ACTIVIDAD BIOCIDA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Lippia origanoides* H.B.K SOBRE ALGUNOS FITOPATÓGENOS DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.)

DAVID EDUARDO ÁLVAREZ SÁNCHEZ

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRARIAS
ÁREA DE ÉNFASIS EN PRODUCCIÓN DE CULTIVOS
SAN JUAN DE PASTO
2015

ACTIVIDAD BIOCIDA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Lippia origanoides* H.B.K SOBRE ALGUNOS FITOPATÓGENOS DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.)

DAVID EDUARDO ÁLVAREZ SÁNCHEZ

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Magister en Ciencias Agrarias con énfasis en Producción de Cultivos

Director:

ANDRÉS MAURICIO HURTADO BENAVIDES I.Q. Ph.D.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRARIAS
ÁREA DE ÉNFASIS EN PRODUCCIÓN DE CULTIVOS
SAN JUAN DE PASTO
2015

San Juan de Pasto, 09 de marzo de 2015

“Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado son responsabilidad exclusiva de los autores”

Artículo 1º del Acuerdo Nº 324 de octubre 11 de 1966 emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

NOTA DE ACEPTACIÓN

_____
LUIS ALFREDO MOLINA VALERO I.A. M.Sc.
Jurado delegado

_____

INÉS TORO SUAREZ Q. M.Sc. Ph.D.
Jurado

_____
ROLANDO TITO BACCA IBARRA I.A. M.Sc. Ph.D.
Jurado

_____
ANDRÉS MAURICIO HURTADO BENAVIDES I.Q. Ph.D.
Presidente

AGRADECIMIENTOS

A Dios.

A la Universidad de Nariño

Al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación COLCIENCIAS

A la Vicerrectoría de Investigaciones, Postgrados y Relaciones Internacionales de la Universidad de Nariño

Al Grupo de Investigación Tecnologías Emergentes en Agroindustria, de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial

Al Grupo de Investigación de Sanidad Vegetal, de la Facultad de Ciencias Agrícolas

Al Doctor Andrés Hurtado Benavides

A la Doctora Inés Toro Suarez

Al Doctor Luis Alfredo Molina Valero

Al Doctor Tito Bacca Ibarra

A todas las personas que con su apoyo desinteresado aportaron sus conocimientos a esta investigación.

Dedicado:

A Mi hijo, Juan David Álvarez

A mis padres

A mis hermanos

DAVID EDUARDO ÁLVAREZ SÁNCHEZ I.A. M.Sc.

RESUMEN

Lippia origanoides H.B.K. (Verbenaceae) es un arbusto silvestre que presenta gran diversidad en Colombia, esta especie presenta altos contenidos de aceite esencial, al que diferentes autores han encontrado atractivas propiedades biológicas entre las que se destaca su efecto biocida sobre microorganismos. Debido a que los aceites esenciales pueden integrarse en el concepto de pesticidas verdes, la presente investigación buscó generar alternativas para la sustitución de agroquímicos sintéticos en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.). Para esto, se evaluó la actividad biocida del aceite esencial de *L. origanoides* frente a los fitopatógenos: *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani* y *Alternaria solani* a nivel in *vitro* y prueba de detección de la fracción activa mediante la técnica de bioautografía. El aceite esencial fue obtenido de hojas de *L. origanoides* mediante el sistema de arrastre con vapor, la composición química se determinó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Se evaluó la actividad biocida del aceite esencial mediante la técnica de dilución, calculando los valores de porcentaje de inhibición (PH), concentración efectiva cincuenta (EC_{50}) y concentración mínima inhibitoria (MIC). Adicionalmente, se evaluó la técnica de bioautografía identificando el compuesto que otorga la actividad biocida. El compuesto mayoritario hallado en el aceite esencial de *L. origanoides* fue el monoterpeno timol con una proporción relativa del 60,7%. Los bioensayos realizados, determinaron un alto grado de sensibilidad del aceite esencial sobre los fitopatógenos evaluados, reportando un valor de inhibición micelial de 300 $\mu l.ml^{-1}$ para los fitopatógenos *P. infestans* y *A. solani*, la concentración para el fitopatógeno *R. solani* se calculó en 110 $\mu l.ml^{-1}$. Finalmente, se determinó que el metabolito secundario timol (R_f = 0,60) es el causante de la actividad biocida de acuerdo a la técnica de bioautografía, demostrando el efecto de inhibición sobre los fitopatógenos evaluados.

Palabras clave: aceite esencial, Verbenaceae, orégano, *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria solani*.

ABSTRACT

Lippia origanoides H.B.K. (Verbenaceae) is a wild bush that has a high diversity in Colombia, this species has high content of essential oil, which different authors have found attractive biological properties like biocidal effect on microorganisms which is highlighted. Because essential oils can be integrated into the concept of green pesticides, with the present investigation sought to create alternatives for replacing synthetic agrochemicals in the cultivation of potato (*Solanum tuberosum* L.). For this, the biocidal activity of *L. essential* oil was evaluated against phytopathogenic origanoides potato *Phytophthora infestans*, *Alternaria solani* and *Rhizoctonia solani in vitro* screening level and the active fraction by bioautography technique. The essential oil was obtained from leaves of *L. origanoides* by steam distillation, the volatile chemical composition was determined by Gas chromatography-mass spectrometry. The biocidal activity of the essential oil was assessed by dilution technique culture medium by calculating the percent inhibition values (PH), fifty effective concentration (EC_{50}) and minimum inhibitory concentration (MIC). Additionally, the technique of identifying compounds bioautography provide biocidal activity was evaluated on the phytopathogenic. The main compound found in the essential oil of *L. origanoides* was the monoterpene thymol with a relative share of 60,7%. The bioassays determined a high degree of sensitivity of the pathogen *P. infestans*, *R. solani* and *A. solani* essential oil, reporting a value of mycelial inhibition (MIC) of 300 $\mu l.ml^{-1}$ for plant pathogens *P. infestans* and *A. solani*, the concentration for phytopathogen *R. solani* was estimated at 110 $\mu l.ml^{-1}$. Finally it is determined that the secondary metabolite thymol (Rf = 0,60) is responsible for the biocidal activity according to the technique of bioautography, demonstrating the biological effect of essential oil of "wild oregano" on the phytopathogenic assessed, suggesting the continuing studies at field level in order to develop products for the management of pathogens in potato cultivation.

Keywords: essential oil, Verbenaceae, orégano, *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria solani*.

TABLA DE CONTENIDO

Pág.

I. INTRODUCCIÓN 1

II. OBJETIVOS 4

1.1 OBJETIVO GENERAL 4
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 4

III. HIPÓTESIS 4

IV. MARCO TEÓRICO 5

1. Generalidades cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) 5
2. Problemas fitosanitarios en el cultivo de papa 5
2.1 Tizón tardío o gota de la papa 6
2.1.1 Síntomas y signos 7
2.2 Rizoctoniasis o costra negra 7
2.2.1 Síntomas y signos 8
2.3 Tizón temprano 9
2.3.1 Síntomas y signos 9
3. Aceites esenciales (A.E.) 9
3.1 Extracción de aceites esenciales 10
3.1.1 Método de arrastre por vapor 11
3.1.2 Método de Hidrodestilación o destilación con agua 11
3.2 Evaluación biológica de aceites esenciales (A.E.) 11
3.2.1 Método de difusión en agar 12
3.2.2 Método de dilución en agar 12
3.2.3 Métodos no convencionales 13
3.2.3.1 Bioautografía 13
3.3 Determinación de la composición química en aceites esenciales 14
3.3.1 Cromatografía de gases (GC) 15
4. Aceites esenciales en la agricultura 15
5. Recurso vegetal *Lippia origanoides* H.B.K. 17
5.1 Clasificación taxonómica 17
5.2 Familia Verbenaceae 18
5.3 Genero *Lippia* 18
5.4 *Lippia origanoides* H.B.K. 19
5.4.1 Actividad antimicrobiana de *L. origanoides* 19

Pág.

6. Aceite esencial (A.E) de *Lippia origanoides* H.B.K. 21
6.1 Quimiotipos de *Lippia origanoides* 23

V. METODOLOGÍA 26

1. Localización 26
2. Materiales 26
2.1 Fitopatógenos 26
2.1.1 *Phytophthora infestans* 26
2.1.2 *Rhizoctonia solani* 27
2.1.3 *Alternaria solani* 27
2.2 Material vegetal *Lippia origanoides* H.B.K. 27
2.3 Obtención de aceite esencial de *Lippia origanoides* 27
3. Perfil cromatográfico del aceite esencial de *L. origanoides* 29
4. Evaluación del aceite esencial de *L. origanoides* sobre los fitopatógenos *P. infestans*, *R. solani* y *A. solani* 30
4.1 Análisis de la sensibilidad de los fitopatógenos al aceite esencial de *L. origanoides* mediante la técnica de dilución 30
4.1.1 Diseño experimental 30
4.1.2 Actividad biocida del aceite esencial de *L. origanoides* 30
4.1.3 Variables de evaluación 31
4.1.3.1 Porcentaje de inhibición (PH) 31
4.1.3.2 Concentración efectiva cincuenta (EC_{50}) 32
4.1.3.3 Concentración mínima inhibitoria (MCI) 32
4.1.3.4 Análisis morfométrico de los fitopatógenos sensibles al aceite esencial de *L. origanoides* 32
4.1.4 Análisis estadístico 33
4.2 Evaluación del aceite esencial de orégano silvestre mediante la técnica de bioautografía 33
4.2.1 Fraccionamiento del aceite esencial mediante cromatografía en capa delgada (C.C.D.) 33
4.2.2 Identificación y cuantificación de las fracciones del aceite esencial obtenidas por C.C.D. 34
4.2.3 Identificación de la fracción activa del aceite esencial 34

VI. RESULTADOS 36

1. Material vegetal *Lippia origanoides* H.B.K. 36
2. Obtención de aceite esencial de *Lippia origanoides* 39
3. Perfil cromatográfico del aceite esencial 39
4. Evaluación del aceite esencial de *L. origanoides* sobre los fitopatógenos *P. infestans*, *R. solani* y *A. solani* 41

Pág.

4.1 Análisis de la sensibilidad de los fitopatógenos al aceite esencial de *L. origanoides* mediante la técnica de dilución 41

4.1.1 Crecimiento *Phytophthora infestans* 41
4.1.1.1 Porcentaje de inhibición (PH) 47
4.1.1.2 Concentración efectiva cincuenta (EC_{50}) 48
4.1.1.3 Concentración mínima inhibitoria (MCI) 49
4.1.2 Crecimiento de *Rhizoctonia solani* 50
4.1.2.1 Porcentaje de inhibición (PH) 56
4.1.2.2 Concentración efectiva cincuenta (EC_{50}) 57
4.1.2.3 Concentración mínima inhibitoria (MCI) 58
4.1.3 Crecimiento de *Alternaria solani* 59
4.1.3.1 Porcentaje de inhibición (PH) 65
4.1.3.2 Concentración efectiva cincuenta (EC_{50}) 66
4.1.3.3 Concentración mínima inhibitoria (MCI) 67
4.2.2 Análisis morfométrico de *R. solani* 69
4.2.3 Análisis morfométrico de *A. solani* 72

5. Evaluación del aceite esencial de *L. origanoides* mediante Bioautografía 74

5.1 Fraccionamiento del aceite esencial mediante cromatografía en capa delgada (C.C.D.) 74

5.2 Identificación y cuantificación de las fracciones del aceite esencial obtenidas por C.C.D. 75

5.3 Identificación de la fracción activa del aceite esencial 76

VII. DISCUSIÓN 78

1. Obtención de aceite esencial de *Lippia origanoides* 78
2. Perfil cromatográfico del aceite esencial 79
3. Actividad biocida del aceite esencial de *L. origanoides* sobre los fitopatógenos *P. infestans*, *R. solani* y *A. solani* 81
4. Análisis morfométrico de *P. infestans*, *R. solani* y *A. solani* 83
5. Evaluación del aceite esencial de *L. origanoides* mediante bioautografía 85

VIII. CONCLUSIONES 88

IX. RECOMENDACIONES 89

X. BIBLIOGRAFÍA 90

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Algunos compuestos reportados en aceite esencial (A.E) de *Lippia origanoides* H.B.K., determinados por GC-MS. 24

Tabla 2. Muestreo de los fitopatógenos de papa *P. infestans, R. solani* y *A. solani,* en campo. 26

Tabla 3. Tratamientos prueba de actividad biocida del aceite esencial de *L. origanoides*, Ensayo 1. 31

Tabla 4. Fases móviles reportadas en cromatografía en capa delgada C.C.D. para aceites esenciales. 34

Tabla 5. Composición química del aceite esencial de *Lippia origanoides* H.B.K. (TEA 001), colectado en Taminango-Nariño-Colombia. 40

Tabla 6. Concentraciones de aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*) evaluadas sobre *P. infestans*, Ensayo 2. 42

Tabla 7. Concentraciones de aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*) evaluadas sobre *P. infestans*, Ensayo 3. 44

Tabla 8. Resumen del crecimiento micelial (cm) del patógeno *Phytophthora infestans* al aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*). 47

Tabla 9. Porcentaje de inhibición (PH) del patógeno *Phytophthora infestans* al aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*). 48

Tabla 10. Concentraciones de aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*) evaluadas sobre *R. solani*, Ensayo 2. 51

Tabla 11. Concentraciones de aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*) evaluadas sobre *R. solani*, Ensayo 3. 53

Tabla 12. Resumen del crecimiento micelial (cm) del patógeno *Rhizoctonia solani* al aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*). 56

Tabla 13. Porcentaje de inhibición (PH) del patógeno *Rhizoctonia solani* al aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*). 57

Tabla 14. Concentraciones de aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*) evaluadas sobre *A. solani*, Ensayo 2. 60
Pág.

Tabla 15. Concentraciones de aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*) evaluadas sobre *A. solani*, Ensayo 3. 62

Tabla 16. Resumen del crecimiento micelial (cm) del patógeno *Alternaria solani* al aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*). 65

Tabla 17. Porcentaje de inhibición (PH) del patógeno *Alternaria solani* al aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*). 66

Tabla 18. Identificación de R_f de fracciones de aceite esencial de *L. origanoides* visualizadas mediante C.C.D. 76

Tabla 19. Componentes mayoritarios de aceite esencial de *L. origanoides* reportados en literatura como quimiotipos 3. 79

Tabla 20. Proporción relativa del compuesto timol en el aceite esencial TEA001 y su comparación con algunos géneros de *Lippia* y *Origanum.* 81

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Arbusto de *Lippia origanoides* H.B.K., ecorregión de Alto Patía. 17

Figura 2. Sitio de colecta material vegetal *Lippia origanoides* 28

Figura 3. Equipo de arrastre con vapor, Planta Piloto, Universidad de Nariño. 29

Figura 4. Ejemplar *exsiccatea* codificación Herbario No. 45202, *Lippia origanoides* H.B.K., TEA 001. 38

Figura 5. Aceite esencial de *Lippia origanoides.* 39

Figura 6. Cromatograma de aceite esencial de *Lippia origanoides* H.B.K. (TEA 001), fase estacionaria DB-5MS. 40

Figura 7. Respuesta de sensibilidad del patógeno *Phytophthora infestans* a nivel *in vitro,* Ensayo 1 (192 horas). 42

Figura 8. Respuesta de sensibilidad del patógeno *Phytophthora infestans* a nivel *in vitro,* Ensayo 2 (192 horas). 43

Figura 9. Respuesta de sensibilidad del patógeno *Phytophthora infestans* a nivel *in vitro,* Ensayo 3 (192 horas). 46

Figura 10. Respuesta de sensibilidad del patógeno *Rhizoctonia solani* a nivel *in vitro,* Ensayo 1 (192 horas)..... 51

Figura 11. Respuesta de sensibilidad del patógeno *Rhizoctonia solani* a nivel *in vitro,* Ensayo 2 (192 horas)..... 52

Figura 12. Respuesta de sensibilidad del patógeno *Rhizoctonia solani* a nivel *in vitro,* Ensayo 3 (192 horas)..... 55

Figura 13. Respuesta de sensibilidad del patógeno *Alternaria solani* a nivel *in vitro,* Ensayo 1 (192 horas)..... 60

Figura 14. Respuesta de sensibilidad del patógeno *Alternaria solani* a nivel *in vitro,* Ensayo 2 (192 horas)..... 62

Figura 15. Respuesta de sensibilidad del patógeno *Alternaria solani* a nivel *in vitro,* Ensayo 3 (192 horas)..... 64

Pág.

Figura 16. Medidas del diámetro y longitud de los esporangios de *P. infestans*..... 68

Figura 17. Análisis morfométrico del contorno de esporangios de *P. infestans* sometidos al tratamiento con aceite esencial de *L. origanoides* (+ rojo) y control (+azul). 68

Figura 18. Morfología microscópica de *P. Infestans,* 192 horas de crecimiento, (A) tratamiento con aceite esencial de *L. origanoides* y (B) control.... 69

Figura 19. Medidas del diámetro y longitud de las hifas de *R. solani* 70

Figura 20. Análisis morfométrico del contorno de las hifas de *R. solani* sometidos al tratamiento con aceite esencial de *L. origanoides* (+ rojo) y control (+azul). 70

Figura 21. Morfología macroscópica de *R. solani*, 192 horas de crecimiento, (A) tratamiento con aceite esencial de *L. origanoides* y (B) control.... 71

Figura 22. Morfología microscópica de *R. solani,* 192 horas de crecimiento, (A) tratamiento con aceite esencial de *L. origanoides* y (B) control.... 71

Figura 23. Medidas del diámetro y longitud de las conidias de *A. solani* 72

Figura 24. Análisis morfométrico del contorno de las conidias de *A. solani* al tratamiento con aceite esencial de *L. origanoides* (+ rojo) y control (+azul). 73

Figura 25. Morfología macroscópica de *A. solani*, 192 horas de crecimiento, (A) tratamiento con aceite esencial de *L. origanoides* y (B) control.... 73

Figura 26. Morfología microscópica de *A. solani* 192 horas de crecimiento, (A) tratamiento con aceite esencial de *L. origanoides* y (B) control.... 74

Figura 27. Separación del aceite esencial de *Lippia origanoides* mediante C.C.D; fase móvil tolueno-acetato de etilo relación 9:1. 75

Figura 28. Separación del aceite esencial de *L. origanoides* mediante cromatografía en capa delgada (A), fracción activa para *P. infestans* (B), fracción activa para *R. solani* (C), fracción activa para *A. solani* (D)..... 76

Figura 29. Cromatograma de fracción activa (No. 3) del aceite esencial de *Lippia origanoides* H.B.K. (TEA 001), fase estacionaria DB-5MS. 77

LISTA DE GRÁFICOS

Pág.

Gráfico 1. Crecimiento micelial (cm) del patógeno *Phytophthora infestans* frente al aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*), Ensayo 1*..... 41

Gráfico 2. Crecimiento micelial (cm) del patógeno *Phytophthora infestans* frente al aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*), Ensayo 2*..... 44

Gráfico 3. Crecimiento micelial (cm) del patógeno *Phytophthora infestans* frente al aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*), Ensayo 3*..... 45

Gráfico 4. Evaluación de la concentración efectiva cincuenta (EC_{50}) del patógeno *Phytophthora infestans.* 49

Gráfico 5. Crecimiento micelial (cm) del patógeno *Rhizoctonia solani* frente al aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*), Ensayo 1*. 50

Gráfico 6. Crecimiento micelial (cm) del patógeno *Rhizoctonia solani* frente al aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*), Ensayo 2*. 53

Gráfico 7. Crecimiento micelial (cm) del patógeno *Rhizoctonia solani* frente al aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*), Ensayo 3*. 54

Gráfico 8. Evaluación de la concentración efectiva cincuenta (EC_{50}) del patógeno *Rhizoctonia solani* 58

Gráfico 9. Crecimiento micelial (cm) del patógeno *Alternaria solani* frente al aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*), Ensayo 1*. 59

Gráfico 10. Crecimiento micelial (cm) del patógeno *Alternaria solani* frente al aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*), Ensayo 2*. 61

Gráfico 11. Crecimiento micelial (cm) del patógeno *Alternaria solani* frente al aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*), Ensayo 3*. 63

Gráfico 12. Evaluación de la concentración efectiva cincuenta (EC_{50}) del patógeno *Alternaria solani* 67

I. INTRODUCCIÓN

En Colombia el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) ocupa en relación con los cultivos transitorios, el tercer lugar en área sembrada, con alrededor de 151.616 hectáreas y el primer lugar en valor de la producción con 500 millones de dólares por año. En el país existen unas 90.000 familias que se dedican a este cultivo generándose en él, a su vez, alrededor de 20 millones de jornales al año (FEDEPAPA, 2007; MADR, 2013).

En términos generales, la papa presenta un sistema productivo tradicional en el que prevalece el uso intensivo de fertilizantes, maquinaria y plaguicidas; dirigidos a asegurar el rendimiento, sin considerar el uso racional de los recursos naturales y la sostenibilidad del medio ambiente (MAVDT y FEDEPAPA, 2004).

En este cultivo los problemas fitosanitarios representan gran relevancia, siendo el principal limitante de producción, destacándose la presencia de enfermedades, las cuales si bien está íntimamente ligada con las condiciones climáticas de la región, de la virulencia de los patógenos y las prácticas agronómicas y culturales; se destacan tres principalmente “la gota” o “tizón tardío”, el “tizon temprano” y la “rizoctoniasis”.

En el cultivo de papa, se destaca la presencia del Oomyceto *Phytophthora infestans* causante del disturbio denominado tizón tardío de la papa catalogado como la enfermedad de mayor importancia económica a nivel mundial, llegando a destruir lotes comerciales sin adecuados esquemas de control en 10 a 15 días, afectando fuertemente la rentabilidad del cultivo por su manejo (Torres, 2002; Chavarro *et al*., 2005; Carreño *et al*., 2007).

El hongo *Rhizoctonia solani* causante de la rizoctoniasis, afecta todas las fases del cultivo, produciendo tubérculos deformes; reducción en el rendimiento comercial (Vaillant *et al*., 2009; Farah *et al*., 2008); perdías por descarte entre el 17,28% dependiendo del grado de infestación (García *et al*., 2002) y disminución en la calidad culinaria de los tubérculos a causa de los esclerocios en la epidermis del producto cosechado (Torres, 2002; Carreño *et al*., 2007).

Y, del hongo *Alternaria solani* causante del disturbio denominado tizón temprano de la papa, el cual después del tizón tardío se cataloga como la enfermedad foliar más importante del cultivo, causando pérdidas en producción de hasta un 30% cuando las condiciones ambientales son favorables para la enfermedad (Torres, 2002; Rojas *et al.,* 2010; Pérez y Forbes, 2010).

El productor de papa, no cuenta en la actualidad con suficientes alternativas para el manejo de los anteriores problemas sanitarios, utilizando como medida de control la aplicación de plaguicidas sintéticos; realizando un uso intensivo e indiscriminado

de estos productos, causando diversos problemas, en el recurso hídrico, edáfico, animal y la contaminación de los alimentos; envenenamiento de los agricultores, eliminación de organismos no objetivo, y la selección de fitopatógenos sensibles a ciertos ingredientes activos (FAO, 2008; Stangarlin *et al*., 2011).

Reportes de la FAO (2008), indican que el uso de plaguicidas sintéticos en el cultivo de papa, presenta una tendencia creciente en países como Colombia, haciendo cada día menos rentable la producción de este tubérculo. Actualmente, la papa es el cultivo que mayor demanda hace en el país de plaguicidas agrícolas, sobresaliendo el uso de productos fungicidas. Representando un promedio del 14% del costo total de producción a nivel nacional sin referenciar los costos de aplicación de los mismos (FEDEPAPA, 2007; ICA, 2011).

Por lo anterior, buscar alternativas para el manejo de problemas fitosanitarios en el cultivo de papa deben discutirse ampliamente en el contexto actual. Destacándose el uso de recursos vegetales, los cuales tienen un gran potencial para la gestión de enfermedades de las plantas (Silva *et al*., 2010; Sarmento, 2012).

García *et al*. (2010) indican que las plantas poseen un enorme y desconocido reservorio de sustancias derivado de sus actividades metabólicas enfocadas a sus sistemas de defensa en contra de microrganismos. Esa gran diversidad de mecanismos bioquímicos que intervienen en el metabolismo secundario de las plantas superiores ha permitido la producción de una amplia variedad de principios activos, dentro de estos, los aceites esenciales (A.E) (García *et al*., 2010; Henao *et al*., 2010).

Los aceites esenciales son una mezcla compleja de constituyentes volátiles aislados a partir de material vegetal (Olivero *et al*., 2009; Borges *et al*., 2012). Químicamente, son metabolitos secundarios derivados de terpenos (mono y sesquiterpenos) y sus compuestos oxigenados incluyendo carbohidratos, alcoholes, éter, aldehídos y cetonas; los aceites esenciales son responsables de las propiedades biológicas de las plantas (Kalemba y Kunicka, 2003; Oliveira *et al*., 2007; Olivero *et al*., 2009; García *et al*., 2010).

La especie *Lippia origanoides* H.B.K. (Verbenaceae), conocida comúnmente con los nombres de "orégano de monte" y "orégano silvestre", ha sido ampliamente estudiada en los últimos años por los altos rendimientos de extracción de aceite esencial y la riqueza fitoquímica que esta fracción presenta. De manera general se observan en esta especie alrededor de 32 compuestos identificados (Celis, 2007), en donde la mayoría de autores, coinciden que el timol, carvacrol y ρ-cimeno son los compuestos fenólicos naturales, a los cuales se les atribuyen la actividad antioxidante, antifúngica y antibacterial (Henao *et al*., 2010; García *et al*., 2010; Borges *et al*. 2012; Camele *et al.,* 2012; El-Shiekh *et al.,* 2012).

Diferentes reportes de literatura confirman la actividad biocida de la especie vegetal *Lippia origanoides* H.B.K. evaluada como materia prima de extractos crudos, etanólicos y metanólicos sobre los fitopatógenos *Spongospora subterránea* (Bittara *et al.,* 2009), *Colletotrichum gloesporioides* (Sangronis *et al.,* 2009), *Phytophthora* sp., *Alternaria alternata* (Gasparin *et al.,* 2000)*, Rhizoctonia solani* (Gasparin *et al.,* 2000; Gwinn *et al.,* 2010) y *Bipolaris maydis* (Rodríguez y Sanabria, 2005); encontrando altos niveles de sensibilidad a nivel *in vitro* y reducción de la severidad de los problemas fitosanitarios en pruebas *in situ*, demostrando un elevado potencial de los bioinsumos desarrollados a partir de orégano silvestre. Sin embargo, la evaluación del extracto esencial (aceite esencial) ha sido poco estudiada sobre problemas fitosanitarios.

Por lo anterior, la presente investigación buscó evaluar actividad biocida del aceite esencial de *Lippia origanoides* H.B.K sobre algunos fitopatógenos de papa (*Solanum tuberosum* L.) mediante evaluaciones *in vitro* usando las técnicas de dilución y bioautografía sobre los microorganismos *Phytophthora infestans, Rhizoctonia solani* y *Alternaria solani*.

II. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad biocida del aceite esencial de orégano silvestre (*Lippia origanoides* H.B.K.) frente a los fitopatógenos de papa: *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary, *Rhizoctonia solani* (Kühn) y *Alternaria solani* (Sor) a nivel *in vitro* y prueba de detección de la fracción activa

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el perfil cromatográfico del aceite esencial de *L. origanoides* y las posibles fracciones encontradas mediante cromatografía en capa delgada (C.C.D.).

- Evaluar la actividad biocida del aceite esencial de *L. origanoides* frente a los fitopatógenos *P. infestans, A. solani* y *R. solani* a nivel *in vitro.*

- Identificar la fracción activa del aceite esencial de *L. origanoides* mediante la técnica de bioautografía sobre los fitopatógenos *P. infestans, A. solani* y *R. solani.*

III. HIPÓTESIS

El aceite esencial extraído de orégano silvestre (*Lippia origanoides* H.B.K.), presenta efecto biocida a nivel *in vitro* sobre los fitopatógenos de la papa *P. infestans, A. solani* y *R. solani.*

IV. MARCO TEÓRICO

1. Generalidades cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.)

Las papas cultivadas mundialmente son designadas bajo el nombre de *Solanum tuberosum*. En total, hay ocho grupos cultivados y siete subespecies. La mayor variabilidad genética de esta especie se reporta en Perú y Bolivia, alrededor del lago Titicaca, de donde se extendió a Chile, Ecuador y Colombia (Spooner *et al*., 2005).

La papa, cuya parte comestible es el tubérculo, constituye el cuarto sistema de alimentación más importante del mundo, solo superada por el trigo, maíz y arroz, esto debido a las excelentes propiedades del tubérculo y a su facilidad de crecimiento (FAO, 2012).

Según estadísticas de la FAO (2012), a nivel mundial en el año 2011 la producción de este producto fue de 324,4 millones de toneladas. En Colombia, de acuerdo con las estadísticas del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (2013) para el mismo año, el área cultivada de papa fue de 151.616 ha.año^{-1}, con una producción de 3.247.557 toneladas.

En Colombia, la papa constituye una de las principales actividades agrícolas de las zonas andinas. El cultivo comercial de esta planta se realiza entre los 2.000 y 3.000 msnm, pero las zonas de óptima producción en función de calidad y cantidad de producto, se ubican entre los 2.500 y 3.000 msnm (Carreño *et al*., 2007).

Es importante resaltar que este cultivo ocupa el noveno renglón entre los productos agrícolas más cultivados a nivel nacional y genera unos 80.000 empleos directos y más de 230.000 indirectos, tanto en las zonas rurales como urbanas. Por otra parte, es uno de los cultivos que presenta la mayor demanda de fungicidas e insecticidas para el control de sus problemas fitosanitarios y el segundo en utilización de fertilizantes (ICA, 2011).

En el departamento de Nariño, este cultivo es de gran relevancia en el sector agrícola, participando con el 17,5% de la producción nacional de papa con 550.891 toneladas, producidas en 30.084 hectáreas reportadas para el 2011 (MADR, 2012).

2. Problemas fitosanitarios en el cultivo de papa

Existe una variada gama de enfermedades que afectan tanto a la planta como al tubérculo de papa, por lo general los microorganismos causantes de problemas fitosanitarios están presentes en el suelo o bien, pueden ser transmitidos por la papa semilla. Estos agentes patógenos se multiplicarán a medida que el hospedero

sea abundante y permanente, de esta manera, en la medida que un suelo esté siendo utilizado como monocultivo y/o se use papa-semilla de mala calidad, se aumentará el inóculo y de esta forma las pérdidas debidas a un bajo rendimiento (Castro y Contreras, 2011).

Las enfermedades causadas por los patógenos *Phytophthora infestans*, *Alternaria solani* y *Rhizoctonia solani,* constituyen según diferentes autores los problemas fitosanitarios más relevantes en el cultivo de papa, por su alta incidencia y las importantes pérdidas que ocasionan (Torres, 2002; Jaramillo, 2003; Chavarro *et al*., 2005; Carreño *et al*., 2007; Vaillant *et al*., 2009).

2.1 Tizón tardío o gota de la papa

El problema fitosanitario denominado “tizón tardío” o “gota de la papa” está presente en todas las áreas paperas del mundo y es considerado como el más importante en el cultivo (Torres, 2002; Jaramillo, 2003; Grünwald y Flier, 2005; Carreño *et al*., 2007; Castro y Contreras, 2011). Además, es el responsable de pérdidas en el rendimiento en cosecha y poscosecha; así como, aumento significativo en los costos de producción a través de la necesidad recurrente del uso de fungicidas (Grünwald y Flier, 2005).

Si los campos no están protegidos adecuadamente con estrategias de manejo y las condiciones ambientales son al mismo tiempo óptimas para el desarrollo del patógeno (temperatura de 12 a 15°C y humedad relativa de 95 a 100%), los sembríos de papa pueden ser destruidos en 10 a 15 días (Torres, 2002; Jaramillo, 2003).

A nivel nacional, el control del tizón tardío de papa se basa principalmente en la aplicación intensiva de fungicidas (DNPV, 1997; Torres, 2002; Grünwald y Flier, 2005; Villareal *et al.,* 2007); diferentes investigaciones determinaron que entre el 7 y 14% de los costos totales de producción, dependiendo de la región, están relacionados al manejo de *P. infestans* (FEDEPAPA, 2007; Villareal *et al.,* 2007). Lo anterior hace que se incrementen los costos tanto económicos como ambientales y la probabilidad de generar resistencias en el patógeno (Jaramillo, 2003).

El agente causal de la enfermedad del tizón tardío es el oomyceto *Phytophthora infestans*, se encuentra clasificado dentro del Reino de los Chromista, perteneciente al phylum oomycota, orden peronosporales, familia pythiacea. La pared celular tiene celulosa, son diploides, el micelio no tiene septos y son bisexuales a diferencia de los hongos verdaderos (Torres, 2002; Carreño *et al*., 2007; Castro y Contreras, 2011).

El altiplano central de México se considera un centro de diversidad genética (Grünwald y Flier, 2005), sin embargo, existe una hipótesis alternativa que plantea que el centro de origen del patógeno corresponde a las montañas de los Andes Suramericanos (Gómez *et al.,* 2009).

2.1.1 Síntomas y signos

El tizon tardío afecta a las hojas, tallos y tubérculos de la planta de papa (Torres, 2002; Grünwald y Flier, 2005; Pérez y Forbes, 2011).

En las hojas, la enfermedad se inicia mostrando pequeñas manchas irregulares de color verde pálido a verde oscuro. En condiciones ambientales óptimas de temperatura (12 a 15°C) y humedad relativa mayor al 95%, estas pequeñas manchas irregulares que se desarrollan generalmente en los bordes y en el ápice de los foliolos crecen rápidamente, dando lugar a lesiones necróticas grandes de color marrón a negro, rodeadas de un halo amarillento (Torres, 2002; Castro y Contreras, 2011).

En el envés de las hojas, coincidente con las manchas que se observan en el haz, se desarrolla un mildiú blanquecino, constituido por esporangióforos y esporangios (Torres, 2002; Pérez y Forbes, 2011).

En el tallo, los síntomas se presentan como lesiones oscuras continuas, ubicadas generalmente en el tercio medio o superior de la planta y alcanzan en algunos casos, más de 10 cm de longitud (Torres, 2002; Castro y Contreras, 2011).

En la parte externa de los tubérculos infectados se observan depresiones muy superficiales e irregulares, de tamaño variable y de consistencia dura. Al hacer un ligero raspado (con un cuchillo o con la uña), debajo de la piel afectada el tejido es de color marrón (Torres, 2002; Castro y Contreras, 2011), causando pérdidas de consideración en poscosecha (Grünwald y Flier, 2005).

2.2 Rizoctoniasis o costra negra

La “rizoctoniasis” conocida también con los nombres de “costra negra” (por la presencia de esclerocios en la superficie de los tubérculos afectados) y “cancro del tallo” (por las lesiones necróticas en los tallos) es una enfermedad que está presente en todas las zonas productoras de papa del mundo, reportándose como uno de los problemas de tipo fungoso de mayor relevancia en el cultivo de papa (Torres, 2002; Vaillant *et al*., 2009).

Afecta todas las fases del cultivo desde la emergencia hasta la cosecha. Las plantas infectadas tienden a producir tubérculos deformes, lo que reduce el rendimiento comercial (Vaillant *et al*., 2009; Farah *et al*., 2008), así como perdidas

por descarte entre el 17,28% dependiendo del grado de infestación (García *et al*., 2002) y disminución en la calidad culinaria de los tubérculos (Torres, 2002).

La severidad de la enfermedad de la rizoctoniasis está determinada por el inóculo presente en el suelo. La naturaleza de la trasmisión del hongo hace que su manejo sea costoso y difícil de desarrollar; más aún, cuando el control con fungicidas no siempre es efectivo, especialmente con niveles iniciales de inóculo altos (Farah *et al*., 2008; Pérez y Forbes, 2011).

Es causada por el hongo *Rhizoctonia solani* Kühn. (Fase asexual), *Thanatephorus cucumeris* (Frank.) Donk. (Fase sexual). *R. solani*, pertenece a la Clase Hyphomycetes; es la fase patogénica y se caracteriza porque no produce conidias, las hifas son de color marrón oscuro, las células son multinucleadas y la base de la célula que da origen a una ramificación tiene una constricción; *T. cucumeris* pertenece a la Clase Basidiomycetes (Torres, 2002).

Las hifas de este hongo tienen la particularidad de anastomosarse, condición que se ha tomado en cuenta para clasificarlo en grupos de anastomosis (AG por sus siglas en inglés). Estos AG se diferencian entre si morfológica, fisiológica y serológicamente. Hasta la fecha, se conocen 14 grupos anastomósicos (1 al 13 u el AGBI) y varios subgrupos (Gonzales, 2002).

Los grupos de anastomosis que afectan a la papa son GA2, GA3, GA4, GA5, GA7 y GA9. De éstos, los más importantes son GA3 y GA4 los cuales se caracterizan porque en la superficie de los tubérculos forma esclerocios (masas compactas de micelio), soporta temperaturas bajas y afecta especialmente a la planta de papa y a las raíces de la cebada (Torres, 2002; Farah *et al*., 2008).

2.2.1 Síntomas y signos

La enfermedad afecta a los brotes del tubérculo semilla en los estados de pre y post emergencia, el hongo prolifera en las yemas del tubérculo, brotes, raíces y estolones formando una amplia red de micelio. Los brotes afectados muestran en la base lesiones necróticas de color marrón, que cuando son profundas los estrangulan, sin embargo, aún en este estado, la planta puede desarrollar desde la parte inferior del tallo estrangulado brotes nuevos, produciendo un retardo en la emergencia o anulando la misma, causando una desigualdad en el crecimiento, plantas débiles y fallas de emergencia (Cedeño *et al*., 2001; Torres, 2002; Farah *et al*., 2008; Castro y Contreras, 2011).

Cuando las plantas llegan a ser adultas, las lesiones necróticas llamadas también cancros, interfieren en el normal movimiento de nutrientes, arrosetamiento del ápice, necrosis cortical de tejido leñoso, pigmentación purpura de las hojas y formación de tubérculos aéreos (Torres, 2002; Castro y Contreras, 2011).

En la superficie de los tubérculos afectados se observa la presencia de costras negras, denominadas esclerocios que son las estructuras de conservación del hongo, dando un mal aspecto a los tubérculos y en un mercado exigente, los tubérculos afectados son rechazados (Torres, 2002).

2.3 Tizón temprano

El "tizón temprano" es después del tizón tardío, la enfermedad foliar más importante del cultivo de papa, se presenta con mayor incidencia en las zonas paperas ubicadas en regiones húmedas y cálidas de países como India, Uruguay, Brasil y del Caribe (Torres, 2002).

El hongo *Alternaria solani* afecta especialmente a plantas de la familia Solanaceae. Los conidióforos se encuentran solos o formando pequeños grupos (Ellisy Gibson, 1975), son rectos o flexuosos, septados, de color claro oliváceo de 6 a 10 micras de diámetro y hasta 110 micras de largo (Torres, 2002; Castro y Contreras, 2011).

Las conidias son solitarias de 15 a 19 x 150 a 300 micras, multicelular; de cuerpo oblongo o elipsoidal, tiene de 9 a 11 septas transversales y de 0 a 3 septas longitudinales (Torres y Ames, 1995; Torres, 2002).

2.3.1 Síntomas y signos

El ataque de este hongo se presenta en plantas desarrolladas cuando los tubérculos empiezan a formarse. Este patógeno ataca principalmente las hojas y rara vez los tubérculos, necesitando temperaturas que alternen con periodos húmedos o lluviosos (Castro y Contreras, 2011; Pérez y Forbes, 2011).

El síntoma en la planta inicia con manchas necróticas de 1 a 2 mm de diámetro que se presentan en las hojas basales (Weingartner, 1981; Pérez y Forbes, 2011). A medida que desarrolla la enfermedad, las manchas se rodean de un halo clorótico y forman lesiones necróticas con anillos concéntricos de color marrón claro en todo el área foliar, pero su crecimiento está restringido por las nervaduras de los foliolos (Torres, 2002).

3. Aceites esenciales (A.E.)

Las plantas poseen un enorme y desconocido reservorio de sustancias derivado de sus actividades metabólicas enfocado a sus sistemas de defensa en contra de microorganismos, insectos y herbívoros. Esa gran diversidad de mecanismos bioquímicos que intervienen en el metabolismo secundario de las plantas superiores ha permitido la producción de una amplia variedad de principios activos (García *et al*., 2010), dentro de estos se puede citar a los aceites esenciales (A.E)

los cuales están contenidos en glándulas o vesículas secretoras inmersas en los tejidos de las hojas, flores, corteza y semillas de los frutos de muchas especies aromáticas (Henao *et al*., 2010).

Estos aceites puede definirse como una mezcla compleja de constituyentes volátiles aislados a partir de material vegetal (Olivero *et al*., 2009; Borges *et al*., 2012). Químicamente, son metabolitos secundarios derivados de terpenos (mono y sesquiterpenos) y sus compuestos oxigenados incluyendo carbohidratos, alcoholes, éter, aldehídos y cetonas; por tanto la presencia de aceites esenciales y su composición son responsables de las fragancias y de las propiedades biológicas de las plantas aromáticas y medicinales (Kalemba y Kunicka, 2003; Oliveira *et al*., 2007; Olivero *et al*., 2009; García *et al*., 2010).

Se calcula que existen aproximadamente 17.500 especies con propiedades aromáticas ampliamente distribuidos en unas 60 familias de plantas, principalmente Asteraceae, Lamiaceae, Lauraceae, Verbenaceae, Myrtaceae, Pinaceae, Rosaceae, Rutaceae, Umbeliferae, entre otras; de las cuales se han reportado altos contenidos de aceites esenciales (Peris y Asensio, 2002).

De naturaleza hidrófoba y de alta viscosidad, los aceites esenciales pueden cubrir un amplio espectro de actividades. Varios aceites esenciales producen efectos: farmacológicos, anti-inflamatorios, antioxidantes y propiedades anticancerígenas. Otros son biocidas contra una amplia gama de organismos tales como bacterias, hongos, virus, protozoos, insectos y plantas (Kalemba y Kunicka, 2003; Saito, 2004; Thembo *et al*., 2010).

En la acción antimicrobiana de los componentes de aceites esenciales, el carácter lipófilo de su esqueleto hidrocarburo y el carácter hidrófilo de sus grupos funcionales son de mayor relevancia. El rango de actividad de los componentes de aceite esencial es el siguiente: fenoles> aldehídos> cetonas> alcoholes> éteres> hidrocarburos (Kalemba y Kunicka, 2003). Por tanto, la actividad biológica de un aceite esencial esta en estricta relación directa con su composición química (Lahlou, 2004).

3.1 Extracción de aceites esenciales

Los aceites esenciales pueden obtenerse a partir de plantas por destilación por arrastre de vapor, destilación con agua, hidrofusión, maceración, prensado en frío, fluidos supercríticos y extracción con disolventes. Sin embargo, el método de destilación por arrastre de vapor y destilación con agua (hidrodestilación) son los más comúnmente utilizados para estos compuestos (Bandoni, 2000; Cerutti y Neumayer, 2004; Lahlou, 2004; Ruiz *et al*., 2007; Oluranti, 2010).

3.1.1 Método de arrastre por vapor

La destilación por arrastre por vapor que se emplea para extraer la mayoría de los aceites esenciales, es una destilación de mezcla de dos líquidos inmiscibles y consiste en una vaporización a temperaturas inferiores a las de ebullición de cada uno de los componentes volátiles por efecto de una corriente directa de vapor de agua.

El vapor ejerce la doble función de calentar la mezcla hasta su punto de ebullición rompiendo los glóbulos de aceite en la muestra vegetal y adicionar tensión de vapor a la de los componentes volátiles del aceite esencial; los vapores que salen de la cámara extractora se enfrían en un condensador donde regresan a la fase líquida, los dos productos inmiscibles, agua y aceite finalmente se separan en un dispositivo decantador o vaso florentino. Esta técnica es la más utilizada a nivel industrial debido a su alto rendimiento, por la pureza del aceite obtenido y la facilidad de extracción (Bandoni, 2000; Ortuño, 2006).

3.1.2 Método de Hidrodestilación o destilación con agua

El principio de la destilación en agua es llevar a estado de ebullición una suspensión acuosa de un material vegetal aromático, de tal manera que los vapores generados puedan ser condensados y colectados. El aceite, que es inmiscible en agua, se separa posteriormente (Bandoni, 2000; Cerutti y Neumayer, 2004).

Una de las diferencias más marcadas con la destilación por arrastre de vapor, es que en la primera el material botánico está en contacto con agua hirviendo (Cerutti y Neumayer, 2004).

3.2 Evaluación biológica de aceites esenciales (A.E.)

Actualmente, no hay una clara regulación y/o estandarización de la metodología para evaluar la actividad inhibidora antimicrobiana de los aceites esenciales (Calvo *et al*., 2011). La mayoría de evaluaciones sobre hongos y bacterias, utilizan los métodos convencionales de prueba de habilidades antibióticas. Existiendo dos técnicas básicas utilizadas para dicho fin (Kalemba y Kunicka, 2003; Faleiro, 2011; Calvo *et al*., 2011):

1. El método de difusión en agar (disco de papel o pozo)
2. El método de dilución (caldo agar o líquido).

Sin embargo, le corresponde al investigador seleccionar el método que sea más factible trabajar o su realidad que facilita el desarrollo de su experimento. Es importante destacar que los estudios que tienen como objetivo poner a prueba *in vivo* o *in vitro* un fitopatógeno, la metodología debe acercarse a su aplicabilidad más viables en condiciones de cultivo (Sarmento, 2012).

3.2.1 Método de difusión en agar

El método de difusión en agar es una de las técnicas de evaluación más extendidas en la búsqueda de actividad antimicrobiana. El método es reconocido como preciso y fiable, a pesar de que produce resultados semi-cuantitativos (Christofilogiannis, 2000), y de acuerdo con algunos autores, sólo cualitativos (Taroco *et al*., 2006; Calvo *et al*., 2011); no obstante, se hace posible estimar el grado de inhibición del crecimiento de microorganismos y sus características morfológicas (Michel y Blanc, 2000; Kalemba y Kunicka, 2003).

Basado en la metodología utilizada por Bauer *et al*. (1966), este método utiliza generalmente platos de Petri normalmente, con medio de cultivo y se inocula con el microrganismo a evaluar; existen dos formas de incorporación de aceite esencial en el sistema: disco de papel o en pozos (agujeros) realizados sobre el medio de cultivo (Klancnik *et al*., 2010). El depósito que contiene el aceite esencial (disco o pozo), después de estar en contacto con el medio inoculado y el período de incubación requerido, muestra una zona transparente alrededor (zona de inhibición) la cual se mide determinando de esta forma el efecto inhibitorio (Faleiro, 2011).

El método de difusión en agar se considera no apropiado para los aceites esenciales por algunos autores, puesto que sus componentes volátiles tienden a evaporarse con el disolvente de dispersión durante el tiempo de incubación, mientras que sus componentes poco solubles no se difunde bien en el caldo de agar (Griffin y Markham, 2000). Sin embargo, permite evaluar rápidamente la respuesta de los microorganismos al ser simple y de bajo costo (Klancnik *et al*., 2010). El método de difusión en disco puede considerarse un método de elección previa de un número considerable de los aislados a una gama de productos antimicrobianos (Christofilogiannis, 2000; Faleiro, 2011).

3.2.2 Método de dilución en agar

El método de dilución se considera como uno de los métodos más fiables para la determinación cuantitativa de la actividad microbiana, especialmente cuando la actividad de los extractos de plantas se muestra en concentraciones más bajas en comparación con el método de difusión en disco (Michel y Blanc, 2000; Klancnik *et al*., 2010; Calvo *et al*., 2011).

La dilución, es ampliamente usada para evaluar la respuesta de bacterias y hongos a nivel *in vitro*, esta técnica se lleva a cabo en cajas de Petri, tubos de ensayo y matraces cónicos como unidad experimental. El método de dilución consiste en exponer a los microrganismos en estudio a diferentes concentraciones de antimicrobianos (Taroco *et al*., 2006); los extractos vegetales se adiciona en el medio de cultivo, cuando este se encuentra todavía líquido para obtener las concentraciones finales deseadas (Klancnik *et al*., 2010; Calvo *et al*., 2011).
Este método está basado en el principio de microdiluciones consecutivas y observación directa del crecimiento del blanco biológico (Taroco *et al*., 2006). Suministrando finalmente una cantidad importante de información, donde la necesidad de búsqueda de agentes antimicrobianos nuevos y eficaces es difícil, especialmente para los productos naturales tales como aceites esenciales y extractos de plantas (Faleiro, 2011).

Kalemba y Kunicka (2003), indican que en la última década, diferentes artículos reportaron las propiedades antimicrobianas de aceites esenciales obtenidos de diferentes especies botánicas mediante el método de dilución; principalmente porque este método permite cuantificar la respuesta de los microrganismos determinando de esta forma la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración letal mínima (CLM) (Taroco *et al*., 2006; Engelmeier y Hadacek, 2006).

3.2.3 Métodos no convencionales

Otras técnicas como el método de microatmósfera, turbidimetría, método bioimpedimetric, sistemas *in situ* y bioautografía, son técnicas poco comunes en la evaluación de la actividad fitoquímica de los aceites esenciales, sin embargo la especificidad de estas técnicas en diferentes investigaciones, hacen que ganen importancia (Kalemba y Kunicka, 2003; Faleiro, 2011).

3.2.3.1 Bioautografía

La bioautografia, es una modificación de la técnica de cromatografía en capa delgada (C.C.D.) o también llamada T.L.C. por sus siglas en inglés (*Thin Layer Chromatography*), esta técnica fue introducida por Homans y Fuchs (1970) como un método para determinar las propiedades antimicrobianas de diferentes sustancias, es decir, cambios en el crecimiento de los microrganismo a nivel *in situ* (Engelmeier y Hadacek, 2006; Choma y Grzelak, 2011).

Esta técnica se constituye como una aplicación directa de detección, que combina un método químico analítico con un bioensayo, obteniendo una rápida identificación del compuesto o compuestos activos en un extracto vegetal u otra mezcla compleja (Engelmeier y Hadacek, 2006; Gu *et al*., 2008; Marston, 2011). Faleiro (2011),

indica que esta técnica recientemente se ha probado para evaluar la actividad antimicrobiana de aceites esenciales.

El principio de la bioautografía consiste en la separación de los componentes de una mezcla a través de la migración diferencial sobre una capa fina de adsorbente retenida sobre una superficie plana. En esta técnica, una solución de la muestra que va a ser analizada se aplica por medio de un tubo capilar sobre la superficie de un adsorbente inerte (sílica, alúmina, entre otros) en el extremo inferior de la placa (Sharapin, 2000; Ortuño, 2006).
La separación se lleva a cabo en una cubeta semi-hermética que contiene un agente eluyente, el cual puede ser un disolvente orgánico o una mezcla de varios. Una vez evaporada la fase liquida, es posible observar mediante lámpara ultravioleta varias manchas repartidas a lo largo de la longitud de la placa, cada una de las manchas corresponden a un componente o grupo de componentes químicos distintos (Sharapin, 2000; Ortuño, 2006).

Sobre la placa cromatográfica una relación entre medio de cultivo y los microrganismos a evaluar se vierten en forma de una lámina fina; después del tiempo de incubación, se evalúa el crecimiento del microrganismo. No se observa crecimiento en los componentes activos *in situ*, ya que son transferidos por un proceso de difusión de la fase estacionaria hacia el microrganismo (Kalemba y Kunicka, 2003; Faleiro, 2011).

De forma paralela, los componentes de interés del extracto se pueden identificar mediante constantes Rf (Ration of Front) expresando la posición de un compuesto sobre una placa como una fracción decimal (Kalemba y Kunicka, 2003; Faleiro, 2011; Marston, 2011), o por medio de métodos más sensibles usando GC (análisis cuantitativo) y GC / MS (análisis cualitativo) (Lahlou, 2004).

Shahverdi *et al*. (2007) indican que esta metodología ha sido considerada como el método de ensayo más eficaz para la detección de compuestos antimicrobianos; al ser una técnica sencilla (Engelmeier y Hadacek, 2006; Marston, 2011), de bajo costo y altamente sensible (Choma y Grzelak, 2011), para el estudio de extractos de plantas.

3.3 Determinación de la composición química en aceites esenciales

Los métodos analíticos instrumentales son ampliamente utilizados para determinar la composición química de diversos materiales fragantes, entre ellos los aceites esenciales. Lahlou (2004) y Bauer *et al*. (2001), indican que esta clase de estudios se puede conseguir por medio de métodos altamente sensibles, principalmente las técnicas de separación como la cromatografía de gases (GC), cromatografía liquida de alta presión (HPLC), espectrometría de masas (MS) y técnicas acopladas como la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

3.3.1 Cromatografía de gases (GC)

La cromatografía de gases (GC) es la técnica más importante para el estudio de los aceites esenciales (Sharapin, 2000). La muestra a evaluar, se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte, y a diferencia de la mayoría de los tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna. Existen dos tipos de cromatografía de gases: la cromatografía gas sólido (GSC) y la cromatografía gas líquido (GLC o GC) (Gomis, 2008). Esta última técnica es la más empleada en la actualidad; utilizada en más del 95% de las aplicaciones de la cromatografía de gases (Sharapin, 2000; Burriel *et al*., 2008).

El principio de la cromatografía gas - líquido se basa en la distribución del analito entre una fase móvil gaseosa y la fase estacionaria un líquido no volátil adsorbido en un soporte solido que rellena la columna. Los componentes del gas problema son desplazados selectivamente, como en una cromatografía de reparto, por el gas portador que fluye de manera continua. Los componentes de la muestra se separan de acuerdo con sus coeficientes de reparto entre las dos fases (Gomis, 2008; Burriel *et al*., 2008).

El acoplamiento de un cromatógrafo de gases a un espectrómetro de masas, permite hacer un análisis rápido y confiable, para el análisis cualitativo y cuantitativo de mezclas complejas (McNair y Miller, 1997; Burriel *et al*., 2008); de esta forma, el sistema de datos, convierte las señales procedentes del espectrómetro de masas, en cromatogramas y espectros de masas, permitiendo obtener información estructural de los componentes de la esencia de acuerdo con el patrón de fragmentación del compuesto (McNair y Miller, 1997; Bauer *et al*., 2001).

4. Aceites esenciales en la agricultura

Según Salgado (2009), los productos naturales fueron utilizados de manera amplia hasta mediados del siglo XIX para el control de plagas y enfermedades agrícolas. Entre estos, los basados en *Chrysantemum cinerariaefolium*, *Chrysantemum coccineum* (fuentes de piretro), *Derros* spp. y *Lonchocarpus* spp. (fuente de rotenona) y Nicotiana (fuentes de nicotina). Durante la Segunda Guerra Mundial, se inició la era de los productos de síntesis para el control fitosanitario, lo que aparentaba ser la solución para la agricultura mundial, sustituyo totalmente los productos naturales.

En los años subsecuentes, algunos problemas surgieron. Los productores notaron que la utilización de agroquímicos no garantizaba el control de plagas y fitopatógenos por largo tiempo. Causando además eliminación de enemigos

naturales, insectos y organismos benéficos, selección de organismos resistentes o la utilización de mayores cantidades de productos generando mayo daño ecológico, dando inicio a un nuevo ciclo de desequilibrio (Salgado, 2009).

En la última década, se ha observado un resurgimiento del interés en el uso de productos botánicos para el manejo de plagas agrícolas, debido principalmente a los efectos nocivos que los agroquímicos sintéticos pueden generar sobre el medio ambiente y la salud. Por tanto, alternativas como los aceites esenciales (A.E) extraídos de especies vegetales endémicas y que muestran actividad repulsiva o toxica para problemas fitosanitarios son altamente deseados (Cruz *et al*., 2000; Saito, 2004; Thembo *et al*., 2010).

Koul *et al*. (2008) indican que este tipo de sustancias o sus componentes se integran al concepto de pesticida verde debido a su volatilidad natural, persistencia limitada en condiciones de campo y varios de ellos con exención presentan reducidos protocolos normativos, representando baja presión de selección, mínima contaminación ambiental y seguridad para el operario.

A nivel mundial existen innumerables reportes de aceites esenciales integrados a prácticas agrícolas con acción biocida, en el manejo de arvenses (Saito, 2004), enfermedades (Ribeiro *et al*., 2008; Soylu *et al*., 2010; Thembo *et al*., 2010) y plagas agrícolas (Saito, 2004; Koul *et al*., 2008; Salgado, 2009; Caballero *et al*., 2012).

En particular el uso de aceites esenciales sobre fitopatógenos de manera aislada o en combinación con otros métodos de manejo, pueden tener un importante papel en la reducción del uso de fungicidas y consecuentemente un menor impacto ambiental (agua, suelo y animales), contaminación de los alimentos, intoxicación de los agricultores y consumidores, eliminación de organismos no objetivo y selección de poblaciones. Convirtiéndose en una alternativa promisoria en el manejo de problemas fitosanitarios en cultivos comerciales a futuro (Ribeiro *et al*., 2008; Salgado, 2009; Stangarlin *et al*., 2011; Pârvu y Pârvu, 2011).

5. Recurso vegetal *Lippia origanoides* H.B.K.

5.1 Clasificación taxonómica

Figura 1. Arbusto de *Lippia origanoides* H.B.K., ecorregión de Alto Patía.

Fuente: esta investigación.

Clase:	Spermatopsida
Sub clase:	Asteridae
Super orden:	Lamianae
Orden:	Lamiales
Familia:	Verbenaceae
Tribu:	Lantaneae
Género:	*Lippia*
Especie:	*Lippia origanoides* H.B.K

(Chen y Gilbert, 2007).

5.2 Familia Verbenaceae

Las plantas de la familia Verbenaceae han llamado la atención de diferentes investigadores no sólo por su alta diversidad botánica, su abundante y amplia distribución en todo el mundo, sino también por su uso variable, especialmente por la presencia de metabolitos secundarios volátiles reportados en diferentes especies de esta familia con cierta bioactividad (García, 1992; Lahlou, 2004; Stashenko *et al*., 2003); destacándose la presencia de aceites esenciales con altos contenidos de timol y carvacrol (Ribeiro *et al*., 2008).

Alrededor de 75 géneros y 3.000 especies hacen parte de la familia Verbenaceae, encontrándose distribuidas principalmente en regiones tropicales y subtropicales. Estas especies generalmente se encuentran en forma de árboles, arbustos, lianas y hierbas, algunas con espinas, presentan hojas opuestas o verticiladas rara vez, sin estípulas, simples o trifoliadas, con menos frecuencia palmeado compuesto. Las inflorescencias son terminales o axilares, racemosa, cimosa o espigada, flores normalmente irregulares, bisexuales, cáliz persistente. Corolla con 4, 5 o más lóbulos, con el limbo algo bilabiado; el fruto se encuentra en una cápsula o drupa indehiscente, a veces rompiendo en nuececillas. Semillas (1 or) 2-4, endospermo generalmente ausente, cubierta de la semilla fina; embrión recto (García, 1992; Chen y Gilbert, 2007).

5.3 Genero *Lippia*

El género *Lippia* Linn. es uno de los géneros más grandes de Verbenaceae incluye alrededor de 220 especies de hierbas, arbustos y árboles pequeños. Sur y Centro América, así como los territorios tropicales de África presentan una amplia dispersión de este género (Pascual *et al*., 2001; O´Leary *et al*., 2011; Kunle y Egharevba, 2011; Viana y Tavares, 2013).

Plantas pertenecientes a *Lippia*, se caracteriza según O´Leary *et al*. (2011) por la forma de capitulo, generalmente axilar, floraciones, cáliz principalmente bilobulado y fruta seca, separada en dos unidades denominadas nuececillas.

Cualidades aromáticas se reporta como una característica que sobresale en el género (Ruiz *et al., 2007*). Presentando especies con perfiles consistentes de composición química, actividades farmacológicas y usos populares (Pascual *et al*., 2001).

Dentro de las especies más estudiadas de *Lippia* a nivel mundial se encuentran *Lippia origanoides* H.B.K. (Olivero *et al*., 2009); *L. alba* (Celis, 2007; Stashenko *et al*., 2003), *L. citrodora*, *L. dulcis* (Celis, 2007), *L. micromera* (Olivero *et al*., 2009), Lippia multiflora; *L. javanica* (Thembo *et al*., 2010); Moldenke (Kunle y Egharevba, 2011); *L. turbinata*; *L. polystachya*; *L. chevalieri* Moldenke; *L. sidoides* Cham

(Ribeiro *et al*., 2008); *L. americana*; *L. rugosa*; *L. citriodora* H.B.K.; *L. nodiflora* Rich; *L. junelliana*; *L. turbinate*; *L. scaberrina* Sond; *L. gracillis* (Ribeiro *et al*., 2008); *L. graveolens* (García *et al*., 2010).

5.4 *Lippia origanoides* H.B.K.

Lippia origanoides H.B.K., es un arbusto silvestre que se distribuye en algunos países de América Central hasta el norte de Argentina, con áreas de alta diversidad especialmente en la región amazónica del centro y el este de Brasil, Colombia y Venezuela (Pascual *et al*., 2001; Oliveira *et al*., 2007; O´Leary *et al*., 2011).

En Colombia, *L. origanoides* se conoce comúnmente como "orégano de monte y orégano silvestre", encontrándose en ambientes semiáridos de los departamentos de la Guajira, Magdalena, Cauca, Cundinamarca, Santander, Norte de Santander (Vicuña *et al*., 2009) y Nariño (Arango *et al.,* 2012; Bueno *et al*., 2009).

Lippia origanoides presenta tallos delgados entre 1 a 3 metros de longitud, perenne, posee hojas ovadas muy aromáticas, presencia de pubescencia estrigosa o hispida (no grisáceo, seríceo), inflorescencias sin brácteas apicales frondosas en racimo, axilares y blancas (Dos Santos *et al*., 2004; Oliveira *et al*., 2007; Ruiz *et al*., 2007; O´Leary *et al*., 2011).

Pascual *et al*. (2001) y Oliveira *et al*. (2007) indican que esta planta presenta diferentes usos etnobotánicos utilizada tradicionalmente como condimento culinario, remedio para desordenes gastrointestinales, antiséptico, tratamiento para problemas estomacales y tratamiento para enfermedades respiratorias; especialmente por los metabolitos secundarios que genera esta especie.

5.4.1 Actividad antimicrobiana de *L. origanoides*

Dentro de las actividades biológicas del orégano silvestre se han reportado efectos antimicrobianos, anti parasíticos, estrogenicos, antigenotóxicos, insecticidas y antioxidantes.

Existen diversos reportes de la acción biocida del aceite esencial de *Lippia origanoides* especialmente sobre bacterias, levaduras y hongos que causan enfermedades en los seres humanos.

Estudios de Olivera *et al.* (2006) determinaron un efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Lippia origanoides* frente a los hongos *Candida albicans, Candida parapsilosis, Candida guillermondii, Cryptococcus neoformans, Trichophyton rubrum, Fonsecaea pedrosoi;* así como las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Lactobacillus casei* a nivel *in vitro.*

Celis (2007) determino una alta bioactividad en laboratorio sobre promastigotes de *Leishmania chagasi* y actividad media sobre las bacterias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella tiphymurium* al evaluar el aceite esencial de *L. origanoides.*

También ha sido determinado un alto potencial de inhibición sobre las bacterias *Escherichia coli*, *Salmonella tiphymurium, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Aeromona hydrophila, Proteus mirabilis, Enterobacter clacae, Klebsiella pneumoniae,* igualmente los hongos *Candida albicans* y *Aspergillus niger,* reportando altos valores de zonas de inhibición de los microorganismos usando la técnica de difusión en disco de Kirby – Bauer y perforación en placa (Ramírez *et al.,* 2009; Henao *et al.,* 2010).

En el campo de la agricultura se ha evaluado la actividad biocida del extracto de *Lippia origanoides* sobre los fitopatógenos *Rhizoctonia solani* y *Bipolaris maydis* dos hongos de importancia económica en el cultivo de maíz en Venezuela; los resultados mostraron que existe un alto potencial de uso del extracto de *L. origanoides* para el control de los anteriores fitopatógenos sustentado por los resultados a nivel *in vitro* y de cultivo experimental, reduciendo la enfermedad hasta en un 56,7% para *B. maydis* y 80% para *R. solani* (Rodríguez y Sanabria, 2005).

Estudios de Bittara *et al.* (2009), determinaron que bajo condiciones de campo, que el extracto de *Lippia origanoides* permite reducir la severidad de la enfermedad de la sarna polvosa de la papa causada por el fitopatógeno *Spongospora subterranea* (Wallr.) Lagerh superando al comparador sintético i.a. Mancozeb y permitiendo incrementar los parámetros de producción del cultivo de papa.

Así mismo, Sangronis *et al.* (2009) determinaron mediante ensayos a nivel *in vitro* que el extracto obtenido de hojas de *Lippia origanoides* permite reducir el deterioro en pos cosecha de mango al ataque de *Colletotrichum gloesporioides* causante de la enfermedad de la antracnosis, reportando que el extracto de orégano bajo una concentración de 0,5% presenta control de la enfermedad.

También, el Oomyceto *Phytophthora infestans* causante de la enfermedad del tizón tardío asilado de papa *Solanum tuberosum* (Arango *et al.,* 2011) y tomate de mesa *Solanum lycopersicum* (Quemá *et al.* 2014) ha sido evaluado frente al aceite esencial de orégano silvestre. Arango *et al.* (2011), utilizando la técnica de dilución en medio de cultivo, determinaron diferentes grados de sensibilidad del patógeno al aceite esencial, recomendando evaluar la actividad de los componentes mayoritarios presentes en la fracción oleaginosa con el fin de esclarecer la actividad biocida encontrada.

Dentro de la revisión realizada, finalmente se reportan los trabajos de Sousa *et al.* (2012), autores que evaluaron el efecto de *Lippia origanoides* sobre el fitopatógeno *Fusarium oxysporum,* determinando inhibiciones en el crecimiento micelial

superiores al 80% bajo una concentración de 0,57 $mg.ml^{-1}$ del extracto a nivel *in vitro* determinando alta eficacia de *L. origanoides* ante este hongo.

6. Aceite esencial (A.E) de *Lippia origanoides* H.B.K.

El orégano de monte (*L. origanoides*) es una especie de alto rendimiento de aceite esencial, numerosas investigaciones demuestran la presencia de esta fracción cuando se extrae de hojas, tallos e inflorescencias de esta planta.

El aceite esencial puede obtenerse mediante las técnicas de extracción por hidrodestilación con equipo Clevenger (Oliveira *et al*., 2007; Borges *et al*., 2012; Ruiz *et al*., 2007); hidrodestilación asistida por microondas (MWHD) usando un montaje tipo Clevenger, calentado con un horno microondas (Henao *et al*., 2010; Vicuña *et al*., 2009; Caballero *et al*., 2012), Arrastre con vapor (Arango *et al.,* 2012; Henao *et al*., 2010; García *et al*., 2010), técnica de Extracción Simultánea con Solvente (SDE) utilizando diclorometano (CH_2Cl_2) como solvente, para luego concentrar el extracto con una corriente de N_2 y deshidratación con Na_2SO_4 anhidro (Muñoz *et al*., 2007; Ruiz *et al*., 2007) y Extracción con Fluidos Supercríticos (SFE) utilizando CO_2 como solvente (Ruiz *et al*., 2007).

Celis (2007) y Henao *et al*. (2010) señalan que el aceite esencial de *Lippia origanoides* obtenido por MWHD de las partes aéreas de la planta, presenta un olor picante y color amarillo oscuro a rojo amarillento, representando cerca del 1,46 ± 0,05% del peso del material vegetal fresco; por su parte Oliveira *et al*. (2007) reportan rendimientos promedio de aceite esencial de 1,0%. Arango *et al.* (2012) mediante la técnica de arrastre con vapor a nivel de laboratorio obtuvieron un rendimiento promedio de 2,67%, obteniendo los mejores resultados 3,2% bajo las condiciones tiempo 3,41 h. y densidad de lecho de 95,40 gr.L-1, contrastando con estudios de Dos Santos *et al*. (2004) autores que indican un rendimiento de extracción de aceite esencial de 4,6% (p/p). Todos los autores demuestran el potencial para la extracción de estos compuestos.

Algunas propiedades físico-químicas del aceite esencial reportadas por Celis (2007) son: densidad (23ºC) 0,922 g/ml + 0,002; nD (20ºC) 1,5143 + 0,0005; [α]D25(º•mL/g•dm) (+) 0,439 + 0,099; solubilidad de AE/mL de solución C_2H_5OH/H_2O 20% v/v = insoluble, 40% v/v = 0,004, 60% v/v = 0,006, 80% v/v = 0,64 + 0,11. Otros estudios fisicoquímicos del aceite, indican un índice de refracción de 1,5158 y un peso específico de 0,932 (Henao *et al*., 2010).

La presencia de aceites esenciales y su composición determinan el aroma específico y sabor de las plantas. Por lo tanto, la composición química de los aceites esenciales se convierte en un criterio importante para la identificación de plantas (Oliveira *et al*., 2007), centrándose en el caso de la especie *L. origanoides*

la mayoría de estudios en esta fracción; principalmente por la estabilidad y concentración de compuestos de interés (Olivero *et al*., 2009).

Muchos trabajos sobre la actividad biológica del aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*) se han publicado, sin embargo, muestran mucha discordancia entre la misma esencia. Las razones de esta variabilidad puede ser comprendido si se tiene en cuenta todos los factores que influyen en la composición química de los aceites, a saber, las condiciones climáticas, estacional y geográfica, plazo de la cosecha y la técnica de destilación, entre otros (Lahlou, 2004; De Martino *et al*., 2009; Vicuña *et al*., 2009). El efecto de la madurez de la planta en el momento de la producción de aceite y la existencia de diferencias quimiotipo (chemotypic) también puede afectar drásticamente esta composición (Lahlou y Berrada, 2003).

Por ejemplo, Oliveira *et al*. (2007) y Borges *et al*. (2012) reporta un alto contenido de monoterpenos oxigenados en el orden de 66,0% y contenidos bajos de hidrocarburos monoterpenos (20,7%), hidrocarburos de sesquiterpeno (9,0%), y sesquiterpenos oxigenados (1,1%), siendo los dos compuestos principales entre monoterpenos fenólicos Carvacrol (38,6%) y timol (18,5%); y dentro de los monoterpenos P-cimeno (10,3%) y C-terpineno (4,1%), así como el sesquiterpeno (E)-cariofileno (5,9%).

Vicuña *et al*. (2009) reportan un alto porcentaje de monoterpenos (36,1 a 39,4%), seguido de monoterpenos oxigenados (27,3 a 30,6%), y sesquiterpenos (22,2 a 27,2%). Siendo el principal compuesto del aceite esencial el timol (60%) en el material con nomenclatura COL519799, mientras que el espécimen COL516290 se caracterizó por la alta proporción de timol (34%) y Carvacrol (26%).

Análisis cromatográficos realizados por Henao *et al*. (2010), en diferentes colecciones de *L. origanoides* mostraron que el aceite esencial es rico en monoterpenos fenólicos, ya que el timol fue el compuesto mayoritario, con una abundancia del 29,6%; seguido por el Durenol (3,5%) y o-cimeno (0,8%).

Los hidrocarburos monoterpenos P-cimeno y C-terpineno, los precursores biogenéticos (por hidroxilación enzimática) de los dos terpenos fenólicos, timol y Carvacrol, se encuentran siempre como hidrocarburos monoterpenos importantes (Oliveira *et al*., 2007).

De manera general se observan alrededor de 32 compuestos identificados en el aceite esencial de *L. origanoides* los cuales corresponden al 97,5% de esta fracción (Celis, 2007). La mayoría de autores, coinciden que el timol y el Carvacrol son compuestos, a los cuales se les atribuyen la actividad antioxidantes, agentes antifúngicos y antibacteriales, ya que están presentes en cantidades significativas en los aceites esenciales evaluados (Oliveira *et al*., 2007; Muñoz *et al*., 2007; Vicuña *et al*., 2009; Henao *et al*., 2010; García *et al*., 2010; Kalemba y Kunicka,

2003 y Borges *et al*. 2012); explicado en parte a la naturaleza ácida de su grupo hidroxilo el cual forma un puente de hidrógeno con un sitio activo enzimático (Kalemba y Kunicka, 2003), expresando el más alto espectro de actividad en contra de los microorganismos (García *et al*., 2010).

Sin embargo De Martino *et al*. (2009) indican que aunque los anteriores compuestos son reportados con alta actividad microbiana esta actividad puede resultar de la presencia sinérgica de componentes menores activos, tales como γ-terpineno y P-cimeno; los cuales se reportan en el aceite esencial de *L. origanoides*.

6.1 Quimiotipos de *Lippia origanoides*

Ruiz *et al*. (2007) encontraron variaciones drásticas en la composición química de los metabolitos secundarios en plantas de *Lippia origanoides*, en especies recolectadas en la cuenca oriental del cañón de Chicamocha, con respecto a la composición reportada en literatura. El mismo caso ocurrió con Oliveira *et al*. (2007), autores que observaron variaciones considerables del porcentaje de Carvacrol entre muestras colectadas en Belén y Oriximina estado de Pará, Brasil.

Lo anterior ha conducido a designar quimiotipos (chemotypes), entendiéndose como individuos de la misma especie y región geográfica, que manifiestan variaciones que permiten agruparlos de acuerdo con la presencia de ciertos compuestos mayoritarios en el aceite esencial, algunos autores también toman como criterio adicional, el rendimiento de extracción del aceite (Ruiz *et al*., 2007; De Martino *et al*., 2009).

Ruiz *et al*. (2007) explican este fenómeno como una variación genética en la especie de acuerdo a cambios en la biosíntesis de productos secundarios del metabolismo de plantas sin alterar la parte morfológica del orégano. Especialmente para *L. origanoides* la variabilidad en el contenido de carvacrol y el timol (Oliveira *et al*., 2007).

En general, quimiotipos forman "variedades bioquímicas" o "formas fisiológicas" en especies botánicas, cada uno de ellos con un equipo enzimático específico. Estas especies son genéticamente codificadas para dirigir la biosíntesis en la formación preferente de un compuesto definido (De Martino *et al*., 2009). En el caso de los compuestos fenólicos, la ruta metabólica es a través de la conversión autooxidativa de γ-terpineno de P-cimeno seguido por hidroxilación de p-cimeno al timol o carvacrol (Poulose y Croteau, 1978 citado por De Martino *et al*., 2009).

Estudios de Vicuña *et al*. (2009) indican que al menos tres quimiotipos diferentes pueden diferenciarse para *Lippia origanoides*, dependiendo de la proporción de los constituyentes principales, un quimiotipo primero (A), cuyos componentes

principales son P-cimeno y 1,8-cineol, un quimiotipo segundo (B) con una alta fracción de Carvacrol, y un quimiotipo tercero (C) con una alta fracción de timol.

Ruiz *et al*. (2007) proponen una agrupación de quimiotipos donde los compuestos mayoritarios para el quimiotipo 1 corresponden a monoterpenos ($C_{10}H_{14}$) y sesquiterpenos ($C_{15}H_{24}$) no oxigenados, donde p-cimeno, β-felandreno y trans-β-cariofileno son representativos. Para el quimiotipo 2. Presentan un alto porcentaje del extracto corresponde a timol, un fenilpropano ($C_{10}H_{14}O$) y p-cimeno, monoterpeno no oxigenado. En la Tabla 1, se muestran algunos reportes de compuestos presentes en el aceite esencial de *L. origanoides* en diferentes investigaciones.

Tabla 1. Algunos compuestos reportados en aceite esencial (A.E) de *Lippia origanoides* H.B.K., determinados por GC-MS.

Compuestos reportados	Fuente
1. (E)-cariofileno 2. 1,8-cineol 3. 1-terpinen-4-ol 4. Acetato de timilo 5. Acido-3-isopropilbenzóico 6. Borneol 7. Carvacrol 8. Carvona 9. Citroneleno 10. Durenol 11. Eter metilico de timilo 12. Limoneno 13. Mirceno 14. o-cimeno 15. Timol 16. trans- β-cariofileno 17. α-fenaldreno 18. α-humuleno 19. α-terpineno 20. α-turjeno 21. α-Tuyeno 22. β-bisaboleno 23. β-cariofileno 24. β-Eudesmol+α-Eudesmol 25. β-fenaldreno 26. β-mirceno 27. γ-terpineno 28. ρ-cimeno	Bueno *et al*., 2009; Celis, 2007; Ruiz *et al.,* 2007; Oliveira *et al*., 2007; Muñoz *et al*., 2007; Vicuña *et al*., 2009; Henao *et al*., 2010; Borges *et al*., 2012; Arango *et al.,* 2012; Quema *et al.,* 2014.

Los reportes de Arango *et al.* (2012) y Quema *et al.* (2014), indican que el aceite esencial de orégano (*L. origanoides*) colectado en Alto Patía, Nariño, presenta contenidos de timol 72,54 y 83,0 % mayores a los reportados para la misma especie obtenida en otras regiones del país consignadas en investigaciones de Celis (2007), Muñoz *et al*. (2007), Ruiz *et al*. (2007), Vicuña *et al*. (2009), Bueno *et al*. (2009), Borges *et al*. (2012), así como reportes en Brasil de Oliveira *et al*. (2007).

Finalmente, Lahlou (2004) y De Martino *et al*. (2009) indican que la mayoría de los documentos no suelen citar el origen geográfico y la composición exacta del aceite esencial estudiado, algo que puede llegar a negar sus conclusiones.

V. METODOLOGÍA

1. Localización

La presente investigación se desarrolló en la Planta Piloto y Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Universidad de Nariño, ubicados al noroeste de la ciudad de San Juan de Pasto, Nariño, Colombia. Latitud 1º14'13'' Norte, longitud 77º17'7'' Oeste, a una altitud de 2.540 msnm, temperatura promedio de 20ºC y humedad relativa del 70%.

2. Materiales

2.1 Fitopatógenos

Muestras de tejido vegetal con presencia de los patógenos de interés fueron obtenidos de cultivos comerciales de papa del departamento de Nariño registrando mediante GPS (Global Positioning System) el punto de muestreo. El material vegetal se llevó al laboratorio de Sanidad Vegetal de la Universidad de Nariño para su aislamiento y purificación, en la tabla 2 se describen los puntos en los cuales se recolectaron las muestras de los fitopatógenos.

Tabla 2. Muestreo de los fitopatógenos de papa *P. infestans, R. solani* y *A. solani,* en campo.

Fitopatógeno	Municipio	Vereda	Punto de muestreo	
Phytopthora infestans	Pasto	Botanilla	1°10'59.9"N	77°15'59.3"W
Rhizoctonia solani	Pasto	Cruz de amarillo	1°10'59.9"N	77°15'59.3"W
Alternaria solani	Ipiales	Yanala bajo	0°50'43.8"N	77°34'56.7"W

La identificación de cada microorganismo se realizó con base en las características morfológicas del micelio y estructuras reproductivas según Alexopoulos y Mims (1997).

2.1.1 *Phytophthora infestans*

Los foliolos afectados por el fitopatógeno *P. infestans,* fueron cortados en pedazos pequeños (5mm x 5mm) desinfectados con hipoclorito de sodio al 3% por dos minutos y lavados con agua destilada durante un minuto (Agrios, 2002); siguiendo la metodología de Álvarez *et al.* (2011) este material se sembró en platos de Petri con medio nutritivo agar tomate, incubando en condiciones de oscuridad a una temperatura de 20ºC.

2.1.2 *Rhizoctonia solani*

Siguiendo la metodología de Cedeño *et al*. (2001) con ayuda de pinsas se retiraron de tuberculos afectados por la enfermedad, esclerocios del patógeno los cuales se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio (0,5%) durante tres minutos; seguidamente se procedio a lavarlos en agua destilada estéril para luego ser sembrados asépticamente en platos de Petri con medio PDA (Papa Dextrosa Agar). Estos se incubaron en condiciones de oscuridad a una temperatura de 20ºC.

2.1.3 *Alternaria solani*

Foliolos afectados por *A. solani,* se cortaron en pedazos pequeños (5mm x 5mm) desinfectándolos con hipoclorito de sodio al 3% por dos minutos, se enjuagaron en agua destilada durante un minuto (Agrios, 2002); y se sembraron asépticamente en platos de Petri con medio PDA (Papa Dextrosa Agar). El montaje se incubó a 20ºC en condiciones de oscuridad.

2.2 Material vegetal *Lippia origanoides* H.B.K.

Se emplearon hojas de la especie *Lippia origanoides* H.B.K. (planta adulta), obtenidas de la zona del Alto Patía, vereda Alto del Mayo, municipio de Taminango (N). Para la obtención del aceite esencial, se realizó una colecta masiva en campo de la especie, indicando mediante GPS (Global Positioning System) el punto de muestreo (Figura 2).

Paralelamente, según la metodología de Esquivel (1997) se tomó una muestra de cinco ejemplares con estructuras reproductivas. Dichas muestras se guardaron en bolsas plásticas, consignando la fecha, lugar geográfico, grado de abundancia y hábitat del sitio de muestreo, altura y temperatura media; con el fin de realizar montajes *exsiccatea,* los cuales se enviaron al Herbario PSO de la Universidad de Nariño, para su correspondiente identificación taxonómica y conservación.

2.3 Obtención de aceite esencial de *Lippia origanoides*

El aceite esencial de *Lippia origanoides* se obtuvo mediante la técnica de arrastre con vapor, bajo las condiciones de extracción estandarizadas por Arango *et al.* (2012), utilizando vapor saturado a presión atmosférica de 3,7 psig, densidad del lecho de 80,0 g/L bajo un tiempo de extracción de 2 horas.

Figura 2. Sitio de colecta material vegetal *Lippia origanoides* .

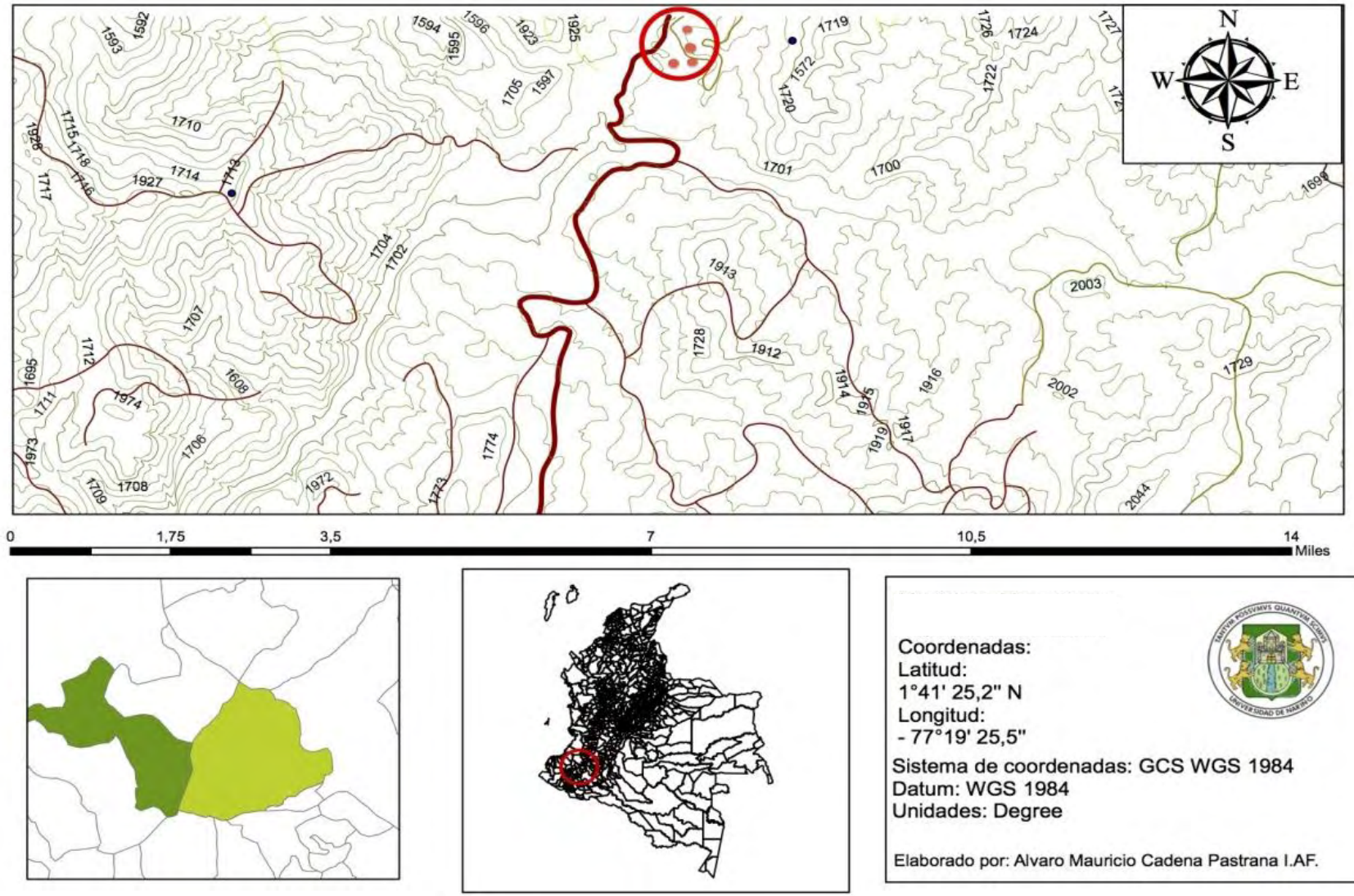


Figura 3. Equipo de arrastre con vapor, Planta Piloto, Universidad de Nariño.

Fuente: esta investigación.

3. Perfil cromatográfico del aceite esencial de *L. origanoides*

El análisis del aceite de *L. origanoides* se realizó mediante cromatografía de gas acoplada a espectrometría de masas (GG-MS), utilizando un equipo Shimadzu QP-20105 CGMS, siguiendo la metodología con modificaciones de Barbosa *et al*. (2006).

Para la separación de los componentes químicos se utilizó una columna DB-5 de J & W Scientific con 30 m de largo, 0,25 mm de diámetro, espesor película de 0,25 µm, y Helio WAP como gas de arrastre. Las condiciones de preparación del cromatógrafo de gases fueron: presión interna de la columna de 56,7 kPa, relación de división de 1:30, de flujo de gas en la columna de 1,0 ml / min, temperatura del inyector a 250°C, temperatura del detector o la interfaz (GC-MS) de 280°C.

La temperatura inicial de la columna fue de 45°C (5 min), seguido de un incremento de 4°C/min hasta 150ºC, y punto de equilibrio durante 30 min (2 min), finalizando a una temperatura de 250ºC a razón de 5ºC/min. El espectrómetro de masas fue programado para realizar lecturas en un rango de 30 a 400 Da, en intervalos de 0,5 s, con energía de ionización 70 eV.

Se inyectó en el GC 1,0 µL del aceite esencial de *L. origanoides* bajo una dilución al 30% en diclorometano (HPLC). La identificación de los componentes se realizó por comparación de sus espectros de masas con los disponibles en las bases de

datos de espectroteca (Nist05 y Adams, 2007) y también por índices de Kovats (IK). Para el cálculo de los índices Kovats, se inyectó en el cromatógrafo una mezcla de alcanos lineales (C_{16} a C_{32}).

La cuantificación de los componentes se llevó a cabo mediante el cálculo de las cantidades relativas de áreas usando un cromatógrafo de gas Shimadzu GC-17A con un detector de ionización de llama (GC-FID).

4. Evaluación del aceite esencial de *L. origanoides* sobre los fitopatógenos *P. infestans*, *R. solani* y *A. solani*

4.1 Análisis de la sensibilidad de los fitopatógenos al aceite esencial de *L. origanoides* mediante la técnica de dilución

4.1.1 Diseño experimental

Para la evaluación de la actividad biocida del aceite esencial de *Lippia origanoides* se utilizó un diseño experimental completamente al azar (D.I.A.), utilizando quince repeticiones por tratamiento, en donde la unidad experimental correspondió a un plato de Petri con medio de cultivo enmendado y un cilindro de micelio del fitopatógeno a evaluar.

Asumiendo un comportamiento diferencial en la sensibilidad de *Phytophthora infestans, Rhizoctonia solani* y *Alternaria solani,* se desarrolló la investigación en ensayos individuales para cada microorganismo, bajo las características experimentales descritas en el ensayo inicial.

4.1.2 Actividad biocida del aceite esencial de *L. origanoides*

El potencial biocida del aceite esencial de orégano fue determinado mediante la respuesta de sensibilidad a nivel *in vitro* de los fitopatógenos propuestos, usando la técnica de dilución en medio de cultivo, calculando los valores de porcentaje de inhibición (PH), concentración efectiva cincuenta (EC_{50}) y la concentración mínima inhibitoria (MIC); variables de evaluación recomendadas por Michel y Blanc (2000), Klancnik *et al*. (2010) y Calvo *et al*. (2011).

Para esto, se preparó medio nutritivo agar tomate para el patógeno *P. infestans* y medio nutritivo PDA para los patógenos *R. solani* y *A. solani*. Para cada caso, el medio de cultivo esterilizado se transfirió a Erlenmeyers con un volumen definido de 150 ml para obtener las concentraciones deseadas; el aceite esencial previamente emulsificado con Tween 20 (1:1 v/v) se incorporó al medio de cultivo, teniendo en cuenta las relaciones consignadas en la Tabla 3.

Tabla 3. Tratamientos prueba de actividad biocida del aceite esencial de *L. origanoides*, Ensayo 1.

Tratamiento	Concentración A.E	
T_1	1	$\mu L.mL^{-1}$
T_2	10	$\mu L.mL^{-1}$
T_3	100	$\mu L.mL^{-1}$
T_4	1.000	$\mu L.mL^{-1}$
T_5	10.000	$\mu L.mL^{-1}$
T_6	100.000	$\mu L.mL^{-1}$
T_7*	0	$\mu L.mL^{-1}$

*Testigo absoluto, agua destilada.

En la Tabla 3, se describen las dosis de aceite esencial propuestas como primer rango de evaluación sobre los tres fitopatógenos (Ensayo 1); dependiendo de la respuesta de sensibilidad de cada microorganismo se exploraron dos nuevos rangos de concentración del aceite esencial (Ensayo 2 y 3). Con el fin de encontrar la concentración mínima inhibitoria (MIC) determinada como la concentración más baja de un producto restrictivo que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo (99%).

Una vez solidificado el medio de cultivo, en cada plato de Petri se sembró un disco de micelio de 1,1 cm de diámetro obtenidos con un sacabocado, a partir de aislamientos puros de los patógenos sembrados 8 días antes del ensayo.

Cada crecimiento micelial se midió mediante el programa ImageJ® (Rohlf, 2005) a intervalos de 48 horas, hasta completar un periodo de incubación de 192 horas a una temperatura promedio de 20°C.

4.1.3 Variables de evaluación

4.1.3.1 Porcentaje de inhibición (PH)

La actividad biofungicida del aceite esencial se expresó en términos de inhibición de crecimiento micelial, calculado mediante la fórmula propuesta por Vaillant *et al.* (2009):

$$PH= [(DCC – DCT)/DCC] \times 100$$

Dónde: PH= porcentaje de inhibición; DCC= diámetro de la colonia control; DCT= diámetro de la colonia tratada.

4.1.3.2 Concentración efectiva cincuenta (EC_{50})

Las lecturas del porcentaje de inhibición (PH) con respecto a la media de crecimiento del testigo para cada fitopatógeno, se analizó mediante el procedimiento de regresión Probit, empleando el software PC-Log Probit (Camacho, 1991), utilizando el valor de las quince repeticiones en el último rango de evaluación. Con este método se obtuvieron la dosis inhibitoria cincuenta, la ecuación de predicción y el coeficiente de correlación r.

4.1.3.3 Concentración mínima inhibitoria (MCI)

El efecto del aceite esencial de orégano silvestre también se determinó a partir del cálculo de la mínima concentración inhibitoria (MCI) para cada patógeno evaluado, determinando la concentración más baja del aceite de *L. origanoides* que inhibe el crecimiento visible del microorganismo después de un periodo de evaluación de 192 horas (Taroco *et al*., 2006; Klancnik *et al*., 2010).

4.1.3.4 Análisis morfométrico de los fitopatógenos sensibles al aceite esencial de *L. origanoides*

Terminado el ensayo de sensibilidad de los fitopatógenos, teniendo en cuenta el cálculo de la EC_{50} se preparó para cada patógeno el medio de cultivo suplementado con aceite esencial, y un medio sin aceite usado como control. Los medios se inocularon durante un periodo de 192 horas (20°C). Al cabo de este periodo, se montaron placas de observación en porta objetos de vidrio, usando azul de lactofenol como agente de tinción y con ayuda de un microscopio óptico (aumento 40X) se tomaron fotografías digitales.

Se reportaron los cambios en la morfología de las estructuras reproductivas de los fitopatógenos mediante comparación morfométrica. Midiendo el diámetro y la longitud de las conidias de *A. solani*, de las hifas de *R. solani* y de los esporangios de *P. infestans,* usando el programa MacBiophotonics ImageJ® (Rohlf, 2005).

Con el fin de evaluar la forma de las estructuras reproductivas de los patógenos sometidos al tratamiento con aceite y control, se realizó un análisis morfométrico con Series de Fourier Elípticas, recreando el contorno de la estructura analizada (Outlines), el ajuste de los puntos de la forma fue tomada de diez mediciones (Liu *et al*. 1996; Laurie *et al*. 1997; De Polanco *et al*. 2005). Los coeficientes del análisis elíptico de Fourier, producto de las deformaciones o armónicas realizadas sobre la elipse inicial, se consignaron en una matriz de evaluación para finalmente realizar el análisis multivariado.

Sobre las imágenes digitales se dibujó el contorno de las hifas, conidias y esporangios en el programa Adobe Photoshop CS3©, seguidamente se ejecutaron los programas de la serie Tps: TpsDig y Tpstoefa (http://life.bio.sunysb.edu/morph/), los cuales permitieron transformar los puntos del dibujo a coordenadas y crear un archivo compatible con el programa EFAWin, en el cual se desarrolló una matriz de datos constituida por los coeficientes generados por ocho armónicas, que representan la forma de la estructura, estos datos finales fueron sometidos al análisis estadístico.

4.1.4 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos del análisis de la sensibilidad de los fitopatógenos al aceite esencial mediante la técnica de dilución, fueron sometidos a un análisis de varianza ANDEVA (α=0,05) con el fin de determinar diferencias significativas entre las diferentes concentraciones propuestas sobre las variables: Porcentaje de inhibición (PH), Concentración efectiva cincuenta (EC_{50}) y Concentración mínima inhibitoria (MCI). Encontradas diferencias estadísticas, se procedió a realizar una comparación de media mediante prueba de Tukey a 5% de nivel de significancia utilizando el paquete estadístico S.A.S versión 9.1. Los datos obtenidos a través de la evaluación del porcentaje de crecimiento, se normalizaron mediante la relación $2.arcosen\sqrt{x}$.

Para evaluar las diferencias entre la morfometría de los patógenos sometidos al crecimiento en el medio suplementado con aceite y el medio control, se realizó una comparación de medias para las variables: diámetro y longitud de las estructuras, mediante una prueba de Tukey a 5% de nivel de significancia en el programa Stat Graphics Centurion XV©.

Para evaluar las diferencias morfométricas del contorno de las estructuras reproductivas de los patógenos, las matrices obtenidas con los coeficientes de Fourier se analizaron mediante el programa PAST© 1.22 (Hammer *et al*., 2001), aplicando el análisis canónico discriminante MANOVA-CVA a través del índice de Shapiro Wilk`s.

4.2 Evaluación del aceite esencial de orégano silvestre mediante la técnica de bioautografía

4.2.1 Fraccionamiento del aceite esencial mediante cromatografía en capa delgada (C.C.D.)

Para el fraccionamiento de aceite esencial se utilizó la metodología modificada de Moreira (2006), aplicando 0,75 µL de aceite esencial por placa de cromatografía en

capa delgada preparativa (1 x 6 cm, con fase estacionaria de 1 mm de sílica-gel (60G F_{254}), utilizando como fase móvil los sistemas consignados en la Tabla 4; con el fin de encontrar una separación de los compuestos químicos del aceite esencial de *L. origanoides* con alta resolución y repetitividad.

Tabla 4. Fases móviles reportadas en cromatografía en capa delgada C.C.D. para aceites esenciales.

Solventes	Relación (v/v)	Fuente
Diclorometano:hexano	2:1	Moreira, 2006
Diclorometano:acetato de etilo	9:1	Marangon, 2006
Hexano:acetato de etilo	7:2	Victório *et al*., 2009
Hexano:acetato de etilo	8:1	Plodpai *et al*., 2013
Tolueno:acetato de etilo	93:7	Nuñez *et al.,* 2007
Cloroformo:metanol	85:15	Li *et al.,* 2006

4.2.2 Identificación y cuantificación de las fracciones del aceite esencial obtenidas por C.C.D.

Una vez estandarizados los solventes y la relación de separación del aceite esencial, se realizó un montaje de la técnica C.C.D. usando paralelamente a la inyección del aceite estándares comerciales de timol y carvacrol (Sisma-Aldrich®) principales compuestos mayoritarios reportados en literatura para orégano silvestre.

Las fracciones obtenidas mediante C.C.D. se visualizaron con luz ultravioleta (UV) longitud de onda de 254 nm. Los compuestos observados se identificaron mediante constantes Rf (Relación frontal) expresando la posición de cada compuesto sobre la placa cromatográfica como una fracción decimal, utilizando la siguiente expresión:

$$\mathbf{Rf = L1 / L2}$$

Dónde: L1= distancia recorrida por la muestra desde el punto de aplicación hasta la aparición del centro de la mancha; L2= distancia del frente del solvente (Marston, 2011).

4.2.3 Identificación de la fracción activa del aceite esencial

La fracción activa de aceite esencial se determinó basándose en la técnica de bioautografía en capa delgada reportada por Moreira (2006) con modificaciones. Se aplicaron 0,75 µL de aceite esencial de *L. origanoides* en una placa preparativa

(2,5 x 6 cm) utilizando para su separación la fase móvil evaluada y estandarizada en la fase de fraccionamiento de aceite esencial (ítem 4.2.1). El sistema cromatográfico se secó por 10 minutos para completar la eliminación de los solventes, para luego disponerlo en un plato de Petri y cubrirlo con una capa fina de medio de cultivo, el montaje individual se consideró como una unidad experimental, realizando veinte repeticiones del montaje por fitopatógeno evaluado.

Para la inoculación de los microorganismos *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani* y *Alternaria solani* se dispuso según el caso, discos de agar de 1,1 cm de diámetro a 20 mm de la placa cromatográfica, el montaje fue incubado a 20ºC por un período de 144 horas, registrando el crecimiento del microorganismo a través del tiempo (Plodpai *et al*., 2013).

La región o regiones a lo largo de la placa cromatográfica en donde el fitopatógeno presentó restricciones de crecimiento o no se desarrolló, fueron atribuidas a la(s) fracción(es) activa(s) del aceite esencial; para esto, se midió la distancia desde el punto de inyección del aceite esencial hasta la zona activa con el fin de comparar este punto con las relaciones R_f previamente identificadas en el ítem 4.2.2.

Identificada la fracción activa se aisló de placas cromatografícas control mediante raspado con espátula y lavado con diclorometano grado HPLC. Después de la individualización, la solución se dispuso en cinco Eppendorfs para su concentración mediante centrifugación a 5.000 rpm por 3 minutos. El sobrenadante se identificó mediante GC-MS, de igual forma que se hizo con el aceite esencial bruto.

VI. RESULTADOS

1. Material vegetal *Lippia origanoides* H.B.K.

Nombre científico: *Lippia origanoides* H.B.K.
Nombre común: "Orégano silvestre" - "orégano de monte"
Localización: Vereda Alto de Mayo, municipio de Taminango, Nariño
Coordenadas: 1º41´25,2´´N y -77º19´25,5´
Altitud: 630 msnm.

Las muestras del material vegetal *Lippia origanoides,* se colectaron en la ecorregión del Alto Patía, Vereda Alto de Mayo, municipio de Taminango, Nariño, descrito como un bosque muy seco tropical (bmsT) a bosque seco tropical (bs-T) por Ariza (1999). Este enclave árido forma parte de un valle interandino transversal ubicado en los departamentos de Cauca y Nariño limitando al norte con un ramal montañoso (Cuchilla del Tambo, Dintel de Popayán), que lo separa del valle del río Cauca (CORPONARIÑO, 2008). El carácter subxerofítico de esta zona se debe al efecto de sombra de lluvias ocasionado por la elevada altitud de la Cordillera Occidental, contra la que chocan los vientos húmedos provenientes del Pacífico (Ariza, 1999). Los límites climáticos en esta zona, se caracterizan por tener una temperatura media superior a 24°C y un promedio anual de lluvias entre 500 – 835,4 mm con variaciones debidas a efectos locales (CORPONARIÑO, 2008).

La especie *L. origanoides* se describió en campo como un arbusto aromático de la familia Verbenaceae, de 3,5 - 4 metros de altura. Con olor a artemisa y/o orégano. Presenta meristemos axilares que dan origen a nuevas ramas de maduración descendente. El sistema de ramas es homomórfico según lo descrito por Múlgura de Romero *et al*. (1998), es decir, que no se observa especialización de ramas fértiles o vegetativas. En las nuevas ramas que se originan a partir de las yemas prolépticas se desarrollan silépticamente las florescencias, que en su conjunto forman las inflorescencias.

Las hojas son elípticas, opuestas, decusadas, cortamente pecioladas, con el haz y envés pubescentes, el haz color verde claro y el envés color plateado, de tricomas brillantes. Tienen tamaños variables debido a posibles adaptaciones fisiológicas y morfológicas en respuesta a la exposición a la luz de acuerdo a Parra y Rodríguez (2007). La lámina mide entre 5,5 cm y 1,5 cm de largo por 2,9 cm y 0,8 cm de largo. La base y el ápice de las hojas es obtuso, el borde es crenulado. La venación es craspedódroma. Los tallos son teretes, flexibles, leñosos desde la base del arbusto hasta la parte distal de las ramas, de color café.

Las florescencias son complejas, de tipo politélico, es decir que terminan en un grupo de flores, son de tipo espigas bracteosas, cilíndricas, densas que salen de un solo punto en las axilas de las ramas, generalmente en grupos de 7 - 8. Las

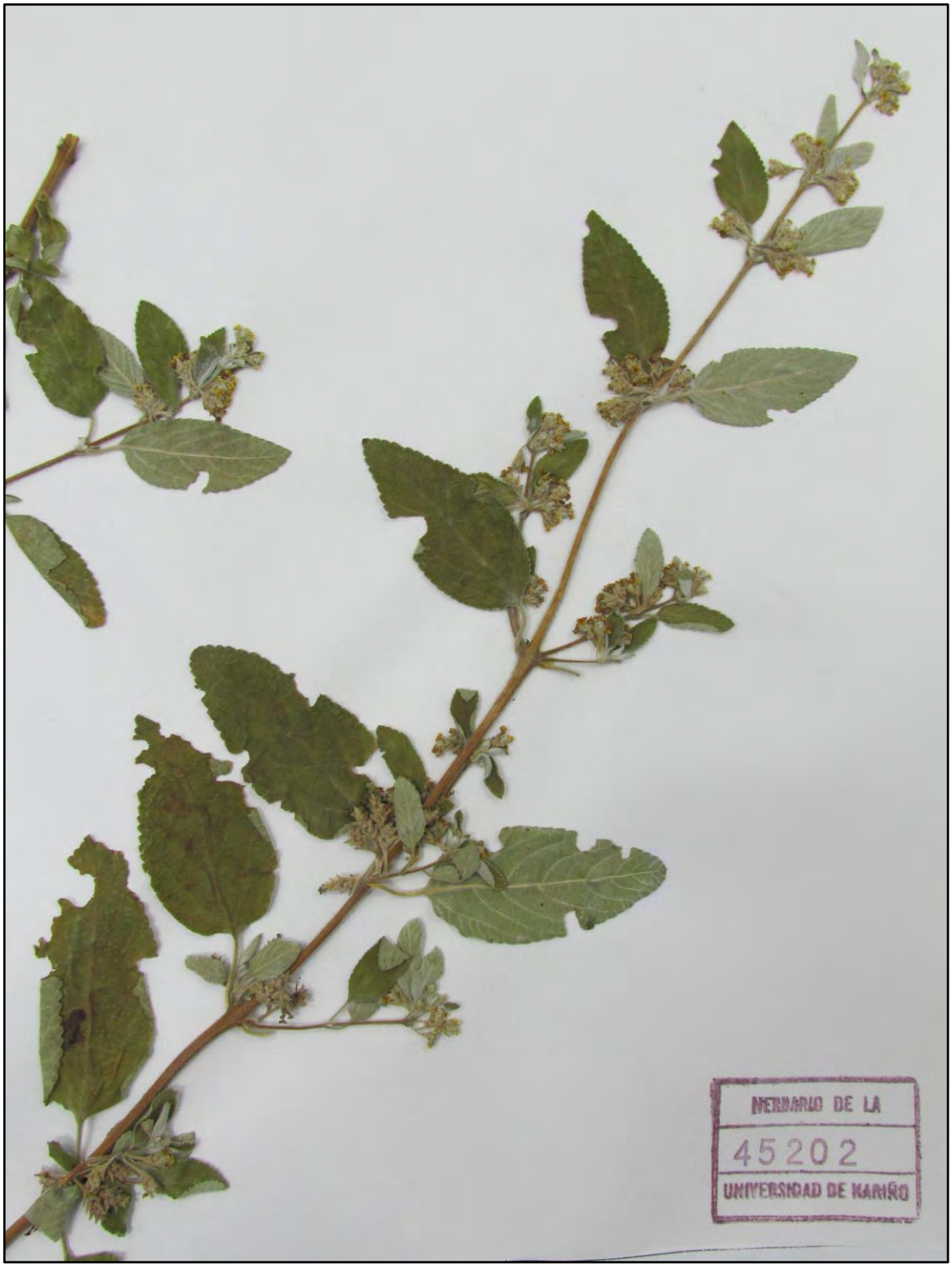
brácteas de las florescencias son planas, escuamiformes, verdosas y están imbricadas en varias series, generalmente de cuatro. Las inflorescencias en su conjunto son de tipo pleiobotrio homotético disyunto.

Las flores son pequeñas, de 4 mm de largo, más grandes que las brácteas, de color amarillo claro, corola gamopétala, hipocrateriforme, fragante, cáliz comprimido, aovado, bífido. Presenta flores masculinas (tempranamente caducas) y flores femeninas por separado. Fruto tipo esquizocarpo seco con dos mericarpos uniseminados, oblicuamente ovado, subcomprimido, cubierto por el cáliz persistente como lo describe Kadereit (2004). Tiene una y una alta producción de frutos secos y semillas por planta (Vega, 2011).

Tiene una distribución geográfica neo tropical, Caribe y del Norte de Sur América. Localmente se distribuye en ecosistemas secos, de alta radiación solar. Existen reportes de *L. origanoides* en los Municipios Nariñenses de Chachagüí, Buesaco, Río Juanambú, y hacia la frontera norte con el departamento del Cauca (Eco Región del Alto Patía), en un rango altitudinal entre los 500 – 1.800 msnm (Colecciones Herbario PSO, 2014); Albesiano *et al*. (2003) indican que esta especie prevalece en ambientes desfavorables caracterizadas por suelos secos, pobres en nutrientes y de alta incidencia lumínica, como se constata en los ejemplares de la Colección del Herbario de la Universidad de Nariño PSO.

Esta planta crece en terrenos con inclinaciones de 5 a 45º, que van desde terrazas aluviales hasta laderas con suelos entisoles poco evolucionados. Las terrazas aluviales donde crece más frecuentemente *L. origanoides*, presentan generalmente características pedregosas, bien drenadas, pH neutro, contenido bajo de materia orgánica y pobres en fósforo soluble (Albesiano *et al*., 2003).

Figura 4. Ejemplar *exsiccatea* codificación Herbario No. 45202, *Lippia origanoides* H.B.K., TEA 001.

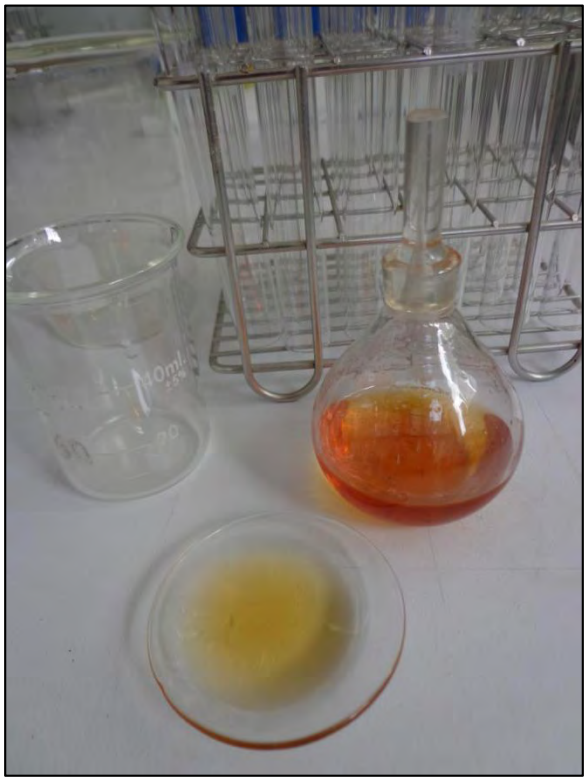


Fuente: esta investigación.

2. Obtención de aceite esencial de *Lippia origanoides*

La extracción del aceite esencial de *L. origanoides* mediante la técnica de arrastre con vapor produjo un aceite ligeramente amarillo (Figura 5), obteniendo un rendimiento promedio de 2,67 % ±0,05 del peso del material vegetal fresco, el rendimiento se calculó a partir de la cantidad de aceite esencial obtenido por unidad de másica de materia prima seca en términos porcentuales (g de aceite/100 g de materia prima).

Figura 5. Aceite esencial de *Lippia origanoides.*

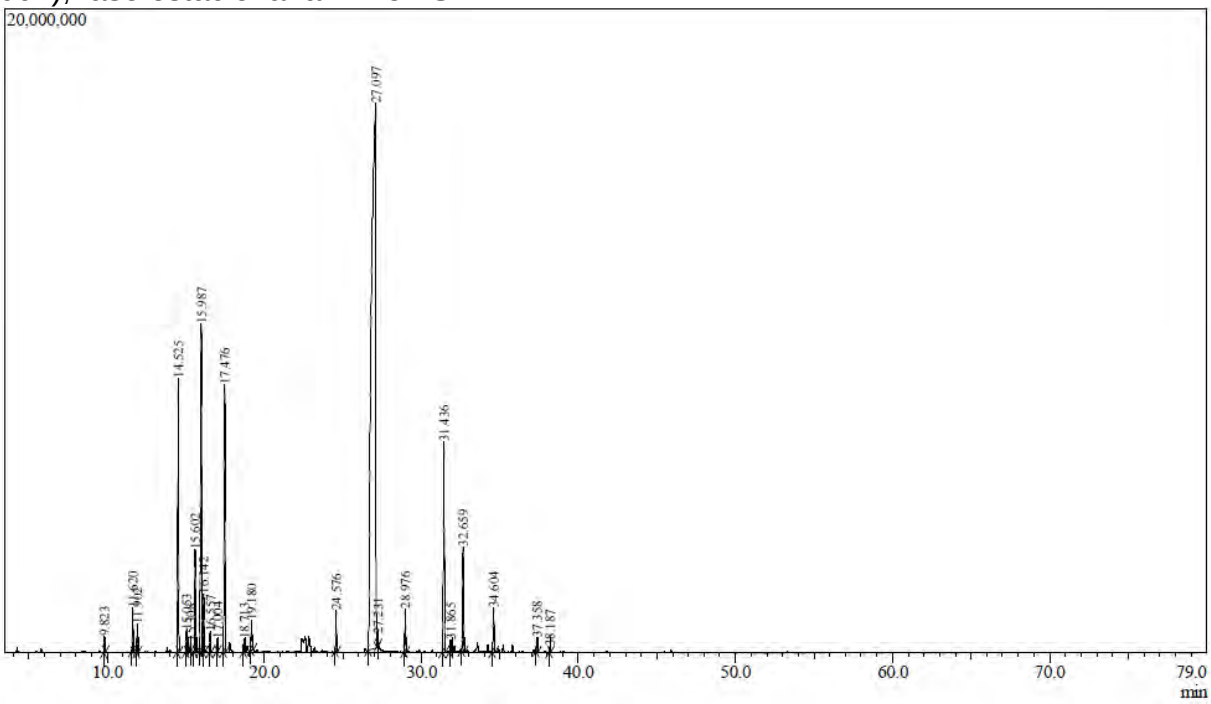


Fuente: esta investigación

3. Perfil cromatográfico del aceite esencial

El análisis obtenido por GC-MS permitió la identificación de 10 compuestos los cuales representan el 93,75 % del aceite esencial de orégano silvestre, tomando como criterio de identificación un porcentaje relativo de área superior al uno por ciento, dentro de estos, se destacan por su abundancia relativa el timol 60,7 % (1.304); ρ-cimeno 8,8 % (1.024); γ-terpineno 6,3 % (1.058); mirceno 5,7 % (990) y β-cariofileno 5,1 % (1.424) (Figura 6 y Tabla 5).

Figura 6. Cromatograma de aceite esencial de *Lippia origanoides* H.B.K. (TEA 001), fase estacionaria DB-5MS.



Fuente: esta investigación.

Tabla 5. Composición química del aceite esencial de *Lippia origanoides* H.B.K. (TEA 001), colectado en Taminango-Nariño-Colombia.

No.	Índice de Retención	Identificación	Cantidad relativa %
1	990	Mirceno	5,70
2	1.015	α-terpineno	2,12
3	1.024	ρ-cimeno	8,85
4	1.028	Limoneno	1,13
5	1.058	γ-terpineno	6,30
6	1.304	Timol	60,7
7	1.308	Carvacrol	0,15
8	1.424	β-cariofileno	5,13
9	1.458	α-humuleno	2,70
10	1.513	β-bisaboleno	1,10

Fuente: esta investigación.

La composición química se determinó por comparación de los espectros de masas de cada compuesto con la base de datos Nist05, Adams2007 y por los índices de Kováts (KI).

4. Evaluación del aceite esencial de *L. origanoides* sobre los fitopatógenos *P. infestans*, *R. solani* y *A. solani*

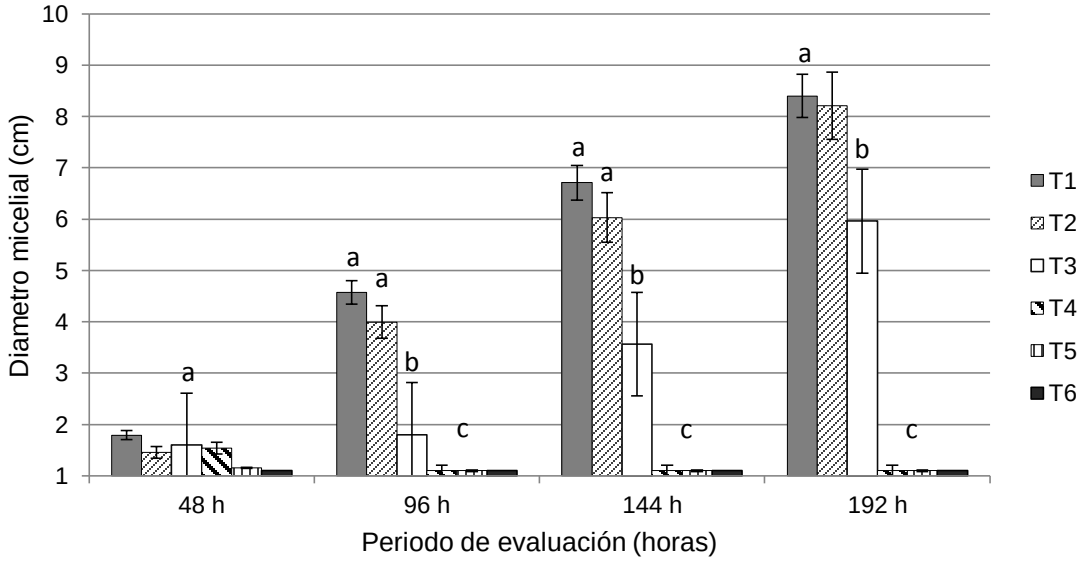
4.1 Análisis de la sensibilidad de los fitopatógenos al aceite esencial de *L. origanoides* mediante la técnica de dilución

4.1.1 Crecimiento *Phytophthora infestans*

Para determinar el efecto biocida del aceite esencial de *L. origanoides* sobre el fitopatógeno *P. infestans*, se establecieron tres rangos de evaluación. El primer rango obedeció a una concentración exponencial desde 10 a 100.000 µl.ml^{-1} del aceite, dichas concentraciones correspondieron al Ensayo 1 (Tabla 6).

En este ensayo se pudo determinar que las relaciones superiores de aceite esencial (T4, T5 y T6) no permitieron el crecimiento micelial del Oomyceto a nivel *in vitro*, por el contrario, el tratamiento T2 (10 µl.ml^{-1}) presentó un comportamiento estadísticamente igual al obtenido en el testigo absoluto, con un crecimiento micelial a las 192 horas de evaluación de 6,03 cm; en el mismo periodo, el testigo absoluto 0 µl.ml^{-1} (T1) presentó un crecimiento de 8,39 cm. Se encontraron diferencias significativas para el tratamiento T2 (100 µl.ml^{-1}) con un valor de 5,96 cm y una respuesta intermedia en este ensayo (Gráfico 1 y Figura 7).

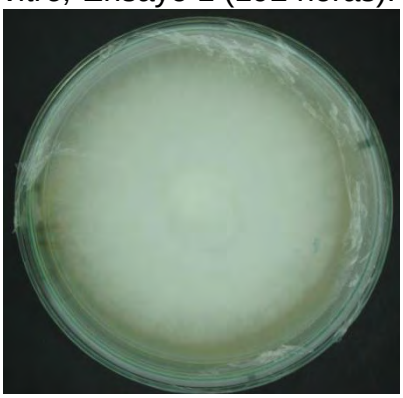
Gráfico 1. Crecimiento micelial (cm) del patógeno *Phytophthora infestans* frente al aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*), Ensayo 1*.



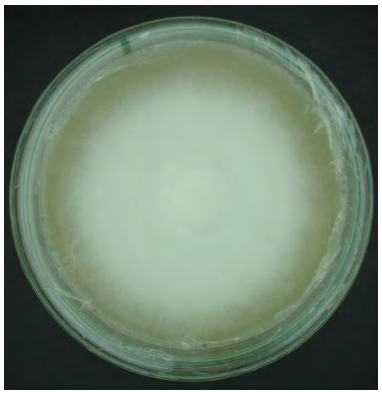
T1 = 0 µl.ml^{-1} (Testigo absoluto); T2 = 10 µl.ml^{-1}; T3= 100µl.ml^{-1}; T4 = 1.000 µl.ml^{-1}; T5 = 10.000µl.ml^{-1}; T6 = 100.000 µl.ml^{-1}.

*Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey 5%).

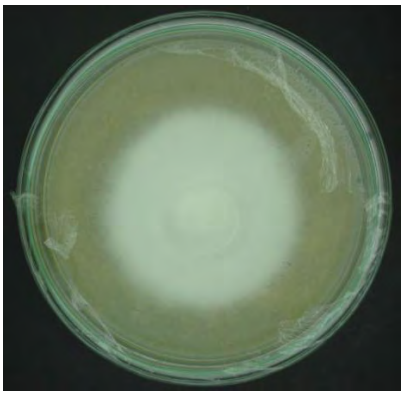
Figura 7. Respuesta de sensibilidad del patógeno *Phytophthora infestans* a nivel *in vitro,* Ensayo 1 (192 horas).



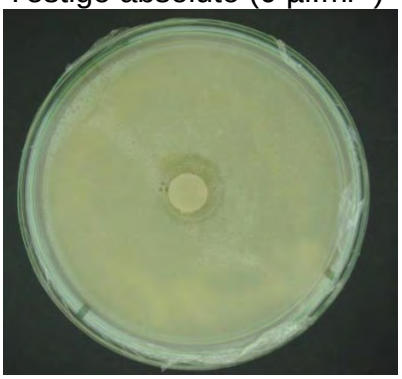
Testigo absoluto (0 µl.ml^{-1})



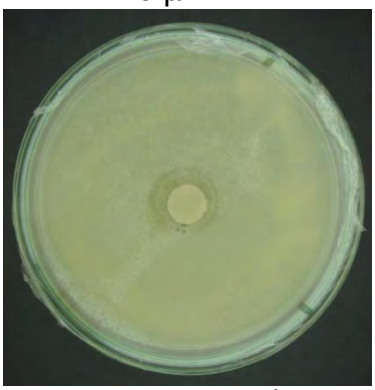
10 µl.ml^{-1}



100 µl.ml^{-1}



1.000 µl.ml^{-1}



10.000 µl.ml^{-1}

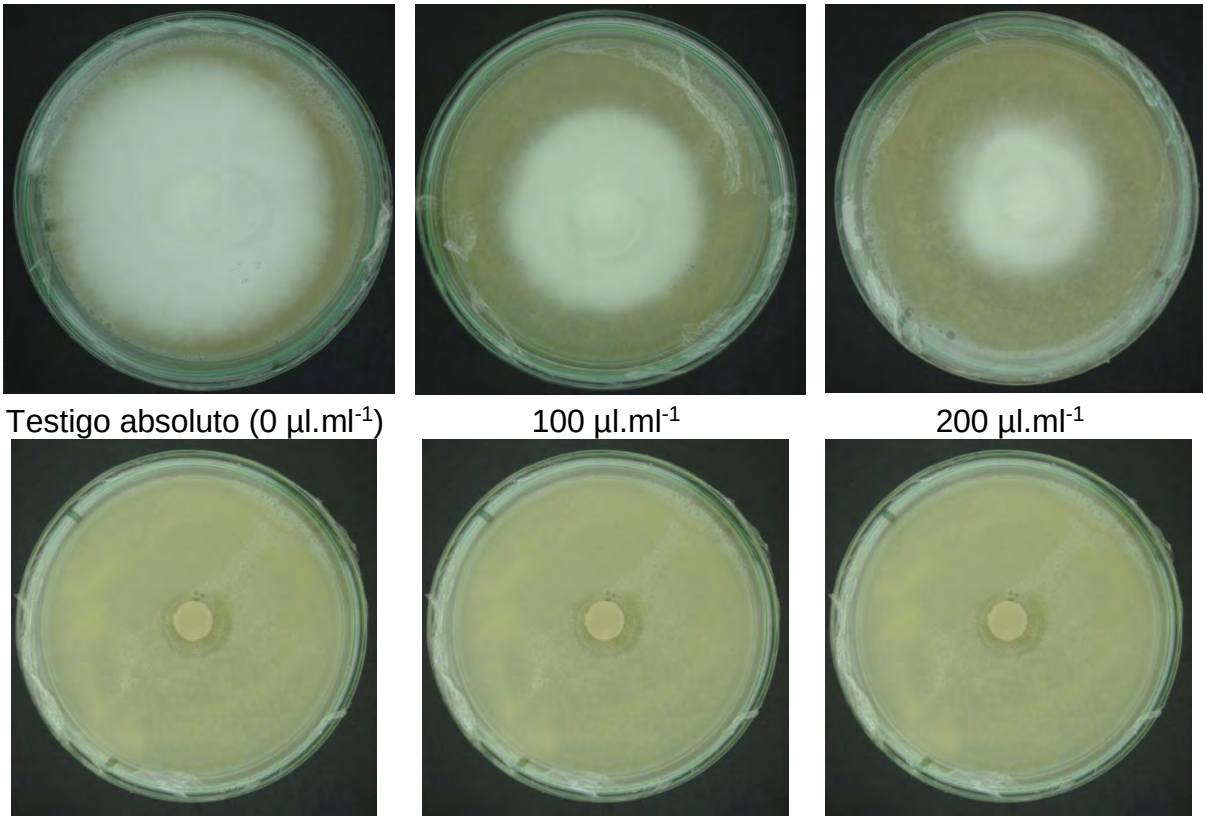
100.000 µl.ml^{-1}

Después de analizar el crecimiento del patógeno *P. infestans* expresado como el diámetro micelial del Ensayo 1, se procedió a explorar un nuevo rango de evaluación comprendido entre la concentración 100 µl.ml^{-1} en la cual se pudo determinar diferencias estadísticas respecto al testigo absoluto (T1) y una concentración de aceite esencial de orégano de 500 µl.ml^{-1}, en la Tabla 6, se describen las relaciones evaluadas para el Ensayo 2.

Tabla 6. Concentraciones de aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*) evaluadas sobre *P. infestans*, Ensayo 2.

Tratamiento	**Concentración A.E. (µl.ml^{-1})**
T1	0
T2	100
T3	200
T4	300
T5	400
T6	500

Figura 8. Respuesta de sensibilidad del patógeno *Phytophthora infestans* a nivel *in vitro,* Ensayo 2 (192 horas).



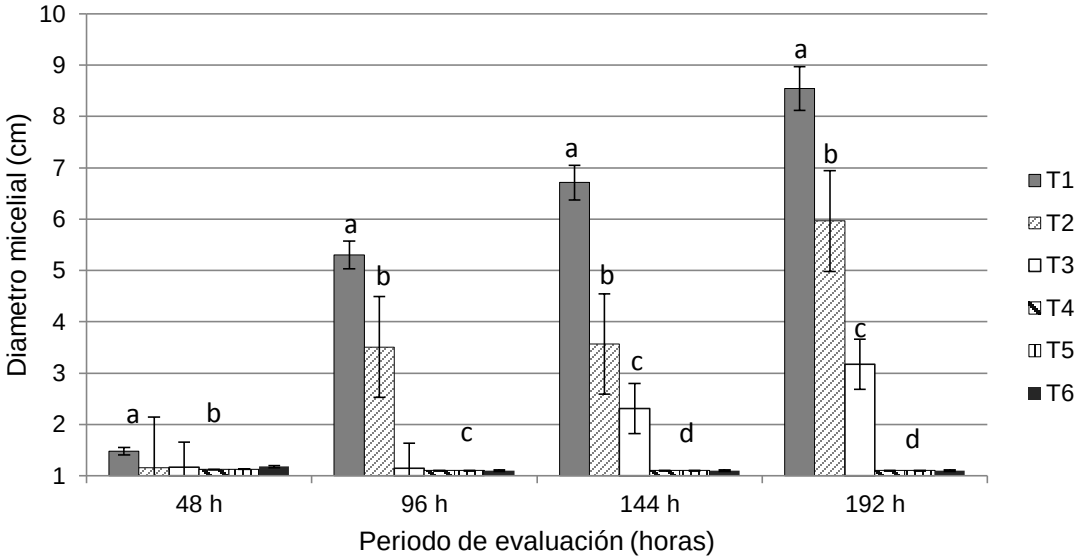
Testigo absoluto (0 µl.ml^{-1}) 100 µl.ml^{-1} 200 µl.ml^{-1}

300 µl.ml^{-1} 400 µl.ml^{-1} 500 µl.ml^{-1}

En el segundo rango de evaluación (Ensayo 2) se determinó que dentro de las relaciones evaluadas, a partir de la concentración 300 µl.ml^{-1} (T4) no fue posible establecer crecimiento micelial aparente en los platos de Petri durante un periodo de 192 horas de evaluación (Gráfico 2 y Figura 8), el tratamiento T2 (100 µl.ml^{-1}) reportó un valor de crecimiento micelial similar al encontrado en el Ensayo 1, confirmando la repetitividad de la metodología empleada.

El Ensayo 2 separó cuatro grupos estadísticos diferentes (Gráfico 2), en donde el testigo absoluto (T1) presentó el mayor valor de crecimiento micelial con 8, 54 cm, seguido del tratamiento T2 (100 µl.ml^{-1}) con 5,96 cm, el tratamiento T3 (200 µl.ml^{-1}) con 3,17 cm; las concentraciones 300, 400 y 500 µl.ml^{-1} no permitieron el crecimiento de *P. infestans* bajo las condiciones de estudio.

Gráfico 2. Crecimiento micelial (cm) del patógeno *Phytophthora infestans* frente al aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*), Ensayo 2*.



T1= 0 µl.ml^{-1} (Testigo absoluto); T2= 100 µl.ml^{-1}; T3= 200 µl.ml^{-1}; T4= 300 µl.ml^{-1}; T5= 400 µl.ml^{-1}; T6 = 500 µl.ml^{-1}.

*Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey 5%).

Finalmente, se exploró un último rango de evaluación (Tabla 7), comprendido entre la concentración 100 µl.ml^{-1} a la concentración 300 µl.ml^{-1}, esta última, propuesta como rango superior con el fin de confirmar los resultados de inhibición obtenidos en el Ensayo 2.

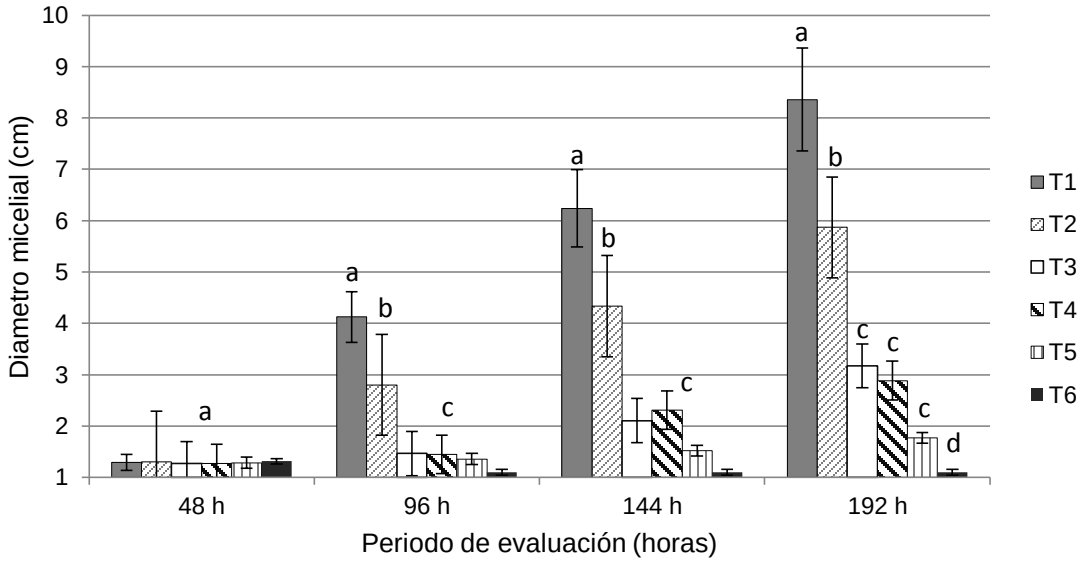
Tabla 7. Concentraciones de aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*) evaluadas sobre *P. infestans*, Ensayo 3.

Tratamiento	Concentración A.E. (µl.ml^{-1})
T1	0
T2	100
T3	150
T4	200
T5	250
T6	300

En la evaluación realizada a las 192 horas después de sembrado el disco de micelio del patógeno *P. infestans* en las unidades experimentales, se determinó que el análisis de crecimiento micelial reporta tres grupos diferenciales, el primero en el cual se encuentra el testigo absoluto (T1) con el valor más alto de crecimiento

micelial con 8,36 cm, un segundo grupo conformado por el tratamiento T2 con un promedio de 5,87 cm, un tercer grupo conformado por los tratamientos T3, T4 y T5 con 3,17, 2,88 y 1,77 cm respectivamente y en un último grupo se ubica el tratamiento T6 al presentar un valor de diámetro micelial de 1,1 cm (cilindro de micelio sembrado) como se observa en el Gráfico 3 y Figura 9.

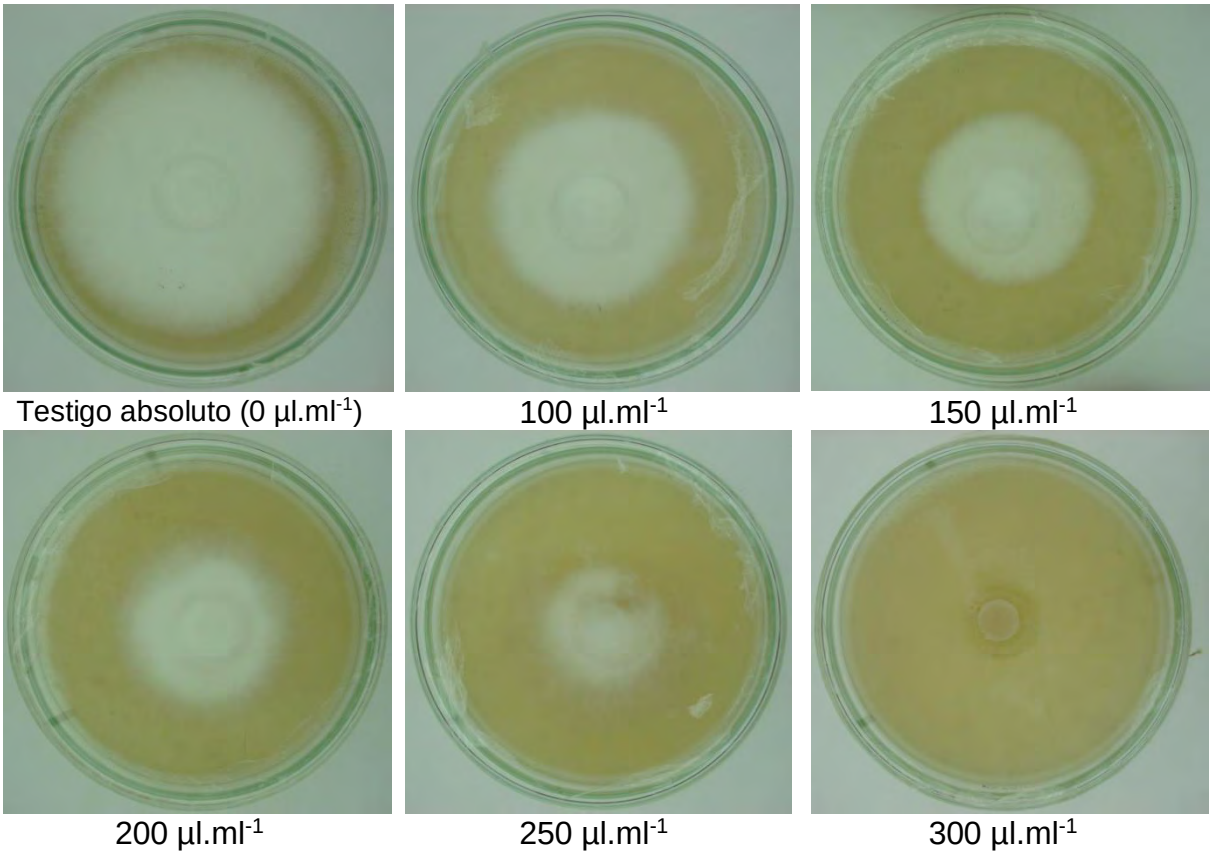
Gráfico 3. Crecimiento micelial (cm) del patógeno *Phytophthora infestans* frente al aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*), Ensayo 3*.



T1= 0 µl.ml^{-1} (Testigo absoluto); T2= 100 µl.ml^{-1}; T3= 150 µl.ml^{-1}; T4= 200 µl.ml^{-1}; T5= 250 µl.ml^{-1}; T6 = 300 µl.ml^{-1}

*Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey 5%).

Figura 9. Respuesta de sensibilidad del patógeno *Phytophthora infestans* a nivel *in vitro,* Ensayo 3 (192 horas).



Testigo absoluto (0 µl.ml^{-1}) | 100 µl.ml^{-1} | 150 µl.ml^{-1}

200 µl.ml^{-1} | 250 µl.ml^{-1} | 300 µl.ml^{-1}

Tabla 8. Resumen del crecimiento micelial (cm) del patógeno *Phytophthora infestans* al aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*).

Tratamiento	Concentración ($\mu l.ml^{-1}$)	Periodo de evaluación			
		48 h	96 h	144 h	192 h
Ensayo 1. Crecimiento micelial (cm)*					
T1	0	1,70 a	4,57 a	6,71 a	8,40 a
T2	10	1,46 a	3,99 a	6,03 a	8,21 a
T3	100	1,60 a	1,80 b	3,57 b	5,96 b
T4	1.000	1,54 a	1,10 c	1,10 c	1,10 c
T5	10.000	1,15 a	1,10 c	1,10 c	1,10 c
T6	100.000	1,10 a	1,10 c	1,10 c	1,10 c
Ensayo 2. Crecimiento micelial (cm)*					
T1	0	1,48 a	5,30 a	6,71 a	8,54 a
T2	100	1,16 b	3,51 b	3,57 b	5,96 b
T3	200	1,16 b	1,14 c	2,31 c	3,17 c
T4	300	1,12 b	1,10 c	1,10 d	1,10 d
T5	400	1,13 b	1,10 c	1,10 d	1,10 d
T6	500	1,18 b	1,10 c	1,10 d	1,10 d
Ensayo 3. Crecimiento micelial (cm)*					
T1	0	1,29 a	4,12 a	6,24 a	8,36 a
T2	100	1,30 a	2,80 b	4,33 b	5,87 b
T3	150	1,27 a	1,46 c	2,10 c	3,17 c
T4	200	1,27 a	1,45 c	2,31 c	2,88 c
T5	250	1,28 a	1,36 c	1,52 c	1,77 c
T6	300	1,31 a	1,10 c	1,10 c	1,10 c

*Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey 5%).

4.1.1.1 Porcentaje de inhibición (PH)

El cálculo de la variable porcentaje de inhibición (PH) del patógeno *Phytophthora infestans* fue determinada teniendo en cuenta los valores de crecimiento micelial obtenidos a las 192 horas, en cada rango de evaluación (Ensayo 1, 2 y 3), las concentraciones duplicadas fueron promediadas entre los ensayos realizados.

El análisis de esta variable determinó una relación positiva entre el porcentaje de inhibición (PH) y el incremento de la dosis de aceite esencial enmendando el medio nutritivo. En los gráficos 1, 2 y 3 así como en la Tabla 9, se puede observar como el patógeno *P. infestans* a nivel *in vitro* presentó un evidente efecto de sensibilidad, representado en el porcentaje de inhibición el cual osciló entre 4% para la concentración más baja evaluada 10 $\mu l.ml^{-1}$ llegando a un porcentaje de inhibición

del 100% a partir de una concentración igual o superiores a 300 µl.ml^{-1} de aceite esencial de orégano.

Tabla 9. Porcentaje de inhibición (PH) del patógeno *Phytophthora infestans* al aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*).

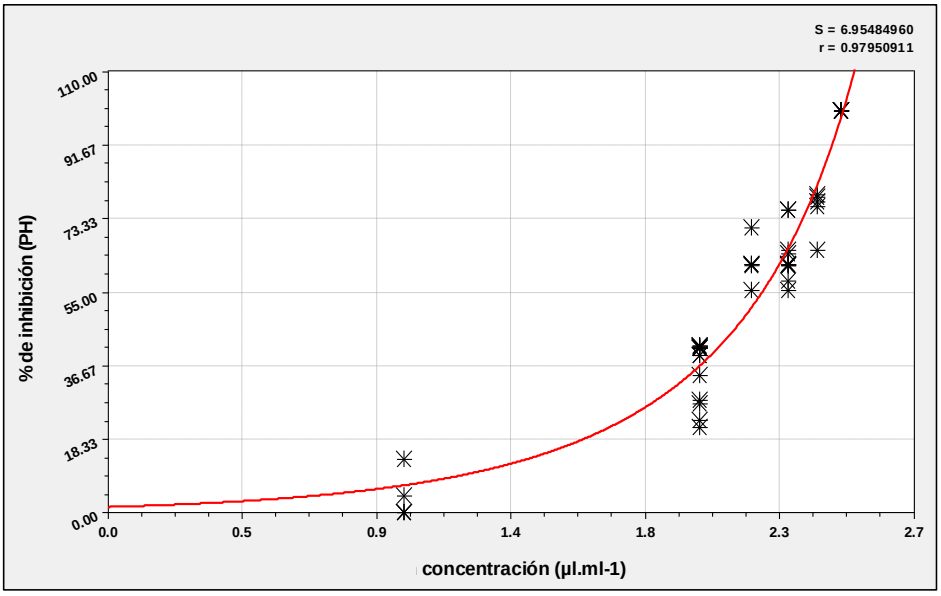
Concentración (µl.ml^{-1})	% inhibición* micelial (PH)	
10	3,54	a
100	29,64	b
150	62,37	c
200	64,09	cd
250	79,00	d
300	100	e
400	100	e
500	100	e
1.000	100	e
10.000	100	e
100.000	100	e
C.V.%	8,1	

*Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey 5%), datos normalizados 2.*arcosen*√x.

4.1.1.2 Concentración efectiva cincuenta (EC_{50})

Para comparar la efectividad biocida del aceite esencial de orégano sobre el patógeno *P. infestans,* se calculó la EC_{50} sobre los valores de porcentaje de inhibición obtenidos en los diferentes, para esto, se ajustó a una curva sigmoidea. Posteriormente, esta curva se linealizó mediante transformación Probit, asumiéndose normalidad para calcular la concentración efectiva cincuenta mediante el software PC-Log Probit (Camacho, 1991). Con estos datos se obtuvo una recta de regresión lineal con ecuación y= (17,3.*X*) - 21,93 con un coeficiente de determinación (r) de 97,95% (Gráfico 4) y un valor de EC_{50} de 138,81µl.ml^{-1} de aceite esencial de orégano silvestre (60,7% timol).

Gráfico 4. Evaluación de la concentración efectiva cincuenta (EC_{50}) del patógeno *Phytophthora infestans.*



4.1.1.3 Concentración mínima inhibitoria (MCI)

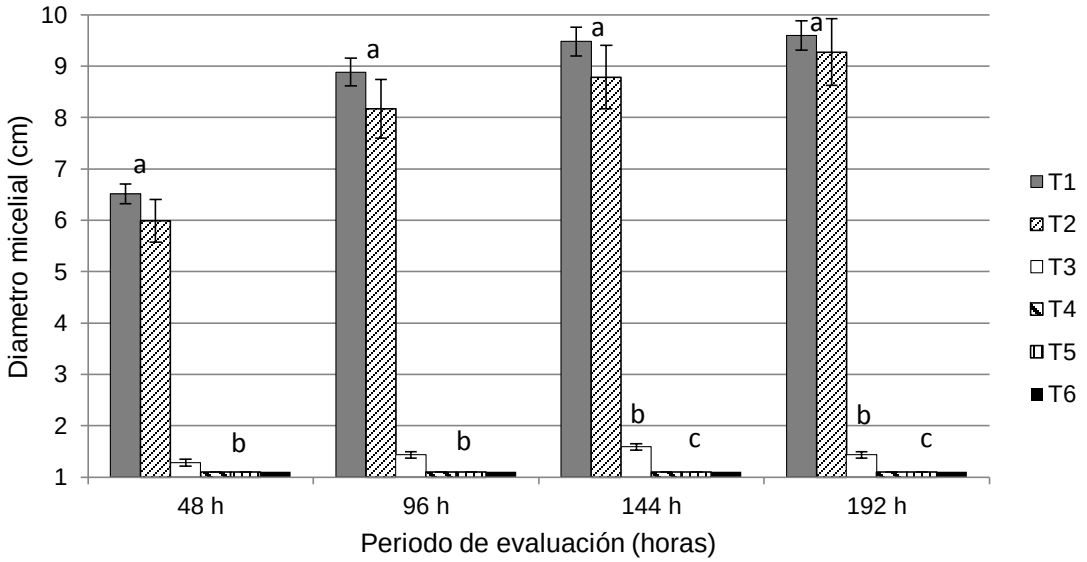
En cada intervalo de concentraciones de aceite esencial evaluadas (Ensayo 1, 2 y 3), se buscó determinar la relación en la cual la inhibición en el crecimiento micelial del patógeno a nivel *in vitro* sea igual al 100%. Bajo las condiciones propuestas en la presente investigación se estableció un valor de concentración mínima inhibitoria (MCI) para *P. infestans* en 300 µl.ml^{-1} de aceite esencial de *Lippia origanoides* como se describe en la Tabla 9.

4.1.2 Crecimiento de *Rhizoctonia solani*

Se cuantificó la respuesta en el crecimiento micelial del patógeno *R. solani* inicialmente bajo las concentraciones: 10, 100, 1.000, 10.000 y 100.000 µl.ml^{-1} de aceite esencial de orégano, determinándose como Ensayo 1.

El análisis de esta variable determinó que *R. solani* presenta alta sensibilidad al aceite esencial, evidenciándose que a partir de la concentración 100 µl.ml^{-1} (T3) se encuentran diferencias estadísticas respecto al testigo absoluto (T1) el cual llegó a presentar un crecimiento micelial a las 192 horas de 9,60 cm, ocupando la totalidad del plato de Petri (Figura 10). Las concentraciones superiores evaluadas (T4 – T6) no permitieron el crecimiento del hongo bajo ningún tiempo de evaluación (Gráfico 5.).

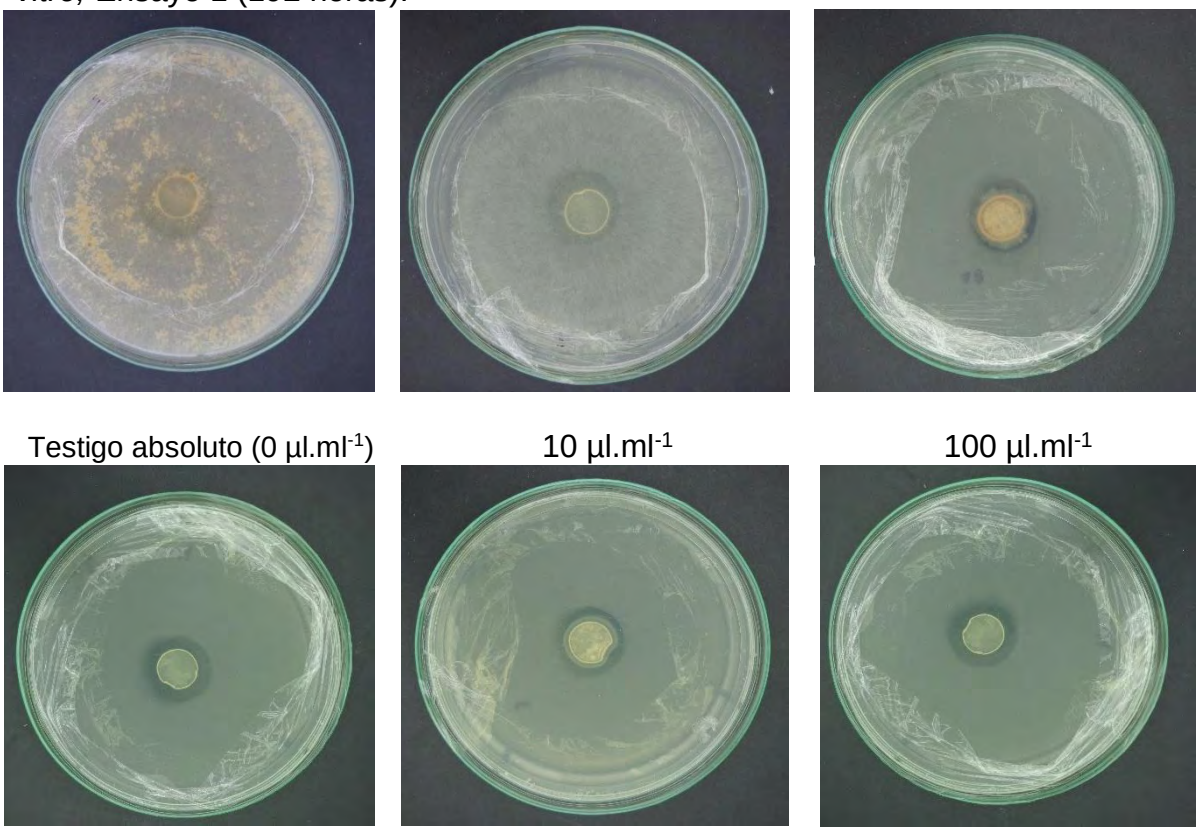
Gráfico 5. Crecimiento micelial (cm) del patógeno *Rhizoctonia solani* frente al aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*), Ensayo 1*.



T1 = 0 µl.ml^{-1} (Testigo absoluto); T2 = 10 µl.ml^{-1}; T3= 100 µl.ml^{-1}; T4 = 1.000 µl.ml^{-1}; T5 = 10.000 µl.ml^{-1}; T6 = 100.000 µl.ml^{-1}

*Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey 5%).

Figura 10. Respuesta de sensibilidad del patógeno *Rhizoctonia solani* a nivel *in vitro,* Ensayo 1 (192 horas).



Testigo absoluto (0 µl.ml^{-1}) | 10 µl.ml^{-1} | 100 µl.ml^{-1}

1.000 µl.ml^{-1} | 10.000 µl.ml^{-1} | 100.000 µl.ml^{-1}

A partir de los resultados obtenidos en el Ensayo 1, se procedió a determinar un nuevo rango de exploración de la actividad antifúngica del aceite esencial de orégano ajustado para el patógeno *R. solani,* por lo tanto, se determinó evaluar concentraciones crecientes del aceite esencial entre 80 µl.ml^{-1} y 100 µl.ml^{-1} como se describen en la Tabla 10.

Tabla 10. Concentraciones de aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*) evaluadas sobre *R. solani*, Ensayo 2.

Tratamiento	**Concentración A.E. (µl.ml^{-1})**
T1	0
T2	80
T3	85
T4	90
T5	95
T6	100

Los resultados del Ensayo 2, determinaron que los valores en el diámetro micelial a través de los diferentes tiempos de evaluación, separan estadísticamente al testigo absoluto (T1) de los tratamientos con aceite esencial (T2 – T6). El análisis realizado a las 192 horas, estableció que a partir de la concentración 100 µl.ml^{-1} de aceite se obtuvo el menor diámetro micelial con 1,69 cm en relación a 9,6 cm del comparador absoluto (0 µl.ml^{-1}) el cual nuevamente completó bajo este tiempo de evaluación el área total del plato de Petri (Figura 11).

Es relevante indicar que en este ensayo, se presentó un cambio evidente en la coloración así como en la forma de crecimiento micelial del patógeno *R. solani* explicado posiblemente por la acción biocida del aceite esencial de orégano sobre el micelio del micro organismo (Figura 11).

Figura 11. Respuesta de sensibilidad del patógeno *Rhizoctonia solani* a nivel *in vitro,* Ensayo 2 (192 horas).

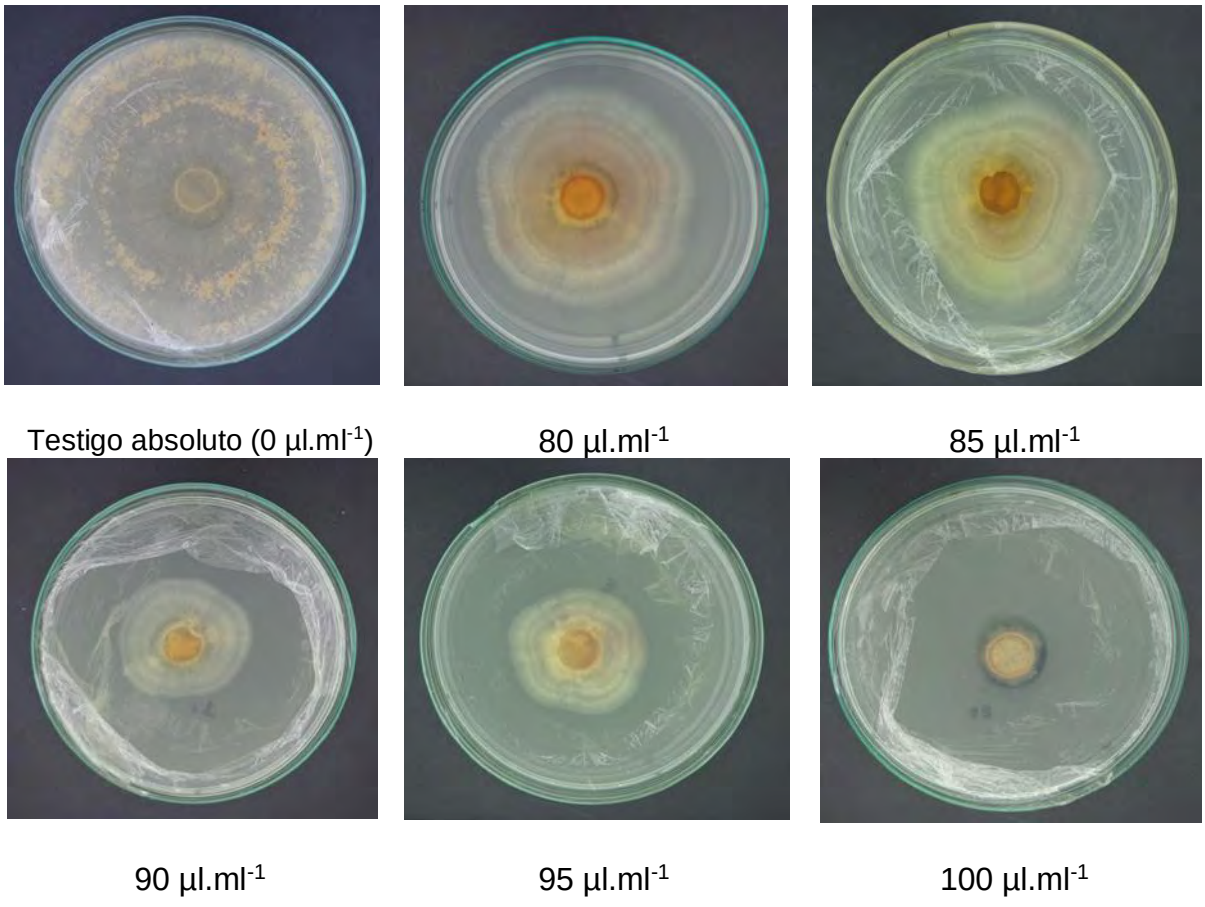
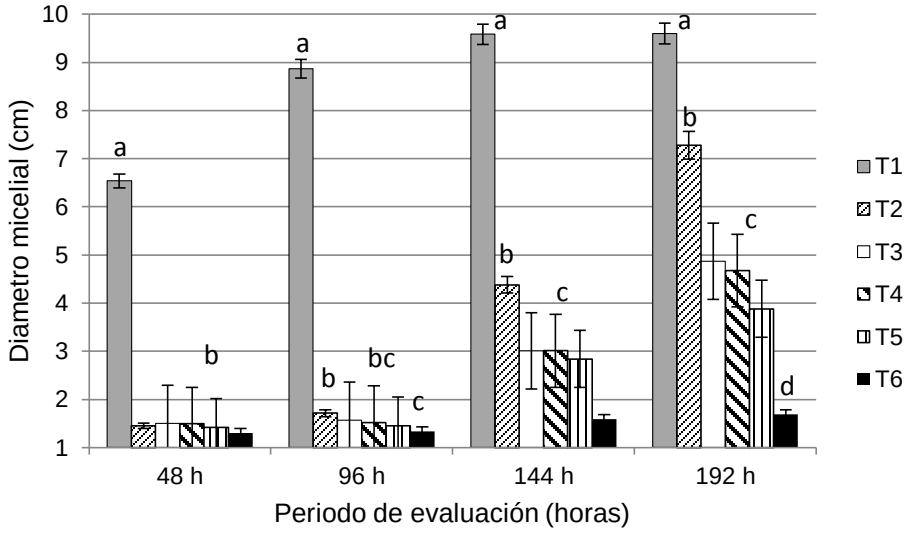


Gráfico 6. Crecimiento micelial (cm) del patógeno *Rhizoctonia solani* frente al aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*), Ensayo 2*.



T1 = 0 µl.ml^{-1} (Testigo absoluto); T2 = 80 µl.ml^{-1}; T3= 85µl.ml^{-1}; T4 = 90 µl.ml^{-1}; T5 = 95µl.ml^{-1}; T6 = 100 µl.ml^{-1}

*Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey 5%).

El Ensayo 3 fue establecido usando las concentraciones 100, 110, 120, 130 y 140 µl.ml^{-1} de aceite esencial de *L. origanoides* enmendando el medio de cultivo PDA con el fin de encontrar la mínima relación de aceite esencial de orégano en la cual el patógeno *R. solani* no pudiese desarrollarse a nivel *in vitro* durante un periodo de evaluación de 192 (Tabla 11).

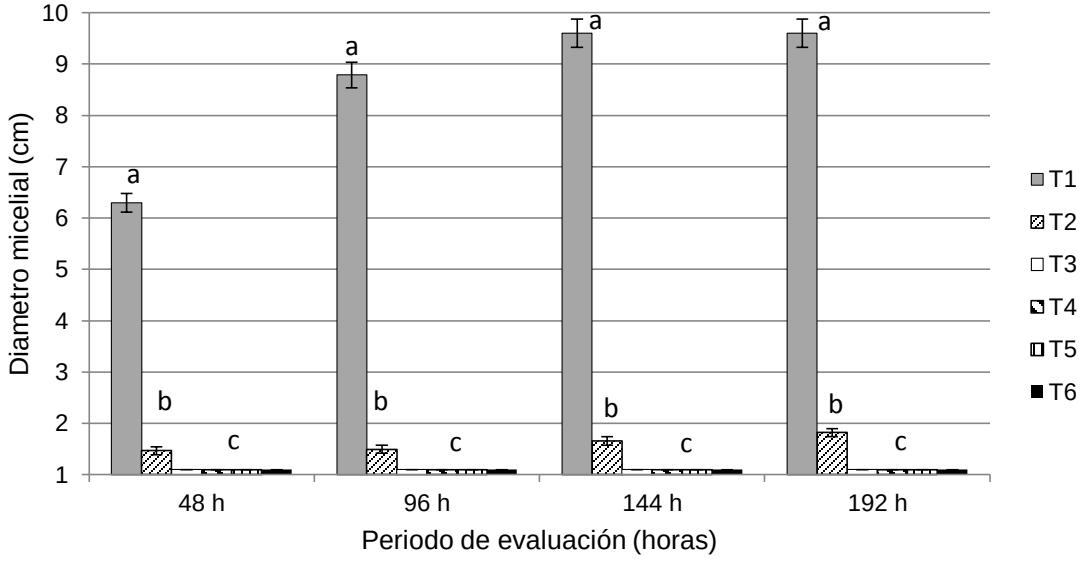
Tabla 11. Concentraciones de aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*) evaluadas sobre *R. solani*, Ensayo 3.

Tratamiento	Concentración A.E. (µl.ml^{-1})
T1	0
T2	100
T3	110
T4	120
T5	130
T6	140

Al analizar los valores de crecimiento micelial de *R. solani* en el tercer ensayo, se ratifica la tendencia de crecimiento observada en los anteriores rangos de

evaluación, reportando valores similares para la concentración 100 µl.ml^{-1} (T2) con 1,82 cm, siendo este, el máximo crecimiento del patógeno a nivel *in vitro* ya que a partir de una concentración de 110 µl.ml^{-1} de aceite esencial de orégano (T3) se observa inhibición en el crecimiento de *Rhizoctonia solani* (Gráfico 7 y Figura 12).

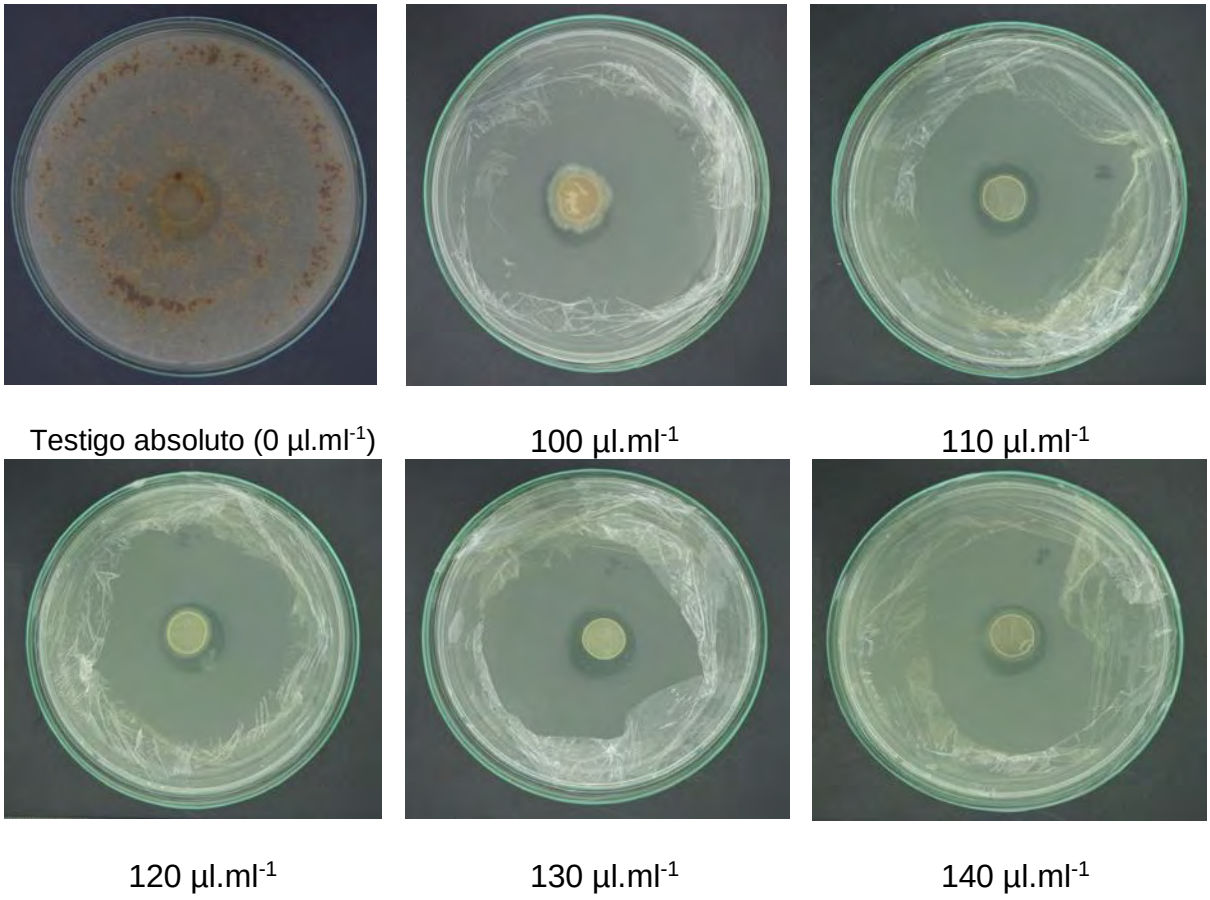
Gráfico 7. Crecimiento micelial (cm) del patógeno *Rhizoctonia solani* frente al aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*), Ensayo 3*.



T1 = 0 µl.ml^{-1} (Testigo absoluto); T2 = 100 µl.ml^{-1}; T3= 110 µl.ml^{-1}; T4 = 120 µl.ml^{-1}; T5 = 130µl.ml^{-1}; T6 = 140 µl.ml^{-1}

*Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey 5%).

Figura 12. Respuesta de sensibilidad del patógeno *Rhizoctonia solani* a nivel *in vitro,* Ensayo 3 (192 horas).



Testigo absoluto (0 µl.ml^{-1}) | 100 µl.ml^{-1} | 110 µl.ml^{-1}

120 µl.ml^{-1} | 130 µl.ml^{-1} | 140 µl.ml^{-1}

Tabla 12. Resumen del crecimiento micelial (cm) del patógeno *Rhizoctonia solani* al aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*).

Tratamiento	Concentración ($\mu l.ml^{-1}$)	Periodo de evaluación			
		48 h	96 h	144 h	192 h
Ensayo 1. Crecimiento micelial (cm)*					
T1	0	6,51 a	8,89 a	9,48 a	9,60 a
T2	10	5,99 a	8,17 a	8,79 a	9,27 a
T3	100	1,28 b	1,43 b	1,59 b	1,43 b
T4	1.000	1,10 b	1,10 b	1,10 c	1,10 c
T5	10.000	1,10 b	1,10 b	1,10 c	1,10 c
T6	100.000	1,10 b	1,10 b	1,10 c	1,10 c
Ensayo 2. Crecimiento micelial (cm)*					
T1	0	6,54 a	8,87 a	9,58 a	9,60 a
T2	80	1,45 b	1,71 b	4,38 b	7,28 b
T3	85	1,50 b	1,57 bc	3,01 c	4,87 c
T4	90	1,50 b	1,52 bc	3,01 c	4,46 c
T5	95	1,42 b	1,45 bc	2,84 c	3,88 c
T6	100	1,31 b	1,34 c	1,59 d	1,69 d
Ensayo 3. Crecimiento micelial (cm)*					
T1	0	6,30 a	8,78 a	9,60 a	9,60 a
T2	100	1,47 b	1,50 b	1,66 b	1,82 b
T3	110	1,10 c	1,10 c	1,10 c	1,10 c
T4	120	1,10 c	1,10 c	1,10 c	1,10 c
T5	130	1,10 c	1,10 c	1,10 c	1,10 c
T6	140	1,10 c	1,10 c	1,10 c	1,10 c

*Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey 5%).

4.1.2.1 Porcentaje de inhibición (PH)

A partir de la fórmula de Vaillant *et al.* (2009) se calculó el valor de porcentaje de inhibición (PH) del patógeno *R. solani* para cada concentración de aceite esencial evaluada, para esto, se asumió los valores de crecimiento micelial reportados en los tres ensayos en el último periodo de evaluación (192 h).

En la Tabla 13, se observa la tendencia obtenida con la adición del extracto esencial de orégano silvestre y el porcentaje de inhibición micelial a nivel *in vitro* del patógeno, indicando que a partir de la concentración 10 $\mu l.ml^{-1}$ la proporción más baja del aceite esencial evaluada, se presenta una disminución en el crecimiento de *R. solani* del 3,39% en relación al testigo absoluto y que se incrementa a 82,84% en la concentración 100 $\mu l.ml^{-1}$, a partir de la concentración inmediatamente superior 110 $\mu l.ml^{-1}$ el porcentaje de inhibición encontrado es del 100%.

Tabla 13. Porcentaje de inhibición (PH) del patógeno *Rhizoctonia solani* al aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*).

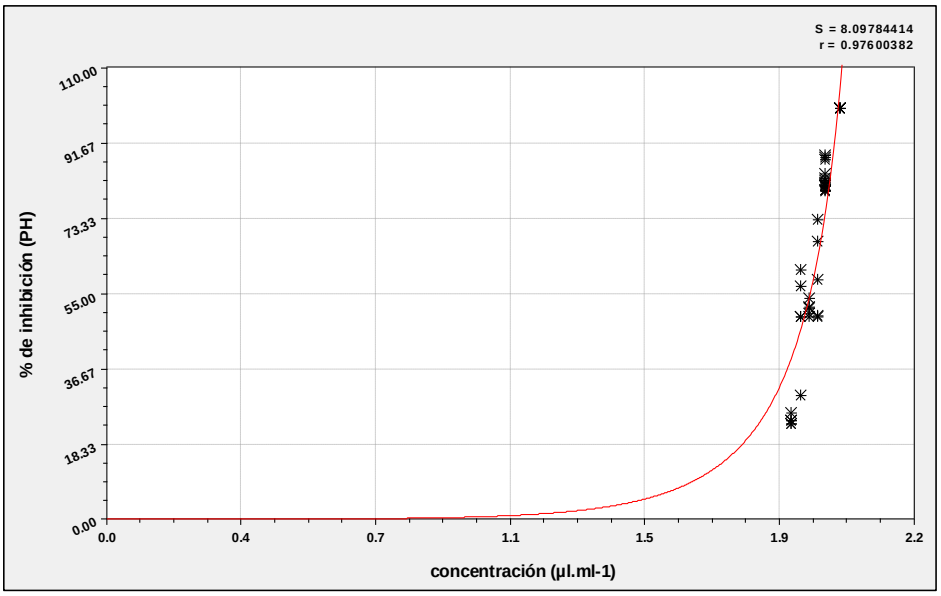
Concentración ($\mu l.ml^{-1}$)	% inhibición* micelial (PH)	
10	3,39	a
80	24,16	b
85	49,30	c
90	51,32	cd
95	59,57	d
100	82,84	e
110	100	f
120	100	f
130	100	f
140	100	f
1.000	100	f
10.000	100	f
100.000	100	f
C.V.%	4,22	

*Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey 5%), datos normalizados 2.*arcosen*√x.

4.1.2.2 Concentración efectiva cincuenta (EC_{50})

Para el cálculo del valor de EC_{50} del patógeno *R. solani* se usó el porcentaje de inhibición obtenido en las concentraciones 10, 80, 85, 90, 95, 100 y 110 $\mu l.ml^{-1}$ de aceite esencial en los diferentes ensayos (Ensayos 1, 2 y 3). Siguiendo la metodología propuesta en esta investigación se ajustó la curva de inhibición micelial a una relación sigmoidea. Posteriormente, esta curva se linealizó mediante transformación Probit, asumiéndose normalidad para calcular la concentración efectiva cincuenta mediante el software PC-Log Probit (Camacho, 1991). Con estos datos se obtuvo una recta de regresión lineal con ecuación y= (453,37.*X*) - 830,63 con un coeficiente de determinación (r) de 97,60% (Gráfico 8), a partir de este análisis, se determinó para *R. Solani* un valor de EC_{50} de 88,94 $\mu l.ml^{-1}$ de aceite esencial de orégano silvestre (60,7% timol).

Gráfico 8. Evaluación de la concentración efectiva cincuenta (EC_{50}) del patógeno *Rhizoctonia solani*



4.1.2.3 Concentración mínima inhibitoria (MCI)

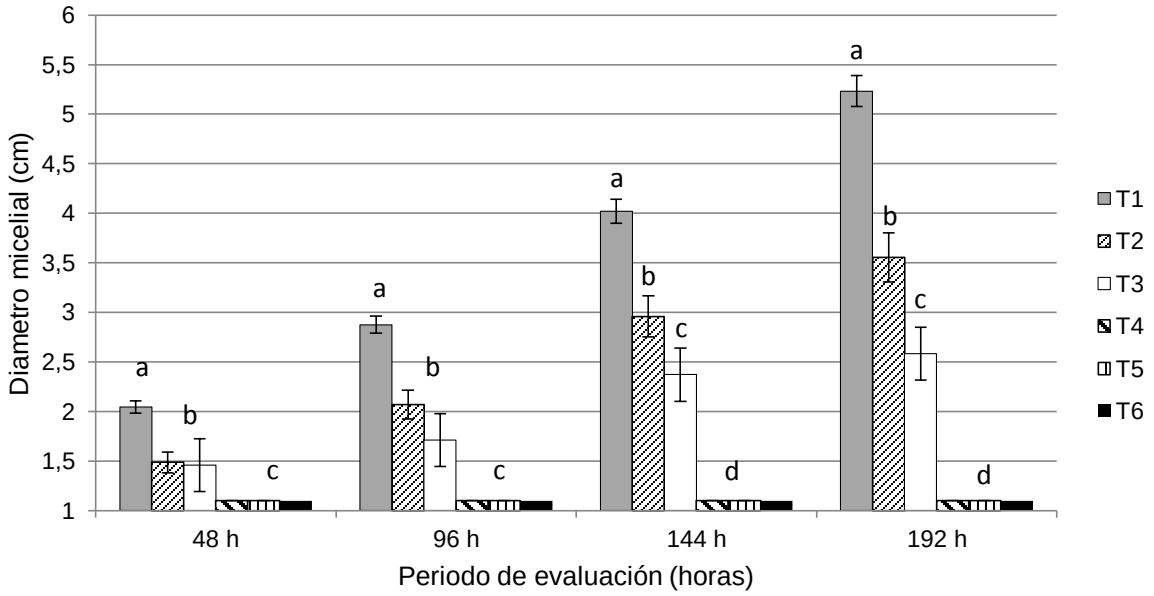
En cada intervalo de concentraciones de aceite esencial evaluadas (Ensayo 1, 2 y 3) se buscó determinar la relación en la cual el crecimiento micelial del patógeno a nivel *in vitro* sea igual a cero, bajo un periodo de evaluación de 192 horas. El tercer ensayo, determinó que la concentración 110 $\mu l.ml^{-1}$ de aceite esencial causa un porcentaje de inhibición del 100% bajo las condiciones de experimentación, proponiéndose como MCI para este micro organismo.

4.1.3 Crecimiento de *Alternaria solani*

La estimación del crecimiento micelial del patógeno *Alternaria solani* a la aplicación del aceite esencial de orégano silvestre, se desarrolló de manera equivalente a los anteriores microorganismos evaluados (*P. infestans* y *R. solani*), a partir del Ensayo 1 se ajustaron las concentraciones del extracto esencial para determinar la mínima concentración letal a nivel *in vitro.*

Usando la técnica de dilución en agar, el Ensayo 1 ratificó el comportamiento encontrado con los demás fitopatógenos, en donde concentraciones iguales o superiores a 1.000 µl.ml^{-1} de aceite esencial limita el crecimiento de los microorganismos totalmente (Figura 13); las concentraciones 10 µl.ml^{-1} (T2) y 100 µl.ml^{-1} (T3) de aceite presentaron una respuesta estadística diferente al Testigo absoluto, reportando un crecimiento a las 192 horas de 3,23 y 3,56 cm respectivamente, aún la concentración más baja evaluada (T2) causó disminución en el crecimiento de *A. Solani.* El testigo absoluto reportó un crecimiento de 5,23 cm en el mismo periodo de evaluación (Gráfico 9.).

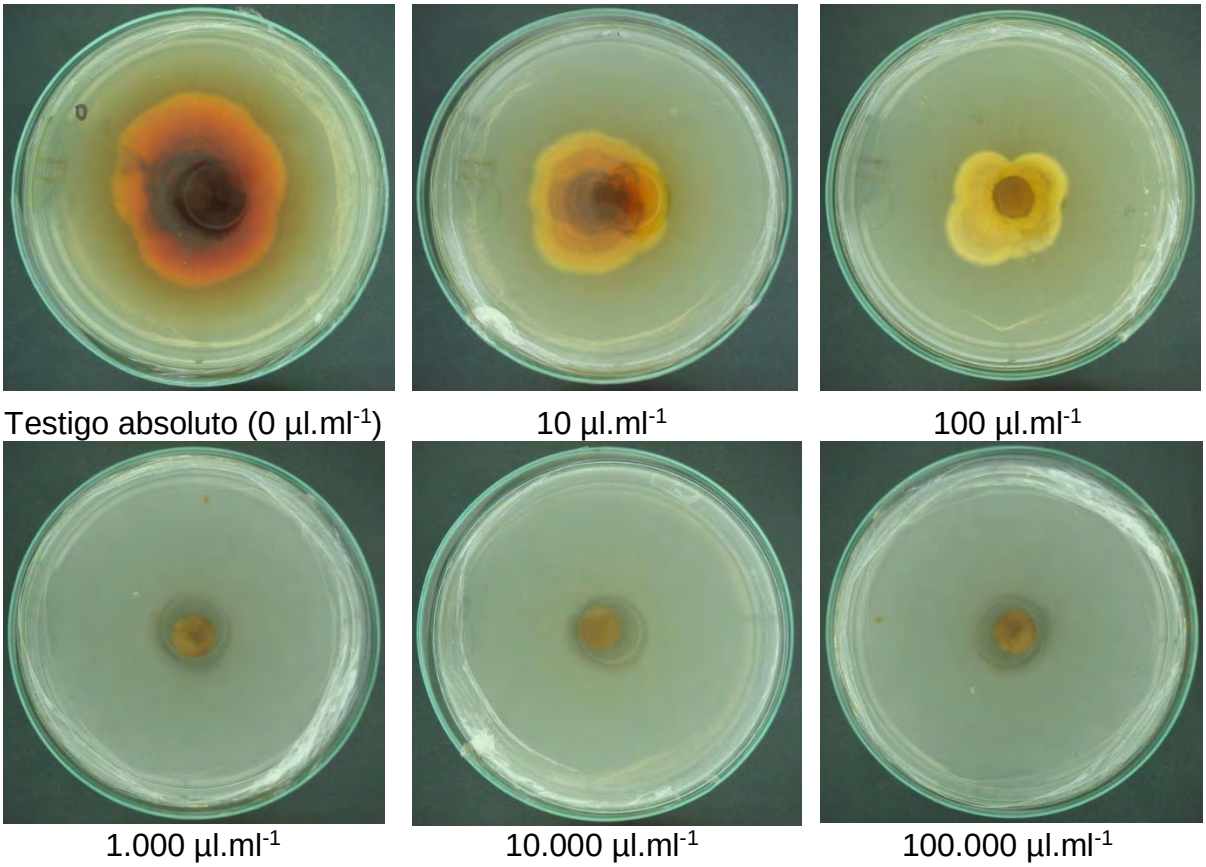
Gráfico 9. Crecimiento micelial (cm) del patógeno *Alternaria solani* frente al aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*), Ensayo 1*.



T1 = 0 µl.ml^{-1} (Testigo absoluto); T2 = 10 µl.ml^{-1}; T3= 100 µl.ml^{-1}; T4 = 1.000 µl.ml^{-1}; T5 = 10.000 µl.ml^{-1}; T6 = 100.000 µl.ml^{-1}

*Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey 5%).

Figura 13. Respuesta de sensibilidad del patógeno *Alternaria solani* a nivel *in vitro,* Ensayo 1 (192 horas).



Testigo absoluto (0 µl.ml^{-1}) 10 µl.ml^{-1} 100 µl.ml^{-1}

1.000 µl.ml^{-1} 10.000 µl.ml^{-1} 100.000 µl.ml^{-1}

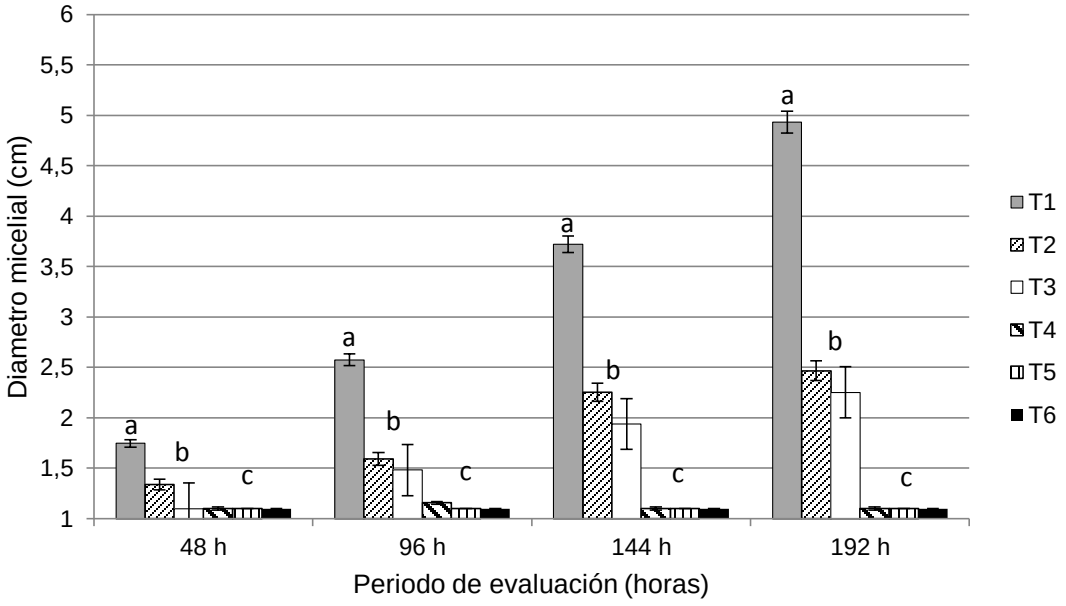
Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el Ensayo 1, sumado a los resultados derivados de los demás patógenos evaluados, se procedió a evaluar un rango entre 100 µl.ml^{-1} y 500 µl.ml^{-1} de aceite esencial de orégano silvestre, mediante las concentraciones descritas en la Tabla 14.

Tabla 14. Concentraciones de aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*) evaluadas sobre *A. solani*, Ensayo 2.

Tratamiento	**Concentración A.E. (µl.ml^{-1})**
T1	0
T2	100
T3	200
T4	300
T5	400
T6	500

El segundo ensayo mostró un comportamiento diferencial del testigo absoluto (T1) con respecto a las demás concentraciones de aceite esencial evaluadas (Gráfico 10); las concentraciones 100 y 200 µl.ml^{-1} formaron un grupo estadístico con baja respuesta de sensibilidad del patógeno *A. solani* con un crecimiento de 2,47 y 2,25 cm respectivamente; las concentraciones 300, 400 y 500 µl.ml^{-1} de aceite esencial no permitieron el crecimiento *in* vitro del fitopatógeno, formando un grupo estadístico igualmente diferente, siendo preciso evaluar un nuevo ensayo con concentraciones de aceite inferiores a 300 µl.ml^{-1} (Gráfico 10) para determinar el valor de MCI.

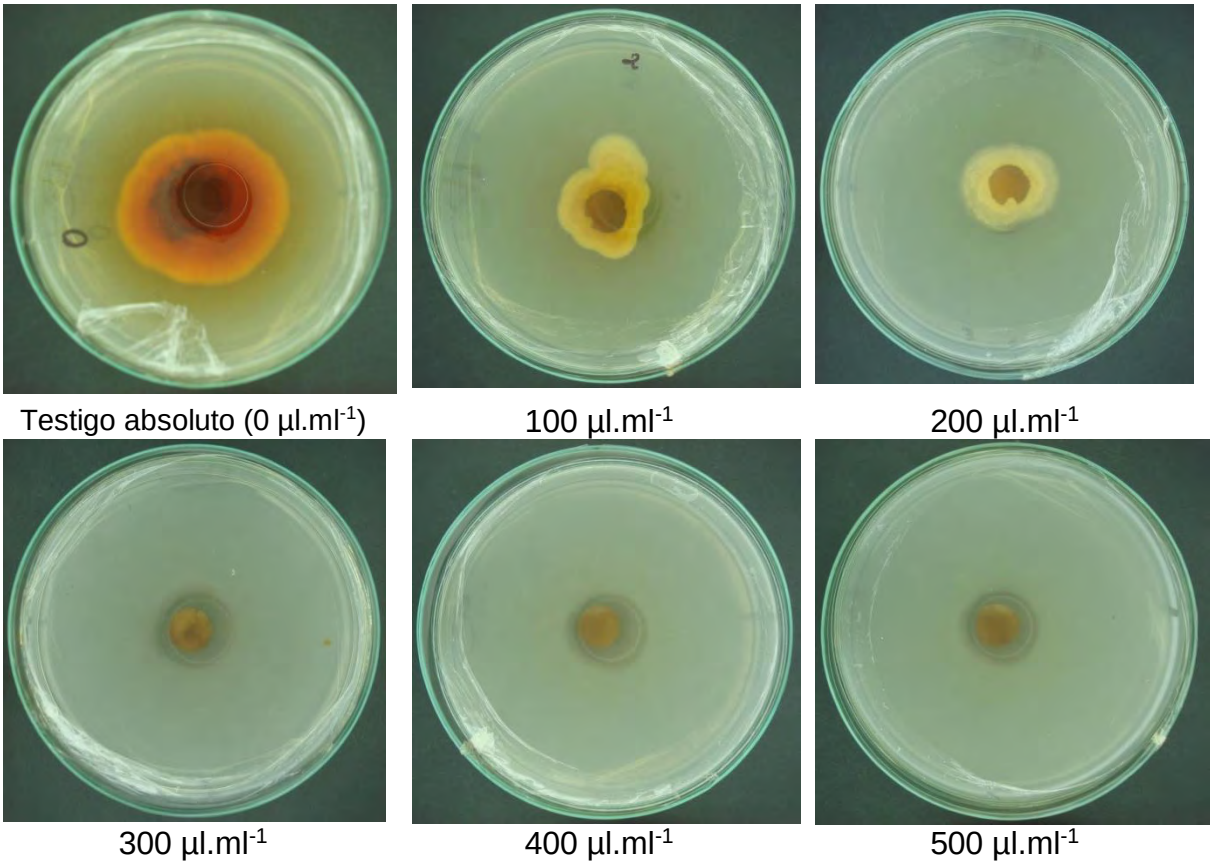
Gráfico 10. Crecimiento micelial (cm) del patógeno *Alternaria solani* frente al aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*), Ensayo 2*.



T1 = 0 µl.ml^{-1} (Testigo absoluto); T2 = 100 µl.ml^{-1}; T3= 200 µl.ml^{-1}; T4 = 300 µl.ml^{-1}; T5 = 400 µl.ml-^{1}; T6 = 500 µl.ml^{-1}.

*Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey 5%).

Figura 14. Respuesta de sensibilidad del patógeno *Alternaria solani* a nivel *in vitro,* Ensayo 2 (192 horas).



Testigo absoluto (0 µl.ml^{-1}) | 100 µl.ml^{-1} | 200 µl.ml^{-1}

300 µl.ml^{-1} | 400 µl.ml^{-1} | 500 µl.ml^{-1}

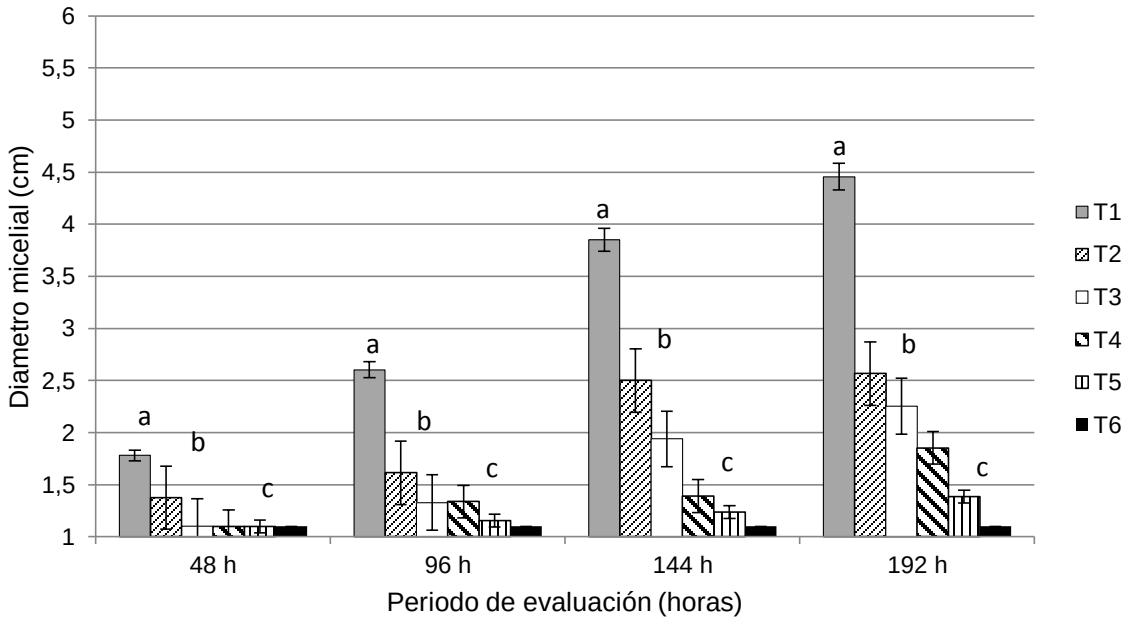
Tabla 15. Concentraciones de aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*) evaluadas sobre *A. solani*, Ensayo 3.

Tratamiento	**Concentración A.E. (µl.ml^{-1})**
T1	0
T2	100
T3	150
T4	200
T5	250
T6	300

En la Tabla 15. se describen el comportamiento de los tratamientos evaluados en el Ensayo 3 del fitopatógeno *Alternaria solani*, los resultados obtenidos a las 192

horas de evaluación dieron como producto dos grupos estadísticos diferentes al testigo absoluto (T1), en donde las concentraciones 100 y 150 µl.ml^{-1}(T2 y T3) presentaron un comportamiento similar estadísticamente con un valor de crecimiento micelial de 2,57 y 2,25 cm respectivamente. Los tratamientos 200 y 250 µl.ml^{-1} (T4 y T5) con un promedio de crecimiento de 1,85 y 1,38 cm formaron un grupo estadístico diferente, al igual que el tratamiento 300 µl.ml^{-1} (T6) la máxima concentración evaluada y en la cual no fue posible visualizar crecimiento del patógeno durante el periodo de evaluación (Gráfico 11 y Figura 15).

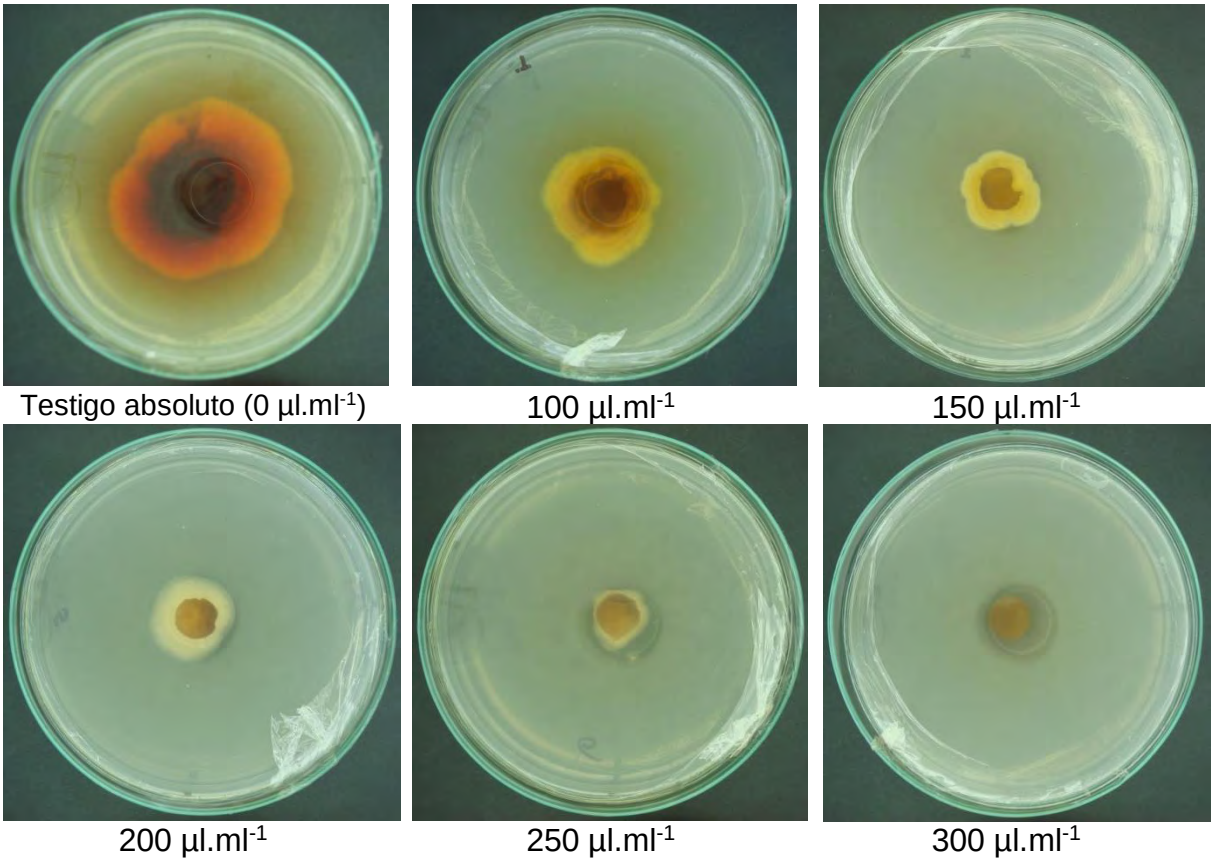
Gráfico 11. Crecimiento micelial (cm) del patógeno *Alternaria solani* frente al aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*), Ensayo 3*.



T1 = 0 µl.ml^{-1} (Testigo absoluto); T2 = 100 µl.ml^{-1}; T3= 150 µl.ml^{-1}; T4 = 200 µl.ml^{-1}; T5 = 250 µl.ml-^{1}; T6 = 300 µl.ml^{-1}

*Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey 5%).

Figura 15. Respuesta de sensibilidad del patógeno *Alternaria solani* a nivel *in vitro,* Ensayo 3 (192 horas).



Testigo absoluto (0 µl.ml^{-1}) | 100 µl.ml^{-1} | 150 µl.ml^{-1}

200 µl.ml^{-1} | 250 µl.ml^{-1} | 300 µl.ml^{-1}

Tabla 16. Resumen del crecimiento micelial (cm) del patógeno *Alternaria solani* al aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*).

Tratamiento	Concentración ($\mu l.ml^{-1}$)	Periodo de evaluación			
		48 h	96 h	144 h	192 h
Ensayo 1. Crecimiento micelial (cm)*					
T1	0	2,05 a	2,88 a	4,02 a	5,23 a
T2	10	1,49 b	2,07 b	2,96 b	3,56 b
T3	100	1,46 b	1,71 b	2,37 c	2,59 c
T4	1.000	1,10 c	1,10 c	1,10 d	1,10 d
T5	10.000	1,10 c	1,10 c	1,10 d	1,10 d
T6	100.000	1,10 c	1,10 c	1,10 d	1,10 d
Ensayo 2. Crecimiento micelial (cm)*					
T1	0	1,75a	2,58 a	3,72 a	4,93 a
T2	100	1,34b	1,59 b	2,25 b	2,47 b
T3	200	1,10c	1,48 b	1,94 b	2,25 b
T4	300	1,10c	1,16 c	1,10 c	1,10 c
T5	400	1,10c	1,10 c	1,10 c	1,10 c
T6	500	1,10c	1,10 c	1,10 c	1,10 c
Ensayo 3. Crecimiento micelial (cm)*					
T1	0	1,78a	2,60 a	3,85 a	4,46 a
T2	100	1,37b	1,62 b	2,50 b	2,57 b
T3	150	1,10c	1,33 c	1,94 c	2,25 b
T4	200	1,10c	1,34 c	1,39 d	1,85 c
T5	250	1,10c	1,16 c	1,24 d	1,38 c
T6	300	1,10c	1,10 c	1,10 d	1,10 c

*Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey 5%).

4.1.3.1 Porcentaje de inhibición (PH)

Usando los valores de crecimiento micelial del fitopatógeno *Alternaria solani* obtenidos a las 192 horas de evaluación en los Ensayos 1, 2 y 3, se procedió a realizar el cálculo del porcentaje de inhibición (PH) usando la fórmula propuesta por Vaillant *et al.* (2009) relacionando el crecimiento del testigo absoluto (T1) y las diferentes concentraciones del aceite esencial de *L. origanoides*.

En la Tabla 16 se resume el promedio de inhibición micelial obtenido en cada tratamiento, a partir de la concentración 10 $\mu l.ml^{-1}$ concentración más baja probada (Ensayo 1) se inhibe el crecimiento de *A. solani* en 23,21%; a partir de esta, el incremento de aceite esencial en una proporción de 50 $\mu l.ml^{-1}$ incrementa en $\pm$7,66% el valor de inhibición micelial (PH), dando como resultado diferencias estadísticas en cada tratamiento evaluado. El máximo valor de inhibición se reporta

cuando se emplearon concentraciones superiores a 300 µl.ml^{-1} de aceite esencial de orégano silvestre (Tabla 17).

Tabla 17. Porcentaje de inhibición (PH) del patógeno *Alternaria solani* al aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*).

Concentración (µl.ml^{-1})	% inhibición* micelial (PH)	
10	23,21	a
100	49,50	b
150	55,21	b
200	63,15	c
250	72,48	d
300	100	e
400	100	e
500	100	e
1000	100	e
10000	100	e
100000	100	e
C.V.%	4,06	

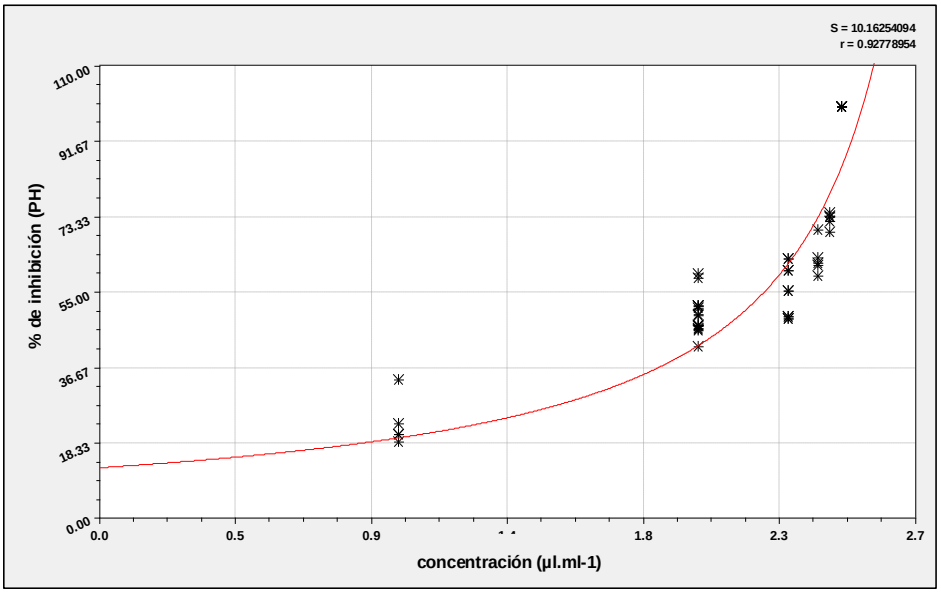
*Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey 5%), datos normalizados 2.*arcosen*√x.

4.1.3.2 Concentración efectiva cincuenta (EC_{50})

Compilados los valores de porcentaje de inhibición (PH) del fitopatógeno *Alternaria solani* obtenidos de los ensayos antes mencionados (Ensayo 1, 2 y 3), se procedió a realizar el análisis Probit de la curva de inhibición bajo las diferentes concentraciones evaluadas, se asumió la normalidad de los datos y se analizó mediante el software estadístico PC-Log Probit de acuerdo a lo descrito por Camacho (1991).

El resultado obtenido determinó un valor de la variable Concentración Efectiva cincuenta en 95,137µl.ml^{-1} de aceite esencial de *Lippia origanoides,* el coeficiente de determinación se calculó en r= 0,9277 con una recta de regresión lineal con ecuación y = 29,662x - 4,632.

Gráfico 12. Evaluación de la concentración efectiva cincuenta (EC_{50}) del patógeno *Alternaria solani*



4.1.3.3 Concentración mínima inhibitoria (MCI)

La Concentración Mínima Inhibitoria determinada en el tercer ensayo de evaluación del fitopatógeno *Alternaria solani,* fue calculada en 300 $\mu l.ml^{-1}$ de aceite esencial.

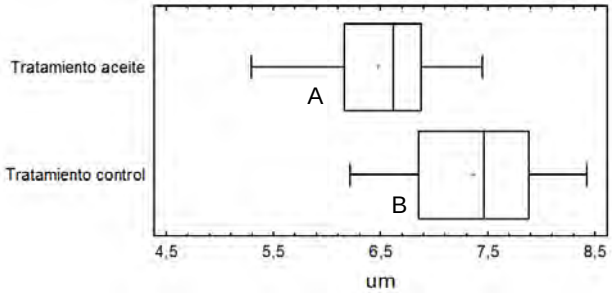
4.2 Análisis morfométrico de *P. infestans*, *R. solani* y *A. solani*

4.2.1 Análisis morfométrico de *P. infestans*

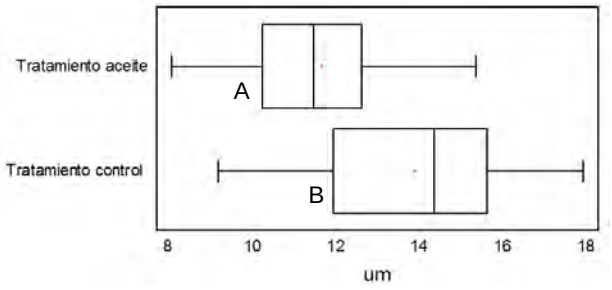
El análisis morfométrico de las estructuras reproductivas de *P. infestans* indica que hay diferencias entre las características morfológicas de los esporangios sometidas a la acción biocida del aceite esencial de *L. origanoides* respecto a las del testigo absoluto. Al comparar el diámetro de los esporangios se encontraron diferencias altamente significativas (P-valor $\leq$ 0,000013) entre las medias calculadas en los dos tratamientos, tal como lo indica la Figura 16-A. Se registraron diámetros entre 6,18 µm y 6,76 µm en los esporangios sometidos al tratamiento con aceite esencial comparados con el tratamiento control de 7,11 µm a 7,60 µm. Así mismo, al comparar la longitud de las estructuras reproductivas las diferencias fueron altamente significativas (P-valor $\leq$ 0,0016) en donde los esporangios en el tratamiento con aceite esencial fueron más pequeños, con valores de 10,70 µm - 12,63µm, respecto a los del tratamiento control con un valor entre 12,92µm y 14,87µm, como se muestra en la Figura 16-B.

El índice de Shapiro Wilk's muestra diferencias significativas (P-valor ≤ 0,0031) para el análisis del contorno de los esporangios en los dos tratamientos, como se muestra en la Figura 17, indicando que las estructuras reproductivas de *P. infestans* sufren reducción y deformación al estar en contacto con el aceite esencial, siendo visualmente diferentes entre sí (Figura18 A y B), en donde se observa cambios morfológicos evidentes.

Figura 16. Medidas del diámetro y longitud de los esporangios de *P. infestans*



A. Diámetro de esporangios de *P. infestans*



B. Longitud de esporangios de *P. infestans*

Figura 17. Análisis morfométrico del contorno de esporangios de *P. infestans* sometidos al tratamiento con aceite esencial de *L. origanoides* (+ rojo) y control (+azul).

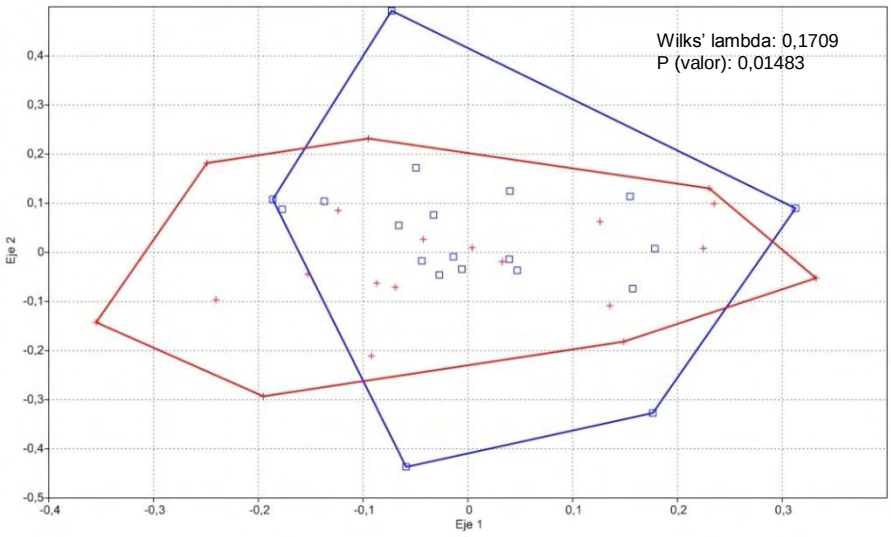
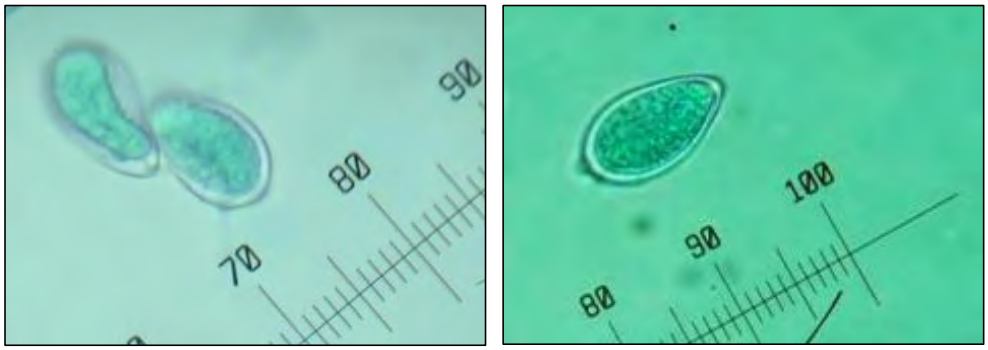


Figura 18. Morfología microscópica de *P. Infestans,* 192 horas de crecimiento, (A) tratamiento con aceite esencial de *L. origanoides* y (B) control.



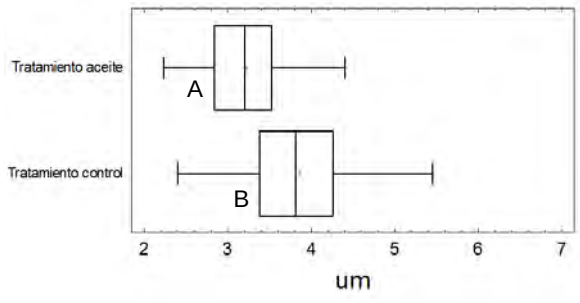
A. Esporangios *P. infestans* deformes B. Esporangios *P. infestans* papilados

4.2.2 Análisis morfométrico de *R. solani*

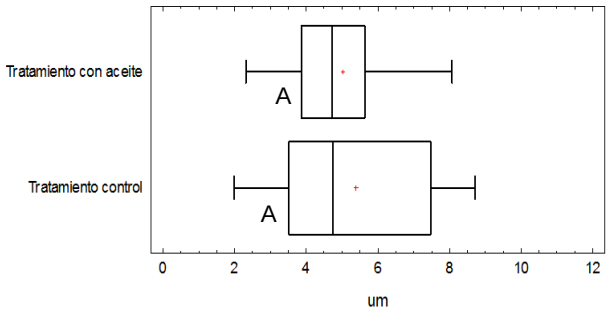
El análisis morfométrico de las hifas de *R. solani* indica que hay diferencias entre las características morfológicas de las hifas sometidas a la acción biocida del aceite de *L. origanoides* y las hifas que crecieron en el medio control. Al comparar el diámetro de las hifas se encontró que hay diferencias significativas (P-valor $\leq$ 0,05) entre las medias calculadas en los dos tratamientos, tal como se muestra en la Figura 19-A, en esta medición se registraron diámetros promedio de 3,07µm - 3,36µm en las hifas sometidas al tratamiento con aceite, respecto a las obtenidas en las hifas del tratamiento control siendo estadísticamente mayores con rango de observaciones entre 3,61µm y 4,10µm.

Por el contrario, al comparar la longitud del cuerpo del hongo (hifa) en los dos tratamientos no se presentaron diferencias estadísticas (P-valor $\leq$ 0,36), solamente puede percibirse una posible tendencia en la cual la longitud del cuerpo de *R. Solani* sometidas al tratamiento con aceite esencial son menores con valores de 4,47µm a 5,57 µm, respecto a las del tratamiento control (4,80µm - 5,98µm) como se muestra en la Figura 19-B. El índice de Shapiro Wilk's muestra diferencias significativas (P-valor $\leq$ 0,00026) para el análisis del contorno de las hifas en los dos tratamientos, como se indica en la Figura 20.

Figura 19. Medidas del diámetro y longitud de las hifas de *R. solani*

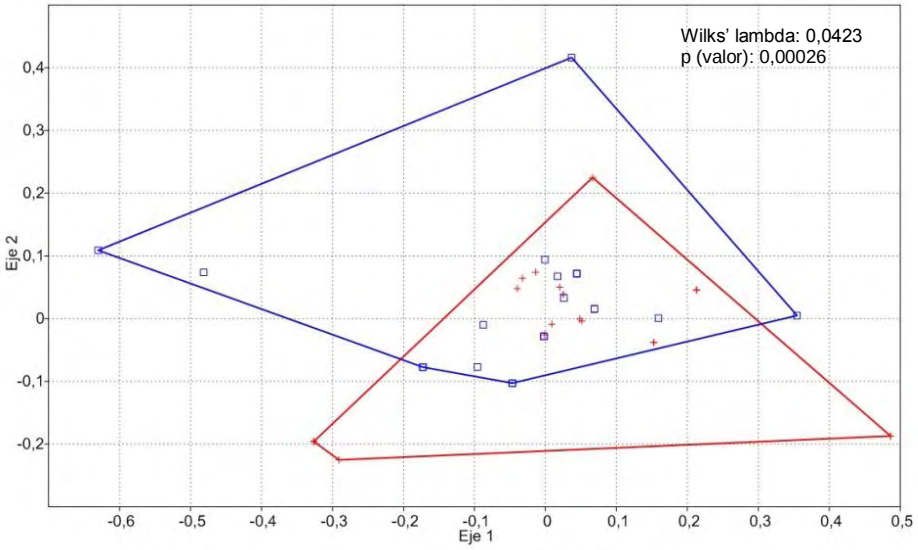


A. Diámetro de hifas de *R. solani*



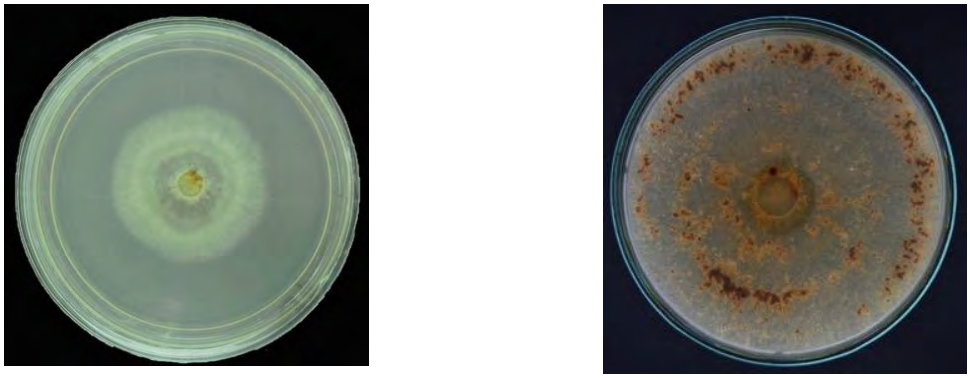
B. Longitud de hifas de *R. solani*

Figura 20. Análisis morfométrico del contorno de las hifas de *R. solani* sometidos al tratamiento con aceite esencial de *L. origanoides* (+ rojo) y control (+azul).



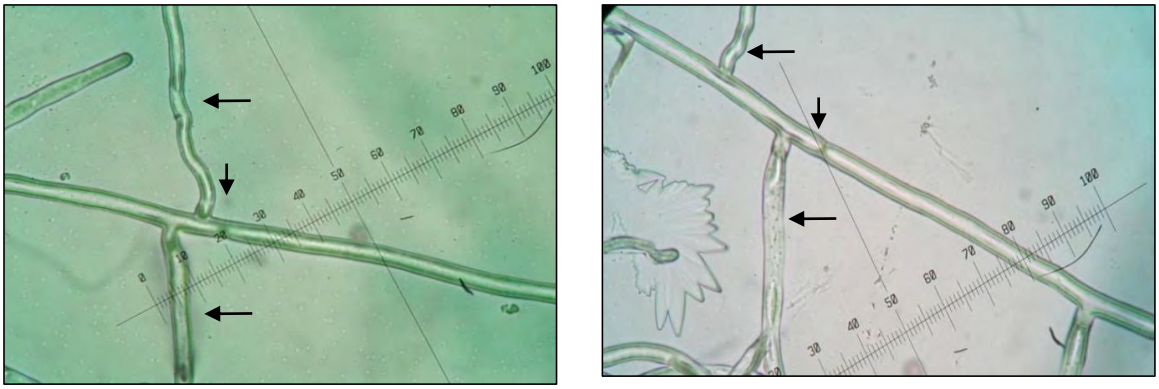
Una de las diferencias morfológicas de *R. solani* más significativas a nivel macroscópico entre los dos tratamientos a las 192 horas de evaluación, es la reducción del crecimiento micelial y la ausencia de esclerocios en el medio suplementado con el aceite de *L. origanoides* (Figura 21-B). A nivel microscópico se observaron septos con germinación múltiple de hifas en el medio control (Figura 22-A), contrario a septos con germinación simple en el medio suplementado con aceite esencial (Figura 22-B).

Figura 21. Morfología macroscópica de *R. solani*, 192 horas de crecimiento, (A) tratamiento con aceite esencial de *L. origanoides* y (B) control.

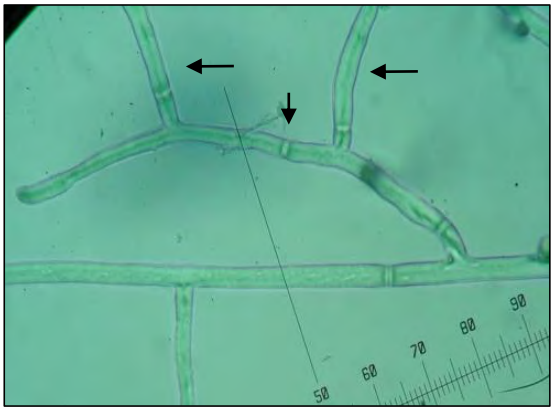


A. B.

Figura 22. Morfología microscópica de *R. solani,* 192 horas de crecimiento, (A) tratamiento con aceite esencial de *L. origanoides* y (B) control.



A. Septos de *R. solani* con doble germinación de hifas



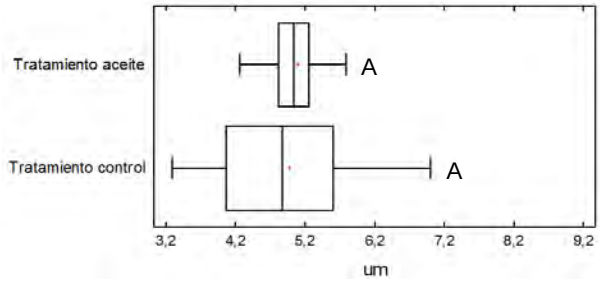
B. Septos de *R. solani* con germinación de hifas simple

4.2.3 Análisis morfométrico de *A. solani*

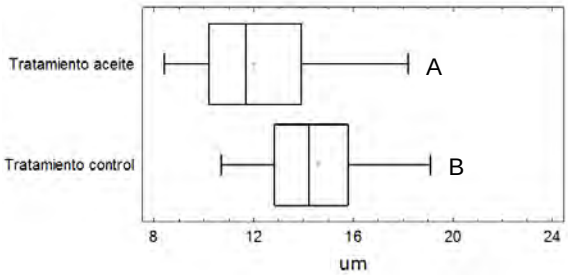
El análisis morfométrico de las conidias de *A. solani* indica que hay diferencias entre las características morfológicas de las conidias expuestas a la acción del aceite esencial de *L. origanoides* y las que crecieron en el medio control.

Aun cuando la comparación de la variable diámetro de conidias no reporto diferencias significativas (P-valor ≤ 0,623) entre las medias calculadas en los dos tratamientos, como lo muestra la Figura 23-A, se registran diámetros entre 4,87µm - 5,31µm en las conidias sometidas al tratamiento con aceite, respecto a los obtenidos en el tratamiento control de 4,54 µm a 5,40 µm.

Figura 23. Medidas del diámetro y longitud de las conidias de *A. solani*



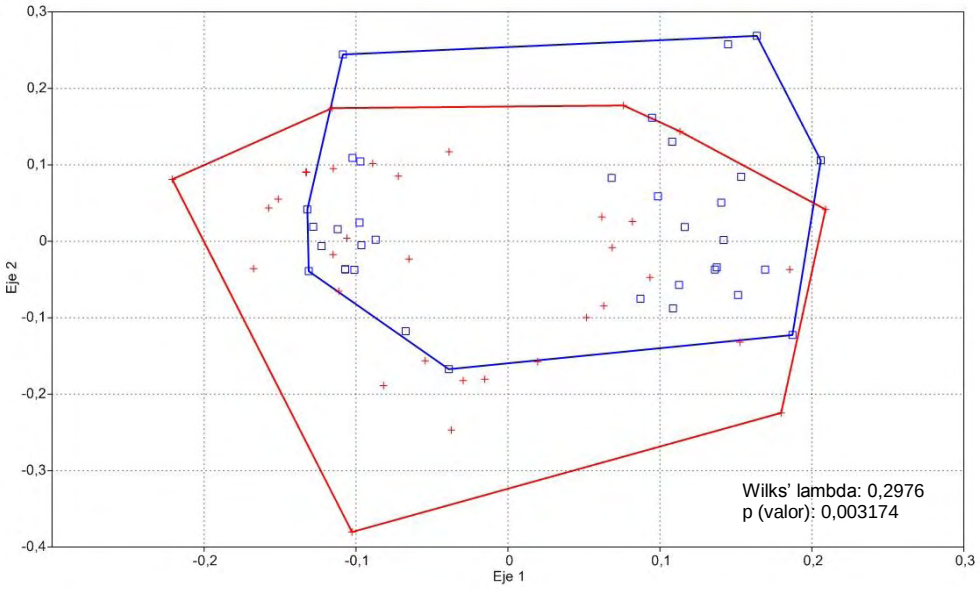
A. Diámetro de conidias de *A. solani*



B. Longitud de conidias de *A. solani*

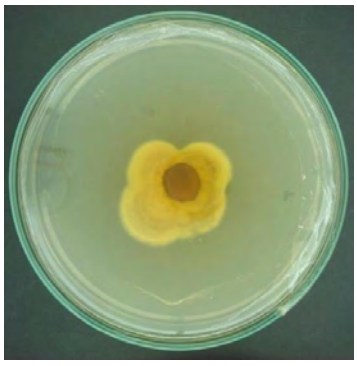
La longitud de conidias expreso diferencias significativas (P-valor ≤ 0,00024) entre tratamientos; las conidias en el tratamiento con aceite esencial son más pequeñas con valores entre 11,09 µm a 12,86 µm, respecto a las del tratamiento control las cuales reportan un rango de longitud mayor entre 13,55 µm y 15,66 µm como se muestra en la Figura 23-B. El índice de Shapiro Wilk's muestra diferencias significativas (P-valor ≤ 0,0031) para el análisis del contorno de las estructuras reproductivas en los dos tratamientos, como se indica en la Figura 24, indicando que el patógeno es afectado posiblemente en su crecimiento en el medio de cultivo a causa de la disminución en tamaño y forma en el cuerpo del micro organismo y en las estructuras reproductivas.

Figura 24. Análisis morfométrico del contorno de las conidias de *A. solani* al tratamiento con aceite esencial de *L. origanoides* (+ rojo) y control (+azul).

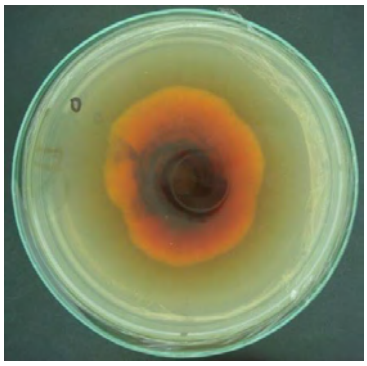


Una de las diferencias morfológicas de *A. solani* más significativas a nivel macroscópico entre los dos tratamientos, es la reducción del crecimiento micelial y visualización de "esporulación" después de 192 horas en el medio suplementado con el aceite de *L. origanoides* (Figura 25B) respecto al control (25A). A nivel microscópico se observaron conidias en proceso de germinación en el medio control (Figura 26A) y conidias amorfas en el medio con aceite (Figura 26B).

Figura 25. Morfología macroscópica de *A. solani*, 192 horas de crecimiento, (A) tratamiento con aceite esencial de *L. origanoides* y (B) control.

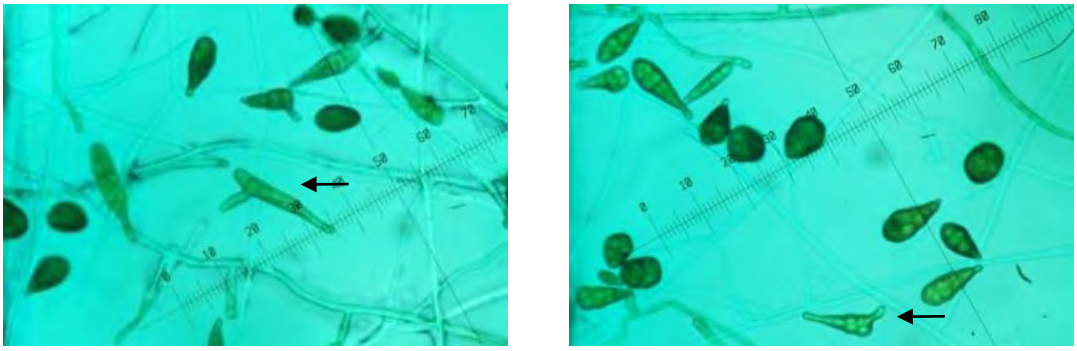


A.

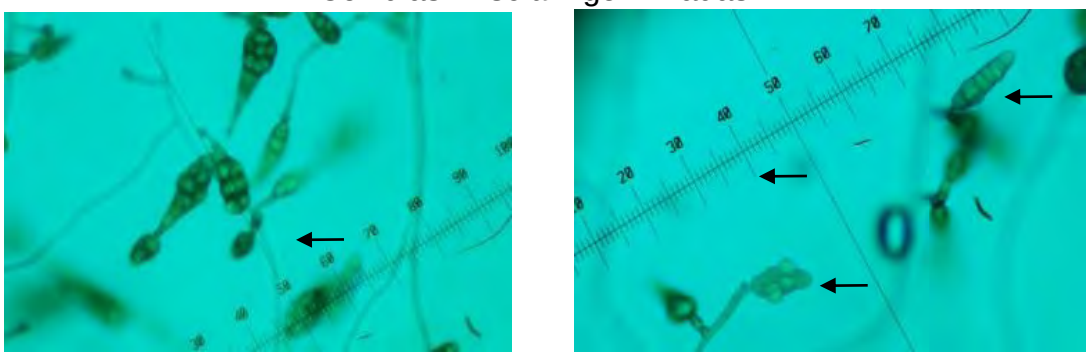


B.

Figura 26. Morfología microscópica de *A. solani* 192 horas de crecimiento, (A) tratamiento con aceite esencial de *L. origanoides* y (B) control.



A. Conidias *A. solani* germinadas



B. Conidias *A. solani* amorfas

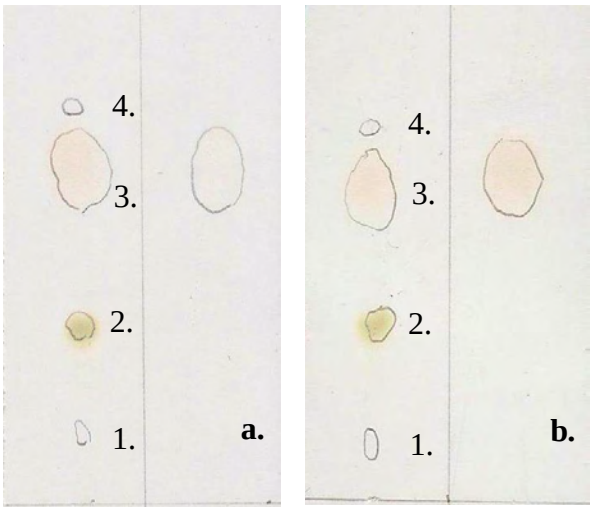
5. Evaluación del aceite esencial de *L. origanoides* mediante Bioautografía

5.1 Fraccionamiento del aceite esencial mediante cromatografía en capa delgada (C.C.D.)

Después de evaluar las diferentes fases móviles para el fraccionamiento de aceites esenciales por medio de la técnica de Cromatografía en Capa Delgada (C.C.D.) consignados en la Tabla 3. *Fases móviles reportadas en cromatografía en capa delgada C.C.D. para aceites esenciales*; se determinó que los solventes que otorgaban mayor resolución y número de fracciones visibles en la placa cromatográfica al inyectar aceite esencial de orégano silvestre, fueron tolueno y acetato de etilo bajo una proporción de 93:7 (v/v) de acuerdo al reporte de Nuñez *et al*. (2007) para la separación de *Lippia turbinata* G. (Verbenaceae). Sin embargo, la proporción original fue modificada en esta investigación para incrementar la resolución de las fracciones del aceite de *L. origanoides*, realizando ensayos de

separación, hasta determinar que la proporción 9:1 tolueno: acetato de etilo permite visualizar mediante luz UV (254 nm) cuatro fracciones claramente individualizadas (Figura 27).

Figura 27. Separación del aceite esencial de *Lippia origanoides* mediante C.C.D; fase móvil tolueno-acetato de etilo relación 9:1.



a. izq. Aceite esencial *L. origanoides;* der. Estándar carvacrol
b. izq. Aceite esencial *L. origanoides;* der. Estándar timol.

El sistema de separación (fase estacionaria y fase móvil) estandarizado en esta investigación para el aceite esencial de la especie *L. origanoides,* garantizó la repetibilidad y alta resolución de las fracciones.

5.2 Identificación y cuantificación de las fracciones del aceite esencial obtenidas por C.C.D.

Para la identificación de las fracciones separadas en la placa cromatográfica se referenció una distancia de frente de solvente en 5,5 cm (21°C), el cálculo de los factores de retención (R_f) fueron obtenidos de la posición de cada fracción visualizada siendo consignado en la Tabla 18; dichos valores fueron comparados con las referencias de terpenos, fenilpropanos, monoterpenos, alcoholes y ésteres en C.C.D. [Tolueno-Acetato de etilo (93:7)] de Wagner y Zgainski (1984), sin embargo el cambio de polaridad del sistema de solventes usado en esta investigación no permitió contrastar los valores estrictos de R_f obtenidos con la base de datos.

Tabla 18. Identificación de R_f de fracciones de aceite esencial de *L. origanoides* visualizadas mediante C.C.D.

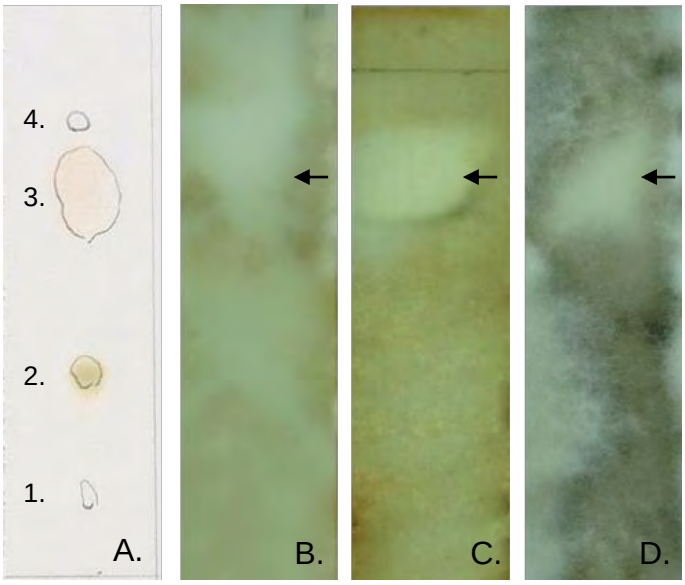
Fracción*	R_f
1	0,14
2	0,33
3	0,60
4	0,74
a.	0,62
b.	0,60

*a= Estándar comercial Carvacrol; b= Estándar comercial timol.

A través de los resultados obtenidos en el análisis del perfil cromatográfico del aceite esencial de *Lippia origanoides* obtenido por GC-MS, se comparó los estándares comerciales de timol (R_f=0,60) y carvacrol (R_f=0,62) (Sisma-Aldrich®) determinándose que la fracción 3 (Figura 27), presenta un valor equivalente al R_f de los estándares sintéticos así como el color característico reportado por Wagner y Zgainski (1984), rojo-violeta para timol en la fase sólida sílica-gel (60G F254) como se observa en la Figura 27. Hay que destacar que la similitud en el valor R_f del patrón de timol y carvacrol obedecen a las características terpénicas y a la naturaleza isomérica que tienen estos compuestos.

5.3 Identificación de la fracción activa del aceite esencial

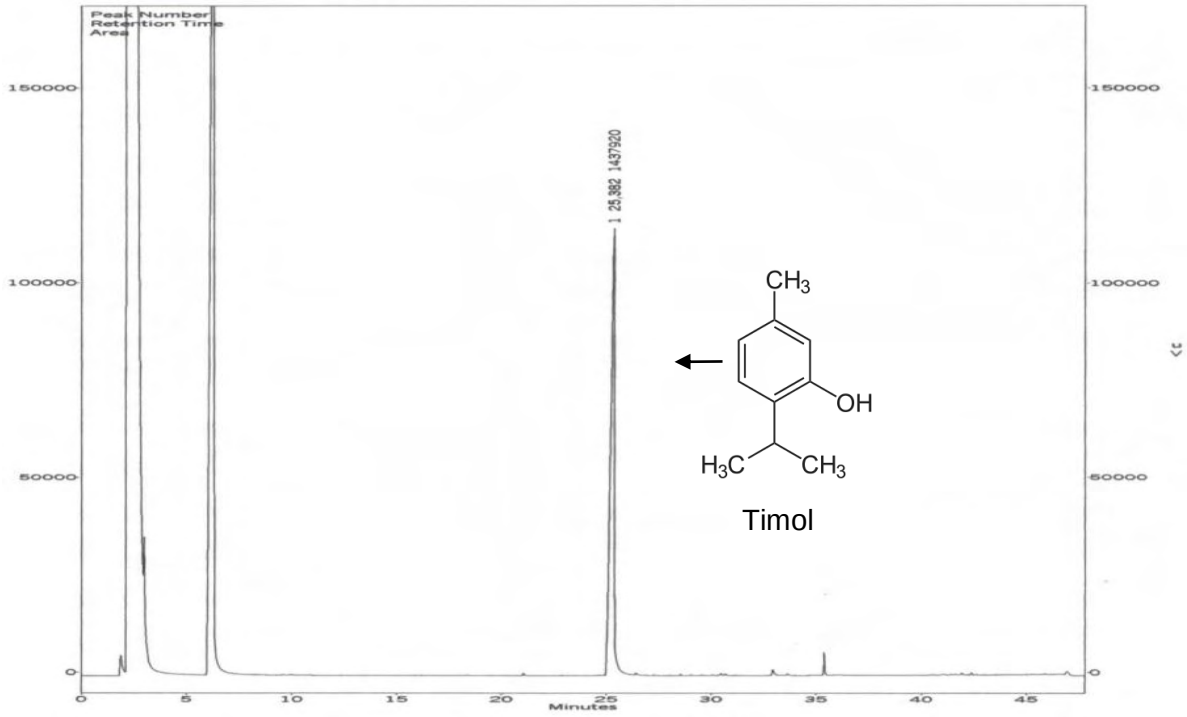
Figura 28. Separación del aceite esencial de *L. origanoides* mediante cromatografía en capa delgada (A), fracción activa para *P. infestans* (B), fracción activa para *R. solani* (C), fracción activa para *A. solani* (D).



Después de un tiempo de incubación de 144 horas, el montaje de bioautografía para cada microorganismo fitopatógeno evidencio que la fracción número tres (R_f =0,60) presento alta actividad biocida, no se evidencio otra fracción con características similares en esta investigación. El crecimiento micelial de los tres fitopatógenos presentó un comportamiento similar en el total de repeticiones realizadas, mostrando un halo de inhibición de $\pm$ 1 cm como se observa en la Figura 28.

Se realizó la identificación de la tercera fracción visualizada en la placa cromatografía a la cual se le atribuyo la actividad biológica del aceite (R_f =0,60) mediante análisis de CG-MS, el análisis cromatográfico determinó que la muestra obtenida al realizar raspado con espátula y lavado con diclorometano grado HPLC de la fracción activa, corresponde al compuesto timol; bajo las condiciones del análisis de CG-MS no fue posible determinar la presencia de otro compuesto en la muestra analizada como se observa en el cromatograma (Figura 29).

Figura 29. Cromatograma de fracción activa (No. 3) del aceite esencial de *Lippia origanoides* H.B.K. (TEA 001), fase estacionaria DB-5MS.



VII. DISCUSIÓN

1. Obtención de aceite esencial de *Lippia origanoides*

El aceite esencial de *L. origanoides* extraído mediante la técnica de arrastre con vapor, fue clasificado como una esencia fluida, al comportarse de forma líquida a temperatura ambiente según la clasificación de Martínez (2001); de consistencia oleosa transparente, libre de materia extraña, de color amarillo-rojizo con olor característico a los compuestos monoterpenicos timol y carvacrol.

El rendimiento promedio de aceite esencial obtenido en esta investigación presentó un promedio de 2,67 % ±0,05 del peso del material vegetal seco, siendo más alto que los reportados para *Lippia multiflora* (0,16%) y *Lippia alba* (0,6%); pero menor, que el reportado para *Lippia graveolens* (3,5%), *Lippia sidoides* (4,0%), *Lippia juliana* (5,0%), *Lippia laxibracteata* (3,0%) y *Lippia palmeri* (5,0%) según los reportes de Salgueiro *et al*. (2003), Bassole *et al.* (2003) y Corella *et al.* (2013).

Al comparar el rendimiento del material TEA001 con diferentes reportes de *Lippia origanoides,* se destaca que este material, superó los valores reportados por Henaro *et al.* (2010) de 1,6 % realizando destilación por arrastre con vapor (60 min). Igualmente se superó los valores de Celis (2007), Oliveira *et al.* (2007) y Henao *et al.* (2010) al utilizar la técnica de hidrodestilación asistida por microondas (MWHD) con rendimientos del 1,46; 1 y 1,7 % respectivamente. Únicamente fue posible referenciar en literatura rendimientos superiores de aceite esencial en los ecotipos COL517741 (Soatá - Boyacá) con 2,76 %, COL520285 (Pedregal - Nariño) con 3,1 % y COL512271 (Jordán Sube - Santander) con 3,6 % extraídos mediante MWHD (Ramírez *et al.,* 2009).

Estudios de Arango *et al.* (2012) sobre la optimización del rendimiento de aceite esencial de la especie *L. origanoides* proveniente de la vereda Alto de Mayo, Taminango, Nariño; obtuvieron un rango de extracción entre 2,45 y 3,27% con un promedio de 2,76% (v/v); los resultados obtenidos, ratifican que esta especie de orégano pertenece a la categoría de "*rich taxa*" a nivel mundial, por cuanto su rendimiento de aceite esencial es mayor al 2% según la clasificación de Padulosi (1996).

Investigaciones recientes, han determinado el potencial que tiene la explotación de oregano silvestre como cultivo comercial para la obtención de aceite esencial dado su alto rendimiento, en donde se ha calculado para *L. origanoides* una relación R B/C (relación beneficio/costo) de 5,58 y una tasa interna de retorno TIR del 86,80% en una superficie mínima de cultivo de 16 hectáreas. Donde el precio de un litro de aceite esencial crudo a nivel de productor presenta un valor de US$ 1.484 según los estudios de Barrientos *et al*. (2012).

2. Perfil cromatográfico del aceite esencial

El reporte cromatográfico obtenido en esta investigación (Tabla 5.) determinó que del 93,75% de compuestos identificados en el aceite esencial de *L. origanoides* mediante GC-MS, el 76,53% de la proporción relativa pertenece al grupo químico de los monoterpenos y el 17,35% de los compuestos encontrados presentan características sesquiterpenicas. No se encontraron diferencias perceptibles con los perfiles químicos de aceites esenciales reportados para *L. origanoides* por Ruiz *et al.* (2007), Oliveira *et al.* (2007), Celis (2007), Bueno *et al.* (2009), Vicuña *et al.* (2009), Henao *et al.* (2010), Borges *et al.* (2012), Arango *et al.* (2012) y Quema *et al.* (2014). Las razones de variación en la proporción de algunos compuestos secundarios y compuestos traza en el aceite esencial puede ser explicada, si se tiene en cuenta los factores que influyen en la composición química de los aceites, dentro de estos se destacan las condiciones climáticas, estacional y geográfica; plazo de la cosecha y la técnica de destilación, entre otros (Lahlou, 2004; De Martino *et al*., 2009; Vicuña *et al*., 2009). El efecto de la madurez de la planta en el momento de la producción de aceite y la existencia de diferencias quimiotipo (chemotypic) también pueden afectar drásticamente esta composición (Lahlou y Berrada, 2003).

Tabla 19. Componentes mayoritarios de aceite esencial de *L. origanoides* reportados en literatura como quimiotipos 3.

Nomenclatura del autor	Componentes mayoritarios (%)					Referencia
	Timol	ρ-Cimeno	γ-terpineno	Mirceno	β-cariofileno	
TEA001	60,7	8,8	6,3	5,7	5,1	Esta investigación
COL51275	56,3	11,8	7,3	-	3,2	Ruiz *et al.,* 2007
COL520285	54,5	10,0	5,0	2,8	2,4	Ramírez *et al.,* 2009 Bueno *et al.,* 2009
COL519799	59,6	8,4	7,3	3,6	4,3	Vicuña *et al.,* 2009
COL516290	34,5	9,3	9,1	3,0	3,4	
COL517741	59,7	8,8	4,5	2,2	1,8	Ramírez *et al.,* 2009; Viana y Tavares, 2013
COL519799	66,0	7,2	4,4	2,2	3,6	
COL512087	53,6	11,5	6,3	4,5	3,2	
-	29,6	0,8	0,1	-	-	Henao *et al.,* 2010
-	73,7	10,6	2,9	3,1	-	Arango *et al.,* 2012
-	83,0	5,5	2,5	3,0	0,3	Quema *et al.,* 2014

En relación al compuesto mayoritario timol (60,7%), en la Tabla 19, se consignaron los valores de diferentes perfiles cromatográficos de aceites esenciales de *Lippia origanoides* reportados en investigaciones como quimiotipos 3. (Compuesto mayoritario timol); en ésta, se destaca que las muestras COL519799 procedente de la localidad Bucaramanga, departamento de Santander, Colombia (Ramírez *et al*., 2009) y las muestras de aceite esencia de *L. origanoides* obtenida del municipio de Taminango, Nariño por Arango *et al.* (2012) y Quema *et al.* (2014), presentaron un contenido mayor de timol, reportando una concentración relativa de 66,0; 73% y 83% respectivamente en relación a la muestra TEA001 de 60,7%.

El timol, un fenilpropano ($C_{10}H_{14}O$) y el ρ-cimeno ($C_{10}H_{14}$) un monoterpeno no oxigenado, se destacan en esta investigación como los compuestos principales del aceite esencial obtenido de hojas de *L. origanoides* colectadas en el Municipio de Taminango, Nariño. En relación a este reporte, diferentes investigaciones han encontrado variaciones considerables en la composición química de aceites esenciales extraídos de orégano silvestre a nivel experimental, lo cual ha conducido a designar quimiotipos (chemotypes) dentro de la especie *Lippia origanoides* H.B.K., entendiéndose como individuos de la misma especie y región geográfica, manifestando variaciones que permiten agruparlos de acuerdo con la presencia de ciertos compuestos mayoritarios en el aceite esencial (Ruiz *et al*., 2007; De Martino *et al*., 2009); siendo reportados los compuestos timol, carvacrol y ρ-cimeno para la especie *L. origanoides* (Oliveira *et al*., 2007; Vicuña, 2005).

Según la clasificación de Vicuña *et al*. (2009), al menos tres quimiotipos diferentes pueden diferenciarse: un quimiotipo primero (A) cuyos componentes principales son ρ-cimeno y 1,8-cineol, un quimiotipo segundo (B) con una alta fracción de carvacrol, y un quimiotipo tercero (C) con una alta fracción de timol. Se sugiere que el aceite esencial evaluado en esta investigación, se designe como quimiotipo tercero (C) al presentar una proporción del 60,7 % del compuesto timol en el extracto esencial evaluado.

Se destaca que la muestra COL519799 procedente de la localidad Bucaramanga, departamento de Santander, Colombia (Ramírez *et al*., 2009) presentó un contenido mayor de compuesto timol (66,0 %), al igual que los reportes de Arango *et al.* (2011) y Viana y Tavares (2013) quienes reportan un contenido de timol del 73 y 78,8% respectivamente en ejemplares de *Lippia origanoides* provenientes del Alto Patía (Taminango, Nariño, Colombia), respecto a la muestra TEA001 obtenida de la misma región.

Al comparar el contenido relativo de timol de *Lippia origanoides* (TEA001) con *Origanum vulgare* (oregano Mediterraneo) y cuatro especies del género *Lippia* ampliamente conocidas por su utilización en la extracción de aceite esencial, en la Tabla 20 se indican las diferencias referidas a la proporción que ocupa el compuesto timol como molécula bioactiva y de interés industrial.

Tabla 20. Proporción relativa del compuesto timol en el aceite esencial TEA001 y su comparación con algunos géneros de *Lippia* y *Origanum.*

Especie	Proporción del compuesto timol (%)	Referencia
Lippia origanoides (TEA001)	60,7	Esta investigación
Lippia palmeri	21,8	Corella *et al.,* 2013
Lippia micromera	29,1	Viana y Tavares, 2013
Lippia gracilis	51,14*	
Lippia sidoides	59,65	
Origanum vulgare	42,0	Corella *et al.,* 2013

* Promedio tomado de cuatro reportes.

La alta proporción en el porcentaje relativo de timol del ecotipo TEA001, sumado a la acción antimicrobiana que a este compuesto fenólico natural se le atribuye sobre diferentes microorganismos, hace que el aceite esencial de *Lippia origanoides* muestra TEA001 presente una gran perspectiva en la búsqueda de actividad biocida (Kalemba y Kunicka, 2003; Oliveira *et al*., 2007; Muñoz *et al*., 2007; Vicuña *et al*., 2009; Henao *et al*., 2010; García *et al*., 2010; Borges *et al*., 2012).

3. Actividad biocida del aceite esencial de *L. origanoides* sobre los fitopatógenos *P. infestans*, *R. solani* y *A. solani*

Los resultados obtenidos en esta variable evidencian que el aceite esencial de orégano silvestre tiene un efecto biocida sobre los fitopatógenos *P. infestans*, *R. solani* y *A. solani* a nivel *in vitro,* inhibiendo el 100% del crecimiento micelial. A lo largo de los diferentes ensayos se determinó una relación directamente proporcional entre el incremento de las dosis de aceite y el porcentaje de inhibición de los microorganismos evaluados, dando como resultado que una concentración de 300 $\mu l.ml^{-1}$ de aceite esencial causara la inhibición de los fitopatógenos *P. infestans* y *A. Solani* bajo un periodo de evaluación de 192 horas; para el patógeno *R. solani* la concentración inhibitoria del aceite esencial disminuyo a 110 $\mu l.ml^{-1}$ determinando una mayor sensibilidad de este microorganismo, bajo el mismo periodo de evaluación.

Diferentes reportes de literatura confirman la actividad biocida de la especie vegetal *Lippia* spp. evaluada como materia prima de extractos crudos, etanólicos y metanólicos sobre los fitopatógenos *Spongospora subterranea* (Bittara *et al.,* 2009), *Colletotrichum gloesporioides* (Sangronis *et al.,* 2009), *Phytophthora* sp., *Alternaria alternata* (Gasparin *et al.,* 2000)*, Rhizoctonia solani* (Gasparin *et al.,* 2000; Gwinn *et al.,* 2010) y *Bipolaris maydis* (Rodríguez y Sanabria, 2005); encontrando altos niveles de sensibilidad a nivel *in vitro* y reducción de la severidad de los problemas

fitosanitarios en pruebas *in situ*, demostrando un elevado potencial de los bioinsumos desarrollados a partir de sus extractos y aceites esenciales empleando este género taxonómico.

Gasparin *et al.* (2000) determinaron que bajo condiciones controladas, el extracto crudo de *Lippia* spp. inhibió el crecimiento micelial de los fitopatogenos *Phytophthora* sp., *Rhizoctonia solani* y *Alternaria alternata,* encontrado diferencias en el grado de afectación de los fitopatogenos evaluados, siendo el más sensible *Phytophthora* sp. el cual se inhibió con 15% del extracto, *R. solani* con 25% y *Alternaria alternata* con el 50% (v/v); estos valores respaldan la actividad biocida que presentó el aceite esencial de *L. origanoides* en esta investigación, sin embargo, los resultados encontrados en esta variable evidencian un efecto en la sensibilidad de los microorganismos contrapuesta, en donde *R. solani* presentó la menor concentración minima inhibitoria (CMI) y un valor de EC_{50} de 88,94 $\mu l.ml^{-1}$ siendo el fitopatógeno más sensible al aceite esencial. Los fitopatógenos *P. infestans* y *A. solani* se comportaron de forma similar reportando una CMI de 300 $\mu l.ml^{-1}$ y un valor de EC_{50} de 138,81 y 95,13$\mu l.ml^{-1}$ respectivamente.

Estos resultados pueden explicarse por la variación y concentración relativa de compuestos bioactivos presentes en el extracto crudo evaluado por Gasparin *et al.* (2000) y el perfil fitoquímico que presentó el aceite esencial de *L. origanoides* TEA001; Nemeth *et al.* (1994) indican que existen diferencias marcadas en la relación de compuestos principales de un extracto y aceite esencial entre familias taxonomicas e incluso especies; dichas diferencias pueden estar relacionadas con la diferenciación en la actividad biológica, condiciones ambientales y metodo de obtención o extracción del bioinsumo, siendo compleja su comparación.

La busqueda bibliográfica demostró que el uso y evaluación del aceite esencial de oregano silvestre (*L. origanoides*) en el campo agricola es reducida, aún cuando éste tipo de metabolito secundario presentan un alto grado de estabilidad y concentración de compuestos activos que pueden afectar al microorganismo evaluado en mayor proporción que un extracto crudo (Olivero *et al*., 2009; Viana y Tavares, 2013), disminuyendo considerablemente los estimativos de concentración minima inhibitoria (CMI) y concentración efectiva cincuenta (EC_{50}), tal como se evidencia al comparar los resultados de Gasparin *et al.* (2000) y los obtenidos en esta investigación.

Se destaca que los valores de concentración minima inhibitoria (CMI) obtenidos en esta investigación fueron considerablemente mayores a los propuestos por Quemá *et al.* (2014) evaluando el aceite esencial de *L. origanoides* sobre *Phytophthora infestans* aislado de tomáte de mesa (*Solanum lycopersicum*), en donde estos autores determinaron un valor de CMI de 75 $\mu l.ml^{-1}$ de aceite esencial con un porcentaje relativo de timol de 78%; de igual forma, los reportes de Ospina *et al.* (2011) indican que la concentración minima inhibitoria de aceite esencial de oregano sobre el fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* Berk. es de 120 $\mu l.ml^{-1}$ con

una proporción relativa de timol de 65%. A lo anterior, Muller-Riebau *et al.* (1995), Vaillant *et al.* (2009) y Gwinn *et al.* (2010) evidencian que la actividad biocida de los aceites esenciales depende del compuesto específico mayoritario. Se destaca en los anteriores reportes que el compuesto fenólico timol presenta alta actividad sobre diferentes microorganismos evaluados (hongos, bacterias, oomycetos), concluyendo que a mayor porcentaje de este compuesto, es posible obtener mayores niveles de sensibilidad sobre el blanco biologico evaluado.

4. Análisis morfométrico de *P. infestans*, *R. solani* y *A. solani*

El análisis microscópico de la morfología de los tres fitopatógenos evaluados, determino que existen diferencias estadísticas relacionadas a modificaciones en las estructuras reproductivas y en el cuerpo de los microorganismos a causa del contacto con el aceite esencial, el análisis morfométrico de contorno en cada caso, indicó una disminución en el perímetro de la estructura evaluada (Figura 17, 20 y 24).

El fitopatógeno *P. infestans* presento esporangios ovoides y eventualmente amorfos, con diferencias estadísticas en los valores de diámetro y longitud de la estructura reproductiva, siendo el patógeno mayormente afectado por el aceite esencial, se presume que las alteraciones morfológicas reportadas en esta investigación afecten la taza de esporulación y por consiguiente el progreso de la enfermedad en futuros ensayos *in vivo*. Los fitopatógenos *R. solani* y *A. solani* sometidos al aceite esencial presentaron diferencias estadísticas en una de las variables morfológicas en evaluación, diámetro de micelio para *R. solani* y longitud de esporangio para *A. solani* siendo en cada caso menores respecto al crecimiento micelial del fitopatógeno usado como testigo absoluto, en los dos casos se observaron estructuras con ruptura de la membrana celular que origina la salida del material intracelular y deformación.

En relación a estos resultados se ha encontrado que los aceites esenciales con altos contenidos de timol causan alteraciones en la morfología de las hifas y estructuras reproductivas de varios hongos, generando una disminución en los diámetros así como lisis de las mismas, estas estructuras afectadas pierden su capacidad de germinación y crecimiento (Rasooli *et al*., 2006; Svircev et al., 2007; Uscátegui, 2013); siendo lo observado en los tres fitopatógenos evaluados en esta investigación y estableciendo altas expectativas en el desarrollo de bioinsumos a partir de aceite esencial de *L. origanoides* para el manejo de los problemas fitosanitarios causados por enfermedades en el cultivo de papa.

El mecanismo de acción de los aceites esenciales contra hongos y oomycetos puede ser relacionado con su capacidad general para disolver o perturbar la integridad de las paredes celulares y membranas (Isman y Michael, 2006),

facilitándose por la capacidad de penetración en los microorganismos debido a su naturaleza lipofílica, que les permite ser absorbidos rápidamente (Soylu et al., 2006). De acuerdo con los hallazgo obtenidos, se respalda lo indicado por Rasooli *et al*. (2006) al demostrar que el aumento de concentraciones del aceite esencial en ensayos *in vitro* aumenta las tasas de inhibición del crecimiento de microorganismos evaluado, tal como se evidencio en el ensayo de actividad biocida del aceite esencial de *L. origanoides*.

Microscopía electrónica de transmisión (TEM) y evaluaciones morfológicas de distintos microorganismos tratados con aceites esenciales ricos en timol, ha demostrado daños considerables a la celda pared, membrana celular y orgánulos celulares. También se han determinado cambios en la morfológica en las hifas, membrana plasmática interrupción y destrucción mitocondrial, coagulación citoplasmática, vacuolizaciones y fugas del protoplasto (Soylu *et al*., 2006; Rasooli *et al.,* 2006; Agredo *et al.,* 2012; Kordal *et al*, 2008; Uscátegui, 2013).

Cabe destacar que la mayor parte del daño ocasionado al microorganismo es irreversible, ya que se provocan cambios en la desorganización general del citoplasma, así como fugas citoplasma, probablemente causada por la pérdida de integridad de la membrana de los conidios y micelio, lo que eventualmente podría conducir a la muerte celular del blanco biológico (Soylu *et al*., 2006; Agredo *et al.,* 2012).

Dado que las alteraciones macroscópicas se deben a efectos individuales generalizados en el cuerpo del microorganismo evaluado, visualmente en esta investigación los fitopatógenos *R. solani* y *A. solani* evidenciaron cambios en la coloración de micelio y disminución en la densidad del mismo, así como una marcada reducción en la formación de esclerocios en el caso de *R. solani* y esporas sexuales en *A. Solani* (Figura 25 y 21); respecto a esto, se ha demostrado también que aceites esenciales ricos en timol como el caso de *Lippia origanoides* afecta la formación de estructuras reproductivas de resistencia como son los esclerocios en el hongo *Sclerotium cepivorum* (Ospina *et al*, 2011) y *R. solani* (Plodpai *et al*., 2013) demostraron con micrografías electrónicas de barrido que el crecimiento de los patógenos en medios que contienen el extracto es afectado tanto el crecimiento micelial como la formación de estructuras de reproducción asexuales y sexuales, confirmando los resultados obtenidos en esta investigación.

Este tipo de estudios según Agredo *et al.* (2012) permiten analizar la complejidad de la composición de los aceites esenciales, y sugiere este autor, que esta complejidad implica que hay múltiples mecanismos de acción. El modo de acción de los aceites esenciales afecta comúnmente a varios objetivos al mismo tiempo, sin reportarse ninguna resistencia particular.

5. Evaluación del aceite esencial de *L. origanoides* mediante bioautografía

En esta investigación se estandarizó y valido la metodología de bioautograía, siendo esta una modificación de la técnica de cromatografía en capa delgada (C.C.D.) que se constituye como una aplicación directa de detección, que combina un método químico analítico con un bioensayo, obteniendo una rápida identificación del compuesto o compuestos activos en un extracto vegetal u otra mezcla compleja (Engelmeier y Hadacek, 2006; Gu *et al*., 2008; Marston, 2011). Faleiro (2011) indica que esta técnica recientemente se ha probado para evaluar la actividad antimicrobiana de aceites esenciales; en literatura no fue posible encontrar reportes del uso de esta técnica evaluando el aceite esencial de *L. origanoides*.

Los resultados obtenidos indican que bajo las condiciones de estudio, se identificaron cuatro fracciones en el montaje cromatográfico usando sílica-gel (60G F_{254}) como fase estacionaria y tolueno y acetato de etilo (9:1) como fase móvil, de estas fracciones, la única que mostro actividad biocida sobre los tres fitopatógenos evaluados fue la numero tres (R_f =0,60) identificada mediante comparación con estándar puro del compuesto timol y validado mediante GC-MS como este monoterpeno; en la Figura 28, es posible observar como *P. infestans, R. solani* y *A. solani* fueron afectados evidenciando un halo de inhibición similar en esta zona en la placa cromatográfica.

Estudios de Camele *et al.* (2012) y El-Shiekh *et al.* (2012) evaluado los principales compuestos mayoritarios presentes en aceites esenciales sobre diferentes microorganismos, demostraron que el compuesto timol, presentó la mayor actividad biocida a nivel *in vitro*, siendo comparada su efectividad con los compuestos citral, eugenol, metil cinnamate, linalol, α-pineno, o-cimeno, 1,8-cineol, γ-terpineno, α-fenaldreno y canfeno.

El efecto del timol lo estudio Muller-Riebau *et al.* (1995) sobre *Phytophthora capsici* en donde concentraciones mayores a 100 $\mu l.ml^{-1}$ del compuesto fenólico registro una inhibición completa del patógeno. Así mismo Krolow *et al*. (2006) y Uscátegui (2013) encontraron que el timol presente en el aceite esencial de *Timus vulgaris* bajo una dosis de 500 $\mu l.ml^{-1}$ logró reducir el crecimiento de Oomyceto en un 60% respecto al testigo absoluto. Para Arango *et al.* (2011) y Quema *et al.* (2014), la actividad antifúngica del aceite esencial de *L. origanoides* la otorga el compuesto timol al cual le atribuyen la reducción en el crecimiento del micelial de *P. Infestans.* En esta investigación se pudo respaldar mediante la metodología de bioautografía la hipótesis del compuesto bioactivo.

Igualmente, Muller-Riebau *et al*. (1995) determinaron que el compuesto timol afectaba el crecimiento micelial *in vitro* de *R. solani,* indicando que 100 $\mu l.ml^{-1}$ de este compuesto en el medio de cultivo inhibía completamente el crecimiento del fitopatógeno; siendo equivalente con lo reportado por Vaillant *et al,* (2009). Gwinn *et al.* (2010) evaluaron el aceite esencial de *Monarda didyma* (44% timol) sobre el

crecimiento *in vitro* de *R. Solani,* indicando que en el microambiente de estudio, los valores de inhibición micelial dependieron del compuesto principal y de su concentración en el aceite esencial específico, siendo el timol el compuesto de mayor actividad biocida. El-Shiekh *et al.* (2012) indican que el compuesto timol reporta una Concentración Efectiva Cincuenta (EC_{50}) de 59,28 $\mu l.ml^{-1}$ sobre *R. Solani* después de 10 días de evaluación usando la técnica de dilución en agar.

El fitopatógeno *Alternaria solani* también ha sido evaluado frente al compuesto timol, destacándose los estudios de El-Shiekh *et al*, (2012) los cuales comprobaron que este monoterpeno inhibe en un 100% el crecimiento del patógeno; los resultados de Babagoli, Behdad (2012) y Alizadeh *et al*, (2013) coinciden en indicar que el timol como componente mayoritario de los aceites esenciales de *Carum copticum*, *Zataria multiflora*, *Satureja hortensisi* y *Thymus daenensis* causa el mayor efecto antifúngico sobre el crecimiento hifal de *A. solani*. El-Shiekh *et al.* (2012) reporta un valor de EC_{50} de 156,41 $\mu l.ml^{-1}$ sobre este fitopatógeno después de 10 días de evaluación.

Pocos estudios se han centrado en el mecanismo por el cual los extractos de plantas y sus aceites esenciales logran inhibir el crecimiento de microorganismos evaluados, los terpenos (mono y sesquiterpenos) presentes de los aceites esenciales se relacionan como los principales antimicrobianos. El timol es un compuesto fenólico cuya actividad antifúngica puede atribuirse a la presencia de un núcleo aromático y una resina fenólica OH, grupo que es hidrógeno activo formando enlaces con los sitios activos de las enzimas diana de los blancos biológicos evaluados (Ultee *et al.,* 1999); diferentes autores indican que la naturaleza hidrofóbica de este compuesto perteneciente al grupo de los fenoles terpenicos asegura su preferencial partición en la membrana lipídica en los microorganismos probados, sin embargo la presencia del grupo hidroxilo es crítica para la toxicidad, ya que por ejemplo le ρ-cimeno presenta bajos niveles biocidas en relación al metabolito timol (Ultee *et al*., 2002; Xu *et al*., 2008).

Es así como los compuestos fenólicos causa perturbación en las enzimas de la pared celular, tales como quitinasa, quitina sintasa y α- y β- glucanasa propia de los hongos (Adams *et al.,* 1996; Numpaque *et al*, 2011), como se evidencio en esta evaluación sobre los fitopatógenos de la papa probados en esta investigación. Además, el timol actúa como un intercambiador de protones, reduciendo de este modo el gradiente de pH a través de la membrana citoplasmática, lo que disminuye la fuerza motriz de protones causando la muerte celular (Numpaque *et al*, 2011).

En las células eucariotas, los aceites esenciales pueden provocar la despolarización de las membranas mitocondriales por la disminución del potencial de membrana, lo que afecta el ciclo de los iones de Ca^{++}, K^{+}, H^{+} y otros canales iónicos reduciendo el gradiente de pH, afectando la bomba de protones y el pool de ATP (Ultee *et al.,* 1999; Bakkali *et al,* 2008; Xu *et al*., 2008). Ellos cambian la fluidez de las membranas, que se convierten anormalmente permeables dando lugar a la

liberación de radicales, citocromo C, iones de calcio y proteínas, como en el caso de estrés oxidativo y la insuficiencia bioenergética. La permeabilización de las membranas mitocondriales interna y externa conduce a la muerte celular por apoptosis y necrosis. Parece que las reacciones en cadena de la pared celular o la membrana celular externa invaden toda la célula, a través de las membranas de diferentes organelos tales como mitocondrias y peroxisomas. Estos efectos sugieren una actividad prooxidante de los fenoles (Bakkali *et al,* 2008). Las alteraciones de las envolturas celulares, dependen del estado de crecimiento celular, las células en división son más sensibles probablemente porque los aceites esenciales penetran más eficazmente a los sitios en desarrollo (Xu *et al*., 2008; Ultee *et al*., 2002) causando graves daños sobre los hongos verdaderos (*Alternaria solani* y *Rhizoctonia solani*) y similares como el caso del Oomyceto *P. infestans*.

VIII. CONCLUSIONES

- El ecotipo TEA001 de la especie *Lippia origanoides* H.B.K colectado en la vereda Alto de Mayo, municipio de Taminango (N), presentó altos contenidos relativos de timol (60,7%), proponiendo su identificación como quimiotipo tercero (c).

- La separación del aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*) mediante la técnica de cromatografía en capa delgada (C.C.D) fase estacionaria sílica-gel (60G F_{254}) y fase móvil tolueno-acetato de etilo en relación 9:1 (v/v) permitió la visualización de cuatro fracciones individualizadas.

- El aceite esencial de *Lippia origanoides,* descrito como TEA001 en esta investigación, presentó alta actividad biocida sobre los fitopatógenos *Phytophthora infestans, Rhizoctonia solani* y *Alternaria solani* a nivel *in vitro.*

- La concentración de aceite esencial de *L. origanoides* de 300 $\mu l.ml^{-1}$ inhibió el crecimiento de los fitopatógenos *P. infestans* y *A. solani*; la concentración letal para el fitopatógeno *R. solani* se calculó en 110 $\mu l.ml^{-1}$; estas concentraciones pueden ser utilizadas para iniciar nuevos estudios y extrapolar los resultados a nivel de campo.

- El análisis microscópico de la morfología de los tres fitopatógenos evaluados, determino que existen diferencias estadísticas relacionadas a modificaciones y alteraciones en las estructuras reproductivas a causa del contacto de los microorganismos con el aceite esencial; el análisis morfométrico de contorno en cada caso indicó una disminución en el perímetro de la estructura evaluada.

- Utilizando la técnica de bioautografía se pudo comprobar la actividad biocida del monoterpeno timol (R_f =0,60) al inhibir el crecimiento micelial de los fitopatógenos evaluados.

IX. RECOMENDACIONES

- Se recomienda evaluar la actividad biocida del aceite esencial de *L. origanoides* sobre diferentes microorganismos patógenos de cultivos, integrándose en el concepto de pesticida biorracional.

- Evaluar la taza de multiplicación de los fitopatógenos evaluados bajo la aplicación del aceite esencial de *L. origanoides* a nivel *in vitro.*

- Se resalta la importancia de evaluar el aceite esencial de *L. origanoides* en condiciones controladas, *in vivo* para contrastar su eficacia, como estrategia alternativa en el manejo integrado de las enfermedades de la papa causadas por *P. infestans, R. solani* y *A. solani.*

- Realizar un estudio de mercado que viabilice la extracción y utilización del aceite esencial de *L. origanoides* como pesticida biorracional en cultivos comerciales y nichos agroecológicos de producción de papa.

X. BIBLIOGRAFÍA

Adams, S., Kunz, B. and Weidenbörner, M. 1996. Mycelial deformations of *Cladosporium herbarum* due to the application of Eugenol and Carvacrol. Journal Of Essential Oil Research. 8, pp. 535 – 540.

Ágredo, J., Alves, E., Rozwalka, L., de Souza, E., Marquez, W. 2012. Antifungal activity and ultrastructural alterations in *Pseudocercospora griseola* treated with essential oils. Ciênc. agrotec., Lavras. 36 (3), pp. 270 – 284.

Agrios, G. 2002. Fitopatología. 2da ed. México: Limusa, 838 p.

Albesiano, S., Rangel, C. y Cadena, A. 2003. La vegetación del cañón del río Chica-mocha (Santander, Colombia). Caldasia. 25, pp73 – 99.

Alexopoulos, C. y Mims, C. 1997. Introducción a la Micología. Ediciones Omega, S.A. Barcelona, España. 638 p.

Álvarez, D. Salazar, C., Hurtado, A., Delgado, D. y Arango, O. 2011. Sensibilidad in vitro de *Phytophthora infestans* al extracto de fique (*Furcraea gigantea* Vent.) y fungicidas sistémicos. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. 9 (2), pp. 96 – 104.

Amini, M., Safaie, N., Salmani, M.J., Shams-Bakhsh, M. 2012. Antifungal activity of three medicinal plant essential oils against some phytopathogenic fungi. Trakia journal of sciences. 10 (1), pp. 1 – 8.

Arango, O., Bolaños, F., Villota, O., Hurtado, A. y Toro, I. 2012. Optimización del rendimiento y contenido de timol de aceite esencial de orégano silvestre obtenido por arrastre con vapor. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. 10 (2), pp. 217 – 226.

Arango, O., Hurtado, A., Pantoja, D. y Santacruz, L. 2011. Actividad antifungica del aceitede oregano silvestre (*Lippia origanoides* Kunth) sobre el crecimiento de *Phytophthora infestans*. Vitae. 18 (2), pp. S192.

Ariza, C. 1999. Estudio de la diversidad florística del enclave árido del río Patía (Colombia). Trabajo de grado. Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia (inédito). Bogotá, 100 p.

Babagoli, M.A. y Behdad, E. 2012. Effects of three essential oils on the growth of the fungus *Alternaria solani.* Journal of Research in Agricultural Science. 8 (1), pp 45 – 57.

Bandoni, A. 2000. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Argentina. Editorial Universidad Nacional de la Plata. 78 p.

Barbosa, F., Barbosa, L., Melo, E., Botelho, F. e Santos, R. 2006. Influência da temperatura do ar de secagem sobre o teor e a composição química do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill). Química Nova. 15 (1), pp 1 – 5.

Barrientos, J., Reina, M. y Chacón, M. 2012. Potencial económico de cuatro especies aromáticas promisorias para producir aceites esenciales en Colombia. Revista colombiana de ciencias hortícolas.6 (2), pp. 225 – 237.

Bauer, A., Kirby, W., Sherris, J. and Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility by standarized single disk method. American Journal of Clinical Pathology. 45 (4), pp. 493 – 496.

Bauer, K.; Garbe, D.; Surburg, H. 2001. Common fragrance and flavor materials: Preparation, properties and uses. 4ta Edición. WILEY-VCH, Weinhein. 305 p.

Bélanger, A., Landry B. and Dextraze, L. 1991. Extraction et détermination de composés volatils de l'ail (*Allium sativum*). Rivista Italiana EPPOS. 2(1), 455 p.

Bittara, F., Rodríguez, D., Sanabria, M., Monroy, J. y Rodríguez, J. 2009. Evaluación de fungicidas y productos vegetales en el combate de la sarna polvorienta de la papa. Interciencia. 34 (4), pp. 265 – 269.

Borges, A., De Albuquerque, J., Marciel, T., Freire, M., Graças, A., Dantas, J. and Queiroz, R. 2012. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. Experimental Parasitology. 132 (1), pp. 123 – 128.

Bueno, J., Martínez, J., Stashenko, E. and Ribón, W. 2009. Anti-tubercular activity of eleven aromatic and medicinal plants occurring in Colombia. Biomédica. 1 (1), pp. 51-60.

Burriel, F., Lucena, F., Arribas, S. y Hernández, J. 2008. Química analítica cualitativa. España, Ed. Thomson. 1050 p.

Caballero, K., Olivero, J. and Stashenko, E. 2012. Repellency and toxicity of essential oils from *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon flexuosus* and *Lippia origanoides* cultivated in Colombia against *Tribolium castaneum*. Journal of Stored Products Research. 50 (1), pp. 62 – 65.

Calvo, M., Arosemena, E., Shiva, C. and Adelantado, C. 2011. Antimicrobial activity of plant natural extracts and essential oils. In: Mendez, A. 2011. Science against

microbial pathogens: communicating current research and technological advances. España. Ed. Vilas, 1143 – 1156 p.

Camacho, C. 1991. Programa PC-Probit, versión 1.0, Centro de Estadística y Cálculo, Colegio de postgraduados, Montecillos, Chapingo, México.

Camel, I., Altieri, L., De Martino, L., De Feo, V., Mancini, E. and Luigi, G. 2012. In vitro control of post-harvest fruit rot fungi by some plant essential oil components. International Journal of Molecular Sciences. 13 (1), pp. 2290 – 2300.

Campo, J., C. Nguyen-The, M. Sergent, M.J. Amito. 2003. Determination of most bioactive phenolic compounds from rosemary against *Listeria monocytogenes*: influence of concentration, pH and NaCl. Journal Food Science. 68 pp 2066 – 2071.

Carreño, N., Vargas, A., Bernal, A. y Restrepo, S. 2007. Problemas fitopatológicos en especies de la familia *Solanaceae* causados por los géneros *Phytophthora*, *Alternaria* y *Ralstonia* en Colombia: Una revisión. Agronomía Colombiana. 25 (2), pp 320 – 329.

Castro, I. y Contreras, A. 2011. Manejo de plagas y enfermedades en el cultivo de la papa. Chie. Ed. Valdivia hile: Imprenta Austral. 72 p.

Cedeño, L., Carrero, C., Quintero, K., Araujo, Y., Pino, H. y García, R. 2001. Identificación y virulencia de grupos de anastomosisi de *Rhizoctonia solani* Kühn asociados con papa en Mérida, Venezuela. Interciencias. 26 (007), pp 296 – 300.

Celis, C. 2007. Estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de *Lippia alba*, *Lippia origanoides*y *Phyla* (*Lippia*) *dulcis*, especes de la familia *Verbenaceae*. Scientia et Technica Año XIII. 33 (mayo de 2007), pp 103 – 105.

Cerutti, M. y Neumayer, F. 2004. Introducción a la obtención de aceite esencial de limón. Invenio. 7 (12), pp. 149 – 155.

Chen, S. and Gilbert, M. 2007. *Verbenaceae*. Missouri Botanical Garden Press, pp 1 – 49.

Choma, I. and Grzelak, E. 2011. Bioautography detection in thin-layer chromatography. Journal of Chromatography. 1218 (1), pp 2684 – 2691.

Christofilogiannis, P. 2000. Current inoculation methods in MIC determination. Aquaculture. 196 (1), pp 297 – 302.

Corella, R. y Ortega, M. 2013. Importancia del aceite esencial y la producción de oregano *Lippia palmeri* Watson en el estado de Sonora. Revista de ciencias biológicas y de la salud. XV (1), pp 57 – 64.

Corporación Autonoma Regional de Nariño – CORPONARIÑO. 2008. Diagnóstico biofísico y socioeconómico, Municipio de Taminango Nariño. [En linea]: http://corponarino.gov.co/expedientes/intervencion/DIAGNOSTICO%20BIOFISICO%20SOCIO%20ECONOMICO%20DE%20TAMINANGO.pdf, consultado: septiembre, 2014.

Cruz, M., Nozaki, M. e Batista, M. 2000. Plantas medicinais e alelopatía. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. 15 (1), pp. 28 – 34.

De Martino, L., De Feo, V., Formisano, C., Mignola, E. and Senatore, F. 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from three chemotypes of *Origanum vulgare* L. ssp. hirtum (Link) letswaart growing wild in Campania (Southern Italy). Molecules. 14 (1), pp 2735 – 2746.

De Polanco, M., Ordoñez, M. y Galindo, L. 2005. Morfometría del contorno (borde de la forma) con Series de Fourier, paso a paso. Ibagué (Colombia). Universidad del Tolima, pp 6 – 25.

DNPV – Departamento Nacional de Protección Vegetal. 1997. Memorias del curso: Manejo integrado de las principales plagas y enfermedades del cultivo de papa. Quito (Ecuador). 92 p.

Dos Santos, F., Lopes, A. and Cito, A. 2004. Composition and biological activity of essential oils from *Lippia origanoides* H.B.K. Journal of essential oil research. 16 (1), pp. 504 – 506.

Engelmeier, D. and Hadacek, F. 2006. Antifungal natural products: Assays and applications. 17 (1). In: Rai, M. and Carpinella, M. 2006. Naturally Occurring. Bioactive Compounds, 1st Edition. 502 p.

Esquivel, H. 1997. Herbarios en los jardines botánicos. Colombia: Red Nacional de Jardines Botánicos de Colombia. [En linea]: http://www.humboldt.org.co/jardinesdecolombia/documentos/Herba.pdf. Consultado noviembre de 2012.

Faleiro, M. 2011. The mode of antibacterial action of essential oils. In: Mendez, A. 2011. Science against microbial pathogens: Communicating current research and technological advances. España. Ed. Vilas, pp. 1143 – 1156.

FAO – Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2008. Gestión de las plagas y enfermedades de la papa. [En linea]: http://www.potato2008.org/es/lapapa/IYP-5es.pdf. Consultado: enero de 2013.

FAO – Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2012. Producción de cultivo de papa. [En linea]: http://faostat3.fao.org/home/index.html#DOWNLOAD. Consultado: noviembre de 2012.

Farah, N., Chaudhary, A., Nadeem, A., Irfan, U. and Iftikhar, A. 2008. Influence of inoculum levels of *Rhizoctonia solani* and susceptibility on new potato germplasm. Pakistan Journal of Botany. 40 (5), pp. 2199 – 2209.

FEDEPAPA - Federación Colombiana de Productores de Papa. 2007. Costos de producción de papa en las principales zonas productoras de Colombia. [En linea]: http://papaunc.com/img_upload/f243f82ed8fde644849683ee48a08ef8/ESTUDIO_DE_COSTOS_DE_PROD._PAPA.pdf. Consultado: enero de 2013.

Federación Colombiana de Productores de Papa. 2004. Guía ambiental para el cultivo de la papa. Bogota (Colombia). Imp. Diagráficas. 56 p.

García, B. 1992. Flora medicinal de Colombia. Tomo II, Ed. Tercer mundo editores, Bogotá (Colombia), pp 506 – 507.

García, C., Martínez A., Ortega, J., Castro, F. 2010. Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. Química Viva. 9 (2), pp 86 – 96.

García, R., García, A. y Gamica, C. 2002. Distribución, incidencia y alternativas de control de *Rhizoctonia solani* en el cultivo papa en el estado Mérida, Venezuela. Revista Latinoamericana de la Papa. 13 (1), pp 24 – 40.

Gasparin, M., Moraes, L., Schwan-Estrada, K., Stangarlin, J., Cruz, M. 2000. Effect of crude extract of *Lippia alba* and *Rosmarinus officinalis* on phytopathogenic fungi. Anuário CCA/UEM, pp 33 – 44.

Gomis, V. 2008. Introducción a las técnicas instrumentales en el análisis industrial. España. Universidad de Alicante, 431 p.

Griffin, S. and Markham, J. 2000. An agar dilution method for the determination of the minimum inhibitory concentration of essential oils. Journal of essential oil research. 12 (1), pp. 249 – 255.

Grünwald, N. and Flier, W. 2005. The biology of *Phytophthora infestans* at its center of origin. Annual review of phytopathology. 43 (1), pp. 171 – 90.

Gu, L., Wu, T. and Wang, Z. 2008. TLC bioautography-guided isolation of antioxidants from fruit of *Perilla frutescens* var. acuta. LWT - Food Science and Technology. 42, pp 131 – 136.

Gwinn, K., Ownley, B., Greene, S., Clark, M., Taylor, C., Springfield, T., Trently, D., Green, J., Reed, A., and Hamilton, S. 2010. Role of essential oils in control of Rhizoctonia damping-off in tomato with bioactive monarda herbage. Phytopathology. 100 (1), pp 493 – 501.

Hammer, O., Harper, D. and Ryan, P. 2001. Paleontological statistics software package for education and data analysis. Paleontología Electrónica. 4 (1) 49 p.

Henao, J., Muñoz, L., Padilla, L. y Rios, E. 2010. Extracción y caracterización del aceite esencial de *Lippia origanoides* H.B.K. "orégano de monte" cultivado en el Quindío y evaluación de la actividad antimicrobiana. Revista de investigación Universidad de Quindío. 21, pp 82 – 86.

Henningsen, M. 2003. Fungal diseases in agriculture, modern fungicides. Chemie in unserer Zeit. 37, pp 98 – 111.

Homans, A. and Fuchs, A. 1970. Direct bioautography on thin-layer chromatograms for detecting fungitoxic substances. Journal of chromatography. 51, pp 242 – 245.

Houghton, P. 2000. Use of small scale bioassays in the discovery of novel drugs from natural sources. Phytotherapy Research. 14 (6), pp. 419 – 423.

Hyams, D. 2009. Curve Expert. v. 1.4. E.E.U.U.

ICA - Instituto Colombiano Agropecuario. 2011. Manejo fitosanitario del cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* subsp. Andigena y S. phureja): Medidas para la temporada invernal. Bogotá, 35 p.

Isman, M.B. and Machial, C.M. 2006. Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. *In* M. Rai and M.C. Elsevier (BV). Ed. Carpinella, Naturally Occurring Bioactive Compounds, pp 29 – 44.

Jaramillo, S. 2003. Monografía sobre *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. Monografía. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia. Medellín (Colombia), 137 p.

Kadereit, J.2004. The Families and Genera of Vascular Plants. Volume VII. Flowering Plants Dicotiledons. *Lamiales* (except *Acanthaceae* including *Avicenniaceae*). Edited by K. Kubitzki. Springer – Verlag. Pág 457. ISBN: 3-540-40593-3. [En línea]:

[http://books.google.com.co/books?id=kcSZriBQGp4C&pg=PA468&lpg=PA468&dq=sobre+dioecia+en+especies+de+Lippia&source=bl&ots=Kg4yg-RU1y&sig=biIRBJ0yNMM0Q0obqv7OWo7Md4c&hl=es&sa=X&ei=3bd2Uci3DdX64AOH54GwDw&ved=0CEMQ6AEwAw#v=onepage&q=sobre%20dioecia%20en%20especies%20de%20Lippia&f=false]. Consultado: abril de 2013.

Kalemba, D. and A. Kunicka. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Current Medicinal Chemistry. 10(10), pp 813 – 829.

Klancnik, A., Piskernik, A., Jeršek, B. and Smole, S. 2010. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. Journal of Microbiological Methods. 81 (1), pp 121 – 126.

Koul, O., Walia, S. and Dhaliwal, G. 2008. Essential Oils as Green Pesticides: Potential and Constraints. Biopesticides International. 4 (1), pp 63 – 84.

Krolow, V., Bauer, C., y Costa, J. 2006. Effeito de óleos essenciais de plantas medicianis no controle de *Phytophthora infestans* em batata. Resumos do I Congresso Brasileiro de Agroecologia. Revista Brasilera de Agroecologia. 1 (1), 56 p.

Kunle, F. and Egharevba, O. 2011. Essential oil of *Lippia multiflora* Moldenke: A review. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 02 (01), pp 15 – 23.

Lahlou, M. 2004. Methods to Study the Phytochemistry and Bioactivity of Essential Oils. Phytotherapy research. 18, pp 435 – 448.

Lahlou, M. and Berrada, R. 2003. Composition and niticidal activity of essential oils of three chemotypes of *Rosmarinus officinalis* L.acclimatised in Morocco. Flavour and Fragrance Journal. 18 (1), pp 124 – 127.

Lin, L., Mukhopadhyay, S., Robbins, R. and Harnly, J. 2006. Identification and quantification of flavonoids of Mexican orégano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis. Journal of Food Composition and Analysis. 20, pp 361 – 369.

Liu, J.; Mercer, J. M.; Stam, L.; Gibson, G.; Zeng, Z.; Laurie, C. 1996. Genetic analysis of a morphological shape difference in the male genitalia of *Drosophila simulans* and *D. mauritana*. Genetics. 142 (1), pp 1129 – 1145.

López, S. 1997. Flora de Venezuela. *Verbenaceae*. Universidad de los Andes, Consejo de publicaciones/ Facultad de Farmacia. 438 p.

Lurie, C.; True, J. R.; Liu, J.; Mercer, J. M. 1997. An introgression analysis of quantitative trait loci that contribute to a morphological difference between *Drosophila simulans* and D. *mauritiana*. Genetics. 145 (1), pp 339 – 348.

MADR – Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. 2013. Anuario estadístico del sector agropecuario y pesquero 2012. Bogotá. Ed. JL. 205 p.

Marangon, C. 2006. Composição e atividade antifúngica de extratos de *Chenopodium ambrosioides* L. Tesis presentada titulo de Magister Scientiae en agroquímica, Universidad Federal de Viçosa, Brasil. 83 p.

Marston, A. 2011. Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. Journal of Chromatography A. 1218, pp 2676 – 2683.

Martínez, A. 2001. Aceites esenciales. Universidad de Antioquia, 34 p.

McNair, H. and Miller, J. 1997. Basic gas chromatography. EE.UU. (New York). Ed. John Wiley & Sons. pp 154 – 158.

Michel, C. and Blanc, G. 2000. Minimal inhibitory concentration methodology in aquaculture: The temperature effect. Aquaculture. 196. pp 311 – 318.

Moreira, M. 2006. Composição e atividade antifúngica do óleo essencial de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.). Tesis presentada título de Magister Scientiae en agroquímica, Universidad Federal de Viçosa, Brasil. 67 p.

Múlgura de Romero, M. Martínez, S. y Suyama, A. 1998. Morfología de las Inflorescencias en *Lippia* (*Verbenaceae*). Darwiniana. 36(1-4), pp 1 – 12.

Múlgura de Romero, M. 2000. Las Especies de *Lippia* L. sect. *Dioicolippia* Tronc. (*Verbenaceae*). Candollea. 55(2), pp. 227 – 254.

Muller-Riebau, F., Berger, B. and Yegen, O. 1995. Chemical composition and fungitoxic prop erties to phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. Journal of agricultural and food chemistry. 43 (8), pp 2262 – 2266.

Muller, R.F., Berger, B. and Yegen, O. 1995. Chemical composition and fungi toxic properties to phyto pathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. Journal Agriculture Food Chemical. 43 (1), pp 2262 – 2266.

Muñoz, A., Castañeda, M., Blanco, K., Cardenas, C., Reyes, J. y Kouznetsov, V. 2007. Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol. Scientia et Technica Año X. 33 (1), pp 125 – 128.

Nemeth E, Hethelyi E, Bernah J. 1994. Comparison studies on *Tanacetum vulgare* L. chemotypes. Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants. 2 (1), pp 85 – 92.

Núñez, M., Aguado, M., Bela, A., Vonka, C. y Sansberro, P. 2007. Farmacognosia y fitoquímica de *Lippia turbinata* G., *Verbenaceae*. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 6 (5), pp 262 – 263.
O´Leary, N. Denham, S., Salimena, F. and Múlgura, M. 2011. Species delimitation in *Lippia* section *Goniostachyum* (*Verbenaceae*) using the phylogenetic species concept. Botanical Journal of the Linnean Society. 170 (1), pp 197 – 219.

Oliveira, D., Leitäo, Bizzo; H., Lopes, D., Alviano, D., Alviano, C. e Leitäo, S. 2007. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. Food Chemistry. 101, pp 236 – 240.

Olivero, J., Güette, J. and Stashenko, E. 2009. Acute toxicity against *Artemia franciscana* of essential oils isolated from plants of the genus *Lippia* and *Piper collected* in Colombia. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 8 (5), pp 419 – 427.

Oluranti, O. 2010. Chemical transformations and phytochemical studies of bioactive components from extracts of *Rosmarinus officinalis* L. Trabajo de grado, presentado como requisito para optar al título de Doctor en Ciencias de la Facultad de Ciencias y Agricultura, Universidad de Fort Hare, 198 p.

Ortuño, M. 2006. Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. Ed. Aiyana, 1ra edición. 121 p.

Ospina, D., Álvarez, V., Torres, H.G., Sánchez, M.S. y Bonilla, C.R. 2011. Evaluación in vitro de la actividad inhibitoria de aceites esenciales de *Lippia origanoides* H.B.K. sobre el desarrollo micelial y la formación de esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk. Acta agronómica. 60 (4), pp 306 – 311.

Padulosi, S. 1996. Orégano: Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano. Ed. Bari (Italia), 182 p.

Parra-Torres, E. & Rodríguez-Lopoez, N. 2007. Plasticidad Fenotípica de *Lippia alba* y *Lippia origanoides* (Verbenaceae) en respuesta a la disponibilidad de luz. Acta biologica Colombia. 12 (S), pp 91 – 102.

Pârvu, M. and Pârvu, A. 2011. Antifungal plant extracts. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. 1 (1), pp 1055 – 1062.

Pascual, M., Slowing, K., Carretero, E., Sanchez, D. and Villar, A. 2001. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. Journal of Ethnopharmacology. 76, pp 201 – 214.

Pérez, W. y Forbes, G. 2011. Guía de identificación de plagas que afectan a la papa en la zona andina. Lima (Perú). Ed. Centro Internacional de la Papa, 21 p.

Peris, S. and Asensio, J. 2002. Organic acids plus botanicals. Feed International. 3, pp17 – 19.

Plodpai, P., Chuenchitt, S., Petcharat, V., Chakthong, S. and Piyawan, S. 2013. Anti-*Rhizoctonia solani* activity by Desmos chinensis extracts and its mechanism of action. Crop Protection. 43, pp 65 – 71.

Poulose, A. and Croteau, R. 1978. Biosynthesis of aromatic monoterpenes. Conversion of γ-terpinene to p-cymene and thymol in Thymus vulgaris L. Archives of Biochemistry and Biophysics. 187 (1), pp 307 – 314.

Quema, D. Fuertes, C., Acosta, J., Alvarez, D. y Hurtado, A. 2014. Evaluación a nivel in vitro de la fitotoxicidad y actividad antifúngica del aceite esencial de orégano de monte (*Lippia origanoides* H.B.K) sobre *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary aislado de tomate de mesa (*Solanum lycopersicum*). En: 3º Congreso Argentino de Fitopatología. Tucuman (Argentina), 4 – 6 junio, 2014.

Rasooli, I., Rezaei, M. B. and Allameh, A. 2006. Growth inhibition and morphological alterations of Aspergillus niger by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus xporlock*. Food Control. 17, pp 359 – 364.

Ribeiro, O., Terao, D., Portugal, A., Innecco, R. e Cavalcanti, C. 2008. Efeito de óleos essenciais de plantas do gênero *Lippia* sobre fungos contaminantes encontrados na micropropagação de plantas. Revista Ciência Agronómica. 39 (1), pp 94 – 100.

Riveros, A. y Alba, S. 2010. Inducción de resistencia en plantas. Planta-patógeno. San José (Costa Rica). Ed. IICA. 135 p.

Rodríguez, D. y Sanabria, M. 2005. Efecto del extracto de tres plantas silvestres sobre la Rizoctoniosis, la mancha sureña del maíz y los patógenos que las causan. Interciencia. 30 (012), pp 739 – 744.

Rohlf, F. 2005. TpsDig, digitize landmarks and outlines, version 2.05. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.

Ruiz, C., Tunarosa, F., Martínez, J. y Stashenko, E. 2007. Estudio comparativo por GC-MS de metabolitos secundarios volátiles de dos quimiotipos de *Lippia*

origanoides H.B.K., obtenidos por diferentes técnicas de extracción. Scientia Et Technica X. 033 (1), pp 325 – 328.

Saito, M. 2004. As plantas praguicidas: alternativa para o controle de pragas da agricultura. Brasil. Ed. Embrapa, [En linea]: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/Saito_plantasID-xWZZuffPN5.pdf, consultado: noviembre 2012.

Salgado, L. 2009. Óleos essenciais no controle fitossanitário de plantas. En: Bettiol, W. y Morandi, M. Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas. Jaguariúna (Brasil). Ed. Embrapa meio ambiente, 1a ed. pp 139 – 152.

Sangronis, J., Ortiz, F., Valera, R., Rangel, M., Rodriguez, D. y Sanabria, M. 2009. Efecto de extractos etanólicos de *Lippia origanoides* para el control de la antracnosis en frutos de mango (*Mangifera indica*). Fitopatologia Venezolana. 22 (2). 44 p.

Sarmento, R. 2012. Efeito de óleos essenciais no controle de fungos fitopatogênicos. Trabajo de grado, presentado como requisito para optar al título de Magister en producción vegetal, Universidade Federal do Tocantins, 135 p.

Shahverdi, A., Abdolpour, F.,Monsef-Esfahani, R. and Farsam, H. 2007. A TLC bioautographic assay for the detection of nitrofurantoin resistance reversal compound. Journal of Chromatography B. 850 (1), pp 528 – 530.

Sharapin, N. 2000. Fundamentos de tecnologías de productos fitoterapéuticos. Bogota (Colombia). Convenio Andrés Bello, 174 p.

Silva, M., Morandi, M., Paula Júnior, T., Venzon, M. e Fonseca, M. 2010. Uso de princípios bioativos de plantas no controle de fitopatógenos e pragas. Informe Agropecuário. 31 (255), pp 70 – 77.

Sousa, T., Silva, R., Oliveira, R., Monçáo, N., Oliveira, G. e Citó, A. 2012. Atividade antifúngica do extrato etanólico e frações das folhas de *Lippia origanoides* H.B.K. frente ao fitopatógeno *Fusarium oxysporum.* Memorias: 64ª Reunião Anual da SBPC, Sáo Luís (Brasil), [En línea]: http://www.sbpcnet.org.br/livro/64ra/resumos/resumos/6022.htm, consultado: febrero, 2013.

Soylu, E., Kurt, S. and Soylu, S. 2010. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. International Journal of Food Microbiology. 143 (3), pp 183 – 189.

Soylu, E., Soylu, S. and Kurt S. 2006. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. Mycopathologia. 161(2), pp 119 – 128.

Spooner, D., McLean, K., Ramsay, G., Waugh, R. and Bryan G. 2005. A single domestication for potato based onmultilocus amplified fragment length polymorphism genotyping. Proceedings of the National Academy of Sciences. 102 (41), pp 14694 –14699.

Stangarlin, J., Kuhn, O., Assi, L., Schwan, K. 2011. Control of plant diseases using extracts from medicinal plants and fungi. Science against microbial pathogens: Communicating current research and technological advances.1 (1), pp 1032 – 1042.

Stashenko, E., Jaramillo, B. y Martínez, J. 2003. Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia *Verbenaceae*. Revista academia colombiana de ciencias exactas, fisicas y naturales. 27 (105), pp 579 – 597.

Svircev, A., Smith, R., Zhou, T., Hernandez, M., Liu, W. and Chu, C. 2007. Effects of thymol fumigation on survival and ultraestructure of *Monilia fruticola.* Postharvest Biology and Technology. 45 (1), pp 228 – 233.

Taroco, R., Seija V. y Vignoli R. 2006. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. En: Temas de Bacteriología y Virología. 2ª edición, Ed. Universidad de la República (Uruguay), 663 p.

Terblanche, F. and Kornelius, G. 1996. Essential oil constituents of the genus *Lippia* (*Verbenaceae*): a review. Journal of essential oil research. 8, pp 471 – 485.

Thembo, K., Vismer, H., Nyazema, N., Gelderblom, W. and Katerere, D. 2010. Antifungal activity of four weedy plant extracts against selected mycotoxigenic fungi. Journal of applied microbiology. 109 (1), pp 1479 –1486.

Torres, H. 2002. Manual de las enfermedades más importantes de la papa en el Perú. Lima (Perú). Ed. Centro Internacional de la Papa (CIP), 59 p.

Tsao, R. and Zhou, T. 2000. Antifungal activity of monoterpenoids against postharvest pathogens *Botrytis cinerea* and *Monilinia fructicola.* Journal Essential Oil Reserarch. 12 (1), pp 113 – 121.

Ultee A., Bennik M. and Moezelaar R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Applied and environmental microbiology. 68, pp 1561 – 1568.

Uscátegui, Y. 2013. Bioactividad de hidrosoles, aceites esenciales y mezclas de extractos de especies vegetales para el control de *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora infestans* y *Fusarium oxysporum* en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum*). Trabajo de grado para optar al título de Magister en Diseño y Gestión de Procesos. Universidad de la Sabana. Bogotá (Colombia), 120 p.

Vaillant, D., Romeu, C., Ramos, E., González, M., Ramírez, R. y González, J. 2009. Efecto inhibitorio *in vitro* de cinco monoterpenos de aceites esenciales sobre un aislado de *Rhizoctonia solani* en papa (*Solanum tuberosum* L.). Fitosanidad. 13 (3), pp 197 – 200.

Vega-Vela, N. 2011. Estructura Poblacional de *Lippia origanoides* H.B.K. en el Cañón del Rio Chicamocha (Boyacá & Santander, COL). Tesis de grado Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Bogotá (Colombia). pp. 78.

Viana, B. e Tavares, M. 2013. Espécies de *Lippia* (*Verbenaceae*), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. Macapá. 3 (1), pp 109 – 123.

Victório, C., Alviano, D., Alviano, C. and Lage, C. 2009. Chemical composition of the fractions of leaf oil of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm. and antimicrobial activity. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 19 (3), pp 697 – 701.

Vicuña, G., Stashenko, E. and Fuertes, J. 2009. Chemical composition of the *Lippia origanoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. Fitoterapia. 81, pp 343 – 349.

Villarreal, H., Porras, P., Santa, A., Lagoeyte, J. y Muñoz, D. 2007. Costos de producción de papa en las principales zonas productoras de Colombia. [En línea]: http://www.fedepapa.org.co/files/estadistica/estudio.pdf, consultado: noviembre 2012.

Weingartner, D. 1981. Early Bligh. In: Compendium of Potato Diseases. W.J. Hooker. St. Paul MN (EE.UU). Ed. American Phytopathological Society, pp. 43 – 44.

Xu, J., F. Zhou, B. P. Ji, R. S. Pei, and N. Xu. 2008. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. Letters in Applied Microbiology. 47 (1), pp 174 – 179.

Zambonelli, A., Aulerio, A.D., Bianchi. A. and Albasini, A. 1996. Effects of essential oils on phytopathogenic fungi in vitro. Journal of Phytopathology. 94, pp 491 – 495.