

**EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE  
ACEITES ESENCIALES DE HOJAS DE *Thymus vulgaris* L.,  
*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng y *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.,  
FRENTE A *Fusarium* sp.**



**MARTHA LUCÍA VALDÉS PENNA**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA  
POPAYÁN  
2018**

**EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE  
ACEITES ESENCIALES DE HOJAS DE *Thymus vulgaris* L.,  
*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng y *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.,  
FRENTE A *Fusarium* sp.**

**Trabajo de grado como requisito parcial para optar al título de  
Bióloga**

**MARTHA LUCÍA VALDÉS PENNA**

**Directora**

**KATHERIN RUIZ MONTOYA MSc.**

**CODIRECTORA**

**MSc MARÍA DEL PILAR RIVAS PAVA**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA  
POPAYÁN  
2018**

## Nota de aceptación

---

---

---

---

Director \_\_\_\_\_

MSc.KATHERIN RUIZ MONTOYA

Jurado \_\_\_\_\_

Biol. MELISSA CAROLINA PATIÑO PORTELA

Jurado \_\_\_\_\_

Ing. SANDRA PATRICIA PAZ

Lugar y fecha de sustentación: Popayán, 21 de Marzo de 2.018

## RESUMEN

Las especies fitopatógenas del género *Fusarium*, producen grandes pérdidas en cultivos, como en el Maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var *flavicarpa*), frutos cítricos y Lulo (*Solanum quitoense*), entre otros. La resistencia de algunos de estos hongos a los fungicidas ha estimulado la búsqueda de nuevas alternativas para su control. La aplicación de aceites esenciales constituye una alternativa ecológica que permite la conservación del medio ambiente. El objetivo del presente trabajo consistió evaluar los aceites esenciales de Tomillo (*Thymus vulgaris* L), Orégano brujo (*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng) y Limoncillo (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf), frente a *Fusarium* sp mediante el método de difusión en agar con discos, bajo condiciones de laboratorio. Estos aceites esenciales (AE) aplicados en tres dosis diferentes (10, 15 y 20  $\mu$ L) ejercieron una inhibición total sobre las cepas de *Fusarium* sp. Los resultados indican que los tres aceites evaluados pueden ser utilizados como agentes para el control de enfermedades causadas por *Fusarium* sp exponiendo una alternativa atractiva para el control de agentes patógenos que atacan la producción de cultivos agrícolas.

### Palabras clave:

Aceites esenciales, *Fusarium*, Antifungicidad, *Thymus vulgaris* L., *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng y *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios principalmente, por haberme dado la vida y permitirme el haber llegado hasta este momento de mi formación profesional. A mi madre Ana Lilia, por darme la vida y que aunque ya no se encuentre con nosotros físicamente siempre está presente en mi corazón. A Iván Aragón, por ser el pilar más importante y por demostrarme siempre cariño y apoyo incondicional, sin él, jamás hubiese podido conseguir lo que hasta ahora. A mi hija Rachel Aragón por ser mi orgullo y mi principal motivación a luchar por conseguir lo mejor.

Agradezco a mi directora de tesis MSc. Katherín Ruiz por su tiempo a través del proceso, por sus consejos, dirección del trabajo y su agradable amistad.

A la profesora María del Pilar Rivas, por la orientación, colaboración y enseñanzas, no solo para la realización del presente trabajo sino a lo largo de la carrera.

A Felipe Liévano y Ariane Coral, por su tiempo, amistad y por los conocimientos que me transmitieron.

A los profesores Bernardo Ramírez, Sandra Rivas, Neyla Benitez y muchos otros por sus consejos y apoyo en la realización del trabajo.

A Melissa Patiño y Sandra Patricia Paz por sus sugerencias al evaluar el proyecto.

Al Profesor Jimmy Guerrero por compartir sus conocimientos y experiencias.

A las laboratoristas, Marybell, Doña Clandia, Magaly por su disposición para colaborar en el avance del trabajo y por su agradable amistad.

A mis amigos Miyer Cerón, Astrid Erazo Dilberney Solarte, Ginna Melenje, Magda P. Grisales, Laura Amaya, Yuraní Perafán, Julian Trochez, David Malfitano, Adriana Collazos, Lorena Buitrón, Ingrid Vásquez, Karol Montilla, Yolanda Bolaños por su grata compañía y haber hecho de mi etapa universitaria un trayecto de vivencias que nunca olvidaré.

A Fernando Ibarra, por su colaboración, apoyo y grata compañía no solo en el desarrollo de mi tesis sino en situaciones de desánimo dándome fortaleza para continuar.

Por último a todos los que olvido mencionar y han sido parte de mi formación como una persona íntegra y de buen actuar, muchas gracias.

## Tabla de Contenido

<b>1. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>13</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	<b>15</b>
<b>4. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>16</b>
4.1 Aceites esenciales.....	16
4.2 Propiedades físicas de los AE.....	16
4.2.1 Densidad.....	17
4.2.2 Índice de Refracción.....	17
4.2.3 Medición del pH de los AE.....	18
4.3 Composición química de los aceites esenciales.....	18
4.4 Aplicaciones de los aceites esenciales.....	19
4.5 Métodos utilizado para la determinación de la actividad Antimicrobiana- Antifúngica.....	20
4.6 Generalidades del tomillo ( <i>Thymus vulgaris</i> L).....	21
4.7 Generalidades del orégano brujo ( <i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng).....	22
4.8 Generalidades del Limoncillo ( <i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf).....	23
4.9 Generalidades de <i>Fusarium</i> sp.....	24
<b>5. ANTECEDENTES</b> .....	<b>25</b>
<b>6. MARCO METODOLÓGICO</b> .....	<b>30</b>
6.1 Colección y clasificación del material vegetal.....	30
Figura 4. Material vegetal dispuesto para secado ( <i>T. vulgaris</i> L., <i>P. amboinicus</i> (Lour.) Spreng y <i>C. citratus</i> (DC) Stapf.).....	31
6.2 Protocolo de extracción del AE del material vegetal de las especies de <i>T.vulgaris</i> L., <i>P. amboinicus</i> (Lour) Spreng y <i>C. citratus</i> (DC) Stapf.....	31

6.3	Determinación de las propiedades físicas de los AE de <i>T. vulgaris</i> L., <i>P. amboinicus</i> (Lour.) Spreng y <i>C. citratus</i> (DC) Stapf.....	33
6.4	Prueba <i>In vitro</i> .....	34
6.4.1	Determinación de la eficacia de los AE extraídos en la inhibición del crecimiento de <i>Fusarium sp.</i> .....	34
6.4.1.1	Preparación del patrón del inóculo.....	35
6.4.1.2	Evaluación de la actividad antifúngica de <i>Fusarium sp</i> a los AE.....	35
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>36</b>
7.1	Extracción del AE del material vegetal de las especies <i>T. vulgaris</i> L., <i>P. amboinicus</i> (Lour.) Spreng y <i>C. citratus</i> (DC) Stapf.....	36
7.2	Determinación de las propiedades físicas de los AE de <i>T. vulgaris</i> L., <i>P. amboinicus</i> (Lour.) Spreng y <i>C. citratus</i> (DC) Stapf.....	38
7.3	Determinación de la eficacia de los AE extraídos en la inhibición del crecimiento de <i>Fusarium sp.</i> .....	40
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>44</b>
<b>9.</b>	<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>45</b>

## TABLA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Principales aplicaciones de los AE .....	19
<b>Figura 2.</b>	Balanza triple brazo (TRIPLE BEAM 700/800 SERIES Chaus) .....	31
Figura 3.	Material vegetal dispuesto para secado ( <i>T. vulgaris</i> L., <i>P. amboinicus</i> (Lour.) Spreng y <i>C. citratus</i> (DC) Stapf.).....	31
<b>Figura 4.</b>	Destilación por arrastre de vapor y extracción continua utilizando como disolvente agua.....	32
<b>Figura 5.</b>	Respuesta de sensibilidad del patógeno <i>Fusarium sp</i> a los AE, in vitro, Ensayo (15 días).....	40
<b>Figura 6.</b>	Respuesta de sensibilidad del patógeno <i>Fusarium sp</i> al control negativo, a nivel in vitro, Ensayo (15 días).....	40



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Porcentaje de rendimiento de AE de <i>Thymus vulgaris</i> L., <i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng y <i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf.....	36
<b>Tabla 2.</b> Valores de densidad, índice de refracción y pH de los AE de <i>Thymus vulgaris</i> L., <i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng y <i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf....	38
<b>Tabla 3.</b> Promedio del porcentaje de inhibición (%) del efecto de aceites esenciales y el control negativo sobre el crecimiento micelial de <i>Fusarium</i> sp., a los 15 días de incubación a 25 °C. ....	41
<b>Tabla 5.</b> Seguimiento de crecimiento de <i>Fusarium</i> sp frente a los tres AE y al control positivo.....	42

## INTRODUCCIÓN

La creciente necesidad de buscar un sistema de producción sostenible de cultivos agrícolas, sin deterioro de los recursos naturales y encaminados al crecimiento económico mejorando la calidad de vida de la población, ha suscitado un inmenso desarrollo de productos biológicos que pueden llegar a ser muy efectivos para el control de agentes patógenos no deseados en la producción.

Como resultado de ello, hoy en día se conocen compuestos activos con alta actividad biológica extraídos de plantas que tienen efecto antifúngico, siendo sustancias que la planta ha sintetizado y almacenado en el curso de su crecimiento a través del metabolismo secundario, los cuales no se distribuyen de una manera uniforme por toda la planta, sino que se concentran perfectamente en flores, hojas, raíces, y a veces en semillas, frutos y en la corteza (Pahulow, 1985). Particularmente los aceites esenciales (AE) en las plantas pueden encontrarse en las diferentes células oleíferas (algunas plantas como jengibre, cúrcuma, vainilla), en los canales secretorios (plantas como pino, artemisa, anís), están presentes en las glándulas (plantas cítricas y eucaliptos) o en los tricomas (muchas plantas de las familias Labiadas, Asteráceas, Solanáceas, Geraniáceas) (Stashenko, 2009).

En los últimos años se ha observado gran interés en buscar activamente moléculas bioactivas en plantas, insectos y microorganismos que pudieran representar una alternativa para el control de enfermedades fúngicas. Los aceites esenciales (AE) poseen propiedades funcionales con efectos positivos, que los hace una alternativa promisorio frente a enfermedades fúngicas, posibilitando a que haya una disminución en la tasa de uso de fertilizantes químicos en la agricultura y con ello se genere una reducción en la mitigación de efectos adversos sobre el suelo ocasionado por el uso excesivo de agroquímicos en la agricultura.

La mayoría de los AE de las plantas están constituidos por compuestos químicamente complejos, lo que aumenta su eficacia antifúngica e insecticida debido a la sinergia entre los componentes (Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales, HA., Basurto-Sotelo, M., Soto-Parra, JM y Martínez-Escudero, 2014).

Según (Rangel-Ch, 2015) Colombia cuenta con una prodigiosa riqueza natural, en flora, se cuenta con registros cercanos a las 26.500 especies de plantas con flores que le ubican como el segundo país con mayor riqueza, después de Brasil. La diversidad y la riqueza de los bosques y otros tipos de vegetación como selvas, matorrales, pastizales, rosetales de Colombia, alcanza cerca de 1.200 tipos diferentes, que le confieren característica singular como uno de los países con mayor variedad a nivel mundial.

Gozando de ésta gran diversidad de flora y teniendo en cuenta el uso tradicional que una especie ha tenido por generaciones, es útil desarrollar productos efectivos con base en plantas ricas en metabolitos secundarios frente a enfermedades limitantes de cultivos agrícolas, manejo de plagas, entre otras utilidades, en la medida en que se estudien plantas ya sean introducidas o nativas con aplicaciones claramente identificadas y que se traduzcan en productos que garanticen efectividad.

En el presente trabajo las especies de plantas *Thymus vulgaris* L, (tomillo) *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (óregano brujo), y *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (limoncillo), se pueden enmarcar en este contexto debido a sus características antimicrobianas-antifúngicas, pues presentan gran riqueza bioquímica (Lizcano-González, 2007; Shah *et al.*, 2011; Menéndez-Castillo y Pavón-González, 1999;) por lo tanto son una interesante alternativa a explorar para inhibir a *Fusarium* sp., conduciendo hacia nuevas investigaciones en donde se pueda reemplazar parcial o totalmente a insecticidas y fungicidas sintéticos.

Los hongos del género *Fusarium* tienen amplia distribución y gran importancia desde el punto de vista agrícola y económico, ya que se producen en la mayoría de las regiones climáticas del mundo ocasionando diferentes tipos de enfermedades en los cultivos (Burgess, 1981; Nelson *et al.*, 1983), la mayoría producen marchitamientos vasculares como la especie *Fusarium oxysporum*, mientras que otras como *Fusarium solani* ocasionan marchitez vascular, pudrición de semillas, raíces, plántulas, tallos inferiores, coronas, cormos, bulbos, tubérculos, frutos y otras partes de la planta (Agrios, 2007; Meister Media Worldwide, 2005). No obstante, muchas especies de este género, son patógenos oportunistas de numerosos hospederos, en los que se incluyen, humanos, animales y plantas (Summerell *et al.*, 2001).

Teniendo en cuenta el grado de daño que ocasiona *Fusarium* sp., en los diferentes cultivos, se tuvo como objetivo la evaluación *in vitro* de los aceites esenciales (AE) de las especies mencionadas (tomillo, orégano brujo, limoncillo) frente a *Fusarium* sp., con el fin de responder a la pregunta: ¿Los aceites esenciales de las plantas objeto de estudio y sus compuestos presentan actividad antifúngica frente a *Fusarium* sp?

Los resultados obtenidos se convertirán en soporte para investigaciones posteriores, que apoyen la aplicación y el aprovechamiento de estas especies vegetales frente a éste fitopatógeno, tomando en consideración la amplia disponibilidad y facilidad de cultivo de las especies.

## 1. JUSTIFICACIÓN.

La mayoría de las especies del género *Fusarium* han sido definidos como “patógenos multihospederos” (van Baarlen *et al.*, 2007), y se identifican por su impacto negativo en la economía de la agricultura global y a nivel clínico, ya que infectan y dañan diversos cultivos y organismos (plantas, humanos y animales).

En Colombia se observa una disminución en los índices de producción y calidad de productos de exportación, como hortalizas, legumbres, frutas y ornamentales, los cuales son afectados por este patógeno (Arbeláez, 2000; Perusquia-Ortiz *et al.*, 2012). Se reportan enfermedades como la secadera o marchitez vascular en maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*), pudrición en frutos cítricos en mayor proporción en naranjas y mandarinas en poscosecha, marchitez en los cultivos de lulo (*Solanum quitoense*), entre otros cultivos a los cuales están asociadas las especies del género *F. solani* y *F. oxysporum* (Castro-Caicedo *et al.*, 2000; CORPOICA, C.I. Nataima, 2008; Cubillos *et al.*, 2009; Rojas *et al.*, 2010; Suárez *et al.*, 2008).

Según (ICA., 2015; ICA., 2016) en algunas zonas del Norte, Sur y Noroccidente del Departamento del Cauca (Colombia), abarcando a: Santander de Quilichao, Caloto, Guachené, Puerto Tejada, El Patía y Vereda la Rejoya, se cultivan el Maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var *flavicarpa*), frutos cítricos y Lulo (*Solanum quitoense*) y éstos por ser frutos con un potencial económico alto debido a su amplia aceptación en los mercados nacionales, genera diferentes productividades e ingresos para los agricultores, además de ser utilizados para consumo doméstico, pero son cultivos que se han visto afectados por plagas y enfermedades fúngicas, entre las cuales *Fusarium* sp., es una de las de mayor importancia, ya que afecta costos de producción y consecuentemente la rentabilidad de los agricultores (ICA., 2016; Rojas *et al.*, 2010).

Los estudios con AE de plantas han demostrado que éstos pueden ser utilizados como antifúngicos, antimicrobianos, repelentes de insectos o como alternativa a los plaguicidas sintéticos (Arango–Bedoya *et al.*, 2014; Espitia, 2011) permitiendo control de plagas y enfermedades fúngicas con productos de origen natural, mostrando una alternativa ecológica y eficaz frente a numerosos problemas causados por fitopatógenos presentes en el agro ecosistema. Aunque las investigaciones con AE se han incrementado en los últimos años aún quedan muchas especies de plantas que producen aceites esenciales que no han sido investigadas para su potencial uso.

Este trabajo permitió evaluar *in vitro* AE puros de *Thymus vulgaris* L, *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng, y *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, frente a *Fusarium* sp., contribuyendo con una alternativa atractiva para el control de enfermedades fúngicas causadas por éste patógeno, teniendo en cuenta la característica cosmopolita del género.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar *In vitro* el efecto de aceites esenciales (AE) de las especies *Thymus vulgaris* L., *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng y *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., frente a *Fusarium* sp.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener aceites esenciales de *Thymus vulgaris* L., *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng y *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf mediante hidrodestilación por arrastre de vapor de agua.
- Determinar *in vitro* la actividad antifúngica mediante el método difusión en agar de los aceites esenciales obtenidos frente a *Fusarium* sp.

## 3. HIPÓTESIS

Los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* L., *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng y *Cymbopogon citratus* (DC) poseen actividad fungicida frente a *Fusarium* sp., *in vitro*.

## **4. MARCO TEÓRICO**

### **4.1 Aceites esenciales.**

Los AE son fracciones líquidas volátiles responsables del olor de las plantas, normalmente son líquidos a temperatura ambiente. Según la (Farmacopea Europea 7ª edición, 2010), los AE generalmente son de composición compleja y son obtenidos de una materia prima vegetal definida botánicamente.

Los AE son biosintetizados naturalmente en diferentes órganos de la planta en forma de metabolitos secundarios (Asbahani *et al.*, 2015; Martínez, 2003), debido a su naturaleza hidrofóbica y su densidad a menudo más baja que la del agua pueden extraerse por diferentes métodos físicos sin afectar su composición química, generalmente son lipófilos, solubles en solventes orgánicos e inmiscibles con agua, sus rendimientos de extracción varían según las especies y los órganos (Asbahani *et al.*, 2015). Entre las especies de plantas solo el 10% contienen AE y se llaman plantas aromáticas, de las que existen más de 17,000 especies de plantas distribuidas en todo el mundo (Svoboda y Greenaway, 2003). Los géneros en los que se pueden encontrar se clasifican en un pequeño número de familias: Lamiaceae, Lauraceae, Asteraceae, Rutaceae, Myrtaceae, Poaceae, Cupressaceae y Piperaceae (Bruneton, 1999).

### **4.2 Propiedades físicas de los AE.**

En general, son líquidos a temperatura ambiente, su densidad es inferior a la del agua. Poseen un índice de refracción elevado y la mayoría desvían la luz polarizada; son arrastrables en vapor de agua y son muy poco solubles en ella, sin embargo son solubles en alcoholes y disolventes orgánicos habituales, como éter o cloroformo, y alcohol de alto grado (González-Villa, 2004).



### 4.2.1 Densidad.

La densidad de una sustancia es la relación que existe entre la masa y el volumen de dicha sustancia. En un AE, bien sea la densidad absoluta o la densidad relativa al agua, es medida a una temperatura estándar (normalmente 20 o 25 °C) (Ortuño-Sánchez, 2006). La densidad se determina mediante la siguiente ecuación:

$$\rho = \frac{M}{V}$$

$\rho$  = Densidad (g/mL)

$M$  = masa de la sustancia (g)

$V$  = Volumen de la sustancia (mL)

La densidad de un líquido se establece comparándola contra la densidad de otro líquido, casi siempre es el agua.

La relación que existe entre las densidades, es igual a la relación que existe entre las masas de dichos líquidos, los cuales ocupan un mismo volumen.

Para poder determinar la densidad de los aceites esenciales o de cualquier líquido es necesario conocer el volumen que estos poseen, para lo cual se utiliza un picnómetro o material de vidrio de laboratorio aforado, estos instrumentos sirven para el trasvase entre recipientes de volúmenes perfectamente conocidos (alícuota) (Carrasco-Vanegas y Castañeda-Pérez, 2013).

### 4.2.2 Índice de Refracción

Se llama índice de refracción a la relación que existe entre la velocidad de luz en el aire y la velocidad de la luz a través de la muestra cuyo índice se calcula.

La velocidad de la luz a través de la muestra está relacionada con la clase de grupos funcionales que la sustancia posea. Está determinada por la interacción que existe entre las ondas luminosas con los electrones de orbitales enlazantes y antienlazantes de las sustancias. El índice de refracción puede ser obtenido de algún tipo de refractómetro. La lectura se realiza normalmente a 40°C, o en su defecto, se hace correlación a la temperatura a la que se efectúa la medición, multiplicando la constante 0,000365 por cada grado Celsius de cambio en la temperatura normal de lectura. (Herrera *et al.*, 2003).

#### **4.2.3 Medición del pH de los AE**

Para poder determinar el pH de los AE o de cualquier sustancia, se utiliza una cinta de papel indicador universal, que adopta diferentes colores a diferentes valores de pH. Las mediciones más precisas se realizan con un pH-metro. Este instrumento consiste en un voltímetro conectado a dos electrodos que se sumergen dentro de la solución. La diferencia de potencial eléctrico entre los electrodos es proporcional al pH; de esta manera, una vez que se calibra la escala sobre el medidor, el pH puede leerse directamente. (Alkins y Jones, 2006).

#### **4.3 Composición química de los aceites esenciales**

Están constituidos por una variedad de compuestos químicos, la mayoría hacen parte de una familia de sustancias químicas llamadas “terpenos” y pueden ser monoterpenos (10 carbonos) y sesquiterpenos (15 carbonos)(Carey, 1999; Luengo, 2004; Sell, 2003).

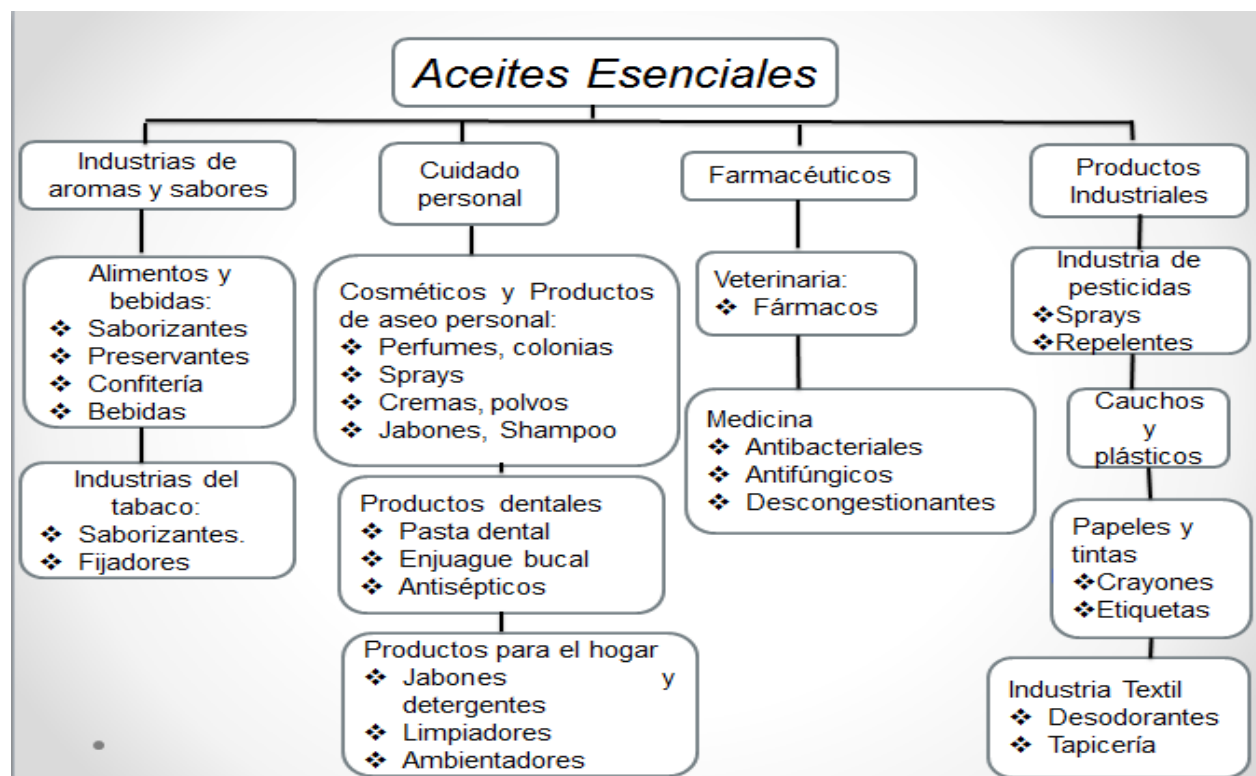
Otra clase de sustancias químicas presentes en los AE son los compuestos aromáticos derivados del fenilpropano (aldehído cimámico, eugenol, anetol, aldehído anísitico y safrol, entre otros), los cuales se caracterizan por poseer en su estructura un grupo propilénico enlazado a un anillo de benceno (Luengo, 2004).

Algunos AE son casi monomoleculares, ya que poseen en exclusiva un solo componente, otros son ricos en 2-3 moléculas. Pero la mayoría son polimoleculares, puesto que contienen 3-4 moléculas mayoritarias, un cierto número de moléculas minoritarias y, en ocasiones, centenares de moléculas diferentes que sólo están presentes en trazas (Luengo, 2004).

#### 4.4 Aplicaciones de los aceites esenciales

Los AE tienen un rango de aplicaciones muy amplio. Éstos se usan en las industrias de alimentos, farmacéutica, cosmética y química, siendo incorporados en productos de consumo (CBI, 2004, 2005).

En la Figura 1, se resumen algunos de los usos más importantes de los AE en diferentes áreas.



**Figura 1.** Principales aplicaciones de los AE

#### **4.5 Métodos utilizado para la determinación de la actividad Antimicrobiana-Antifúngica.**

Los métodos para determinar la actividad antimicrobiana-antifúngica que tienen los AE no se han definido totalmente, en consecuencia, existen métodos que incluyen las determinaciones de las concentraciones mínimas inhibitoria (CMI), la eficacia antimicrobiana–antifúngica, entre otras.

Los métodos principalmente utilizados para evaluar la actividad antimicrobiana–antifúngica de los AE por medio de la concentración mínima inhibitoria (CMI), definido como la menor concentración requerida del AE que tenga la capacidad de frenar el crecimiento de un microorganismo (propiedades bacteriostáticas o fungistáticas) (Smith-Palmer *et al.*, 1998) son: Contacto directo y Fase de vapor.

A partir del método contacto directo se utilizan, Dilución de agar, Dilución y microdilución, Difusión en agar y Sembrado en espiral y a partir del método Fase de vapor, los principales métodos utilizados son: Caja Petri invertida y Cámara hermética.

El método de difusión en agar ha sido probablemente el método más utilizado para determinar la actividad antimicrobiana contra microorganismos aerobios y existen dos formas de identificar la difusión y por lo tanto la efectividad del AE. En la primera, el agar solidificado se inocula con la suspensión requerida del microorganismo; un papel filtro es impregnado con una solución de concentración conocida de AE, el cual es colocado en la superficie del agar. En la segunda, se perfora el agar solidificado y previamente inoculado, usando un perforado estéril, y se vierte una solución de cierta concentración de AE en las perforaciones, posteriormente, las cajas Petri son incubadas a la temperatura y tiempo óptimos. El principio es la difusión del AE hacia todo el agar, lo que conduce a la inhibición del crecimiento bacteriano o fúngico mediante la formación

de zonas de inhibición. Lo anterior supone que el diámetro de las zonas aumentará al incrementar la concentración del AE (Bonev *et al.*, 2008).

Los resultados de la prueba de difusión en agar son generalmente cualitativos. La susceptibilidad del microorganismo en prueba está relacionada con el tamaño de la zona de inhibición en milímetros. Dependiendo de la zona de inhibición se determina si el hongo es sensible, resistente, intermedio o indeterminado (Rodríguez *et al.*, 2000).

Los microorganismos se denominan susceptibles cuando el diámetro de la zona es mayor a 30-35 mm, intermedios cuando el diámetro de la zona varía entre 20 y 30mm, o resistentes con una zona cuyo diámetro es menor a 15–20mm (López-Malo *et al.*, 2005). Entre las ventajas de este método se encuentra que la tasa de difusión de cada antifúngico en el agar es generalmente predecible y reproducible. La concentración de los antifúngicos disminuye exponencialmente difundiendo desde su punto de origen, siendo los gradientes relativamente estables sobre el periodo de tiempo requerido para ver el crecimiento del hongo (Chavez, 2006).

#### **4.6 Generalidades del tomillo (*Thymus vulgaris* L).**

Pertenece a la familia *Lamiaceae*, crece sobre suelos calizos, arcillosos y menos frecuentes en silicios. Según (Alarcon, 2011) se distribuye a alturas entre 0 a 1.800msnm. Resiste bien a las heladas y sequías, pero no el exceso de humedad. Aunque prefiere los suelos ricos y calcáreos, se adapta a los arcillosos, ligeros y silicios (Latorre, 1999).

*T. vulgaris* es una planta aromática, vivaz, leñosa, muy polimorfa, de 10 a 40cm de altura, con numerosas ramas leñosas, erectas, compactas, parduzcas o blanco-aterciopeladas (Muñoz, 1996).

Es una especie muy variable, tanto en su fenología como en la composición química de su AE, en la que ya se han detectados siete quimiotipos. Debido a

esto ha dado lugar a confusiones taxonómicas en este género, en el que se han considerado como especies distintas, a sus variedades o ecotipos (Fonnegra y Jimenez, 2006).

El AE contiene timol y carvacrol en porcentajes del 20 al 70%, y en algunas variedades su composición puede alcanzar valores hasta del 80% (Dawidowicz *et al.*, 2006). Tanto los AE obtenidos de las especies de *Thymus*, como el timol, han sido reconocidos por su actividad antibacteriana y antifúngica, razón por la cual se emplean industrialmente en la preparación de desinfectantes de uso humano, enjuagues bucales y otros agentes antimicrobianos utilizados a nivel doméstico (Rota *et al.*, 2008; Winward *et al.*, 2008) según las especies; también contiene p-cimeno, terpinenos, linalol, borneol y sus ésteres acéticos, ciñelo, geraniol, y cariofileno (Fonnegra y Jimenez, 2006).

#### **4.7 Generalidades del orégano brujo (*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng).**

Pertenece a la familia *Lamiaceae* es considerada nativa de las regiones tropicales de Asia Oriental y fue introducida en Cuba, otras Antillas y algunos países de América Continental (Menéndez-Castillo y Pavón-González, 1999)

Es una hierba perenne, suculenta, de hojas anchamente aovadas de bordes dentados, peciolo grueso y flores violáceas en espigas terminales con fuerte olor característico a orégano (Acosta, 1996).

Las hojas contienen AE con azúcares reductores, fenoles, triterpenos y esteroides, flavonoides, principios amargos y aminos. La evaluación físico-química del AE de las hojas ha reportado al carvacrol como el componente principal, el cual se considera uno de los responsables de su acción bacteriostática, se presenta con valores superiores al 40%. (Basla, 1981; Timor *et al.*, 1991) y (Vizoso-Parra *et al.*, 1999) encontraron que el A.E de sus hojas presentan una

fuerte actividad citotóxica y genotóxica significativa frente al hongo *Aspergillus nidulans* D-30.

#### 4.8 Generalidades del Limoncillo (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf)

*C. citratus* (DC) Stapf es una planta herbácea, aromática de clima tropical o subtropical pertenece de la familia Poaceae (Gramineae), su nombre común es limonaria (Quintero *et al.*, 1999).

Responde a cualquier tipo de suelo, siempre y cuando no sean muy compactos o estén mal drenados y crece en alturas de hasta 1700 msnm (Acosta y Rodríguez-Ferrada, 2006; Leal *et al.*, 2003; Soto-Ortiz *et al.*, 2002; Soto-Ortiz *et al.*, 2003). En Colombia *C. citratus* (DC) Stapf está adaptado a los diversos pisos climáticos.

La planta *C. citratus* (DC) Stapf, es una hierba perenne con una vida promedia larga y crece hasta 1 m, posee tallo redondo corto y ramificado que origina numerosas macollas; presenta hojas lanceoladas, pubescentes, de color verde y superficie áspera y cortante que emanan un olor característico a lima o limón (Acosta y Rodríguez-Ferrada, 2006; Fernández-Pola, 1996; Gupta, 1995).

A *C. citratus* (DC) Stapf se le atribuyen propiedades sedantes, hipnóticas, analgésicas, antiespasmódicas, antipiréticas, antisépticas, antiinflamatorias, antihipertensivas y antirreumáticas (Carbajal *et al.*, 1989; Carlini *et al.*, 1986; Gupta, 1995).

El AE obtenido a partir de las hojas de *C. citratus* posee un elevado contenido de citral, que representa entre 70-80% del total de la esencia, el cual es usado como materia prima para la síntesis de compuestos aromáticos y vitamina A, además de emplearse en perfumería (Chisowa *et al.*, 1998; Figueirinha *et al.*, 2008; Kasali *et al.*, 2001; Puatanachokchai *et al.*, 2002; Rao y Sunita, 1992),

debido a su alto contenido de citral, presenta una efectiva actividad antibacterial y antifúngica frente a un amplio espectro de microorganismos, entre ellos, *Aspergillus niger*, *A. ochraceus*, *Fusarium culmorum*, *Staphylococcus aureus*, *Beneckea natriegens*, *Salmonella pullorum*, *Citrobacter freundii* y *Clostridium perfringens*, entre otros (Baratta *et al.*, 1998; Lis-Balchin *et al.*, 1998). También se ha evaluado la capacidad antioxidante de los AE, extractos alcohólicos e infusiones de *C. citratus* en diversos ensayos; obteniéndose resultados importantes (Sacchetti *et al.*, 2005).

#### 4.9 Generalidades de *Fusarium* sp

*Fusarium* es un género de hongos de distribución universal, ubicuos que se caracterizan por ser hongos hialinos filamentosos, reportados por algunos autores como parásitos facultativos de numerosos hospederos, en los que se incluyen plantas, humanos y animales (Summerell *et al.*, 2001; Tosti *et al.*, 2000).

*Fusarium* es un género anamórfico o Fungi imperfecti perteneciente a los ascomicetos del orden *Hypocreales*, clase *Euascomycte* Familia *Hypocreaceae* (Guarro, 2012; Leslie y Summerell, 2006). La fase sexual o perfecta (también llamada teleomórfo) se encuentra en los géneros *Albonectria*, *Gibberella* y *Haematonectria* (Leslie y Summerell, 2006).

Las principales especies patógenos de plantas son *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides* (*moniliforme*) además de ser las especies aisladas con mayor frecuencia (Chade *et al.*, 2003; Nuccy y Anaissie, 2007).

Macroscópicamente *Fusarium* sp, se caracteriza por producir colonias de crecimiento rápido, produciendo micelio generalmente aéreo, abundante, algodonoso y con coloración blanca al principio, pero conforme madura adquiere un color crema o amarillo pálido y bajo ciertas condiciones adquieren una tonalidad rosa pálido, rojo o púrpura dependiendo de la especie (Díaz de Castro *et*



*al.*, 2007). Microscópicamente *Fusarium* sp puede producir tres tipos de conidias y mesoconidias, microconidias, macroconidias y clamidosporas (Acevedo-Granados, 2013).

## 5. Antecedentes

La utilización de plantas con propiedades biocidas es un instrumento tecnológico importante dentro del manejo ecológico de plagas, pues pueden ser sustitutos naturales de los insecticidas y fungicidas químicos (Álvarez, 2005). La existencia actual de diversas clases de antifúngicos naturales y biológicos, como los AE en la agricultura, los cuales han tenido un impacto positivo en el control de diversos fitopatógenos, entre ellos los del género *Fusarium* (Hashem *et al.*, 2010; Seseni *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2016) se han usado ampliamente como medicamentos tradicionales para mejorar la salud o curar enfermedades en humanos (Brenes y Roura, 2010; Kim *et al.*, 2008).

*Fusarium* sp es un patógeno de cultivos solanáceos como *Solanum quitoense* (Rojas, CM., Muñoz, LA., Terán, VF., Prado, FA., y Magally, 2010), y tomate (González, 2006), de *Passifloras*, como maracuyá (CORPOICA Huila, 2008; González *et al.*, 2002), en *Cucurbita moschata* Duch (Ortiz *et al.*, 2014), y marchitamiento vascular del clavel (Arbelaez y Calderón, 1991).

Se han encontrado trabajos que revelan que las especies vegetales a evaluar poseen numerosas actividades biológicas.

Entre los estudios relacionados con los AE de *Thymus vulgaris* L., se encontró el de (Marino *et al.*, 1999) quienes demostraron que éstos poseen potencial significativo como antiparasitario, antiséptico, antiespasmódico y antimicrobiano. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng se cita con mayor frecuencia en la literatura por sus propiedades y usos medicinales (Lukhoba *et al.*,

2006). Según (Braga-Gonçalves *et al.*, 2012) los AE de *P. amboinicus* presentan efecto bactericida frente a *Klebsiella pneumoniae* con una pérdida completa de la viabilidad bacteriana; sumado a lo anterior (Galvão Rodrigues *et al.*, 2013) mostraron que los AE de *P. amboinicus* y dos especies más del género, inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 13135, *Bacillus cereus* ATCC 33018, *Staphylococcus aureus* ATCC 12692 y una cepa multiresistente *Staphylococcus aureus* SA 358, esto proporcionó una nueva perspectiva frente al problema de resistencia bacteriana a los antibióticos. Además un estudio de (Selvakumar *et al.*, 2011) con los AE de *P. amboinicus* demostró que éstos junto a *Eucalyptus globules* pueden ser utilizados para establecer un compuesto natural como agente anticarpa que puede usarse para la producción de fármacos antimicóticos potenciales y sumado a esto se encuentra la investigación de (Velasco *et al.*, 2013) quienes demostraron que el AE de *P. amboinicus* presentan actividad antibacteriana contra patógenos entéricos importantes (*Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Escherichia coli* diarreogénico y *Vibrio* sp.). Los AE de *Cymbopogon citratus* (DC) y sus compuestos volátiles pueden inhibir una variedad de bacterias y hongos que se sabe que son los principales organismos causantes de varios patógenos almacenados y transmitidos por los alimentos (Abdulazeez *et al.*, 2016).

La eficacia antimicrobiana o antifúngica en general de los AE se puede atribuir a la actividad de compuestos terpenoides. (Knobloch *et al.*, 2011) señalan que la actividad de los AE se debe a la solubilidad en la bicapa de fosfolípidos de las membranas celulares ya que se ha encontrado que los terpenoides que se caracterizan por su labilidad interfieren con las reacciones enzimáticas del metabolismo energético.

El AE de *T. vulgaris.*, posee como componentes principales el timol y carvacrol (Ortuño-Sánchez, 2006; Queiroz *et al.*, 2012; Walentowska y Flaczyk, 2013). Los AE de *Cymbopogon citratus.*, tienen como compuesto más abundante el  $\alpha$ -citril y su isómero  $\beta$ -citril (Poonpaiboonpipat *et al.*, 2013; Sharapin, 2000) y

el AE de *P. amboinicus* posee como componente mayoritario el carvacrol (Galvão Rodrigues *et al.*, 2013; León-Méndez *et al.*, 2015; Velasco *et al.*, 2013). Todos estos compuestos mayoritarios clasificados en terpenos fenólicos.

Entre los estudios relacionados con las especies vegetales que hacen parte de este trabajo y representan fuentes viables de alternativas para la protección de cultivos frente a fitopatógenos o que han tenido efectos positivos como antimicrobianos o antifúngicos se encuentran: el de (Carrillo *et al.*, 2010) quienes evaluaron ocho AE: *Origanum vulgare*, *Mentha piperita*, *Salvia officinalis*, *Ocimum basilicum*, *Rosmarinus officinalis*, *Origanum majorana*, *Thymus vulgaris* y *Pogostemon cablin*, con diferentes metodologías sobre el crecimiento de *Phytophthora infestans* en condiciones de laboratorio, encontrándose que los AE que mostraron efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *P. infestans*, fueron los de *T. vulgaris* y *M. piperita*, los cuales redujeron el crecimiento del hongo en 92,1 y 89,9% respectivamente y que las metodologías más apropiadas son aquellas en las que el aceite ejerce efecto volátil. Otro estudio realizado por (Abdulazeez *et al.*, 2016) en donde se evaluó el aceite esencial de *C. citratus* por medio de la fase de vapor contra patógenos poscosecha de clavel: *Coccodes de Colletotrichum*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*, *Rhizopus stolonifera* y *Aspergillus niger* *in vitro* mostró que el AE redujo significativamente el desarrollo de las colonias, e *in vivo* se descubrió que el aceite prolonga la vida útil y las propiedades sensoriales del mejillón y los vegetales refrigerados. Los informes sugieren que el AE de limoncillo es un complejo natural de sabor seguro, conservante e inhibidor del deterioro de los alimentos, capaz de reducir el riesgo de enfermedades asociadas con productos contaminados.

En adición, en otro trabajo científico con resultados positivos está el de (Borugă *et al.*, 2014), quienes realizaron un estudio para determinar la composición química y las propiedades antimicrobianas del aceite esencial de *Thymus vulgaris*. Su actividad antimicrobiana se evaluó en 7 bacterias y hongos comunes relacionados con los alimentos: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*

*aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*, mediante el uso del método de difusión en disco, utilizando cantidades puras del AE (5, 10, 15 y 20  $\mu\text{L}$ ). Los resultados demuestran que el aceite esencial de *Thymus vulgaris* probado posee fuertes propiedades antimicrobianas, y puede representar en el futuro una nueva fuente de antisépticos naturales con aplicaciones en la industria farmacéutica y alimentaria.

El estudio de (Božik *et al.*, 2016), quienes exploraron el potencial de seis aceites esenciales obtenidos de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Nees.), Tomillo (*Thymus vulgaris* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.), clavo de olor (*Syzygium aromaticum* L.), limoncillo (*Cymbopogon citratus* [DC] Stapf.) y jengibre (*Zingiber officinale*)Rosc.), utilizando como metodología la fase de vapor y microdilución frente a tres cepas de patógenos poscosecha: *Aspergillus parasiticus*, *A. flavus* y *A. clavatus* aislados de la avena, arrojó resultados excelentes ya que los AE de tomillo, óregano, clavo de olor y limoncillo son altamente efectivos en fase de vapor y podrían ser potencialmente utilizados en la lucha contra patógenos fúngicos poscosecha. Sin embargo, debido a su fuerte aroma y sabor, no todos son aceptables para los consumidores.

En algunos estudios no ha habido resultados tan efectivos, según (Santos *et al.*, 2015), quienes evaluaron la actividad antibiótica y la actividad modificadora de antibacterianos en combinación con enjuague bucal del aceite esencial de *Plectranthus amboinicus* Lour, frente a una cepa de *Streptococcus mutans*, microorganismo causante de la placa dental, se obtuvo que aceite esencial combinado con el enjuague bucal fue eficaz para inhibir el crecimiento bacteriano, pero este resultado fue menor que con la clorhexidina sola, que es utilizada para combatir este patógeno.

En lo que respecta al apoyo de los aceites esenciales como agentes naturales para el control de la enfermedad frente a la marchitez ocasionada por

*Fusarium* se encuentran el de (Seseni *et al.*, 2015), ellos evaluaron 10 aceites esenciales disponibles comercialmente: naranja dulce (*Citrus sinensis*), citronela (*Cymbopogon nardus*); mandarina (*Citrus reticulata*); pomelo (*Paraíso Cítrico*); alcanfor (*Cinnamomum camphora*); clavo de olor (*Syzygium aromaticum*); menta verde (*Mentha spicata*); limoncillo (*Cymbopogon citratus*) y tomillo (*Thymus vulgaris*); geranio rosa (*Pelargonium graveolens*, éstos AE fueron evaluados *in vitro* contra cuatro cepas de *Fusarium* (*F. circinatum*, *F. oxysporum*, *F. circinatum* mat 1, *F. circinatum* mat 2). Las propiedades antifúngicas de los AE se determinaron incorporándolos en el medio de cultivo a concentraciones crecientes que oscilaron entre 100 a 1000µl/L. De los 10 aceites esenciales analizados a 1000µl/l, solo el de limoncillo, clavo de olor y tomillo pudieron controlar totalmente el crecimiento micelial, mostrando inhibición total frente a las cuatro especies de *Fusarium* seleccionadas.

(Sharma *et al.*, 2016), evaluaron el efecto antifúngico de cuatro aceites esenciales, clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), hierba de limón (*Cymbopogon citratus*), menta (*Mentha piperita*) y eucalipto (*Eucalyptus globulus*) contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* 1322. Además, se estudió el efecto del aceite esencial de clavo de olor sobre la morfología de las hifas y las esporas a través del microscopio electrónico de barrido (SEM) y el microscopio de fuerza atómica (AFM), respectivamente. *En vivo* se realizaron bioensayos para evaluar la capacidad del aceite de clavo para reducir el marchitamiento causado por *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici* 1322 en plantas de tomate. La actividad fúngica se evaluó mediante la técnica de comida envenenada. La determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los aceites esenciales se determinó mediante el método de microdilución en caldo. La investigación reveló que todos los aceites esenciales probados tenían actividad antifúngica *in vitro* moderada a alta frente a *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici* 1322. La eficacia de los aceites esenciales contra el patógeno fue del orden del aceite de clavo de olor> limoncillo> menta> eucalipto.

Aunque la actividad biológica de los AE de *Thymus vulgaris* L, *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng, y *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, ha sido confirmada con las metodologías en donde se utilizan los AE diluidos en solventes orgánicos, se ha observado que éstos generalmente poseen alta efectividad cuando ejercen actividad volátil (Abdulazeez *et al.*, 2016; Božik *et al.*, 2016; Carrillo *et al.*, 2010) permitiendo mejor visualización del efecto inhibitorio, por ende en esta investigación se aplicaran los aceites esenciales puros de cada una de las especies como lo reporta (Borugă *et al.*, 2014; Quintanilla *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2009).

## 6. MARCO METODOLÓGICO

### 6.1 Colección y clasificación del material vegetal

*T. vulgaris* L. se colectó a N 2°24'46"; W 76° 32'15"; Altitud 2140msnm en el municipio Popayán, corregimiento Santa Bárbara, vereda Pisojé Bajo al Nor-Oriente de Popayán. *P. amboinicus* (Lour.) Spreng se colectó en el antejardín de la casa de la investigadora del Proyecto en la ciudad de Popayán (N. 2° 26' 18.4"; W 76° 36' 42" ; Altitud 1760msnm, cabe destacar que el lugar de procedencia de ésta planta fue vía San Pablo en El Guayabal a N 2° 4' 53" ; W 76° 59' 47" ; Altitud 830msn. *C. citratus* (DC) Stapf fue colectada en el Municipio de Santander de Quilichao Departamento del Cauca a N 2°59'3"; W 76°6'; Altitud 1071msnm. Para tener plena identificación de las especies colectadas, fueron llevadas al Especialista Bernardo Ramírez del Herbario de la Universidad del Cauca.

Una vez identificado el material vegetal se seleccionaron hojas con apariencia sana, se hizo lavado con agua destilada, se pesó el material húmedo utilizando Balanza triple brazo (TRIPLE BEAM 700/800 SERIES Chaus), se picó a mano, y se dispuso a secar a temperatura ambiente durante 8 días para *T. vulgaris* L y *C. citratus* (DT) Stapf y 25 días para *P. amboinicus* (Lour.) Spreng.



**Figura 2.** Balanza triple brazo (TRIPLE BEAM 700/800 SERIES Chaus)



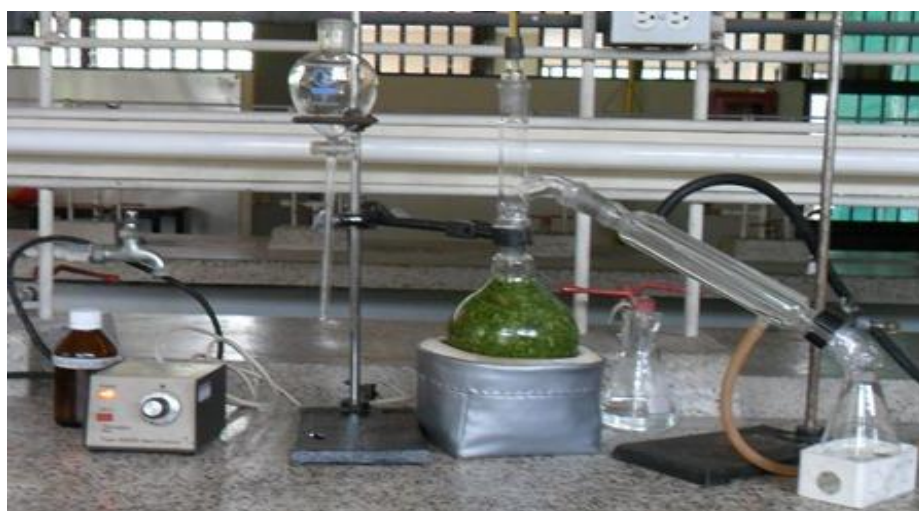
**Figura 3.** Material vegetal dispuesto para secado (*T. vulgaris* L., *P. amboinicus* (Lour.) Spreng y *C. citratus* (DC) Stapf.)

## **6.2 Protocolo de extracción del AE del material vegetal de las especies de *T.vulgaris* L., *P. amboinicus* (Lour) Spreng y *C. citratus* (DC) Stapf.**

Procedimiento que se realizó utilizando destilación por arrastre de vapor de agua como técnica de laboratorio para la extracción continua del AE. Se emplearon gramos (Tabla 1) de hojas secas picadas de Tomillo, Orégano brujo y Limoncillo, utilizando como disolvente agua destilada los cuales fueron cargados en un balón aforado de fondo redondo de 1000mL. La estructura de la

metodología es como sigue: el vapor de agua es inyectado mediante un distribuidor interno, próximo a su base y con la presión suficiente para vencer la resistencia hidráulica del lecho. La generación del vapor es local (hervidor). Conforme el vapor entra en contacto con el lecho, la materia prima se calienta y va liberando el AE contenido y éste a su vez, debido a su alta volatilidad se va evaporando. Al ser soluble en el vapor circundante, es arrastrado, corriente arriba hacia el tope del hidroddestilador. La mezcla, vapor saturado y AE, fluye hacia un condensador, mediante un cuello cisne o prolongación de salida del hidroddestilador. En el condensador, la mezcla es condensada y enfriada, hasta la temperatura ambiental. A la salida del condensador, se obtiene una emulsión líquida inestable. La cual, fue separada en un embudo de separación. Este equipo está lleno de agua fría al inicio de la operación y el aceite esencial se va acumulando, debido a su casi inmiscibilidad en el agua y a la diferencia de densidad y viscosidad con el agua. Posee un ramal lateral, por el cual, el agua es desplazada para favorecer la acumulación de los AE (Cerpa, 2007).

Los aceites esenciales obtenidos se deshidrataron con sulfato de sodio anhidro para luego filtrarlos, conservarlos y refrigerarlos a una temperatura que no supere los 4°C en frascos ámbar herméticos.



**Figura 4.** Destilación por arrastre de vapor y extracción continua utilizando como disolvente agua.



### 6.3 Determinación de las propiedades físicas de los AE de *T. vulgaris* L., *P. amboinicus* (Lour.) Spreng y *C. citratus* (DC) Stapf.

Se determinó la densidad utilizando una pipeta capilar aforada de 1mL, en la cual se midió un volumen preciso de AE repitiéndose tres veces la medición.

El cálculo para determinar la densidad relativa de los aceites esenciales se hace mediante la ecuación (Guarnizo-Franco y Martínez-Yepes, 2009).

#### Ecuación

$$M_L = M_{LP} - M_P$$

$$M_A = M_{AP} - M_P$$

$$V_L = V_A$$

$$\rho_T = \frac{\rho_L}{\rho_A} = \frac{M_L}{M_A}$$

Dónde:

$V_L$  = Volumen del líquido.

$V_A$  = Volumen del agua.

$\rho_T$  = Densidad total.

$\rho_A$  = Densidad del agua.

$\rho_L$  = Densidad del líquido.

$M_L$  = Masa del líquido.

$M_A$  = Masa del agua.

$M_{LPCA}$  = Masa del líquido dentro de la pipeta capilar aforada.

$M_{APCA}$  = Masa del agua dentro de la pipeta capilar aforada.

$M_P$  = Masa de la pipeta capilar aforada vacía.

El índice de refracción se determinó con el Refractómetro ABBE a 25°C. El refractómetro es un equipo que permite medir de forma sencilla y rápida el índice de refracción de las sustancias sin necesidad de realizar ningún cálculo.

Para poder determinar el pH se utilizó el pH-metro 744 pH Meter Metrohm, que permite medir de manera automática la acidez o la alcalinidad que posee una sustancia.

La solubilidad se determinó en agua y en alcohol.

#### **6.4 Prueba *In vitro*.**

Procedencia del patógeno: El hongo utilizado para la evaluación antifúngica de los aceites, fue *Fusarium* sp., proveniente del cepario del Laboratorio de Biología de la universidad del Cauca. *Fusarium* sp se multiplicó en cajas Petri en agar YGC (40 g.L-1) y se incubó a 28°C ±2°C durante 72 horas.

##### **6.4.1 Determinación de la eficacia de los AE extraídos en la inhibición del crecimiento de *Fusarium* sp.**

El procedimiento se realizó de acuerdo a las metodologías descritas en los documentos M38-A2 del Instituto de estándares clínicos y del laboratorio (CLSI) y E.DEF 9.1 del Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana EUCAST (CLSI, 2008; EUCAST, 2008).

Con el fin de determinar cuál de los AE presenta mayor eficacia inhibiendo el crecimiento de *Fusarium* sp., se inóculo el patógeno en agar YGC, se realizó la siembra por triplicado, durante 48 horas a 35°C y luego a 28°C hasta completar 7 días, tiempo y temperaturas óptimas, para promover las formación de esporas. Debido a que no se observó una adecuada esporulación en el tiempo estipulado, se aumentó el tiempo de incubación a 14 días.

#### **6.4.1.1 Preparación del patrón del inóculo.**

Para estandarizar la densidad del inóculo se preparó una suspensión de esporas a partir de tres cultivos sin contaminación de 14 días de *Fusarium* sp., crecidos en medio YGC, estableciendo que éste período es el adecuado para promover la formación de esporas (Solano *et al.*, 2011).

La remoción de esporas se realizó adicionando 3mL de solución salina estéril al 0,85%, sobre las 3 cajas Petri con los cultivos puros del patógeno y se dejó sedimentar de 5 a 7min; con ayuda de un aplicador de algodón se removieron de la superficie de agar las esporas. Luego se tomaron los sobrenadantes obteniéndose de esta forma una suspensión turbia formada de conidias, trozos de hifas y micelio que fue puesta en vórtex durante cinco minutos. Para obtener suspensiones de conidios puros, se filtró a través de filtros de gasa esterilizados con el propósito de separar las conidias del micelio. Los lavados resultantes de las cajas se recogieron en un tubo estéril, y a partir de ésta suspensión inicial se ajustó la concentración a  $1 \times 10^6$  UFC/mL equivalente al standard 0.5 de turbidez en la escala McFarland (CLSI, 2008; EUCAST, 2008; Lage *et al.*, 2012).

Esta lectura se realizó en el equipo DENSIMAT.

#### **6.4.1.2 Evaluación de la actividad antifúngica de *Fusarium* sp a los AE.**

Para evaluar la sensibilidad de *Fusarium* sp., al aceite esencial se empleó el método de difusión en agar según la técnica estandarizada por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), basada en el método de Kirby-Bauer. Se depositaron 8, 10, y 15  $\mu$ L del aceite esencial puro de cada especie en discos de papel de filtro Whatman de 5 mm de diámetro que, posteriormente, fueron centrados sobre el medio inoculado con el hongo objeto de estudio y fueron, colocados en la superficie del agar. Posteriormente, las cajas Petri fueron incubadas a 28°C por 15 días. Durante este tiempo se buscó medir el

halo de inhibición del crecimiento del hongo para los tratamientos. En todos los casos la evaluación se realizó por triplicado y se empleó un control negativo, un disco de papel filtro tratado con agua destilada estéril.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Extracción del AE del material vegetal de las especies *T. vulgaris* L., *P. amboinicus* (Lour.) Spreng y *C. citratus* (DC) Stapf.

A continuación en la (Tabla 1) se expone el porcentaje de rendimiento que se obtuvo de los aceites. Para la extracción se utilizó el método de destilación por arrastre de vapor de agua de acuerdo a la metodología descrita por (Cerpa, 2007).

**Tabla 1.** Porcentaje de rendimiento de AE de *Thymus vulgaris* L., *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng y *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.

Especie	<i>T. vulgaris</i>	<i>P. amboinicus</i>	<i>C. citratus</i>
Peso material húmedo de la planta (g)	1799	1684.5	2093
Peso material seco de la planta (g)	361.2	895.2	1791
Cantidad de AE (mL)	5.0	2.5	5.7
Cantidad de AE (g)	4,21	2.29	5.08
Rendimiento	1.16%	0.255%	0.283%

El rendimiento de la extracción del aceite esencial de las especies vegetales, se obtuvo por medio de la presente ecuación (Granados, Yáñez y Acevedo 2013).

$$P = \frac{M1}{M2} \times 100\%$$

Dónde:

P=Porcentaje de rendimiento de la extracción

M1=Masa final del aceite (g)

M2=Masa inicial del material vegetal en base seca (g).

Cálculos:

Rendimiento de ***Thymus vulgaris L***

$$\frac{4.21}{361.2} \times 100\% = 1.16\%$$

Rendimiento de ***Plectranthus amboinicus (Lour.) Spreng***

$$\frac{2.29}{895.2} \times 100\% = 0.255\%$$

Rendimiento de ***Cymbopogon citratus (DC) Stapf.***

$$\frac{5.08}{1791} \times 100\% = 0.283\%$$

En el presente trabajo de investigación se consiguieron los siguientes rendimientos: para *C. citratus* se obtuvo un rendimiento de 0.283%(v/w), comparado con los resultados de (Boukhatem *et al.*, 2014) quienes obtuvieron un rendimiento de extracción de 0.6% (v/w). Para *Plectranthus amboinicus L* se obtuvo un rendimiento bueno que fue de 0.255% comparado con el de (León-Méndez *et al.*, 2015) que fue de 0.05%, a pesar de que las hojas de esta especie vegetal almacenan bastante agua y el secado requiere de mayor tiempo. En cuanto a *T. vulgaris* el rendimiento de aceite esencial: 1.16%(v/w) un resultado bastante alto comparado con resultados obtenidos por (Cano-Morales *et al.*, 2001) de 0.40490% a partir de material vegetal cultivado a 2380msnm, la cual es una altitud muy similar a donde obtuvimos el material vegetal para nuestra investigación: 2140msnm. El rendimiento de AE en las especie *P. amboinicus* y *T. vulgaris* puede estar relacionado a factores de estrés como las condiciones ambientales y agronómicas, además de el genotipo, la variación geográfica, la época de cosecha y la edad de la planta (Figueiredo *et al.*, 2008).

Según(Cano-Morales *et al.*, 2001), un tratamiento post cosecha inadecuado significa una materia prima de mala calidad con pérdida de principios activos, para evitar estos resultados indeseables se prefiere utilizar una materia prima seca que una fresca, por lo tanto el secado es una parte del procesamiento muy importante y decisivo para obtener resultados buenos de rendimiento. (Poole *et al.*, 1990), expresan de que el éxito en la extracción está muy relacionado principalmente con la naturaleza exacta de las partes de la planta, y según (Hernández *et al.*, 2009) los factores más comunes que afectan críticamente el rendimiento de cualquier extracción de especies vegetales, en este caso de los AE, son las propiedades de la matriz de la muestra, la temperatura, la presión y la duración del proceso dependiendo de la temperatura. El rendimiento de los AE se ve afectado también debido a que las especies vegetales poseen compuestos con elevada volatilidad, que se evaporan en el proceso de extracción además que se adhieren al material de vidrio debido a su viscosidad. Todos estos factores pudieron haber influido en el rendimiento de los AE extraídos para este estudio.

## 7.2 Determinación de las propiedades físicas de los AE de *T. vulgaris* L., *P. amboinicus* (Lour.) Spreng y *C. citratus* (DC) Stapf.

A cada indicador se le realizó un promedio de 6 datos (densidad, índice de refracción y pH)

**Tabla 2.** Valores de densidad, índice de refracción y pH de los AE de *Thymus vulgaris* L., *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng y *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.

Indicadores	<i>T. vulgaris</i>	<i>P. amboinicus</i>	<i>C. citratus</i>
Densidad (g/mL)	0,843	0.918	0,892
Índice de Refracción (20°C)	1,490	1.475	1,477
pH	5.7	6.1	4,5
Color	Amarillo translucido	Amarillo translucido	Amarillo translucido
Solubilidad en agua	Negativa	Negativa	Negativa
Solubilidad en alcohol (70%)	Positiva	Positiva	Positiva

El análisis físico es una de las técnicas instrumentales disponibles para garantizar la calidad de un AE, es una técnica simple, barata y rápida para identificar falsificaciones graves (Tiên Do *et al.*, 2014) y la adición de volátiles más baratos de otras fuentes naturales (Koenig y Hochmuth, 2004).

Los valores para *T. vulgaris* de índice de refracción y densidad utilizando hidrodestilación por arrastre de vapor, son cercanos a los reportados por (Ahmed-Al.Maqtari *et al.*, 2011), D=0,945g/mL; IR=1,4800. Los de (Soto-Mendivil *et al.*, 2006), D=0,939g/mL; IR=1,4914.

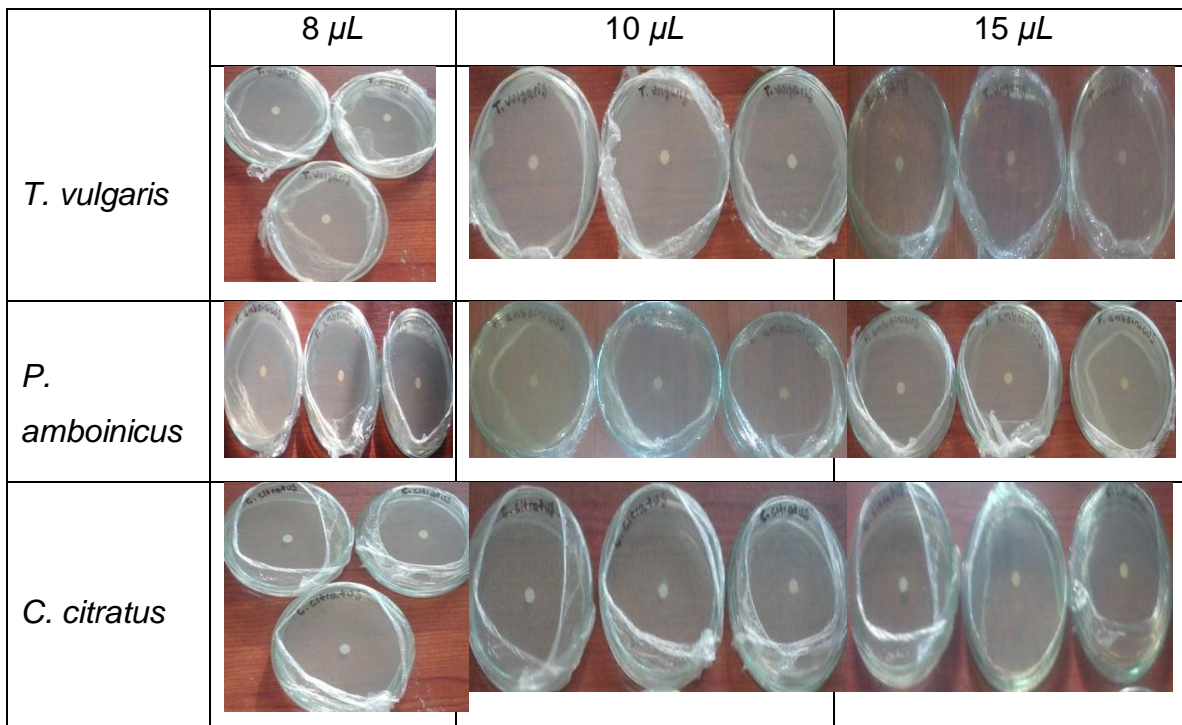
Los valores para *P. amboinicus*, de índice de refracción, densidad, color y solubilidad en alcohol al 70% utilizando hidrodestilación por arrastre de vapor, coinciden con los datos reportados por (León-Méndez *et al.*, 2015), D=0,9471g/mL; IR=1,4753; Color= amarillo palido y Solubilidad EtOH 70% (V/V)=positiva.

Los valores para *C. citratus*, de índice de refracción color y densidad son similares a los informados por (Vázquez-Briones *et al.*, 2015), D= 0.873; IR=1.483; y los parámetros de color que indican un tono amarillo. (Tovar *et al.*, 2011) D= 0,885g/mL; IR= 1,482; (Essien *et al.*, 2008), D = 0,888 g / mL; IR = 1,477 y (Monteiro *et al.*, 2011), D = 0,949 g / mL; IR = 1,332.

El comportamiento de solubilidad en OH 70% (V/V)=positiva para los AE de las tres especies vegetales, se debe principalmente al contenido de compuestos oxigenados en los AE. La presencia de compuestos oxigenados aumenta la afinidad por el solvente y, adicionalmente, los aldehídos y alcoholes poseen la capacidad de formar puentes de hidrógeno; por tal razón, el contenido de compuestos oxigenados, además de proveer las notas aromáticas agradables a los AE, aumentan su solubilidad en etanol haciéndolos más aptos para su aplicación en la industria (Albaladejo, 1999; Granados *et al.*, 2012; Torrenegra *et al.*, 2015).

### 7.3 Determinación de la eficacia de los AE extraídos en la inhibición del crecimiento de *Fusarium sp.*

En la presente investigación sobre los AE utilizados de *Thymus vulgaris* L., *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng y *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., frente a *Fusarium sp.*, se determinó que los tres AE presentan actividad antifúngica ya que se observó inhibición total del crecimiento del hongo, para las 3 cantidades de AE evaluadas.



**Figura 5.** Respuesta de sensibilidad del patógeno *Fusarium sp* a los AE, *in vitro*,

Ensayo (15 días).



**Figura 6.** Respuesta de sensibilidad del patógeno *Fusarium sp* al control negativo,

a nivel *in vitro*, Ensayo (15 días).



**Tabla 3.** Promedio del porcentaje de inhibición (%) del efecto de aceites esenciales y el control negativo sobre el crecimiento micelial de *Fusarium* sp., a los 15 días de incubación a 25 °C.

<b>Tratamientos</b>	<b>1</b>	<b>2</b>			<b>3</b>			<b>4</b>		
<b><math>\mu\text{L(AE)}</math></b>	8	8	10	15	8	10	15	8	10	15
<b>% Inhibición</b>	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Tratamientos

1 → Agua destilada estéril (control negativo (-))

2 → AE de *T. vulgaris*

3 → AE P de *P. amboinicus* (Lour.) Spreng

4 → AE de *C. citratus* (DC) Stapf

En la (Tabla 3), se presenta que los AE de *T. vulgaris* L., *P. amboinicus* (Lour.) Spreng y *C. citratus* (DC) Stapf., frente a *Fusarium* sp., prueban una total inhibición del crecimiento micelial, esporulación y germinación de las esporas a dosis de 8, 10, y 15  $\mu\text{L}$ . La tasa de crecimiento para estas dosis fue de 0,0 comparada con el control negativo (Tratamiento 1), que tuvo un crecimiento radial total y fue de 4.5 cm d-1. (Figura 7)

**Tabla 4.** Seguimiento de crecimiento de *Fusarium* sp frente a los tres AE y al control positivo.

<b>Cantidades de AE de especies vegetales</b>	<b>Seguimiento crecimiento de <i>Fusarium</i> sp (días)</b>														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
	<b><i>T. vulgaris</i></b>														
8 $\mu$ L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 $\mu$ L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15 $\mu$ L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<b><i>P. amboinicus</i></b>														
8 $\mu$ L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 $\mu$ L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15 $\mu$ L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<b><i>C. citratus</i></b>														
8 $\mu$ L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 $\mu$ L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15 $\mu$ L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Control negativo (cm)d<sup>-1</sup></b>	0	2	2.5	3.2	3.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5

Se sabe que la composición de los aceites esenciales varía según la región geográfica, la edad de la planta y los métodos de extracción. Estos resultados evidencian que los parámetros de colecta fueron buenos pues los tres AE poseen excelentes potencialidades antifúngicas frente al patógeno evaluado, lo que nos permite inferir de su posible uso para combatir enfermedades que ocasiona *Fusarium* sp., en la agricultura, como la marchitez vascular en maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*), pudrición en frutos cítricos, marchitez en los cultivos de Lulo (*Solanum quitoense*) entre otras enfermedades producidas por éste hongo.

Los resultados obtenidos en este trabajo de inhibición total de los tres AE en las tres dosis propuestas frente al fitopatógeno y evidencias actuales de investigaciones realizadas con AE manifiestan el hecho de que los AE con un alto porcentaje de compuestos terpenoides del tipo fenólicos poseen grandes propiedades antifúngicas. Esta potencia podría atribuirse a la presencia de compuestos fenólicos tales como carvacrol, timol (Chavan y Tupe, 2014; Cosentino *et al.*, 1999; Juliano *et al.*, 2000) y el monoterpeno aldehído citral que

según (Luo *et al.*, 2004) informaron que podría inhibir eficazmente bacterias y hongos.

Para (Isman, 2006) el comportamiento de los AE puede estar asociado a la cinética de evaporación de los AE, que conlleva a una mayor concentración de vapores durante el periodo inicial de evaluación. Otro aspecto que pudiera influir, son los cambios en el tiempo de la composición cuantitativa de los compuestos bioactivos en la fase vapor de los aceites. Los resultados obtenidos se relacionan con las características de los aceites esenciales como sustancias volátiles que producen un efecto biológico.

Investigaciones han mostrado que los AE de éstas especies poseen actividad antifúngica muy fuerte, es así como (Bravo *et al.*, 2000) encontraron que el timol inhibe en un 100% el desarrollo micelial del hongo fitopatógeno *Fusarium moniliforme*, e igualmente (Muller-Riebau *et al.*, 1995) registran que el timol y su isómero estructural, carvacrol, inhiben completamente el crecimiento micelial de los hongos *Rhizoctonia solani*, *Fusarium moniliforme*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Phytophthora capsici* a 100 mg/L. También (ALZATE O *et al.*, 2009) muestra que el timol a 125 mg/L y el citral a 300 mg/L, inhiben el crecimiento micelial la esporulación y la germinación de las esporas de *Colletotrichum acutatum* causante de la antracnosis del tomate de árbol. Asimismo, (Hernández *et al.*, 2003) reportan que este compuesto “timol” inhibió totalmente el crecimiento micelial de los hongos *Microsporum canis* y *Trichophyllum mentagrophytes* a 100 mg/L y de *T. rubrum* a 50 mg/L. En el caso del AE de *P. amboinicus*, (Pushpa *et al.*, 2008) encontraron que éste es eficaz contra varios hongos, ya que inhibía el crecimiento radial de los micelios y exhibía amplias propiedades fungitóxicas contra *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus oryzae*, *Candida versatilis*, *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.*, y *Saccharomyces cerevisiae*.

La incidencia de enfermedades ocasionadas por el género *Fusarium* es una de las principales causas de la pérdida de algunos productos agrícolas, ya que afecta la calidad en el proceso productivo. Sin embargo, el mercado cuenta con productos muy eficientes para controlar las afecciones ocasionada por éstos patógenos, que están elaborados a base de triazoles, estrobilurinas, benzimidazoles y mezclas con triazoles, pero a pesar de que han demostrado ser una práctica efectiva, económicamente es poco viable para el manejo de estos patógenos, ya que puede afectar a los organismos antagónicos benéficos actuando como agentes mutagénicos de las plantas y dejando al suelo desprotegido ante un nuevo ataque del hongo y en el peor de los casos su uso indiscriminado puede generar poblaciones fungosas resistentes (Agris, 2005; Besoaín, 1989; Sivakumar, D *et al.*, 2014).

De esta manera se hace importante esta investigación pues los aceites esenciales de estas tres especies extraídos relacionada con la actividad antifúngica frente a *Fusarium* sp es una opción atractiva para futuras investigaciones sobre alternativas a los fungicidas sintéticos para el control de las enfermedades provocadas por éstos patógenos.

## 8. Conclusiones

La técnica de hidrodestilación permitió extraer en total 3 aceites esenciales de las tres especies vegetales (*T. vulgaris*, *P. amboinicus*, *C. citratus*) con un porcentaje de rendimiento de 1.16, 0,255 y 0,283 % respectivamente.

Se logró evaluar la capacidad antifúngica *in vitro* de tres aceites esenciales puros frente al fitopatógeno *Fusarium* sp., donde los tres aceites esenciales usados en sus tres dosis diferentes (8, 10 y 15  $\mu$ L), mostraron el porcentaje máximo de inhibición micelial en comparación al control negativo (discos

impregnados con agua destilada estéril) donde *Fusarium* sp creció, indicando con esto que *Fusarium* sp es susceptible a los tres aceites esenciales probados en las tres cantidades pues el diámetro de la zona de inhibición es mayor a 30-35 mm.

Los resultados presentados a través de esta investigación evidencian la potencialidad antifúngica de los tres aceites esenciales, Tomillo (*Thymus vulgaris* L) Orégano brujo (*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng) y Limoncillo (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf) sugiriendo que la utilización de éstos tres AE es una opción atractiva para futuras investigaciones sobre alternativas a los fungicidas sintéticos para el control de las enfermedades ocasionadas por *Fusarium* sp.

Los resultados obtenidos se convertirán en soporte para investigaciones posteriores, que apoyen la aplicación y el aprovechamiento de estas especies vegetales frente a éste fitopatógeno, tomando en consideración la amplia disponibilidad y facilidad de cultivo de las especies.

El éxito de los AE de las tres especies evaluadas en la inhibición de *Fusarium* sp, como se muestra en este estudio, es una herramienta potencial para en estudios posteriores y frenar la enfermedad del marchitamiento por *Fusarium* tanto de forma preventiva como terapéutica, entre otras enfermedades

Teniendo en cuenta que la prueba se ha realizado *in vitro*, el siguiente paso es evaluar los AE *in vivo* para confirmar si la infección puede ser inhibida por los AE.

## 9. Recomendaciones

Resulta necesario realizar nuevas evaluaciones con dosis más bajas que permitan determinar la concentración mínima inhibitoria de los tres aceites

esenciales frente a *Fusarium sp*; pero estos resultados sirven de punto de partida para experimentos posteriores, además de demostrar la actividad antifúngica promisorio del aceite esencial de Tomillo (*Thymus vulgaris L*), Orégano brujo (*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng) y Limoncillo (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf) frente al patógeno evaluado.

Nuevos plaguicidas basados en estos tres aceites esenciales podrían constituir una alternativa eficaz y ambientalmente segura para el control de afectaciones fúngicas en cultivos provocadas por éste fitopatógeno estudiado, como los cultivos de Maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var *flavicarpa*), frutos cítricos y el Lulo (*Solanum quitoense*).

## BIBLIOGRAFÍA

- Abdulazeez, M.A., Abdullahi, A.S., James, B.D., 2016. Lemongrass (*Cymbopogon spp.*) Oils. Chapter 58– Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety 2016 Pages 509–516.
- Acevedo-Granados, Y.F., 2013. TAXONOMIA MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE *Fusarium* OBTENIDOS A PARTIR DE MUESTRAS CLÍNICAS (Tesis de Maestría). Univ. Nac. Colomb. Sede Medellín.
- Acosta de la Luz, LL y Rodríguez-Ferrada, C., 2006. Plantas medicinales: bases para su producción sostenible. Agrinfor, Impresiones MINAG La Habana, . 203 pp. 91–92.
- Alarcón, J. J (2011). Plantas aromáticas y medicinales Enfermedades de importancia y sus usos terapéuticos. Medidas para la Tempor. Invernal 1, 48.
- Acosta L, 1996. Cultivo del Orégano francés para la producción de fitofármacos.
- Agrios, G., 2005. Plant pathology. Nueva York. Amsterdam. Elsevier Acad. Press 922p 5ed.
- Agrios, G.N., 2007. Fitopatología México: Limusa.
- Ahmed-Al.Maqtari, M.A., Mohammed-Alghalibi, S., Ebtessam Hasan-Alhamzy, E., 2011.

Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Thymus vulgaris* from Yemen. Department of Chemistry Faculty of Science, Sana'a.

Alarcon, J. jairo, 2011. Plantas aromáticas y medicinales Enfermedades de importancia y sus usos terapéuticos. Medidas para la Tempor. invernal 1, 48. <https://doi.org/00.09.36.12.C>

A Ibaladejo, Q., 1999. El Aceite Esencial de limón producido en España. Contribución a su evaluación por Organismos Internacionales. Universidad de Murcia, Facultad de Veterinaria, Departamento de Tecnología.

Alkins, P.W., Jones, L.L., 2006. Principios de Química, Los caminos del descubrimiento. 3ª Edición. Editor. Panam. Oxford University. University of Northem Colorado.

Álvarez, D., 2005. Influencia de la aplicación de algunas sustancias de origen botánico en el comportamiento de plagas del tomate (*Lycopersicon sculentum*).

ALZATE O, Diego A, MIER M, Gonzalo I, AFANADOR K, Lucía, DURANGO R, Diego L, & GARCÍA P, C.M., 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. *Vitae*, 16(1), 116-125. Retrieved October 05, 2017,.

Arango-Bedoya, O., Hurtado-Benavides, AM., Pantoja-Daza, D y Santacruz-Chazatar, L., 2014. Actividad inhibitoria del aceite esencial de *Lippia origanoides* H.B.K sobre el crecimiento de *Phytophthora infestans* Facultad d, Ciudad Universitaria Torobajo, San Juan de Pasto,.

Arbelaez, G., Calderón, O., 1991. DETERMINACION DE LAS RAZAS FISIOLÓGICAS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* DEL CLAVEL EN COLOMBIA.

Arbeláez, G., 2000. Algunos aspectos de los hongos del género *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum* *Agronomía*, 17, 11–22.

Asbahani, AE., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Aït Addi, A, EH., Casabianca, H., Mousadik El., Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, FNR y Elaissari, A., 2015. Essential oils: from extraction to encapsulation. *Int. J. Pharm. International Journal of Pharmaceutics* 483, 220–243.

Baratta, MT., Dorman, DHJ., Deans, SG., Figueiredo, C., Barroso, JG., and Ruberto,

- G., 1998. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour and Fragrance* 235–244.
- Basla K., 1981. Phytochemical studies of plants of *Coleus* genera *Herba Hung*;20:1-2.
- Besoain, J., 1989. Benzimidazoles En: Latorre, B. (ed.). *Fungicidas y Nematicidas, Avances y Aplicabilidad*. Facultad de Agronomía, Pontificia Universidad Católica.
- Bonev, B., Hooper, J. y Parisot, J., 2008. Principles os assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. *J. Antimicrob. Chemother.* 1295–1301.
- Borugă, O., Jianu, C., Mișcă, C., Goleț, I., Gruia, A., y Horhat, F., 2014. Aceite esencial de *Thymus vulgaris*: composición química y actividad antimicrobiana. 3), 56-60.
- Boukhatem, MN, Ferhat, MA, Kameli, A., Saidi, F., y Kebir, H., 2014. Aceite esencial de hierba de limón (*Cymbopogon citratus*) como potente antiinflamatorio y antimicótico. *The Libyan Journal of Medicine*, 9, 10.3402 / v.
- Božik, M., Císarová, M., Tančinová, D., Kouřimská, L., Hleba, L., Klouček, P., 2016. Selected essential oil vapours inhibit growth of *Aspergillus* spp. in oats with improved consumer acceptability. Pages 146-152.
- Braga-Gonçalves, T., Aguilar-Braga, M., FM de Oliveira, F., MP-Santiago, G., BM-Carvalho, C., Cabral-Brito, P., Thiago de Melo, S., S-Sousa, J., Bedê-Barros, E., Ferreira do Nascimento, R., Nagao-Dias, A., 2012. Effect of subinhibitory and inhibitory concentrations of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on *Klebsiella pneumonia*.
- Bravo LL, Bermúdez TK, M.-B.R., 2000. Inhibición del *Fusarium moniliforme* Sheld mediante polvos vegetales y algunos de sus componentes químicos. 57: 29-34.
- Brenes, A., Roura, R., 2010. Essential oils in poultry nutrition: main effects and modes of action. 158(1), pp.1–14.
- Bruneton, J., 1999. *Farmacognosia: fotoquímica, plantas medicinales*.
- Burgess, L., 1981. General ecology of the *Fusaria*. In Nelson, P.E., Toussoun T.A., Cook, R.J (Eds). *Fusarium; diseases, biology and taxonomy*. Pennsylvania, State University. p225-235.
- Cano-Morales, T.M., Lemus-Godínez, J.E., Chavez-Quiñonez de Perez, L.B., Barrientos-Rojas, C.E., 2001. Obtención y Caracterización del Aceite Esencial de



- Tomillo (*Thymus vulgaris*) cultivado en Guatemala, utilizado en diversidad de productos fitofarmacéuticos. Universidad San Carlos de Guatemala. Dirección Gen.
- Carbajal, D., Casaco, A., Arruzazabala, L., González, R., and Tolon, Z., 1989. Pharmacological study of *Cymbopogon citratus* Leave. *J. Ethnopharmacol.* 103–107.
- Carey, F., 1999. *Química orgánica Tercera ed*, 945–953.
- Carlini, EA., Contar, JDP., Silva-Filho, AR., Silveira-Filho, NG., Frochtengarten, ML., and Bueno, O., 1986. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). I. Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. *J. Ethnopharmacol.* 37–64.
- Carrasco-Vanegas, L., Castañeda-Pérez, L., 2013. *Química experimental, aplicaciones.* Empres. Ed. Macro E.I.R.L. Lima – Perú.
- Carrillo, YA., Gómez, MI., Cotes, JM., Núñez, C., 2010. Efecto de algunos aceites esenciales sobre el crecimiento de *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary en condiciones de laboratorio.
- Castro-Caicedo BL., Timmer, LW., Leguizamón, JE., Müller, GW., Corrales, J., 2000. *Enfermedades de los cítricos en Colombia.* Fondo Nacional de Fomento Hortifrutícola.
- CBI, 2005. *Natural Ingredients for Cosmetics.* EU Mark. Surv. ProFound 32–52.
- CBI, 2004. *Food Ingredients for Industrial Use.* EU Mark. Surv. ProFound pp.46-72.
- Cerpa, M.G., 2007. *Hidrodestilación de aceites esenciales: Modelado y Caracterización.*
- Chade, M.E., Mereles, B.E., Medvedeff, M.G., Vedoya, M., 2003. Micosis subcutánea postraumática por *Fusarium solani*. 20: 29-30.
- Chavan, PS., Tupe, S.G., 2014. Antifungal activity and mechanism of action of carvacrol and thymol against vineyard and wine spoilage yeasts. *Food Control*, 46, pp.115–120.
- Chavez, J., 2006. *Susceptibilidad in vitro de hongos miceliales aislados de pacientes con cáncer* Instituto Nacional de Cancerología E.S.E. Trabajo de grado (Bacterióloga). Univ. Javeriana. Fac. Ciencias, Carrera Bacteriol. Santafé Bogotá.
- Chisowa, EH., Hall, DR y Farman, D., 1998. Volatile constituents of the essential oil of

- Cymbopogon citratus* Stapf grown in Zambia. *Flavour and Fragrance. J.* 13 29–30.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved Standard-Second edition. CLSI document.
- Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA, C.I.N., 2008. Manual del Manejo preventivo de la secadera (*Fusarium* sp) en el Cultivo del Maracuyá. . Bogotá, DC, Colomb.
- Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., Palmas, F., 1999. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, 29, pp.130–135.
- Cubillos, JG., Páez, A y Mejía, L., 2009. Evaluación de la Capacidad Biocontroladora de *Trichoderma harzianum* Rifai contra *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. Asociado al Complejo “Secadera” en Maracuyá, Bajo Condiciones de Invernadero. *Fac.Nal.Agr.Medellín* 5821–5830.
- Dawidowicz A, Rado E, Wianowska D, Mardarowicz M, G.J., 2006. Application of PLE for the determination of essential oil components from *Thymus vulgaris* L. *Talanta* 878–884.
- Díaz de Castro, F.J., Restrepo, M.A., Rojas, W., 2007. Microbiología de las infecciones humanas.
- Espitia, C., 2011. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD REPELENTE E INSECTICIDA DE ACEITES ESENCIALES EXTRAÍDOS DE PLANTAS AROMÁTICAS UTILIZADOS CONTRA *TRIBOLIUM CASTANEUM* HERBST (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE). Univ. Nac. Colomb. Fac. Med. Dep. Toxicol. Cart. India-Colombia.
- Essien, E., Essien, J., Ita, B., & Ebong, G., 2008. Physicochemical properties and fungitoxicity of the essential oil of *Citrus medica* L. against groundnut storage fungi. *Turkish Journal of Botany*, 32(2), 161-164.
- EUCAST, 2008. Definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MIC of antifungal agents for fermentative yeasts *Clin Microbiol Infect.*14:398-405.
- Fernández-Pola, J., 1996. Cultivo de plantas medicinales, aromáticas y condimentarias.

- Ediciones Omega. Barcelona pp.32-35, 218-221.
- Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G. and Scheffer, J.J.C., 2008. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. . *Flavour Fragr. J.*, 23: 213–226.
- Figueirinha, A., Paranhos, A., Pérez, C., Buelga, A y Batista, S., 2008. *Cymbopogon citratus* leaves: Characterization of flavonoids by HPLC–PDA–ESI/MS/MS and an approach to their potential as a source of bioactive polyphenols. *Food Chem.*
- Fonnegra, R. y Jimenez, S., 2006. *Plantas medicinales aprobadas en Colombia*. Editor. Univ. Antioquia.
- Galvão Rodrigues, F. F., Costa, J. G. M., Rodrigues, F. F. G., & Campos, A.R., 2013. Study of the Interference between *Plectranthus* Species Essential Oils from Brazil and Aminoglycosides.
- González-Villa, A., 2004. Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas. Univ. Nac. Colomb. Sede Manizales.
- González, P., 2006. *Enfermedades del Tomate*.
- Granados, C., Yáñez, Y., S.G.(, 2012. Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* de Norte de Santander. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*.
- Guarnizo-Franco, A. Martínez-Yepes, P.N., 2009. *Experimentos de Química Orgánica con enfoque en ciencias de la vida*.
- Guarro, J., 2012. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.* 30, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.09.006>
- Gupta, M., 1995. *270 Plantas Medicinales Iberoamericanas*. Editor. Presencia Ltda. Bogotá 559–560.
- Hashem, M., Moharam, A.M., Zaiied, A.A., Saleh, F.E., 2010. Efficacy of essential oils in the control of cumin root rot disease caused by *Fusarium* spp. Assiut University,.
- Hernández, Y., Lobo, M.G., González, M., 2009. Factors affecting sample extraction in the liquid chromatographic determination of organic acids in papaya and pineapple. *Food Chemistry* 114 (2), 734–741.
- Hernández L, Rodríguez JM, García D, P.A., 2003. Actividad antidermatofítica in vitro

- de aceites esenciales. *Rev Cubana Plant Med.* [ Sitio en internet]. Dispo.
- Herrera, C., Bolaños, N., Lutz, G., 2003. *Química de alimentos, Manual de laboratorio.* Editor. la Univ. Costa Rica.
- ICA (Instituto Colombiano Agropecuario), 2015. Base de datos de viveros registrados en Colombia Mayo 2015. En <http://www.ica.gov.co/Files/pdf/Viveros-Registrados-Nacional-1---copia.aspx> Consult. marzo 2016.
- ICA (Instituto Colombiano Agropecuario)., 2016. Entrevista Octubre 2016. Sedes Popayán, Santander de Quilichao y el Bordo P.
- Isman MB., 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture an increasingly regulated world. *Annu Rev Entomol*; 51:45-66.
- Juliano, C., Mattana, A., Usai, M., 2000. Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herba-barona* Loisel growing wild in Sardinia. *J. Essent. Oil Res.* 12, pp.516–522.
- Kasali, AA., Oyedeji, A y Ashilokun, A., 2001. Volatile leaf oil constituents of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. *Flavour Fragr. J.* 377–378.
- Kim, S., Fan, M., A.T., 2008. Nonruminant nutrition symposium on natural phytobiotics for health of young animals and poultry: mechanisms and application. 86(14 Suppl.) pp. E138–E139.
- Knobloch, K., Pauli, A., Iberl, B., Weigand, H., Weis, N., 2011. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oil Components.
- Koenig, W.A., Hochmuth, D.H., 2004. Enantioselective gas chromatography in flavor and fragrance analysis: strategies for the identification of known and unknown plant volatiles. *J. Chromatogr. Sci*, 42, pp. 423–439.
- Lage, Liset., Panizo, María Mercedes., Ferrara, Giuseppe., Reviakina, V., 2012. Validación del inóculo por densitometría para las pruebas de susceptibilidad a los antifúngicos en especies del género *Fusarium*. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología.*
- Latorre, B., 1999. *Enfermedades de las plantas cultivadas.* Alfaomega Grup. Ed. México 731–738 (2004).
- Leal, TCAB., Freitas, SP., Silva, J.F., and Carvalho, A., 2003. Produção de biomassa e óleo essencial de elixir-paregórico em função do corte das inflorescências e

- épocas de colheita. Produção de biomassa e óleo essencial de elixir-paregórico em função do corte das inflorescências e épocas de colheita.
- León-Méndez, G., Osorio-Fortich, MdelR., Torrenegra, M.E., Gil-González, J., 2015. Extracción, caracterización y actividad antioxidante del aceite esencial de *Plectranthus amboinicus* L.
- Leslie, J.F., y Summerell, B.A., 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. 388 p.
- Lis-Balchin, M., Deans, SG y Eaglesham, E., 1998. Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal* 98 – 104.
- Lizcano-González, M., 2007. Evaluación de la Actividad Antifúngica del extracto de Tomillo (*Thymus vulgaris*) contra *Botrytis cinérea*, *Fusarium oxisporum* y *Sclerotinia sclerotiorum*). Pontif. Univ. Javeriana. Bogotá D.C.
- López-Malo, A., Palou, E., Parish, M. y Davidson, P., 2005. Methods for activity assay and evaluation of resultd. En P.M Davidson, J., Sofos y A. Branen, *Antimicrobials in Food*. (3a edición, capítulo 21, págs. 659-680=. Boca RatónCRC Press. Taylor y Fr. Group.
- Luengo, P.E.Z., 2004. Los aceites esenciales 23, 88–91.
- Lukhoba, CW., Simmonds, MSJ., Paton, A., 2006. *Plectranthus*: una revisión de los usos etnobotánicos.
- Luo, M., Jiang, L.K., Huang, Y.X., Xiao, M., Li, B., Zou, G., 2004. *Acta Biochim Biophys Sin* B36 (4), 277.
- Marino, M., Bersani, C., Comi, G., 1999. Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method *J. Food Prot.* p.1017–1023.
- Martínez, A., 2003. *Aceites esenciales*. Facultad Química Farmacéutica. Medellín.
- Meister Media Worldwide, 2005. *Plagas y Enfermedades de Cucurbitáceas*. Guia Identificación y manejo. Prod. Hortalizas Impresa en.
- Menéndez-Castillo, RA, y Pavón-González, V., 1999. *Plecthranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 4(3), 110-115.
- Monteiro, O. O., Souza, A. A., Soledade, L. L., Queiroz, N. N., Mouchrek Filho, V. V., & Vasconcelos, A.A., 2011. Chemical evaluation and thermal analysis of the essential

- oil from the fruits of the vegetable species *Pimenta dioica* Lindl. *Journal of Thermal Analysis & Calorimetry*, 106(2),.
- Muller-Riebau MF, Berger B, Y.O., 1995. Chemical composition and fungitoxic properties of phytopathogenic fungi of essential oils selected aromatic plants growing wild in Turkey. 43 (8): 2262-2266.
- Muñoz, F., 1996. PLANTAS MEDICINALES Y AROMATICAS: Estudio, cultivo y procesado, Madrid Barcelona.
- Nelson P., Tousoun, T. & Marasas, W. (eds), 1983. *Fusarium species* The Pennsylvania State University Press, Universit.
- Nuccy, M y Anaissie, E., 2007. *Fusarium infections in immunocompromised patients.* Univ. Fed. do Rio Janeiro, Rio Janeiro, Brazil.
- Ortiz, GS, Quiñones, HJ., Valdés, RMP., Gomez, E. y H.D., 2014. PATOGENOS DEL ZAPALLO Cucurbita moschata Duch. EN TRES LOCALIDADES DEL VALLE DEL CAUCA.
- Ortuño-Sánchez, M., 2006. *Manual Práctico de Aceites esenciales, aromas y perfumes.*
- Pahulow, M., 1985. *El gran libro de las plantas medicinales*, Editorial. ed. León, España.
- Perusquia-Ortiz, A.M., Vazquez-Gonzalez, D., and Bonifaz, A., 2012. Opportunistic filamentous mycoses: aspergillosis, mucormycosis, phaeohyphomycosis and hyalohyphomycosis. *J Dtsch Dermatol Ges* 10, 611-621; quiz 621-612.
- Poole, S.K., Dean, T.A., Oudsema, J.W., Poole, C.F., 1990. Sample preparation for chromatographic separations: an overview. *Analytica Chimica Acta* 236 (1), 3– 42.
- Poonpaiboonpipat, T., Pangnakorn, U., Suvunnamek, U., Teerarak, M., Charoenying, P., 2013. Phytotoxic effects of essential oil from *Cymbopogon citratus* and its physiological mechanisms on barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). 41:403-407.
- Puatanachokchai, R; Kishida, H; Denda, A; Murata, N; Konishi, Y; Initketkumnuen, U; Nakae, D., 2002. Inhibitory effects of lemon grass (*Cymbopogon citratus*, Stapf) extract on the early phase of hepato-carcinogenesis after initiation with diethylnitrosamine in male Fischer 344 rats. *Cancer*.
- Pushpa, S. ,Murthy, K., Ramalakshmi, P., S., 2008. Fungitoxic activity of Indian borage (*Plectranthus amboinicus*) volatiles. . *Food Chem. Elsevier*.

- Queiroz, FCF., Kummer, R., Silva, CFE., , Carvalho, MDB., Cunha, R., Grespan, CAB., Amado, JM., Kenji, R., Cuman, N., 2012. Efectos de los constituyentes timol y carvacrol del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. sobre la respuesta inflamatoria Evid. Complemento basado.
- Quintanilla, P., J.R. y T.I., 2002. Influence of essential oils on *Phytophthora infestans*. 45(2-4), 225-235.
- Quintero, A., González, N y Vera, A., 1999. Obtención y análisis cromatográfico del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (Limonaria).
- Rafaela Soto-Ortiz; Gilberto Vega-Marrero; Aldo Tamajón-Navarro, 2002. Instructivo técnico del cultivo de *Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf (caña santa).
- Rangel-Ch, J.O., 2015. La biodiversidad de Colombia: significado y distribución regional. Rev. la Acad. Colomb. Ciencias Exactas, Físicas y Nat. Bogotá 39 (151).
- Rao, BL; Sunita, L., 1992. New aroma chemicals in *Cymbopogon* for future. Indian Perfumer.
- Rodríguez JL, Rodero L, Córdoba S, C.E.M., 2000. III Curso Hispano-Argentino de Micología Médica Determinación de la Resistencia a los Antifúngicos en el Laboratorio.
- Rojas, CM., Muñoz, LA., Terán, VF., Prado, FA., y Magally, A., 2010. Evaluación de patógenos en clones de lulo (*Solanum quitoense* Lam.).
- Rota MC, Herrera A, Martínez RM, Sotomayor JA, J.M., 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils.
- Sacchetti, G; Maietti, S; Muzzoli, M; Scaglianti, M; Manfredini, S; Radice, M., and Bruni, R., 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. 621–632.
- Sánchez, Y., Pino, O., Correa, T.M., Naranjo, E., Iglesia, A., 2009. Estudio químico y microbiológico del Aceite Esencial de *Piper auritum* Kunth (Caisimón de Anís). Vol. 24 No, 39–46 La Habana, Cuba.
- Santos, AV.F., Serra, C.G., Bezerra, JAC.R., Figueredo, F.G., Matias, FF. E., Menezes, RA.I., Costa, GM. J., Coutinho, D.E., 2015. Antibacterial activity of *Plectranthus amboinicus* Lour (Lamiaceae) essential oil against *Streptococcus mutans*. European

- Journal of Integrative Medicine. Volume 8, June 2016, Pages 293-297.
- Sell, C., 2003. A fragrant introduction to terpenoid chemistry.
- Selvakumar, P., Edhaya, n., Prakash, S., 2011. Studies on the antidandruff activity of the essential oil of *coleus amboinicus* and *eucalyptus globulus*.
- Seseni, L., Regnier, R., Roux-van de Merwe, M.P., Mogale, E., B., 2015. Control of *Fusarium* spp. causing damping-off of pine seedlings by means of selected essential oils.
- Shah, G., Shri, R., Panchal, V., Sharma, N. Singh, B., y Mann, A., 2011. Base científica para el uso terapéutico de *Cymbopogon citratus*, Stapf (hierba de limón). Rev. Av. Tecnol. Farm. e Investig. 2(1), 3-8.
- Sharapin, N., 2000. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. Editor Roberto Pinzón.
- Sharma, A., Rajendran, S., Satyawati, R., Srivastava, A., Sharma, S., Kundu, B., 2016. Antifungal activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* 1322, with emphasis on *Syzygium aromaticum* essential oil.
- Sivakumar, Dharini y Bautista-Baños, S., 2014. A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. Crop Protection, 64 (2014) 27-37.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L., 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens 26(2), 118-122.
- Solano, A., León-García de Alba, C., Valdovinos-Ponce, G., Soto, L., Silva-Rojas, H., 2011. La pigmentación de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) como factor de virulencia en plántulas de maíz. Tesis de Maestría. Instituto de Fitosanidad-Fitopa.
- Soto-Mendivil, E.A., Moreno-Rodríguez, J.F., Estarrón-Espinosa, M., García-Fajardo, J.A., and Obledo-Vázquez, E.N., 2006. ). CHEMICAL COMPOSITION AND FUNGICIDAL ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL OF *Thymus vulgaris* AGAINST *Alternaria citri*.
- Soto-Ortiz, R., Vega- Marrero, G., Tamajon-Navarro, A.L., 2003. Efecto de diferentes densidades de plantación en *Cymbopogon citratus* Stapf. Dispon. En internet <[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S102847962003000200008&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102847962003000200008&lng=es&nrm=iso)>. S.



- Stashenko, E., 2009. Aceites Esenciales. Univ. Ind. Santander. Cent. Nac. Investig. para la Agroindustrialización Especies Veg. Aromáticas y Med. Trop. 180.
- Suárez, CL., Fernández, RJ., Valero, NO., Gámez, RM., Páez, A., 2008. Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá.
- Summerell B., Leslie J., Backhouse D., B.W.& B.L., 2001. *Fusarium*: Paul E. Nelson. Memorial symposium: American Phytopathological Society Press. St, Paul, Minnessota, USA.
- Svoboda, KP., Greenaway, R., 2003. Investigación de glándulas sebáceas volátiles de *Satureja hortensis* L. (Ajedrea de verano) y comparación fotoquímica de diferentes variedades. pp 196-202.
- Tiên Do, T.K., Hadji-Minaglou, F., Antoniotti, S., Fernandez, X., 2014. Authenticity of essential oils. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. Volume 66, March 2015, Pages 146-157.
- Timor, C., Manzini, ME., Fernández, A y González, M., 1991. Evaluación físico-química del aceite de las hojas de *Plecthranthus amboinicus* (Lour) Spreng.
- Torrenegra, M., Granados, C., Osorio, M., León, G., 2015. Method comparison of hydrodistillation microwave radiation-assisted (MWHD) front hydrodistillation (HD) in the extraction of essential oil of *Minthostachys mollis*. *Inf. Technol.* 26(1):117-122.
- Tosti A, Piraccini, BM., Lorenzi, S., 2000. Onychomycosis caused by no dermatophytic molds clinical features and response to treatment of 59 cases. 42: 217-24.
- Tovar, L. P., Pinto, G. M. F., Wolf-Maciel, M. R., Batistella, C. B., & Maciel-Filho, R., 2011. Short-path-distillation process of lemongrass essential oil: physicochemical characterization and assessment quality of the distillate and the residue products. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 50(13).
- van Baarlen, P., van Belkum, A., Summerbell, R.C., Crous, P.W., and Thomma, B., 2007. Molecular mechanisms of pathogenicity: how do pathogenic microorganisms develop cross-kingdom host jumps? *FEMS Microbiol Rev* 31, 239-277.
- Vázquez-Briones, MdC., Hernández, L.R y Guerrero-Beltrán, J.A., 2015. Physicochemical and Antioxidant Properties of *Cymbopogon citratus* Essential Oil. Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental, Universidad de las

Américas Puebla, Cholula, Puebl.

- Velasco, J, Rojas, L.B., Díaz, T., y Usubillaga, A., 2013. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Coleus amboinicus* Lour., Contra patógenos entéricos.
- Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales, HA., Basurto-Sotelo, M., Soto-Parra, JM y Martínez-Escudero, E., 2014. Situación actual en el control de *Fusarium* spp., y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. Univ. Autónoma Chihuahua (UACH).Facultad Ciencias Agrotecnológicas México.
- Vizoso-Parra, A., Ramos-Ruiz, A., Edreira-Armenteros, A., Betancourt-Badell, José, y Décalo-Michelena, M., 1999. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Orégano Francés). Estudio toxicogenético de un extracto fluido y del aceite esencial.
- Walentowska, J., Flaczyk, J., 2013. Tomillo aceite esencial para la protección Antimicrobiana de textiles naturales. 407–411.
- Winward GP, Avery LM, Stephenson T, J.B., 2008. Essential oils for the disinfection of grey water.

## ANEXO I

Los rendimientos de los aceites esenciales de las recolecciones se obtuvo mediante la relación peso/volumen aplicando la siguiente formula:

$$R = \frac{V}{P} \times 100$$

Dónde:

R= rendimiento expresado en porcentaje

V= volumen de aceite esencial obtenido (8mL)

P= peso del material vegetal.

## ANEXO II

Para determinar la solubilidad de los tres AE en OH 70% (V/V) se siguió la norma de Determinación de la solubilidad en etanol de Aceites Esenciales y productos

aromáticos. Method of test for solubility of essential oils and aromatic products in Ethanol (NMX-K-081-1976) como sigue:

A una probeta fue transferido 1 mL de AE (para los tres casos) y posteriormente se agregó OH 70%, hasta un volumen máximo de 20 mL, agitándose constantemente en un agitador Vortex. Obtenida la disolución translúcida, se anotó el volumen V de etanol utilizado. Si se producía turbidez antes de haber agregado los 20 mL de alcohol, se anota el volumen V con el que apareció la turbidez y eventualmente el volumen V con el cual desaparecía

Para el aceite esencial de, *Thymus vulgaris* L., los volúmenes gastados fueron 8.2 mL de OH 70%.

Para *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng los volúmenes gastados fueron 10 mL de OH 70%.

Para *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., los volúmenes gastados fueron 9 mL de OH 70%.