

**EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DEL PATÓGENO *Rhizoctonia solani*
AISLADO DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.) FRENTE AL ACEITE ESENCIAL
DE ORÉGANO SILVESTRE *Lippia origanoides* H.B.K, Y DETERMINACIÓN DE
LA FRACCIÓN MAS ACTIVA A NIVEL *in vitro*.**

**LUCY MARCELA FIGUEROA BELTRAN
OLMER IVAN RUANO CASTILLO**

**UNIVERSIDA DE NARIÑO
FACULTAD DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
SAN JUAN DE PASTO
2013**

**EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DEL PATÓGENO *Rhizoctonia solani*
AISLADO DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.) FRENTE AL ACEITE ESENCIAL
DE ORÉGANO SILVESTRE *Lippia origanoides* H.B.K, Y DETERMINACION DE
LA FRACCION MAS ACTIVA A NIVEL *in vitro*.**

**LUCY MARCELA FIGUEROA BELTRAN
OLMER IVAN RUANO CASTILLO**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Ingeniero Agroindustrial**

**Asesor:
JULIAN MARCELO ACOSTA
Ingeniero Agroindustrial**

**UNIVERSIDA DE NARIÑO
FACULTAD DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
SAN JUAN DE PASTO
2013**

NOTA DE RESPONSABILIDAD

“Las ideas y conclusiones aportadas en el trabajo son responsabilidad exclusiva de su autor”

Artículo 1 Acuerdo N° 324 de Octubre 11 de 1966 emanada por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a Dios por haberme dado el privilegio de vivir y compartir mi vida con personas realmente valiosas, por ser mi fuerza cuando se agotan las mías, por mostrarme la luz cuando todo parecía tinieblas y por bendecirme cada día.

A mi madre Olga Doris Beltrán por su amor, comprensión, consejos e infinito apoyo, por haberme formado con buenos sentimientos, hábitos y valores, lo cual me ha ayudado a salir adelante en los momentos más difíciles.

A mi padre, que a pesar de nuestra distancia física, está siempre conmigo y aunque nos faltaron muchas cosas por vivir juntos, sé que siempre me ha cuidado y me ha guiado desde el cielo.

A mi tía abuela que fue como mi segunda madre, por su dedicación y sus sabios consejos a quien le debo gran parte de lo que soy.

A mis hermanos por estar siempre presentes, acompañándome y brindándome su apoyo. A mis sobrinos quienes son mi motivación, inspiración y felicidad.

A mi novio Rubén Darío, por compartir conmigo buenos y malos momentos, por brindarme su amor y comprensión.

A mi compañero y gran amigo Olmer Ivan Ruano por su amistad y confianza.

A todas las personas que de una u otra manera me brindaron su apoyo en el momento preciso.

A todos mil gracias, y Dios los bendiga.

Lucy Marcela Figueroa

“El tiempo de Dios es perfecto”

DEDICATORIA

*A Dios por iluminar mi camino y mantenerme sano y salvo siempre;
A mis Padres Rosario y German por su constante apoyo, enorme amor, preocupación y esfuerzo que pusieron para que alcanzara esta Meta; A mi novia Karla Córdoba que llegó a mi vida con su sinceridad y lindos sentimientos, siendo la base de inspiración para ser una mejor persona, LA AMO. A Lucy Figueroa por su colaboración y acompañamiento en el desarrollo de este trabajo.
En general a todas aquellas personas que estuvieron presentes durante cada una de las etapas que se presentaron en mi camino.
Gracias*

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darnos la oportunidad de cumplir este logro.

A nuestras familias por el apoyo incondicional.

Al Ingeniero Julián Acosta, por su tiempo y colaboración durante el desarrollo del presente trabajo.

MSc. Olga Benavides y MSc. Oscar Arango, por sus valiosas y oportunas recomendaciones.

Al Ingeniero David Álvarez por su contribución y atención durante el desarrollo del trabajo.

Laboratorios Especializados de la Universidad de Nariño.

Al Sistema de Investigaciones de la Universidad de Nariño (VIPRI), por la financiación de este trabajo.

A todas y cada una de las personas que de una u otra manera hicieron posible el desarrollo de este trabajo.

Mil gracias...

RESUMEN

Una de las enfermedades que más daño causa al cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) es la “rizoconiosis” causada por el fitopatógeno *Rhizoctonia solani* el cual produce pérdidas en el rendimiento y calidad del tubérculo. El manejo fitosanitario se basa en el uso indiscriminado de productos agroquímicos los cuales ocasionan graves problemas de contaminación y desequilibrio ambiental. En la última década se ha incrementado la tendencia al uso de extractos naturales como alternativas bioracionales en la agricultura, una opción son los aceites esenciales los cuales generan menos efectos negativos. El objetivo de esta investigación fue evaluar la sensibilidad del patógeno *Rhizoctonia solani* aislado de papa (*Solanum tuberosum* L.) frente al aceite esencial de orégano silvestre (*Lippia origanoides* H.B.K) y determinar la fracción más activa a nivel *in vitro*. El aceite esencial se obtuvo mediante la técnica de arrastre por vapor, se evaluó el efecto fungicida del aceite frente a *R. solani* mediante dilución en concentraciones: 0,10, 100, 1.000 y 10.000 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. Se calculó el porcentaje de crecimiento del fitopatógeno analizando los datos en el programa ImageJ. Adicionalmente, se estandarizó la técnica de bioautografía por medio de Cromatografía en Capa Delgada (tolueno / acetato de etilo 9:1 v/v) para identificar y separar las fracciones más bioactivas del aceite esencial. En el análisis de composición del aceite mediante GC-MS se encontró que los compuestos mayoritarios fueron timol (83%), p-cimeno(5,5%), mirceno (3%), γ -terpineno (2,5%). La concentración mínima inhibitoria (CMI) de aceite frente a *R. solani* fue 110 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ y mediante la técnica de bioautografía se encontró que la región activa donde *R. solani* no crece corresponde al metabolito secundario timol ($R_f=0,61$). Finalmente se determinó que el fitopatógeno *R. solani* presenta alta sensibilidad *in vitro* frente al aceite esencial de orégano silvestre.

Palabras clave: Cromatografía, bioautografía, biofungicida, *Lippia origanoides*, *Solanum tuberosum* L, *R. solani*.

ABSTRACT

One of the most damaging diseases to potatoes (*Solanum tuberosum* L.) is the " rizoctoniasis " caused by the plant pathogen *Rhizoctonia solani* which causes losses in yield and tuber quality . The plant management is based on the indiscriminate use of agrochemicals which cause serious pollution problems and environmental imbalance . In the last decade has increased tendency to use natural extracts like biorational alternative in agriculture, an option are essential oils which generate less negative effects. The objective of this research was to evaluate the sensitivity of the pathogen *Rhizoctonia solani* isolated from potato (*Solanum tuberosum* L.) against wild oregano essential oil (*Lippia origanoides* HBK) and determine the most active fraction in vitro level . The essential oil is obtained by steam- pull technique was evaluated fungicidal against oil *R. solani* by dilution concentrations : 0.10 , 100, 1,000 and 10,000 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. The percentage of growth of phytopathogenic analyzing data on ImageJ . Additionally, standardized technique bioautography via Thin Layer Chromatography (toluene / ethyl acetate 9:1 v / v) to identify and separate the most bioactive fractions of essential oil. In the oil composition analysis by GC -MS was found that the major components were thymol (83%) , p -cymene (5.5%) , myrcene (3%) , γ - terpinene (2.5%) . The minimum inhibitory concentration (MIC) of oil against *R. solani* was 110 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ and by bioautography technique was found that the active region where *R. solani* not grow secondary metabolite corresponds to thymol ($R_f = 0.61$) . Finally determined that the pathogen *R. solani* is highly sensitive in vitro against wild oregano essential oil .

Keywords: chromatography , bioautography , fungicide , *Lippia origanoides* , *Solanum tuberosum* L , *R. solani* .

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	13
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
2. JUSTIFICACIÓN	18
3. OBJETIVOS DEL PROYECTO	20
3.1 OBJETIVO GENERAL	20
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:	20
4. MARCO TEÓRICO	21
4.1 TAXONOMÍA DE LA PAPA.....	21
4.2 MORFOLOGÍA.....	21
4.3 TAXONOMÍA, FORMA DE REPRODUCCIÓN E INFECCIÓN DEL FITOPATÓGENO <i>RHIZOCTONIA SOLANI</i>	23
4.4 ACEITES ESENCIALES	24
4.5 ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO	25
4.6 COMPOSICIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO	26
4.7 EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO SILVESTRE ..	27
4.8 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA Y ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO DE MONTE Y OTROS ACEITES ESENCIALES.....	28
4.9 TÉCNICAS DE EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES	30
4.9.1 Cromatografía de Gases GC-FID/MS.	31
4.10 BIOAUTOGRAFÍA EN CROMATOGRFÍA EN CAPA DELGADA CCD.	31
5. METODOLOGÍA	33
5.1 OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL	33
5.1.1 Extracción del aceite esencial de orégano silvestre <i>Lippia organoides</i> H.B.K.	33
5.1.2 Fraccionamiento de aceite esencial mediante cromatografía en capa delgada (C.C.D.).	34

5.1.3	Identificación y cuantificación de los componentes mayoritarios presentes en el aceite esencial mediante análisis por cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-FID) y (GC/MS).	35
5.2	BIOENSAYOS.....	37
5.2.1	Aislamiento del Fitopatógeno.	37
5.2.1	Evaluación de la actividad biofungicida del aceite esencial.	37
5.2.2	Determinación de los niveles de sensibilidad de los aislamientos de <i>Rhizoctonia solani</i> al aceite esencial de orégano.	38
5.2.3	Identificación y recuperación de la fracción antifúngica del aceite esencial mediante la técnica (C.C.D).	39
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
6.1	OBTENCIÓN Y FRACCIONAMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL.....	41
6.1.1	Extracción del aceite esencial de orégano silvestre <i>Lippia origanoides</i> H.B.K.	41
6.1.3	Identificación y cuantificación de los componentes activos presentes en el aceite esencial mediante análisis por cromatografía de gases (GC-FID y GC/MS).	45
6.2	BIOENSAYOS.....	52
6.2.1	Aislamiento del Fitopatógeno.	52
6.2.2	Evaluación de la actividad biofungicida del aceite esencial.	52
6.2.3	Determinación de los niveles de sensibilidad de los aislamientos de <i>Rhizoctonia solani</i> al aceite esencial de orégano.	59
6.2.4	Identificación y recuperación de la fracción antifúngica del aceite esencial mediante la técnica (C.C.D).	62
	CONCLUSIONES	65
	RECOMENDACIONES	66
	BIBLIOGRAFÍA.....	67

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Concentraciones de aceite esencial <i>Lippia organoides</i> H.B.K evaluadas en <i>Rhizoctonia solani</i> a nivel in vitro.....	37
Tabla 2. Condiciones de extracción de aceite esencial mediante arrastre con vapor.....	41
Tabla 3. Cromatografía en Capa Delgada del aceite esencial de Orégano silvestre <i>Lippia organoides</i> H.B.K.	44
Tabla 4. Composición del aceite esencial de <i>Lippia organoides</i> H.B.K. de la región del <i>Alto Patía</i>	46
Tabla 5. Resultados de la evaluación de la actividad biofungicida del aceite esencial de orégano en diferentes concentraciones frente al porcentaje de crecimiento de <i>R. solani</i> en el octavo día de seguimiento	53
Tabla 6. Análisis de varianza para ensayo I.	54
Tabla 7. Prueba de Tukey $P < 0,05$ para Ensayo I	54
Tabla 8. Análisis de varianza para el ensayo II.....	55
Tabla 9. Prueba de Tukey para ensayo II	56
Tabla 10. Análisis de varianza para ensayo III	57
Tabla 11. Prueba de Tukey correspondiente al ensayo III.....	57
Tabla 12. Crecimiento de <i>R. solani</i> frente a diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano.....	60
Tabla 13. Relación de la sensibilidad de <i>R. Solani</i> frente al aceite esencial de <i>Lippia organoides</i> H.B.K. en base a la escala de Shattock.	61

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructuras químicas de los principales componentes presentes en el aceite de orégano (<i>Lippia origanoides</i>).	27
Figura 2. Unidad de extracción de arrastre por vapor, Planta Piloto de Ingeniería Agroindustrial Universidad de Nariño.....	34
Figura 3. Materiales y reactivos utilizados en la separación de los compuestos de aceite esencial de orégano silvestre (<i>Lippia origanoides</i> H.B.K), mediante Cromatografía en Capa Delgada C.C.D.	35
Figura 4. Equipo de cromatografía de gases (GC-MS), para la Identificación y cuantificación de los componentes activos presentes en el aceite esencial de orégano.....	36
Figura 5. Recuperación de la fracción antifúngica del aceite esencial mediante la técnica (C.C.D).....	40
Figura 6. Aceite esencial de orégano silvestre <i>Lippia origanoides</i> H.B.K extraído utilizando la técnica de Arrastre por Vapor.	42
Figura 7. Fraccionamiento del aceite esencial de orégano silvestre <i>Lippia origanoides</i> H.B.K., mediante Cromatografía en Capa Delgada.....	43
Figura 8. Perfil Cromatográfico del aceite esencial de orégano <i>Lippia origanoides</i> H.B.K obtenido mediante análisis en Cromatografía de gases (GC-FID)/MS.	45
Figura 9. Perfil cromatográfico de la fracción 1 obtenida mediante CCD.....	48
Figura 10. Perfil cromatográfico de la fracción 2 de la muestra de aceite esencial obtenida mediante CCD.	49
Figura 11. Perfil cromatográfico de la fracción 3 de la muestra de aceite esencial obtenida mediante CCD.	50
Figura 12. Perfil cromatográfico de la fracción 4 de la muestra de aceite esencial obtenida mediante CCD.	51
Figura 13. <i>Rhizoctonia solani</i> aislada de papa (<i>Solanum tuberosum</i> L.) vista en el microscopio (40x).....	52
Figura 14. Concentración de aceite esencial de $10 \mu\text{L.ml}^{-1}$ a $10.000 \mu\text{L.ml}^{-1}$ (Ensayo I).	55

Figura 15.	Concentración de aceite esencial de 0 $\mu\text{L.ml}^{-1}$ a 100 $\mu\text{L.ml}^{-1}$ (Ensayo II).	56
Figura 16.	Concentración de aceite esencial de 0 $\mu\text{L.ml}^{-1}$ a 140 $\mu\text{L.ml}^{-1}$ (Ensayo III).	58
Figura 17.	Concentraciones de aceite esencial evaluadas sobre <i>R. solani</i> aislado de papa (<i>Solanum tuberosum</i>), a nivel in vitro, observadas después de ocho días de incubación.....	59
Figura 18.	Cromatograma de fraccionamiento de aceite (placas A y B) y Bioautograma donde se evalúa el aceite esencial de <i>L. organoides</i> H.B.K frente a <i>R. solani</i> (placa C).	63

INTRODUCCIÓN

Hoy en día el uso irracional de productos sintéticos o químicos, como los fungicidas utilizados para el control de plagas en la producción de alimentos ha traído consigo efectos negativos o perjudiciales en la salud del consumidor y también del medio ambiente; de acuerdo a lo anterior es necesario evaluar extractos de diferentes plantas con características amigables al ser humano y al medio ambiente y que además posean propiedades antifúngicas y/o antimicrobianas, pero que además su obtención sea de bajo costo; es el caso del aceite esencial de orégano de monte *Lippia origanoides*, un extracto que ha presentado alta eficiencia en cuanto a estudios relacionados con la evaluación de tratamientos frente a diferentes patógenos, inhibiendo su desarrollo y crecimiento. Además, de llevar a cabo la evaluación del extracto natural, se debe conocer la composición del mismo y establecer que compuestos son responsables de mencionada actividad antifúngica y también cuantificar su presencia. Lo anterior se puede realizar mediante la aplicación de técnicas analíticas de separación como la cromatografía de gases o de capa fina CCD. Por último es de gran importancia experimentar con nuevas técnicas de evaluación, que permitan identificar a nivel *in vitro* la acción que presentan los metabolitos secundarios frente al desarrollo de los microorganismos en estudio, dicha técnica es conocida como Bioautografía, la cual combina la cromatografía en capa fina, fraccionando un determinado compuesto y su acción de inhibición frente a un microorganismo a nivel *in vitro*.

De acuerdo con lo anterior, en este trabajo se pretende aportar con posibles soluciones a las problemáticas existentes, relacionadas con la producción de papa (*Solanum tuberosum*); ya que es un cultivo que constituye una valiosa fuente de alimentación en un gran número de países incluido Colombia. Para satisfacer la demanda a los mercados nacionales e internacionales y potenciales compradores de productos con excelente calidad es necesario mantener el control de enfermedades, especialmente las producidas por hongos fitopatógenos, ya que debido a esto se causan las mayores pérdidas económicas dentro de la cadena productiva y en diferentes regiones del país y del departamento de Nariño (Skandamis *et al.*, 2001). Una de las enfermedades que más daño causa a este cultivo es la rizoctoniasis causada por el patógeno *Rhizoctonia solani*, el cual se encuentra en la mayoría de las áreas que son cultivadas, y está presente desde la emergencia hasta la cosecha afectando tanto a la planta como al tubérculo; disminuye el rendimiento y causa pérdidas significativas en los niveles de producción.

Para llevar a cabo el control de esta problemática se ha optado por el uso de productos sintéticos que a medida del tiempo ha incrementado su aplicación, por lo tanto los efectos se han tornado perjudiciales a la salud del consumidor y además deterioran la calidad del medio ambiente.

Por esta razón, se ha incrementado la tendencia al uso de extractos naturales como los aceites esenciales, que han llegado a constituir una prometedora alternativa como fuente de sustancias con actividad antifúngica, siendo promisorio el estudio de plantas como es el caso del orégano silvestre (*Lippia origanoides* H.B.K).

En este orden, la importancia de realizar la presente investigación se basa en el contexto en el que se encuentra el departamento de Nariño, ya que al ser de carácter netamente agrícola, necesita de la asesoría de profesionales que colaboren y trabajen constantemente en la búsqueda de soluciones eficaces frente a la diversidad de problemas que se presentan en la producción de sus cultivos y que además de esto, emitan nuevas oportunidades de desarrollo social, económico y productivo en cada etapa en las diferentes cadenas productivas.

Por ello, el objetivo de la presente investigación consiste en evaluar la sensibilidad del fitopatógeno *Rhizoctonia solani* un microorganismo aislado de papa, frente al aceite esencial de orégano silvestre *Lippia origanoides* H.B.K y además determinar cuál de sus componentes es más activo sobre su crecimiento a nivel *in vitro*.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) constituye una valiosa fuente de alimentación en un gran número de países (Estévez *et al.*, 2001). En Colombia se distribuye en 14 departamentos; los cuatro mayores productores son: Cundinamarca (45%), Boyacá (22%), Nariño (13%) y Antioquia (8%) (DANE, 2002).

Dentro de las labores agrícolas que necesita el cultivo, el control de enfermedades es una de las más importantes, y una que más daño causa a este cultivo es la rizoctoniasis causada por el hongo *Rhizoctonia solani* (Castellanos *et al.*, 2005). Este patógeno está presente en numerosas áreas productivas, y 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 (Acuña y Vargas, 2004), gran parte de esto se debe a la descomposición por hongos que limita en gran medida su valor económico. *Rhizoctonia solani* también puede causar lesiones en el tallo en más del 90% de las plantas y reducir significativamente el rendimiento hasta en un 31,5% (Carling *et al.*, 1989) así como el peso de los tubérculos (Banville, 1989). La enfermedad se manifiesta en las partes subterráneas del cultivo, produciendo una reducción significativa del vigor de las plantas, ya que causa muerte de brotes por la formación de chancros que pueden llegar a rodear el tallo, genera una reducción del sistema radical, además produce esclerocios superficiales en tubérculos, malformaciones, cambios de tamaño y disminución en cantidad producida de éstos deteriorando su calidad y ocasionando pérdidas de hasta un 50% y hasta una incidencia en el cultivo y la postcosecha comprendida entre el 60 y 70%, de muchos países productores de papa, entre ellos Colombia (Wilson *et al.*, 2008).

Al utilizar fungicidas como medio de inhibición frente a este tipo de hongo, la preocupación está *encaminada* a la presencia de residuos químicos en los alimentos, que generan con el tiempo, problemas cancerígenos y teratogénicos por su toxicidad residual en los productos (Skandamis *et al.*, 2001). Además, el abuso de estos compuestos en los últimos años ha favorecido el desarrollo de especies fúngicas resistentes a su acción (Murray y Pfaller, 2006), razón por la cual se ha incrementado la búsqueda de alternativas de manejo de estos problemas fitosanitarios (Jiménez, 2010), utilizando diferentes extractos de plantas como los aceites esenciales, los cuales han demostrado influencia biocida sobre diferentes enfermedades que afectan seriamente los cultivos.

Una de estas especies es el orégano silvestre o “de monte”, planta herbácea que crece espontáneamente en la zona del Alto Patía durante todo el año, y la cual posee compuestos como timol y carvacrol (Bolaños y Villota, 2010), los cuales han sido reportados por diferentes autores como compuestos biocidas que se pueden integrar en esquemas de manejo de fitopatógenos (Zanandrea, 2004).

Por tanto el presente proyecto se enfoca en la evaluación de las propiedades biofungicidas del aceite esencial de orégano (*L. origanoides* H.B.K), frente al patógeno *R. solani* el cual representa una presión y un problema constante en el sistema de producción de papa, generando problemas ambientales, económicos y de salud del operario como del consumidor final.

2. JUSTIFICACIÓN

La papa es el tubérculo más relevante en los Andes Colombianos (Cevipapa, 2004). Aproximadamente 134.812 ha se siembran con papa en Colombia (FAOSTAT, 2008), distribuidas en 250 municipios entre 2.000 y 3.500 m.s.n.m, donde el cultivo es una fuente primordial de empleo, ya que ocupa cerca de 20 millones de jornales al año, y a esta actividad se encuentran vinculadas de forma directa aproximadamente 90.000 familias (Villarreal, *et al.*, 2007).

Para satisfacer la demanda a los mercados nacionales e internacionales y potenciales compradores de productos con excelente calidad es necesario mantener el control de enfermedades especialmente las producidas por hongos fitopatógenos, ya que debido a esto se causan las mayores pérdidas económicas aproximadamente entre 8 y 12 % de los costos de producción total del cultivo (Del Valle, 1997 y Orozco *et al.*, 2001). La cadena productiva de este producto está promoviendo el uso de sustancias químicas que en la mayoría de casos son muy efectivas, pero que generan con el tiempo, problemas cancerígenos y teratogénicos por su toxicidad residual en los productos (Skandamis *et al.*, 2001). Además, el abuso de estos compuestos en los últimos años ha favorecido el desarrollo de especies fúngicas resistentes a su acción (Murray y Pfaller, 2006). Por esta razón, se ha incrementado la tendencia al uso de extractos naturales como los aceites esenciales, que han llegado a constituir una prometedora alternativa como fuente de sustancias con actividad antifúngica (Hernández *et al.*, 2007), siendo promisorio el estudio de plantas como es el caso del orégano silvestre el cual sus extractos han sido utilizados y evaluados sobre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, hongos filamentosos y levaduras, presentando altos porcentajes de inhibición.

De lo anterior, un ejemplo es la actividad fungicida *in vitro* de cinco monoterpenos a diferentes concentraciones sobre un aislado del hongo *R. solani* obtenido de papa, en donde se destaca la actividad fungicida del timol y mentol, los cuales mostraron el 100% de inhibición a las concentraciones del 0,5 y el 0,1% para cada ensayo (Vaillant *et al.*, 2009); también se ha evaluado el efecto de algunos aceites esenciales sobre el crecimiento de *Phytophthora infestans* (mont.) de bary en condiciones de laboratorio, en donde se usaron los aceites esenciales comerciales de las especies *Origanum vulgare*, *Mentha piperita*, *Ocimum basilicum*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Pogostemon cablin* y *Salvia officinalis*; en donde todos los extractos a diferentes concentraciones presentaron inhibición sobre el crecimiento del fitopatógeno en estudio (Carrillo *et al.*, 2010). La aplicación de extractos naturales también se ha realizado en otra clase de cultivos diferentes a la papa, como es el caso de evaluar el efecto antifúngico del Quitosano y de los aceites esenciales de clavo, canela y tomillo individualmente y combinados sobre *R. stolonifer*. Los resultados de los experimentos *in vitro* demostraron que los tratamientos más efectivos fueron obtenidos con los aceites

esenciales (clavo, canela y tomillo) a 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y con quitosano a 10 mg mL⁻¹, así como las combinaciones de estos en donde se observó un efecto aditivo en la mayoría de los tratamientos y un efecto sinérgico en la combinación de quitosano con el aceite esencial de tomillo. Los experimentos *in situ* mostraron que el quitosano a 10 mg mL⁻¹ fue el tratamiento más efectivo para reducir la pudrición fúngica y la pérdida de peso de los frutos de jitomate, *in situ* no se observó efecto sinérgico con ninguna combinación de quitosano y aceites esenciales, mientras que *in vitro* se presentó efecto aditivo e incluso en algunos casos hasta sinérgico (Hernández, 2012).

Lo anterior se debe a que los aceites esenciales son mezclas homogéneas de compuestos químicos orgánicos, correspondientes a una misma familia química, los terpenoides (Cerpa, 2007). Los aceites esenciales están contenidos en glándulas o vesículas secretoras inmersas en los tejidos de las hojas, flores, corteza y semillas de los frutos de muchas especies. Las plantas pueden producir aceite esencial para muchos y diversos fines; por un lado protegen a la planta de plagas, enfermedades e inclusive la invasión de otras plantas, para atraer insectos y aves (polinizantes) (Martínez *et al.*, 2003). Los aceites esenciales de plantas aromáticas y medicinales presentan bioactividades notables (propiedades antifúngicas, antibacteriales y antioxidantes), atrayendo la atención de importantes sectores de la industria farmacéutica, agrícola, cosmética y de alimentos, entre otras, por sus posibles y viables aplicaciones (Muñoz *et al.*, 2007). Esta investigación por tanto, está encaminada hacia la búsqueda de nuevos productos de origen biológico para el control de fitopatógenos como *Rhizoctonia solani*, que no causen efectos negativos en la salud del consumidor, que generen menor costo de producción y vayan en pro de la conservación y/o bajo impacto del ambiente, en comparación a los productos utilizados tradicionalmente.

3. OBJETIVOS DEL PROYECTO

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la sensibilidad del patógeno *Rhizoctonia solani* aislado de papa (*Solanum tuberosum* L.) frente al aceite esencial de orégano silvestre (*Lippia origanoides* H.B.K) y determinar la fracción más activa a nivel *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Determinar los compuestos activos del aceite esencial de orégano (*L. origanoides* H.B.K.) mediante la técnica de fraccionamiento en cromatografía en capa delgada (C.C.D.)
- Determinar la composición química del aceite esencial de orégano (*L. origanoides* H.B.K.)
- Evaluar el potencial biofungicida del aceite esencial de orégano (*L. origanoides* H.B.K) y su fracción más activa frente al patógeno *Rhizoctonia solani*.

4. MARCO TEÓRICO

La papa está compuesta por el 80% de agua y la materia seca constituida por carbohidratos, proteínas, celulosa, minerales, vitaminas A y C proporcionan una dieta balanceada, además es utilizada en la industria para la producción de almidón, comidas rápidas, papas a la francesa, chips, hojuelas y puré (INTA, 2004).

4.1 TAXONOMÍA DE LA PAPA

Reino: Vegetal
División: Fanerógama
Subdivisión: Angiosperma
Clase: Dicotiledóneas
Subclase: Simpétala
Sección: Anisocárpeas
Orden: Tubifloríneas
Familia: Solanácea
Género: *Solanum*
Especie: *S. Tuberosum* L.

4.2 MORFOLOGÍA

La papa es una planta suculenta, herbácea y anual por su parte aérea y perenne por sus tubérculos (tallos subterráneos) que se desarrollan al final de los estolones que nacen del tallo principal, y a veces de varios tallos, según el número de yemas que hayan brotado del tubérculo. Los tallos son de sección angular y en las axilas de las hojas con los tallos se forman ramificaciones secundarias. Las hojas son alternas y las primeras tienen aspecto simple y vienen después de las hojas compuestas imparipinnadas con tres pares de hojuelas laterales y una hojuela terminal entre las hojuelas laterales está las hojuelas en segundo orden.

Las flores son hermafroditas, tetra cíclicas, pentámeras; el cáliz es gamocépalo lobulado; la corola de color blanco a púrpura con cinco estambres anteras de color amarillo más fuerte o anaranjado que por supuesto producen polen.

Las raíces se desarrollan principalmente en el verticilo en los nudos del tallo principal su crecimiento es primero vertical dentro de la capa de suelo arable, luego horizontal de 25 a 50 cm, la planta de papa posee un sistema radicular fibroso y muy ramificado.

El tubérculo es un sistema morfológico ramificado, los ojos de los tubérculos tienen una disposición rotada alterna desde el extremo proximal del tubérculo donde va inserto el estolón hasta el extremo distal, donde los ojos son más abundantes (Magfor, 1999).

Las enfermedades producidas por microorganismos fitopatógenos, tales como bacterias, nematodos u hongos, constituyen la principal causa de pérdida en la producción agrícola, tanto en cosecha como en postcosecha (Rey *et al.*, 2000). Dentro de los distintos fitopatógenos, los hongos constituyen uno de los principales grupos, tanto por la diversidad de especies existentes, como por las pérdidas que ocasionan en los diferentes rubros agrícolas (Papavizas, 1985).

El cultivo de papa se reporta como el cuarto cultivo más importante en producción a nivel mundial después del maíz, el trigo y el arroz (Faostat, 2008), y el tubérculo más relevante en los Andes colombianos (Cevipapa, 2004). Aproximadamente 134.812 ha se siembran con papa en Colombia (Faostat, 2008), distribuidas en 250 municipios entre 2.000 y 3.500 msnm, donde el cultivo es una fuente primordial de empleo, ya que ocupa cerca de 20 millones de jornales al año, y a esta actividad se encuentran vinculadas de forma directa aproximadamente 90.000 familias (Villarreal *et al.*, 2007).

Los cultivos de papa se encuentran diseminados en climas fríos con temperaturas de 13°C y alturas de 2.000 msnm, hasta alcanzar zonas de páramo con alturas cercanas a los 3.500 msnm y temperaturas de 8°C. Geográficamente, las unidades de producción están dispersas principalmente en las regiones frías de la zona Andina, bajo una variada gama de condiciones biofísicas, sociales y económicas de quienes practican esta actividad (DANE, 2002). Tradicionalmente en Colombia la producción se distribuye en 14 departamentos: siendo los cuatro mayores productores Cundinamarca (45%), Boyacá (22%), Nariño (13%) y Antioquia (8%).

En términos generales, alrededor del 75% del área cultivada con papa en el país se encuentra en zonas de topografía quebrada y ondulada, con pendientes superiores al 25% que dificultan adelantar labores con cualquier tipo de mecanización (Quintero, 2004).

Los problemas de calidad de la papa tienen como causa principal el tipo de manejo que se le da al producto desde la siembra hasta su distribución al consumidor. El uso inapropiado de prácticas de siembra y recolección de cosechas, la utilización inadecuada de insumos agroquímicos en el proceso productivo, el bajo uso de semilla de buena calidad, la alta incidencia de enfermedades y plagas en el cultivo y los problemas derivados del mal manejo pos cosecha, así como el uso de empaques inadecuados que le ocasionan daño a la papa, constituyen las causas principales de los problemas de calidad de ésta en Colombia (IICA, 1999).

4.3 TAXONOMÍA, FORMA DE REPRODUCCIÓN E INFECCIÓN DEL FITOPATÓGENO *RHIZOCTONIA SOLANI*

Rhizoctonia solani, es un fitopatógeno causante de diversas enfermedades en una gran variedad de cultivos. Ha sido objeto de múltiples estudios ecológicos, patológicos, taxonómicos y de control biológico (González y Hernández, 2002; Sneh *et al.*, 1991). Sin embargo su taxonomía todavía es confusa y controversial. Esto se debe a que su morfología es muy sencilla y los rasgos fisiológicos y patológicos que se usan en su clasificación varían mucho, lo cual dificulta aún más la delimitación taxonómica del grupo (Parmeter y Whitney, 1970). Otro factor que contribuye a la confusión en su taxonomía, es que raramente produce estructuras sexuales, utilizadas tradicionalmente en la taxonomía de hongos. Sin embargo, Castro y Osorio, (2005) reportan la siguiente clasificación taxonómica:

Reino: Fungi
División: Eumycota
Sub. División: Deuteromycota
Sub. Clase: Hyphomycetidae
Clase: Hyphomycete
Familia: Agronomycetaceae
Género: *Rhizoctonia*

Esta enfermedad se encuentra en muchas áreas productoras del mundo, diseminándose con el agua de riego, la lluvia o por órganos infectados o contaminados. Afecta al cultivo desde su desarrollo hasta la cosecha, atacando también a una extensa cantidad de especies vegetales, causando una baja calidad de la semilla, caída de plántulas, pudrición de raíces y enfermedades foliares (Parmenter, 1970).

R. solani es un hongo que consta de por lo menos cuatro formas más o menos emparentadas, estas cepas se distinguen entre sí debido a que las anastomosis (fusión de las hifas), sólo se producen entre los aislados de un mismo grupo de anastomosis. Presenta una fase anamórfica que se ubica dentro del *Phylum Basidiomycota*, género *Rhizoctonia* (anamorfo). En esta fase el hongo presenta un micelio castaño oscuro con hifas algo gruesas, posee ramificaciones en ángulo recto, constricciones en el punto de origen de la ramificación de la hifa y formación de una septa en el punto de origen (AGRIOS, 1996).

El micelio se puede reconocer por medio de microscopía óptica, porque consta de células largas con ramificaciones, que crecen en ángulo recto con respecto a la hifa principal. Además, las hifas se estrechan a nivel de la bifurcación y poseen una septa cerca de ella (AGRIOS, 1996). Este hongo vive principalmente en forma de micelio y/o esclerocios en el suelo, en plantas perennes o en órganos de propagación como los tubérculos de papa. Cuando las condiciones son favorables,

el hongo germina e invade los tallos de las plantas o los brotes emergentes, especialmente a través de las heridas (Frank, 1980).

Un medio frío y húmedo es propicio para el desarrollo de este hongo, atacando primero a los brotes y llegando a destruirlos cuando el clima favorece el desarrollo del patógeno. Cuando el clima no favorece el desarrollo del patógeno, los brotes son débiles, se retarda el crecimiento de la planta y se producen tubérculos deformes (Rohm y Hass, 1980).

Este patógeno está presente en todas las áreas productoras de papa, provoca cáncer de tallo y estolón, así como costras sobre los tubérculos (Hooker, 1986), además reduce la emergencia de los brotes, el vigor de la planta y frecuentemente, los tubérculos infectados se agrietan o se deforman (Powelson *et al.*, 1993).

Las plagas (insectos y patógenos) constituyen la principal limitante de la producción agrícola. Se ha comprobado que los plaguicidas químicos, y en particular los fungicidas, pueden tener impactos negativos en la biodiversidad de agro ecosistemas, así como en la salud pública. Por esta razón los científicos trabajan en el desarrollo de alternativas de control ecológicas (Zavaleta, 2000). Una de las más actuales es el uso de productos derivados de las plantas, como aceites esenciales y algunos de sus compuestos como: terpenos, líganos, alcaloides, azúcares, esteroides, entre otros (Dixon, 2001).

4.4 ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales son el producto final del metabolismo secundario de las plantas aromáticas. Están constituidos por terpenos con actividad y composición variada; después de la extracción generalmente son líquidos y rara vez sólidos o pastosos. Diversas investigaciones han permitido establecer su actividad antibacteriana, antimicótica, antiparasitaria, antiviral e insecticida (Alzamora, 2001).

La actividad antimicrobiana de los extractos de plantas está asociada a la presencia de metabolitos secundarios. La fracción fenólica de aceites esenciales de varias plantas aromáticas ha mostrado ser tóxica contra *Fusarium moniliforme*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Phytophthora capsici* (Müller *et al.*, 1995). Los aceites esenciales combinados de *Ocimum canum*, *Chenopodium ambrosioides* y *Lippia alba* también fueron tóxicos contra un amplio rango de hospederos, entre los que estaban *R. solani*, *Alternaria solani*, *A. alternata*, *F. moniliforme* y *F. oxysporumf. sp. vasinfectum* (Dubey y Kishore, 1987). Rao *et al.*, (1992) determinaron la fungitoxicidad de los aceites esenciales de la semilla de *Cuminum cyminum* L y de los botones florales de *Syzygiummaro maticum* L, así

como que la fracción aldehídica y fenólica de éstos eran los responsables del efecto contra los hongos.

La vegetación tropical constituye un inmenso recurso de diversidad biológica cuyo potencial de uso ha sido escasamente estudiado (Bermúdez, 1999; Vele *et al.*, 1999).

Los mono terpenos presentes en aceites esenciales son compuestos que resultan menos perjudiciales que los fungicidas químicos desde el punto de vista ambiental (Saccheti *et al.*, 2005). Varios investigadores han comprobado el efecto de estas sustancias sobre insectos plaga y microorganismos que afectan cultivos de importancia económica (Gómez, 2006).

Según Martínez (2003), los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (saborizantes). Los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes que pueden ser:

- ✓ Compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos)
- ✓ Monoterpenos
- ✓ Sesquiterpenos
- ✓ Fenilpropanos

4.5 ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO

Taxonomía:

Dominio: Eukaryota
Reino: Plantae
Subreino: Viridaeplantae
Phylum: Tracheophyta
Subphylum: Spermatophytina (auct.)
Infraphylum: Angiospermae auct
Clase: Magnoliopsida dicotiledóneas
Subclase: Lamiidae
Superorden: Lamianae
Orden: Lamiales
Familia: Verbenaceae (ver-be-NAY-see-ay),
Tribu: Lantaneae
Género: Lippia (LIP-pee-uh)
Epíteto específico: origanoides Kunth

Nombre botánico: *Lippia origanoides* H.B. & K

La hoja del orégano se usa no solo como condimento de alimentos y conservación del mismo sobre todo en la elaboración de carnes y embutidos sino también en la elaboración de cosméticos, fármacos y licores. Adicionalmente, la Organización Mundial de la Salud estima que cerca del 80% de la población en el mundo usa extractos vegetales o sus compuestos activos.

En Colombia la superficie cultivada y distribución geográfica, del orégano está presente principalmente en los Departamentos de Antioquia, Cundinamarca y Nariño (Salamanca y Sánchez, 2009).

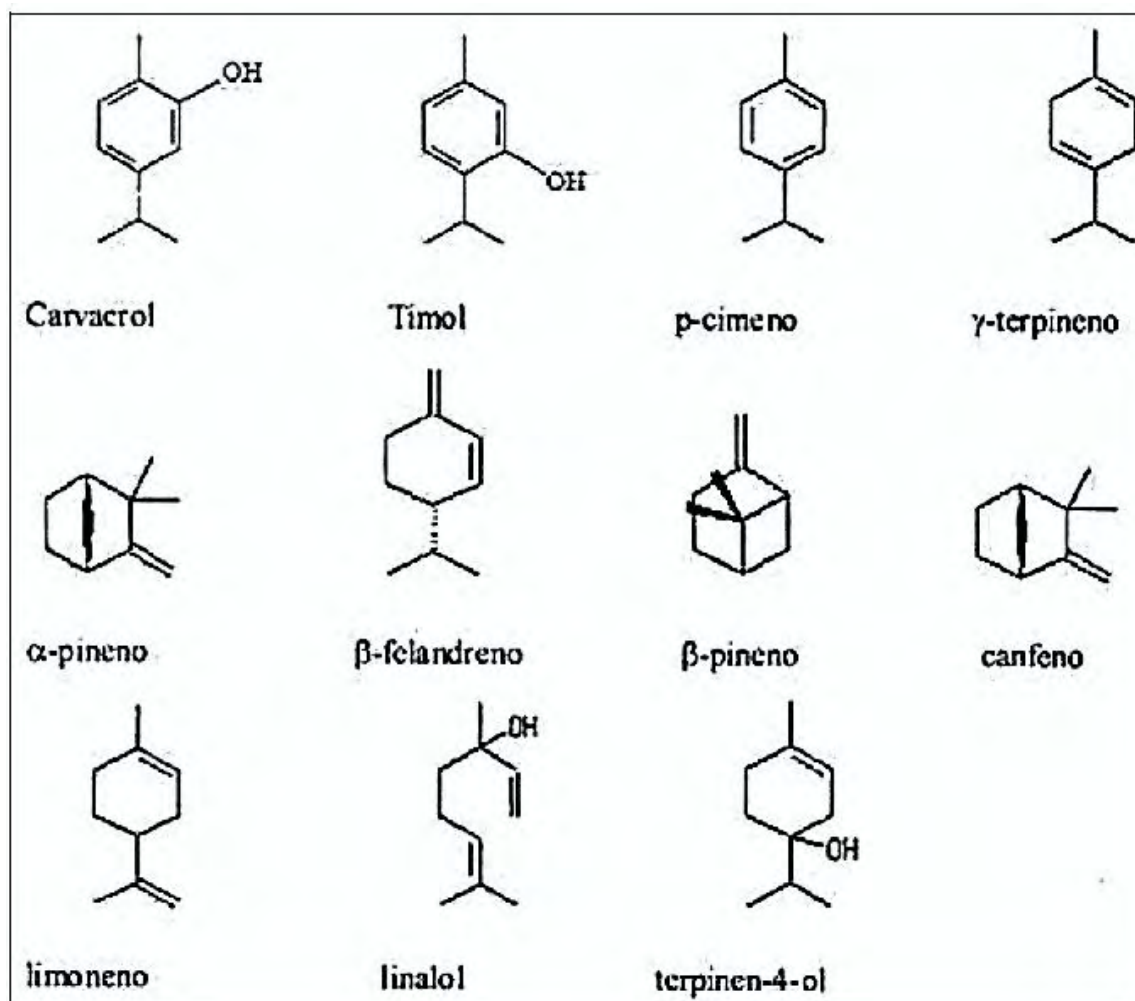
El Orégano (*Lippia origanoides* H.B.K), es una familia de plantas labiadas, herbácea, muy ramificada, que además se utiliza como sustancia antibacterianas, antifúngica, antiinflamatorias, antioxidantes, anticancerígenos, Todas estas características son atribuidos a carvacrol y timol, compuestos químicos que se encuentran en abundancia (Zanandrea, 2004).

4.6 COMPOSICIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO

Lippia origanoides (Verbenaceae) es una planta conocida en Oriximiná (Brasil) como “Salva-de-Marajo”. Sus hojas son ampliamente utilizadas como una especia en la cocina y en la medicina tradicional. La composición química del aceite esencial obtenido de sus hojas, se ha analizado por GC y GC/MS, mostrando un alto contenido de monoterpenos oxigenados (66,0%), carvacrol (38,6%) y timol (18,5%) siendo estos los principales componentes (Oliveira, 2007).

Existen diversos estudios sobre la composición química del orégano, usando extractos acuosos y sus aceites esenciales, se han identificado flavonoides como la apigenina, luteolina, agliconas, alcoholes alifáticos, compuestos terpénicos y derivados del fenilpropano. En *Origanum vulgare* han encontrado ácidos coumerico, ferulico, cafeico, r-hidroxibenzoico y vainilínico (Martínez A. 2003). En la figura 1 se observa la estructura química de los principales compuestos presentes en el aceite de *Lippia origanoides*.

Figura 1. Estructuras químicas de los principales componentes presentes en el aceite de orégano (*Lippia origanoides*).



Fuente. Martínez A. 2003

4.7 EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO SILVESTRE

Los aceites esenciales se pueden extraer de las muestras vegetales mediante varios métodos como son: Expresión, destilación con vapor de agua, extracción con solventes volátiles, enfleurage y con fluidos supercríticos.

En la expresión el material vegetal es exprimido para liberar el aceite y este es recolectado y filtrado (Martínez, 2003). En la destilación por arrastre con vapor de agua, la muestra vegetal generalmente fresca y cortada en trozos pequeños, es encerrada en una cámara inerte y sometida a una corriente de vapor de agua

sobrecalentado, la esencia así arrastrada es posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa. Esta técnica es muy utilizada especialmente para esencias fluidas, primordialmente las utilizadas para perfumería. Se utiliza a nivel industrial debido a su alto rendimiento, la pureza del aceite obtenido y porque no requiere tecnología sofisticada (Martínez, 2003).

Otro método utilizado en la extracción de aceite esencial es la hidrodestilación asistida por radiación con microondas (M.W.H.D), que es una técnica basada en la disipación de energía por conductividad térmica y disipación por rotación de dipolos y la destilación, se puede llevar a cabo a presión atmosférica o con vacío. En este proceso el material vegetal está sumergido en agua y el aceite esencial es arrastrado por el vapor de agua producido por el calentamiento. Posteriormente este vapor es condensado, el destilado se recolecta continuamente y el exceso de agua se lleva a recirculación y reciclado al balón de extracción con el fin de mantener la humedad del material vegetal; el aceite esencial es recolectado directamente y secado sin necesidad de añadir ningún solvente (Cerpa, 2007).

La extracción de aceite por arrastre con vapor es un proceso que consiste en calentar una solución hasta que sus componentes más volátiles pasen a la fase de vapor y, a continuación, enfriar el vapor para recuperar dichos componentes en forma líquida por medio de la condensación. En la destilación por arrastre con vapor, la presencia de vapor por cualquiera de los componentes no puede ser modificada por la presencia del otro; además ambos ejercen una presión verdadera a la temperatura predominante. El líquido orgánico de alto punto de ebullición se evapora a una temperatura bastante menor que su punto de ebullición normal, sin la necesidad de utilizar vacío en la operación (Olaya *et al.*, 2000).

De esta forma, en la extracción de aceites esenciales, el rendimiento obtenido se puede ver influenciado por el tipo de material en estudio, sus condiciones de almacenamiento y por el tipo de técnica empleada para la extracción del aceite esencial.

4.8 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA Y ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO DE MONTE Y OTROS ACEITES ESENCIALES.

En el aceite de orégano que crece en forma silvestre se ha encontrado la presencia dominante de carvacrol y timol (Russo M. *et al.*, 1998). Se utiliza en la preparación de alimentos, como conservante y saborizante. Las hojas y sumidades floridas se aplican en el campo farmacéutico debido a las propiedades tónicas, amargo-excitantes, antisépticas, diuréticas y antiespasmódicas (Guerrero y Nuñez, 1991). Sobre el poder antiséptico de los aceites esenciales de plantas pertenecientes especialmente a las familias Labiadas hay amplia información (Guenter, E. 1949; Montes MA. 1996; Dominguez X. 1985 y Lock de Ugaz O.

1994). Todas contienen un compuesto o principio activo propio pero varios compuestos son comunes a numerosas especies. Las plantas de uso tradicional ofrecen posibilidades para la búsqueda de principios bioactivos o etnomedicina siendo una alternativa de uso de antisépticos estándar.

Existen múltiples estudios sobre la actividad antimicrobiana de los extractos de diferentes tipos de orégano. Se ha encontrado que los aceites esenciales de las especies del género *Origanum* presentan actividad contra bacterias Gram negativas como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica* y *Enterobacter cloacae*; y las Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus subtilis*. Tienen además capacidad antifúngica contra *Cándida albicans*, *C. tropicalis*, *Torulopsis glabrata*, *Aspergillus Níger*, *Geotrichumy Rhodotorula*; pero no contra *Pseudomona aeruginosa*. Se ha evaluado la actividad antimicrobiana de los componentes aislados, así como el del aceite esencial (Skandamis *et al.*, 2001).

Los fenoles carvacrol y timol poseen los niveles más altos de actividad contra microorganismos Gram negativos, excepto para *P. aeruginosa*, siendo el timol más activo. Se ha demostrado que para los aceites de *L. multiflora* y *L. chevalieri*, los valores de CMI y de la concentración mínima bactericida (CMB) son más bajos para inhibir los microorganismos Gram negativos (*Salmonella entérica*, *Escherichia coli*, *Shigella disentería*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*) que para los Gram positivos (*Staphylococcus camorum*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Bacillus cereus*). *L. multiflora* presenta alta actividad antimicrobiana debido a su alto contenido de timol y sus derivados. *L. chevalieri* contiene un alto porcentaje de p-cimeno, el cual ejerce un efecto antagónico con el carvacrol y el timol, lo que explica su baja actividad antimicrobiana (Leon, 2009).

Se han utilizado diversas técnicas microbiológicas para demostrar la actividad antimicrobiana de plantas superiores frente a microorganismos patógenos para el hombre (Rangel *et al.*, 2001). Chávez *et al.*, (2008) determinaron el efecto sinérgico antibacteriano entre el aceite esencial de *Origanum vulgare* y la Gentamicina en aislados de *Escherichia coli* concluyendo que existe un efecto sinérgico antibacteriano *in vitro* entre el aceite esencial de *Origanum vulgare* y la gentamicina en *E. coli*.

Además, Cueto (2010), determinó la actividad antifúngica del aceite esencial y de los extractos obtenidos con hexano, metanol y cloruro de metileno del orégano Mexicano (*Lippia graveolens*) contra *F. oxysporum* obteniendo como resultado que por medio de la técnica de difusión en placa el aceite esencial del orégano inhibió el crecimiento del hongo en todas las concentraciones probadas. Cabe resaltar que Escobar *et al.*, (2010) realizaron estudios sobre la composición química y actividad biológica de 19 aceites esenciales, donde siete de sus principales

componentes fueron probados contra las formas libres e intracelulares de *Leishmania chagasi* y parásitos *Trypanoso macruzi*.

Montes *et al.*, (2000), probó un total de 206 especies de plantas contra la actividad de 26 especies de hongos fitopatógenos, incluyendo pruebas de germinación de esporas, desarrollo micelial, esporulación y pruebas de invernadero y campo en algunos casos. Las formulaciones de los productos vegetales utilizados han sido: extractos acuosos y hexánicos, polvos, aceites esenciales y metabolitos secundarios antifúngicos. Los resultados han indicado que entre 32 y 51% de las plantas probadas interactúan con los hongos y la respuesta de los patógenos varía desde la estimulación biológica hasta su total inhibición. Se han logrado resultados promisorios en campo con extractos acuosos contra la roya del frijol *Uromyces appendiculatus*, la cenicilla *Erysiphe cichoracearum* y el mildiu de la calabacita *Pseudoperonospora cubensis*.

KuUcan (2008) evaluó *in vitro* diferentes extractos de orégano (*Lippia origanoides* H.B.K) sobre el crecimiento, de *Xanthomon acampestris*, *Cladosporium cladosporioides* y *Aspergillus niger*, especies que atacan diversos cultivos de hortalizas, entre ellos al tomate de mesa. Se utilizaron hojas secas de *Lippia graveolens* (orégano) de las poblaciones silvestres del Municipio de Peñamiller, Qro., proporcionadas por la Asociación "Semidesierto de Peñamiller, ARIC". El extracto total se obtuvo por el método de presurizado, el aceite esencial y las aguas madres por Hidrodestilación. De acuerdo al análisis estadístico se observaron diferencias significativas entre los extractos utilizados como tratamientos, la inhibición del hongo *Aspergillus niger* y *Cladosporium cladosporioides* se pudo observar al reducir el crecimiento micelial en este hongo por lo que el aceite puede ser empleado como un agente fungicida con una dosis del 75%.

4.9 TÉCNICAS DE EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana de aceites, se aplican generalmente métodos convencionales probados con capacidades antibióticas. Hay dos técnicas básicas usadas para la valoración de ambas actividades, antibacteriales y antimicóticas de los aceites esenciales: 1. El método de difusión en agar (pozo o disco de papel) y 2. El método de dilución (agar o caldo líquido). Las pruebas y evaluación de la actividad, insolubilidad en agua y complejidad (Kalemba y Kunicka, 2003).

Los aceites esenciales son de naturaleza hidrofóbica y de gran viscosidad. Estas características pueden reducir la capacidad de la dilución o pueden causar distribución desigual del aceite a través del medio, aun si se usa un agente correcto disgregante o solubilizante. Se tiene que comprobar si las

concentraciones aplicadas del emulsor o del solvente no afectan el crecimiento y la diferenciación de los microorganismos de prueba. Los cultivos de microorganismos se realizan en medios líquidos, bajo condiciones físicas óptimas para las especies individuales. Los microorganismos tienen que alcanzar una fase apropiada del crecimiento, y un número especificado de células tiene que ser utilizado para la prueba (Kalembe y Kunicka, 2003)

4.9.1 Cromatografía de Gases GC-FID/MS. El primer reporte de esta combinación realizada por Holmes y colaboradores, apareció en 1960 (Braithwaite y Smith, 1999), desde entonces pasaron cinco años hasta que se dispuso comercialmente de un equipo que acoplara las dos técnicas. Hoy en día GC-MS es la técnica que goza de gran importancia y valor para análisis de los AE. La característica esencial de la espectrometría de masas aplicada a su análisis es que los espectros de masas son particularmente únicos para muchos componentes de aceites esenciales e.g. terpenos. Sin embargo, la combinación del tiempo de elución del compuesto con su espectro de masas, hacen que la calidad de los datos y la confiabilidad de la identificación aumenten considerablemente (Jennings *et al.*, 1987; Marriott *et al.*, 2001; Kellner *et al.*, 2004). Los tiempos de retención de la sustancia y de los de hidrocarburos lineales se utilizan para determinar los llamados índices de Kováts (Ecuación 3), que sirven para identificar tentativamente los compuestos, pues todas las sustancias que se analizan por GC tienen k' diferentes, aunque raramente pueden tener los k' muy cercanos. La identificación por MS se hace por comparación del espectro de la sustancia con los espectros de distintas bases de espectros e.g. NIST, Wiley, Adams, o con los de los patrones certificados; siendo el analista químico quien verifica las posibles rutas de fragmentación y los fragmentos característicos de ciertos grupos de moléculas.

4.10 BIOAUTOGRAFÍA EN CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA CCD.

La bioautografía ha sido un método útil para encontrar nuevas moléculas antimicrobianas, ya que mediante esta técnica se ha guiado el aislamiento de sustancias activas contra varios microorganismos (Becker *et al.*, 2005; Muhammad *et al.*, 2000).

Este método consiste en incluir los cromatogramas obtenidos por cromatografía en capa fina en un medio de cultivo. Para ello se utilizan placas cromatográficas de sílica gel 60f 254 de MERK o de celulosa las cuales se colocan en las cajas Petri correspondientes. Previamente se procede a eliminar el disolvente para evitar falsas bandas de inhibición (Manrique, 1997).

La bioautografía ha sido considerada como el ensayo más eficiente para la detección de componentes antimicrobiales, porque ésta permite la localización de

la actividad en un complejo matriz y por lo tanto permite un directo aislamiento de los constituyentes activos. El ensayo de bioautografía puede dividirse en tres grupos (Manrique, 1997):

- **Bioautografía directa:** Donde los microorganismos crecen directamente sobre la capa fina cromatográfica.
- **Bioautografía de contacto:** donde los componentes antimicrobiales son transferidos de la fina capa cromatográfica y son inoculados en una caja de agar a través de contacto directo.
- **Bioautografía cubierta de agar o inmersión de bioautografía:** Es donde el medio de agar sembrado es aplicado encima de la fina capa cromatográfica.

La bioautografía directa resulta ser una técnica fundamental, que determina con exactitud y precisión la sustancia o sustancias responsables de la actividad antimicrobiana en una mezcla compleja, previamente optimizado su perfil cromatográfico por cromatografía en capa delgada (Bot *et al.*, 2001). Esta técnica ha sido aplicada exitosamente para la detección de las sustancias antimicrobianas de extractos de plantas (Horváth *et al.*, 2002., Nostro *et al.*, 2000., Chomnawang *et al.*, 2005), en tejidos de órganos animales como hígado y riñón (Salisbury *et al.*, 1989), en alimentos como la leche (Ramírez *et al.*, 2003) y, últimamente, en extractos de esponjas marinas, facilitando el aislamiento de los metabolitos activos (Colorado *et al.*, 2005; Galeano, 2006).

5. METODOLOGÍA

5.1 OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL

5.1.1 Extracción del aceite esencial de orégano silvestre *Lippia origanoides* H.B.K. El material vegetal empleado en esta investigación fueron las hojas de orégano (*Lippia origanoides* H.B.K), que se recolectaron en cultivos silvestres en la zona del Alto Patía, corregimiento de El Remolino, Municipio de Taminango, al Norte del Departamento de Nariño. Posteriormente las hojas se trasladaron a las instalaciones de la Planta Piloto de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad de Nariño, para su procesamiento o extracción del aceite esencial. Se utilizaron las hojas de orégano por ser la parte representativa de la planta y es donde se concentran los metabolitos secundarios (aceites esenciales); además, se realizó su acondicionamiento y almacenamiento, en donde se seleccionó el material separándolo de algunos contaminantes (tallos gruesos, raíces, piedras entre otros) que perjudican o no son necesarios en la extracción del aceite esencial, también con el fin de preservar el material biológico, las hojas se secaron a la sombra durante dos días hasta obtener una humedad final del 9% (Arango O., *et al*, 2012).

El aceite esencial se extrajo mediante la técnica arrastre por vapor según la metodología descrita por Bolaños (2010), utilizando la unidad de extracción con arrastre por vapor de Planta Piloto, se usó vapor saturado bajo las siguientes condiciones de extracción: densidad del lecho (D.L.) de 95,4g/L, presión de 1 psig y tiempo de extracción de 1 hora, y llenando el tanque (volumen de 80 litros) del equipo con una cantidad aproximada a 7,632 Kilogramos de hojas de orégano previamente seleccionadas.

En última instancia se determinó el rendimiento de la muestra de aceite esencial de *Lippia origanoides* mediante la aplicación de la siguiente relación:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{peso del aceite esencial}}{\text{peso del material vegetal}} * 100 \text{ Ecuación 1}$$

Figura 2. Unidad de extracción de arrastre por vapor, Planta Piloto de Ingeniería Agroindustrial Universidad de Nariño.



Fuente. Esta investigación

El aceite esencial obtenido se separó con un embudo de decantación y posteriormente se eliminó el exceso de agua utilizando un rotaevaporador aplicando vacío, luego se realizó el almacenamiento en frascos de vidrio ámbar a temperatura ambiente, lo anterior con el fin de proteger y conservar el aceite de factores que pueden deteriorar su calidad; posteriormente se llevaron a cabo las pruebas de fraccionamiento y los ensayos de actividad antifúngica.

5.1.2 Fraccionamiento de aceite esencial mediante cromatografía en capa delgada (C.C.D.). El fraccionamiento de aceite esencial se realizó mediante la aplicación de 200 μ l de aceite utilizando una micropipeta BIOHIT B7230, por placa de cromatografía en capa delgada (20 x 10 cm), con fase estacionaria de 1mm de silica-gel 60GF254) utilizando como fase móvil los solventes tolueno y acetato de etilo (9:1 v/v) para determinar los compuestos fenólicos presentes en el aceite esencial de orégano (Sridhar *et al.*, 2003). Se utilizó una cubeta de cromatografía para garantizar que los gases que componen los solventes utilizados, separen adecuadamente los compuestos del aceite esencial de orégano. Inmediatamente la fase móvil alcanzó el frente de la placa cromatográfica, fue retirada de la cubeta con el fin de secar la placa y lograr la visualización de los compuestos.

Las fracciones se visualizaron con una lámpara de luz ultravioleta con longitud de onda de 254 nm en la placa de cromatografía.

Figura 3. Materiales y reactivos utilizados en la separación de los compuestos de aceite esencial de orégano silvestre (*Lippia origanoides* H.B.K), mediante Cromatografía en Capa Delgada C.C.D.



Fuente. Esta investigación

Mediante la ecuación 2 (Patra *et al.*, 2012), se determinaron los Rfs para cada sustancia que se separó en la Cromatografía de Capa Delgada.

$$R_f = \frac{(a) \text{ distancia que recorre la muestra desde el punto de aplicación}}{(b) \text{ distancia que recorre el disolvente hasta el frente del eluyente.}} \text{ Ecuación 2.}$$

5.1.3 Identificación y cuantificación de los componentes mayoritarios presentes en el aceite esencial mediante análisis por cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-FID) y (GC/MS). El aceite esencial de orégano se analizó mediante cromatografía de gases con detector FID y detector de masas para determinar los componentes presentes en la muestra. El análisis se realizó en un Cromatógrafo de Gases SHIMADZUGC-17A con detector de ionización en llama FID. Columna Capilar DB-5 J&W (30m x 0,25mm ID 0,25um), gas carrier: Helio UAP (99,995 %) a flujo de 1,0 mL/min, presión de entrada de la columna: 80 kPa, con temperatura inyector de 250°C, modo inyección: *split*, relación 50:1; detector FID a temperatura de 280°C.

La programación de temperatura de la columna fue de la siguiente manera: 45°C (5 min) hasta 150°C (2 min) a razón de 4°C/ min, posteriormente se incrementó a

250°C (5 min) a razón de 5°C/min, por último se llevó a una temperatura de 275°C (15 min) aumentando a 10°C/min.

La confirmación del análisis se realizó por GC-MS a las condiciones descritas anteriormente.

Para identificar los componentes del aceite esencial, se calculó los índices de Kovat's mediante la fórmula citada por Celis *et al*, (2007). (Ecuación 3), los cuales fueron comparados según lo reportado por Adams (2004) y Nist (2005), y se comparó con los espectros de masa. La cuantificación se realizó por el método de % de área relativa, utilizando el programa Shimadzu Class vp 4.3, además se comparó con los datos reportados en el trabajo realizado por Bolaños y Villota (2009) con aceite esencial de la misma especie.

Figura 4. Equipo de cromatografía de gases (GC-MS), para la identificación y cuantificación de los componentes activos presentes en el aceite esencial de orégano.



Fuente. Esta investigación

$$Ik = 100 \left[n + (N - n) \frac{\log_{tr}x - \log_{tr}n}{\log_{tr}N - \log_{tr}n} \right] \text{Ecuación 3.}$$

Dónde: IK = Índice de Kovat's

n = número de carbonos de la parafina anterior

N = número de carbonos de la parafina posterior

trx = tiempo de retención del compuesto a identificar

trn = tiempo de retención de la parafina anterior
trN = tiempo de retención de la parafina posterior

5.2 BIOENSAYOS

5.2.1 Aislamiento del Fitopatógeno. El aislamiento de *R. solani*, se realizó a partir de siembras de tejido infectado por el hongo, en tallos y tubérculos de papa obtenidos en mercados locales de la Ciudad de Pasto. Éstos se lavaron con agua corriente y destilada, se cortaron en trozos pequeños y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3% por 3 min, se lavaron 3 veces con agua destilada estéril para eliminar el exceso de cloro, y se secaron con papel filtro estéril. Los trozos se colocaron en cajas de *Petri* con medio papadextrosa-agar (PDA), incubándose a temperatura ambiente por 4-5 días, para posteriormente con el apoyo de las claves de Sneh *et al.*, (1991), se logró su identificación. La conservación de *R. solani* fue en medio de cultivo PDA.

5.2.1 Evaluación de la actividad biofungicida del aceite esencial. La evaluación de la actividad antifúngica del aceite esencial de orégano silvestre (*L. organoides* H.B.K) se determinó mediante el crecimiento micelial *in vitro* del patógeno *Rhizoctonia solani* en medios de cultivo enmendados bajo las concentraciones que muestra la tabla 1, emulsificando con Tween 20 bajo una relación 1:1 para cada caso. Como comparador se utilizó un testigo absoluto (agua destilada), (Riveros *et al.*, 2003).

Tabla 1. Concentraciones de aceite esencial *Lippia organoides* H.B.K evaluadas en *Rhizoctonia solani* a nivel *in vitro*.

Ensayo	Concentración $\mu\text{L.ml}^{-1}$
1	0,10, 100, 1.000, 10.000
2	0, 80, 85, 90, 95, 100, 110
3	0, 100, 110, 120, 130, 140

Fuente. Esta investigación

En cada caja de *Petri* se sembraron discos de micelio de 1,1 cm de diámetro obtenidos con sacabocado de aislamientos puros del patógeno sembrados 8 días antes del ensayo, cada crecimiento micelial se midió mediante el programa gráfico ImageJ (Rohlf, 2005) después de un período de incubación de 8 días a temperatura promedio de 25°C.

El comportamiento *in vitro* de los aislamientos, se determinó con relación al crecimiento radial del fitopatógeno *R. solani* en diferentes concentraciones de

aceite esencial de orégano. Se determinó el porcentaje de crecimiento respecto al testigo absoluto sin enmendar, utilizando la relación propuesta por Riveros *et al.*, (2003):

$$PC = \frac{DMCM - 1,1 \text{ cm}}{DMCA} \times 100 \text{ Ecuación 4.}$$

Dónde:

PC = porcentaje de crecimiento

DMCM = diámetro medio de la colonia creciendo en tratamiento; 1,1 cm corresponde al diámetro del cilindro con micelio.

DMCA = diámetro medio de la colonia sin enmendar (Riveros *et al.*, 2003).

El ensayo se dispuso siguiendo un diseño completamente al azar, utilizando 5 repeticiones por tratamiento, los datos obtenidos a través de la evaluación del porcentaje de crecimiento fueron normalizados con la relación $\arccos \sqrt{x}$ y sometidos a un análisis de varianza ($P \leq 0,05$), al encontrarse diferencias significativas se procedió a realizar una comparación de medias mediante prueba de Tukey a 5% de probabilidad, utilizando el paquete estadístico INFOSTAT 2009.

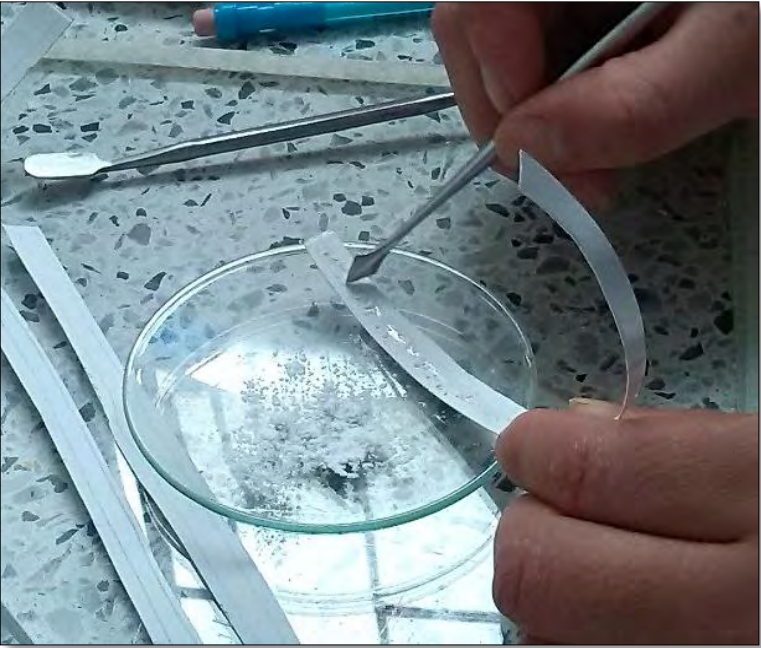
5.2.2 Determinación de los niveles de sensibilidad de los aislamientos de *Rhizoctonia solani* al aceite esencial de orégano. El comportamiento *in vitro* de los aislamientos, se determinó, con relación al crecimiento radial de las colonias de *R. solani* a los diferentes tratamientos. Para esto se utilizó la escala propuesta por Shattock (1988) utilizada por Álvarez *et al.* (2010) como medida de clasificación de respuestas de aislamientos de patógenos a productos biológicos a nivel de laboratorio.

Sensibles (S):	Menor del 10% del crecimiento del testigo
Intermedio (I):	Entre 10 y 60% del crecimiento del testigo
Resistente (R):	Mayor del 60% del crecimiento del testigo

5.2.3 Identificación y recuperación de la fracción antifúngica del aceite esencial mediante la técnica (C.C.D). La fracción activa de aceite esencial se determinó basándose en la técnica de bioautografía en capa delgada descrita por Sridhar *et al.* (2003). Se aplicó 75 µl de aceite esencial con una micropipeta BIOHIT B71001 en una placa (20 x 10 cm) y se adaptó una placa de menor tamaño a la caja de *petri* con dimensiones de 6 x 3 cm. La placa se dispuso sobre la fase móvil constituida por tolueno y acetato de etilo, bajo una relación 9:1 (v/v), y se reveló con luz UV para la identificación de sus fracciones; posteriormente se cubrió con una fina capa de medio de cultivo e inoculado con una solución de hifas del patógeno en agua estéril, obtenidas del raspado superficial del micelio contenido en placas de *petri* (Pineda *et al.*, 2005). La placa se depositó en una bandeja esterilizada y humedecida con agua estéril y cubierta con una película plástica de PVC transparente, luego se incubó a 20°C por un período de 8 días para el crecimiento del patógeno. La región donde *Rhizoctonia solani* no se desarrolló se atribuyó a la fracción activa del aceite esencial. Esa fracción se identificó en otras placas por comparación entre el factor de retención (Rf) y el largo de la banda.

Para recuperar la fracción activa de los aceites esenciales que incidieron en el crecimiento del patógeno, se procedió a raspar cada placa (solamente las que se visualizaron con luz ultravioleta a 254 nm), posteriormente se extrajo con diclorometano y con agitación magnética por 3 horas, se recuperó la fracción evaporando el solvente con un rota evaporador para su análisis.

Figura 5. Recuperación de la fracción antifúngica del aceite esencial mediante la técnica (C.C.D).



Fuente. Esta investigación

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.1 OBTENCIÓN Y FRACCIONAMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL.

6.1.1 Extracción del aceite esencial de orégano silvestre *Lippia origanoides* H.B.K. La obtención del aceite esencial de orégano silvestre (*Lippia origanoides* H.B.K), se realizó utilizando el método de extracción con la unidad de arrastre con vapor de la Planta Piloto de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad de Nariño. Las condiciones de extracción utilizadas se encuentran en la tabla 1.

Tabla 2. Condiciones de extracción de aceite esencial mediante arrastre con vapor

Densidad de lecho (g/L)	Presión de vapor (psig)	Tiempo (h)	Rendimiento %
95,4	1	1	2,82

Fuente. Esta investigación

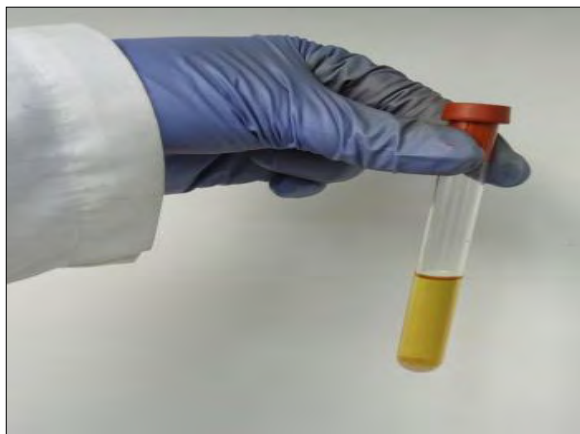
Los resultados de rendimiento de la tabla 1 son acordes a los reportados por diferentes autores. Arango *et al.* (2012), reportan que en la extracción por arrastre con vapor a nivel de planta piloto se obtuvo un rendimiento promedio de 2,76% (p/p); en la investigación mencionan que el contenido de aceite esencial indica que esta especie de orégano pertenece a la categoría de “*richtaxa*” a nivel mundial según la clasificación presentada por Padulosi (1996) , por cuanto su rendimiento es mayor al 2% y es superior a los reportados en otras regiones de Colombia (Bolaños y Villota 2010). En otra investigación Pantoja y Santa cruz (2011), reportan que se obtuvieron un rendimiento de aceite esencial de orégano silvestre de 3,27% (p/p), utilizando la técnica de arrastre por vapor, a unas condiciones de extracción de: DL 80 g/L, Tiempo 2 h y una presión de vapor de 0,32 psi; donde se considera que la variación en cuanto a las condiciones de extracción afecta positiva o negativamente en los resultados finales de rendimiento.

Comparando los resultados encontrados en esta investigación, frente a otras técnicas de extracción de aceite esencial de *L. origanoides* H.B.K., se encontró que Henao *et al.*(2010) utilizaron dos técnicas diferentes: Hidrodestilación Asistida por Microondas (MWHd) y Destilación por Arrastre con Vapor (DAV), donde se tuvieron rendimientos de 1.8% y 1.6% para tiempos de 60 y 90 minutos de operación respectivamente, sin embargo la primera técnica, además de utilizar menos tiempo de extracción, mostró un mayor porcentaje de rendimiento. Según lo anterior, podemos observar que la técnica de arrastre por vapor a escala piloto

utilizada en la presente investigación es más eficiente a la utilizada por los anteriores autores (MWHD y DAV); por otro lado esta eficiencia puede estar relacionada con la diferencia de quimiotipos presentes en las zonas los cuales se ven afectados por las interacciones genotipo ambiente. Otros autores reportan valores similares. Kulisic, *et al.* (2004) evaluaron un aceite de orégano obtenido mediante hidrodestilación reportando un rendimiento del 2,9%. En el estudio realizado por Dos Santos, *et al.* (2004) obtuvieron un rendimiento de 4,6% (p/p) de *L. organoides* en tres localidades del Brasil. En otra especie del mismo género *Lippia* se encontraron rendimientos del 4,3% (Rocha *et al.*, 2007), mientras que Acevedo *et al.* (2007) obtuvieron un rendimiento mucho más bajo (2,3%) por el método de hidrodestilación asistida por radiación de microondas. En la investigación de Escobar *et al.* (2010) en *L. organoides* colectada en Mercaderes Cauca, obtuvieron un rendimiento del 2%. Igualmente en otros quimiotipos de *L. organoides* reportados por Stashenko, *et al.* a una altura de 850 m.s.n.m, se encontraron rendimientos entre 2,4 - 3,1 %, los cuales varían según donde se cultivan (2010).

Los resultados encontrados también se compararon con valores similares encontrados en otras subespecies: *O. vulgare sp. hirtum* que son unas de las más estudiadas, especialmente en relación a la composición y calidad de su aceite esencial, ya que este último tiene un importante valor comercial. En esta subespecie el rendimiento del aceite esencial en la hoja seca varía entre 2% y 6%, porcentaje que se ve afectado por la altitud del lugar de cultivo y por la época de recolección, siendo éste más bajo en el otoño (Russo *et al.*, 1998; Milos *et al.*, 2000).

Figura 6. Aceite esencial de orégano silvestre *Lippia organoides* H.B.K extraído utilizando la técnica de Arrastre por Vapor.



Fuente. Esta investigación

6.1.2 Fraccionamiento del aceite esencial de *Lippia origanoides* H.B.K mediante cromatografía en capa delgada (C.C.D.). Las fracciones encontradas en el AEO (*Lippia origanoides* H.B.K.), mediante la aplicación de la Cromatografía en Capa Fina C.C.D, se muestran en la figura 7. Cabe mencionar que se realizaron ensayos previos en donde se probaron diferentes solventes y con diferentes proporciones, fracasando en el fraccionamiento de las muestras de aceite.

Figura 7. Fraccionamiento del aceite esencial de orégano silvestre *Lippia origanoides* H.B.K., mediante Cromatografía en Capa Delgada.



Fuente. Esta investigación

El Factor de Retención (R_f), se determinó mediante la aplicación de la (Ecuación 2) y los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Cromatografía en Capa Delgada del aceite esencial de Orégano silvestre *Lippia origanoides* H.B.K.

Fracción	Factor de retención (Rf)
1	0,13
2	0,34
3	0,61
4	0,72

Fuente. Esta investigación

Para verificar los resultados encontrados en la CCD del aceite esencial, se compararon con un estándar comercial de Timol T0501 SIGMA, componente principal de este aceite esencial. (Torres *et al.*, 2008; Ruiz *et al.*, 2007); encontrando similitudes entre los factores de retención (Rf) de la fracción 3 de la muestra de aceite frente al Rf del estándar comercial de Timol, 0,61 y 0,62 respectivamente.

Como se mencionó anteriormente, la obtención de los solventes y relaciones adecuadas utilizadas como fase móvil en la CCD, se determinó luego de varios experimentos con solventes y variando las proporciones. La relación óptima (9:1 v/v) de los solventes tolueno y acetato de etilo, permitió el fraccionamiento de la muestra de AEO.

No se han reportado estudios donde se realice el fraccionamiento del aceite esencial de *L. origanoides* H.B.K mediante Cromatografía de Capa Delgada; sin embargo se han realizado investigaciones, en donde se fraccionan extractos de otras plantas, utilizando proporciones similares de los solventes en la fase móvil. Purkayastha *et al.* (2012), utilizaron esta relación en la separación de los compuestos de aceite esencial de hinojo, enebro y kalonji, fase móvil 9,3:0,7 v/v de tolueno y acetato de etilo respectivamente. Gómez (2008), utilizó la técnica de CCD en la caracterización de extractos y aceites esenciales de tres especies de piperáceas, utilizando como estándar canela en metanol al 1 por ciento y con la relación de solventes (9,3:0,7 v/v) de tolueno-acetato de etilo y en la misma fase estacionaria (Placas de sílica gel-60GF254).

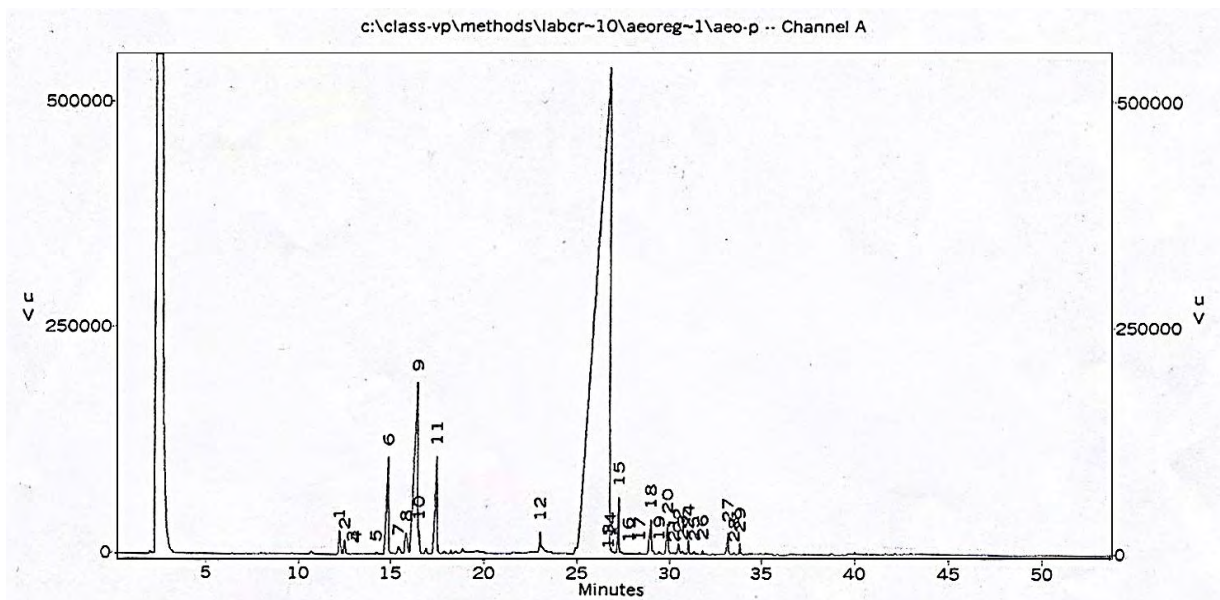
Las fracciones resultantes de la placa cromatográfica de Sílica-Gel, se diluyeron en diclorometano para corroborar los resultados mediante (GC-FID)/MS, llevando a cabo la comparación con los índices de Kovat's y los respectivos tiempos de retención.

6.1.3 Identificación y cuantificación de los componentes activos presentes en el aceite esencial mediante análisis por cromatografía de gases (GC-FID y GC/MS). Para la identificación de los compuestos presentes en el aceite esencial de orégano se utilizó cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Los metabolitos presentes en la muestra de aceite se identificaron con base en sus patrones de fragmentación y sus tiempos de retención, utilizando los índices de Kovats según la ecuación 3.

Los índices de Kovats encontrados mediante la ecuación 3 para cada compuesto, se compararon con la base de datos ADAMS (2004) para una columna DB-5.

En la figura 8 se muestra el cronograma del aceite esencial obtenido para la muestra de orégano *Lippia origanoides* H.B.K.

Figura 8. Perfil Cromatográfico del aceite esencial de orégano *Lippia origanoides* H.B.K obtenido mediante análisis en Cromatografía de gases (GC-FID)/MS.



Fuente. Esta Investigación

En la tabla 4 se muestra la composición del aceite de orégano con los porcentajes de cantidad relativa, tiempo de retención e índices de Kovats estándar después del análisis cromatográfico, los cuales fueron comparados con los reportados por Adams (2004).

Tabla 4. Composición del aceite esencial de *Lippia origanoides* H.B.K. de la región del Alto Patía.

Pico	Tiempo de retención	Cantidad Relativa	IRL	Compuesto TENTATIVO
1	12,283	0,5	941	á-pineno
2	12,541	0,2	946	canfeno
3	14,924	3,0	999	mirreno
4	15,466	0,2	1012	α-felandreno
5	15,874	0,7	1021	α-terpineno
6	16,457	5,5	1035	p-cimeno
7	17,51	2,5	1059	γ-terpineno
8	23,04	0,3	1193	terpinen-4-ol
9	26,736	83,0	1294	timol
10	27,29	1,0	1309	carvacrol
11	29,02	1,0	1357	acetato de timilo
12	29,931	0,7	1382	acetato decarvacrilo
13	30,531	0,3	1398	β-elemeno
14	31,08	0,3	1414	β-cariofileno
15	33,21	0,4	1474	γ-muruleno
16	33,964	0,2	1495	β-bisaboleno

Fuente. Esta investigación

En la tabla 4 se muestra los posibles compuestos mayoritarios presentes en la muestra de aceite esencial de orégano utilizado en esta investigación; mediante cromatografía de gases se determinó que los principales metabolitos secundarios encontrados en la muestra se mencionan en su orden: timol (83%), p-cimeno (5,5%), mirreno (3%), γ-terpineno (2,5%).

Bolaños y Villota (2010), encontraron el metabolito secundario timol (81,47%), como compuesto principal, seguido de p-cimeno (6,19%), a diferencia de la presente investigación, los cantidades varían en los compuestos 3 y 4 de las muestras analizadas con 2,96% y 1,13% para los metabolitos γ-terpineno y trans-cariofileno respectivamente; en esta investigación se muestra la presencia de mirreno y γ-terpineno en su orden. La composición del AEO encontrada por Pantoja y Santacruz (2011) fue timol (73,698%), p-cimeno (10,509%), mirreno (3,095%) y γ-terpineno (2,914%) son acordes a los encontrados, en relación de los posibles compuestos mayoritarios presentes en *L. origanoides*. También son acordes a los resultados encontrados por Henao *et al.* (2007) en donde estudiaron la composición de *L. origanoides* mediante dos técnicas de extracción y encontraron que el compuesto mayoritario fue timol en las dos muestras.

Sin embargo, los resultados de esta investigación difieren de los encontrados por Castañeda *et al.* (2007), donde analizaron dos quimiotipos de *Lippia origanoides*,

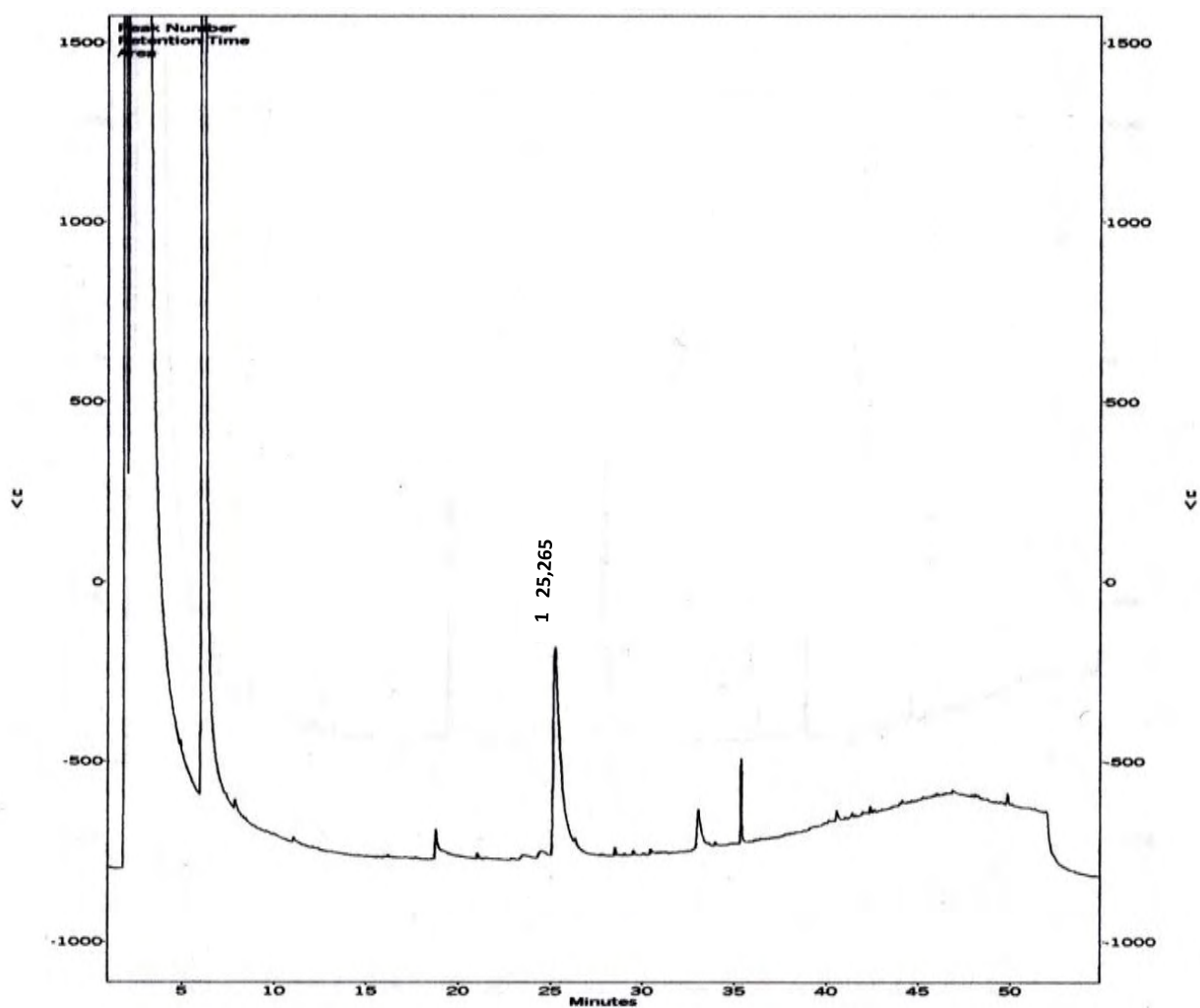
con materia prima obtenida de diferentes regiones de Colombia, encontrando que el contenido de timol de uno de los quimiotipos era del 9,1%, mientras que Oliveira *et al.* (2007) en la especie *L. origanoides* sembradas en Brasil obtuvieron una cantidad de 18,5% de timol y como compuesto mayoritario a carvacrol (38,6%). Stashenko *et al.* (2007), analizaron dos quimiotipos de *L. origanoides*, y encontraron como componentes mayoritarios de las muestras de aceite esencial a timol (56%), *p*-cimeno (13%), y 1,8% de cineol.

Con los resultados encontrados y la revisión bibliográfica realizada se verifica la variación en cuanto a composición de metabolitos secundarios para cada quimiotipo existente.

En base a los resultados encontrados, se puede observar que el aceite esencial del corregimiento de Taminango del Alto Patía, contiene cantidades más elevadas del metabolito timol en relación a las encontradas en la misma especie de diferentes regiones de Colombia y de algunas de Suramérica.

A continuación se presentan los perfiles cromatográficos de las fracciones que se obtuvieron de la muestra de aceite esencial, mediante CCD y que fueron sometidas a cromatografía de gases para conocer el metabolito secundario presente en ellas.

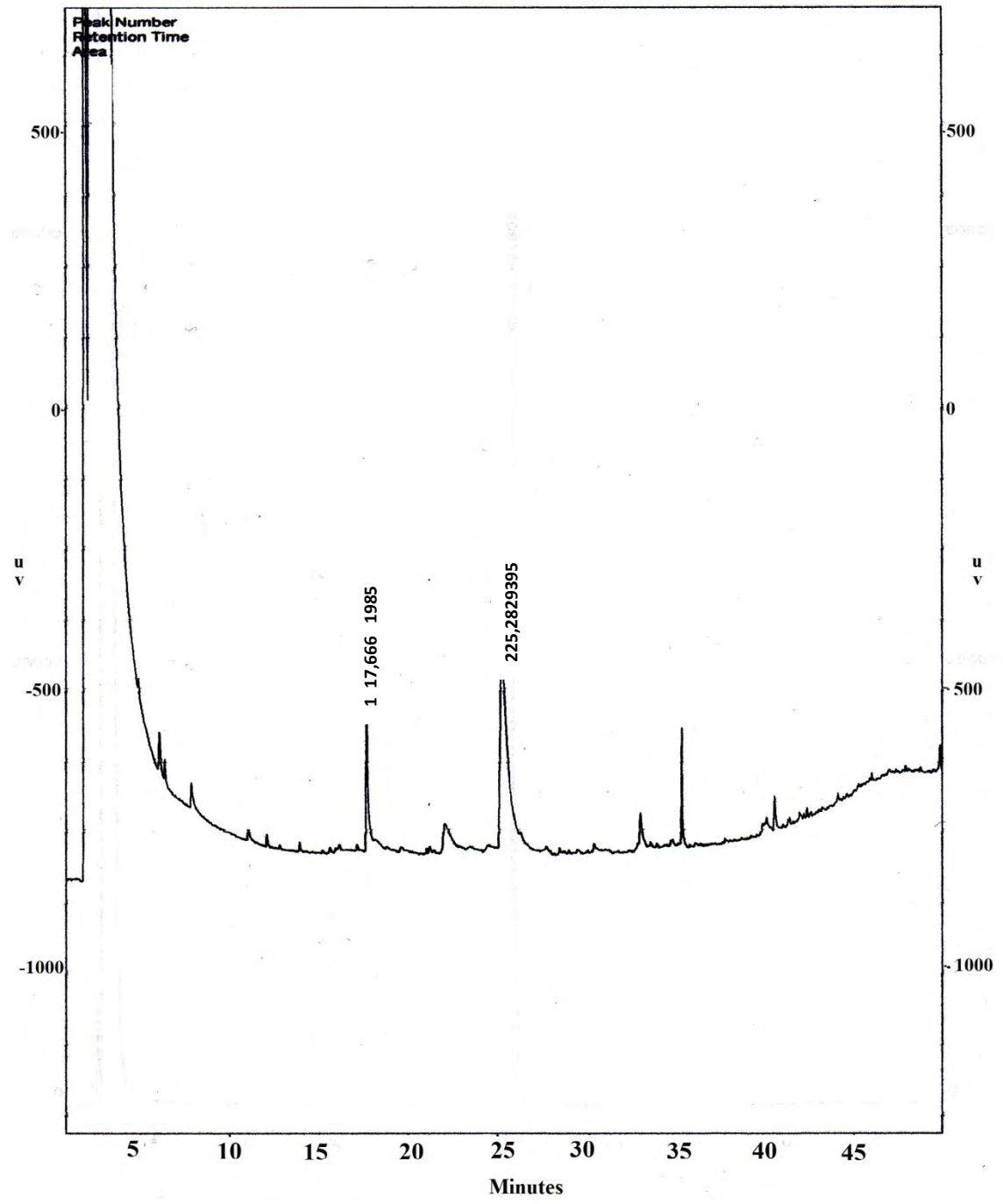
Figura 9. Perfil cromatográfico de la fracción 1 obtenida mediante CCD.



Fuente. Esta investigación

En la cromatografía en capa delgada, se obtuvieron 4 fracciones a partir de la muestra de aceite analizada; en la figura 9 se indica la primera fracción, la cual según el perfil cromatográfico presenta un tiempo de retención de 25,265 minutos, y comparando con la tabla 4, de los compuestos identificados en la muestra de aceite, se atribuye que posiblemente el compuesto de esta fracción corresponda al metabolito secundario timol en una pequeña proporción.

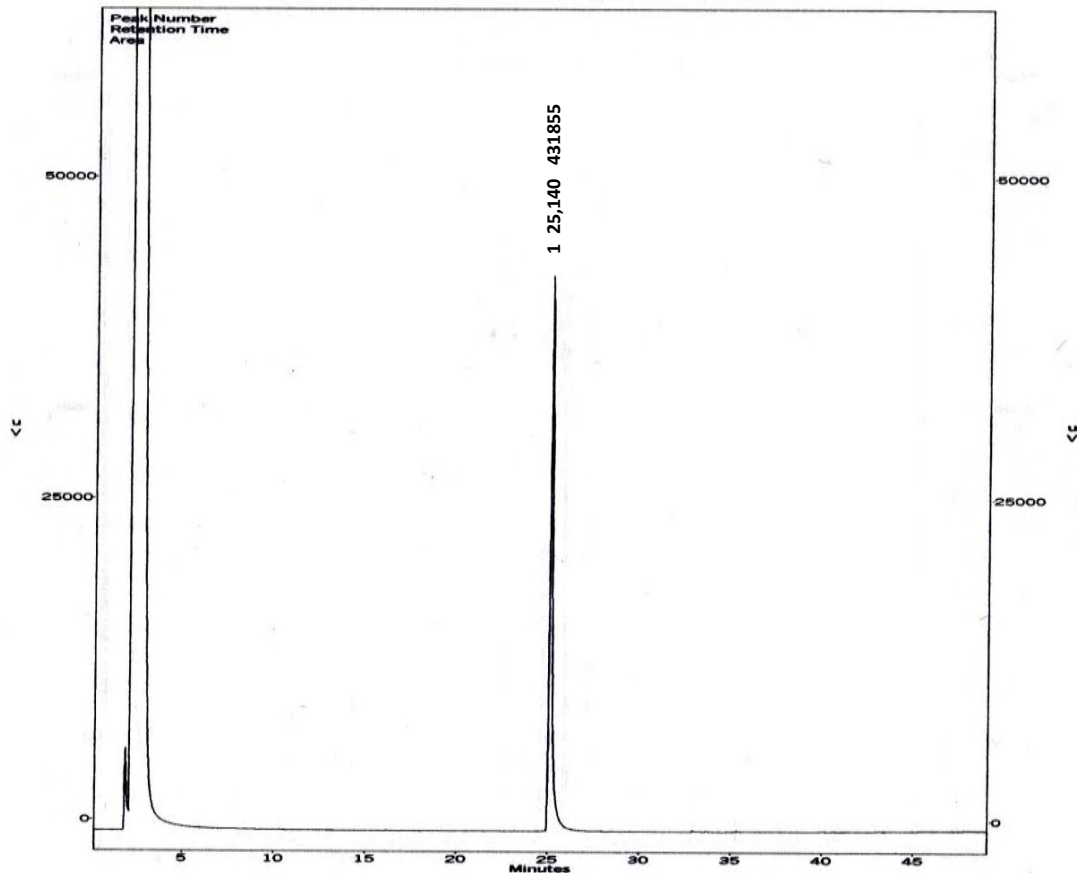
Figura 10. Perfil cromatográfico de la fracción 2 de la muestra de aceite esencial obtenida mediante CCD.



Fuente. Esta investigación

La figura 10, muestra la presencia de dos compuestos, el primer pico con un tiempo de retención de 17,666 minutos y el segundo pico con 25, 282 minutos; que según la tabla 4, corresponderían a γ -terpineno y timol.

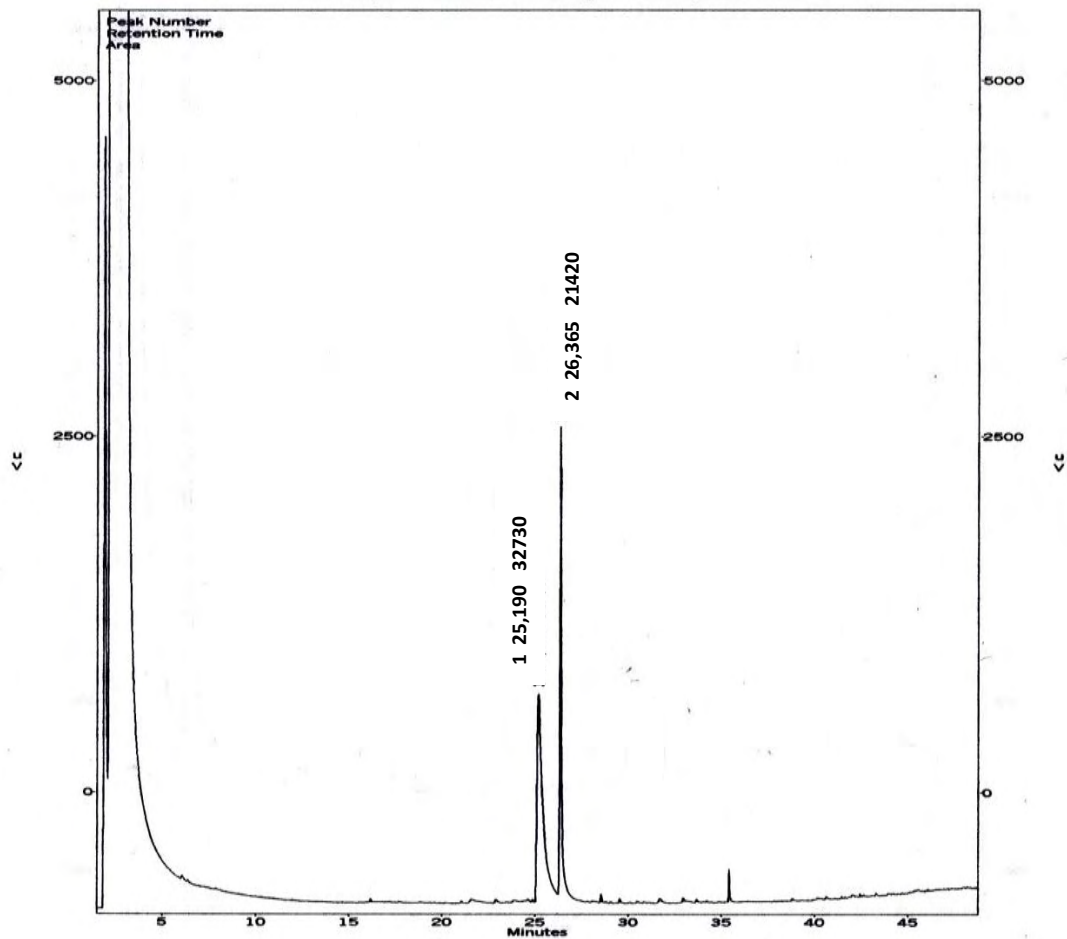
Figura 11. Perfil cromatográfico de la fracción 3 de la muestra de aceite esencial obtenida mediante CCD.



Fuente. Esta investigación

La fracción 3, muestra un único pico con tiempo de retención de 25,140 minutos que correspondería al metabolito timol, ya que coincide con el tiempo de retención presentado en la tabla 4 y además porque es el compuesto que se encuentra en mayor cantidad en el aceite esencial de esta especie. También se observa claramente el compuesto debido a la pureza de la muestra lo que permite su clara identificación.

Figura 12. Perfil cromatográfico de la fracción 4 de la muestra de aceite esencial obtenida mediante CCD.



Fuente. Esta investigación

En la fracción 4, la presencia de dos compuestos, con tiempos de retención similares, podrían corresponder a timol y carvacrol, ya que son isómeros y su tiempo de retención es muy cercano debido a que se ubica en un tiempo de 26,736 minutos.

Las fracciones de AEO encontradas mediante la técnica de fraccionamiento en CCD, fueron sometidas únicamente a su identificación mediante cromatografía de gases para ser comparados con los tiempos de retención de la muestra de aceite a la cual se le identifico el 98% de su composición, sin embargo no se realizaron pruebas de cuantificación para las demás fracciones presentes en la separación mediante CCD.

6.2 BIOENSAYOS

6.2.1 Aislamiento del Fitopatógeno. Partiendo de la cepa aislada de tejido de papa con presencia de *Rhizoctonia solani*, se obtuvo que el patógeno aislado presenta las características físicas que se muestran en la figura 13.

Figura 13. *Rhizoctonia solani* aislada de papa (*Solanum tuberosum* L.) vista en el microscopio (40x).



Fuente. Esta investigación

De acuerdo a la figura anterior, se puede afirmar que los aislamientos corresponden al patógeno de interés; ya que las características obtenidas son idénticas a las reportadas por la escala de claves de Sneh *et al.*, (1991), que observaron un color marrón oscuro, células multinucleadas y la base de la célula da origen a una ramificación, además que presenta crecimiento rápido. Resultados similares reporta Agrios (1996), donde el hongo presenta un micelio castaño oscuro con hifas algo gruesas, con ramificaciones en ángulo recto, constricciones en el punto de origen de la ramificación de la hifa y formación de una septa en el punto de origen.

6.2.2 Evaluación de la actividad biofungicida del aceite esencial. Al realizar las pruebas a nivel *in vitro* del crecimiento micelial del patógeno *Rhizoctonia solani* mediante la técnica de dilución (emulsificante Tween 20), bajo las concentraciones de aceite esencial indicadas en la tabla 1 se obtuvieron los resultados que se muestra a continuación:

Tabla 5. Resultados de la evaluación de la actividad biofungicida del aceite esencial de orégano en diferentes concentraciones frente al porcentaje de crecimiento de *R. solani* en el octavo día de seguimiento

Ensayo I					
Replica	Testigo	10	100	1.000	10.000
	(% Crec)	$\mu\text{L.ml}^{-1}$	$\mu\text{L.ml}^{-1}$	$\mu\text{L.ml}^{-1}$	$\mu\text{L.ml}^{-1}$
		(% Crec)	(% Crec)	(% Crec)	(% Crec)
1	100	98,5	18,6	0,0	0,0
2	100	96,6	17,2	0,0	0,0
3	100	94,8	15,8	0,0	0,0
4	100	98,6	16,6	0,0	0,0
5	100	94,5	17,8	0,0	0,0

Ensayo II							
	Testigo	80	85	90	95	100	110
	(% Crec)	$\mu\text{L.ml}^{-1}$	$\mu\text{L.ml}^{-1}$	$\mu\text{L.ml}^{-1}$	$\mu\text{L.ml}^{-1}$	$\mu\text{L.ml}^{-1}$	$\mu\text{L.ml}^{-1}$
		(% Crec)	(% Crec)	(% Crec)	(% Crec)	(% Crec)	(% Crec)
1	100	75,896	50,326	47,887	32,351	18,988	0,0
2	100	74,655	52,125	52,088	35,088	19,180	0,0
3	100	78,689	44,045	48,073	36,083	18,421	0,0
4	100	74,542	50,548	48,063	30,157	17,777	0,0
5	100	75,436	56,549	47,306	30,503	20,722	0,0

Ensayo III						
	Testigo	100	110	120	130	140
	(% Crec)	$\mu\text{L.ml}^{-1}$	$\mu\text{L.ml}^{-1}$	$\mu\text{L.ml}^{-1}$	ppm	$\mu\text{L.ml}^{-1}$
		(% Crec)	(% Crec)	(% Crec)	(% Crec)	(% Crec)
1	100	17,508	0,0	0,0	0,0	0,0
2	100	13,220	0,0	0,0	0,0	0,0
3	100	18,521	0,0	0,0	0,0	0,0
4	100	14,609	0,0	0,0	0,0	0,0
5	100	23,722	0,0	0,0	0,0	0,0

%Crec: Porcentaje de crecimiento de *R. solani*.

Fuente. Esta investigación

Ensayo I:

Tabla 6. Análisis de varianza para ensayo I.

F.V.	SC	GL	CM	F	P-Valor
Modelo	52426,56	4	13106,64	13172,50	<0,0001
Error	19,90	20	1,00		
Total	52446,46	24			

Fuente. Esta investigación

Realizado el análisis de varianza en el ensayo I (Tabla 6), muestra un P-Valor < 0,05 lo cual indica que existen diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza del 95% para las concentraciones de aceite esencial utilizadas.

Tabla 7. Prueba de Tukey $P \leq 0,05$ para Ensayo I

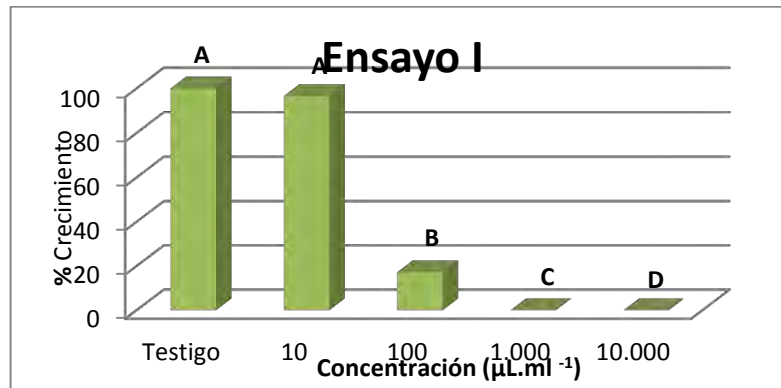
Concentración	Medias	Grupos Homogéneos*
10.000	0,00	A
1.000	0,00	A
100	17,20	B
10	96,60	C
0	100,00	D

*Letras distintas indican diferencia estadísticamente Significativa

Fuente. Esta investigación

La tabla anterior, indica el efecto de las concentraciones utilizadas sobre cada tratamiento, respecto al crecimiento de *R. solani*. En la concentración de 100 $\mu\text{L.ml}^{-1}$ el crecimiento fue del 17,2% y en las concentraciones de 1000 y 10000 $\mu\text{L.ml}^{-1}$ no se presentó crecimiento del fitopatógeno.

Figura 14. Concentración de aceite esencial de 10 $\mu\text{L.ml}^{-1}$ a 10.000 $\mu\text{L.ml}^{-1}$ (Ensayo I).



Fuente. Esta investigación

De acuerdo al análisis anterior, en el ensayo I se puede afirmar que en los tratamientos en los que se evaluaron concentraciones de 1000 y 10000 no hubo desarrollo del fitopatógeno, lo que indica que este tiene gran sensibilidad a estas concentraciones.

Ensayo II

A continuación se presentan los resultados estadísticos, con las concentraciones establecidas en la tabla 1.

Tabla 8. Análisis de varianza para el ensayo II

F.V.	SC	GL	CM	F	P-Valor
Modelo	34248,61	5	5708,10	1139,66	<0,0001
Error	140,24	28	5,01		
Total	140,24	34			

Fuente. Esta investigación

Los tratamientos estudiados después de desarrollado el análisis de varianza en el ensayo II (Tabla 8) muestra un P-Valor < 0,05 lo cual indica que no existe diferencia estadísticamente significativa a un nivel de confianza del 95%.

Tabla 9. Prueba de Tukey para ensayo II

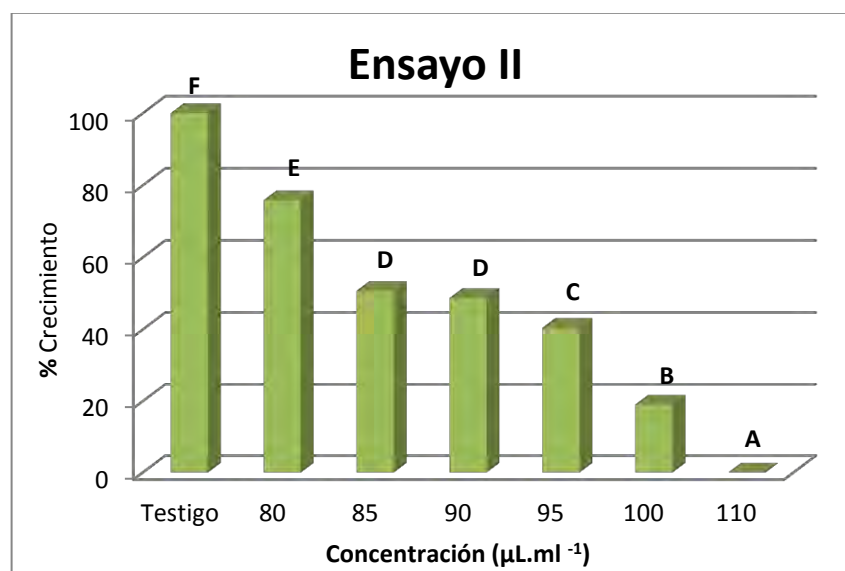
Concentración	Medias	Grupos Homogéneos*
110	0,00	A
100	19,02	B
95	32,84	C
90	48,68	D
85	50,72	D
80	75,84	E
0	100,00	F

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes.

Fuente. Esta investigación

En búsqueda de determinar las concentraciones que presentan un mayor grado de inhibición sobre el fitopatógeno se desarrolló la prueba de Tukey para este ensayo. En la tabla 9 se observa que hubo diferencias estadísticamente significativas en el % de crecimiento del patógeno para todas las concentraciones evaluadas, excepto entre 85 y 90. Además, en la concentración de $110 \mu\text{L.ml}^{-1}$ el porcentaje de crecimiento del fitopatógeno fue cero.

Figura 15. Concentración de aceite esencial de $0 \mu\text{L.ml}^{-1}$ a $100 \mu\text{L.ml}^{-1}$ (Ensayo II).



Fuente. Esta investigación

Ensayo III:

En las tablas 10 y 11, se presentan los resultados estadísticos, con las concentraciones establecidas en la tabla 1.

Tabla 10. Análisis de varianza para ensayo III

F.V.	SC	GL	CM	F	P-Valor
Modelo	39628,87	5	7925,77	2744,10	<0,0001
Error	66,43	23	2,89		
Total	39695,30	28			

Fuente. Esta investigación

Las concentraciones utilizadas en este tercer ensayo (Tabla 10) después de desarrollado el análisis de varianza muestra un P-Valor < 0,05 lo cual indica que existen diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza del 95%.

Tabla 11. Prueba de Tukey correspondiente al ensayo III

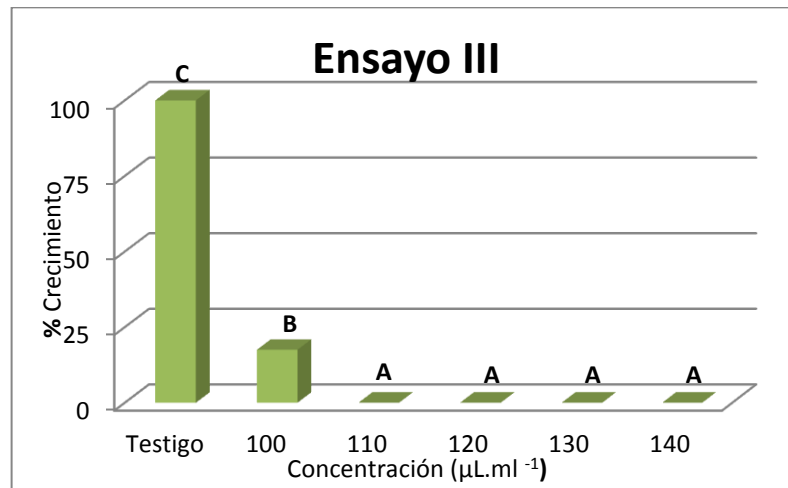
Concentración	Medias	Grupos Homogéneos*
110	0,00	A
140	0,00	A
130	0,00	A
120	0,00	A
100	17,52	B
0	100,00	C

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes

Fuente. Esta investigación

Después de desarrollada la prueba de Tukey para el ensayo III, se muestra que en las concentraciones de aceite: 110, 140, 130 y 120 $\mu\text{L.ml}^{-1}$ no hubo crecimiento del fitopatógeno, a diferencia de las concentraciones de 0 y 100 $\mu\text{L.ml}^{-1}$, con 17,52% y 100% respectivamente.

Figura 16. Concentración de aceite esencial de 0 $\mu\text{L.ml}^{-1}$ a 140 $\mu\text{L.ml}^{-1}$ (Ensayo III).



Fuente. Esta investigación

Con respecto a los resultados indicados en la figura anterior, se encuentra que existe diferencia entre los tratamientos, lo cual indica un resultado favorable para la presente investigación ya que es posible conocer la concentración mínima inhibitoria (CMI), correspondiente a 110 $\mu\text{L.ml}^{-1}$.

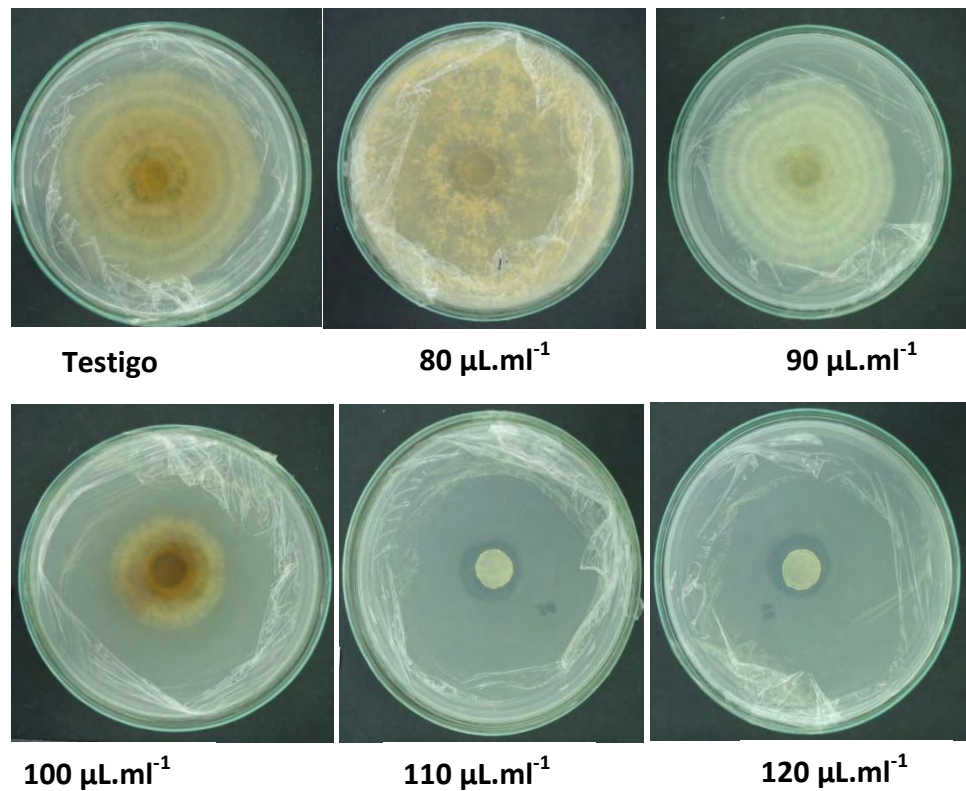
Además, el porcentaje de crecimiento mostrado en las figuras 14,15 y 16, indican que el comportamiento de *R. solani* es directamente proporcional a las concentraciones de aceite esencial de orégano evaluadas, sin embargo se puede apreciar que la concentración de 110 $\mu\text{L.ml}^{-1}$, muestra excelentes resultados en cuanto a la inhibición del crecimiento del fitopatógeno en estudio; siendo este resultado similar a lo reportado por Müller-Riebau *et al.* (1995), que realizaron estudios en Turquía, donde encontraron que los aceites esenciales de *Thymbraspicata*, *Satureja timbra*, *Pimpinella anisum* y *Origanum minitiflorum* inhibieron totalmente el micelio de *R. solani*; al separar y evaluar individualmente los metabolitos secundarios (MS), estos autores observaron que el efecto inhibitor lo lograban con carvacrol y timol a 100 y 150 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, respectivamente.

En consecuencia se aprecia una óptima concentración ya que esta fuerte acción antimicrobiana se debe a la acción del alto contenido de timol presente en el aceite esencial (83%), ya que se ha reportado que este compuesto es activo contra bacterias, hongos y protozoos, (Maguna *et al.*, 2006). Además, en otros estudios referentes al timol se ha demostrado que este terpenoide tiene la capacidad de interactuar con las membranas fosfolípídicas, alterando la permeabilidad de la membrana del microorganismo (Trombetta *et al.*, 2005); por otro lado se ha demostrado la actividad fungicida de aceites esenciales que

contienen timol sobre hongos fitopatógenos tales como *Botrytris cinerea* y *Fusarium oxysporum* (Hernández *et al.*, 2007).

A continuación se observa el crecimiento de *R. solani*, en ocho días de incubación con diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano.

Figura 17. Concentraciones de aceite esencial evaluadas sobre *R. solani* aislado de papa (*Solanum tuberosum*), a nivel *in vitro*, observadas después de ocho días de incubación.



Fuente. Esta investigación

6.2.3 Determinación de los niveles de sensibilidad de los aislamientos de *Rhizoctonia solani* al aceite esencial de orégano. El comportamiento *in vitro* de los aislamientos, se determinó con relación al porcentaje de crecimiento de las colonias de *R. solani*, llevados a cabo en diferentes ensayos y variando la concentración de aceite esencial como se muestra en la tabla 12.

Tabla 12. Crecimiento de *R. solani* frente a diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano.

Ensayo	Concentración $\mu\text{L.ml}^{-1}$	% de Crecimiento (PC)
1	0	100
	10	96,6
	100	17,2
	1.000	0
	10.000	0
	0	100
2	80	75,84
	85	50,7
	90	48,68
	95	32,83
	100	19
	110	0
3	0	100
	100	17,5
	110	0
	120	0
	130	0
	140	0

Fuente. Esta investigación.

En cuanto a la evaluación de *R. solani* frente al aceite esencial aplicado en dosis de 10 a 10000 $\mu\text{L.ml}^{-1}$, en diferentes ensayos como se indica en la tabla 12, se determinó que todos los tratamientos poseen efecto inhibitorio frente al fitopatógeno *Rhizoctonia solani* a nivel *in vitro*. En este sentido y según la escala de Shattock, con los datos obtenidos se realiza la siguiente clasificación:

Tabla 13. Relación de la sensibilidad de *R. Solani* frente al aceite esencial de *Lippia origanoides* H.B.K. en base a la escala de Shattock.

Escala de Shattock	Concentración de AEO $\mu\text{L.ml}^{-1}$
Sensibles (S) < 10% *	110, 120, 130, 140, 10000
Intermedio (I) entre 10 y 60% *	85, 90, 95, 100, 1000
Resistente (R) > 60% *	10, 80

*Crecimiento del Testigo

Fuente. Esta investigación.

De la tabla anterior se obtiene que el aceite esencial de orégano silvestre (*Lippia origanoides* H.B.K.), posee un efecto inhibitor muy importante contra el fitopatógeno *R. solani*, tal como se muestra en la tabla 12 desde $10 \mu\text{L.ml}^{-1}$ que fue la dosis mínima probada, presento un porcentaje de crecimiento de 96,6% del fitopatógeno y a partir de una concentración de $110 \mu\text{L.ml}^{-1}$ se inhibió completamente su crecimiento, por lo cual se considera como concentración letal para *R. solani*.

En diversos estudios se ha demostrado la actividad antifúngica para especies del género *Lippia*, ricas en compuestos fenólicos como el timol y carvacrol. Este es el caso de *L. sideoies*, *gracilis* (Lemos *et al.*, 1990), *L. graveolens* (Salgueiro *et al.*, 2003), *L. chevalieri*, *L. multiflora* (Bassole *et al.*, 2003) y *L. origanoides* (Santos *et al.*, 2004); resultados similares fueron encontrados en la presente investigación, además que se atribuye el efecto inhibitor sobre *R. solani* a los compuestos fenólicos como el timol y carvacrol.

Otros estudios realizados demuestran que el aceite de *L. origanoides* es un importante agente inhibitor del crecimiento de diferentes patógenos, entre ellos se puede destacar la investigación en la cual se evaluó el efecto de tres extractos de plantas silvestres entre los que se encuentra el extracto de *L. origanoides* contra *Rhizoctonia solani* y *Bipolaris maydis* causante de la mancha sureña del maíz, donde los resultados muestran que *L. origanoides* fue efectivo contra los dos hongos en una concentración de 1.5% (v/v) o 14319 ppm, causó una inhibición total en los patógenos, y en una concentración de 0.5% (v/v) o 4773 ppm la reducción fue del 70 y 84% en *R. solani* y *B. maydis*, respectivamente (Rodríguez *et al.*, 2005). Comparando estos resultados con la presente investigación se evidencia que el aceite de *L. origanoides* posee actividad antifúngica más relevante contra *R. solani* aislada de papa causante de la costra negra, puesto que en $110 \mu\text{L.ml}^{-1}$ se inhibe totalmente su crecimiento lo cual indica que es más sensible a los compuestos de *L. origanoides*. Además esta diferencia también se la puede atribuir a que los compuestos fenólicos a los cuales se les atribuye la actividad antifúngica no estén en la misma proporción dado que Rodríguez *et*

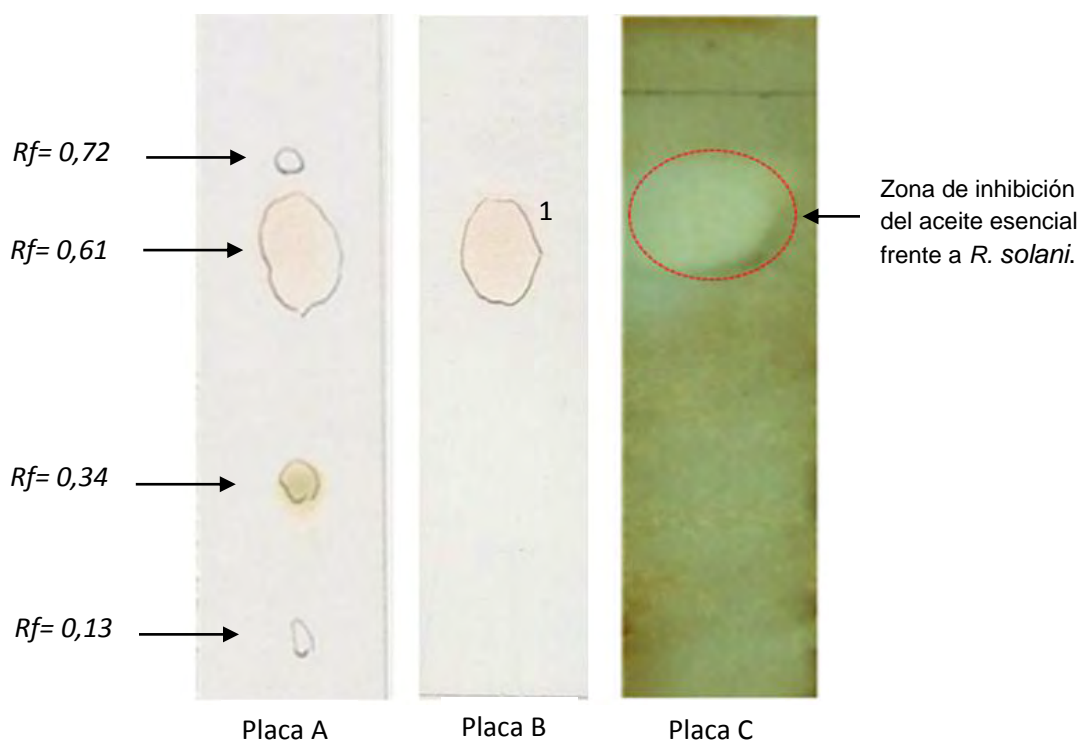
al.(2005) utilizaron extractos etanólicos y no su aceite esencial en donde estos se encuentran más concentrados.

También se han realizado estudios en donde se evaluó el efecto del aceite esencial de orégano como inhibidor de diversos patógenos, como el estudio reportado por Pantoja y Santacruz (2011), en donde evaluaron muestras de aceite de orégano de la especie *L. origanoides*, el cual presentó uso potencial como controlador del tizón tardío o gota causada por *Phytophthora infestans*, debido que desde la dosis mínima probada de $10 \mu\text{L}.\text{ml}^{-1}$ presentó un porcentaje de inhibición de 41.6% en el desarrollo del patógeno y a partir de una concentración de $150 \mu\text{L}.\text{ml}^{-1}$ se inhibió completamente el crecimiento del fitopatógeno.

6.2.4 Identificación y recuperación de la fracción antifúngica del aceite esencial mediante la técnica (C.C.D). Mediante bioautografía se logró determinar la zona de inhibición de los compuestos activos del aceite esencial de orégano. La separación de los compuestos mediante C.C.D permitió observar la acción biofungicida de los compuestos del aceite frente al fitopatógeno *Rhizoctonia solani*.

Los Rf de los compuestos encontrados en la muestra de aceite esencial, fueron comparados con los valores de Rf del patrón comercial Timol T0501 SIGMA, encontrando que existen valores similares de la zona en donde *R. solani* no se desarrolló como se muestra en la figura 18.

Figura 18. Cromatograma de fraccionamiento de aceite (placas A y B) y Bioautograma donde se evalúa el aceite esencial de *L. origanoides* H.B.K frente a *R. solani* (placa C).



Fuente. Esta investigación.

Placa A: Indica la separación de la muestra de *Lippia origanoides* H.B.K. mediante cromatografía de capa delgada, en la cual se utilizó como fase móvil: tolueno/acetato de etilo relación (9:1 v/v) y como fase estacionaria sílica gel 60 F₂₅₄. La **placa B** muestra la corrida del estándar comercial timol (1) y finalmente la **placa C** muestra el Bioautograma con la zona de inhibición por parte de los metabolitos presentes en el aceite esencial, sobresaliendo el timol con Rf 0,61 sobre *R. solani*. Para el ensayo se utilizó la muestra de aceite esencial puro, después de haber sido extraído y rotaevaporado, sin variar en ningún momento la concentración de este.

En la figura 18, se observa la zona de inhibición (círculo rojo), que ocasiona el aceite esencial, frente al crecimiento de *R. solani*. Como se mencionó anteriormente la acción inhibitoria de los metabolitos secundarios, fue atribuida a timol, metabolito secundario mayoritario presente en el aceite esencial de orégano de la especie en estudio (Russo M. *et al.*, 1998).

Además existen diferentes estudios (Montes *et al.*, 2000; Ku Ucan, 2008; Escobar *et al.*, 2010; Cueto, 2010) donde se evalúa aceites como *Lippia graveolens*, *Lippia*

origanoides, y otros extractos frente a diferentes patógenos, confirmando las propiedades antimicrobianas que los aceites esenciales poseen.

No existen estudios reportados en donde se fraccione el aceite esencial de orégano *L. origanoides* H.B.K. mediante CCD y que además se evalúe el comportamiento de sus compuestos sobre el crecimiento del fitopatógeno *R. solani* aislado de papa. Sin embargo se han realizado estudios en otros microorganismos, en donde realizan la separación de los compuestos de diferentes extractos de plantas, mediante CCD y evalúan sus actividades inhibitorias en mencionados microorganismos a nivel *in vitro*. Purkayastha *et al.*, (2012) evaluaron la actividad antimicrobiana y fitoquímica de aceites esenciales de Hinojo, Enebro y Kalonji frente a cepas de *E. coli* y *Staphylococcus aureus*, resistentes a variedad de drogas farmacéuticas; en donde se encontró la actividad inhibitoria de sus compuestos taninos, mediante la técnica de bioautografía. En otro estudio, el método de la bioautografía (Choma y Grzelak, 2011) permitió reconocer cualitativamente en el halo de inhibición de diferentes bacterias por acción del aceite esencial de *Capparis ovalifolia*.

Los resultados de la zona de inhibición encontrados mediante la técnica de bioautografía sobre el crecimiento de *R. solani*, puede ser atribuido al metabolito timol, debido a la composición encontrada mediante cromatografía de gases en las fracciones de CCD de la muestra de aceite, los cuales muestran tiempos de retención acordes a este compuesto según la identificación y cuantificación realizada para el aceite como tal, en donde la presencia de timol se encontró en un total de 83% (tabla 3), además, los datos de Rf en la zona de inhibición en CCD, es acorde al del patrón comercial utilizado para corroborar los resultados encontrados.

CONCLUSIONES

Se determinó la composición química del aceite esencial de orégano silvestre (*Lippia organoides* H.B.K.), mediante la técnica de separación de GC-FID/MS, que permitió identificar la mayoría de compuestos que se encuentran en el aceite esencial, como principal componente se estableció al metabolito timol con 83%, seguido de p-cimeno con 5,5%, mirceno 3% y γ -terpineno con 2,5%.

La Cromatografía de Capa Delgada permitió llevar a cabo el fraccionamiento de las muestras de aceite mediante la utilización de una fase móvil compuesta por tolueno y acetato de etilo (9:1 v/v) y la fase estacionaria en sílica-gel (60GF254), en donde se encontraron 4 fracciones, de las cuales, después de hacer la comparación de los Rfs de cada sustancia con el patrón comercial (Rf: 0,61), se determinó que el metabolito presente en mayor proporción fue timol (Rf: 0,62), además mediante cromatografía de gases se logró validar los resultados encontrados en CCD.

El fraccionamiento del aceite esencial de *Lippia organoides* H.B.K. permitió la evaluación de sus características antifúngicas frente al fitopatógeno *Rhizoctonia solani*, en donde se determinó que la técnica de Bioautografía permite determinar la fracción activa de la muestra de aceite a la cual se atribuye el potencial antifúngico, encontrando que el metabolito secundario activo corresponde a timol.

El aceite esencial de orégano de la especie *Lippia organoides* H.B.K. presentó un alto potencial antifúngico frente a *R. solani* aislado de papa evaluado a nivel *in vitro*, ya que a partir de una concentración de $110 \mu\text{L}\cdot\text{ml}^{-1}$ se inhibió completamente el crecimiento del fitopatógeno.

La utilización de los solventes adecuados y la optimización de la proporción de los mismos para ser aplicados en la separación de los compuestos del aceite esencial, mediante Cromatografía en Capa Delgada, es muy importante, ya que permite identificar a nivel *in vitro* cuál de estas fracciones posee el efecto inhibitorio sobre el crecimiento del patógeno en estudio. También es un tema de alto interés para llevar a cabo investigaciones futuras en la experimentación de muchos otros extractos y compuestos importantes.

RECOMENDACIONES

De acuerdo al trabajo desarrollado y con el fin de conocer a mayor profundidad el comportamiento del orégano de monte y sus compuestos, se plantea las siguientes recomendaciones:

Evaluar el aceite esencial de orégano a nivel de campo, con el fin de analizar su comportamiento antifúngico a esta escala y determinar la estabilidad del mismo frente a agentes físicos y químicos que puedan interferir en la actividad antimicrobiana descrita en el presente trabajo.

Evaluar las diferentes formas de inhibición que el orégano de monte puede presentar, como adecuar las hojas de la planta de forma que se permita esparcir en el cultivo de interés y analizar su funcionamiento antifúngico o antimicrobiano, función similar a la que cumple la misma planta en su estado de crecimiento como repelente entre otras funciones; también cabe la posibilidad de realizar ensayos de fermentación de la planta en sí, y evaluar la composición en cuanto a sus metabolitos secundarios después del tratamiento que reciba.

BIBLIOGRAFÍA

ACEVEDO, V. Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol. *ScientiaTechn.* 2007. 33:

ACUÑA, I. y VARGAS, M. «Rizoctoniasis de la papa», *Boletín Informativo* 46:1-4, Instituto de Investigaciones Agropecuarias, La Habana. 2004.

ADAMAS, R. Identificación de los componentes del aceite esencial por espectrometría de masas. Alluret. Bayler University. 2004

AGRIOS, G. Fitopatología. México. Limusa 838. 1996.

ALZAMORA, L.; MORALES, L.; ARMAS, L.; FERNÁNDEZ, G. “Medicina Tradicional en el Perú: Actividad Antimicrobiana *in vitro* de los Aceites Esenciales Extraídos de Algunas Plantas Aromáticas. Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas “Antonio Raimondi” Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Vol. 62, N° 2. 2001.

ARANGO O., BOLAÑOS F., VILLOTA O., HURTADO A., TORO I. 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*. Vol 10 No. 2 (217 - 226) Julio - Diciembre. 2012.

BANVILLE, G. Yield losses damage to potato plant caused by *Rhizoctonia solani* K.hn.Am. *Potato J.* 66:821-834. 1989.

BASSOLE, N., QUATTARA, S., NEBIE, R., QUATTARA, AT., ABORE, I., Y TRAORE, A. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. *Phytochemistry*. 2013.

BECKER, H., SCHER, J., SPEAKMAN, J. y ZAPP, J. Bioactivity Guided Isolation of Antimicrobial Compounds from *Lythrum salicaria*. *Fitoterapia*; 76 (6): 580-584. 2005.

BERMÚDEZ, A. Enfoques Metodológicos para la Investigación Etnobotánica sobre plantas Medicinales. *Memorias del Instituto de Biología Experimental*. Caracas. Venezuela. 1999.

BOLAÑOS, A.; VILLOTA, O. Estudio del proceso de extracción de aceite esencial de orégano silvestre del Alto Patía (*Lippia origanoides* Kunth) y determinación de la influencia de algunas condiciones agroecológicas en su composición y rendimiento. Tesis pregrado. Universidad de Nariño. Facultad Ingeniería Agroindustrial. Pasto, Colombia. 2010.

BOT, L., Nagy, S. y KOCSIS B. Detection of Microbiologically Active Compounds. En: Nyiredy S, editor. Planar Chromatography. Hungary: Springer; 2001.

BRAITHWAITE, A., SMITH, F. J. Cromatographic methods. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers, 1999.

CARRILLO, Y., GÓMEZ, M., COTES, M. y ÑÚSTEZ, C. Efecto de algunos aceites esenciales sobre el crecimiento de *Phytophthora infestans* (mont.) de bary en condiciones de laboratorio. Agronomía Colombiana 28(2), 245-253. Medellín Colombia, 2010.

CARLING, DE, LEINER, R. y WESTPHALE, P. Symptoms, signs and yield reduction associated with *Rhizoctonia* disease of potato induced by tuber born e inoculum of *Rhizoctonia solani* AG-3. Amer. Potato J. 1989.

CASTELLANOS, L.; RIVERO, T.; POMAS, A. y PAJÓN, J. Modelación matemática de *Alternaria solani* Sor en papa en función del tiempo», *Fitosanidad* 9 (1):28-33, La Habana, 2005.

CASTRO, A., OSORIO, C. Bioregulación de *R. solani* en la Germinación del café. Boletín CENICAFE Avance técnico N° 336. 2005.

CELIS, N., ESCOBAR, P., ISAZA, J., STASHENKO, E., MARTINEZ, J. Estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de *Lippia alba*, *Lippia organoides* y *phyla (Lippia) dulcis*, especie de la familia *Verbenaceae*. *Scintia Et Techina*, abril, año/vol. XIII, número 033. Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira, Colombia, 2007.

CERPA, M. Tesis doctoral. Hidrodestilación de aceites esenciales: modelado y caracterización. UNIVERSIDAD DE VALLADOLID. Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente. Valladolid, 2007.

CEVIPAPA. El cultivo de la papa en Colombia. En: www.cevipapa.org.co/cultivo/Colombia.php; consulta: agosto de 2010.

CHOMAI, GRZELAK E., Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography*; 1218(19), 2011.

COLORADO, J., GALEANO, E. y MARTÍNEZ, A. Detección de la actividad antimicrobiana de la esponja marina *Svenzea zeai* mediante bioautografía directa. *Actualidades Biológicas*; 27 (1): 2005.

CUETO, M. Determinación del efecto inhibitorio del aceite esencial y diferentes extractos de orégano (*Lippia berlandieri schauer*) sobre el crecimiento de fusarium

oxysporum tanto *in vitro* como en plántula de tomate. Tesis de doctorado en ciencias biológicas. Universidad autónoma de nuevo león. 2010.

CHÁVEZ, L.; DÍAZ, F.; ESCALANTE, G. y ESTRADA, E. “Efecto sinérgico del aceite esencial de *Origanum vulgare* a la Gentamicina en cultivos de *Escherichia coli*. Vol. 13, Nº 2 2008.

CHOMNAWANG, M., SURASSMO, S., NUKOOLKARN, V. y GRITSANAPAN, W..Antimicrobial Effects of Thai Medicinal Plants against Acne inducing Bacteria. J Ethnopharmacol; 101(1,3): 2005.

DANE. I. Censo Nacional del Cultivo de la Papa. 2002.

Del Valle Estrada, A.La gota. Revista Papa 1997.

DIXON, R. «Natural Products and Plant Disease Resistance», *Nature* 411:843-847, EE. 2001.

DOMINGUEZ, X. Métodos de Investigación Fitoquímica. Edit. Limusa S.A. 3ra edic. Méjico. 1985.

DOS SANTOS, F.; ARIMATÉIA, J.; GRACAS, A.; LIMA, S.; REIS, F. 2004. Composition and Biological Activity of Essential Oil from *Lippia origanoides* H.B.K. J. Essen. Oil Res. 16: 504- 506.

DUBEY, N. y KISHORE, N. 1987. Fungitoxicity of some higher plants and synergistic activity of their essential oils. *TropicSci.* 27: 23-27.

ESCOBAR, P.; LEAL, S.; HERRERA, L.; MARTINEZ, J. y STASHENKO, E. 2010. “Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components”. *MemInst Oswaldo Cruz*; 105(2): 184-190

ESTÉVEZ, A.; GONZÁLEZ M. E.; HERNÁNDEZ M. M.; CASTILLO J.; MORÉ O. y CORDERO M. 2001. «Estrategia para el desarrollo del mejoramiento de la papa», *Granma Ciencia* 5: 21-30, Cuba.

FAOSTAT. 2008. Estadísticas de producción de cultivos. En: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, <http://faostat.fao.org>; consulta: agosto de 2010.

FRANK, J. 1980. Rizoctoniasis, costra negra. In: Hooker, W. J. Compendio de enfermedades de la papa. Centro Internac. De la Papa. Lima, Perú. pp: 73-75.

GALEANO, J. 2006. Evaluación de la actividad antimicrobiana de esponjas del Golfo de Urabá y aislamiento de uno de los metabolitos bioactivos de la esponja *Svenzea zeai*. [Tesis doctoral] Universidad de Antioquia.

GOMEZ, A. 2008. Caracterización de extractos y aceites esenciales y evaluación de la actividad biológica de hoja de tres especies de piperáceas (*P. jacquemontianum*, *P. oradendron* y *P. umbellatum*). Trabajo de grado para optar el título de Químico Farmacéutico. Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala facultad de ciencias químicas y farmacia.

GÓMEZ, M. 2006. Aceites esenciales contra hongos fitopatógenos. Revista Andalucía Investiga: <http://www.andaluciainvestiga.com>

GONZÁLEZ, D., y HERNADEZ, A. 2002. Estado actual de la taxonomía de *Rhizoctonia solani* Kühn. *Rev. Mex. Fitopatol.* 20: 200-205.

GUENTER, E. 1949. The Essential Oils of the Plant Family Labiatae. Canada. Van Nostrand. III: 541.

GUERRERO L. y NÚÑEZ. M. 1991. Obtención de Aceites Esenciales de Eucalipto y Orégano. *Industria Farmacéutica* 1991; Julio/Agosto: 73-79.

HENAO, J., MUÑOZ, J., PADILLA, L., RÍOS, E. 2010. Extraction and characterization of the essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. "orégano de monte" cultivated at Quindío and evaluation of antimicrobial activity. Universidad del Quindío. Maestría en Química. *Rev. Invest. Univ. Quindío* (21): 82- 86. Armenia – Colombia.

HERNANDEZ, A. 2012. Efecto antifúngico *in vitro* e *in situ* del quitosano y aceites esenciales sobre *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. Maestría en Ciencias de Manejo Agroecológico de Plagas y Enfermedades. México.

HERNÁNDEZ, F., GUERRERO, E. y SÁNCHEZ, 2007. Abies, Inhibición del crecimiento Micelial de *Rhizoctonia solani*.

HOOKE, W. 1986. Compendium of potato diseases. APS.p 125.

HORVÁTH, G., KOCSIS, B., BOTZ, L., NÉMETH, J. y SZABÓ, L. (2002) Antibacterial Activity of Thymus Phenols by Direct Bioautography. *Acta Biologica Szegediensis* 2002; 46 (3-4):145-146.

HUILCAPI, E. 2012. Combate de Tizón Tardío (*Phytophthora infestans*) con activadores de defensas naturales en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) c.v. Superchola. Trabajo de tesis. Ingeniero Agrónomo. Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ingeniería Agronómica. Pag. 6.

IICA. 1999. Acuerdo de competitividad de la Cadena agroalimentaria de la papa. Colección de Documentos IICA, Serie Competitividad No.14, págs. 55 y 62. Colombia.

INTA. 2004. Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuario. Manejo integrado de plagas del cultivo de papa

JENNINGS, W., MITTFELDLT, E., and STREMPLE, P. 1987. Analytical gas chromatography. San Diego: Academic Press, pp. 1-287

JIMENEZ, L. 2010. análisis sistemático de literatura sobre el efecto bactericida y/o fungicida de los subproductos obtenidos del metabolismo de *Candida guilliermondii* EN cultivos de tomate. Tesis pregrado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. Microbiología industrial. Bogota D.C. Colombia.

KALEMBA, D. y KUNICKA, A. 2003. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry. Poland*, 10 pag 813-829.

KELLNER, R., MERMET, J. M., OTTO, M., VALCARCEL, M., y WIDMWER, H.M. (Ed). 2004. Analytical Chemistry. Berlín: Willey-VCH, Verlag GmbH & Co., pp.407-409; 554, 823-825; 867

KORDALI, S.; AKIR, A.; OZER, H.; CAKMAKCI, R.; KESDEK, M. y METE, E. 2008. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and *p*-cymene Original Research Article *Bioresource Technology*, Volume 99, Issue 18. Pág. 8788-8795

KULISIC, T.; RADONIC, A.; KATALINIC, V.; MILOS, M. 2004. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chem.* 85: 633-644.

LEMONS, T. L. G., MATOS, F.J.A., ALENCAR, J. W., CRAVEIRO, A. A., CLARK, A. M., Y MICCHESNEY, J. D. 1990. Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plant. *Phytotherapy Research*, 4(2). 82-84p

LEON, P. 2009. Monografía 061, ficha técnica orégano, *Origanum vulgare* L. publicación virtual red peruana de alimentación y nutrición. Lima-Perú.

LOCK O. 1994. Investigación Fitoquímica. Edit. Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima.

MAGFOR. 1999. Agricultura y Desarrollo. Ministerio Agropecuario Forestal. Nicaragua.

MANRIQUE, E., MOSQUERA, E. 1997. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos y fracciones obtenidas a partir de *Espeletia murilloi* Cuatr. Y *Espeletopsis guacharaca*. Carrera bacteriología. Facultad de Ciencias Básicas. Pontificia Universidad Javeriana. Trabajo de Pregrado. Bogota. DC. Pag 15, 16.

MARRIOTT, P.J., SHELLIE, R., and CORNWELL, C. Gas Chromatographic Technologies for the Analysis of Essential Oils. J. Chromatogr. A, 2001, 936, pp. 1-22.

MARTINEZ, A. 2003. "aceites esenciales". Profesor facultad química farmacéutica. Universidad de Antioquia. Medellín.

MARTÍNEZ, J., SULBARÁN DE FERRER, B., OJEDA DE RODRÍGUEZ, G., FERRER, A. & NAVA R. 2003. Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de Mandarina. Revista de Facultad de Ciencias Agrónomas.; (20): 502-512.

MILOS, M.; MASTELIC, J.; JERKOVIC, I. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*). Food Chem. 2000. 71: 79-83.

MONTES, R.; CRUZ, V.; MARTINEZ, G.; SANDOVAL, G.; GARCIA, R.; DOMINGUEZ, S.; BRAVO, L.; BERMUDEZ, K.; FLORES, H. y CARVAJAL, M. 2000. Propiedades antifúngicas en plantas superiores. Análisis retrospectivo de investigaciones. Revista mexicana de fitopatología. Obregon México. Vol 18

MONTES, M. A. 1996. El boldo, planta tradicional chilena de permanente actualidad. Farmacia Sudamericana; 6: 18-21

MUHAMMAD, I., EL SAYED, K.A., MOSSA, J.S., AL-SAID, M.S., EL-FERALY, F.S. y CLARK, A.M. 2000. Bioactive 12-Oleanene Triterpene and Secotriterpene Acids from *Maytenus* sp. J Nat Prod; 63: 605-610.

MUÑOZ, A., CASTAÑEDA, M., BLANCO, K., CÁRDENAS, C., REYES, J., KOUZNETSOB, V. & STASHENKO, E. 2007. Composición y Capacidad Antioxidante de Especies Aromáticas y Medicinales con Alto Contenido de timol y carvacrol. Scientia et Technica; (33): 125-128.

MURRAY, P.; PFALLER, M. 2006. Microbiología Médica. Ed 5, ilustrada. España. Elsevier. Pág 301.

MÜLLER, F., BERGER, B. y YEGEN, O. 1995. Chemical composition and fungitoxic properties to phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. J. Agricol. Food Chem. 43: 2262-2266.

NIST. 2005. Agencia Americana de Estándares.

NOSTRO, A., GERMANÓ, M.P., D'ANGELO, V., MARINO, A., CANNATELLI, M.A. 2000. Extraction Methods and Bioautography for Evaluation of Medicinal Plant Antimicrobial Activity. *Lett Appl Microbiol* ; 30: 379-384.

OLAYA, J. M. Manual de extracción de aceites esenciales de plantas aromáticas. Banco de proyectos CORPOEDUAGRO. 35pg. Año 2000.

OLIVEIRA, D. G. G. (2007). Issue. *Food Chemisitry* , 236-240.

OLIVEIRA, D., LEITAÓ, G. G. BIZZO, H. R. y LOPEZ, D.2005. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* H.B.K Departamento de productos. Naturais e Alimentos, Facultad e de Farma´cia – UFRJ, cetro de ciencias da sau de Bloco A 2º andar. Universidad Federal de Rio de Janeiro. Ilha do funda´o, 21941-590, Rio de Janeiro, Brazil.

OROZCO, J.I. Y M.I. LÓPEZ. 2001. Evaluación de características agronómicas, de calidad industrial y resistencia a *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary en 19 clones de papa *Solanum tuberosum* L. en Santa Rosa de Osos (Antioquia). Trabajo de grado. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín.

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

PANTOJA, D., SANTACRUZ, L. 2011. Evaluación de la actividad antifúngica y antioxidante del aceite esencial de orégano silvestre *Lippia organoides* H.B.K. del alto Patía. Tesis pregrado. Ingeniería Agroindustrial. Pasto Colombia.

PAPAVIZAS, G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology. Ecology and the potential for biocontrol. *Annual Rev Phytopathol*. 23: 23-54.

PARMENTER, J. 1970. *Rhizoctonia solani*, Biology and Pathology. Press, Berkeley, Los Angeles, U.S.A. University of California. 255p.

PATRA, J.K., GOUDA, S., SAHOO, S.K., THATOI, H.N. 2012. Chromatography separation, H NMR analysis and bioautography screening of methanol extract of *Excoecaria agallocha* L. from Bhitarkanika, Orissa, India. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. S50-S56. Odisha. India.

POWELSON, ML; JOHNSON, K.B.; ROWE, R.C. 1993. Management of diseases caused by soil borne plant pathogens. *In* Rowe, RC.Ed. Potato health management.APS.p.149-158.

PINEDA, J., HERNANDEZ, A., GONZALEZ, A. 2011. Técnica de inoculación rápida y eficiente para la evaluación de materiales de maíz (*Zea mays l.*) ante

Rhizoctonia solani kuhn. *Bioagro*. [online]. abr. 2005, vol.17, no.2 [citado 14 Diciembre 2011], p.93-98. Disponible en la World Wide Web: <http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612005000200004&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1316-3361.

PURKAYASTHA, S., NARAIN, R., DAHIYA, P. 2012. Evaluation of antimicrobial and phytochemical screening of Fennel, Juniper and Kalonji essential oils against multi drug resistant clinical isolates. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. Amity Institute of Biotechnology, Amity University, Noida, Uttar Pradesh, India.S1625-S1629.

QUINTERO, L., 2004. Documento de Trabajo No 40. Observatorio de Agrocadenas IICA, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Costos de producción de papa en Colombia.

RAMÍREZ, A., GUTIÉRREZ, R., DÍAZ, G., GONZÁLEZ, C., PÉREZ, N. y VEGA, S. 2003. High-performance Thin-layer Chromatography-bioautography for Multiple Antibiotic Residues in Cow's Milk. *J Chrom B*; 784: 315-322

RANGEL D., GARCÍA I., VELASCO J., BUITRAGRO D. y VELAZCO E. 2001. Actividad antimicrobiana de los extractos etanólico, acetónico y acuoso de *Baccharisnitida*(Ruiz et Pavon) Pers. *REVISTA DE LA FACULTAD DE FARMACIA Vol. 42*.

RAO, G., SINGH, M. y SINGH, H. 1992. Fungitoxic evaluation of essential oils extracted from higher plants against some sugarcane pathogens *in vitro*. 32: 377-382.

REY M., DELGADO, J., RINCÓN, A., LIMÓN, M. y BENITEZ, T. 2000. Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicidas. *Rev. Iberoam. Micol.* 17: 31-36

RIVEROS, F., SOTOMAYOR, R., RIVERA, V., SECOR, G. y ESPINOZA, B. 2003. Resistencia de *Phytophthora infestans* (Montagne) de Bary a Metalaxyl en cultivo de papas en el monte de Chile. *Agricultura técnica Chile* 63 (2), 117 – 124p.

ROCHA, N.E.; GALLEGOS, J.A.; GONZALEZ, R.F.; RAMOS, M.; RODRIGUEZ, M.E.; REYNOSO, R.; ROCHA, A.; ROQUE, M.R. 2007. Antioxidant effect of oregano (*Lippia berlandieri* v. Shauer) essential oil and mother liquors. *Food Chem.*102: 330-335.

RODRIGUEZ, D. Y ZANABRIA, M. 2005. Efectos del extracto de tres plantas silvestres sobre la rizoctoniosis, la mancha sureña del maíz y los patógenos que las causan. *INCI*, dic., vol.30, no.12, p. 739-744. ISSN 0378-1844.

ROHM y HASS Company.1980. La papa. Control de sus enfermedades y plagas en América Latina. Industrias químicas Chile S.A. Santiago, Chile. 40 p

ROHLF, F.J. 2005 Dig. Digitize landmark 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 quimotipos de *Lippia organoides* obtenidos por diferentes técnicas de extracción. Scientia et Technica, 13, (33), p. 325-328.

RUSSO M., GALLETTI G.C., BOCCHINI P. y CARNACINI A. 1998. Essential oil chemical composition of wild populations of Italian orégano spice (*Origanum vulgare* ssp. *Hirtium* (Link) Letswaart); Preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis, I. Inflorescences. J Agric Food Chem.; 46: 3741-3746.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE M. y BRUNI R. 2005. Comparative Evaluation of 11 Essential Oils of Different Origin As Functional and Spatial Analysis of Epidemics Caused by Species in the Genus Antioxidants, Antiradicals and Antimicrobials in Foods, *Food Chem.* 91:621-632, Alemania.

SALAMANCA, M. y SANCHEZ, M. 2009. “extracción y caracterización de la oleoresina del orégano (*Origanum vulgare*)”. Trabajo de grado. Universidad tecnológica de Pereira. Facultad de tecnología: escuela de tecnología química. Pereira. Colombia.

SALGUEIRO, L. R., CAVALEIRO, C., GONC, ALVESH, M. J., Y CUNHA, A. P. 2003. Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Lippia graveolens* from Guatemala. *Planta Médica.* 69, 80-83p.

SALISBURY, D.C., RIGBY, C.E. y CHAN, W. 1989. Determination of Antibiotic Residues in Canadian Slaughter Animals by Thin-Layer Chromatography-Bioautography J. Agric Food Chem; 37: 105-108

SHATTOCK, R. 1988. Studies on the inheritance o resistance to metalaxyl in *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology.* 37: 4-11p.

SKANDAMIS, P.N. y NYCHAS, G.-J.E. 2001. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *J Appl Microbiol* 91, 1011–1022.

SNEH, B., BURPEE, L. y OGOSHI, A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. American Phytopatological Society, St. Paul, MN, USA.133 p.

SRIDHAR, S. R., RAJAGOPAL, R., RAJAVEL, R., MASILAMANI, S. y NARASIMHAN, S. 2003. Antifungal activity of some essential oils. *J. Agric Food Chem.* 51:7596-7599

TORRES, H., SÁNCHEZ, M. y POTES, J. 2008. Composición química del aceite esencial de dos quimiotipos de *Lippia origanoides* H. B. K. Memorias III Congreso Internacional de Plantas Medicinales Aromáticas y Condimentarias, Palmira (Colombia).

VAILLANT, D., ROMEU, C., RAMOS, E., GONZÁLEZ, M., RAMÍREZ, R., GONZÁLEZ, J. 2009. Inhibitory Effect in vitro of Five Monoterpenes from Essential Oils on a *Rhizoctonia solani* Isolate in Potato (*Solanum tuberosum* L.). *Fitosanidad* v.13 n.3 Ciudad de la Habana jul.-sep

Vázquez, D. 2012. El orégano de monte (*Lippia origanoides*) del Alto Patía: Efecto del método de obtención de sus extractos sobre la composición y la actividad antioxidante de los mismos. Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá Facultad de Ciencias Departamento de Química Maestría en Ciencias Químicas Bogotá D.C., Colombia.

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: Fedepapa, <http://www.fedepapa.org.co/files/estadistica/estudio.pdf>; consulta: agosto de 2010.

WILSON, P.; KETOLA, O.; AHVENNIEMI, P.M.; LEHTONEN, M. J. y VALKONENPLANT, J. 2008. Dynamics of soil borne *Rhizoctonia solani* in the presence of *Trichoderma harzianum* : effects on stem canker, black scurf and progeny tubers of potato. *Pathology* 57(1):152–16

ZAVALETA, E. 2000. Alternativas del manejo de las enfermedades de las plantas, *Terra* 17:202-217, México.

ZANANDREA, I.; JULIANO D.; ANDRÉA, B.; JULIANE, L. y VERIDIANA K. 2004. Atividade do óleo essencial de orégano contra fungos patogênicos do arroz: crescimentos micelial em placas. Universidad Federal de Pelotas Departamento de Agronomía. *Revista Brasileira de Farmacognosia*.