F calculada (2029.55) supera el valor de F tabular e indica que existen diferencias altamente significativas entre los promedios de los tratamientos; el coeficiente de variación alcanza un valor de 2.01% que es aceptable en las condiciones del ensayo, y que expresa la confiabilidad de los datos.

#### Cuadro 9.

**Análisis de varianza (ADEVA) de la actividad antifúngica de los aceites esenciales sobre el crecimiento de *Aspergillus oryzae*, a los 10 días de incubación.**

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	F tabular. Significación	
					0.05	0.01
Tratamientos	26	72312.2	2781.24	2029.55	1.853	1.615**
Error	54	74.0	1.37			
Total	80	72386.2				
Probabilidad	0.0000					
CV %	2.01					
Media	58.148					

\*significativo

\*\*Altamente significativo

<sup>ns</sup> no significativo

En el cuadro 10 se expresa los rangos obtenidos con la prueba de significación de Tukey al 5%, donde se observa los promedios de crecimiento del micelio bajo la acción de cada tratamiento; destacándose los tratamientos T10, T14 y T15, (*C. citratus* 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , y *O. quixos* 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$  y 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), mismos que resultaron estadísticamente iguales a los tratamientos positivos (T24: *T. vulgaris* 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$  y T25: *T. vulgaris* 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) que alcanzaron los menores diámetros de crecimiento (4.0 mm), evidenciando con ello la mayor efectividad de los tratamientos. En tanto que T1 (*C. limon* 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), T2 (*C. limon* 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) y T11 (*O. quixos* 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) con 81.33 mm, 81.00 mm y 80.66 mm respectivamente, fueron estadísticamente iguales a los testigos negativos (T26 y T27, PDA Y PDA+DMSO).

**Cuadro 10.**

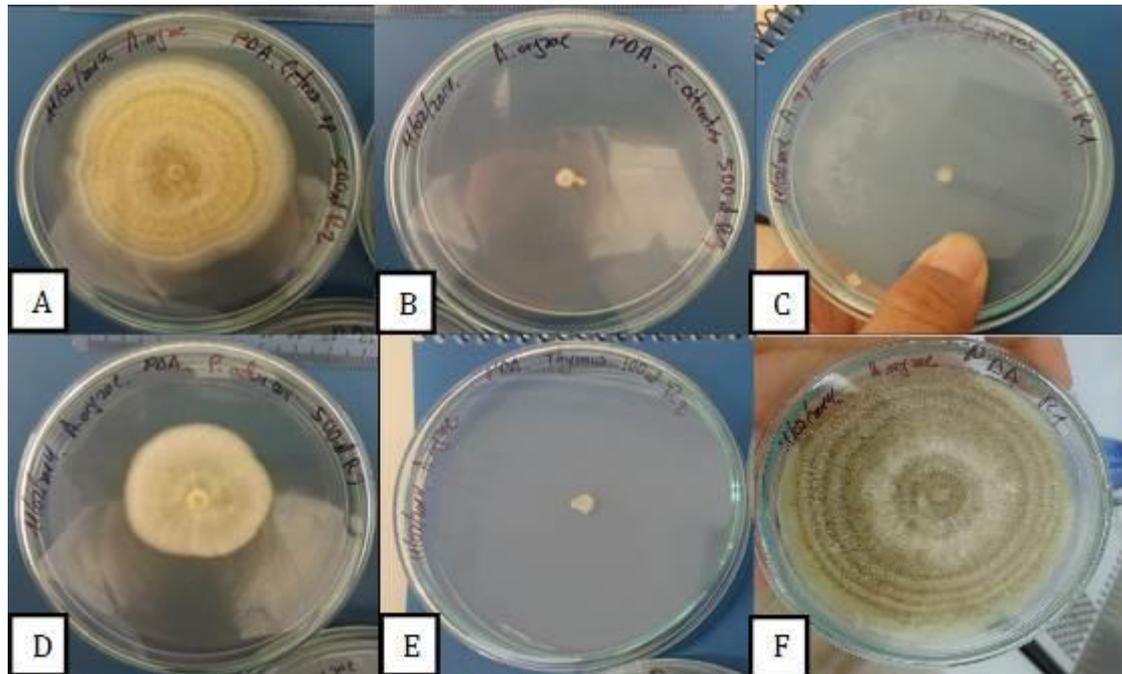
**Rangos de significación (Tukey 5%) para la actividad antifúngica de los aceites esenciales (A) a cinco concentraciones (C) frente a *Aspergillus oryzae*.**

Tratamiento	Descripción	Media (mm)	Grupo Significancia al 5%
T26 (testigo-1)	PDA	83.000	a
T1 (A1C1)	<i>C. limon</i> x 10 µL/mL	81.333	a
T27 (testigo-2)	PDA+DMSO	81.333	a
T2 (A1C2)	<i>C. limon</i> x 50 µL/mL	81.000	a
T11 (A3C1)	<i>O. quixos</i> x 10 µL/mL	80.667	a
T6 (A2C1)	<i>C. citratus</i> x 10 µL/mL	80.000	ab
T12 (A3C2)	<i>O. quixos</i> x 50 µL/mL	80.000	ab
T16 (A4C1)	<i>P. aduncum</i> x 10 µL/mL	79.000	bc
T17 (A4C1)	<i>P. aduncum</i> x 50 µL/mL	78.000	cd
T3 (A1C3)	<i>C. limon</i> x 100 µL/mL	77.667	cde
T7 (A2C2)	<i>C. citratus</i> x 50 µL/mL	77.333	def
T18 (A4C3)	<i>P. aduncum</i> x 100 µL/mL	76.333	ef
T13 (A3C3)	<i>O. quixos</i> x 100 µL/mL	76.000	fg
T4 (A1C4)	<i>C. limon</i> x 200 µL/mL	74.667	g
T8 (A2C3)	<i>C. citratus</i> x 100 µL/mL	71.000	h
T21 (testigo+1)	<i>T. vulgaris</i> x 10 µL/mL	70.333	h
T5 (A1C5)	<i>C. limon</i> x 500 µL/mL	70.000	h
T9 (A2C4)	<i>C. citratus</i> x 200 µL/mL	64.667	i
T19 (A4C4)	<i>P. aduncum</i> x 200 µL/mL	61.333	j
T20 (A4C5)	<i>P. aduncum</i> x 500 µL/mL	49.667	k
T22 (testigo+2)	<i>T. vulgaris</i> x 50 µL/mL	49.667	k
T23 (testigo+3)	<i>T. vulgaris</i> x 100 µL/mL	7.0000	l
T10 (A2C5)	<i>C. citratus</i> x 500 µL/mL	4.0000	m
T14 (A3C4)	<i>O. quixos</i> x 200 µL/mL	4.0000	m
T15 (A3C5)	<i>O. quixos</i> x 500 µL/mL	4.0000	m
T24 (testigo+4)	<i>T. vulgaris</i> x 200 µL/mL	4.0000	m
T25 (testigo+5)	<i>T. vulgaris</i> x 500 µL/mL	4.0000	m

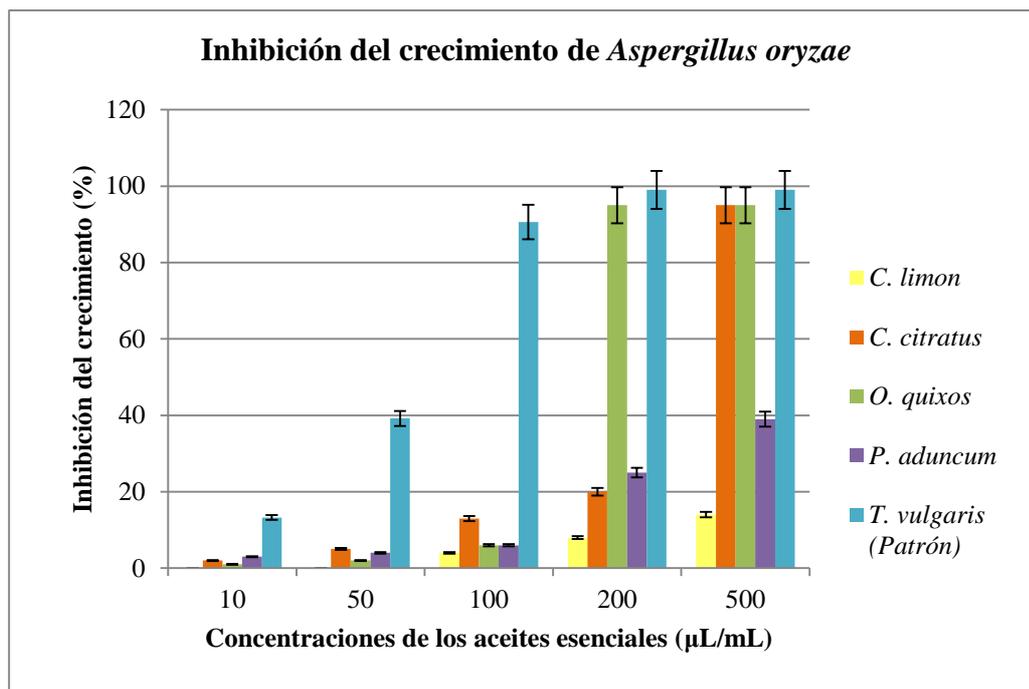
#### 4.3.2.1.1 Inhibición del Crecimiento de *Aspergillus oryzae*

En la Figura 54 se muestra la acción que ejercieron los aceites esenciales a la máxima concentración (500 µL/mL) sobre el crecimiento del micelio de *A. oryzae* a los diez días de incubación; se observa que los aceites esenciales que tuvieron mayor capacidad de inhibición frente al fitopatógeno *A. oryzae*, fueron *C. citratus* y *O. quixos*, acercándose al comportamiento del patrón positivo (*T. vulgaris*). El aceite esencial de *C. citratus* logró inhibir hasta un 95% la formación de la colonia a la

concentración de 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Así mismo el aceite de *O. quixos* resultó eficaz a la concentración de 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$  y también a la de 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ; en ambos casos se registró una inhibición del 95%. Concentraciones menores de los aceites esenciales inhibieron el crecimiento del hongo fitopatogéno de manera no significativa, ya que a todas se registró una inhibición entre el 1% y el 40% (Figura 55).



**Figura 54.** Crecimiento del micelio de *Aspergillus oryzae* a 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de concentración del aceite esencial de (A) *C. limon*, (B) *C. citratus*, (C) *O. quixos*, (D) *P. aduncum* (E) *T. vulgaris*-Control (+) y, (F) PDA-Control (-), a los diez días de incubación



**Figura 55. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *Aspergillus oryzae* por acción de los aceites esenciales**

#### **4.3.2.2 Inhibición del Crecimiento de *Cladosporium cladosporioides* por Efecto de los Aceites Esenciales**

El Cuadro 11 muestra los resultados del análisis de varianza de los promedios del diámetro de crecimiento de *Cladosporium cladosporioides*, bajo el efecto cuatro aceites (*C. limon*, *C. citratus*, *O. quixos* y *P. aduncum*) a diferentes concentraciones, a niveles de significancia del 5% y 1%, con 26 y 54 grados de libertad. La probabilidad del 0.000 y el valor de F calculada de 524.71 (superior al valor de F de la tabla) indican que existen diferencias altamente significativas entre los promedios de los tratamientos; el coeficiente de variación alcanza un valor de 4.04% aceptable en las condiciones del ensayo, que brinda confiabilidad a la investigación.

**Cuadro 11.**

*Análisis de varianza (ADEVA) de la actividad antifúngica de los aceites esenciales sobre el crecimiento de Cladosporium cladosporioides, a los 10 días de incubación.*

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	F tabular. Significación	
					0.05	0.01
Tratamientos	26	11958.2	459.933	524.71	1.853	1.615**
Error	54	47.3	0.877			
Total	80	12005.6				
Probabilidad	0.0000					
CV %	4.04					
Media	23.173					

\*significativo

\*\*Altamente significativo

<sup>ns</sup> no significativo**Cuadro 12.**

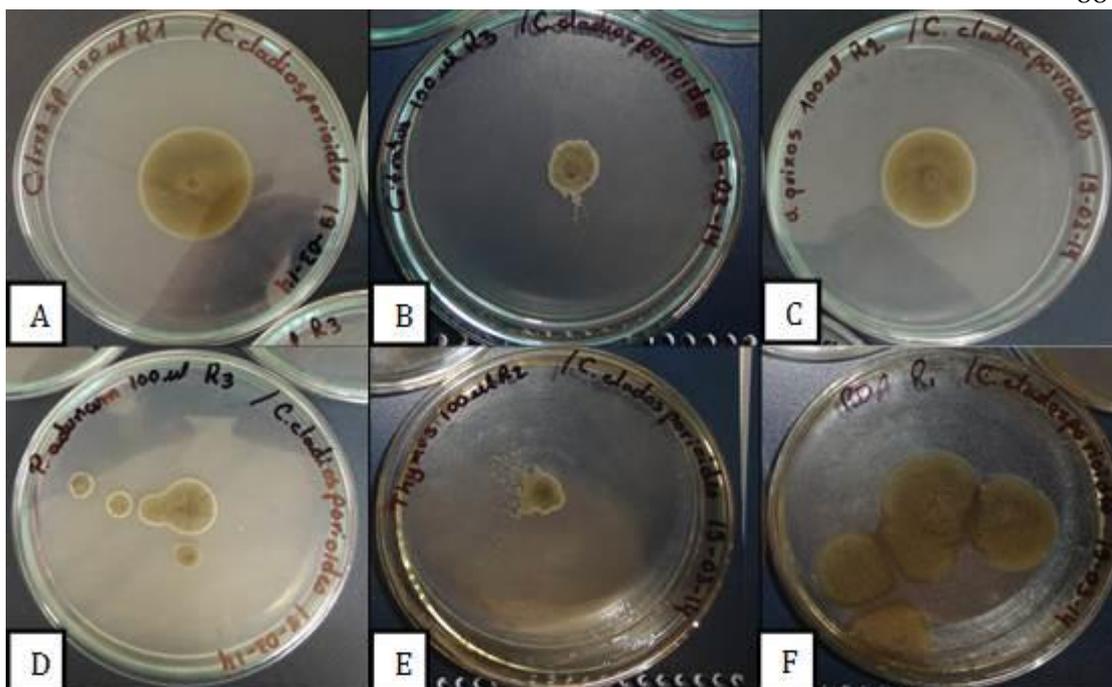
*Rangos de significación (Tukey 5%) para la actividad antifúngica de los aceites esenciales (A) a cinco concentraciones (C) frente Cladosporium cladosporioides.*

Tratamiento	Descripción	Media	Grupo
T26 (testigo-1)	PDA	39.000	a
T27 (testigo-2)	PDA+DMSO	38.000	a
T1 (A1C1)	<i>C. limon</i> x 10 µL/mL	37.000	ab
T2 (A1C2)	<i>C. limon</i> x 50 µL/mL	37.000	ab
T3 (A1C3)	<i>C. limon</i> x 100 µL/mL	35.000	bc
T6 (A2C1)	<i>C. citratus</i> x 10 µL/mL	35.000	bc
T11 (A3C1)	<i>O. quixos</i> x 10 µL/mL	35.000	bc
T16 (A4C1)	<i>P. aduncum</i> x 10 µL/mL	34.333	bc
T12 (A3C2)	<i>O. quixos</i> x 50 µL/mL	34.000	c
T21 (testigo+1)	<i>T. vulgaris</i> x 10 µL/mL	33.667	c
T13 (A3C3)	<i>O. quixos</i> x 100 µL/mL	30.000	d
T4 (A1C4)	<i>C. limon</i> x 200 µL/mL	28.333	d
T14 (A3C4)	<i>O. quixos</i> x 200 µL/mL	27.667	d
T5 (A1C5)	<i>C. limon</i> x 500 µL/mL	27.333	d
T17 (A4C2)	<i>P. aduncum</i> x 50 µL/mL	22.333	e
T7 (A2C2)	<i>C. citratus</i> x 50 µL/mL	20.000	e
T22 (testigo+2)	<i>T. vulgaris</i> x 50 µL/mL	20.000	e
T18 (A4C3)	<i>P. aduncum</i> x 100 µL/mL	17.000	f
T8 (A2C3)	<i>C. citratus</i> x 100 µL/mL	16.667	fg
T23 (testigo+3)	<i>T. vulgaris</i> x 100 µL/mL	14.000	gh
T19 (A4C4)	<i>P. aduncum</i> x 200 µL/mL	13.000	h
T20 (A4C5)	<i>P. aduncum</i> x 500 µL/mL	10.000	i
T9 (A2C4)	<i>C. citratus</i> x 200 µL/mL	5.3333	i
T10 (A2C5)	<i>C. citratus</i> x 500 µL/mL	4.0000	i
T15 (A3C5)	<i>O. quixos</i> x 500 µL/mL	4.0000	i
T24 (testigo+4)	<i>T. vulgaris</i> x 200 µL/mL	4.0000	i
T25 (testigo+5)	<i>T. vulgaris</i> x 500 µL/mL	4.0000	i

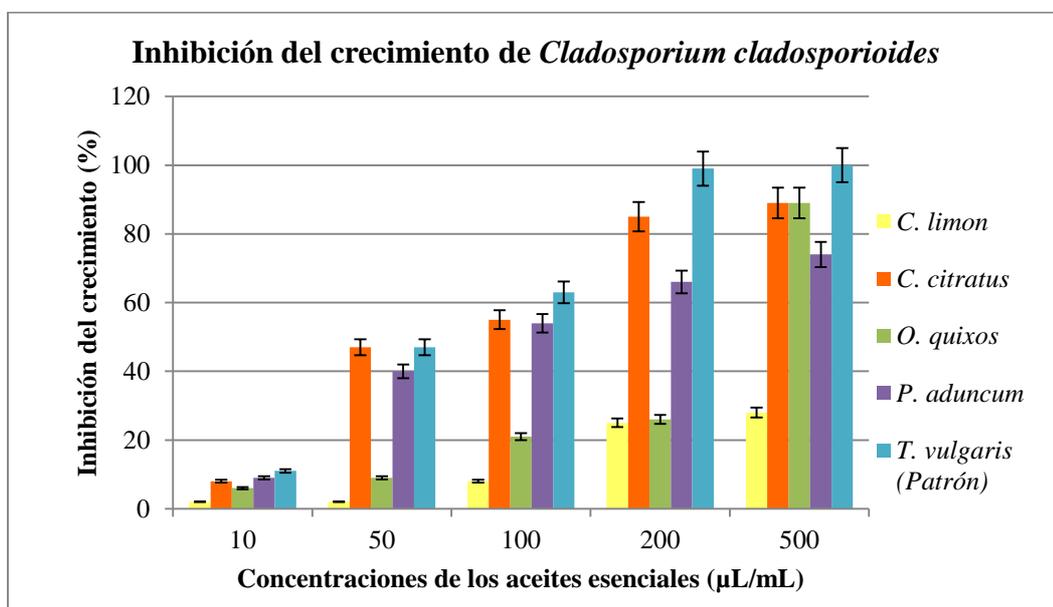
El cuadro 12 detalla la prueba de significación de Tukey, al 5% de significación, se destacan los tratamientos T9, T10 y T15 (*C. citratus* 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$  y 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , y *O. quixos* a la máxima concentración), que son estadísticamente iguales a los controles positivos T24 y T25 (*T. vulgaris* 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$  y 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), que controlaron el crecimiento del hongo (4 mm de diámetro). Los tratamientos que mostraron menor efectividad fueron T2, T1 (*C. limon* 50 y 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), con 37.00 mm de diámetro; y son estadísticamente similares al patrón negativo (T26 y T27).

#### **4.3.2.2.1 Inhibición del Crecimiento de *Cladosporium cladosporioides***

En la Figura 56 se observa el crecimiento del micelio de *C. cladosporioides* a los diez días del inóculo bajo la acción de los aceites esenciales a una concentración de 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Los aceites esenciales que tuvieron efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *C. cladosporioides* fueron *C. citratus*, *P. aduncum* y *O. quixos*; los tres mostraron un comportamiento inhibitorio dosis-dependiente. El aceite esencial de *C. citratus* mostró una inhibición del 50% a la concentración de 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , equivalente a aquella del patrón *T. vulgaris* a la misma concentración. Al aumentar la concentración se observó una proporcional capacidad inhibitoria que alcanzó el 90% a los 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . El aceite esencial de *P. aduncum* alcanzó una inhibición del 72% a los 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . El aceite de *O. quixos* tuvo un comportamiento diferente comparado con los dos aceites mencionados; de hecho a concentraciones de 10 a 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$  hizo registrar una inhibición entre el 8% y el 20%, mientras solo a la concentración de 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$  mostró una inhibición del 90%. El patrón, el aceite esencial de *T. vulgaris*, mostró un efecto inhibitorio dosis-dependiente alcanzando el 100% de inhibición a la concentración de 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Estos resultados una vez transcurridos los diez días de incubación del hongo (Figura 57).



**Figura 56.** Crecimiento del micelio de *Cladosporium cladosporioides* a 100  $\mu\text{L/mL}$  de concentración del aceite esencial de (A) *C. limon*, (B) *C. citratus*, (C) *O. quixos*, (D) *P. aduncum* (E) *T. vulgaris*-Control (+) y, (F) PDA-Control (-), a los diez días de incubación



**Figura 57.** Porcentaje de inhibición del crecimiento de *Cladosporium cladosporioides* por acción de los aceites esenciales

### 4.3.2.3 Inhibición del Crecimiento de *Fusarium solani* por Efecto de los Aceites Esenciales

Los resultados del análisis de varianza de los promedios del diámetro de crecimiento de *Fusarium solani* bajo el efecto cuatro aceites (*C. limon*, *C. citratus*, *O. quixos* y *P. aduncum*) a diferentes concentraciones, a niveles de significación del 5% y 1%, con 26 y 54 grados de libertad se observan en el Cuadro 13. El valor de F calculada alcanza un valor de 3965.84 (superior al valor de F de la tabla) y la probabilidad de 0.0000 indican que existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos; el coeficiente de variación alcanza un valor de 1.64% aceptable en las condiciones de laboratorio, por lo tanto los datos son confiables.

#### Cuadro 13.

*Análisis de varianza (ADEVA) de la actividad antifúngica de los aceites esenciales sobre el crecimiento de Fusarium solani, a los 10 días de incubación.*

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	F tabular. Significación	
					0.05	0.01
Tratamientos	26	92927.9	3574.15	3965.84	1.853	1.615**
Error	54	48.7	0.90			
Total	80	92976.5				
Probabilidad	0.0000					
CV %	1.64					
Media	57.765					

\*significativo

\*\*Altamente significativo

<sup>ns</sup> no significativo

La prueba de significancia de Tukey al 5% (Cuadro 17), muestra los promedios del crecimiento del micelio. Los tratamientos T20, T10 y T15 (*P. aduncum*, *O. quixos* y *C. citratus*, a 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de concentración) son estadísticamente iguales en sus promedios a los controles (*T. vulgaris* 100, 200 y 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) con un valor de 4.00 mm de diámetro de la colonia; por el contrario T1, T2, T6, T11, T12, T13, T13 y T16, presentan el máximo crecimiento de la colonia fitopatógena (85 mm), siendo estadísticamente igual a los controles negativos T26 y T27 (PDA y PDA+DMSO).

**Cuadro 14.**

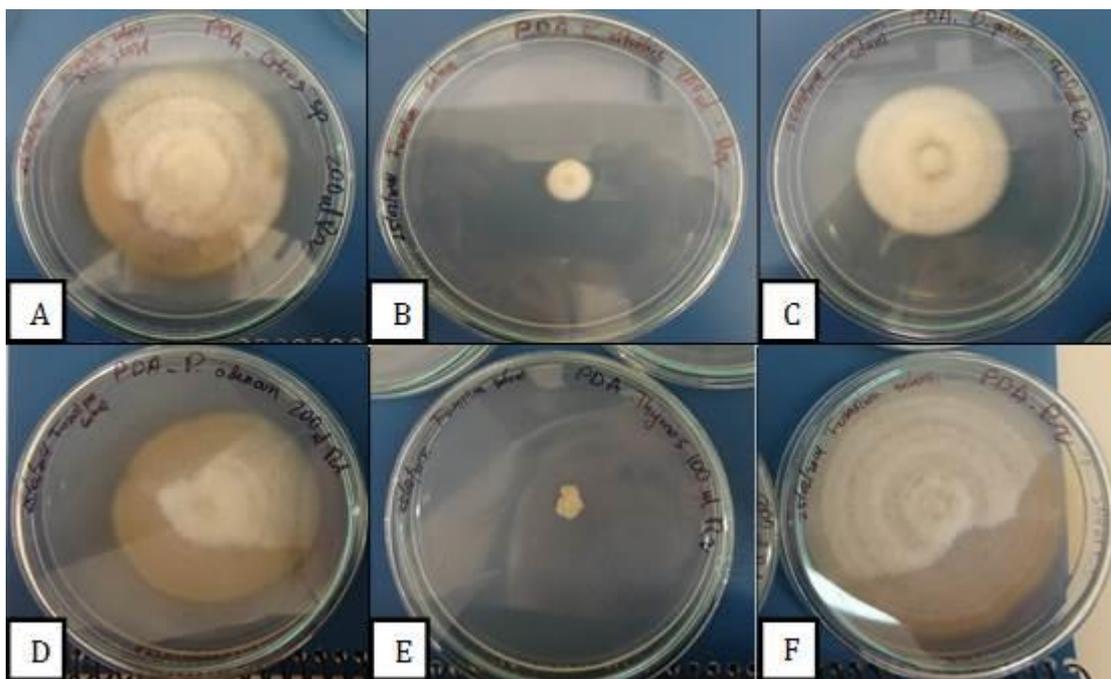
**Rangos de significación (Tukey 5%) para la actividad antifúngica de los aceites esenciales (A) a cinco concentraciones (C) frente *Fusarium solani*.**

Tratamiento	Descripción	Media (mm)	Grupo Significancia al 5%
T1 (A1C1)	<i>C. limon</i> x 10 µL/mL	85.000	a
T2 (A1C2)	<i>C. limon</i> x 50 µL/mL	85.000	a
T6 (A2C1)	<i>C. citratus</i> x 10 µL/mL	85.000	a
T11 (A3C1)	<i>O. quixos</i> x 10 µL/mL	85.000	a
T12 (A3C2)	<i>O. quixos</i> x 50 µL/mL	85.000	a
T13 (A3C3)	<i>O. quixos</i> x 100 µL/mL	85.000	a
T16 (A4C1)	<i>P. aduncum</i> x 10 µL/mL	85.000	a
T21 (testigo+1)	<i>T. vulgaris</i> x 10 µL/mL	85.000	a
T26 (testigo-1)	PDA	85.000	a
T27 (testigo-2)	PDA+DMSO	85.000	a
T3 (A1C3)	<i>C. limon</i> x 100 µL/mL	84.000	ab
T17 (A4C2)	<i>P. aduncum</i> x 50 µL/mL	82.000	ab
T4 (A1C4)	<i>C. limon</i> x 200 µL/mL	81.667	b
T7 (A2C2)	<i>C. citratus</i> x 50 µL/mL	81.000	b
T18 (A4C3)	<i>P. aduncum</i> x 100 µL/mL	77.667	c
T14 (A3C4)	<i>O. quixos</i> x 200 µL/mL	69.667	d
T19 (A4C4)	<i>P. aduncum</i> x 200 µL/mL	61.000	e
T8 (A2C3)	<i>C. citratus</i> x 100 µL/mL	59.333	e
T22 (testigo+2)	<i>T. vulgaris</i> x 50 µL/mL	53.667	f
T5 (A1C5)	<i>C. limon</i> x 500 µL/mL	24.000	g
T9 (A2C4)	<i>C. citratus</i> x 200 µL/mL	11.333	h
T20 (A4C5)	<i>P. aduncum</i> x 500 µL/mL	4.3333	i
T10 (A2C5)	<i>C. citratus</i> x 500 µL/mL	4.0000	i
T15 (A3C5)	<i>O. quixos</i> x 500 µL/mL	4.0000	i
T23 (testigo+3)	<i>T. vulgaris</i> x 100 µL/mL	4.0000	i
T24 (testigo+4)	<i>T. vulgaris</i> x 200 µL/mL	4.0000	i
T25 (testigo+5)	<i>T. vulgaris</i> x 500 µL/mL	4.0000	i

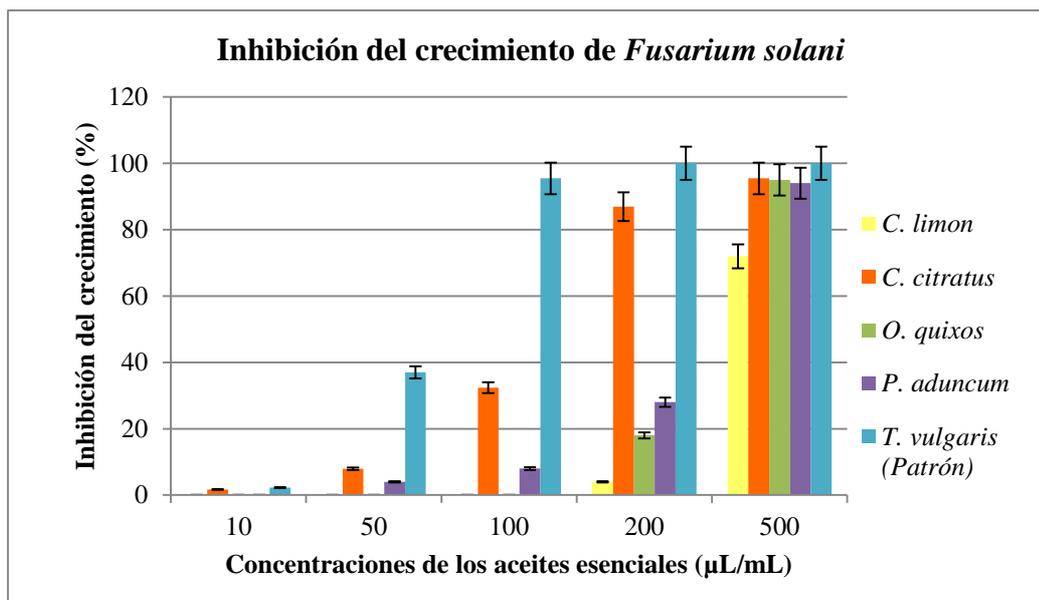
#### 4.3.2.3.1 Inhibición del Crecimiento de *Fusarium solani*

La Figura 58 muestra el efecto que ejercieron los aceites esenciales a una concentración de 200 µL/mL sobre el fitopatógeno *F. solani* a los diez días de incubación. Los aceites esenciales que registraron la mayor capacidad inhibitoria frente al fitopatógeno *F. solani* fueron *C. citratus*, *O. quixos* y *P. aduncum*. A las concentraciones de 10 µL/mL, 50 µL/mL y 100 µL/mL no ejercieron efecto alguno sobre el crecimiento del micelio, puesto que el porcentaje de inhibición se encuentra muy por debajo de los valores expresados por el patrón. En cambio, a las

concentraciones de 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$  y 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , los aceites esenciales de *C. citratus* y *O. quixos* hicieron registrar una inhibición respectivamente de 87% y 95%, y de 86% y 95%. El aceite de *P. aduncum* mostró un comportamiento un poco diferente comparado con los dos aceites mencionados, registrando un menor porcentaje de inhibición (30%) a 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$  y uno más elevado (94%) a los 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Cabe destacar el comportamiento del aceite esencial de *C. limon*, que mostró su efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *F. solani* solo a la concentración de 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , con un valor de 72% (Figura 59).



**Figura 58.** Crecimiento del micelio de *Fusarium solani* a 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de concentración del aceite esencial de (A) *C. limon*, (B) *C. citratus*, (C) *O. quixos*, (D) *P. aduncum* (E) *T. vulgaris*-Control (+) y, (F) PDA-Control (-), a los diez días de incubación



**Figura 59. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *Fusarium solani* por acción de los aceites esenciales**

#### **4.3.2.4 Inhibición del Crecimiento de *Moniliophthora roreri* por Efecto de los Aceites Esenciales**

Los resultados del análisis de varianza de los promedios del diámetro de crecimiento de *Moniliophthora roreri* bajo el efecto cuatro aceites (*C. limon*, *C. citratus*, *O. quixos* y *P. aduncum*) a diferentes concentraciones, a niveles de significación del 5% y 1%, con 26 y 54 grados de libertad se observan en el Cuadro 15. El valor de F calculada alcanza un valor de 1351.36 (superior al valor de F de la tabla) y la probabilidad del 0.0000, indican que existen diferencias altamente significativas entre los promedios de los tratamientos; el coeficiente de variación alcanza un valor de 2.68% aceptable en las condiciones del ensayo, brinda confiabilidad a los datos.

**Cuadro 15.**

***Análisis de varianza (ADEVA) de la actividad antifúngica de los aceites esenciales sobre el crecimiento de Moniliophthora roreri, a los 10 días de incubación.***

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	F tabular. Significación	
					0.05	0.01
Tratamientos	26	50317.3	1935.28	1351.36	1.853	1.615**
Error	54	77.3	1.43			
Total	80	50394.6				
Probabilidad	0.0000					
CV %	2.68					
Media	44.642					

\*significativo

\*\*Altamente significativo

<sup>ns</sup> no significativo

La prueba de significancia de Tukey al 5% se observa el Cuadro 16, en donde se destacan los tratamientos T9, T10, T15 (*C. citratus* a 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$  y 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , y *O. quixos* 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , de concentración) que se comportan estadísticamente igual a los controles T23, T24 y T25 (*T. vulgaris* a concentraciones que van de 100 a 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) con un crecimiento del micelio de 4.00 mm de diámetro. Por otro lado se encuentran los tratamientos T1 y T2 (*C. limon* 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$  y 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) que mostraron mayor crecimiento del micelio (70.00 mm y 68.33 mm de diámetro, respectivamente), mostrando un comportamiento similar al control negativo T26 y T27 (PDA y PDA+DMSO).

**Cuadro 16.**

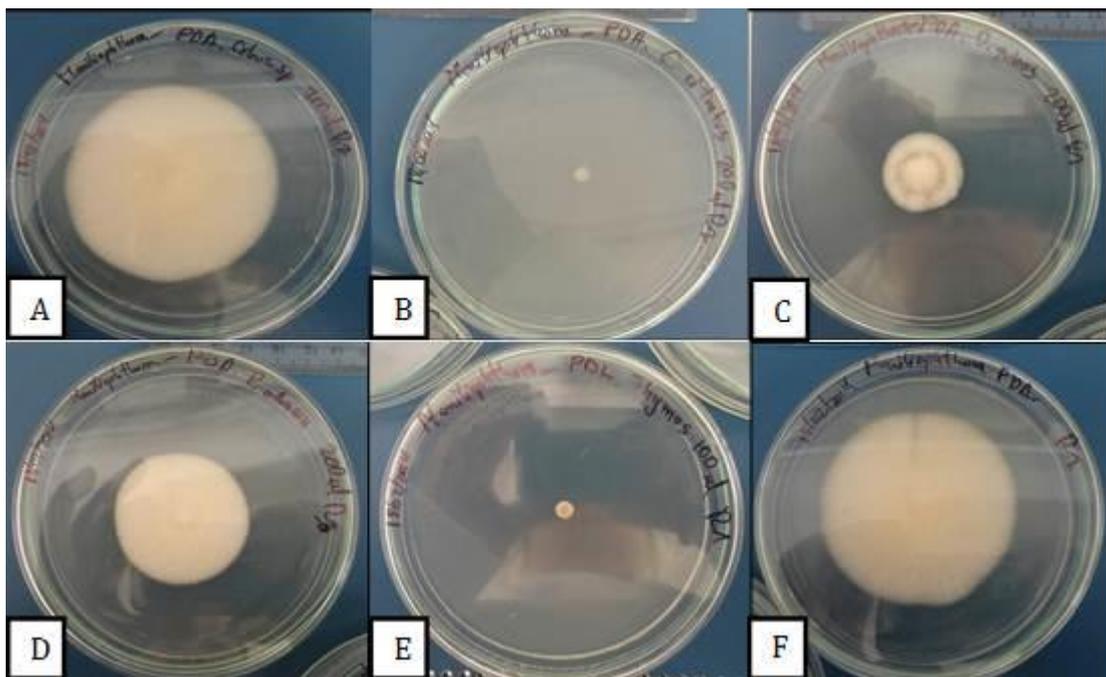
**Rangos de significación (Tukey 5%) para la actividad antifúngica de los aceites esenciales (A) a cinco concentraciones (C) frente *Moniliophthora roreri*.**

Tratamiento	Descripción	Media (mm)	Grupo Significancia al 5%
T26 (testigo-1)	PDA	72.000	a
T1 (A1C1)	<i>C. limon</i> x 10 µL/mL	70.000	ab
T27 (testigo-2)	PDA+DMSO	70.000	ab
T2 (A1C2)	<i>C. limon</i> x 50 µL/mL	68.333	abc
T6 (A2C1)	<i>C. citratus</i> x 10 µL/mL	68.000	bc
T3 (A1C3)	<i>C. limon</i> x 100 µL/mL	67.333	bc
T4 (A1C4)	<i>C. limon</i> x 200 µL/mL	65.667	cd
T7 (A2C2)	<i>C. citratus</i> x 50 µL/mL	65.667	cd
T16 (A4C1)	<i>P. aduncum</i> x 10 µL/mL	65.333	cd
T5 (A1C5)	<i>C. limon</i> x 500 µL/mL	63.333	de
T21 (testigo+1)	<i>T. vulgaris</i> x 10 µL/mL	61.333	ef
T11 (A3C1)	<i>O. quixos</i> x 10 µL/mL	60.333	ef
T8 (A2C3)	<i>C. citratus</i> x 100 µL/mL	58.333	f
T12 (A3C2)	<i>O. quixos</i> x 50 µL/mL	57.667	f
T18 (A4C3)	<i>P. aduncum</i> x 100 µL/mL	50.333	g
T13 (A3C3)	<i>O. quixos</i> x 100 µL/mL	46.667	g
T19 (A4C4)	<i>P. aduncum</i> x 200 µL/mL	41.667	h
T22 (testigo+2)	<i>T. vulgaris</i> x 50 µL/mL	35.667	i
T17 (A4C2)	<i>P. aduncum</i> x 50 µL/mL	35.000	i
T14 (A3C4)	<i>O. quixos</i> x 200 µL/mL	33.333	i
T20 (A4C5)	<i>P. aduncum</i> x 500 µL/mL	25.000	j
T23 (testigo+3)	<i>T. vulgaris</i> x 100 µL/mL	4.6667	k
T9 (A2C4)	<i>C. citratus</i> x 200 µL/mL	4.0000	k
T10 (A2C5)	<i>C. citratus</i> x 500 µL/mL	4.0000	k
T15 (A3C5)	<i>O. quixos</i> x 500 µL/mL	4.0000	k
T24 (testigo+4)	<i>T. vulgaris</i> x 200 µL/mL	4.0000	k
T25 (testigo+5)	<i>T. vulgaris</i> x 500 µL/mL	4.0000	k

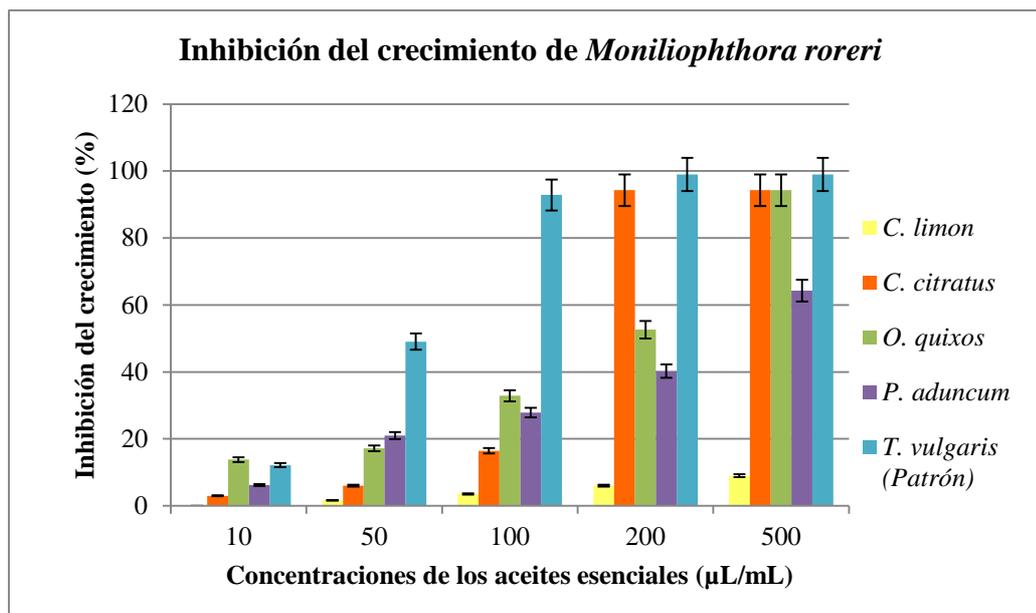
#### 4.3.2.4.1 Inhibición del Crecimiento de *Moniliophthora roreri*

En la Figura 60 se observa la capacidad inhibitoria que tienen los aceites esenciales a una concentración de 200 µL/mL sobre el crecimiento del micelio de *M. roreri* durante diez días de incubación. Los aceites esenciales que han tenido mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *M. roreri* han sido *C. citratus* y *O. quixos*. A concentraciones de 200 µL/mL y 500 µL/mL *C. citratus* alcanza el 95% de inhibición, haciendo registrar un valor muy cerca a lo del patrón y correspondiente al

100%. El aceite esencial de *O. quixos* mostró un efecto inhibitorio dosis-dependiente ya que a los 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$  inhibe por un 50% el crecimiento del hongo y a los 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$  llega hasta el 95%. El aceite esencial de *P. aduncum* registró un menor efecto inhibitorio comparado con los dos aceites mencionados, aunque mostró una inhibición del 65% a la concentración de 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . El crecimiento del micelio de *M. roreri* bajo la acción de los aceites esenciales una vez transcurridos diez días de incubación, se muestra en la Figura 61.



**Figura 60.** Crecimiento del micelio de *Moniliophthora roreri* a 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de concentración del aceite esencial de (A) *C. limon*, (B) *C. citratus*, (C) *O. quixos*, (D) *P. aduncum* (E) *T. vulgaris*-Control (+) y, (F) PDA-Control (-), a los diez días de incubación



**Figura 61.** Porcentaje de inhibición del crecimiento de *Moniliophthora roreri* por acción de los aceites esenciales

#### 4.3.2.5 Inhibición del Crecimiento de *Phytophthora sp.* por Efecto de los Aceites Esenciales

Los resultados del análisis de varianza de los promedios del diámetro de crecimiento de *Phytophthora sp.* bajo el efecto cuatro aceites (*C. limon*, *C. citratus*, *O. quixos* y *P. aduncum*) a diferentes concentraciones, a niveles de significación del 5% y 1%, con 26 y 54 grados de libertad se observan en el Cuadro 17. La probabilidad de 0.0000 y el valor de F calculada de 1731.70 (superior al valor de F de la tabla) indican que existen diferencias altamente significativas entre los promedios de los tratamientos; el coeficiente de variación alcanza un valor de 2.13% aceptable en las condiciones del ensayo, por lo tanto los datos son confiables.

**Cuadro 17.**

**Análisis de varianza (ADEVA) de la actividad antifúngica de los aceites esenciales sobre el crecimiento de *Phytophthora sp.*, a los 10 días de incubación.**

Fuentes de variación	Grados libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	F tabular. Significación	
					0.05	0.01
Tratamientos	26	71149.4	2736.52	1731.70	1.853	1.615**
Error	54	85.3	1.58			
Total	80	71234.8				
Probabilidad	0.0000					
CV %	2.13					
Media	59.123					

\*significativo

\*\*Altamente significativo

<sup>ns</sup> no significativo**Cuadro 18.**

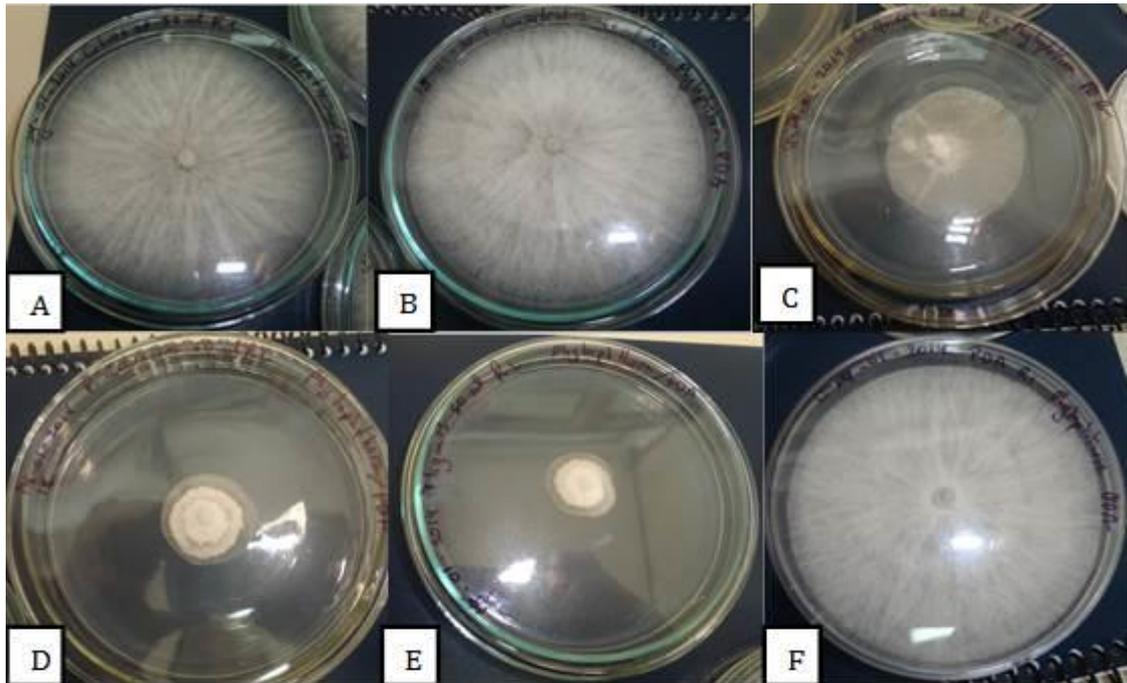
**Rangos de significación (Tukey 5%) para la actividad antifúngica de los aceites esenciales (A) a cinco concentraciones (C) frente *Phytophthora sp.***

Tratamiento	Descripción	Media (mm)	Grupo Significancia al 5%
T1 (A1C1)	<i>C. limon</i> x 10 µL/mL	85.000	a
T2 (A1C2)	<i>C. limon</i> x 50 µL/mL	85.000	a
T3 (A1C3)	<i>C. limon</i> x 100 µL/mL	85.000	a
T4 (A1C4)	<i>C. limon</i> x 200 µL/mL	85.000	a
T6 (A2C1)	<i>C. citratus</i> x 10 µL/mL	85.000	a
T7 (A2C2)	<i>C. citratus</i> x 50 µL/mL	85.000	a
T8 (A2C3)	<i>C. citratus</i> x 100 µL/mL	85.000	a
T9 (A2C4)	<i>C. citratus</i> x 200 µL/mL	85.000	a
T16 (A4C1)	<i>P. aduncum</i> x 10 µL/mL	85.000	a
T21 (testigo+1)	<i>T. vulgaris</i> x 10 µL/mL	85.000	a
T26 (testigo-1)	PDA	85.000	a
T27 (testigo-2)	PDA+DMSO	85.000	a
T5 (A1C5)	<i>C. limon</i> x 500 µL/mL	79.667	b
T10 (A2C5)	<i>C. citratus</i> x 500 µL/mL	77.000	b
T11 (A3C1)	<i>O. quixos</i> x 10 µL/mL	70.667	c
T12 (A3C2)	<i>O. quixos</i> x 50 µL/mL	55.000	d
T13 (A3C3)	<i>O. quixos</i> x 100 µL/mL	52.000	de
T17 (A4C2)	<i>P. aduncum</i> x 50 µL/mL	50.000	e
T18 (A4C3)	<i>P. aduncum</i> x 100 µL/mL	48.333	e
T14 (A3C4)	<i>O. quixos</i> x 200 µL/mL	31.000	f
T19 (A4C4)	<i>P. aduncum</i> x 200 µL/mL	28.000	fg
T22 (testigo+2)	<i>T. vulgaris</i> x 50 µL/mL	26.333	g
T23 (testigo+3)	<i>T. vulgaris</i> x 100 µL/mL	24.333	gh
T20 (A4C5)	<i>P. aduncum</i> x 500 µL/mL	22.000	h
T15 (A3C5)	<i>O. quixos</i> x 500 µL/mL	4.0000	i
T24 (testigo+4)	<i>T. vulgaris</i> x 200 µL/mL	4.0000	i
T25 (testigo+5)	<i>T. vulgaris</i> x 500 µL/mL	4.0000	i

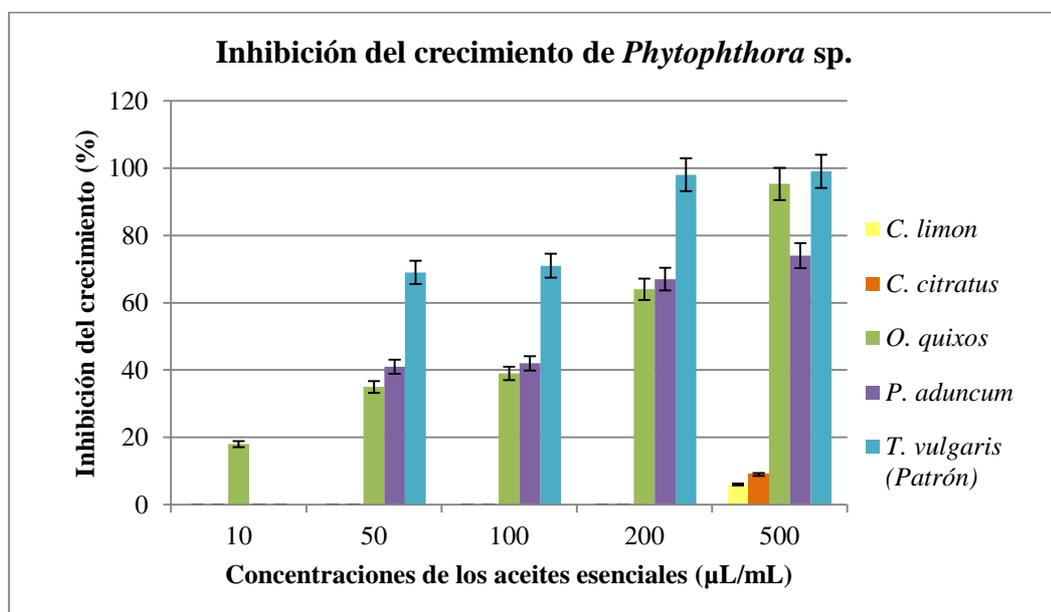
En el Cuadro 18 se observa la prueba de significancia de Tukey al 5%, de los promedios de los tratamientos, en donde se destaca con el menor crecimiento del micelio (4 mm de diámetro) el tratamiento T15 (*O. quixos* 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), siendo estadísticamente iguales sus promedios con los controles T24 y T25 (*T. vulgaris* a 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$  y 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de concentración). Los tratamientos en los que el micelio creció sin dificultad (85 mm) fueron T1 a T4 (*C. limon* 10 a 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), T6 a T9 (*C. citratus* 10 a 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) y T16 (*P. aduncum* 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), que son estadísticamente iguales a los controles negativos T26 y T27 (PDA y PDA+DMSO) y a *T. vulgaris* a la menor concentración (10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ).

#### **4.3.2.5.1 Inhibición del Crecimiento de *Phytophthora* sp.**

En la Figura 62 se muestra la acción que ejercieron los aceites esenciales (50  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) sobre el control del crecimiento de *Phytophthora* sp a los diez días de sembrada la cepa. Los aceites que mostraron mayor capacidad de inhibición fueron *O. quixos* y *P. aduncum*. En ambos casos se evidenció un efecto de inhibición directamente proporcional a la dosis de aceite esencial. El mayor porcentaje de inhibición se registró a la concentración de 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , a la cual *O. quixos* controló el crecimiento del micelio en un 95%, y *P. aduncum* en un 75%. Sin embargo ya a la concentración de 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$  se observó una inhibición del 62% y 64% respectivamente. En lo que respecta a *C. limon* y *C. citratus* no ejercieron efecto sobre el crecimiento de *Phytophthora* sp. (Figura 63).



**Figura 62.** Crecimiento del micelio de *Phytophthora* sp a 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de concentración del aceite esencial de (A) *C. limon*, (B) *C. citratus*, (C) *O. quixos*, (D) *P. aduncum* (E) *T. vulgaris*-Control (+) y, (F) PDA-Control (-) a los diez días de incubación



**Figura 63.** Porcentaje de inhibición del crecimiento de *Phytophthora* sp. por acción de los aceites esenciales

#### 4.3.2.6 Inhibición del Crecimiento de *Rhizopus stolonifer* por Efecto de los Aceites Esenciales

En el Cuadro 19 se muestra los resultados del análisis de varianza de los promedios del diámetro de crecimiento de *Rhizopus stolonifer* bajo el efecto cuatro aceites (*C. limon*, *C. citratus*, *O. quixos* y *P. aduncum*) a diferentes concentraciones, a niveles de significación del 1% y 5%, con 19 y 40 grados de libertad. El valor de F calculada alcanza un valor de 6806.51 (superior a la F tabular) y la probabilidad de 0.0000, indicando que existen diferencias altamente significativas entre los promedios de los tratamientos. El coeficiente de variación fue menos del 3.1%, que es justificado para condiciones de laboratorio, dando gran confiabilidad de los datos, ya que estos fueron obtenidos en ambiente controlado, dando así validez al trabajo.

#### Cuadro 19.

**Análisis de varianza (ADEVA) de la actividad antifúngica de los aceites esenciales sobre el crecimiento de *Rhizopus stolonifer* a los 10 días de incubación.**

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	F tabular. Significación	
					0.05	0.01
Tratamientos	26	85798.2	3299.93	8909.82	1.853	1.615**
Error	54	20.0	0.37			
Total	80	85818.2				
Probabilidad	0.0000					
CV %	3.1					
Media	63.148					

\*significativo

\*\*Altamente significativo

<sup>ns</sup> no significativo

El cuadro 20 muestra la prueba de significancia de Tukey al 5%, los tratamientos que tuvieron el menor crecimiento (4 mm) del micelio del fitopatógeno fueron T10 y T15 (*C. citratus* y *O. quixos* a la concentración de 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), siendo estadísticamente similares sus promedios a los controles T24 y T25 (*T. vulgaris* a 200 y 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ); los tratamientos que tuvieron el mayor promedio de crecimiento (85 mm) del micelio fueron T1, T2, T3 y T4 (10, 50, 100 y 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de *C. limon*); T6, T7 y T8 (10, 50 y 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de *C. citratus*); T11, T12 y T13 (10, 50 y 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de *O. quixos*); y T16 y T17 (10 y 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de *P. aduncum*); que resultaron

estadísticamente similares a los controles positivos T21 y T22 (*T. vulgaris* 10 y 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) y a los controles negativo T26 y T27

#### Cuadro 20.

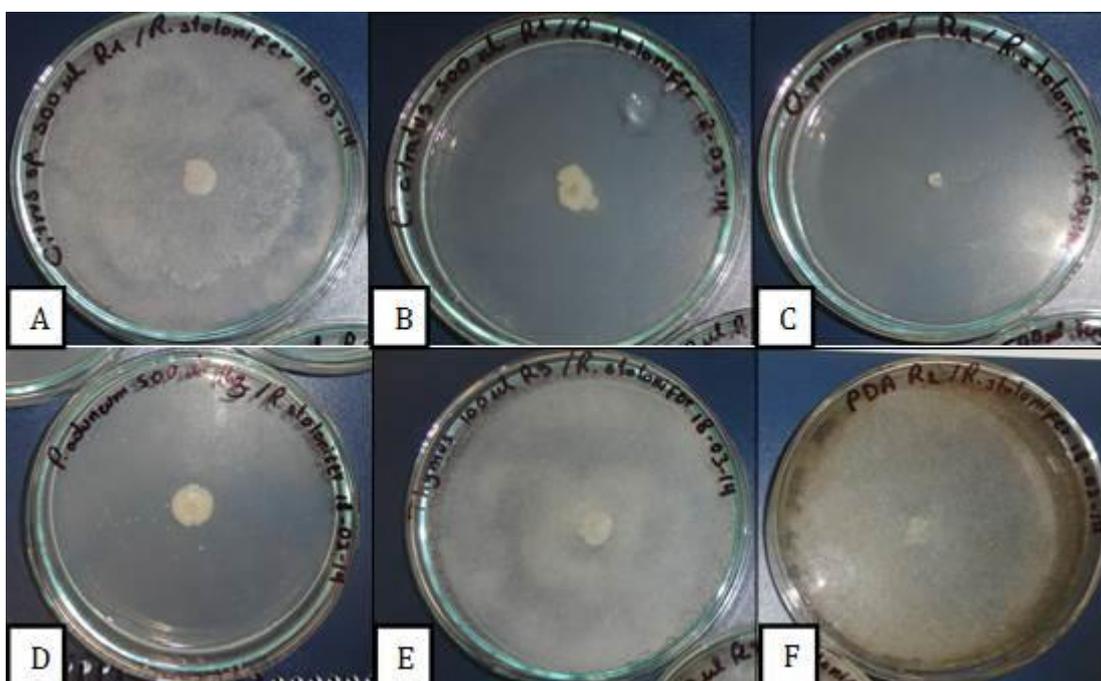
**Rangos de significación (Tukey 5%) para la actividad antifúngica de los aceites esenciales (A) a cinco concentraciones (C) frente *Rhizopus stolonifer*.**

Tratamiento	Descripción	Media (mm)	Grupo Significancia al 5%
T1 (A1C1)	<i>C. limon</i> x 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$	85.000	a
T2 (A1C2)	<i>C. limon</i> x 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$	85.000	a
T3 (A1C3)	<i>C. limon</i> x 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$	85.000	a
T4 (A1C4)	<i>C. limon</i> x 200 $\mu\text{L}/\text{mL}$	85.000	a
T6 (A2C1)	<i>C. citratus</i> x 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$	85.000	a
T7 (A2C2)	<i>C. citratus</i> x 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$	85.000	a
T8 (A2C3)	<i>C. citratus</i> x 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$	85.000	a
T11 (A3C1)	<i>O. quixos</i> x 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$	85.000	a
T12 (A3C2)	<i>O. quixos</i> x 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$	85.000	a
T13 (A3C3)	<i>O. quixos</i> x 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$	85.000	a
T16 (A4C1)	<i>P. aduncum</i> x 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$	85.000	a
T17 (A4C2)	<i>P. aduncum</i> x 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$	85.000	a
T21 (testigo+1)	<i>T. vulgaris</i> x 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$	85.000	a
T22 (testigo+2)	<i>T. vulgaris</i> x 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$	85.000	a
T26 (testigo-1)	PDA	85.000	a
T27 (testigo-2)	PDA+DMSO	85.000	a
T9 (A2C4)	<i>C. citratus</i> x 200 $\mu\text{L}/\text{mL}$	82.000	b
T23 (testigo+3)	<i>T. vulgaris</i> x 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$	80.000	c
T5 (A1C5)	<i>C. limon</i> x 500 $\mu\text{L}/\text{mL}$	63.000	d
T18 (A4C3)	<i>P. aduncum</i> x 100	50.000	e
T14 (A3C4)	<i>O. quixos</i> x 200 $\mu\text{L}/\text{mL}$	23.000	f
T19 (A4C4)	<i>P. aduncum</i> x 200	16.000	g
T20 (A4C5)	<i>P. aduncum</i> x 500	15.000	g
T10 (A2C5)	<i>C. citratus</i> x 500 $\mu\text{L}/\text{mL}$	4.0000	h
T15 (A3C5)	<i>O. quixos</i> x 500 $\mu\text{L}/\text{mL}$	4.0000	h
T24 (testigo+4)	<i>T. vulgaris</i> x 200 $\mu\text{L}/\text{mL}$	4.0000	h
T25 (testigo+5)	<i>T. vulgaris</i> x 500 $\mu\text{L}/\text{mL}$	4.0000	H

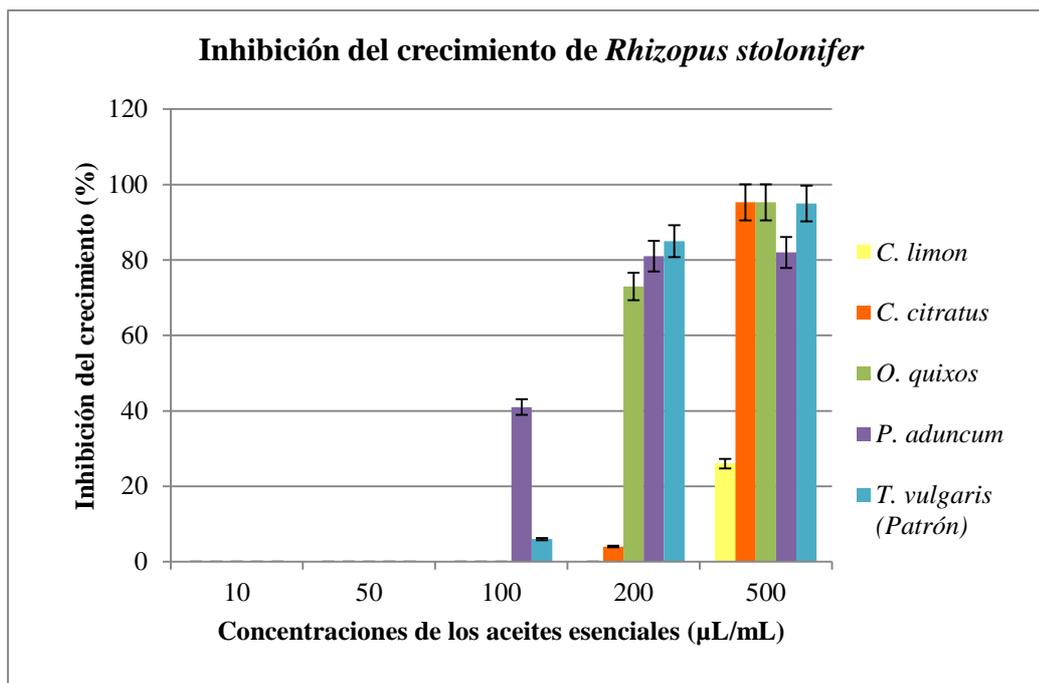
#### 4.3.2.6.1 Inhibición del Crecimiento de *Rhizopus stolonifer*

La acción que ejercieron los aceites esenciales a una concentración de 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$  sobre el crecimiento del micelio de *R. stolonifer* a los diez días de sembrada la cepa se muestran en la Figura 64. Los aceites esenciales que mostraron mayor capacidad inhibitoria frente a *R. stolonifer* fueron *P. aduncum*, *O. quixos* y *C.*

*citratus*. A las concentraciones de 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$  y 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$  ninguno de los aceites estudiados ejercieron efecto alguno sobre el crecimiento del patógeno, registrándose valores iguales al patrón con 0% de inhibición; a la concentración de 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$  *P. aduncum* registró el máximo porcentaje de inhibición (40%), superior al patrón (7%). A la concentración de 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$  *O. quixos* y *P. aduncum* registraron los valores más altos de inhibición, hicieron registrar valores de 74% y 81% respectivamente, frente al patrón que registró 85% de inhibición. De la misma manera a la máxima concentración (500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) *C. citratus* y *O. quixos* mostraron un comportamiento similar al patrón alcanzado los máximos valores de inhibición (95%), a esta misma concentración *P. aduncum* registró valores también considerables del 80% de inhibición (Figura 65).



**Figura 64.** Crecimiento del micelio de *Rhizopus stolonifer* a 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de concentración del aceite esencial de (A) *C. limon*, (B) *C. citratus*, (C) *O. quixos*, (D) *P. aduncum* (E) *T. vulgaris*-Control (+) y, (F) PDA-Control (-) a los diez días de incubación



**Figura 65.** Porcentaje de inhibición del crecimiento de *Rhizopus stolonifer* por acción de los aceites esenciales

## CAPÍTULO V DISCUSIÓN

### 5.1 Rendimiento de Destilación y caracterización de Aceites Esenciales de plantas Amazónicas

#### 5.1.1 *Citrus limon*

El rendimiento de destilación de *Citrus limon* fue del 0.44% (cuadro 1), lo cual resultó superior al valor registrado en otras investigaciones, como aquella que alcanzó el 0.31% utilizando hojas de limon provenientes de Valencia (España) (Calle, 2010), y al 0.29% de rendimiento del aceite extraído de hojas colectadas en Piauí (Brasil) (Campelo, 2013); sin embargo, el rendimiento del aceite esencial de cortezas de *C. limon* alcanzó el 1.12% (Mushtaq, 2006), valor que supera la investigación objeto de estudio, esto se debió seguramente al polimorfismo fitoquímico entre los órganos de la planta (Baser y Buchbauer, 2010). La composición química del aceite esencial de *C. limon* ha resultado similar en cuanto el predominio de monoterpenos, a aquella obtenida de plantas cosechadas en Valencia y en Piauí. Sin embargo, los aceites difieren por cuantificación y tipología de compuestos; de hecho el aceite objeto de estudio se caracterizó por el predominio de limonene (28.14%), citronellal (20.27%), linalool (15.95%) y sabinene (13.97%); mientras que la investigación citada por Calle (2010) se caracterizó por geraniol (25.96%), limoneno (25.48%), neral (18.71%) y  $\beta$ -pineno (9.45%); sin embargo, Campelo (2013) en su estudio reporta el predominio del limoneno (52.77%) y acetato de geraniol (9.92 %); finalmente, la composición química del aceite analizado por Mushtaq (2006), incluyó al limoneno (53.61%),  $\gamma$ -terpineno (18.57%),  $\beta$ -pineno (11.80%) y myrcene (11.16%) como los componentes principales del aceite de limón.

De acuerdo a los resultados, el limoneno está presente en los cuatro aceites como uno de los principales constituyentes de la esencia. El geraniol resultó ausente en el aceite objeto de estudio. El rendimiento y composición química de los aceites esenciales presentan variaciones que pueden asociarse a factores intrínsecos como la

edad de la planta, el quimiotipo, el estado de desarrollo de la planta al momento de la cosecha, y extrínsecos como el manejo del cultivo, las condiciones geográficas y ambientales del sitio de cultivo (Baser & Buchbauer, 2010; Vargas y Bottia, 2008).

### **5.1.2 *Cymbopogon citratus***

El rendimiento de destilación del aceite de *Cymbopogon citratus* fue del 0.58%, lo cual resultó superior al valor registrado por Sacchetti *et al.* (2005) con materiales provenientes de Morona Santiago (Ecuador), y correspondiente al 0.33%; mientras que Matasyoh *et al.* (2011), alcanzaron un rendimiento de 0.8%, en hojas provenientes de Kakamega (Kenia). La composición química del aceite esencial de *C. citratus* ha resultado similar en cuanto al predominio de monoterpenos, a aquella obtenida con plantas cosechadas en Morona Santiago (Ecuador) y en Kakamega (Kenia). Sin embargo los tres aceites difieren por cuantificación y tipología de compuestos; de hecho el aceite objeto de estudio se caracterizó por el predominio de geraniol (32.23%), neral (21.09%) y geranial (21.02%), mientras en la investigación citada por Sacchetti *et al.* (2005), se encontró abundantemente geranial (41%), neral (32%), geraniol (3.35%) y myrcene (15.48%); y en el análisis realizado por Matasyoh (2011) hubo un predominio de monoterpenos geranial (39.53%), neral (33.31%) y myrcene (11.41%). Este último resultó ausente en el aceite objeto de estudio. Las diferencias de rendimiento y composición química en los aceites esenciales son comunes, debido probablemente a la variación entre quimiotipos y a la alta dependencia de las condiciones climáticas, especialmente la duración del día, la irradiación, la temperatura y el abastecimiento de agua (Baser y Buchbauer, 2010).

### **5.1.3 *Ocotea quixos***

El rendimiento de destilación de *Ocotea quixos* fue del 0.16%, lo cual resultó inferior al valor registrado en otras investigaciones utilizando hojas provenientes de Macas (Ecuador), como el mencionado por Noriega y Dacarro (2008) en el que obtuvieron el 0.3% (30 mL/10000 g), el de Sacchetti *et al.* (2006) con el 1.6 mL/kg y el de Bruni *et al.* (2004) que alcanzó el 1.9% de rendimiento, este último utilizando cálices de ishpink. La composición química del aceite esencial de hojas de *O. quixos*

ha resultado similar en cuanto el predominio de sesquiterpenos y fenilpropanoides, a aquellas obtenidas con plantas cosechadas en Macas (Ecuador). Sin embargo los aceites difieren por cuantificación y tipología de compuestos; de hecho el aceite objeto de estudio se caracterizó por el predominio de trans-cinnamaldehyde (16.62%), trans-methyl isoeugenol (11.94%),  $\beta$ -caryophyllene (10.59%) y  $\alpha$ -pinene (9.39%), mientras en las investigación citadas se registró una composición caracterizada por presencia de cariofileno (19.03%), humuleno (14.32%) y eremofileno (11.41%) (Noriega y Dacarro, 2008);  $\beta$ -caryophyllene (15.1%) y cinnamyl acetate (11.4%) (Sacchetti *et al.*, 2006); caryophyllene (10.06%) y trans cinnamyl acetato (10.02%) (Rolli *et al.*, 2014); trans-cinnamaldehyde (27.91%) y methyl cinnamate (21.65%) (Bruni *et al.*, 2004). Algunos compuestos químicos, aunque presentes en ambos aceites esenciales como es el caso del cariofileno, se observan en porcentajes diferentes, mientras los compuestos eremofileno y cinnamyl acetate se encuentran ausentes en el aceite objeto de estudio. La composición química de los aceites de *C. citratus* es variable en cantidad y tipología, dependiendo no solo de las condiciones del lugar de procedencia, sino también de factores internos de la planta (Baser & Buchbauer, 2010). Las diferencias de rendimiento y composición química en los aceites esenciales son comunes, ya que depende de muchos factores, entre ellos: polimorfismo fitoquímico, diferencias en la composición entre las glándulas de aceite, edad de la planta, época de cosecha (factores intrínsecos); otros, condiciones de suelo y clima del lugar de crecimiento de la planta (factores extrínsecos) (Baser & Buchbauer, 2010; Vargas y Bottia, 2008).

#### ***5.1.4 Piper aduncum***

En la presente investigación el aceite esencial de *Piper aduncum* alcanzó un rendimiento del 0.12%, lo cual resultó superior al valor reportado por Albarracín y Gallo (2003), en el que obtuvieron un rendimiento de 0.01% de aceite destilado de hojas e inflorescencias frescas de *P. aduncum* proveniente de Colombia. Por el contrario Pino *et al.* (2011) obtuvieron un rendimiento del aceite esencial de *P. aduncum* del 0.56% de hojas provenientes de La Habana (Cuba). La composición química del aceite esencial de *P. aduncum* ha resultado similar en cuanto a la presencia de monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos, aunque difieren en

tipología y cuantificación a aquella obtenida con plantas cosechadas en Colombia y Cuba. El aceite objeto de estudio se caracterizó por el predominio de dillapiol (45.92%), *E*-ocimene (10.39%) y piperitone (8.47%), estos resultados coinciden con los datos reportados en la literatura en donde el dilapiol es el componente mayoritario del aceite esencial de la especie proveniente de Brasil, Colombia, Costa Rica, Cuba, Ecuador, Fiji, Panamá y Papua Nueva Guinea (Pino *et al.*, 2011); sin embargo, se ha descrito los resultados de la composición química del aceite de *P. aduncum* del proveniente de diferentes partes del mundo, que evidencian diferentes grados de polimorfismo fitoquímico, por ejemplo, en el de Bolivia el componente principal es el 1.8-cineol (40%), el quimiotipo de Panamá tuvo un alto contenido de caryophyllene y aromadendrene; las muestras de América del sur, Asia Oriental y Oceanía tuvieron abundante contenido de en dillapiol (30-90%); en los ejemplares de Brasil los principales componentes fueron el linalol o nerolidol, pero carecían de fenilpropanos; el aceite de *P. aduncum* de originario del oriente Ecuatoriano demostró que el componente mayoritario es el dilapiol en su composición (Guerrini *et al.*, 2009). Mientras Albarracín y Gallo (2003) mencionan que el apiol es componente predominante (54.4 y 70.66%), seguido del germacreno-d (17.3%), cariofileno (9.47%) y piperitona (24.61%); Pino *et al.* (2011) reportó como los principales componentes alcanfor (36.0%), piperitona (32.1%) e isoborneol (9.8%). Las diferencias de rendimiento y composición química en los aceites esenciales son comunes, la presencia de esencias en la planta es altamente dependiente de las condiciones climáticas, especialmente de la duración del día, la irradiación, la temperatura y el abastecimiento de agua (Baser y Buchbauer, 2010); mientras que la composición depende principalmente de factores intrínsecos (edad y estado de desarrollo), el lugar de crecimiento de la planta y la época de cosecha influyen en estos parámetros (Vargas y Bottia, 2008). La composición del aceite esencial también varía de acuerdo al órgano o parte de la planta que se extraiga, y a las diferencias en la composición entre las glándulas de aceite (Baser y Buchbauer, 2010).

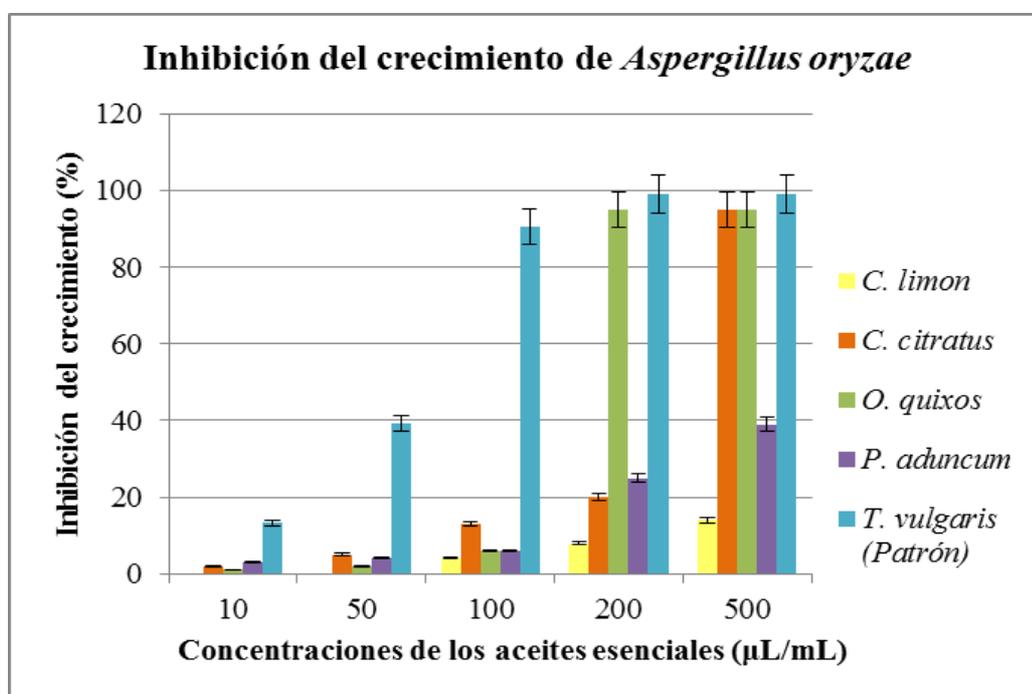
## 5.2 Estudio *in vitro* de la Actividad Antifúngica de Aceites Esenciales

El análisis de varianza para el promedio del diámetro de crecimiento del micelio de los fitopatógenos *Aspergillus oryzae*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium solani*, *Moniliophthora roreri*, *Phytophthora* sp. y *Rhizopus stolonifer* (Cuadro 9 a 14), muestra que existen diferencias significativas entre los tratamientos (probabilidad 0.000 y el valor de F calculada superior a la F tabular). La prueba de Tukey (Cuadro 15 a 20) confirmó la significancia de los tratamientos, debido a la acción dosis-dependiente de los aceites esenciales, como también debido a la composición química de los aceites, teniendo en cuenta que provienen de especies (*Citrus limon*, *Cymbopogon citratus*, *Ocotea quixos* y *Piper aduncum*) de familias taxonómicamente diferentes; tal como se detalla para las Figuras 30 a 71 (Capítulo resultados y discusión).

### 5.2.1 Efecto de los aceites esenciales sobre el crecimiento de *Aspergillus oryzae*

Los hongos fitopatógenos del género *Aspergillus* representan una fuerte amenaza para el cultivo agrícola de las plantas y para la conservación post-cosecha de los productos agroalimenticios, ya que varias especies son productoras de micotoxinas cancerígenas para el Hombre y los animales. La investigación científica está direccionada a la búsqueda de principios activos de origen natural que puedan controlar en campo y en post-cosecha dichos patógenos. A este respecto, los aceites esenciales son estudiados para evaluar su potencial como agentes de control biológico de hongos fitopatógenos. Varias especies del género *Aspergillus* han resultado muy sensibles a la acción de varios aceites esenciales como aquel de *Allium tuberosum* (ajo chino) y *Cinnamomum cassia* (MIC=0.25  $\mu$ L/mL para *A. oryzae*) (Kocevski *et al.*, 2013), así como al aceite de *Cymbopogon citratus* que de acuerdo a los datos de Sonker *et al.* (2014), ha logrado inhibir el 100% el crecimiento micelial de *A. flavus*, *A. niger* y *A. ochraceus* a la concentración de 0.33  $\mu$ L/mL. Matasyoh *et al.* (2011), comprobaron el efecto antifúngico de *C. citratus* sobre cinco cepas del género *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*, *A. niger* y *A. fumigatus*), a una concentración mínima inhibitoria que varió entre 15 y 118 mg/mL sobre el crecimiento del micelio. En la presente investigación se alcanzó

un porcentaje de inhibición parecido (95%) pero con una concentración de aceite esencial de *C. citratus* (500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) y *O. quixos* (200  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) mucho superior. Por su parte el patrón *T. vulgaris* mantuvo su actividad antifúngica superior sobre el fitopatógeno ejerciendo efecto similar (95% de inhibición) pero a una concentración menor (100  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ). La efectividad en el control del crecimiento del micelio se debió probablemente a la presencia de sus componentes mayoritarios geraniol, neral y geranial en *C. citratus*; y trans-cinnamaldehyde, trans-methyl isoeugenol,  $\beta$ -caryophyllene y  $\alpha$ -pinene presentes en *O. quixos*; mientras que el timol fue el responsable del efecto antifúngico del tomillo tal como mencionan varios autores (Solís, 2011; Pérez, 2011; Ochoa *et al.*, 2012) (Figura 66).



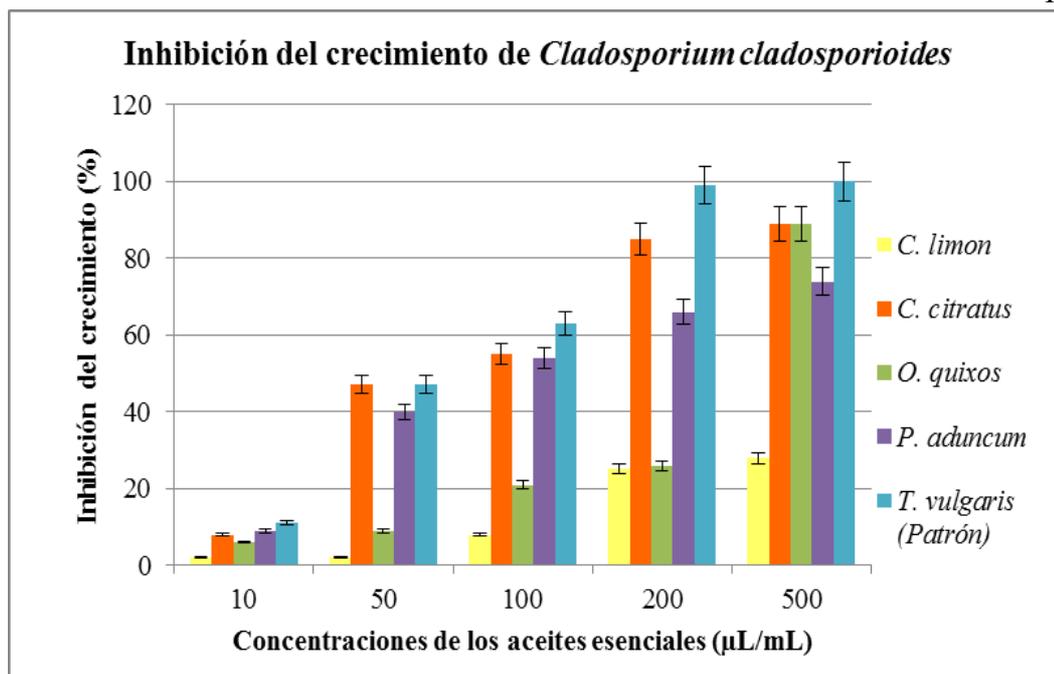
**Figura 66.** Porcentaje de inhibición del crecimiento de *Aspergillus oryzae* por acción de los aceites esenciales

### 5.2.2 Efecto de los aceites esenciales sobre el crecimiento del hongo *Cladosporium* cladosporioides

Los hongos fitopatógenos del género *Cladosporium* son especies cosmopolitas que dependiendo del medio en que se encuentran pueden ser endófitas, patógenas o saprófitas. Representan una fuerte amenaza para el sector agrícola, pues atacan a cultivos y frutos en postcosecha, disminuyendo el rendimiento y la calidad del

producto. Se han empleado diferentes técnicas de biocontrol para evitar la proliferación del patógeno. La utilización de fuentes naturales de origen vegetal como los aceites esenciales en pre y postcosecha ha tomado mayor interés. La presente investigación está encaminada a la búsqueda del tipo de aceite, compuestos químicos y dosis de aceites esenciales capaces de inhibir el crecimiento del micelio del fitopatógeno. Varias especies del género *Cladosporium* han resultado muy sensibles a la acción de varios aceites esenciales que contienen carvacrol y timol, entre ellas la especie *Lippia graveolens* (Pérez, 2011) y *Thymus vulgaris* que, a una concentración de 0.125  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , inhibe el crecimiento de *C. cladosporioides* (Ochoa *et al.*, 2012).

El aceite de *C. citratus* de acuerdo a los datos registrados por Sonker *et al.* (2014), a una concentración de 0.29  $\mu\text{L}/\text{mL}$  muestra elevadas propiedades de inhibir el crecimiento del micelio, hasta el 100%. En la presente investigación se alcanzó un porcentaje de inhibición parecido (90%) pero con una concentración de aceite esencial de *C. citratus* y *O. quixos* mucho superior (500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ); aunque a una concentración de 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de *C. citratus*, se alcanzó un control considerable (85%) sobre el fitopatógeno. *C. limon* mostró una leve actividad fungitóxicas; a la mayor concentración utilizada (500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) tuvo un efecto inhibitorio muy por debajo al registrado por el patrón. La actividad antifúngica de *T. vulgaris* (patrón) se mostró superior a los aceites evaluados, registrando valores del 100% de inhibición de crecimiento del fitopatógeno a partir de 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de concentración. La actividad antifúngica de los aceites esenciales podría deberse a la presencia de algunos compuestos mayoritarios (Escobar *et al.*, 2013), en este caso geraniol, neral y geranial presentes en *C. citratus*; y trans-cinnamaldehyde, trans-methyl isoeugenol,  $\beta$ -caryophyllene y  $\alpha$ -pinene presentes en *O. quixos*; las dos especies presentaron un comportamiento similar al patrón (*T. vulgaris* 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ). Mientras que la actividad antifúngica de *T. vulgaris* se atribuye a la presencia de timol como componentes mayoritario (Escobar *et al.*, 2013), que posiblemente junto al *p*-cimeno tuvieron una actividad sinérgica proporcionándole el potente efecto al tomillo (Figura 67).

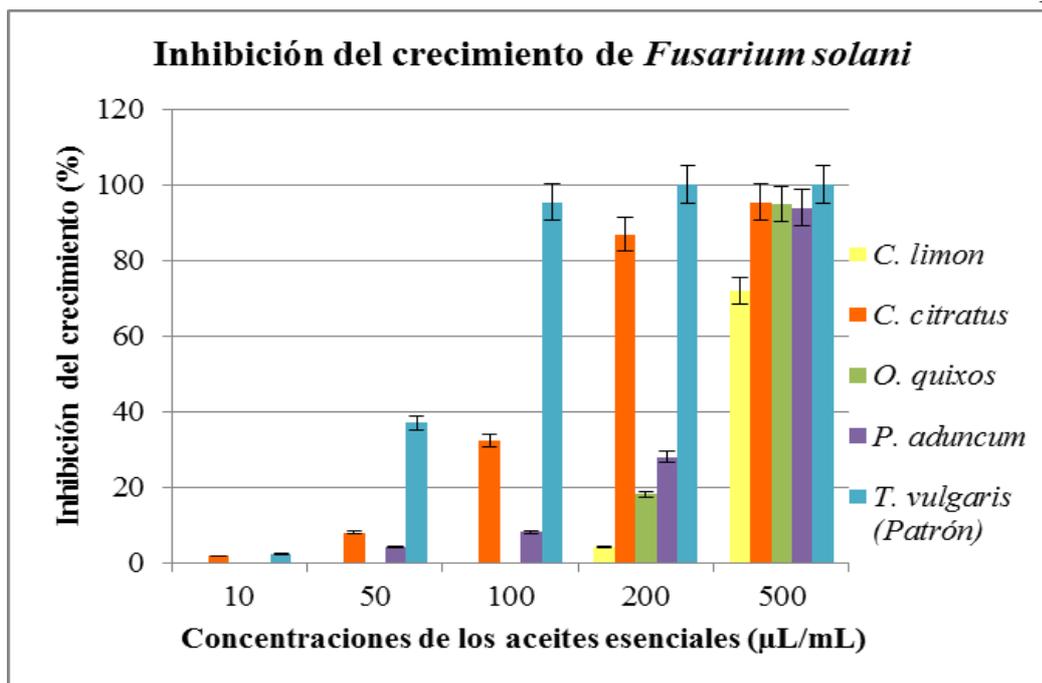


**Figura 67.** Porcentaje de inhibición del crecimiento de *Cladosporium cladosporioides* por acción de los aceites esenciales

### 5.2.3 Efecto de los aceites esenciales sobre el crecimiento de *Fusarium solani*

Las especies del género *Fusarium* son saprófitas o patógenas de diversos cultivos hortícolas, frutales y ornamentales. Provoca el marchitamiento y muerte de la planta, y con ello la disminución de la productividad y pérdidas considerables en el campo agrícola. La lucha para el control del patógeno incluye la utilización de diversos mecanismos, y ha obligado a buscar nuevas alternativas de control que causen el menor impacto al ecosistema. Los aceites esenciales son estudiados para identificar fuentes de control del fitopatógeno. Varios estudios revelan la efectividad de los aceites esenciales de *Thymus vulgaris*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Syzygium aromaticum*, *Teloxys ambrosioides*, *Piper auritum*, *Mentha piperita*, *Eucalyptus globulus*, entre otras, en el control de cepas de *Fusarium*. A este respecto se reportan los resultados obtenidos por Barrera y García (2008) acerca de la aplicación del aceite esencial de *Thymus vulgaris* que, a la mínima concentración (200 µL/ml), inhibió completamente el crecimiento del micelio de *Fusarium* sp. aislado de papaya. Mientras la aplicación de aceites de *C. zeylanicum*, *S. aromaticum* y *T. ambrosioides* mostraron una actividad dosis-dependiente (Duarte *et al.*, 2013).

Los aceites esenciales de *M. piperita*, *Eucalyptus globulus*, *Telexys ambrosioides*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Syzygium aromaticum* y *T. vulgaris* a dosis de 10000 y 7500 ppm inhibieron el crecimiento del micelio de *F. moniliforme* (Barrera y García, 2008); las especies de género *Fusarium* han presentado sensibilidad a la acción del aceite esencial de *Artemisia sieberi* (MIC=750  $\mu\text{L/L}$  para *F. moniliforme* y *F. solani*) (Farzaneh *et al.*, 2006) y de *Cymbopogon parkeri* Stapf (MIC=43.63  $\mu\text{L/L}$  para *F. oxysporum*) (Hajieghrari *et al.*, 2006). Según los datos reportados por Tchoumboungang *et al.* (2013), los aceites esenciales de *Caucalis melanantha*, *Geniosporum rotundifolium*, *Piperomia pellucida*, *P. vulcanica* y *Pycnostachys meyeri* mostraron una actividad antifúngica sobre *F. moniliforme* que va del 46.2 al 97.3% sobre el crecimiento del micelio. De acuerdo a los datos registrados por Sonker *et al.* (2014), *C. citratus* a una concentración de 0.29  $\mu\text{L/mL}$  logró inhibir el crecimiento de *F. oxysporum* en un 100%. En la presente investigación se alcanzó un porcentaje de alrededor del 95% de inhibición del crecimiento de *F. solani* pero con la concentración de aceite esencial de *C. citratus*, *O. quixos* y *P. aduncum* máxima (500  $\mu\text{L/mL}$ ). A esta misma concentración *C. limon* alcanza una acción inhibitoria considerable (70%) sobre el fitopatógeno. *C. citratus* a la concentración de (200  $\mu\text{L/mL}$ ) supera en efectividad a los tres aceites en estudio, de hecho alcanza valores el 85% de inhibición. Todos los aceites evaluados registran una menor efectividad que el patrón (*T. vulgaris*) que mantiene su actividad antifúngica (90%) sobre el fitopatógeno a partir de 100  $\mu\text{L/mL}$ ; a menores concentraciones se pierde la actividad antimicrobiana del aceite. El control del crecimiento del fitopatógeno seguramente se debió a la acción de los componentes principales en cada uno de los aceites, tal como sucedió con el tomillo que la presencia mayoritaria de timol lo convirtió en un potente agente antifúngico (Solís, 2011); la piperitona también posee actividad antimicrobiana, antialimentaria e insecticida (Pino, *et al.*, 2011) (Figura 68).

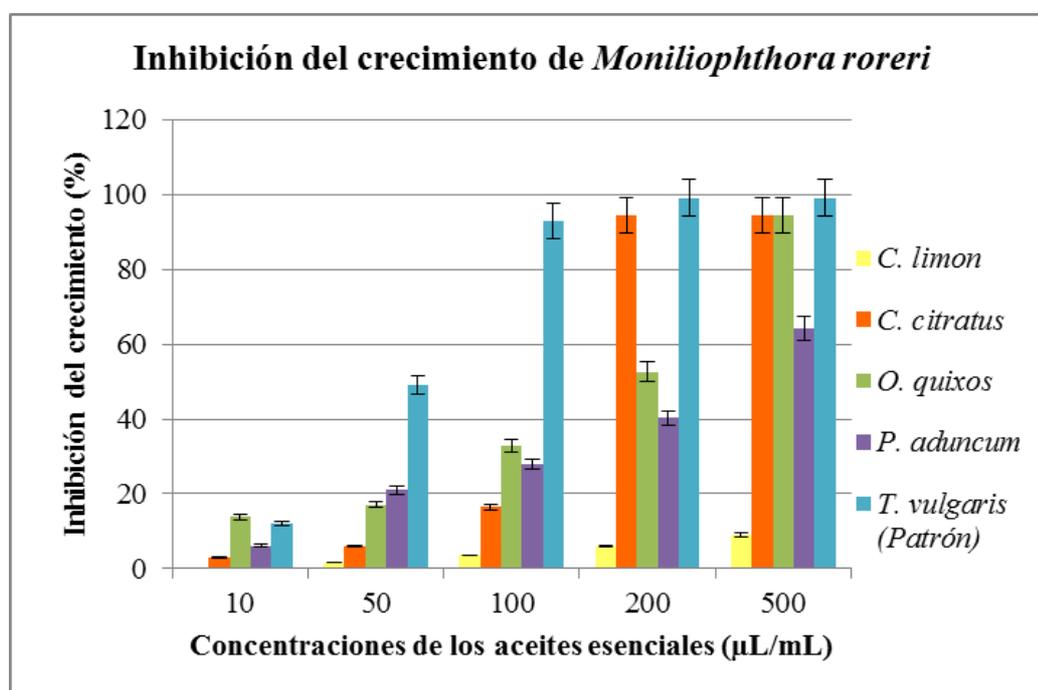


**Figura 68.** Porcentaje de inhibición del crecimiento de *Fusarium solani* por acción de los aceites esenciales

#### 5.2.4 Efecto de los aceites esenciales sobre el crecimiento de *Moniliophthora roreri*

Los hongos fitopatógenos del género *Moniliophthora* representan una fuerte amenaza para las especies del género *Theobroma*, especialmente de *T. cacao*. *Moniliophthora roreri* agente causal de la enfermedad conocida como moniliasis, es el responsable de las mayores pérdidas de producción del cacao en el Ecuador, ataca al cultivo especialmente a los frutos (deformación, podredumbre y momificación) en cualquier estado de desarrollo, causando el abandono de plantaciones, bajas considerables de producción, aumento de los costos de producción, baja rentabilidad, empobrecimiento del agricultor y deterioro ambiental. La investigación científica está direccionada a la búsqueda de alternativas de origen vegetal eficientes en el manejo del patógeno. A ese respecto los aceites esenciales son estudiados para evaluar su potencial como agentes de control biológico de hongos fitopatógenos. Las especies del género *Moniliophthora* han resultado muy sensibles a la acción de varios aceites esenciales. *Lippia origanoides*, *L. citriodora* y *L. alba*, que según Lozada *et al.* (2012) han logrado inhibir el 100% de la germinación de esporas y

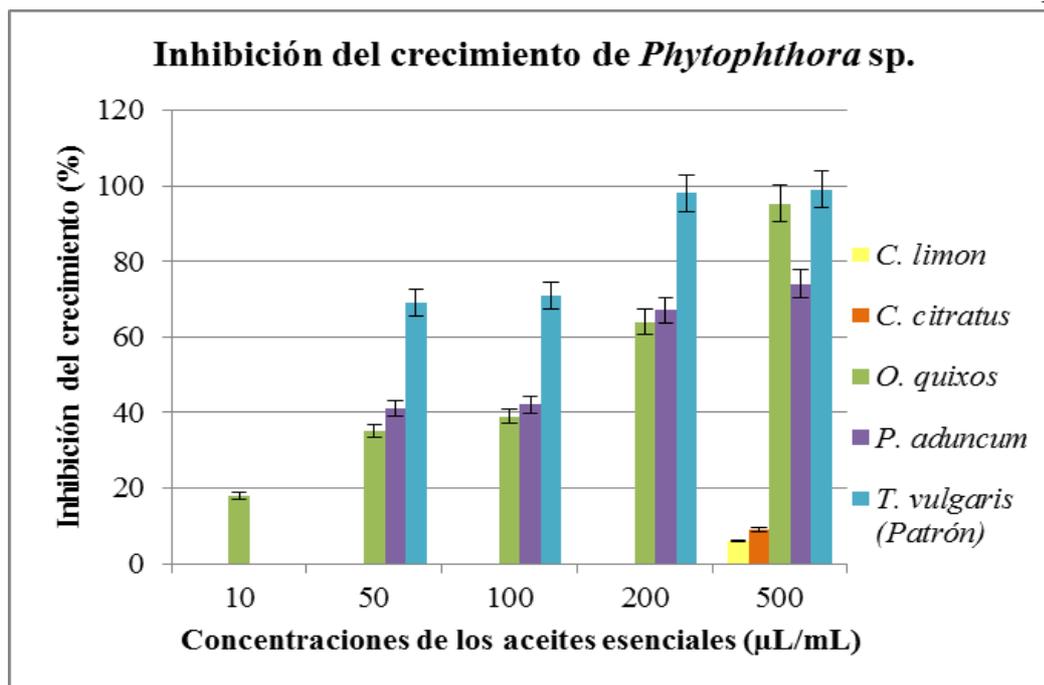
crecimiento del micelio de *M. roreri*, si se utiliza de 800 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ ; siendo *L. origanoides* la más activa, pues inhibió el 100% del crecimiento micelial y el 90% de la germinación de esporas de *M. roreri*. En la presente investigación, los aceites esenciales que tuvieron un comportamiento similar al patrón *T. vulgaris* (100  $\mu\text{L/mL}$ ), pero a diferentes concentraciones fueron *C. citratus* (200  $\mu\text{L/mL}$ ) y *O. quixos* (500  $\mu\text{L/mL}$ ), mostrando un porcentaje de inhibición parecido (95%). Estos resultados demuestran posiblemente que la efectividad de los aceites esenciales se debió a la acción de sus componentes principales (Escobar *et al.*, 2013), como el geraniol, neral y geraniol en el caso de *C. citratus*; y, trans-cinnamaldehyde, trans-methyl isoeugenol,  $\beta$ -caryophyllene y  $\alpha$ -pinene en *O. quixos*. Probablemente los componentes pueden actuar solos o en acción sinérgica entre ellos, proporcionando así mayor efecto antifúngico al aceite (Arroyo *et al.*, 2014). La actividad antifúngica del tomillo ha sido reportada por varios autores quienes concluyen que su efectividad se debe a la presencia de timol y carvacrol (Solís, 2011; Pérez, 2011; Ochoa *et al.*, 2012) (Figura 69).



**Figura 69.** Porcentaje de inhibición del crecimiento de *Moniliophthora roreri* por acción de los aceites esenciales

### 5.2.5 Efecto de los aceites esenciales sobre el crecimiento de *Phytophthora* sp.

Los hongos fitopatógenos del género *Phytophthora* representan una fuerte amenaza para diversos cultivos de interés comercial. Por tener la capacidad de vivir en el suelo y en material en descomposición, fácilmente pueden invadir las raíces de las plantas causando la muerte de las mismas, y con ello la pérdida de la cosecha en cantidad y calidad del producto. La investigación científica está direccionada a la búsqueda de principios activos de origen vegetal que puedan controlar en campo dichos patógenos. A ese respecto los aceites esenciales son estudiados para evaluar su potencial como agentes de control biológico de hongos fitopatógenos. Varias especies del género *Phytophthora* han resultado muy sensible a la acción de los aceites esenciales como aquel de orégano (*Lippia berlandeieri*) que mostró efectividad antifúngica sobre *P. capsici* (Castro *et al.*, 2005), así como al aceite de *Thymus vulgaris* y *Menta piperita* que de acuerdo a los datos de Carrillo *et al.* (2010) ha logrado reducir el micelio de *P. infestans* en un 92.1 y 89.9%, respectivamente a la concentración de 4  $\mu\text{L}/\text{UE}$ . De los aceites esenciales objeto de estudio solamente *Ocotea quixos* alcanzó un porcentaje de inhibición parecido (95%) al reportado por Carrillo *et al.* (2010), pero con una concentración mucho superior (500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ); con respecto al patrón la efectividad de *O. quixos* fue menor (65%), puesto que *T. vulgaris* ejerció actividad antifúngica (99%) sobre el fitopatógeno a partir de 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Los aceites esenciales de *P. aduncum*, *C. citratus* y *C. limon* a todas las concentraciones estudiadas mostraron un efecto inhibitorio inferior al patrón. La efectividad en el control de *Phytophthora* sp, se debió seguramente a la presencia de componentes antiproliferativos presentes en los aceites como pueden ser trans-cinnamaldehyde,  $\beta$ -caryophyllene, trans-methyl isoeugenol y el  $\alpha$ -pinene en *O. quixos*, así como la acción sinérgica entre ellos (Arroyo *et al.*, 2014); la acción antifúngica del tomillo fue posible gracias a la presencia de timol y carvacrol en su aceite (Solís, 2011) (Figura 70).

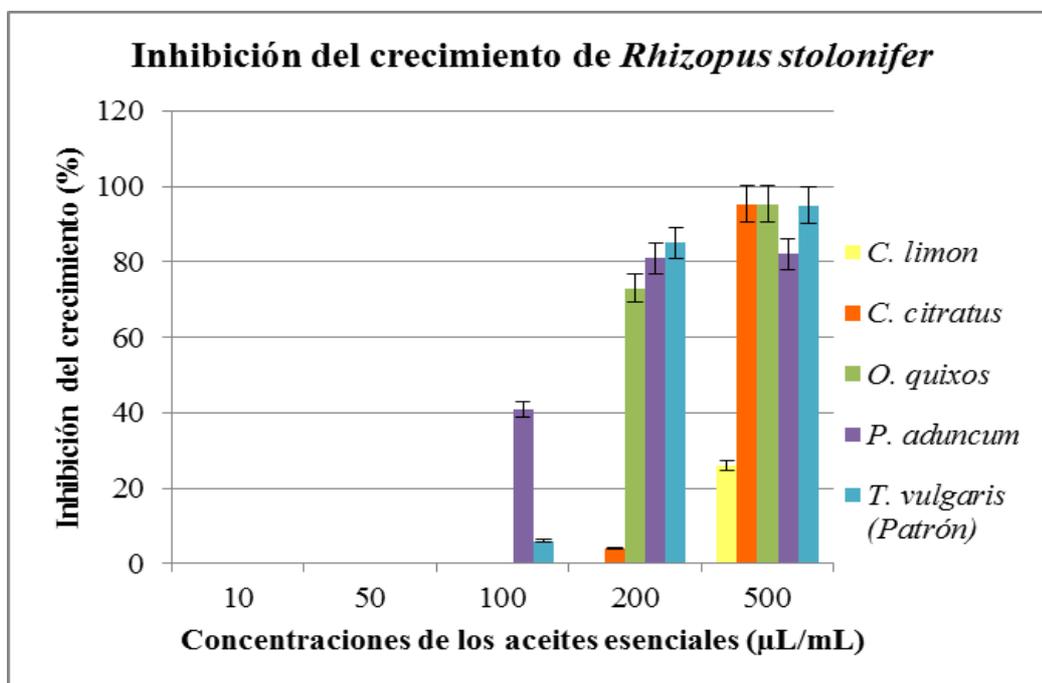


**Figura 70.** Porcentaje de inhibición del crecimiento de *Phytophthora* sp. por acción de los aceites esenciales

### 5.2.6 Efecto de los aceites esenciales sobre el crecimiento de *Rhizopus stolonifer*

Los hongos del género *Rhizopus* son especies de distribución cosmopolita que atacan a frutos y vegetales, de ellos *R. stolonifer* causante de la pudrición blanda de los frutos es considerado uno de los fitopatógenos más destructivos, causa grandes pérdidas en la producción puesto que ataca los productos próximos a la cosecha y en postcosecha. La búsqueda de alternativas orgánicas de origen vegetal, con propiedades antifúngicas y fungistáticas para el control de este patógeno, es importante para garantizar el volumen de producción. Por ello, el presente estudio consistió en evaluar la actividad biológica que los aceites esenciales ejercen sobre el crecimiento de *R. stolonifer*. Algunos estudios ponen de manifiesto la acción de los aceites sobre el fitopatógeno, como aquel de orégano (*Lippia berlandieri*) que mostró efectividad antifúngica sobre *Rhizopus* sp. (Castro *et al.*, 2005). Según los datos registrados por Sonker *et al.* (2014) *C. citratus* a una concentración de 0.29 µL/mL mostró un alto efecto fungitóxico sobre el fitopatógeno, al inhibir completamente el crecimiento del micelio. Znini *et al.* (2013) ha evaluado la actividad fungicida y el efecto fungistático del aceite esencial de *Pulicaria*

*mauritanica*, a 80 mL/disco y 40 mL/disco, respectivamente. Tchoumboungang *et al.* (2013) menciona que los aceites esenciales de *Caucalis melanantha*, *Geniosporum rotundifolium*, *Piperomia pellucida*, *P. vulcanica* y *Pycnostachys meyeri* mostraron una actividad antifúngica que va del 46.2 al 97.3% de inhibición del crecimiento micelial. De acuerdo a los resultados publicados por Alvarado (2011), los aceites esenciales de canela (*C. zeylanicum*), clavo (*S. aromaticum*) y tomillo (*T. vulgaris*) inhibieron el crecimiento del micelio de *R. stolonifer* en un 100%, cuando se evaluaron a concentraciones de 0.3 mg/mL. En la presente investigación se alcanzó un porcentaje de inhibición parecido (95%) pero con una concentración de aceite esencial de *C. citratus* y *O. quixos* de 500  $\mu$ L/mL, comportamiento similar al patrón *T. vulgaris* a la misma concentración; mientras que el aceite de *P. aduncum* controla el crecimiento de la colonia fitopatógena en un 80% a los 200 y 500  $\mu$ L/mL. La acción fungitóxica de altas concentraciones de los aceites esenciales contra *R. stolonifer*, hace suponer que a menores concentraciones disminuye la actividad antimicrobiana, tanto que a 10 y 50  $\mu$ L/mL ningún aceite esencial surge efecto sobre el fitopatógeno. Al igual que en los casos anteriores la efectividad del aceite se atribuye a la acción de sus componentes mayoritarios, solos o con efecto sinérgico (Arroyo *et al.*, 2014) (Figura 71).



**Figura 71.** Porcentaje de inhibición del crecimiento de *Rhizopus stolonifer* por acción de los aceites esenciales

## CAPÍTULO VI CONCLUSIONES

- Las plantas amazónicas estudiadas e identificadas taxonómicamente en la presente tesis fueron *Citrus limon*, *Cymbopogon citratus*, *Ocotea quixos* y *Piper aduncum*.
- Los aceites esenciales de *Citrus limon* y *Cymbopogon citratus* mostraron un mayor rendimiento de destilación de su aceite esencial, alcanzando valores de 0.44% y 0.58% respectivamente, frente a *Ocotea quixos* (0.16%) y *Piper aduncum* (0.12%).
- La composición química de los aceites esenciales estudiados resultó similar a los datos reportados por otros investigadores, como consta en el apartado de discusión, en lo referente a la presencia de monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos, como constituyentes mayoritarios en cada una de las esencias, sin embargo difieren en cuantificación y tipología. Los componentes predominantes en cada uno de los aceites estudiados fueron limonene, citronellal, linalool y sabinene en *C. limon*; geraniol, neral y geranial en *C. citratus*; trans-cinnamaldehyde, trans-methyl isoeugenol,  $\beta$ -caryophyllene y  $\alpha$ -pinene en *O. quixos*; dillapiol, *E*-ocimene y piperitone presentes en *P. aduncum*. Las características organolépticas de los aceites variaron dependiendo de la especie, el color de ligeramente amarillento a Amarillo, el olor de leve a fuerte característico de la planta, y de sabor levemente astringente hasta fuertemente astringente.
- Los aceites esenciales de *C. limon*, *C. citratus*, *O. quixos* y *P. aduncum* mostraron una actividad antifúngica dosis-dependiente, sobre los fitopatógenos *Aspergillus oryzae*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium solani*, *Moniliophthora roreri*, *Phytophthora* sp. y *Rhizopus stolonifer*; sin embargo, el poder inhibitorio de los aceites esenciales sobre el crecimiento del micelio varió en porcentaje, dependiendo de la especie vegetal productora de aceite y del patógeno a controlar. Por otra parte los hongos han mostrado diferentes grados de sensibilidad a la

acción de los aceites, que va desde la total inhibición hasta alcanzar el máximo diámetro de crecimiento del micelio (85 mm).

- Inhibición del crecimiento de los fitopatógenos por parte de los aceites esenciales:
  - *A. oryzae* resultó sensible a la acción de los aceites esenciales de *C. citratus* y *O. quixos* a la concentración de 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$  y 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$  respectivamente, con un porcentaje de inhibición en el crecimiento del micelio del 95%, las especies *C. limon* y *P. aduncun* no mostraron un porcentaje de inhibición significativo en el control del patógeno.
  - *C. cladosporiodes* mostró su sensibilidad a la acción del aceite esencial de *C. citratus* (200  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) y *O. quixos* (500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) con valores de 85% y 90% de inhibición en el crecimiento del micelio, respectivamente.
  - *F. solani* mostró diferentes grados de sensibilidad a la actividad de los aceites esenciales, de hecho *O. quixos* y *P. aduncum* a la concentración de 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , controlaron su crecimiento en un 95%, *C. citratus* (200  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) el 85%, y *C. limon* (500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) inhibió en un 70% el crecimiento del micelio.
  - *M. roreri* resultó sensible a la actividad de *C. citratus* (200  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) y *O. quixos* (500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), que ejercieron un efecto inhibitorio del 95% sobre el crecimiento de la colonia fitopatógena; efecto similar ejerció *T. vulgaris* pero a la concentración de 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de su aceite. Los aceites de *C. limon* y *P. aduncum* no ejercieron un control significativo sobre la colonia fitopatógena.
  - *Phytophthora* sp. mostró diferentes grados de sensibilidad frente a la acción de los aceites esenciales, así, a la concentración de 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$  *O. quixos* y *P. aduncum* inhibieron su crecimiento en un 95% y 75%, respectivamente; mientras que los aceites esenciales de *C. citratus* y *C. limon* a todas las concentraciones estudiadas mostraron un efecto inhibitorio inferior al patrón.
  - El hongo *R. stolonifer* mostró sensibilidad (95% de inhibición) a la acción de *C. citratus* y *O. quixos* a la concentración de 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , evidenciando un efecto similar a *T. vulgaris* a la misma concentración, mientras que *C. citratus* controló el crecimiento de la colonia fitopatógena en un 80% a la concentración de 200 y 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . *C. limon* no mostró un efecto significativo

sobre el hongo, de hecho a la máxima concentración (500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) ejerció una inhibición del 25% sobre el crecimiento del micelio.

## **CAPÍTULO VII**

### **RECOMENDACIONES**

- Los resultados obtenidos en la presente investigación se deben tomar como referencia preliminar para la realización de estudios *in vivo*.
- La amplia diversidad tanto en especies vegetales con presencia de aceites esenciales, así como la constante variabilidad y resistencia de los fitopatógenos, abren la posibilidad de emprender nuevos ensayos a nivel de laboratorio, con la finalidad de direccionar y encontrar fuentes de control eficientes y amigables con el medio ambiente, que garanticen la práctica de una agricultura sostenible y sustentable para pequeños, medianos y grandes productores.

## CAPÍTULO VIII

### BLIBIOGRAFÍA

- Abreu, O., Rodríguez, A., Morgado, M. & Cao, L. (2012). Farmacognosia, farmacobotánica, farmacogeografía y farmacoetimología del platanillo de Cuba (*Piper aduncum* subespecie *ossanum*). *Revista Cubana*, 17 (12), 181-193.
- Agrios, G. (2012). *Fitopatología*. (2ª ed.). México: LIMUSA.
- Albarracín, G. & Gallo, S. (2003). *Comparación de dos métodos de extracción de aceite esencial utilizando Piper aduncum (cordoncillo) procedente de la zona cafetera*. Tesis de ingeniero agrónomo. Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
- Alvarado, A., Barrera, L., Hernández, A. & Velázquez, M. (2011). Actividad antifúngica del quitosano y aceites esenciales sobre *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill., agente causal de la pudrición blanda del tomate. *Revista Colombiana Biotecnología*, 8 (2), 127-134.
- Alvarado, J., Brito, J., Sarmiento, J. & Cazar-Ramírez, A. (2012). *Evaluación de la actividad antifúngica de los aceites esenciales de Cymbopogon citratus y Eucaliptus globulus ante Colletotrichum sp.* Azuay: Especialización en Biotecnología Vegetal, Universidad del Azuay, Ecuador.
- Alzate, N., López, V., Marrín, H. & Murillo, A. (2009). Evaluación preliminar de la actividad fungicida de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus tereticornis*, Myrtaceae) y cáscara de naranja (*Citrus sinensis*, Rutaceae) sobre algunos hongos filamentosos. *Revista Tumbaga*, 4 (1), 59-71.
- Alzate, D., Mier, G., Afanador, L., Durango, D. & García, C. (2009). Evaluación de la fitotoxicidad y la actividad antifúngica contra *Colletotrichum acutatum* de los aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*), limoncillo (*Cymbopogon citratus*), y sus componentes mayoritarios. *Revista de la Facultad de Química y Farmacéutica de la Universidad e Antioquia*, 16 (1), 116-125.

- Andrade, M. (2005). Proyecto de prefactibilidad para exportar limon Tahití al mercado de los Estados Unidos de Norteamérica 2005-2015. Tesis de grado. Universidad Tecnológica Equinoccial, Ecuador.
- Arias, E. & Piñeros, P. (2008). *Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de páramos de guasca y cruz verde*. Tesis de microbiología industrial. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Arroyo, J., Herrera, O., Chávez, R., Ventura, E., Buendía, J., Pacheco, J. & Palomino, R. (2014). Efecto antitumoral in vitro del aceite esencial de *Piper aduncum* L. (matico) y su toxicidad oral en ratones. *Anuales de la Facultad de Medicina*, 75 (1), 8-13.
- Ávila, T. Barra, S. Coca, N. Guevara, N. Céspedes, J. & Guzmán, L. (2007). Multiplicación y conservación in vitro de pasifloras andinas. Avances de investigación en recursos genéticos en el Cono Sur II/PROCISUR, IICA. Montevideo, Uruguay.
- Ayala, M. (2008). *Manejo integrado de moniliasis (Moniliophthora roreri) en el cultivo de cacao (Theobroma cacao L.)*. Tesis de ingeniero agropecuario. Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador.
- Ayala, M. & Navia, D. (2010). Manejo integrado de moniliasis (*Moniliophthora roreri*) en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) mediante el uso de fungicidas, combinado con labores culturales. *Facultad de Ingeniería mecánica y Ciencias de la Producción de la Escuela Superior Politécnica del Litoral*, Guayaquil, Ecuador.
- Barnett, H; Hunter, B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi*. (4<sup>a</sup> ed.). The American Phytopathological Society (APS PRESS), St. Paul, Minnesota.
- Barrera, L. & García, L. (2008). Actividad antifúngica y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium* sp. aislado de papaya (*Carica papaya*). *Revista UDO Agrícola*, 8 (1), 33-41.
- Baser, K. & Buchbauer, G. (2010). *Handbook of essential oils, Science, technology and applications*. United of America: CRC Press.
- Becerra, J., Bittner, M., Hernández, V., Brintrup, C., Becerra, J. & Silva, M., (2010). Actividad de aceites esenciales de canelo, queule, bailahuén y culén frente a hongos fitopatógenos. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*, 9 (3), 212-215.

- Bejarano, R., & Centeno, S. (2009). Extracto de *Citrus limon* para el control de aflatoxinas y hongos aflatoxigénicos en alimentos concentrados para pollos de engorde producidos en Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29 (1), 57-61.
- Berdonces, J. (2010). *Gran Enciclopedia de las plantas medicinales*. Océano. Tomo I y II. España: TIKAL.
- Bernal, H., García, H. & Quevedo, G. (2011). *Pautas para el conocimiento, conservación y uso sostenible de las plantas medicinales nativas en Colombia*. Bogotá, DC: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.
- Borja, F. (2007). *Actividad antibacteriana y concentración mínima inhibitoria del aceite esencial del Cymbopogon citratus frente al Streptococcus mutans in vitro*. Tesis de odontólogo. Universidad Nacional Federico Villarreal, Lima, Perú.
- Borrego, S. (2012). *Cladosporium*: género fúngico que deteriora soportes documentales y afecta a la salud del hombre. *Boletín del Archivo Nacional de la República d Cuba*, 20, 104-118.
- Braun, U. & Konstanze, K. (2007). Taxonomic revision of the genus *Cladosporium* s. lat. Descriptions of new species, a new combination and further new data. *Journal Schlechtendalia*, 24 (1), 61-76.
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia, Fitoquímica y Plantas Medicinales*. (2ª ed.). Zaragoza, España: Acribia.
- Calle, M. (2010). *Control de la germinación in vitro de Araujia sericifera con aceites esenciales de Laurus nobilis, Myrtus communis, Citrus sinensis y Citrus limon*. Tesis de máster en producción vegetal y ecosistemas agroforestales. Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Campelo, L., Feitosa, C., Sougsa, G. & Freitas, R. (2013). Constituyentes químicos e estudos toxicológicos do óleo essencial extraído das folhas de *Citrus limon* Burn (Rutaceae). *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 15 (1), 708-716.
- Carrillo, Y., Gómez, M., Cotes, J. & Ñustes, C. (2010). Efecto de algunos aceites esenciales sobre el crecimiento de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary en condiciones de laboratorio. *Revista Agronomía Colombiana*, 28 (2), 245-253.

- Castro, R., Sánchez, J. & Soto, R. (2005). Determinación de la efectividad fungicida del aceite de orégano contra hongos que atacan granos de maíz almacenados. *Revista Chapingo de la Universidad Autónoma de Chapingo*. 4 (2), 103-108.
- Castro, D., Díaz, J., Serna, R., Martínez, M., Urrea, P., Muñoz, K. & Osorio, E., (2013). *Cultivo y producción de plantas aromáticas y medicinales*. (2ª ed.). Colombia: Universidad Católica del Oriente.
- Cazorla, M. (2013). *Actividad fotoprotectora de la maracuyá (Passiflora edulis), Ishpingo (Ocotea quixos) en fototipos III (Homo sapiens) para la elaboración de un protector solar*. Tesis de bioquímico farmacéutico. Escuela Superior Politécnica del Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- Centro Internacional de mejoramiento del maíz y trigo CIMMYT. (2004). *Enfermedades del maíz, Una guía para su identificación en el campo*. (4ª ed.). México, D.F: CIMMYT. Disponible en: <http://repository.cimmyt.org/xmlui/bitstream/handle/10883/715/25905.pdf?sequence=1>
- Cerón, C. (2006). Plantas Medicinales de los Andes ecuatorianos. *Botánica Económica de los Andes Centrales*, 1 (1), 285-293.
- Chávez, I. (2011). *Biocontrol de Rhizopus stolonifer en frutos de zarzamora (Rubus fruticosus) empleando microbiota nativa, asociada a la planta*. Tesis de maestro en ciencias en producción agrícola sustentable. Instituto Politécnico Nacional, Michoacán, México.
- Chávez, J. & Arboleda, M. (2011). *Propagación in vitro del limon (Citrus limon) con el empleo de dos reguladores de crecimiento*. Tesis de ingeniero agrónomo. Universidad de Técnica de Cotopaxi, Ecuador.
- Criollo, F., Vásquez, P., Vallejo, Y. & Cazar-Ramírez, A. (2012). *Evaluación de mezclas de aceites esenciales de romero (Rosmarinus officinalis), arrayán (Myrceugenella apiculata) y menta (Mentha pulegium), como biocontroladores de Fusarium sp.* Azuay: Especialización en biotecnología vegetal, Universidad del Azuay.
- Crous, P., Braun, U. Schubert, K. & Groenewald, J. (2007). Delimiting *Cladosporium* from morphologically similar genera. *Studies in Mycology*, 5 (1), 33–56.

- Daste, J. (2010). *Plan de factibilidad para la exportación de limón Tahití a Dinamarca para los años 2009 – 2019*. Tesis de ingeniero en comercio exterior e integración. Universidad tecnológica Equinoccial, Quito, Ecuador.
- Del Pozo, A. (2006). *Actividad antibacteriana y antimicótica del aceite esencial de hierba luisa (Cymbopogon citratus (DC) Stapf)*. Tesis de ingeniero en biotecnología. Escuela Superior Politécnica del Ejercito, Pichincha, Ecuador.
- Delgado, G., Castaño, J. & Villegas, B. (2012). Edad óptima de susceptibilidad del maracuyá a la roña (*Cladosporium cladosporioides* ATK.). *Revista Agronomica*, 20 (2), 45 – 52.
- Duarte, Y., Pino, O. & Martínez, B. (2013). Efecto de cuatro aceites esenciales sobre *Fusarium* spp. *Revista Protección Vegetal*, 28 (3), 232-235.
- Escobar, A., Molina, C. & Zapata, G. (2013). Comparación de la actividad acaricida entre *Ocimum basilicum*, *Coriandrum sativum* y *Thymus vulgaris* contra el ácaro *Tetranychus urticae*. Tesis de ingeniero en biotecnología de los recursos naturales. Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador.
- Estrada, M. (2007). *Plan de desarrollo turístico para el cantón Pastaza*. Tesis de ingeniero en administración turística. Universidad Técnica Equinoccial, Quito, Ecuador.
- Farzaneh, M., Ahmadzadeh, M., Hadian, J. & Tehrani, A. (2006). Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of three species of *Artemisia* on some soil-borne phytopathogens. *Communications in agricultural and applied biological*, 71 (3), 1327-1333.
- Ferrer-Pereira, H. (2009). Lauraceae del herbario Nacional de Venezuela. *Acta Botánica de Venezuela*, 32 (1), 237-250.
- Flores, E. (2006). *Metabolitos secundarios bioactivos de especies del género Piper de la flora boliviana*. Tesis de doctora. Universidad de la Laguna. Bolivia.
- Fontecha, R. & Lizarazo, H. (2007). *Diseño y construcción de un equipo de destilación para la extracción de aceites esenciales, usando los métodos de hidrodestilación, arrastre con vapor y deslitación agua/vapor*. Tesis de ingeniero mecánico. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.
- Gassenmeier, K., Yang, X., Grab, W., Peppet, J. & Eilerman, R. (2001). Flavor of aromatic fruits and spices from the tropical rainforest-a field study. *Chimia*

*International Journal for Chemistry*, 55 (5), 435-440

- Gassiot, C., Pino, P., Rodríguez, J., Ramos, M., Páez, I. & Gundián, J. (2009). Aspergillosis pulmonar: un nuevo enfoque en la reemergencia. *Acta Médica*, 9 (2), 67-72.
- Gobierno Autónomo Descentralizado del Cantón Santa Clara. (2011). *Plan de desarrollo y ordenamiento territorial del cantón Santa Clara*. Pastaza, Ecuador.
- Gobierno Autónomo Descentralizado del Cantón Pastaza. (2012). *Plan de turismo del cantón Pastaza*. Pastaza, Ecuador.
- Gobierno Autónomo Descentralizado de la Provincia de Pastaza. (2012). *Plan de turismo del cantón Pastaza*. Pastaza, Ecuador.
- Guédez, C., Cañizalez, L., Castillo, C., Olivar, R. & Maffei, M. (2010). Alternativas para el control de hongos postcosecha en naranjas valencia (*Citrus sinensis*). *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 30 (1), 44-47.
- Guerrini, A., Sacchetti, G., Rossi, D., Paganetto, G., Muzzoli, M., Andreotti, E., Tognolini, M., Maldonado, M. & Bruni, R. (2009). Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 27 (1), 39-48.
- Güisa, D. & Rincón, L. (2007). *Estudio del efecto antimicrobiano del aceite esencial de Minthostachys mollis combinado con inactivación térmica, sobre cepas de Listeria monocytogenes y Bacillus cereus*. Tesis de microbiólogo industrial. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Hajieghrari, B., Mohammadi, M. & Hadian, D. (2006). Antifungal activity of *Cymbopogon parkeri* Stapf. Essential oil on some important phytopathogenic fungi. *Communications in agricultural and applied biological*, 71 (3), 937-941.
- Hashem, M., Moharam, A., Zaied, A. & Saleh, F. (2010). Efficacy of essential oils in the control of cumin root rot disease caused by *Fusarium* spp. *Crop Protection*, 29 (10), 1111-1117.
- Huilcapi, E. (2012). *Combate de tizón tardío (Phytophthora infestans) con activadores de defensas naturales en el cultivo de papa (Solanum tuberosum)*

*c.v. superchola*. Tesis de ingeniero agrónomo. Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador.

Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas Sinchi. (2006). *Libro rojo de planta de Colombia. Especies maderables amenazadas*. I parte. Bogotá, Colombia: Editores Dairon Cárdenas y Nelson Salinas. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo territorial.

Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. (2014). Cultivo de naranjilla *Solanum quitoense*. Ecuador.

Juárez, J., Castro, A., Jaúregui, J., Lizano, J., Carhuapoma, M., Choquesillo, F., Félix, L., Cotillo, P., López, J., Jaramillo, M., Córdova, A., Ruíz, J. & Ramos, N. (2010). Composición química, actividad antibacteriana del aceite esencial de *Citrus sinensis* L. (naranja dulce) y formulación de una forma farmacéutica. *Ciencia e Investigación*, 13 (1), 9-13.

Kocevski, D., Du. M., Kan, J., Jing, C., Lacanin, I. & Pavlovic, H. (2013). Antifungal Effect of *Allium tuberosum*, *Cinnamomum cassia*, and *Pogostemon cablin* Essential Oils and Their Components Against Population of *Aspergillus* Species. *Journal of Food Science*, 78 (5), 731-737.

Lagos, E. (2012). *Determinación de la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial Thymus vulgaris L. "Tomillo" frente a Porphyromonas gingivalis ATCC 33277 causante de gingivitis*. Tesis de químico farmacéutico. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Tacna, Perú.

Landero, N. (2013). *Extractos vegetales y Trichoderma spp. en el control de Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Penz. Y Sacc. En frutos de papaya maradol (Carica papaya L.) en postcosecha*. Tesis de doctora en ciencias. Colegio de Postgraduados, México.

Lozada, B., Herrera, L., Perea, J., Stashenko, E. & Escobar, P. (2012). Efecto in vitro de aceites esenciales de tres especies de *Lippia* sobre *Moniliophthora roreri* (Cif. Y Par.) Evans et al., agente causante de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao* L.). *Acta Agronómica*, 61 (2), 102-110.

Maridueña, M. (2011). *Estudio de la microbiota patogénica de "cacao criollo" (Theobroma cacao) en cinco provincias de la costa ecuatoriana y evaluación de la efectividad in vitro de los bioles locales para su control*. Tesis de master

en biotecnología agrícola. Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador.

- Maridueña, G., Jiménez, M. & Peralta, E. (2010). Actualización de la micobiota patogénica del cacao “arriba” (*Theobroma cacao*) presente en la costa ecuatoriana. *Revista Tecnológica ESPOL*, 23 (1), 21-26.
- Martínez, A. (2001). *Aceites Esenciales*. Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Colombia.
- Mata, M., Umaña, L. & Chaves, J. (2009). *Protocolo de manejo de colecciones de hongos*. Instituto Nacional de biodiversidad. Costa Rica: INBIO.
- Mattasyoh, J., Wagara, I., Nakavuma, J. & Kibural, A. (2011). Chemical composition of *Cymbopogon citratus* essential oil and effect on mycotoxigenic *Aspergillus* species. *African Journal of Food Science*, 5 (3), 138-142.
- Mejía, K. & Rengifo, E. (2000). *Plantas Medicinales de Uso Popular en la Amazonía Peruana* (2ª ed.). Lima: Agencia Española de Cooperación Internacional.
- Mendoza, D. & Taborda, M. (2010). Composición química y actividad acaricida del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* Stapf contra el acaro intradomiciliario *Dermatophagoides farinae* (Acari: Pyroglyphidae). *Revista Biosalud*, 9 (2), 21-31.
- Mérida, M. (2012). *Estudio del rendimiento del aceite esencial de diferentes poblaciones silvestres de Lippia chiapasensis Loes. Del altiplano occidental guatemalteco*. Tesis de biólogo. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Ministerio del Ambiente del Ecuador. (2010). *Política y Estrategia Nacional de Biodiversidad del Ecuador 2001-2010*. Ecuador.
- Montes, R. (2009). Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Micología*, 29 (1), 73-82.
- Montes, R., Cruz, V., Martínez, G., Sandoval, G., García, R., Zilch, S., Bravo, L., Bermúdez, K., Flores, H. & Carvajal, M. (2000). Propiedades antifúngicas en plantas superiores, análisis retrospectivo de investigaciones. *Revista Mexicana de fitopatología*, 18 (002), 125-131.

- Muñoz, A. (2008). *Caracterización de distintos péptidos antimicrobianos con actividad frente a hongos fitopatógenos de interés agroalimentario*. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Mushtaq, M., Rehman, S., Iqbal, Z., Muhammad, F. & Iqbal, J. (2006). Genetic variability to essential oil composition in four Citrus fruit species. *Pakistan Journal of Botany*, 38 (2), 319-324.
- Noriega, P. & Dacarro, C. (2008). Aceite foliar de *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm.: actividad antimicrobiana y antifúngica. *La Granja*, 7 (1), 3-8.
- Northover, J. & Zhou, T. (2002). Control of *Rhizopus* rot of peaches with postharvest treatments of tebuconazole, fludioxonil and *Pseudomonas syringae*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 24 (2), 144-153.
- Ochoa, C., Luna, J. & Pérez, F. (2012). Efecto de la aplicación de aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia graveolens*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) en factores de calidad de rodajas de manzana (*Malus domestica*). *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3 (2), 247-269.
- OMS (1998). Pautas para la evaluación de Medicamentos Herbarios. Programa de Medicina Tradicional. Organización Mundial de la Salud. Ginebra, 1998.
- Osorio, R. (2010). Estudio del efecto de *Trichoderma harzianum* en el control de *Moniliophthora roreri* en plantas de *Theobroma cacao* en la provincia de Esmeraldas. Tesis de ingeniero agroindustrial. Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.
- Pérez, J. (2011). *Estudio químico de los aceites esenciales y metabolitos secundarios de tres plantas del género Lantana (Verbenaceae)*. Concejo Nacional de Ciencia y tecnología –CONCYT- Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología – SENACYT- Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología – FONACYT- Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Pérez, J., Luengo, A. & Izquierdo, J. (2011). *Phytophthora* sp.. *Ficha técnica de sanidad vegetal, Consejería de Agricultura, desarrollo rural, medio ambiente y energía*, 72 (1).
- Pino, O., Sánchez, Y., Rodríguez, H., Correa, T., Demedio, J. & Sanabria, J. (2011). Caracterización química y actividad acaricida del aceite esencial de *Piper aduncum* subsp. *Ossanum* frente a *Varroa destructor*. *Revista de Protección Vegetal*, 26 (1), 52-61.

- Prieto, J., Pabón, L., Patiño, O., Delgado, W. & Cuca, L. (2010). Constituyentes químicos, actividad antifúngica de los aceites esenciales de hojas de dos especies colombianas del género *Ocotea* (Lauraceae). *Red de Revistas Científicas de América latina, el caribe, España y Portugal*, 39 (2), 199-209.
- Ríos, M., Koziol, M., Borgtoft, H. & Granda, G. (2007). *Plantas útiles del Ecuador: aplicaciones, retos y perspectivas*. (1ª ed.). Quito, Ecuador: Abya Yala.
- Rivas, F. (2010). *Análisis de la expresión del gen PR-1, mediante la técnica PCR en tiempo real (RT-PCR), en tomate (Solanum lycopersicum) infectado con Phytophthora infestans*. Tesis de ingeniero en biotecnología. Escuela Politécnica de Ejército, Sangolquí, Ecuador.
- Rodríguez, M. (2008). Hongos de enfermedades de postcosecha en frutos de Cucurbitáceas de interés económico de zonas de distribución de Trujillo, Perú. *REBIOL*, 28 (2), 2-4.
- Rolli, E., Maietti, S., Sacchetti, G. & Bruni, R. (2014). Comparative phytotoxicity of 25 essential oils on pre and post-emergence development of *Solanum lycopersicum* L.: A multivariate approach. *Industrial Crops and Products*, 60 (1), 280-290.
- Ronquillo, M. (2012). *Etiología de la pudrición del cogollo de la palma aceitera (Elaeis guineensis Jacq.) en el Ecuador*. Tesis de maestría en ciencias. Universidad de Puerto Rico, Puerto Rico.
- Sacchetti, G., Guerrini, A., Noriega, P., Bianchi, A. & Bruni, R. (2006). Essential oil of wild *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) leaves from Amazonian Ecuador. *Flavour and Fragrance Journal*, 21 (1), 674-676.
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S. Radice, M. & Bruni, R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 9 (1), 621-632.
- Sánchez, C., Cruz, M., Alvarado, Y., Pérez, M., Medinilla, M., Acosta, M., Leiva, M. M. & Roque, B. (2007). Evaluación del efecto del aceite esencial de *Cymbopogon nardus* para el control de microorganismos contaminantes del cultivo in vitro de plantas. *Biotecnología Vegetal*, 7 (3), 187-190.
- Sánchez, F. & Garcés, F. (2012). *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al. En el cultivo de cacao. *Sciencia Agropecuaria*, 3 (1), 249-258.

- Serrano, P., Tello, M., Portilla, W. & Cazar, A. (2012). *Actividad antimicrobiana de aceites esenciales de menta (Mentha pulegium) y cedrón (Alloysia tryphylla) en la germinación in vitro de la orquídea Cattleya maxima*. Azuay: Especialización en Biotecnología Vegetal, Universidad del Azuay.
- Silva, B., Ortega, L., González, A., Olivas, I. & Ayala, J. (2013). Protección antifúngica y enriquecimiento antioxidante de fresa con aceite esencial de hoja de canela. *Revista de Fitotecnia*, 36 (3), 217-224.
- Solís, P. (2011). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare* L.) y tomillo (*Thymus vulgaris* L.) como potenciales bioconservadores en carne de pollo. Tesis de bioquímico farmacéutico. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- Sonker, N., Pandey, A., Singh, P. & Tripathi, N. (2014). Assessment of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf Essential Oil as Herbal Preservatives Based on Antifungal, Antiaflatoxin, and Antiochratoxin Activities and *In Vivo* Efficacy during Storage. *Journal of Food Science*, 79 (4), 628-634.
- Soto, R., Vega, G. & Tamajon, A. (2002). Instructivo Técnico del cultivo de *Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf (caña santa). *Revista Cubana Plantas Medicinales*, 7 (2).
- Stashenko, E. (2009). *Aceites esenciales*. (1ª ed.). Colombia. CENIVAM
- Stell & Torrie (1985). *Bioestadística: Principios y procedimientos*. (2ª ed.). Editorial Mac Graw-Hill. México.
- Tapia, C. & Amaro, J. (2014). Género *Fusarium*. *Revista Chilena Infectol*, 31 (1), 85-86.
- Tchoumboungang, F., Jazet, M., Wouatsa, V., Fekam, FA., Sameza, L., Amvam, H. & Menut, C. (2013). Composition and antifungal properties of essential oils from five plants growing in the mountainous area of the west Cameroon. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 16 (5), 679-688.
- Terreros, V. (2004). *Evaluación de alternativas de control de Cladosporium echinulatum causante de la mancha anular en clavel (Dianthus caryophyllus)*. Tesis de ingeniero agrónomo, Talca, Chile.
- Torres, H., Mendoza, F. & Hernández, J., (2008). Estudio preliminar de la bioactividad y comportamiento agronómico de diez especies silvestres de

plantas medicinales y uso biopesticida para su aplicabilidad en el sector rural de Daule, Provincia del Guayas. *Revista Tecnológica ESPOL*.

- Valencia, M. (2009). *Caracterización enzimática de cepas de Fusarium aisladas de lesiones de animales, humanos y plantas*. Pontificia Universidad Javeriana. Tesis de microbiología agroindustrial. Bogotá, Colombia.
- Vargas, A. & Bottia, E. (2008). *Estudio de la composición química de los aceites esenciales de seis especies vegetales cultivadas en los municipios de Bolívar y El Peñón*. Tesis de ingeniero químico. Santander, Colombia.
- Velázquez, M., Bautista, S., Hernández, A., Guerra, N. & Amora, E. (2008). Estrategias de control de *Rhizopus stolonifer* Ehrenb. (Ex Fr.) Lind, agente causal de pudriciones postcosecha en productos agrícolas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 26 (1), 49-54.
- Villagómez, T., Juárez, G. & Morales, E. (2003, junio). *Control de Aspergillus flavus en trigo con oleorresina de la semilla de jícama (Pachyrhizus tuberosus (L.) Urban)*. Ponencia presentada en el quinto Congreso Regional en Ciencias de los Alimentos, Monterrey, México.
- Villavicencio, M. (2010). *Caracterización morfológica, fisiológica y patogénica de Moniliophthora roreri aislados de cinco provincias de la costa Ecuatoriana*. Tesis de ingeniero agrícola y biológico. Escuela Superior Politécnica del litoral, Guayaquil, Ecuador.
- Znini, M., Cristofari, G., Majidi, L., Paolini, J., Desjobert J. & Costa, J. (2013). Essential oil composition and antifungal activity of *Pulicaria mauritanica* Coss., against postharvest phytopathogenic fungi in apples. *LWT-Food Science and Technology*, 54 (1), 564-569.