

Evaluación de Aceites Esenciales, Aislados de Plantas Aromáticas Colombianas,
como Agentes Antimicrobianos Contra el Hongo *Mycosphaerella fijiensis*, Fitopatógeno
Causante de la Enfermedad Sitagoka negra en Banano.

Daniela Carolina Monsalve López

Trabajo de Grado para optar al título de Química

Director

William Fernando Hidalgo Bucheli

Doctor en Química

Co-directora

Inés Hernández Celi

Magister en Ciencias Básicas Biomédicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2020

Dedicatoria

A mi madre, Myrian López Villamizar, a quien debo todos mis logros, por su esfuerzo, amor, dedicación y apoyo.

Agradecimientos

Al profesor William Hidalgo Bucheli, director de la presente investigación quien, con sus conocimientos, apoyo y gran calidad humana, me guió a través de cada etapa de este proyecto.

A Inés Hernández Celi, por compartir conmigo su amor por los hongos, por su paciencia, sus enseñanzas, y colaboración como Co–directora en el desarrollo del presente trabajo de grado.

A los profesores Claudia Ortiz y Camilo Durán, por su colaboración como evaluadores de la presente Tesis de pregrado.

Al grupo de Biotecnología Vegetal de la Universidad Nacional de Colombia–Sede Medellín, por su donación de las cepas de *M. fijiensis* con las cuales se desarrolló el presente trabajo de grado.

Al Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinas Tropicales CENIVAM, por el suministro de los aceites esenciales empleados en el presente trabajo de grado

A Yari, Lucia, David, Eli, Kate y Mauricio, compañeros y amigos del Laboratorio de hongos, por su cariño, amistad y buenos momentos vividos.

Finalmente, pero de manera muy especial agradezco a mi novio Esteban Plata Caballero, quien me acompañó, animó y brindó su apoyo incondicional durante todo el transcurso de mi pregrado.

Tabla de contenido

Introducción	14
1. Objetivos.....	17
1.1 <i>Objetivo general</i>	17
1.2 <i>Objetivos específicos</i>	17
2. Marco teórico	18
2.1 Antecedentes.....	18
2.2 <i>Aspectos generales y taxonomía del banano</i>	20
2.3 <i>Mercado bananero en Colombia e impacto económico</i>	21
2.4 <i>Enfermedades que afectan la producción de banano</i>	23
2.5 <i>Enfermedad Sigatoka negra</i>	24
2.5.1 <i>Aspectos generales de la interacción <i>Mycosphaerella fijiensis</i>-<i>Musa</i> (planta de banano)</i>	24
2.5.2 <i>Efecto de la Sigatoka negra en las plantas de banano</i>	27
2.5.3 <i>Influencia de la Sigatoka negra en el mercado bananero</i>	29
2.5.4 <i>Control de la Sigatoka negra</i>	30
2.6 <i>Propiedades biológicas de los aceites esenciales</i>	33
2.7 <i>Aproximaciones del mecanismo de acción de los aceites esenciales en su actividad biológica contra hongos</i>	42
3. Materiales y métodos	44
3.1 <i>Reactivos</i>	44
3.2 <i>Material biológico</i>	44
3.3 <i>Material vegetal</i>	45
3.4 <i>Ensayos biológicos</i>	46
3.4.1 <i>Evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales contra la cepa C86 del hongo <i>M. fijiensis</i> mediante la técnica de dilución en agar</i>	46
3.4.2 <i>Determinación de la concentración inhibitoria del 50% de la población (IC₅₀) de los aceites esenciales empleando la técnica de dilución en microplato</i>	47
3.5 <i>Análisis estadístico de los datos</i>	48
4. Resultados y discusión	49

<i>4.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales mediante la técnica de dilución en agar</i>	49
<i>4.2 Determinación del IC₅₀ de los aceites esenciales y mezclas de aceites esenciales empleando la técnica de dilución en microplato</i>	56
5 Conclusiones	64
Referencias bibliográficas	66
Apéndices	80

Lista de figuras

- Figura 1.** Exportaciones de banano colombiano en el año 2018 según país de destino
;Error! Marcador no definido.
- Figura 2.** Ciclo de la enfermedad Sigatoka negra causada por el hongo *M. fijiensis*.....**26**
- Figura 3.** Etapas del desarrollo de la enfermedad Sigatoka negra según lo descrito por Meredith y Lawrence. A) Etapa 1, B) etapa 2, C) etapa 3, D) etapa 4, E) etapa 5, F) etapa 6
**28**
- Figura 4.** Inhibidores externos de la quinona: Trifloxystrobin (1), azoxystrobin (2) y pyraclostrobin (3).....**31**
- Figura 5.** Estructura del ergosterol (4), componente principal de la membrana plasmática de los hongos.....**32**
- Figura 6.** Inhibidores de desmetilación (DMI): Bitertanol (5), difenoconazol (6) y propiconazol (7).....**32**
- Figura 7.** Aminas inhibidoras de la biosíntesis del esterol: Espiroxamina (8), fenpropimorf (9) y tridemorf (10).....**32**
- Figura 8.** Principales componentes del aceite esencial de tomillo: Timol (11), *p*-cimeno (12) y γ -terpineno (13).....**37**
- Figura 9.** Principales componentes del aceite esencial de cardamomo: Acetato de terpenilo (14) y eucaliptol (15).....**38**

Figura 10. Principales componentes del aceite esencial de limoncillo: Citral (16) y neral (17)	39
Figura 11. Principales componentes del aceite esencial de palmarosa: Geraniol (18) y acetato de geranilo (19).....	40
Figura 12. Principal componente del aceite esencial de naranja: Limoneno (20)	40
Figura 13. Principal componente del aceite esencial de citronela: Citronelal (21)	41
Figura 14. Principales componentes del aceite esencial de orégano: Timol (22) y carvacrol (23)	42
Figura 15. Fotografías de las cepas de <i>M. fijiensis</i>;Error! Marcador no definido.	
Figura 16. Graficas del crecimiento de <i>M. fijiensis</i> cepa C86, representado por el diámetro de la colonia fúngica medido durante 12 días de evaluación, para los aceites esenciales: (a) Limoncillo, (b) citronela, (c) palmarosa, (d) tomillo, (e) cardamomo y (f) naranja	52
Figura 17. IC ₅₀ de los aceites esenciales y grupos de aceites sobre las cuatro cepas de <i>M. fijiensis</i>	63

Lista de tablas

Tabla 1. Variedades de banano con diferentes niveles de resistencia a la Sigatoka negra	21
Tabla 2. Grados de reacción de acuerdo con el progreso de los síntomas.....	29
Tabla 3. Actividad antimicrobiana determinada para diferentes aceites esenciales sobre diversas clases de hongos.....	35
Tabla 4. Porcentaje de inhibición micelial (PIM) promedio de los aceites esenciales evaluados para la cepa de <i>M. fijiensis</i> C86.....	49
Tabla 5. Concentración relativa (%) de los principales metabolitos identificados en los aceites esenciales.....	56
Tabla 6. Concentración de inhibición del 50% de la población de los aceites esenciales evaluados para la cepa C86.....	58
Tabla 7. IC ₅₀ determinado para los aceites esenciales evaluados contra las cepas C86, C139, 111033 y 111029 de <i>M. fijiensis</i>	61
Tabla 8. Grupos de aceites esenciales seleccionados para ser evaluados contra las cuatro cepas de <i>M. fijiensis</i>	57
Tabla 9. Concentración de inhibición del 50% de la población de los grupos de aceites esenciales evaluados para las cepas C86, C139, 111033 y 111029 de <i>M. fijiensis</i>	62

Lista de apéndices

Apéndice A. Divulgación de resultados **80**

Apéndice B. Análisis estadístico..... **81**

Lista de abreviaturas

FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
ASBAMA	Asociación de Bananeros del Magdalena y La Guajira
DANE	Departamento Administrativo Nacional de Estadística
UNIBAN	Unión de Bananeros de Urabá
TECBACO	Técnicas Baltime de Colombia
BANASAN	Bananeros Unidos de Santa Marta
CENIVAM	Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinas tropicales
PPM	Partes por millón
SEM	Microscopía electrónica de barrido
CMI	Concentración mínima inhibitoria
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDA	Agar de papa y dextrosa
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
IC ₅₀	Concentración inhibitoria del 50% de la población
DMSO	Dimetilsulfóxido

PIM

Porcentaje de inhibición mycelial

Resumen

Título: Evaluación de Aceites Esenciales, Aislados de Plantas Aromáticas Colombianas, como Agentes Antimicrobianos Contra el Hongo *Mycosphaerella fijiensis*, Fitopatógeno Causante de la Enfermedad Sigatoka negra en Banano*

Autor: Daniela Carolina Monsalve López**

Palabras clave: *Mycosphaerella fijiensis*, Sigatoka negra, Aceites esenciales, Actividad antifúngica

Descripción: El banano, después de los cítricos es una de las frutas más consumidas en el mundo y su producción constituye una importante fuente de empleo para el país productor; sin embargo, los cultivos de banano son afectados por varias enfermedades que ponen en riesgo su producción.

Actualmente la enfermedad que genera más pérdidas para los productores de banano es la Sigatoka negra, una enfermedad foliar causada por el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis*. Con el propósito de explorar otras estrategias de control frente a la Sigatoka negra se evaluó la actividad antifúngica de ocho aceites esenciales: Tomillo (*Thymus vulgaris*), cardamomo (*Elettaria cardamomum*), limoncillo (*Cymbopogon flexuosus*), palmarosa (*Cymbopogon martinii*), naranja (*Citrus sinensis*), citronela (*Cymbopogon nardus*) y orégano (*Lippia organoides*) quimiotipos timol-carvacrol I y II y mezclas de estos: Grupo 1 (Tomillo, cardamomo y limoncillo), Grupo 2 (Naranja, citronela y palmarosa) y Grupo 3 (Orégano T-C I y orégano T-C II) contra cuatro cepas del hongo fitopatógeno *M. fijiensis* (Cepas C86, C139, 111033 y 111029). Por el método de dilución en agar se encontró que fueron los aceites esenciales de limoncillo, citronela y palmarosa los que presentaron mayor PIM contra la cepa C86. Por la técnica de microplato se determinó que fue el aceite esencial de orégano T-C I y el grupo 3 los que presentaron mayor actividad antifúngica contra las cuatro cepas de *M. fijiensis*.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: William Fernando Bucheli. Doctor en Química. Codirector: Inés Hernández Celi. Magister en Ciencias Básicas Biomédicas

Abstract

Title: Evaluation of Essential Oils, Isolated from Colombian Aromatic Plants, as Antimicrobial Agents Against the Fungus *Mycosphaerella fijiensis*, a Phytopathogen that Causes Black Leaf Streak Disease in Bananas*

Author: Daniela Carolina Monsalve López**

Key words: *Mycosphaerella fijiensis*, Black sigatoka, Essential oils, Antifungal activity

Description: Banana, after citrus fruits, is one of the most consumed fruits in the world and its production constitutes an important source of employment for the producing country; however, banana crops are affected by various diseases that put their production at risk.

Currently the disease that generates the most losses for banana producers is black leaf streak disease, a foliar disease caused by the ascomycete fungus *Mycosphaerella fijiensis*. In order to explore other control strategies against Black Sigatoka, the antifungal activity of eight essential oils was evaluated: Thyme (*Thymus vulgaris*), cardamomum (*Elettaria cardamomum*), lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*), palmarosa (*Cymbopogon martinii*), orange (*Citrus sinensis*), citronela grass (*Cymbopogon nardus*) and oregano (*Lippia origanoides*) thymol-carvacrol chemotypes I and II and mixtures of these: Group 1 (Thyme, cardamomum and lemongrass), Group 2 (Orange, citronella grass and palmarosa) and Group 3 (Oregano T-C I and oregano T-C II) against four strains of the phytopathogenic fungus *M. fijiensis* (Strains C86, C139, 111033 and 111029). By the agar dilution method, it was found that the essential oils of lemongrass, citronela grass and palmarosa were those that presented the highest PIM against the C86 strain. Using the microplate technique, it was determined that the essential oil of oregano T-C I and group 3 were those that presented the highest antifungal activity against the four strains of *M. fijiensis*.

* Degree work

** Science Faculty. School of Chemistry. Director: William Fernando Buchelli. Doctor in Chemistry. Co-director: Inés Hernandez Celi. Master in Basic Biomedical Sciences

Introducción

El banano constituye una importante fuente de alimento para millones de personas en el mundo, después de los cítricos, es una de las frutas que más se consumen (Pareek, 2015a). Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), en el año 2018, esta variedad frutal se cultivó en 138 países aproximadamente, principalmente en las regiones tropicales de África, Asia y Latinoamérica, con una producción de 115 millones de toneladas anualmente (*Estadísticas / Organización de Las Naciones Unidas Para La Alimentación y La Agricultura*, n.d.). India, China, Filipinas, Ecuador y Colombia se encuentran entre los principales productores de banano (Ploetz et al., 2015).

En el año 2018 el banano se consolidó como el tercer producto agrícola de exportación en Colombia, después del café y las flores, aportando a la economía un ingreso de 800.8 millones de dólares, posicionando al país en el cuarto puesto como exportador de banano (ASBAMA, n.d.). A pesar de que existen diversos factores como el estado del suelo, la nutrición vegetal, el tipo de cultivo y la densidad de siembra que pueden poner en riesgo la producción de banano tanto en Colombia como en el mundo, uno de los factores de mayor impacto son las enfermedades por agentes bióticos que afectan los cultivos; causando pérdidas económicas en el sector agrícola (Ploetz et al., 2015).

Por décadas, los cultivos de banano se han visto afectados por varias enfermedades, entre ellas la más recordada; enfermedad de Panamá dado el impacto negativo que generó en la producción de banano, siendo necesario reemplazar la variedad *Gros Michel* tipo por las variedades del subgrupo Cavendish (Marín et al., 2003). En la actualidad, la enfermedad que presenta mayor riesgo para los productores de banano es la sigatoka negra, causada por el

hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis*, considerado como el fitopatógeno más agresivo para los cultivos del subgrupo *Cavendish*(M. Hidalgo et al., 2006) llegando a generar pérdidas hasta de un 50% en la producción total(Marín et al., 2003).

Actualmente, el control químico es el método más eficaz para combatir la sigatoka negra; sin embargo, esta estrategia trae consigo serias consecuencias para la salud de los agricultores de banano, genera un daño ecológico considerable para el medio ambiente y además representa un alto costo para el agricultor. De igual manera es importante resaltar que, la aplicación constante de fungicidas, conlleva un riesgo potencial en el desarrollo de resistencia en *M. fijiensis*, siendo necesario aumentar el número de aplicaciones de fungicidas al año(Donzelli & Churchill, 2007), lo que en el costo de producción representa un valor de hasta 800 dólares por hectárea para su control(María et al., n.d.).

Por lo anterior, en la actualidad se han desarrollado diversas estrategias para disminuir el uso de sustancias químicas en la agricultura, entre estas se encuentran el mejoramiento genético(Camayo, 2015), control biológico(Guzmán, 2012), manejo integrado del cultivo(Sanabria & Inta, 2006) y el uso de productos naturales(Rodríguez Saucedo, 2011).

Durante la implementación del control con productos naturales, han sido ampliamente estudiadas varias familias de plantas como Anacardiaceae, Rubiaceae y Myrtaceae(Wena et al., 2011) por la actividad antimicrobiana que exhiben los extractos crudos (a partir de material vegetal como hojas, tallos, semillas y flores o igualmente aceites esenciales de los mismos) contra bacterias como: *Escherichia coli*(Gutiérrez-Jiménez et al., 2017), *Bacillus subtilis*(Ferrer, 2003), *Staphylococcus aureus*(Ferrer, 2003), y *Listeria monocytogenes*(Ferrer, 2003) y hongos como: *Aspergillus flavus*(Viuda et al., 2008), *A. niger*(Viuda et al., 2008), *Fusarium oxysporum*(Gakuubi et al., 2017), *Mycosphaerella graminicola*(Jabeur et al., 2017), entre otros.

Motivados por el amplio espectro de actividad biológica que exhiben los aceites esenciales (Nakatsu [xc*] et al., 2000) y por los escasos estudios realizados sobre el uso de estos para combatir al hongo *M. fijiensis*, en el presente trabajo de grado se evaluó la actividad antifúngica de los aceites esenciales de Tomillo (*Thymus vulgaris*), Cardamomo (*Elettaria cardamomum*), Limoncillo (*Cymbopogon flexuosus*), Palmarosa (*Cymbopogon martinii*), Naranja (*Citrus sinensis*), Citronela (*Cymbopogon nardus*) y Orégano (*Lippia origanoides*), con el fin de explorar otras estrategias de menor impacto ecológico y que además favorezcan la reducción del uso indiscriminado de fungicidas comerciales como control frente al agente causal de la sigatoka negra.

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Evaluación de la actividad antimicrobiana de seis aceites esenciales aislados de plantas aromáticas colombianas en la inhibición del hongo *M. fijiensis*.

1.2 Objetivos específicos

Evaluar la actividad antimicrobiana de seis aceites esenciales contra el hongo *M. fijiensis* mediante la técnica de dilución en agar.

Determinar la concentración de inhibición del 50% de la población (IC₅₀) de los aceites esenciales y mezclas de estos utilizando la técnica de dilución en microplato.

2. Marco teórico

2.1 Antecedentes

De acuerdo con la base de datos bibliográfica Scopus consultada en abril de 2020, usando como palabra clave [*“Mycosphaerella fijiensis”*] en el año 1970 se realizó la primera publicación sobre el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis* y hasta la fecha, se han publicado alrededor de 1,282 artículos que abordan esta temática(*Scopus - Document Search Results*, n.d.), siendo Estados Unidos el país con más publicaciones con 224 documentos. Colombia actualmente cuenta con 57 publicaciones ubicándose en el noveno puesto a nivel mundial. En el periodo entre 2001-2010 Colombia ocupó el puesto 14 con un total de 13 publicaciones, desde entonces, hasta la fecha se han publicado 44 documentos posicionando a Colombia en el octavo puesto en el periodo 2011-2020(*Scopus - Document Search Results*, n.d.).

Al realizar la búsqueda en la base de datos Scopus con la palabra clave [*“essential oils”*], esta arrojó 56,897 resultados. Los enfoques de investigación más relevantes de los artículos publicados sobre esta temática son: Ciencias agropecuarias y biológicas (23,464 publicaciones), química (17,683), bioquímica, genética y biología molecular (13,715), farmacología, toxicología y farmacia (12,738) y medicina (11,152)(*Scopus - Document Search Results*, n.d.).

Cuando se realizó la búsqueda con las palabras clave [*“essential oils” And banana”*], la base de datos Scopus arrojó 4,233 resultados(*Scopus - Document Search Results*, n.d.); India se ubica en el primer puesto con 628 publicaciones. Colombia, por su parte, ocupa el puesto 26

con 58 documentos en total, todos publicados en el periodo 2011-2020(*Scopus - Document Search Results*, n.d.).

Por último, al usar como palabras clave [“*Essential oils*” And “*Mycosphaerella fijiensis*”] en la base de datos Scopus, con el fin de conocer las publicaciones realizadas que abarcan estos dos temas, se encontraron 31 documentos(*Scopus - Document Search Results*, n.d.), de los cuales 21 tuvieron como enfoque de investigación ciencias agropecuarias y biológicas, siete fueron de farmacología, toxicología y farmacia y siete de química, sin embargo, ninguno de estos corresponde a la evaluación de la actividad antifúngica de aceites esenciales contra *M. fijiensis*.

En cuanto a las publicaciones más recientes de artículos referentes a la actividad antifúngica de aceites esenciales sobre el hongo *M. fijiensis*, Camara *et al.* (2017)(Camara *et al.*, 2017) publicaron un estudio en el cual evaluaron la actividad *in vitro* de dos aceites esenciales contra el hongo en cuestión, encontrando que el aceite de *Monodora myristica* presenta alto efecto tóxico a nivel fúngico a concentraciones superiores a 7000 ppm con un IC₅₀ igual a 744 ppm: para el aceite esencial de *Eucalyptus torelliana* este presentó un IC₅₀ de 3158 ppm. En conclusión, los autores atribuyen el efecto antifúngico de los aceites esenciales a los compuestos mayoritarios de *M. myristica*, los cuales fueron: α -felandreno (24.2%) y *p*-cimeno (30%) y, en el caso del aceite esencial de *E. torelliana*, fueron los compuestos de α -pineno (42.85%) y β -cariofileno (14.54%).

En el año 2017, Gutiérrez *et al.*(Gutiérrez-Jiménez *et al.*, 2017) reportaron un estudio en el cual evaluaron la actividad biológica de diferentes aceites esenciales sobre *M. fijiensis* bajo condiciones *in vitro*. Los aceites utilizados fueron: *Pimenta dioica*, *Piper auritum*, *Syzygium aromaticum*, *Cinnamomum zeylanicu*, *Origanum vulgare*, *Artemisia ludoviciana* y *Origanum majorana*. Los aceites de *P. dioica*, *C. zeylanicum* y *O. vulgare* fueron los que

generaron menor porcentaje de crecimiento micelial de *M. fijiensis* a una concentración de 500 ppm, seguidos de *O. majorana* y *A. ludoviciana* a 1000 ppm y por último los aceites de *P. auritum* y *S. aromaticum* a 5000 ppm. En este estudio, Gutiérrez *et al.* atribuyen la actividad antifúngica de los aceites de *P. dioica*, *C. zeylanicum* y *O. vulgare* a la presencia de los compuestos eugenol, cinamaldehído y carvacrol.

Lo anterior demuestra que los aceites esenciales pueden ser una alternativa potencial frente al control fitosanitario en las plantaciones de banano y plátano, especialmente en el manejo y control del hongo *M. fijiensis*.

2.2 Aspectos generales y taxonomía del banano

El banano, fruta tropical cuyo nombre científico es *Musa x paradisiaca* es un híbrido entre las especies silvestres *Musa acuminata* y *Musa balbisiana*, proviene del sudeste asiático, pertenece a la familia Musaceae y hace parte del género *Musa*(Valmayor *et al.*, 2000).

Las plantas de banano se caracterizan por ser hierbas perennes de gran tamaño, poseen entre 5 y 20 racimos de bananos, cada uno con 2 a 20 frutos, también cuentan con un rizoma corto y un tallo cónico que resulta de la unión de las vainas foliares, el cual puede medir desde 3.5 a 7.5 m de alto, terminado en un racimo de hojas que pueden llegar a medir hasta cuatro metros de largo y 1.5 m de ancho(Infoagro, n.d.).

En cuanto a los bananos, estos tienen un alto valor nutricional, pues contribuyen a la ingesta de carbohidratos, fibra, vitaminas C, A y B, minerales como potasio y magnesio(Pareek, 2015b) y antioxidantes como la dopamina(Kanazawa & Sakakibara, 2000).

Existen diferentes variedades de banano, entre las más conocidas y comercializadas se encuentran aquellas pertenecientes al subgrupo *Cavendish* como Grand Naine, Valery y Williams que, aunque sean susceptibles a la enfermedad Sigatoka negra (**Tabla 1**), cumplen con estándares requeridos en términos de características postcosecha, rendimiento y sabor que

se esperan de un banano apto para ser exportado. Entre los países que lideran las exportaciones de banano se encuentran Ecuador, Filipinas, Costa Rica, Guatemala y Colombia; mientras que los países con mayor demanda son Estados Unidos, Japón y países de Europa como Bélgica, Italia, Alemania, entre otros(Soto, 2011).

Tabla 1

Variedades de banano con diferentes niveles de resistencia a la Sigatoka negra (Hidalgo Bucheli, 2009)

Variedad	Genoma	Nivel de resistencia
Calcutta 4	AA	HR
Tuu gia	AA	HR
Bocadillo	AA	S
Fougamou	ABB	PR
Niyarma yik	AA	S
Cavendish	AAA	VS
Gross michel	AAA	VS
Balbisiana	BB	HR
Pelipita	ABB	PR

Nota: **HR:** Muy resistente, **PR:** Parcialmente resistente, **S:** Sensible, **VS:** Muy sensible

2.3 Mercado bananero en Colombia e impacto económico

En Colombia, el banano de exportación se cultiva en la región de Urabá y en los departamentos de Magdalena y la Guajira, su producción constituye una importante fuente de empleo para el país, además de ser uno de los productos con los mayores ingresos en exportaciones según la Asociación de Bananeros del Magdalena y la Guajira (ASBAMA)(ASBAMA, n.d.). El banano se posiciona como el tercer producto agrícola

exportable del país después del café y las flores, con un ingreso de 800.8 millones de dólares en divisas en el año 2018. De acuerdo con ASBAMA, el Departamento Administrativo Nacional de Estadísticas (DANE) reportó que en el año 2018 Colombia exportó 1,738,504 toneladas de banano del subgrupo *Cavendish*, equivalentes a 86.9 millones de cajas de 20 Kg, 6.8 millones de cajas menos que en el año 2017(ASBAMA, n.d.).

De acuerdo con la información reportada por el DANE, la causa de la disminución del 7.2% de las exportaciones nacionales respecto al año 2017, se debió principalmente a la reducción en volumen exportado en el Urabá antioqueño que pasó de 1,271,844 toneladas en el 2017 a 1,055,569 toneladas en el 2018. En el caso de los departamentos del Magdalena, La Guajira y Cesar, las exportaciones aumentaron un 13.3% respecto al año 2017, lo cual permitió que la región pase de representar el 32% en el 2017 al 9.2% de las exportaciones de banano en el país en el 2018(ASBAMA, n.d.).

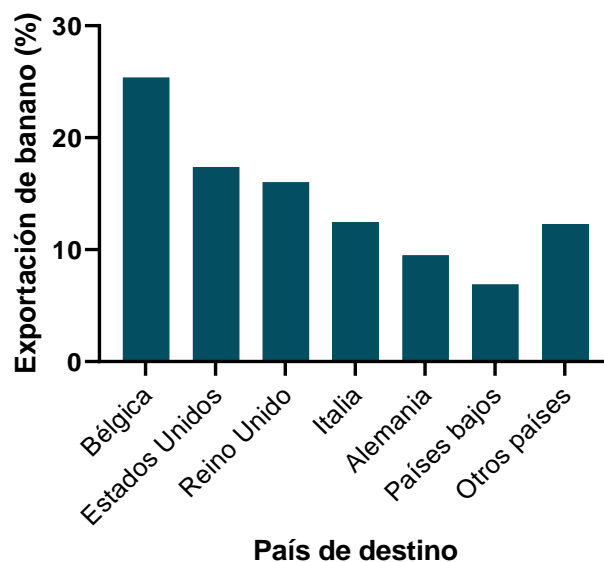
La distribución del volumen exportado por comercializadora a nivel nacional en 2018 la lideró la comercializadora UNIBAN S.A. con el 34.5% del mercado, seguida por TECBACO S.A. (17.4%) y BANASAN S.A. (12%). En cuanto a la región Caribe, TECBACO S.A. es el mayor exportador (44.3%), seguido por BANASAN S.A. (30.7%) y en tercer lugar BANARRICA S.A. (9.4%)(ASBAMA, n.d.).

El sector bananero, a nivel nacional aporta 168,782 empleos de los cuales 42,069 son directos y 126,713 indirectos. De la cifra total, la región Caribe aporta 51,821 empleos de los cuales 12,916 son indirectos y 38,905 directos(ASBAMA, n.d.).

Respecto a los países a los cuales se exporta el banano colombiano, Bélgica es el principal destino con un porcentaje del 25.39%, seguido por Estados Unidos 17.40% y Reino Unido con 16.04% (ASBAMA, n.d.)(**Figura 1**).

Figura 1

Exportaciones de banano colombiano en el año 2018 según país de destino



2.4 Enfermedades que afectan la producción de banano

Existen diversos factores abióticos que influyen en la producción de banano en el mundo; entre estos se encuentran el suelo y la nutrición vegetal, drenaje e irrigación, tipo de cultivo, la densidad de siembra y bióticos como los agentes infecciosos: hongos, bacterias, virus y nematodos; este último factor es el de mayor preocupación para los productores de banano por ser el que ocasiona mayor número de pérdidas en los cultivos en el mundo (Ploetz et al., 2015).

Las enfermedades del banano más importantes a lo largo del tiempo han sido principalmente tres, la enfermedad de Panamá, la Sigatoka amarilla y la Sigatoka negra. La Enfermedad de Panamá es causada por el hongo *Fusarium oxysporum*, en los años 60 fue este hongo el responsable de que la variedad de banano de exportación conocida como *Gros Michel*, la más famosa para ese entonces se dejara de cultivar y fuera reemplazada por las variedades del subgrupo *Cavendish* (Marín et al., 2003). La Sigatoka amarilla fue la primera enfermedad

foliar que tuvo un impacto significativo a nivel económico para los cultivos de banano, sobre todo del subgrupo *Cavendish*, el hongo causante de esta enfermedad es *Mycosphaerella musicola*(Churchill, 2011)(Aman & Rai, 2015). La sigatoka negra, conocida en inglés como *Black leaf streak disease* (BLSD), es la enfermedad foliar que genera mayor preocupación para el sector bananero comparada con otras enfermedades, pues se caracteriza por ser la más agresiva para los cultivos del subgrupo *Cavendish*; además, debido a las características biológicas del hongo causante de esta enfermedad, como por ejemplo la alta producción de ascosporas, incremento en el número de ciclos sexuales por año y una tasa elevada de colonización de tejidos, han permitido posicionar la Sigatoka negra como la principal enfermedad foliar del banano(M. Hidalgo et al., 2006). Por esta razón, en las secciones siguientes se profundizará en la enfermedad de la Sigatoka negra.

2.5 Enfermedad Sigatoka negra

En Colombia, la Sigatoka negra se detectó por primera vez en octubre de 1981, en la zona bananera de Urabá y desde entonces se ha difundido por las regiones Atlántica, Pacífica y hacia el centro del país alcanzando los departamentos de Caldas, Cundinamarca y Tolima(Hidalgo Bucheli, 2009), lo cual generó problemas en los cultivos de banano, pues disminuyó su producción, aumentó el costo del cultivo por el manejo que se le debía dar a la enfermedad y también aumentó el riesgo para la salud de los agricultores por el uso de fungicidas(Churchill, 2011).

2.5.1 Aspectos generales de la interacción *Mycosphaerella fijiensis*-*Musa* (planta de banano)

M. fijiensis es el microorganismo causante de la enfermedad Sigatoka negra. Este es un hongo filamentoso, ascomiceto haploide, de orden Capnodiales, perteneciente a la familia Mycosphaerellaceae y de género *Mycosphaerella*(Churchill, 2011). *M. fijiensis* se reproduce sexual (teleomorfo) y asexualmente (anamorfo) lo cual genera una recombinación genética que

asegura el mejoramiento y la evolución de la especie. Tiene un hábito alimenticio hemibiotrófico, esto indica que el hongo inicialmente forma una asociación con las células vivas de la hoja en la cual se nutre de estas y luego cambia a un desarrollo destructivo y necrotrófico(Nieuwenhuis & James, 2016).

2.5.1.1 Ciclo de la enfermedad Sigatoka negra

El ciclo de la enfermedad Sigatoka negra (**Figura 2**) causada por el hongo *M. fijiensis* consta de cuatro etapas: germinación de esporas, penetración del huésped, desarrollo de síntomas y producción de esporas(Churchill, 2011; Henderson et al., 2006).

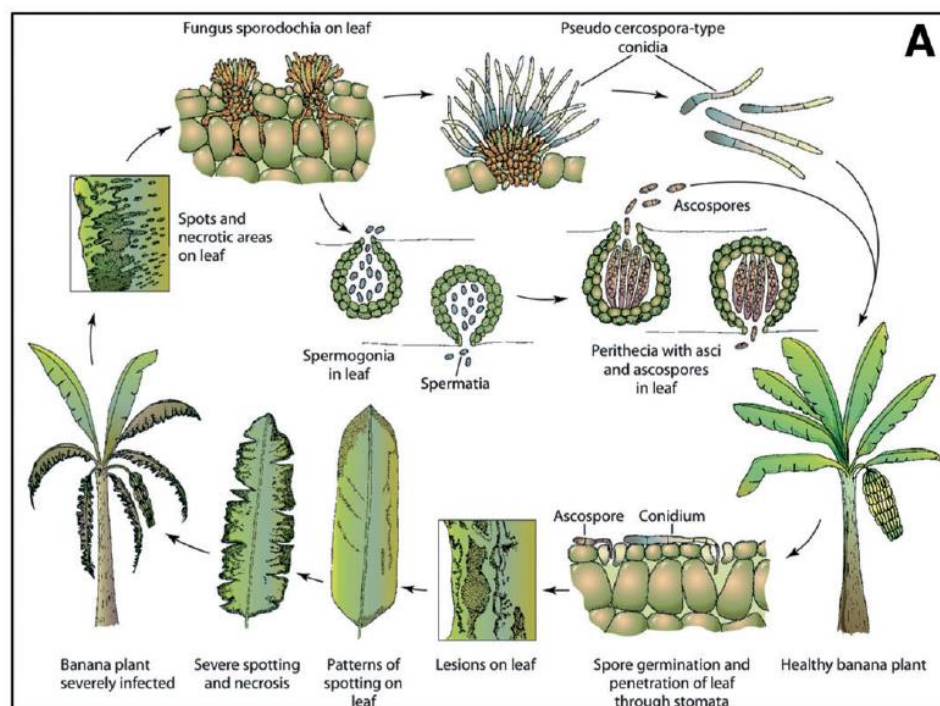
- Germinación de esporas: El ciclo de la enfermedad inicia cuando las ascosporas germinan en la superficie de la hoja, cuya germinación depende en gran medida de la humedad y temperatura del ambiente. La penetración de la estoma por los tubos germinales se favorece a temperaturas mayores a los 20°C y humedad cercana al 100%.
- Penetración del huésped: Luego de la germinación, el hongo experimenta un periodo de crecimiento epifítico que dura entre dos y tres días, lo cual significa que el hongo existe sobre la superficie de la hoja sin causarle daño. Luego, el tubo germinal produce un apresorio sobre un poro estomatal a través del cual el hongo dirige una hifa infectante.
- Desarrollo de síntomas: Una vez estando dentro de la hoja, la hifa infectante forma una vesícula sub-estomatal, desde esta vesícula crece una hifa intercelularmente, extendiéndose a través de las capas mesofílicas y las cámaras de aire hacia la capa empalizada. Estando en la capa empalizada, la hifa prolifera, creciendo en las cámaras de aire entre las venas. En esta etapa comienzan a aparecer los primeros síntomas, que

se presentan como pequeñas rayas color marrón rojizo y es en ese momento cuando inicia el periodo de transición que se conoce como el tiempo que lleva el desarrollo de síntomas desde las pequeñas rayas hasta las manchas negras en la hoja.

- Producción y dispersión de esporas: La producción de conidias en *M. fijiensis* ocurre en una etapa temprana del desarrollo de la lesión y principalmente en la superficie abaxial de la hoja. *M. fijiensis* genera cantidades pequeñas de conidias y se producen en grupos individuales o pequeños de conidióforos. Las conidias de este hongo son fácilmente desalojadas por el viento, haciendo fácil su desplazamiento hacia hojas más jóvenes y hacia otras plantas, mientras que las ascosporas requieren de agua para ser expulsadas del peritecio, dispersándose por salpicadura sobre hojas y plantas.

Figura 2

Ciclo de la enfermedad Sigatoka negra causada por el hongo M. fijiensis(Churchill, 2011)



2.5.2 Efecto de la Sigatoka negra en las plantas de banano

En las enfermedades foliares, todos los procesos que lideran el flujo de carbono vegetal como la fotosíntesis, respiración y transporte, se pueden ver afectados con el fin de favorecer la demanda de carbono por parte del microorganismo. *M. fijiensis* ataca las hojas de los cultivos de banano produciendo un deterioro en el área foliar de la planta, además retrasa la floración, ocasionando una disminución en el llenado del racimo y afectando la vida verde de la fruta induciendo una maduración prematura de los racimos.(Churchill, 2011):(M. Hidalgo et al., 2006)

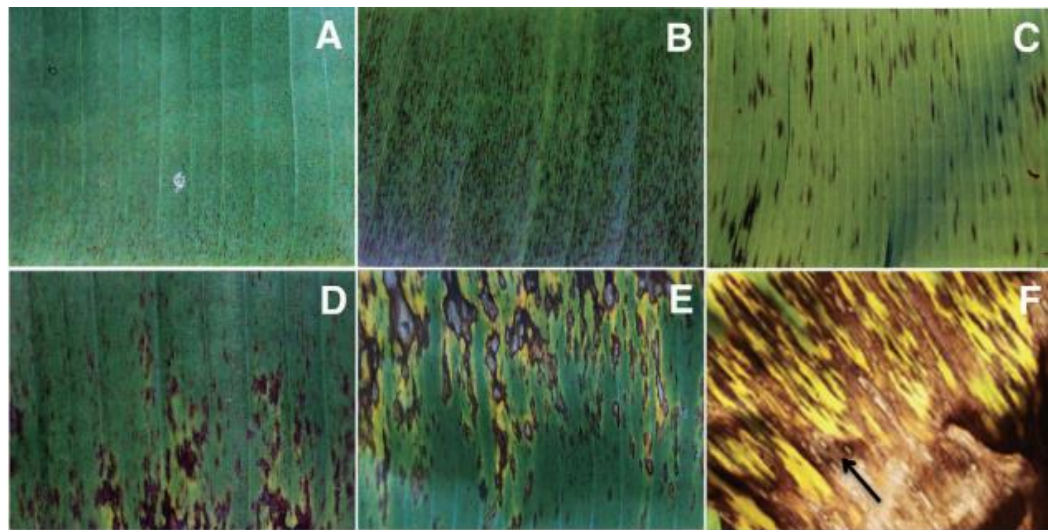
Mederedith y Lawrence (1969)(Churchill, 2011; Marín et al., 2003) describieron del desarrollo de síntomas por el hongo *M. fijiensis* en plantas de banano y lo dividieron en seis etapas.

- Etapa 1: En la superficie abaxial de la hoja se observan pequeñas manchas color marrón rojizo (**Figura 3. A**).
- Etapa 2: Aparecen rayas color marrón rojizo tanto en la superficie abaxial como adaxial de la hoja (**Figura 3. B**).
- Etapa 3: Comienzan a aparecer rayas más anchas, su color empieza a cambiar de marrón rojizo a marrón oscuro (**Figura 3. C**).
- Etapa 4: Las manchas pasan de ser marrón oscuro a negro (**Figura 3. D**).
- Etapa 5: Se desarrolla un halo clorótico alrededor de las manchas negras y las lesiones están ligeramente sumidas (**Figura 3. E**).

- Etapa 6: El centro de la mancha se seca y pasa a ser color blanco grisáceo, la mancha está rodeada por un borde marrón oscuro y se observa más sumida (**Figura 3. E**).

Figura 3

Etapas del desarrollo de la enfermedad Sigatoka negra según lo descrito por Meredith y Lawrence. A) Etapa 1, B) etapa 2, C) etapa 3, D) etapa 4, E) etapa 5, F) etapa 6 (Churchill, 2011)



En cuanto a la reacción de la planta (hospedero) al ataque del hongo (patógeno), Fullerton y Olsen (1995)(Fullerton & Olsen, 1995), determinaron el grado de reacción de acuerdo con el progreso de los síntomas, los cuales dependen de la relación planta-hospedero (**Tabla 2**).

Tabla 2

Grados de reacción de acuerdo con el progreso de los síntomas(Fullerton & Olsen, 1995)

Grado	Síntomas (Etapa/tiempo)	Patógeno	Hospedero
1	Max 1 o 2	Avirulento	Resistencia alta
2	Max 3	Virulencia baja	Resistencia moderada
3	4>45 días	Virulencia baja	Resistente
4	4<45 días	Virulencia alta	Moderadamente susceptible
5	4<30 días	Virulencia muy alta	Altamente susceptible

2.5.3 Influencia de la Sigatoka negra en el mercado bananero.

La presencia de Sigatoka negra en los cultivos de banano puede ocasionar una disminución en la producción del 50% o más si no se trata de manera adecuada la enfermedad. La susceptibilidad de los cultivos de banano a *M. fijiensis* hace que sea necesario el uso de múltiples fungicidas aplicados de forma constante en los cultivos, lo cual genera un aumento en el costo del manejo de esta enfermedad, mayor riesgo para la salud y el medio ambiente(Churchill, 2011). La aplicación de fungicidas para el control de la Sigatoka negra en América Central es responsable de al menos el 27% del precio minorista del banano, con gastos que van desde 400 a 1400 dólares por hectárea por año debido a las múltiples aplicaciones de fungicidas requeridas para el control de la enfermedad que pueden llegar a ser hasta de 45 aplicaciones al año^{6,27}. En Colombia, el uso de fungicidas se ha incrementado de 19 ciclos por año en 1993 a 32 ciclos por año en 2013, repercutiendo negativamente en el mercado y producción del banano pues, incrementa los costos del manejo de la enfermedad, siendo los

pequeños agricultores los más afectados por el alto costo que involucra el uso de este método de control(Gutierrez-Monsalve et al., 2015).

2.5.4 Control de la Sigatoka negra

Actualmente existen diferentes sistemas de control contra *Mycosphaerella fijiensis*, entre estos se encuentran: manejo integrado del cultivo, control biológico y control químico. El manejo integrado del cultivo consiste en mejorar el drenaje del suelo, disminuir la densidad de siembra, controlar maleza y eliminar el tejido enfermo(Sanabria & Inta, 2006).

El control biológico consiste en usar microorganismos o los productos de su metabolismo para controlar total o parcialmente las poblaciones de un patógeno. Diferentes hongos del género *Trichoderma*(Cavero, 2011) han sido evaluados en el control de la Sigatoka negra, encontrando que podría ser una opción para tratar la enfermedad. Sin embargo, aunque es una alternativa al uso de productos químicos y tiene la ventaja de presentar un bajo riesgo y menor impacto tanto en el medio ambiente como en la salud de las personas, el control biológico es más eficaz controlando enfermedades del suelo y no foliares como la enfermedad de la Sigatoka negra producida por *M. fijiensis*(Guzmán, 2012).

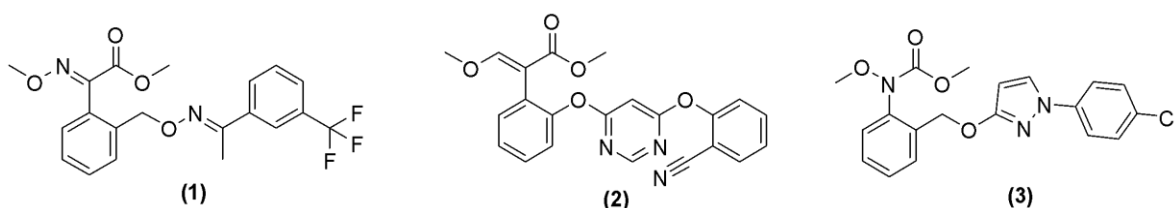
El control químico es actualmente el método más eficiente en el manejo de esta enfermedad y consiste en la aplicación de fungicidas con el fin de detener el crecimiento y desarrollo de patógenos en las plantas(Martínez-Bolaños et al., 2012). Sin embargo, el hongo *M. fijiensis* presenta una alta capacidad de adaptación, lo cual hace necesario el uso de diferentes tipos de fungicidas; entre los más comunes se encuentran los inhibidores de la quinona (QoI) e inhibidores de la biosíntesis del esterol (como los inhibidores de desmetilación y las aminas), que se describirán brevemente a continuación(Lorenz, 2012).

Inhibidores de la quinona (QoI): Esta clase de fungicidas inhibe la respiración mitocondrial en los hongos a través de la unión en el sitio “externo” de la quinona expuesto en

el complejo enzimático citocromo *bc₁* (complejo que interviene en la respiración mitocondrial), bloqueando la transferencia de electrones y deteniendo la síntesis de ATP (Fernández-Ortuño et al., 2008). Se introdujeron en América Latina entre los años 1997 y 2000 y con solo dos a tres años de uso, el hongo *M. fijiensis* desarrolló fungo resistencia. En Colombia, los niveles de resistencia a estos fungicidas son muy altos, aunque desde el año 2010 no se tiene reporte de su uso (Lorenz, 2012). Entre los QoI más comunes se encuentran: el trifloxystrobin, el azoxystrobin y el pyraclostrobin (**Figura 4**)^{17,18}.

Figura 4

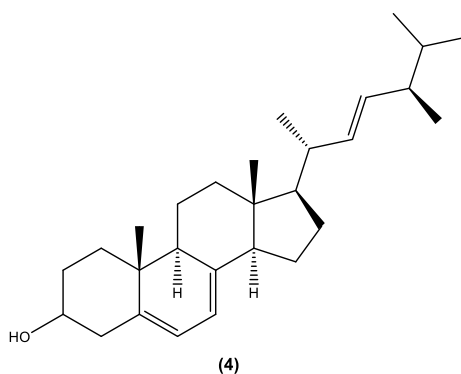
Inhibidores externos de la quinona: Trifloxystrobin (1), azoxystrobin (2) y pyraclostrobin (3)



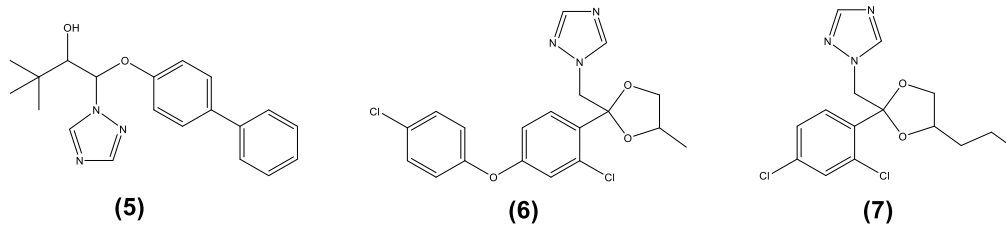
Inhibidores de desmetilación (DMI): Este tipo de fungicida inhibe las enzimas implicadas en la biosíntesis del ergosterol (**Figura 5**), componente principal de la membrana plasmática de los hongos. Esta deficiencia en ergosterol conlleva a la formación de membranas celulares con estructuras y funciones alteradas que afectan el crecimiento del hongo, e inducen la acumulación excesiva de precursores de ergosterol los cuales, son tóxicos para el microorganismo (Leroux et al., 2008). La primera aparición de los DMI en el mercado fue en los años 80 y los cambios en la sensibilidad se observaron por primera vez diez años después (Ngando et al., 2015). Entre los fungicidas inhibidores de desmetilación utilizados en los cultivos de banano se encuentran: el bitertanol, el difenoconazol y el propiconazol (**Figura 6**).

Figura 5

Estructura del ergosterol (4), componente principal de la membrana plasmática de los hongos

**Figura 6**

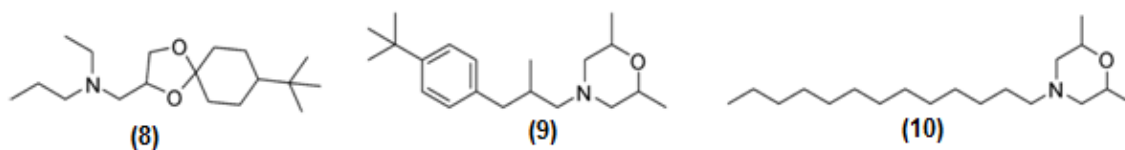
Inhibidores de desmetilación (DMI): Bitertanol (5), difenoconazol (6) y propiconazol (7)



Aminas: *M. fijiensis* presenta alta sensibilidad principalmente frente a las aminas terciarias; el mecanismo de acción de este grupo de fungicidas ocurre a través de la inhibición de la biosíntesis del ergosterol. Entre estas se encuentran la espiroxamina, el fenpropimorf y el tridemorf (Lorenz, 2012) (**Figura 7**).

Figura 7

Aminas inhibidoras de la biosíntesis del esterol: Espiroxamina (8), fenpropimorf (9) y tridemorf (10)



2.6 Propiedades biológicas de los aceites esenciales

Los aceites esenciales son producto de la síntesis natural que ocurre en diferentes partes de las plantas durante los procesos de metabolismo secundario. Estos contienen alrededor de 20 a 60 compuestos que están presentes en diferentes concentraciones, siendo los más comunes metabolitos tipo terpenos, aldehídos, ésteres, cetonas, alcoholes, compuestos aromáticos y lactonas (Nakatsu [xc*] et al., 2000). No obstante, se ha determinado que los terpenos son los metabolitos más abundantes en los aceites esenciales, especialmente los monoterpenos y sesquiterpenos (Puškárová et al., 2017).

El estudio de los aceites esenciales y sus componentes principales ha demostrado que estos tienen un amplio espectro de actividad biológica y terapéutica. Tayarani-Najaran *et al* (2013) (Tayarani-Najaran et al., 2013) realizaron un estudio de actividad antiemética para los aceites de hierbabuena (*Mentha spicata*) y menta piperita (*Mentha piperita*) en náuseas y vómitos inducidos por quimioterapia, obteniendo como resultado, una reducción significativa tanto en la intensidad como en el número de eventos eméticos en las primeras 24 horas para los dos aceites esenciales encontrándolos como seguros y efectivos para el tratamiento de las náuseas y vómito.

Tung *et al.* (2010) (Tung et al., 2010) estudiaron el aceite esencial de canela indígena (*Cinnamomum osmophloeum*), encontrando que este posee actividad antiinflamatoria, pues inhibe la producción de óxido nítrico NO (IC₅₀ 9.7-15.5 µg/mL), compuesto que cuando está presente en grandes cantidades en el cuerpo es asociado con diversas enfermedades

inflamatorias, demostrando así el potencial de este aceite esencial para ser empleado en productos naturales para la salud.

También se han realizado estudios de la actividad antioxidante de los aceites esenciales, Lagouri *et al.* (1993) (Lagouri et al., 1993) evaluaron cuatro aceites provenientes de las siguientes plantas: *Origanum vulgare*, *O. onites*, *Coridothymus capitatus* y *Satureja thymbra*, encontrando que todos estos tienen actividad antioxidante al ser evaluados en placas de cromatografía de capa fina rociada con una solución de β -caroteno y ácido linoleico, lo cual demuestra el potencial de los aceites esenciales en la industria alimentaria para ser empleados con el fin de retrasar los cambios en los alimentos debidos a su oxidación.

Adicional, los aceites esenciales también han sido reportados como promisorios agentes antimicrobianos contra diferentes microorganismos patógenos, tanto de interés clínico como agrícola. En la Tabla 3 se reportan algunos aceites esenciales evaluados contra hongos patógenos.

Tabla 3

Actividad antimicrobiana determinada para diferentes aceites esenciales sobre diversas clases de hongos

Aceite esencial	Microorganismo	Concentración de inhibición	Referencia
Limón (<i>Citrus lemon</i>)	<i>Aspergillus niger</i>	0.94% ^a	(Viuda et al., 2008)
Mandarina (<i>Citrus reticulata</i>)	<i>Aspergillus flavus</i>		
Pomelo (<i>Citrus paradisi</i>)	<i>Penicillium</i>		
Naranja (<i>Citrus sinensis</i>)	<i>chrysogenum</i> <i>Penicillium verrucosum</i>		
Eucalipto (<i>Eucalyptus camaldulensis</i>)	<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>F. solani</i> <i>F. verticillioides</i> <i>F. proliferatum</i> <i>F. subglutinans</i>	7-8 $\mu\text{L}/\text{mL}^{\text{b}}$	(Gakuubi et al., 2017)
Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>)	<i>M. graminicola</i>	31.04 $\mu\text{L}/\text{L}^{\text{c}}$	(Jabeur et al., 2017)
Pimienta (<i>Pimenta dioica</i>)	<i>M. fijiensis</i>	100 ppm ^a	(Gutiérrez-Jiménez et al., 2017)
Canela (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>)			
Oregano (<i>Origanum vulgare</i>)			
<i>Monodora myristica</i>	<i>M. fijiensis</i>	744.05 ppm ^c	(Camara et al., 2017)
Eucalipto (<i>Eucalyptus torelliana</i>)		315.90 ppm ^c	

a. Concentración inhibitoria del 100%

b. Concentración mínima inhibitoria (CMI)

c. Concentración inhibitoria del 50% (IC₅₀)

En el presente proyecto de grado se evaluó la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*), cardamomo (*Elettaria cardamomum*), limoncillo (*Cymbopogon flexuosus*), palmarosa (*Cymbopogon martinii*), naranja (*Citrus sinensis*), citronela (*Cymbopogon nardus*) y orégano (*Lippia origanoides*) quimiotipo timol-carvacrol I (En adelante se denominará como orégano T-C I) y quimiotipo timol-carvacrol II (orégano T-C II). Por tanto, a continuación, se presenta una breve revisión respecto a cada aceite esencial, su composición química y potencial biológico.

- **Tomillo** (*Thymus vulgaris*)

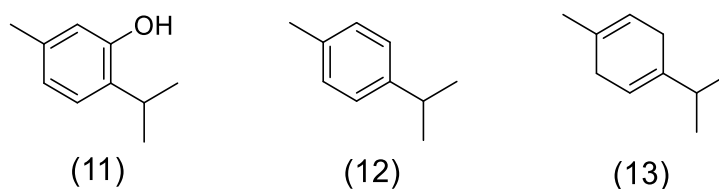
El tomillo es una planta aromática y medicinal nativa del mediterráneo occidental de Europa, ha sido comúnmente utilizada como conservante natural de alimentos. Además, es ampliamente conocida por sus propiedades expectorantes, antitusivas, antibroncolíticas, antiespasmódicas y diuréticas (Fachini-Queiroz et al., 2012). Se han realizado diferentes estudios sobre la actividad antifúngica del aceite esencial de tomillo, encontrando que presenta actividad sobre *Trichophytum rubrum* y *Trichophytum tonsurans*, hongos responsables de la dermatomicosis (Soković et al., 2008), *Mycosphaerella graminicola* patógeno de las plantas de trigo (Jabeur et al., 2017), *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* (Rahimifard et al., 2008), entre otros.

El aceite esencial de tomillo está compuesto principalmente por timol (47,59%), *p*-cimeno (8,41%) y γ -terpineno (30,9%) (Borugă et al., 2014) (**Figura 8**), compuestos a los cuales se les ha evaluado su actividad antimicrobiana, encontrando que el timol presenta propiedades antifúngicas contra los hongos *Colletotrichum acutatum* y *Botryodiplodia teobroma* (Numpaque et al., 2011), *Candida albicans* (Rahimifard et al., 2008), *Fusarium solani*, *Fusarium tricinctum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium verticillioides* (Stević et al., 2014), entre otros. El γ -terpineno actúa como antifúngico contra *Sporothrix schenckii* y

Sporothrix brasiliensis a una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 62.5-500.0 $\mu\text{g/mL}$ y 125.0-250.0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente(Couto et al., 2015). El *p*-cimeno es un monoterpene que está presente en al menos 100 especies de plantas y posee actividad antifúngica contra *Candida lusitaniae*(Marchese et al., 2017).

Figura 8

Principales componentes del aceite esencial de tomillo: Timol (11), *p*-cimeno (12) y γ -terpineno (13)



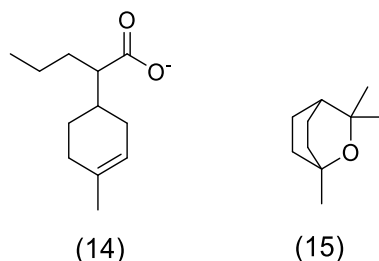
- **Cardamomo** (*Elettaria cardamomum*)

El aceite esencial de cardamomo es utilizado como agente aromatizante en dulces, encurtidos y en productos de panadería, además se emplea en el tratamiento de problemas gastrointestinales(Sereshti et al., 2012).

Se ha estudiado la actividad antifúngica del aceite esencial encontrando que posee actividad contra *Aspergillus flavus*, *Candida albicans* y *Trichophyton simii*(Atta-Ur-Rahman et al., 2000). Los componentes principales del aceite esencial son eucaliptol (54.4%) y acetato de terpenilo (24%)(Atta-Ur-Rahman et al., 2000) (**Figura 9**). La actividad antifúngica del eucaliptol se evaluó sobre *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*; obteniendo como resultado una inhibición del crecimiento micelial de 5.5% a una concentración de 900 $\mu\text{g/mL}$ (Vilela et al., 2009).

Figura 9

Principales componentes del aceite esencial de cardamomo: Acetato de terpenilo (14) y eucaliptol (15)

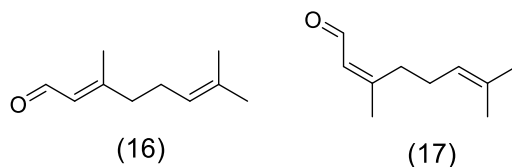


- **Limoncillo** (*Cymbopogon flexuosus*)

El limoncillo es una planta herbácea aromática nativa de la India, el aceite esencial de esta planta se utiliza comúnmente en la industria cosmética y farmacéutica, está compuesto principalmente por citral (43.80%) y neral (18.93%)(Pandey et al., 2003) (**Figura 10**). El aceite de limoncillo se ha reportado por presentar actividad antifúngica contra los patógenos *Fusarium oxysporum*, *Trichophyton mentagrophytes* a una concentración inhibitoria del 100% a las concentraciones de 1.56 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y 0.39 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Pandey et al., 2003), respectivamente. Este aceite también se ha evaluado contra el hongo *Aspergillus flavus*, causante del deterioro de las plantas medicinales *Terminalia arjuna*, *Acorus calamus*, *Rauwolfia serpentina*, *Holarrhena antidysenterica*, *Withania somnifera* y *Boerhaavia difusa*, encontrando que inhibió totalmente el crecimiento de *A. flavus* con una concentración inhibitoria del 100% de 1.3 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Kumar et al., 2009). En el caso del citral, este presenta actividad antifúngica contra *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Sporothrix schenkii* y *Aspergillus fumigatus*, ha sido determinado con una concentración mínima inhibitoria (CMI) que varía entre 0.1 a 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Pattnaik et al., 1997).

Figura 10

Principales componentes del aceite esencial de limoncillo: Citral (16) y neral (17)

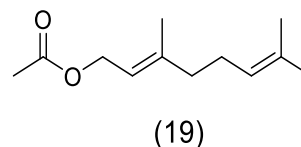
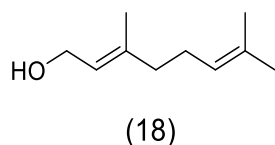


- **Palmarosa** (*Cymbopogon martinii*)

Palmarosa es una hierba perenne nativa del sudeste de Asia, su aceite esencial es usado como repelente de insectos, antihelmíntico y antifúngico. Entre los componentes principales del aceite se encuentran geraniol (65%) y acetato de geranilo (20%)(Ganjewala, 2009) (**Figura 11**). El aceite esencial de palmarosa presenta actividad antifúngica contra *Microsporium gypseum* y *Trichophyton rubrum*, con una concentración mínima inhibitoria de 200 y 150 ppm, respectivamente(Prasad et al., 2010). El geraniol por su parte, presenta actividad antifúngica contra *Trichophyton rubrum* a una concentración mínima inhibitoria (CMI) que varía entre 16 y 256 ppm(De Oliveira Pereira et al., 2015), también contra *Candida albicans* (CMI de 16 ppm)(Leite et al., 2015). El acetato de geranilo tiene actividad antifúngica contra *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. verrucosum* y *Cryptococcus neoformans* a unas cOncentraciones fungicidas mínimas (CFM) que van desde 0.04 hasta 0.64 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Pinto et al., 2013).

Figura 11

Principales componentes del aceite esencial de palmarosa: Geraniol (18) y acetato de geranilo (19)

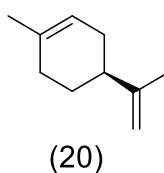


- **Naranja** (*Citrus sinensis*)

Debido a sus múltiples propiedades, el aceite esencial de naranja es usado ampliamente en la industria cosmética, alimentaria y en la medicina popular. Está compuesto principalmente por limoneno (96.62%)(Velázquez-Nuñez et al., 2013) (**Figura 12**). Se ha reportado actividad biológica de este aceite ,contra *Staphylococcus aureus*, *Penicillium chrysogenum*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* con CMI que varía desde 4.66 hasta 18.75 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Tao et al., 2009). Por su parte, el limoneno actúa como antifúngico contra *Trichophyton rubrum*, con un valor CMI de 0.5% v/v(Chee et al., 2009).

Figura 12

Principal componente del aceite esencial de naranja: Limoneno (20)



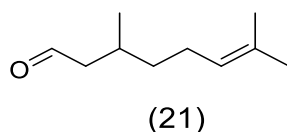
- **Citronela** (*Cymbopogon nardus*)

El aceite esencial de citronela ha sido utilizado en la producción de alimentos, bebidas, perfumes y en productos farmacéuticos. Actualmente se han venido estudiando sus propiedades biológicas como antifúngico sobre varias especies de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Eurotium*,

encontrando que presenta inhibición a partir de una concentración de 250 ppm(Nakahara et al., 2003). El componente principal del aceite esencial es citronelal (29.6%)(Wei & Wee, 2013) (**Figura 13**); este presenta actividad antifúngica contra *Aspergillus*, *Pyricularia grisea* y *Colletotrichum musae* con CMI de 25, 50 y 25 ppm respectivamente(Aguiar et al., 2014).

Figura 13

Principal componente del aceite esencial de citronela: Citronelal (21)

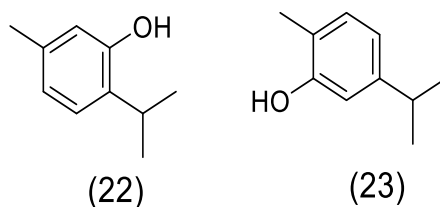


- **Orégano** (*Lippia organoides*)

El orégano es una planta ampliamente utilizada en la preparación de comidas y en la medicina tradicional. Se ha evaluado la actividad biológica del aceite esencial, encontrando que inhibe el crecimiento de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Trichophyton rubrum*, *Lactobacillus casei*, entre otros microorganismos(Oliveira et al., 2007). Estudios realizados con el aceite esencial de orégano quimiotipo timol mostraron que este presenta actividad antifúngica contra *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus fumigatus*, con valores de MIC de 157.5, 198.4, 125 y 31 mg/mL respectivamente(Betancur-galvis et al., 2011). El aceite esencial está compuesto principalmente por carvacrol (38.6%) y timol (18.5%)(Oliveira et al., 2007) (**Figura 14**). La actividad antifúngica del carvacrol se ha evaluado contra *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium funiculosum*, *Phomopsis helianthi* y otros ocho microorganismos, encontrando que este presenta un MIC entre 0.1 y 0.2 $\mu\text{L/mL}$ (Soković et al., 2002). El timol, por su parte, presenta actividad antifúngica contra 111 aislados de *Candida* resistentes y sensibles al fluconazol, con valores de CMI de 100–125 mg/L y 100–150 mg/L, respectivamente(Ahmad et al., 2011).

Figura 14

Principales componentes del aceite esencial de orégano: Timol (22) y carvacrol (23)



2.7 Aproximaciones del mecanismo de acción de los aceites esenciales en su actividad biológica contra hongos

Los mecanismos de acción de los aceites esenciales en hongos han sido poco investigados; a continuación, se relacionan algunos estudios de referencia. Jun Tian *et al.* (2015)(Tian et al., 2015) realizaron un estudio del mecanismo de acción del aceite esencial de eneldo (*Anethum graveolens*) en *Aspergillus flavus* evaluando el efecto del aceite sobre la membrana plasmática y las mitocondrias del hongo. Según Jun Tian *et al.*, estos son los blanco o diana por los cuales el aceite ejerce su actividad biológica, ya que la membrana plasmática desempeña un papel vital en la conservación del entorno homeostático y la transferencia de energía e información en la célula con el fin de mantenerla sana. Las mitocondrias por su parte proveen un gran número de servicios a la célula como la producción de energía, la homeóstasis del pH, la regulación de la apoptosis, entre otros.

En el estudio se detectó mediante citometría de flujo una lesión en la membrana plasmática dependiente de la concentración del aceite, lo cual llevó a los investigadores a evaluar el efecto de este sobre la cantidad de ergosterol, componente principal de la membrana plasmática y responsable de mantener la función e integridad celular. Se encontró que el contenido de ergosterol en la membrana de *A. flavus* fue significativamente inhibido por las diferentes concentraciones evaluadas de aceite esencial (0.25, 0.5, 0.75, 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$), causando así, cambios morfológicos en las células. También se encontró que el aceite de eneldo causó

interferencia en el potencial de membrana mitocondrial (MMP), disminución de las actividades de ATPasa y deshidrogenasa en las células del hongo lo cual llevó a la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en *A. flavus*. Por lo tanto, se concluyó que la actividad antifúngica del aceite esencial de eneldo es producto de su capacidad para romper la barrera de permeabilidad de la membrana plasmática y por la acumulación de ROS en el hongo.

En otro estudio, De Oliveira *et al* (2015)(De Oliveira Pereira et al., 2015) evaluaron la actividad antifúngica del geraniol y citronelol, monoterpenos presentes en diferentes aceites esenciales, contra *Trichophyton rubrum*, encontrando como resultado que los dos compuestos causan daños a la pared y membrana celular de *T. rubrum* a través de un mecanismo que parece implicar la inhibición de la biosíntesis de ergosterol.

Por otro lado, Sharma *et al.* (2006)(Sharma & Tripathi, 2006) investigaron la toxicidad del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis*) en el hongo *Aspergillus niger*. A través de la microscopía electrónica de barrido (SEM), estudiaron el modo de acción del aceite en el patógeno, encontrando que el tratamiento con el aceite esencial conduce a la distorsión y adelgazamiento de la pared hifal, reducción del diámetro de la hifa y la ausencia de conidióforos.

En conclusión, es posible que el mecanismo de acción de los aceites esenciales esté relacionado con un cambio físico, químico o bioquímico en los microorganismos, provocado por la exposición a los aceites. Además, la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales depende principalmente de la concentración y tipo de compuestos presentes en el aceite, los cuales pueden actuar por diferentes mecanismos, lo que significa que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales está regulada por más de un mecanismo de acción(Rao et al., 2019).

3. Materiales y métodos

3.1 Reactivos

Los medios de cultivo PDA (*Potato Dextrose Agar*) y agar Saboraud, así como el DMSO (dimetilfulfóxido) 99.9% de pureza, fueron comprados a la compañía MERCK y utilizados de acuerdo con las instrucciones/recomendaciones del fabricante.

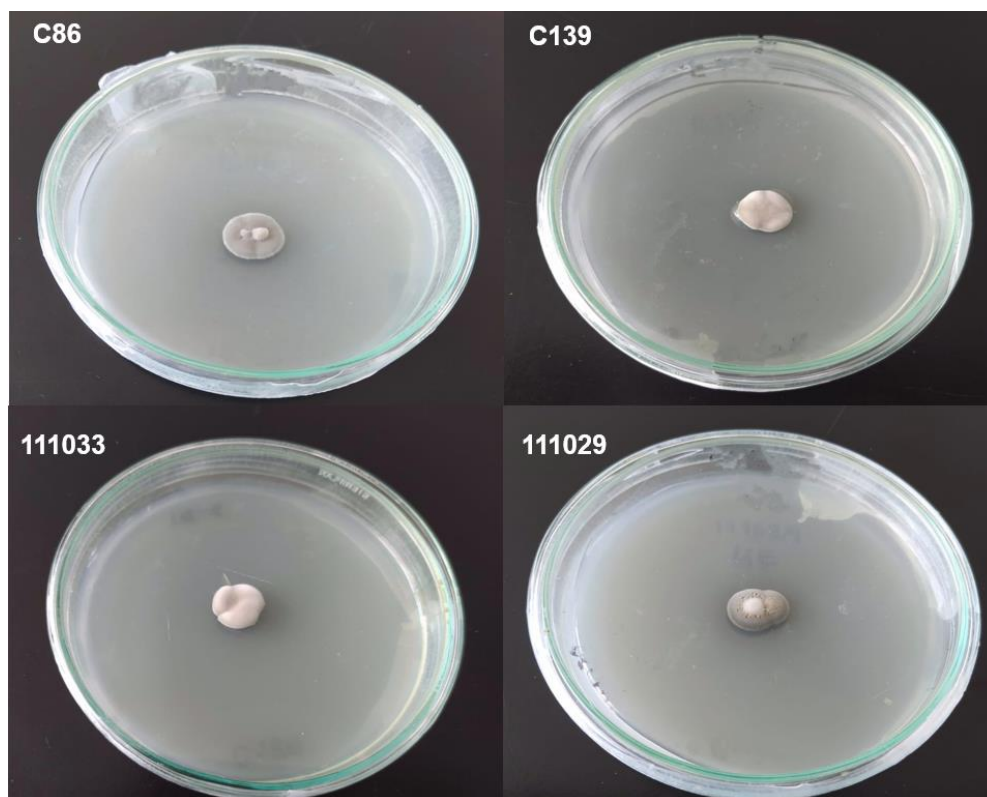
3.2 Material biológico

Las cepas de *M. fijiensis* provienen de plantaciones de banano localizadas en la región de Urabá (Antioquia) y fueron donados por el Banco de Colección de Microorganismos del grupo de Biotecnología Vegetal de la Universidad Nacional de Colombia–Sede Medellín.

Los aislados de *M. fijiensis* fueron obtenidos de ascosporas, después de la descarga de las hojas infectadas con *Sigatoka* negra sobre agar-agua al 2%, y fueron mantenidas en tubos con medio PDA a $25\pm 2^\circ\text{C}$. Los aislados de *M. fijiensis* fueron caracterizados por amplificación de la región ITS por PCR para diferenciar esta de *Mycosphaerella musicola* (Johanson et al., 1994). Las siguientes secuencias de oligonucleótidos fueron utilizadas: MF137 5'GGCGCCCCCGGAGGCCGTCTA3' (específico para *M. fijiensis*), MM137 5'GGCGCCCCCGGAGGTCTCCTT3' (específico para *M. musicola*) en conjunto con el primer inespecífico R635 5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG3' que codifica para una región conservada situada en la subunidad 25S del DNA ribosomal. Las cepas de *M. fijiensis* fueron clasificadas acorde con Cañas et. al (Cañas-Gutiérrez et al., 2009) y se mantuvieron criopreservadas a -80°C en el Laboratorio de hongos del Parque Tecnológico Guatiguará de la Universidad Industrial de Santander bajo las referencias: C86, C139, 111033 y 111029 (**Figura 15**).

Figura 15

Cepas de M. fijiensis utilizadas para el estudio

**3.3 Material vegetal**

Los aceites esenciales empleados en el presente trabajo de grado fueron suministrados por el CENIVAM (Centro nacional de investigaciones para la agroindustrialización de especies vegetales aromáticas y medicinas tropicales), Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Santander, Colombia.

Las plantas bajo estudio se cultivaron en parcelas experimentales ubicadas en el Complejo Agroindustrial Piloto del CENIVAM (N 07°08,442; WO 73°06,960; 977 msnm), en la Universidad Industrial de Santander (Bucaramanga, Santander, Colombia). La caracterización taxonómica de las plantas se realizó en el Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia (Bogotá, Colombia).

La extracción de los aceites esenciales utilizados en este estudio se llevó a cabo mediante la hidrodestilación asistida por radiación de microondas (Cáceres et al., 2020). La identificación y concentración relativa de los metabolitos presentes en los aceites esenciales se realizó por GC-MS y se encuentran reportadas por Cáceres et al (2020) (Cáceres et al., 2020).

3.4 Ensayos biológicos

3.4.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales contra la cepa C86 del hongo *M. fijiensis* mediante la técnica de dilución en agar

Para evaluar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se empleó el método de dilución en agar (Viuda et al., 2008). Se prepararon soluciones de los aceites de tomillo, cardamomo, limoncillo, naranja, citronela y palmarosa en medio PDA a concentraciones de 3000, 1000 y 500 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Posteriormente, se vertieron en cajas Petri de 10 cm de diámetro. Tan pronto como se solidificó el medio se inocularon las cajas colocando un disco de 8 mm de diámetro de material micelial tomado de cultivos del hongo *M. fijiensis* -cepa C86- de 15 días de crecimiento. Las cajas Petri con el inóculo se incubaron a 27°C durante 15 días. La eficacia del tratamiento se evaluó durante 15 días midiendo el diámetro del hongo colonizado. Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado. Como control se utilizó una caja Petri con medio PDA y el inóculo fúngico según lo descrito anteriormente.

La evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se realizó en el día 15 determinando el porcentaje de inhibición micelial (PIM) con la siguiente fórmula (Tamayo & Carvalho, 2014):

$$PIM = \frac{dc - dt}{dc} * 100$$

Donde:

dc: Diámetro de la colonia de la muestra control

dt: Diámetro de la colonia con el tratamiento

3.4.2 Determinación de la concentración inhibitoria del 50% de la población (IC₅₀) de los aceites esenciales empleando la técnica de dilución en microplato

La determinación del IC₅₀ se determinó para los aceites esenciales de tomillo, cardamomo, limoncillo, naranja, citronela, palmarosa, orégano T-C I y orégano T-C II.

Para determinar la concentración de inhibición del 50% de la población (IC₅₀) de los aceites esenciales se empleó el ensayo de dilución en microplatos (Peláez et al., 2006). El inóculo se preparó en agua destilada estéril a partir de un cultivo en PDA de 15 días de crecimiento, la suspensión fue fragmentada por vortex durante tres minutos y filtrada con gasa estéril. Se realizó el recuento de propágulos en cámara Neubauer y se ajustó el inóculo a 2×10^5 propágulos/mL en agua destilada estéril. Luego, en microplacas estériles NEST de 96 pozos se adicionaron 50 μ L de caldo Saboraud, 50 μ L del inóculo fúngico y 50 μ L de solución de aceite esencial preparada a partir de una solución stock en DMSO de 80000 μ L/mL. Se evaluaron concentraciones en el rango de 50 a 1000 μ L/mL. Como control se utilizó 50 μ L de caldo Saboraud, 50 μ L del inóculo fúngico y 50 μ L de solución de DMSO 6.6%. En todos los ensayos, la concentración de DMSO no fue superior a 6.6%. Las microplacas se almacenaron en una incubadora (MEMMERT) a 27°C durante 10 días.

El crecimiento micelial se determinó empleando un espectrofotómetro (THERMO SCIENTIFIC), midiendo la absorbancia de la solución en cada pozo a una longitud de onda de 595 nm en el día cero y a los diez días de realizado el ensayo (W. Hidalgo et al., 2009). A la absorbancia medida se le restó el blanco compuesto por medio y solución de DMSO. El diseño experimental consistió en cinco réplicas técnicas y tres réplicas biológicas para cada cepa.

Todos los aceites esenciales se evaluaron sobre la cepa C86. Aquellos aceites que presentaron buena actividad contra esta cepa fueron evaluados contra los aislados de *M. fijiensis* C139, 111033 y 111029.

Con el fin de determinar si mezclas de aceites esenciales presentaban mejor IC₅₀ que los aceites ensayados individualmente, se formaron tres grupos de aceites esenciales: **Grupo 1** (Tomillo, cardamomo y limoncillo), **Grupo 2** (Naranja, citronela y palmarosa) y **Grupo 3** (Orégano T-C I y orégano T-C II) (**Tabla 6**). Los tres grupos de aceites esenciales fueron evaluados en el rango de 50 a 500 $\mu\text{L}/\text{mL}$ contra las cepas C86, C139, 111033 y 111029. Estos grupos se formaron a partir de un efecto sinérgico observado en ensayos previos que no se presentan en este documento.

3.5 Análisis estadístico de los datos

Todos los ensayos experimentales fueron realizados por triplicado. Los resultados fueron analizados utilizando análisis de varianza de una vía ANOVA usando STATGRAPHICS Centurion XVI.II (Statgraphics Technologies, Inc. The plains, Virginia, USA). Distribución normal y homogeneidad de varianza de los datos fueron verificados usando la prueba de Shapiro-Wilk y de Levene, respectivamente. Prueba de rangos múltiples fue aplicada para comparaciones múltiples con un nivel de confianza del 95%. Valores con p-valor menor a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos. Aquellos conjuntos de datos que no cumplieron los supuestos estadísticos para ANOVA fueron transformados con logaritmo natural, logaritmo en base 10 y raíz cuadrada previo al análisis. Prueba de comparación de medianas de Krustal-Wallis fue utilizada para comparaciones múltiples de datos cuando no aplica estadística paramétrica.

4. Resultados y discusión

A partir de lo descrito en la revisión bibliográfica que soporta el presente Trabajo de grado, queda claro que los aceites esenciales pueden ser una alternativa potencial frente al control fitosanitario. Aunque el estudio de la actividad biológica de estos ha sido bastante amplio, en ninguno de los trabajos consultados evalúan la actividad antifúngica de los aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*), cardamomo (*Elettaria cardamomum*), limoncillo (*Cymbopogon flexuosus*), palmarosa (*Cymbopogon martinii*), naranja (*Citrus sinensis*), citronela (*Cymbopogon nardus*) y orégano (*Lippia origanoides*) T-C I y T-CII contra el hongo *M. fijiensis*; por tanto, en el presente Trabajo de grado se evaluó la actividad antimicrobiana de estos aceites esenciales frente al hongo objeto de estudio mediante las técnicas de dilución en agar y dilución en microplato.

4. 1 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales mediante la técnica de dilución en agar

El método de dilución en agar se empleó con el fin de determinar el porcentaje de inhibición micelial de los aceites esenciales de tomillo, cardamomo, limoncillo, naranja, citronela y palmarosa. Mediante esta técnica se logró determinar que, de los seis aceites esenciales evaluados, los que presentaron mayor porcentaje de inhibición micelial (PIM) a las concentraciones empleadas (500, 1000 y 3000 $\mu\text{L}/\text{mL}$) fueron los aceites de limoncillo, citronela y palmarosa (**Tabla 4**).

Tabla 4

Porcentaje de inhibición micelial (PIM) promedio de los aceites esenciales evaluados para la cepa de M. fijiensis C86

Aceite esencial	Porcentaje de inhibición micelial (PIM) ± D.E		
	500 µL/ mL	1000 µL/ mL	3000 µL/ mL
<i>Thymus vulgaris</i> (T)	6.1 ^a ± 4.5	29.6 ^b ± 3.4	61.0 ^{b,c} ± 13.3
<i>Elletaria cardamomum</i> (CA)	27.8 ^b ± 4.8	44.4 ^{b,c} ± 9.6	44.4 ^{b,c} ± 9.6
<i>Cymbopogon flexuosus</i> (L)	91.7 ^{d,e,f} ± 14.4	91.7 ^{d,e,f} ± 14.4	100 ^f
<i>Citrus sinensis</i> (N)	10.0 ^a ± 5.8	24.4 ^{a,b} ± 15.4	54.4 ^{b,c} ± 11.7
<i>Cymbopogon nardus</i> (CI)	68.5 ^{c,d} ± 5.2	100 ^f	100 ^f
<i>Cymbopogon martinii</i> (P)	77.8 ^{d,e} ± 9.6	100 ^f	100 ^f

Nota: Porcentaje de inhibición micelial promedio ± desviación estándar de la actividad de los aceites esenciales.

T: Tomillo, **CA:** Cardamomo, **L:** Limoncillo, **N:** Naranja, **CI:** Citronela, **P:** Palmarosa. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$)

A la concentración de 500 µL/mL los aceites de limoncillo, citronela y palmarosa presentaron los mayores PIM, siendo estos 91.7, 68.5 y 77.8, respectivamente. A las concentraciones de 1000 y 3000 µL/mL, para los aceites de citronela y palmarosa la inhibición fue del 100% y para limoncillo fue de 91.7 y 100%, respectivamente. En cuanto a los aceites esenciales de tomillo, cardamomo y naranja, a 500 µL/mL no presentaron un porcentaje de inhibición micelial significativo sobre la cepa bajo estudio. Sin embargo, a 1000 y 3000 µL/mL estos aceites presentaron un PIM apreciable, tomillo (29.6 y 61.0), cardamomo (44.4 y 44.4) y naranja (24.4 y 54.4).

El aceite esencial de limoncillo a 500 y 1000 µL/mL inhibió el crecimiento de la colonia fúngica durante los primeros cuatro días; no obstante, a los siete días de exposición se registró

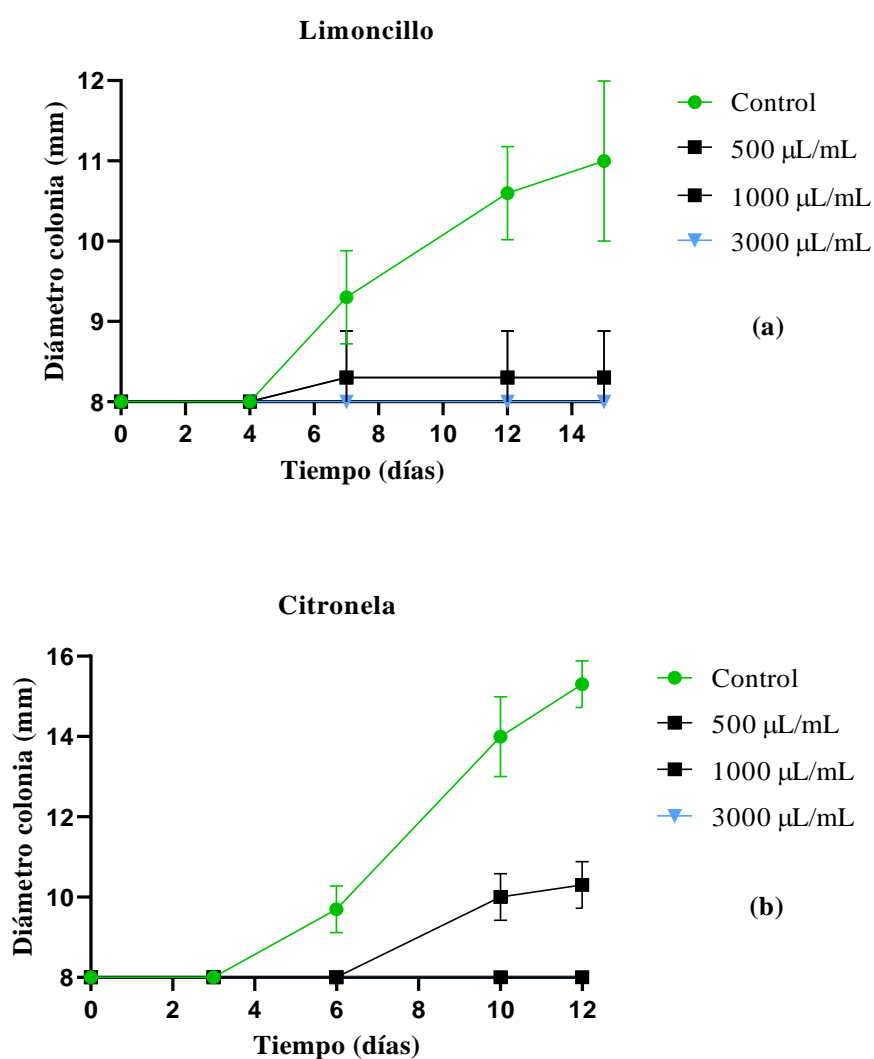
un mínimo desarrollo micelial promedio de 0.3 mm, mientras que a la concentración de 3000 $\mu\text{L}/\text{mL}$, la inhibición del crecimiento del hongo fue del 100% durante el tiempo de evaluación (**Figura 16a**). Respecto a los aceites de citronela y palmarosa, a 500 $\mu\text{L}/\text{mL}$ se observó una inhibición en el desarrollo micelial durante los primeros seis y diez días, respectivamente, con un crecimiento promedio de 2 mm para el aceite de citronela y 1.3 mm para palmarosa. Sin embargo, a las concentraciones 1000 y 3000 $\mu\text{L}/\text{mL}$ no se registró crecimiento de la colonia fúngica, por lo tanto, la inhibición fue del 100% (**Figura 16b, c**).

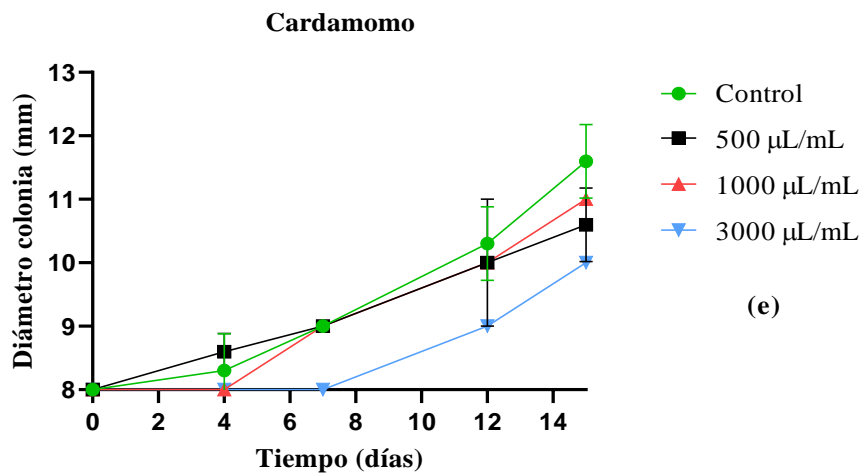
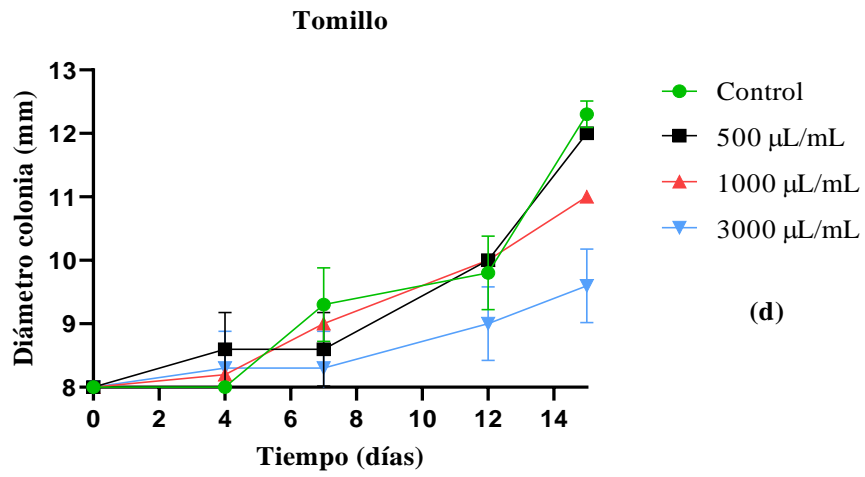
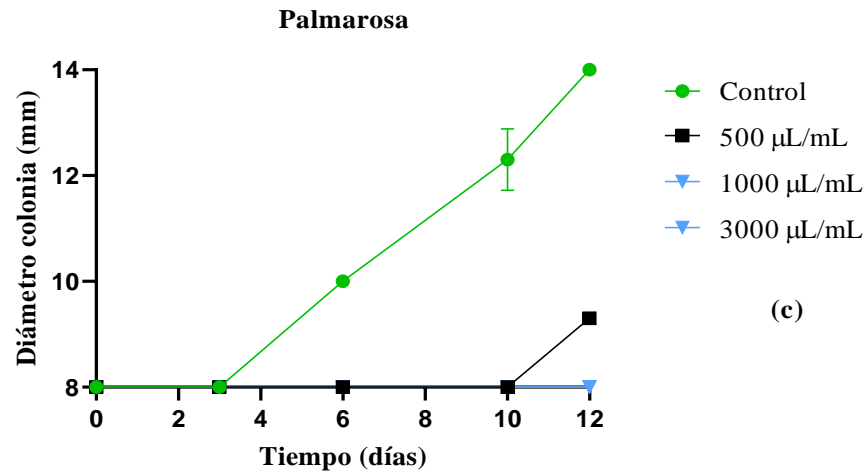
En el caso del aceite de tomillo, para todas las concentraciones evaluadas el crecimiento de *M. fijiensis* se dio a partir del cuarto día de tratamiento, con un aumento promedio en el diámetro de la colonia de 0.6, 0.2 y 0.3 mm para las concentraciones de 500, 1000 y 3000 $\mu\text{L}/\text{mL}$, respectivamente. Al finalizar los 15 días del tratamiento, hubo un crecimiento micelial promedio notorio de 4.0, 3.0 y 1.6 mm para las concentraciones reportadas anteriormente; entre los aceites esenciales evaluados, este fue el que presentó el menor PIM a la concentración de 500 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (**Figura 16d**).

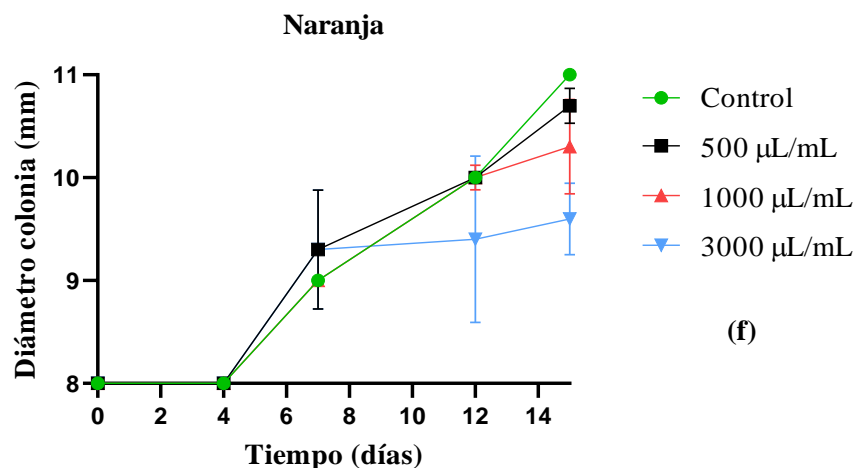
En cuanto al aceite de cardamomo, a las concentraciones evaluadas de 500, 1000 y 3000 $\mu\text{L}/\text{mL}$, el crecimiento de la colonia se observó a partir de los 4 y 7 días con un crecimiento micelial promedio de 0.6, 1.0 y 1.0 mm, respectivamente (**Figura 16e**). Por último, para el aceite esencial de naranja, el crecimiento del hongo se observó a partir del cuarto día para las tres concentraciones, con un aumento promedio de 1.3, 1.0 y 1.3 mm respectivamente. A los 15 días del tratamiento el desarrollo micelial promedio de *M. fijiensis* para el experimento con aceite de naranja fue de 2.6, 2.3 y 1.6 mm (**Figura 16f**).

Figura 16

Curvas de crecimiento del hongo *M. fijiensis* cepa C86, representado por el diámetro promedio ($\pm D.E$) de la colonia fúngica medido durante 15 días de evaluación, durante el tratamiento con los aceites esenciales: (a) Limoncillo, (b) citronela, (c) palmarosa, (d) tomillo, (e) cardamomo y (f) naranja







La actividad antimicrobiana del aceite esencial de limoncillo coincide con lo reportado por Pandey *et al.* (2003)(Pandey et al., 2003), quienes encontraron que este aceite inhibe el 100% del crecimiento de *Fusarium oxysporum*, hongo fitopatógeno causante de la enfermedad de Panamá en el banano, al evaluarse a una concentración de 1,56 µL/mL mediante el método de dilución en serie.

En cuanto al aceite de citronela, es posible que el alto porcentaje de inhibición micelial se deba a modificaciones estructurales de las hifas de *M. fijiensis*, pues Billerbeck *et al.* (2001)(De Billerbeck et al., 2001) por medio de microscopía electrónica, determinaron que luego del tratamiento con el aceite hubo modificaciones estructurales de las hifas de *Aspergillus niger*, como la disminución en el diámetro de la hifa y la pared de la hifa que se veía notablemente más delgada, lo cual se debe a la interferencia del aceite esencial con las enzimas responsables de la síntesis de esta pared, afectando así su normal crecimiento. Además, el aceite esencial causó alteración de la membrana plasmática y desorganización de la estructura mitocondrial, afectando así el crecimiento del hongo.

Los tres aceites esenciales que presentaron mayor porcentaje de inhibición micelial (PIM) provienen de plantas que pertenecen al género *Cymbopogon*, limoncillo (*Cymbopogon flexuosus*), citronela (*Cymbopogon nardus*) y palmarosa (*Cymbopogon martinii*). El aceite de

citronela contiene principalmente geraniol (17.8%), β -citronelol (16.9%) y citronelal (11.6%)(Cáceres et al., 2020). El aceite esencial de palmarosa al igual que el de citronela contiene en mayor medida geraniol (38.7%), seguido por linalol (3.2%) y acetato de geranilo (1.3%)(Cáceres et al., 2020). En el caso del aceite de limoncillo es el citral el compuesto mayoritario con 33.0%, seguido por neral (24.5%) y en tercer lugar se encuentra el geraniol (7.9%)(Cáceres et al., 2020) (**Tabla 5**).

Es posible que el alto PIM de los tres aceites esenciales del género *cymbopogon* se deba a la presencia de los compuestos citral y geraniol, pues Kakarla y Ganjewala (2009)(Kakarla & Ganjewala, 2009) evaluaron su actividad biológica, junto con el acetato de geranilo contra los hongos *Aspergillus flavus* y *A. fumigatus*, encontrando que los compuestos que presentaron mayor zona de inhibición fueron citral y geraniol; en cambio, el acetato de geranilo por su parte, no presentó actividad antifúngica notable sobre estos hongos. También hubo otro estudio realizado por Pattnaik *et al* (1997)(Pattnaik et al., 1997) en el que se demuestra la capacidad antifúngica de los compuestos citral y geraniol, pues, evaluaron su actividad contra 12 cepas de diferentes hongos encontrando que fueron efectivos contra todas las cepas, entre las cuales se encuentran *Candida albicans*, *C. neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *A. oryzae*.

Tabla 5

Concentración relativa (%) de los principales metabolitos identificados en los aceites esenciales (Cáceres et al., 2020)

No	Compuesto	Aceite esencial Concentración relativa (%)							
		T	CA	L	N	CI	P	OT-C I *	OT-C II *
1	Timol	23	-	-	-	-	-	22.1	32.7
2	Acetato de terpenilo	-	45.5	-	-	-	-	-	-
3	Citral	-	-	33	-	-	-	-	-
4	Limoneno	-	-	-	57.5	-	-	-	-
5	Geraniol	-	-	7.9	-	17.8	38.7	-	-
6	<i>p</i> -cimeno	20	-	-	-	-	-	3.7	1.1
7	Butirato de linalilo	-	9.9	-	-	-	-	-	-
8	Neral	-	-	24.5	-	-	-	-	-
9	Linalol	4.7	6.1	-	7.9	-	3.2	-	-
10	β -citronelol	-	-	-	-	16.9	-	-	-
11	Carvacrol	-	-	-	-	-	-	10.7	18.8
12	γ -Terpineno	9.5	-	-	-	-	-	-	5.2
13	1,8-cineol	-	8.9	-	-	-	-	-	-
14	1-octanol	-	-	-	2.1	-	-	-	-
15	Citronelal	-	-	-	-	11.6	-	-	-
16	<i>trans</i> - β -ocimeno	-	-	-	-	-	1.9	-	-
17	<i>trans</i> - β -cariofileno	9.5	-	-	-	-	-	7.9	6.4
18	Acetato de geraniol	-	-	0.5	-	-	1.3	-	-
19	4-terpineol	-	-	-	1.7	-	-	-	-
20	2,6-dimetil-2,6-octadieno	-	-	-	-	6.1	-	-	-
21	Metil timil éter	-	-	-	-	-	-	4.6	-
22	<i>cis</i> -nerolidol	-	3.1	-	-	-	-	-	-
23	Valenceno	-	-	-	1.6	-	-	-	-
24	Acetato de timilo	-	-	-	-	-	-	3.9	-

Nota: Concentración relativa de los principales metabolitos de los aceites esenciales. **T:** Tomillo, **CA:** Cardamomo, **L:** Limoncillo, **N:** Naranja, **CI:** Citronela, **P:** Palmarosa, **O T-C I:** Orégano T-C I, **O T-C II:** Orégano T-C II, *: Aceite esencial no evaluado por el método de dilución en agar

4.2 Determinación del IC₅₀ de los aceites esenciales y mezclas de aceites esenciales empleando la técnica de dilución en microplato

Con el propósito de determinar la concentración de inhibición del 50% de la población (IC₅₀) de los aceites de: tomillo, cardamomo, limoncillo, naranja, citronela, palmarosa, orégano

T-C I y orégano T-C II y de los grupos 1, 2 y 3 de mezclas aceites esenciales (**Tabla 6**), se realizó el ensayo de dilución en microplato. Empleando esta técnica, se realizó primero un *screening* de los aceites esenciales sobre la cepa de referencia C86 para posteriormente evaluar los tres aceites que presentaron menor IC_{50} sobre las cepas del hongo *M. fijiensis*: C139, 111033 y 111029. Los grupos de aceites esenciales fueron evaluados contra las cuatro cepas.

Tabla 6

Grupos de aceites esenciales seleccionados para ser evaluados contra las cuatro cepas de M. fijiensis

Grupo	Aceites esenciales
1	Tomillo, cardamomo, limoncillo
2	Naranja, citronela, palmarosa
3	Orégano T-C I, orégano T-C II

4.2.1 Determinación de IC_{50} de los aceites esenciales evaluados contra la cepa C86

Después de 10 días de incubación, se encontró que la concentración de inhibición del 50% de la población para los aceites esenciales evaluados sobre la cepa C86 varía desde 31.1 a 870.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, (**Tabla 7**). El aceite esencial de tomillo fue el que presentó la mejor actividad contra el hongo *M. fijiensis* (IC_{50} de 31.1 $\mu\text{L}/\text{mL}$); mientras que el aceite de citronela fue el que exhibió la actividad más baja (IC_{50} de 870.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$).

Tabla 7

Concentración de inhibición del 50% de la población de los aceites esenciales evaluados para la cepa C86 de M. fijiensis

Aceite esencial	IC ₅₀ (μL/mL) ± D.E
Tomillo	31.1 ^a ± 8.6
Cardamomo	613.5 ^e ± 28.4
Limoncillo	112.0 ^b ± 11.1
Naranja	380.3 ^d ± 35.7
Citronela	870.5 ^f ± 8.4
Palmarosa	558.7 ^e ± 20.8
Orégano T-C I	66.9 ^a ± 16.0
Orégano T-C II	212.9 ^c ± 15.6

Nota: Promedio de la concentración de inhibición del 50% de la población ± desviación estándar de la actividad de los aceites esenciales. **T:** Tomillo, **CA:** Cardamomo, **L:** Limoncillo, **N:** Naranja, **CI:** Citronela, **P:** Palmarosa. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos (p<0.05)

Los aceites esenciales de tomillo, limoncillo y Orégano T-C I fueron los que presentaron valores más bajos de IC₅₀, 31.1, 112.0 y 66.9 μL/mL, respectivamente.

La actividad antifúngica del aceite de tomillo puede estar relacionada con el contenido de timol, pues autores como Zambonelli y D'Aulerio (2004)(Zambonelli et al., 2004) evaluaron la composición química y la actividad fungicida de aceites comerciales de tomillo contra los hongos *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* y *Colletotrichum lindemuthianum* y encontraron que a mayor porcentaje de timol en el aceite esencial, mayor era su porcentaje de inhibición microbiana, pues este monoterpene interrumpe la biosíntesis de ergosterol y afecta la integridad de la membrana plasmática de los hongos(Ahmad et al., 2011).

En cuanto a los aceites esenciales de orégano, Müller *et al* (1995)(Müller-Riebau *et al.*, 1995) evaluaron la composición química y las propiedades fungicidas de aceites esenciales de plantas aromáticas, encontrando que solo los aceites esenciales que contienen cantidades considerables de los compuestos fenólicos timol y carvacrol fueron fuertemente inhibitorios para los hongos fitopatógenos *Fusarium moniliforme*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Phytophthora capsici*, pues estos isómeros (**Figura 14**), como se mencionó anteriormente, interrumpen la biosíntesis del ergosterol y afectan la membrana plasmática causando así un aumento en la permeabilidad de esta(Garcia & Palou, 2008). Por lo anterior, se esperaba que el aceite esencial de orégano T-C II (IC₅₀: 212.9 µL/mL) el cual tiene los porcentajes más altos de timol y carvacrol en comparación con orégano T-C I (IC₅₀: 66.9 µL/mL) exhibiera la mejor actividad de inhibición contra la cepa C86. Sin embargo, los resultados muestran que la actividad antifúngica de los aceites esenciales evaluados no depende únicamente de los compuestos mayoritarios. Esto concuerda con lo reportado por Betancur *et al.* (2011)(Betancur-galvis *et al.*, 2011), quienes analizaron la actividad antifúngica de nueve aceites esenciales obtenidos de *L. origanoides* (tres aceites quimiotipo carvacrol: 1A, 5E y 9I, cuatro quimiotipo timol: 3C, 6F, 7G y 8H y dos quimiotipo *p*-cimeno/*trans*-β-cariofileno: 2B y 4D) contra *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *Candida krusei* y *C. parapsilosis*. En el estudio encontraron que el aceite quimiotipo timol 6F presentó la mayor concentración de timol (59.7%), seguido por carvacrol (12.2%). Sin embargo, fue el aceite quimiotipo timol 3C (Timol: 54.5%, Carvacrol: 1.7%) el que mostró mayor actividad antifúngica contra *A. flavus*, *C. krusei* y *C. parapsilosis* pero no contra *A. fumigatus*, con MIC de 157, 198, 125 y 63 µg/mL, respectivamente. Para *A. fumigatus* fue el aceite 7G (Timol: 43.8%, Carvacrol: 12.2%) quimiotipo timol el que presentó la actividad antifúngica más alta con MIC de 31 µg/mL.

Como se ha descrito anteriormente, la actividad antifúngica de diversos aceites esenciales se relaciona con su contenido de timol, esperando así que, a mayor porcentaje de

timol en el aceite esencial, mayor inhibición microbiana. Sin embargo, de los tres aceites esenciales que contienen timol: tomillo, orégano T-C I y orégano T-C II (**Tabla 5**), el aceite de tomillo es el que tiene la menor concentración relativa de este compuesto (22%) y a la vez presenta la mejor actividad antimicrobiana contra la cepa C86 de *M. fijiensis*, lo cual demuestra que la actividad de los aceites esenciales no depende únicamente de sus compuestos mayoritarios y se podría hablar de una posible sinergia entre compuestos.

4.2.1.1 Determinación de IC₅₀ de los aceites esenciales evaluados contra las cepas C86, C139, 111033 y 111029

Los aceites esenciales que presentaron mejor actividad antifúngica contra la cepa C86 de *M. fijiensis* fueron tomillo, limoncillo y orégano T-C I. Por consiguiente, estos fueron seleccionados para ser evaluados contra las cepas de *M. fijiensis* C139, 111033 y 111029.

Se encontró que, para la cepa C86, el aceite que presentó menor IC₅₀ fue el de tomillo con valor de 31.1 $\mu\text{L}/\text{mL}$. En el caso de las cepas C139 y 111033, el aceite que presentó menor IC₅₀ fue el de Orégano T-C I con valores de 569.1 y 461.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$, respectivamente. Por último, para la cepa 111029 fue el aceite de limoncillo el que presentó menor valor de IC₅₀ con 347.2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (**Tabla 8**).

Tabla 8

IC₅₀ determinado para los aceites esenciales evaluados contra las cepas de M. fijiensis C86, C139, 111033 y 111029

Cepa	Aceite esencial		
	IC ₅₀ (μL/mL) ± D.E		
	Tomillo	Limoncillo	Orégano T-C I
C86	31.1 ^a ± 8.6	112.0 ^b ± 11.1	66.9 ^{a,b} ± 16.0
C139	2289.2 ^h ± 499.8	3201.3 ^g ± 22.1	569.4 ^{d,e} ± 41.6
111033	1125.6 ^{g,h} ± 103.7	889.5 ^{f,g} ± 85.6	461.8 ^{c,d} ± 84.2
111029	1434.3 ^a ± 208.6	347.2 ^c ± 45.2	674.4 ^{e,f} ± 59.3

Nota: Promedio de la concentración de inhibición del 50% de la población ± desviación estándar de la actividad de los aceites esenciales. **T:** Tomillo, **CA:** Cardamomo, **L:** Limoncillo, **N:** Naranja, **CI:** Citronela, **P:** Palmarosa. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos (p<0.05)

No se encontró una tendencia clara entre los aceites esenciales que permita determinar cuál presenta mejor actividad antifúngica contra las cuatro cepas de *M. fijiensis*, sin embargo, se observa que para dos de las cuatro cepas fue el aceite esencial de orégano T-C I el que presentó menor valor de IC₅₀.

4.2.3 Determinación de IC₅₀ de las mezclas de aceites esenciales evaluadas contra las cepas C86, C139, 111033 y 111029

Los grupos de aceites esenciales (**Tabla 6**) fueron seleccionados por un efecto sinérgico que se observó entre ellos en ensayos previos que no se presentan en este documento. La formación de estos grupos de aceites esenciales se realizó con el fin de determinar si mezclas de aceites esenciales presentaban mejor actividad biológica que los aceites ensayados individualmente.

Los resultados muestran que, para los grupos de aceites esenciales evaluados contra las cepas C86, C139, y 111033, el grupo 3 fue el que presentó mayor actividad antifúngica con valores de IC₅₀ de 126.2, 795.2 y 609.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$, respectivamente. No obstante, para la cepa 111029, el grupo 1 fue el que presentó mayor actividad antifúngica con un valor de IC₅₀ de 306 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (**Tabla 9**). En este caso, sí fue posible determinar que el grupo de aceites esenciales con mayor actividad antifúngica fue el grupo 3, pues presentó menor IC₅₀ para tres de las cuatro cepas evaluadas.

Tabla 9

Concentración de inhibición del 50% de la población de los grupos de aceites esenciales evaluados para las cepas de M. fijiensis C86, C139, 111033 y 111029

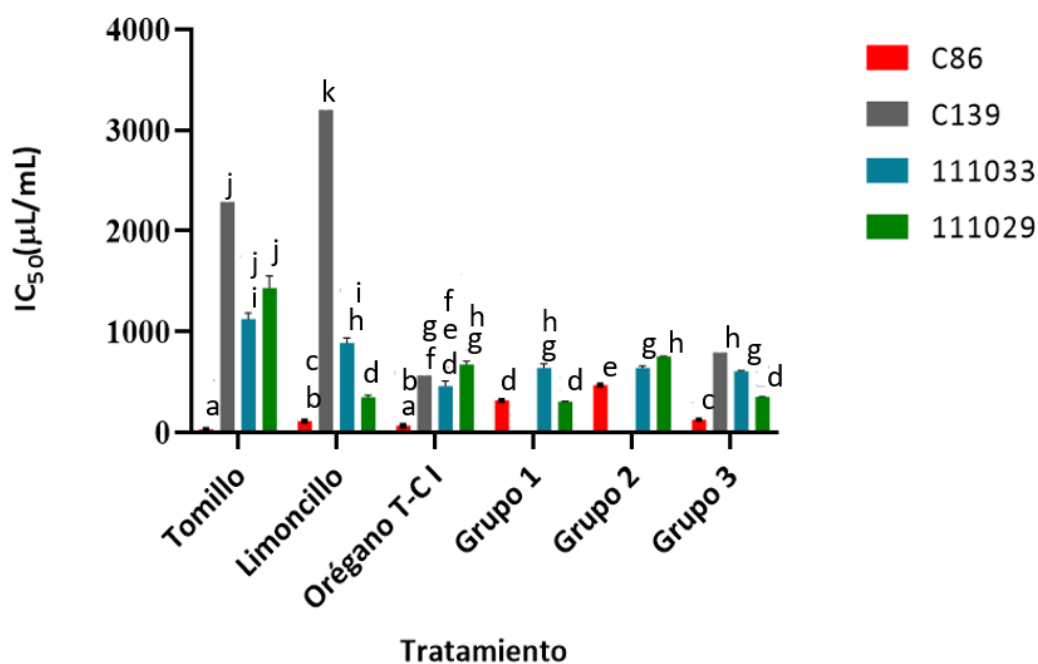
Cepa	Grupos de aceites esenciales		
	IC ₅₀ ($\mu\text{L}/\text{mL}$) \pm D.E		
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
C86	317.0 ^b \pm 10.1	471.9 ^d \pm 13.0	126.2 ^a \pm 1.3
C139	>500	>500	795.2 ^f \pm 54.7
111033	643.1 ^e \pm 69.1	643.1 ^e \pm 33.4	609.2 ^e \pm 10.9
111029	306.0 ^b \pm 2.2	755.9 ^f \pm 7.0	352.1 ^c \pm 2.7

Nota: Promedio de la concentración de inhibición del 50% de la población \pm desviación estándar de la actividad de los aceites esenciales. **T:** Tomillo, **CA:** Cardamomo, **L:** Limoncillo, **N:** Naranja, **CI:** Citronela, **P:** Palmarosa. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$)

A partir de los valores de IC₅₀ de los aceites esenciales y grupos de aceites (**Tablas 7 y 9**), fue posible identificar que la cepa más sensible a los tratamientos es la C86, seguida por 11029 y 111033, mientras que C139 mostró una alta tolerancia a todos los tratamientos empleados (**Figura 17**).

Figura 17

IC₅₀ de los aceites esenciales y grupos de aceites sobre las cuatro cepas de M. fijiensis.



Notas: Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$)

Finalmente, se esperaba una sinergia entre los aceites esenciales de los grupos evaluados debido a diferentes estudios publicados, como el de Nikkhah *et al.* (2017)(Nikkhah *et al.*, 2017) quienes encontraron un efecto sinérgico de la combinación de los aceites esenciales de tomillo/canela/romero para *Botrytis cinérea* y *Penicillium expansum*, hongos responsables del deterioro de la pera. Igualmente, Hossain *et al* (2015)(Hossain *et al.*, 2016) encontraron un efecto sinérgico de la combinación de los aceites de orégano/tomillo contra *Aspergillus flavus*, *A parasiticus* y *Penicillium chrysogenum*, y de la mezcla del aceite de menta/árbol de té contra *A. niger*. Sin embargo, en este estudio no es posible hablar de un efecto sinérgico generalizado para las tres mezclas de aceites esenciales empleadas (tomillo/cardamomo/limoncillo,

naranja/citronela/palmarosa y orégano T-C I/ orégano T-C II), pues en el caso de la cepa C86, los valores de IC₅₀ más bajos se obtuvieron con los aceites esenciales evaluados individualmente (**Tabla 8**), mientras que, en el caso de la cepa 111029 los valores de IC₅₀ más bajos se obtuvieron con los grupos de aceites esenciales (**Tabla 9**).

5 Conclusiones

Los aceites esenciales de limoncillo, citronela y palmarosa presentaron mayor porcentaje de inhibición micelial para la cepa C86 de *M. fijiensis*, con una inhibición del 90-100% a partir de 1000 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Los aceites esenciales de naranja, tomillo y cardamomo exhibieron una actividad moderada a partir de 3000 $\mu\text{L}/\text{mL}$ con PIM de 46.7, 62.8 y 44.4%, respectivamente.

De los ocho aceites esenciales evaluados contra la cepa C86 de *M. fijiensis*, el aceite esencial de tomillo fue el que presentó la mejor actividad antimicrobiana con un valor de IC₅₀ de 31.1 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Para las cepas de *M. fijiensis* C139 y 111033, el aceite esencial de orégano T-C I fue el que presentó la mejor actividad antimicrobiana con un valor de IC₅₀ de 569.4 y 461.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$, respectivamente. Mientras que para la cepa 111029, el aceite esencial de limoncillo presentó una actividad antimicrobiana moderada con un valor de IC₅₀ de 347.2 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

De los tres grupos de aceites esenciales evaluados, el grupo 3 conformado por orégano T-C I y orégano T-C II presentó la mejor actividad antifúngica contra las cepas de *M. fijiensis* C86, C139 y 111033 con valores de IC₅₀ de 126.2, 795.2 y 609.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$, respectivamente. La

cepa 111029, fue inhibida en mayor grado por la mezcla de aceites esenciales correspondiente al grupo 1, con valor de IC_{50} de 306.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Se encontró a partir de los valores de IC_{50} que, de las cuatro cepas evaluadas de *M. fijiensis*, la cepa C86 presentó mayor sensibilidad a los tratamientos empleados, mientras que la cepa C139 fue más tolerante. En cuanto a las mezclas de aceites esenciales, no se observó un efecto sinérgico generalizado entre los aceites de tomillo/cardamomo/limoncillo, naranja/citronela/palmarosa y orégano T-C I/ orégano T-C II cuando fueron evaluados contra las cuatro cepas de *M. fijiensis*.

Por último, en el presente trabajo de grado se evaluó por primera vez la actividad antifúngica de los aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*), cardamomo (*Elettaria cardamomum*), limoncillo (*Cymbopogon flexuosus*), palmarosa (*Cymbopogon martinii*), naranja (*Citrus sinensis*), citronela (*Cymbopogon nardus*) y orégano (*Lippia origanoides*) contra *Mycosphaerella fijiensis*, ratificando así, el potencial de los aceites esenciales como alternativa frente al control fitosanitario en las plantaciones de banano y plátano, especialmente en el manejo y control de la enfermedad Sigatoka negra.

Referencias bibliográficas

- Aguiar, R. W. D. S., Ootani, M. A., Ascencio, S. D., Ferreira, T. P. S., Santos, M. M. D., & Santos, G. R. D. (2014). Fumigant antifungal activity of corymbia citriodora and Cymbopogon nardus essential oils and citronellal against three fungal species. *The Scientific World Journal*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/492138>
- Ahmad, A., Khan, A., Akhtar, F., Yousuf, S., Xess, I., Khan, L. A., & Manzoor, N. (2011). Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against Candida. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 30(1), 41–50. <https://doi.org/10.1007/s10096-010-1050-8>
- Aman, M., & Rai, V. R. (2015). Antifungal activity of fungicides and plant extracts against yellow sigatoka disease causing *Mycosphaerella musicola*. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, 5(3), 277–284. <https://doi.org/10.5943/cream/5/3/11>
- ASBAMA. (n.d.). *Sector bananero en cifras*. Retrieved May 21, 2020, from <http://asbama.com/home/sector>
- Atta-Ur-Rahman, Choudhary, M. I., Farooq, A., Ahmed, A., Iqbal, M. Z., Demirci, B., Demirci, F., & Hüsni Can Baser, K. (2000). Antifungal Activities and Essential Oil Constituents of Some Spices from Pakistan. *Journal of Chemical Society of Pakistan*, 22(1), 60–65. <https://doi.org/10.3390/ecsoc-3-01773>
- Betancur-galvis, L., Zapata, B., Baena, A., & Bueno, J. (2011). Antifungal, citotoxic and chemical analysis of essential oils of *Lippia origanoides* grown in Colombia. *Salud UIS*,

43(2), 141–148.

- Borugă, O., Jianu, C., Mișcă, C., Goleț, I., Gruia, A. T., & Horhat, F. G. (2014). Thymus vulgaris essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of Medicine and Life*, 7. 3(3), 56–60.
- Cáceres, M., Hidalgo, W., Stashenko, E., Torres, R., & Ortiz, C. (2020). Essential oils of aromatic plants with antibacterial, anti-biofilm and anti-quorum sensing activities against pathogenic bacteria. *Antibiotics*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040147>
- Camara, B., N, A. L.-, Georges, D., & Mamadou, C. (2017). *In vitro inhibitory effect of Monodora myristica and Eucalyptus torelliana essential oils on the mycelial growth of Mycosphaerella fijiensis a pathogenic agent of the black leaf streak disease of banana and plantain*. 6(3), 51–61. <https://doi.org/10.24214/IJGHC/HC/6/3/5161>
- Camayo, A. (2015). *Estado actual del mejoramiento genético del plátano y el banano*. December, 2–4.
- Cañas-Gutiérrez, G. P., Angarita-Velásquez, M. J., Restrepo-Flórez, J. M., Rodríguez, P., Moreno, C. X., & Arango, R. (2009). Analysis of the CYP51 gene and encoded protein in propiconazole-resistant isolates of *Mycosphaerella fijiensis*. *Pest Management Science*, 65(8), 892–899. <https://doi.org/10.1002/ps.1770>
- Cavero, P. A. S. (2011). *Controle biológico de Mycosphaerella fijiensis Morelet agente causal da sigatoka-negra da bananeira (Musa spp.) com Trichoderma spp.* 50.
- Chee, H. Y., Kim, H., & Lee, M. H. (2009). In vitro Antifungal Activity of Limonene against *Trichophyton rubrum*. *Mycobiology*, 37(3), 243. <https://doi.org/10.4489/myco.2009.37.3.243>
- Churchill, A. C. L. (2011). *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of

banana: Progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. *Molecular Plant Pathology*, 12(4), 307–328. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00672.x>

Couto, C. S. F., Raposo, N. R. B., Rozental, S., Borba-Santos, L. P., Bezerra, L. M. L., de Almeida, P. A., & Brandão, M. A. F. (2015). Chemical composition and antifungal properties of essential oil of *Origanum vulgare* linnaeus (Lamiaceae) against *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 14(7), 1207–1212. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v14i7.12>

De Billerbeck, V. G., Roques, C. G., Bessière, J. M., Fonvieille, J. L., & Dargent, R. (2001). Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(1), 9–17. <https://doi.org/10.1139/cjm-47-1-9>

De Oliveira Pereira, F., Mendes, J. M., Lima, I. O., De Lira Mota, K. S., De Oliveira, W. A., & De Oliveira Lima, E. (2015). Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. *Pharmaceutical Biology*, 53(2), 228–234. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.913299>

Donzelli, B. G. G., & Churchill, A. C. L. (2007). A quantitative assay using mycelial fragments to assess virulence of *Mycosphaerella fijiensis*. *Phytopathology*, 97(8), 916–929. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-8-0916>

Estadísticas | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (n.d.). Retrieved July 27, 2020, from <http://www.fao.org/statistics/es/>

Fachini-Queiroz, F. C., Kummer, R., Estevão-Silva, C. F., Carvalho, M. D. D. B., Cunha, J. M., Grespan, R., Bersani-Amado, C. A., & Cuman, R. K. N. (2012). Effects of thymol

and carvacrol, constituents of thymus vulgaris L. essential oil, on the inflammatory response. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.

<https://doi.org/10.1155/2012/657026>

Fernández-Ortuño, D., Torés, J. A., De Vicente, A., & Pérez-García, A. (2008). Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. *International Microbiology*, 11(1), 1–9. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.38>

Ferrer, A. (2003). Antibacterial activity of mandarin essential oil. *Revista de La Facultad de Agronomía*, 20(4), 502–512.

Fullerton, R. A., & Olsen, T. L. (1995). Pathogenic variability in mycosphaerella fijiensis morelet, cause of black sigatoka in banana and plantain. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 23(1), 39–48.

<https://doi.org/10.1080/01140671.1995.9513866>

Gakuubi, M. M., Maina, A. W., & Wagacha, J. M. (2017). *Antifungal Activity of Essential Oil of Eucalyptus camaldulensis Dehnh . against Selected Fusarium spp . 2017.*

Ganjewala, D. (2009). Cymbopogon essential oils: Chemical compositions and bioactivities. *International Journal of Essential Oil Therapeutics*, 3(2–3), 56–65.

García, R., & Palou, E. (2008). Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. In *Proceedings - Society of Automotive Engineers* (pp. 41–51).

Gutiérrez-Jiménez, E., Pedroza-Sandoval, A., Martínez-Bolaños, L., Samaniego-Gaxiola, J. A., & García-González, F. (2017). Efecto de aceites naturales contra Micosphaerella fijiensis en condiciones in vitro y detección de fitoquímicos activos. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(1).

<https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1707-4>

- Gutierrez-Monsalve, J. A., Mosquera, S., González-Jaramillo, L. M., Mira, J. J., & Villegas-Escobar, V. (2015). Effective control of black Sigatoka disease using a microbial fungicide based on *Bacillus subtilis* EA-CB0015 culture. *Biological Control*, 87, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.04.012>
- Guzmán, M. (2012). Control biológico y cultural de la sigatoka- negra. *Tropical Plant Pathology*, September, 4. <https://doi.org/10.13140/2.1.2927.7442>
- Henderson, J., Pattemore, J. A., Porchun, S. C., Hayden, H. L., Van Brunshot, S., Grice, K. R. E., Peterson, R. A., Thomas-Hall, S. R., & Aitken, E. A. B. (2006). Black Sigatoka disease: New technologies to strengthen eradication strategies in Australia. *Australasian Plant Pathology*, 35(2), 181–193. <https://doi.org/10.1071/AP06017>
- Hidalgo Bucheli, W. (2009). *Exploración de las relaciones estructura-actividad de compuestos tipo perinaftenona en el sistema biológico. Mycosphaerella fijiensis.*
- Hidalgo, M., Tapia, A., Rodriguez, W., & Serrano, E. (2006). EFECTO DE LA SIGATOKA NEGRA (*Mycosphaerella fijiensis*) SOBRE LA FOTOSÍNTESIS Y TRANSPIRACIÓN FOLIAR DEL BANANO (*Musa s. AAA*, cv. Valery). *Agronomía Costarricense*, 30(1), 35–41.
- Hidalgo, W., Duque, L., Saez, J., Arango, R., Gil, J., Rojano, B., Schneider, B., & Otálvaro, F. (2009). Structure-activity relationship in the interaction of substituted perinaphthenones with *Mycosphaerella fijiensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16), 7417–7421. <https://doi.org/10.1021/jf901052e>
- Hossain, F., Follett, P., Dang Vu, K., Harich, M., Salmieri, S., & Lacroix, M. (2016). Evidence for synergistic activity of plant-derived essential oils against fungal pathogens

of food. *Food Microbiology*, 53, 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.08.006>

Infoagro. (n.d.). *El cultivo del plátano (banano)*.

http://www.infoagro.com/documentos/el_cultivo_del_platano__banano_.asp

Jabeur, M. Ben, Somai-jemmali, L., Hamada, W., & Nicolle, A. C. (2017). *Thyme essential oil as multiple mechanisms-biofungicide causing sensitivity of Mycosphaerella graminicola*. *March 2014*, 17–20. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>

Johanson, A., Crowhurst, R., Rikkerink, E., Fullerton, R., & Templeton, M. (1994). The use of species-specific DNA probes for the identification of *Mycosphaerella djijensis* and *M. musicola*, the causal agents of Sigatoka disease of banana. *Plant Pathology*, 43(6), 701–707.

Kakarla, S., & Ganjewala, D. (2009). Antimicrobial Activity of Essential Oils of Four Lemongrass (*Cymbopogon flexuosus* Steud) Varieties. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 3(1), 107–109.

<https://www.researchgate.net/publication/236108977>

Kanazawa, K., & Sakakibara, H. (2000). High content of dopamine, a strong antioxidant, in cavendish banana. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3), 844–848.

<https://doi.org/10.1021/jf9909860>

Kumar, A., Shukla, R., Singh, P., & Dubey, N. K. (2009). Biodeterioration of some herbal raw materials by storage fungi and aflatoxin and assessment of *Cymbopogon flexuosus* essential oil and its components as antifungal. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 63(6), 712–716. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.03.011>

Lagouri, V., Blekas, G., Tsimidou, M., Kokkini, S., & Boskou, D. (1993). Composition and antioxidant activity of essential oils from Oregano plants grown wild in Greece.

Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung, 197(1), 20–23.

<https://doi.org/10.1007/BF01202694>

Leite, M. C. A., De Brito Bezerra, A. P., De Sousa, J. P., & De Oliveira Lima, E. (2015).

Investigating the antifungal activity and mechanism(s) of geraniol against *Candida albicans* strains. *Medical Mycology*, 53(3), 275–284.

<https://doi.org/10.1093/mmy/myu078>

Leroux, P., Bach, J., Debieu, D., Fillinger, S., Fritz, R., & Walker, A. (2008). Mode of action of sterol biosynthesis inhibitors and resistance phenomena in fungi. *Modern Fungicides and Antifungal Compounds V: 15th International Reinhardsbrunn Symposium*, 15(July 2014), 85–92.

Lorenz, K.-H. (chairman). (2012). Banana Working Group. *FRAC - Fungicide Resistance Action Committee*, June, 1–13.

Marchese, A., Arciola, C. R., Barbieri, R., Silva, A. S., Nabavi, S. F., Sokeng, A. J. T., Izadi, M., Jafari, N. J., Suntar, I., Daglia, M., & Nabavi, S. M. (2017). Update on monoterpenes as antimicrobial agents: A particular focus on p-cymene. *Materials*, 10(8), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ma10080947>

María, C., Amaya, Z., Fernando, L., Hoyos, P., Carlos, J., & Villa, C. (n.d.). *INTEGRACIÓN DE INDUCCIÓN DE RESISTENCIA CON BACTERIAS QUITINOLÍTICAS EN EL CONTROL DE LA SIGATOKA NEGRA (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) EN BANANO*. 60(41), 3891–3905.

Marín, D. H., Romero, R. A., Rica, C., & Sutton, T. B. (2003). Black sigatoka: an increasing threat to banana cultivation. *Plant Disease*, 87(3).

Martínez-Bolaños, L., Téliz-Ortiz, D., Rodríguez-Macie, J. C., Mora-Aguilera, J. A., Nieto-

- Ángel, D., Cortés-Flores, J. I., Mejía-Sánchez, D., Nava-Díaz, C., & Silva-Aguayo, G. (2012). Resistencia a fungicidas en poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* del sureste mexicano. *Agrociencia*, *46*(7), 707–717.
- Mobambo, K. N., Gauhl, F., Vuylsteke, D., Ortiz, R., Pasberg-Gauhl, C., & Swennen, R. (1993). Yield loss in plantain from black sigatoka leaf spot and field performance of resistant hybrids. *Field Crops Research*, *35*(1), 35–42. [https://doi.org/10.1016/0378-4290\(93\)90134-9](https://doi.org/10.1016/0378-4290(93)90134-9)
- Müller-Riebau, F., Berger, B., & Yegen, O. (1995). Chemical Composition and Fungitoxic Properties to Phytopathogenic Fungi of Essential Oils of Selected Aromatic Plants Growing Wild in Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *43*(8), 2262–2266. <https://doi.org/10.1021/jf00056a055>
- Nakahara, K., Alzoreky, N. S., Yoshihashi, T., Nguyen, H. T. T., & Trakoontivakorn, G. (2003). Chemical Composition and Antifungal Activity of Essential Oil from *Cymbopogon nardus* (Citronella Grass). *Japan Agricultural Research Quarterly*, *37*(4), 249–252. <https://doi.org/10.6090/jarq.37.249>
- Nakatsu [xc*], T., Lupo, A. T., Chinn, J. W., & Kang, R. K. L. (2000). Biological activity of essential oils and their constituents. *Studies in Natural Products Chemistry*, *21*, 571–631. [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(00\)80014-9](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(00)80014-9)
- Ngando, J. E., Rieux, A., Nguidjo, O., Pignolet, L., Dubois, C., Mehl, A., Zapater, M. F., Carlier, J., & De Lapeyre de Bellaire, L. (2015). A novel bioassay to monitor fungicide sensitivity in *Mycosphaerella fijiensis*. *Pest Management Science*, *71*(3), 441–451. <https://doi.org/10.1002/ps.3825>
- Nieuwenhuis, B. P. S., & James, T. Y. (2016). The frequency of sex in fungi. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *371*(1706), 20150540.

<https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0540>

- Nikkhah, M., Hashemi, M., Habibi Najafi, M. B., & Farhoosh, R. (2017). Synergistic effects of some essential oils against fungal spoilage on pear fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 257, 285–294. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.021>
- Numpaque, M. A., Oviedo, L. A., Gil, J. H., García, C. M., & Durango, D. L. (2011). Thymol and carvacrol: biotransformation and antifungal activity against the plant pathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* and *Botryodiplodia theobromae*. *Tropical Plant Pathology*, 36(1), 3–13. <https://doi.org/10.1590/s1982-56762011000100001>
- Oliveira, D. R., Leitão, G. G., Bizzo, H. R., Lopes, D., Alviano, D. S., Alviano, C. S., & Leitão, S. G. (2007). Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. *Food Chemistry*, 101(1), 236–240. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.022>
- Pandey, A. K., Rai, M. K., & Acharya, D. (2003). Chemical Composition and Antimycotic Activity of the Essential Oils of Corn Mint (*Mentha arvensis*) and Lemon Grass (*Cymbopogon flexuosus*) Against Human Pathogenic Fungi. *Pharmaceutical Biology*, 41(6), 421–425. <https://doi.org/10.1076/phbi.41.6.421.17825>
- Pareek, S. (2015a). Nutritional and Biochemical Composition of Banana (*Musa* spp.) Cultivars. *Nutritional Composition of Fruit Cultivars*, 49–81. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408117-8.00003-9>
- Pareek, S. (2015b). Nutritional and Biochemical Composition of Banana (*Musa* spp.) Cultivars. *Nutritional Composition of Fruit Cultivars*, 49–81. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408117-8.00003-9>
- Pattnaik, S., Subramanyam, V. R., Bapaji, M., & Kole, C. R. (1997). Antibacterial and

antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios*, 89(358), 39–46.

Peláez, J., Vásquez, E., Díaz, T., Castañeda, D., Rodríguez, E., & Arango, R. (2006). USE OF A MICRO TITRE PLATE DILUTION ASSAY TO MEASURE ACTIVITY ANTIFUNGAL COMPOUNDS AGAINST OF ANTIFUNGAL COMPOUNDS AGAINST *Mycosphaerella Fijiensis*. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín*, 59(2), 3425–3433.
<http://bdigital.unal.edu.co/26710/1/24356-85307-1-PB.pdf>

Pinto, E., Gonçalves, M. J., Hrimpeng, K., Pinto, J., Vaz, S., Vale-Silva, L. A., Cavaleiro, C., & Salgueiro, L. (2013). Antifungal activity of the essential oil of *Thymus villosus* subsp. lusitanicus against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Industrial Crops and Products*, 51, 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.033>

Ploetz, R. C., Kema, G. H. J., & Ma, L.-J. (2015). Impact of Diseases on Export and Smallholder Production of Banana. *Annual Review of Phytopathology*, 53(1), 269–288.
<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120305>

Prasad, C. S., Shukla, R., Kumar, A., & Dubey, N. K. (2010). In vitro and in vivo antifungal activity of essential oils of *Cymbopogon martini* and *Chenopodium ambrosioides* and their synergism against dermatophytes. *Mycoses*, 53(2), 123–129.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2008.01676.x>

Pušková, A., Bučko, M., Kraková, L., Pangallo, D., & Kozics, K. (2017). *The antibacterial and antifungal activity of six essential oils and their cyto / genotoxicity to human HEL 12469 cells*. July, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08673-9>

Rahimifard, N., Shoeibi, S., Sabzevari, O., Pakzad, S. R., Ajdary, S., Pirali Hamedan, M., Hajimehdipoor, H., Bagheri, F., & Esmaeili, B. (2008). Antifungal activity of the native essential oil of *thymus vulgaris* on *candida albicans*, *aspergillus niger* and *aspergillus flavus* from Iran. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 2(2), 343–346.

- Rao, J., Chen, B., & McClements, D. J. (2019). Improving the Efficacy of Essential Oils as Antimicrobials in Foods: Mechanisms of Action. *Annual Review of Food Science and Technology*, 10(1), 365–387. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121727>
- Rodríguez Saucedo, E. N. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*, 153–170. <https://doi.org/10.35197/rx.07.01.2011.14.er>
- Sanabria, O., & Inta, F. B. (2006). *Manejo Integrado del Cultivo del plátano*. 1–34.
- Scopus - Document search results. (n.d.). Retrieved April 16, 2020, from <https://bibliotecavirtual.uis.edu.co:2150/results/results.uri?sort=plf-f&src=s&nlo=&nlr=&nls=&sid=790452ad2fd84357a5c1bddcc408b013&sot=a&sdt=cl&cluster=scoaffilctry%2C%22Colombia%22%2Ct&sl=26&s=%22mycosphaerella+fijie nsis%22&cl=t&offset=1&origin=resultslst&ss=plf-f&ws=r-f&ps=r-f&cs=r-f&cc=10&txGid=4e7822e1c629aae50440e0f73a4c907e>
- Sereshti, H., Rohanifar, A., Bakhtiari, S., & Samadi, S. (2012). Bifunctional ultrasound assisted extraction and determination of *Elettaria cardamomum* Maton essential oil. *Journal of Chromatography A*, 1238, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.03.061>
- Sharma, N., & Tripathi, A. (2006). Fungitoxicity of the essential oil of *Citrus sinensis* on post-harvest pathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(6), 587–593. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-9075-3>
- Soković, M., Glamoclija, J., Ćirić, A., Kataranovski, D., Marin, P. D., Vukojević, J., & Brkić, D. (2008). Antifungal activity of the essential oil of *Thymus vulgaris* L. and thymol on experimentally induced dermatomycoses. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 34(12), 1388–1393. <https://doi.org/10.1080/03639040802130053>

- Soković, M., Tzakou, O., Pitarokili, D., & Couladis, M. (2002). Antifungal activities of selected aromatic plants growing wild in Greece. *Nahrung - Food*, 46(5), 317–320.
[https://doi.org/10.1002/1521-3803\(20020901\)46:5<317::AID-FOOD317>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1521-3803(20020901)46:5<317::AID-FOOD317>3.0.CO;2-B)
- Soto, M. (2011). Situación y avances tecnologicos en la producción bananera mundial. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33(spe1), 6. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452011000500004>
- Stević, T., Berić, T., Šavikin, K., Soković, M., Godevac, D., Dimkić, I., & Stanković, S. (2014). Antifungal activity of selected essential oils against fungi isolated from medicinal plant. *Industrial Crops and Products*, 55, 116–122.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.02.011>
- Tamayo, P. J., & Carvalho, C. P. (2014). *Evaluación in vitro de la actividad fungistática del aceite esencial de mandarina sobre el crecimiento de Penicillium sp . Evaluation in vitro of the fungistatic activity of the mandarin essential oil on the growth of Penicillium sp . 15*, 7–14.
- Tao, N. G., Liu, Y. J., & Zhang, M. L. (2009). Chemical composition and antimicrobial activities of essential oil from the peel of bingtang sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck). *International Journal of Food Science and Technology*, 44(7), 1281–1285.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.01947.x>
- Tayarani-Najaran, Z., Talasaz-Firoozi, E., Nasiri, R., Jalali, N., & Hassanzadeh, M. K. (2013). Antiemetic activity of volatile oil from *Mentha spicata* and *Mentha × piperita* in chemotherapy-induced nausea and vomiting. *Ecancermedicalscience*, 7(1), 1–6.
<https://doi.org/10.3332/ecancer.2013.290>
- Tian, J., Ban, X., Zeng, H., He, J., Chen, Y., & Wang, Y. (2015). The mechanism of antifungal action of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) on *Aspergillus*

flavus. *PLoS ONE*, 22(6), 587–593. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030147>

Tung, Y. T., Yen, P. L., Lin, C. Y., & Chang, S. T. (2010). Anti-inflammatory activities of essential oils and their constituents from different provenances of indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves. *Pharmaceutical Biology*, 48(10), 1130–1136. <https://doi.org/10.3109/13880200903527728>

Valmayor, R. V., Jamaluddin, S. H., Silayoi, B., Danh, L. D., Pascua, O. C., & Espino, R. R. C. (2000). Banana cultivar names and synonyms in southeast asia. *International Network for the Improvement of Banana and Plantain - Asia and the Pacific*, 28.

Velázquez-Nuñez, M. J., Avila-Sosa, R., Palou, E., & López-Malo, A. (2013). Antifungal activity of orange (*Citrus sinensis* var. Valencia) peel essential oil applied by direct addition or vapor contact. *Food Control*, 31(1), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.029>

Vilela, G. R., de Almeida, G. S., D'Arce, M. A. B. R., Moraes, M. H. D., Brito, J. O., da Silva, M. F. das G. F., Silva, S. C., de Stefano Piedade, S. M., Calori-Domingues, M. A., & da Gloria, E. M. (2009). Activity of essential oil and its major compound, 1,8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. *Journal of Stored Products Research*, 45(2), 108–111. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2008.10.006>

Viuda, M., Ruiz, Y., Fernandez, J., & Perez, J. (2008). Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. 19, 1130–1138. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.12.003>

Wei, L. S., & Wee, W. (2013). Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon nardus* citronella essential oil against systemic bacteria of aquatic animals.

Iranian Journal of Microbiology, 5(2), 147–152.

Wena, L., Haddad, M., Fernándezd, I., Espinozae, G., Ruize, C., Neyraf, E., Bustamantef, B., & Rojas, R. (2011). Actividad antifúngica de cuatro plantas usadas en la medicina tradicional peruana. Aislamiento de 3'-formil-2',4',6'-trihidroxidihidrochalcona, principio activo de *Psidium acutangulum*. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 77(3), 199–204.

Zambonelli, A., D'aulerio, A. Z., Severi, A., Benvenuti, S., Maggi, L., & Bianchi, A. (2004). Chemical composition and fungicidal activity of commercial essential oils of *thymus vulgaris* L. *Journal of Essential Oil Research*, 16(1), 69–74.

<https://doi.org/10.1080/10412905.2004.9698653>

Apéndices

Apéndice A. Divulgación de resultados

El presente trabajo de grado se presentó en el 33° Congreso Latinoamericano de Química, realizado en La Habana, Cuba, 2018.

33° LATIN-AMERICAN CONGRESS
OF CHEMISTRY (33-CLAQ)
X CONGRESS OF CHEMICAL SCIENCES,
TECHNOLOGY AND INNOVATION (QUIMICUBA'2018)

The Organizing Committee acknowledges

Daniela C. Monsalve López
Stashenko, E. Hidalgo W.

Who contributed with the following work

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIFÚNGICA DE ACEITES ESENCIALES
CONTRA EL HONGO *Mycosphaerella fijiensis*,
AGENTE CAUSAL DE LA SIGATOKA NEGRA**

As Poster Presentation


Prof. Dr. Daniel García Rivera
President of the Cuban Society of Chemistry


Prof. Dr. José A. González
Chair Natural Products, Pharmaceutical
and Foods Chemistry


Sociedad Cubana de
Química


CLAQ


CLAQ
La Habana, Cuba
Octubre 9-12, 2018

Apéndice B. Análisis estadístico**Tabla 1**

Análisis de varianza (ANOVA): Evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales mediante la técnica de dilución en agar (Sección 4.1)

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	58177.0	17	3422.17	45.28	0.0000*
Intra grupos	2720.85	36	75.5793	36	
Total	60897.8	53			

Nota: *P<0.05: Existen diferencias significativas entre los tratamientos según prueba de Krustal-Wallis

Tabla 2

Análisis de varianza (ANOVA): Determinación de IC₅₀ de los aceites esenciales evaluados contra la cepa C86 (Sección 4.2.1)

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1572.04	7	224.578	505.64	0.0000*
Intra grupos	7.10631	16	0.444145		
Total	1579.15	23			

Nota: *P<0.05: Existen diferencias significativas entre los tratamientos según prueba de rangos múltiples

Tabla 3

Análisis de varianza (ANOVA): Determinación de IC₅₀ de los aceites esenciales evaluados contra las cepas C86, C139, 111033 y 111029 (Sección 4.2.2)

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3.08309E7	11	2.80281E6	102.96	0.0000*
Intra grupos	653360	24	27223.3		
Total	3.14843E7	35			

Nota: *P<0.05: Existen diferencias significativas entre los tratamientos según prueba de Krustal-Wallis

Tabla 4

Determinación de IC₅₀ de las mezclas de aceites esenciales evaluadas contra las cepas C86, C139, 111033 y 111029 (4.2.3)

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1.35206E6	9	150229	165.77	0.0000*
Intra grupos	18125.2	20	906.259		
Total	1.37018E6	29			

Nota: *P<0.05: Existen diferencias significativas entre los tratamientos según prueba de Krustal-Wallis