

**FORMULACIÓN DE UN BIOFUNGICIDA A PARTIR DE UNA EMULSIÓN CON
ACEITE ESENCIAL DE OREGANO SILVESTRE (*Lippia origanoides* H.B.K)
FRENTE AL FITOPATÓGENO *Fusarium oxysporum* f. sp. *lisi* CAUSANTE DE
MARCHITEZ VASCULAR DE ARVEJA (*Pisum Sativum* L.)**

**EDGAR ARMANDO RUANO UNIGARRO
ALVARO JAVIER VALLEJO HORMAZA**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL
SAN JUAN DE PASTO
2014**

**FORMULACIÓN DE UN BIOFUNGICIDA A PARTIR DE UNA EMULSIÓN CON
ACEITE ESENCIAL DE OREGANO SILVESTRE (*Lippia origanoides* H.B.K)
FRENTE AL FITOPATÓGENO *Fusarium oxysporum* f. sp. *lisi* CAUSANTE DE
MARCHITEZ VASCULAR DE ARVEJA (*Pisum Sativum* L.)**

**EDGAR ARMANDO RUANO UNIGARRO
ALVARO JAVIER VALLEJO HORMAZA**

**Trabajo de grado presentado como requisito para obtener el título de
Ingeniero Agroindustrial**

**Director:
Diego Mejía España I.A. M. Sc.**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL
SAN JUAN DE PASTO
2014**

NOTA DE RESPONSABILIDAD

“Las ideas y conclusiones aportadas en el trabajo de grado, son responsabilidad exclusiva de sus autores”.

Artículo 1 del acuerdo No. 323 de octubre 11 de 1966, emanada del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación:

Firma del Director
DIEGO FERNANDO MEJÍA E.

Firma del Jurado
DAVID EDUARDO ÁLVAREZ S.

Firma del Jurado
JULÍAN MARCELO ACOSTA M.

San Juan de Pasto, octubre de 2014.

DEDICATORIA

A Dios, por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida, por protegerme durante todo mi camino y darme fuerzas para superar obstáculos y dificultades a lo largo de toda mi vida.

A mi madre Carmen Elena Unigarro Reina, por la confianza y el apoyo brindado, que sin duda alguna me ha demostrado su amor, corrigiendo mis faltas y celebrando mis triunfos en todo el trayecto de mi carrera profesional.

A mi padre Edgar Homero Ruano Estrada, por su apoyo incondicional en el transcurso de mi carrera universitaria, por compartir momentos de alegría, tristeza y demostrarme que siempre podré contar con él.

A mi hija Valery Camila Ruano Benavides, por su dulzura y amor demostrado, por compartir momentos inolvidables, por ser la inspiración para culminar mi carrera profesional, y por ser uno de los seres más importantes en mi vida.

A mis profesores y asesores por su tiempo, por su apoyo así como por la sabiduría que me transmitieron en el desarrollo de mi formación profesional.

A mis familiares, quienes con su ayuda, cariño y comprensión han sido parte fundamental para el desarrollo de mis logros y metas.

A todos mis gracias por la ayuda directa e indirectamente en la realización de esta tesis y que Dios les bendiga.

Edgar Armando Ruano Unigarro

DEDICATORIA

Son muchas las personas especiales a las que agradezco por su amistad, apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en el corazón. Sin importar en donde estén, si llegan a leer esta dedicatoria quiero que me recuerden como yo a ellas y sepan que siempre formaran parte de mi por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

A Dios. Por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida. Por los triunfos y los momentos difíciles que me han enseñado a valorarte cada día más, esta tesis se la dedico a mi Dios quien supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

A mi madre María Eugenia Formaza Anaguano, por haberme educado y soportar mis errores. Gracias a tus consejos, por el amor que siempre me has brindado, por cultivar e inculcar ese sabio don de la responsabilidad, cuyo vivir me ha mostrado que en el camino hacia la meta se necesita de la dulce fortaleza para aceptar las derrotas y del sutil coraje para derribar miedos.

A mis profesores que en este andar por la vida, influyeron con sus lecciones y experiencias en formarme como una persona de bien y preparada para los retos que pone la vida, a todos y cada uno de ellos les dedico cada una de estas páginas de mi tesis.

A tu paciencia y comprensión, a tu ayuda y tu tiempo para que yo pudiera cumplir con esta meta. Por tu bondad y sacrificio me inspiraste a ser mejor, ahora puedo decir que esta tesis lleva mucho de ti, gracias por estar siempre a mi lado.

A mis familiares, porque creyeron en mí y porque en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada mi meta.

Alvaro Javier Valsejo Formaza

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios por protegernos durante toda la carrera y darnos fuerzas para superar obstáculos y dificultades en esta etapa de nuestras vidas.

Le damos gracias a nuestras familias por apoyarnos en todo momento, por los valores inculcados y por habernos dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de nuestras vidas.

A la Vicerrectoría de Investigaciones, Postgrados y Relaciones Internacionales por el financiamiento del Trabajo de Grado.

A la Facultad de Ingeniería Agroindustrial por ser nuestro segundo hogar y permitirnos hacer realidad nuestro sueño de ser llamados Ingenieros Agroindustriales.

Al Asesor I.A. MSc. Diego Fernando Mejía, por dirigir este Trabajo de Grado.

Al Jurado I.A. Candidato a MSc David Álvarez, por su contribución y atención durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

Al Jurado I.A. Candidato a MSc Julián Acosta, por su colaboración y tiempo durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

A la I.A. Johana Andrade, por su dedicación, entrega y ayuda integral en la asesoría del trabajo de investigación, en el área de recubrimientos comestibles para alimentos.

Al grupo de investigación de Tecnologías Emergentes en Agroindustria (TEA) por facilitar las instalaciones y los equipos del laboratorio de Conservación y Calidad de Alimentos.

Al grupo de investigación de Semilleros de Investigación en Agroindustria (SEMINA) por el apoyo en la participación en Congresos Regionales, Nacionales e Internacionales.

A todas y cada de las personas que de una u otra forma hicieron parte en la ejecución de este trabajo de grado.

Mil gracias...

RESUMEN

La marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum* es una de las enfermedades más limitantes en el cultivo de arveja (*Pisum sativum* L.) generando considerables pérdidas económicas y alta contaminación ambiental a causa de la aplicación de pesticidas sintéticos. En la actualidad, se destaca la utilización de medidas alternativas al control químico, donde los aceites esenciales (A.E.) cobran importancia. Por tanto, se evaluó el extracto esencial de *L. origanoides* H.B.K (60,3% timol) como componente de un biofungicida capaz de disminuir la incidencia de la enfermedad de la marchitez vascular de la arveja. Se determinó la sensibilidad *in vitro* del fitopatógeno *F. oxysporum* utilizando la técnica de dilución en agar, calculando la Concentración Mínima Inhibitoria (C.M.I) en $400 \mu\text{LmL}^{-1}$ matriz estable que contenga el aceite esencial y pueda ser utilizada en condiciones de campo, para ello se evaluó un biopolímero de Alginato de Sodio ácido y dos relaciones de Carboximetil-celulosa (0,1% y 0,3%) en medio acuoso. El biopolímero fue impregnado en sensidiscos enmendados con cinco concentraciones de aceite esencial (200, 400, 600, 800 y $1.000 \mu\text{LmL}^{-1}$) el crecimiento micelial del fitopatógeno *in vitro* dando como resultado que el tratamiento: aceite esencial de *L. origanoides* $400 \mu\text{LmL}^{-1}$ + Carboximetil-celulosa 0,3% + Alginato de sodio ácido 1,5%, presento los mejores resultados. En la fase de invernadero se comprobó que el biopolímero se adhiere a las semillas de arveja sin afectar la emergencia y que la aplicación de biofungicida con una concentración de $800 \mu\text{LmL}^{-1}$ de aceite esencial de orégano silvestre disminuyendo la incidencia de marchitez vascular a un 0% en relación al testigo absoluto ($P < 0,05$). Los resultados obtenidos viabilizan evaluar la aplicación del biofungicida bajo condiciones de campo.

Palabras clave: Marchitez vascular, *Pisum sativum* L., timol, biopolímero.

ABSTRACT

The vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* is one of the most limiting diseases in the cultivation of pea (*Pisum sativum* L.) generating considerable economic losses and high environmental pollution because of the use of synthetic pesticides. Currently, the use of alternatives to chemical control, where the essential oils (A.E) value is emphasized charge. Therefore, the essential *L. origanoides* HBK extract (60.3% thymol) as a component of a fungicide capable of decreasing the incidence of vascular wilt disease pea assessed. *In vitro* sensitivity of the pathogen *F. oxysporum* using the agar dilution technique was determined by calculating the minimum inhibitory concentration (C.M.I) in 400 stable μLmL^{-1} matrix containing the essential oil and can be used in field conditions for this a Sodium Alginate biopolymer and two relationships acid carboxymethyl cellulose (0.1% and 0.3%) in an aqueous medium was evaluated. The biopolymer was amended sensidiscs impregnated with five concentrations of essential oil (200, 400, 600, 800 and 1000 μLmL^{-1}) the mycelial growth of phytopathogenic *in vitro* resulting treatment: *L. origanoides* essential oil 400 μLmL^{-1} carboxymethyl cellulose + 0.3% + 1.5% alginate sodium acid, gave the best results. In phase greenhouse it was found that PHB adheres to pea seeds without affecting the emergence and application of fungicide at a concentration of 800 μLmL^{-1} essential oil of wild oregano decreasing the incidence of vascular wilt to 0 % relative to absolute control ($P < 0.05$). The results make feasible to evaluate the application of fungicide under field conditions.

Keywords: vascular wilt, *Pisum sativum* L., thymol, biopolymer.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN.....	16
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	19
2. JUSTIFICACIÓN.....	20
3. MARCO TEORICO	21
3.1 ARVEJA (PISUM SATIVUM L.)	21
3.1.1 Taxonomía de Arveja:.....	21
3.1.2 Morfología.	21
3.2 FUSARIUM OXYSPORUM F. SP. PISI.	22
3.2.1 Taxonomía del Fitopatógeno Fusarium oxysporum f. sp. pisi.....	22
3.2.2 Sintomatología de la Enfermedad de Marchitez Vascular de la Arveja...23	
3.2.3 Epidemiología de la Enfermedad de la Marchitez Vascular de la Arveja.24	
3.3 ALTERNATIVAS DE MANEJO DE LA ENFERMEDAD.....	25
3.3.1 Manejo varietal.....	25
3.3.2 Control sintético.	25
3.3.4 Rotación de cultivos.....	26
3.3.5 Manejo biorracional.....	26
3.4 ACEITES ESENCIALES (A.E)	26
3.4.1 Actividad Antimicrobiana y Antibacterial de Aceites Esenciales.	27
3.4.2 Metabolismo Secundario Vegetal	28
3.4.3 Actividad Antimicrobiana de la Familia Verbenacea.	30
3.4.4 Aceite Esencial de Orégano Silvestre (Lippia organoides H.B.K).	31
3.4.4.1 Composición del Aceite Esencial de Orégano Silvestre (Lippia organoides H.B.K).	32
3.4.4.2 Extracción del Aceite Esencial de Orégano Silvestre (Lippia organoides H.B.K).	32
3.4.4.3 Actividad Antifúngica y Antimicrobiana del Aceite Esencial de Orégano Silvestre (Lippia organoides H.B.K).....	33

3.5	RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES Y BIOPOLÍMEROS.	35
3.5.1.	Principales Componentes de los Recubrimientos Comestibles.	35
3.5.2.	Tipos de Recubrimientos comestibles.	36
3.5.2.1.	Recubrimientos constituidos a base de mezclas de Biopolímeros.....	37
3.5.3	Recubrimientos y biopolímeros a utilizar.....	38
3.5.4	Goma Arábica.....	38
3.5.5	Alginato de sodio ácido.....	38
3.5.6	Soportar aditivos alimentarios.....	39
4.	ESTADO DEL ARTE.....	40
5.	OBJETIVOS DEL PROYECTO.....	45
5.1	OBJETIVO GENERAL.....	45
5.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	45
6.	METODOLOGÍA.....	46
6.1	OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO SILVESTRE (LIPPIA ORIGANOIDES H.B.K).....	46
6.1.1	Extracción del aceite esencial de orégano silvestre. El.....	46
6.2	AISLAMIENTO DEL FITOPATÓGENO FUSARIUM OXYSPORUM F. SP. PISI.....	47
6.3	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO SILVESTRE (LIPPIA ORIGANOIDES H.B.K).	47
6.3.1	Determinación de los Niveles de la Actividad Antifúngica sobre los Aislamientos de Fusarium oxysporum f. sp pisi en Aceite Esencial de Orégano Silvestre (Lippia origanoides H.B.K).....	48
6.4	DISEÑO EXPERIMENTAL EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.....	49
6.5	PREPARACIÓN DEL BIOPOLÍMERO EMULSIFICADO PARA EL BIOFÚNGICIDA.....	49
6.5.1	Evaluaciones Preliminares.....	49
6.5.2	Biopolímero emulsificado a base de Lecitina de Soya.....	49

6.5.3	Biopolímero emulsificado a base Goma arábica.....	49
6.5.4	Biopolímero emulsificado a base de Alginato de sodio ácido.	50
6.5.5	Formulación del Biofúngicida.	50
6.6	EVALUACIÓN DE LOS BIOPOLÍMEROS FORMULADOS.	51
6.7	PREPARACIÓN DE SENSIDISCOS CON EL BIOPOLÍMERO EMULSIFICADO DE CARBOXIMETIL-CELULOSA, ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO SILVESTRE Y ALGINATO DE SODIO ÁCIDO.	51
6.8	DISEÑO EXPERIMENTAL DEL BIOPOLÍMERO EMULSIFICADO.	51
6.9	PRUEBA DE EMERGENCIA.	52
6.11	EVALUACIÓN DEL BIOFÚNGICIDA EN INVERNADERO.	52
6.11.1	Prueba de Invernadero	52
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	53
7.1	OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO SILVESTRE (LIPPIA ORIGANOIDES H.B.K).	53
7.1.1	Aislamiento del fitopatógeno <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp pisi.....	54
7.2	LA SENSIBILIDAD DEL FITOPATÓGENO <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> F. SP PISI.	55
7.2.1	Crecimiento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp pisi	55
7.3	DESARROLLO DE UN BIOPOLÍMERO EMULSIFICADO CAPAZ DE CONTENER ACEITE ESENCIAL DE L. ORIGANOIDES COMO BIOFUNGICIDA.	60
7.4	PRUEBA DE EMERGENCIA DE LAS SEMILLAS DE ARVEJA.	67
7.5	EVALUACIÓN DEL BIOFÚNGICIDA DE L. ORIGANOIDES PARA EL MANEJO DE F. OXYSPORUM EN ARVEJA A NIVEL DE INVERNADERO.....	70
7.5.1	LA FORMULACIÓN DEL BIOFÚNGICIDA.	70
7.5.2	Prueba de Invernadero.	70
8.	CONCLUSIONES	74
9.	RECOMENDACIONES.....	75
	BIBLIOGRAFIA.....	76

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Clasificación Taxonómica de la Arveja	21
Cuadro 2. Clasificación Taxonómica del Fitopatógeno.....	22
Cuadro 3. Componentes mayoritarios de los AEs de Lippia origanoides	32
Cuadro 4. Concentraciones de aceite esencial de orégano silvestre (L. origanoides) evaluadas sobre F. oxysporum f. sp pisi.	47
Cuadro 5. Matriz experimental para las formulaciones del Biopolímero estudiado.	50
Cuadro 6. Condiciones de extracción del Aceite esencial de Lippia origanoides H.B.K mediante la técnica de arrastre por vapor.....	53
Cuadro 7. ANOVA para determinar el Crecimiento micelial F. oxysporum f. sp. pisi frente aceite esencial de Lippia origanoides H.B.K.....	56
Cuadro 8. Pruebas de Múltiple Rangos para el valor normalizado del porcentaje de crecimiento micelial y las concentración de aceite esencial ($\mu\text{L.mL}^{-1}$).	56
Cuadro 9. Porcentaje de inhibición a nivel in vitro del fitopatógeno F. oxysporum f. sp. pisi frente aceite esencial de Lippia origanoides H.B.K.	59
Cuadro 10. Determinación de los niveles de la actividad antifúngica sobre los aislamientos de Fusarium oxysporum f. sp pisi con el aceite esencial de orégano silvestre	59
Cuadro 11. Porcentaje de inhibición a nivel in vitro del fitopatógeno F. oxysporum f. sp. pisi frente al Biofúngicida.....	62
Cuadro 12. Análisis de Varianza del halo de inhibición micelial del fitopatógeno frente al Biopolímero emulsificado.	63
Cuadro 13. Análisis de Emergencia de las semillas de arveja impregnadas con el biopolímero.	68

Cuadro 14. Efecto del Tratamiento N°2 sobre *Fusarium oxysporum* f. sp pisi
en arveja (*Pisum sativum* L.) 71

LISTA DE LAS FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Diagrama general de la biosíntesis de metabolitos secundarios en especies vegetales.	29
Figura 2. Ubicación del Alto Patía.	46
Figura 3. Extracción de Aceite Esencial de Orégano Silvestre.	54
Figura 4. Características microscópicas del fitopatógeno <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>pisi</i>	55
Figura 5. Comparación del crecimiento del Fitopatógeno en caja Petri.	58
Figura 6. Preparación del biopolímero emulsificado a base de Alginato de sodio ácido, CMC y aceite esencial de orégano silvestre.	61
Figura 7. Prueba de Emergencia Estándar.	67

LISTA DE GRÁFICAS

Pág.

- Gráfica 1. El porcentaje normalizado de crecimiento micelial fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* frente al aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*)..... 57
- Gráfica 2. Diagrama de Pareto del Biopolímero emulsificado para disminuir el halo de inhibición micelial del Fitopatógeno..... 63
- Gráfica 3. Superficie de Respuesta para los Tratamientos 1 y 2 a nivel in vitro a base de CMC, Alginato de sodio y a diferentes concentraciones de Aceite esencial de Orégano silvestre con Sensidiscos..... 64
- Gráfica 4. Prueba de Emergencia de las semillas de arveja impregnadas con el Biopolímero emulsificado..... 69
- Gráfica 5. Efectos principales para la Emergencia de las semillas de arveja impregnadas por el biopolímero emulsificado..... 69

INTRODUCCIÓN

En Colombia, la arveja después del frijol, es la leguminosa de mayor importancia se cultiva en 14 departamentos, en donde la mayor producción se encuentra en el departamento de Nariño con 50.132 toneladas/año equivalentes al 50% de las 101.070 toneladas/año que se producen en el país, seguido por Cundinamarca con 20% y Boyacá con 16% (Encuesta Nacional Agropecuaria, 2010; FENALCE, 2010). Se estima que del cultivo dependen más de 26.000 productores, generando alrededor de 2,3 millones de jornales y unos 15.000 empleos directos (FENALCE, 2010).

El área cultivada de arveja en Nariño durante el año 2011 fue de 13.809 hectárea, con una producción promedio de 60.178 toneladas y un rendimiento de 4,4 tonelada en vaina verde por hectárea (Acosta y Eraso, 2012), sin embargo recientemente han reportado casos frecuentes del disturbio denominado la mayor producción de esté guisante.

Según Sañudo (2007), en el departamento de Nariño se han reportado casos de marchitez vascular, mostrando la mayor incidencia en los municipios del sur del departamento de marcada producción arvejera como son: Ipiales, Potosí, Gualmatán, Córdoba y Puerres.

En el departamento de Nariño el productor de arveja se caracteriza por ser minifundista, su nivel de estudio es bajo y se basa en el uso de los controles químicos; recibe poca capacitación tecnológica y en su mayoría son propietarios de sus parcelas. El cultivo de la arveja sea ha convertido en un factor estabilizador de la economía de los pequeños productores de las zonas andinas, y ha contribuido a su seguridad alimentaria (FENALCE, 2010).

La escasa existencia de materiales de arveja en el país, ocasiona según FENALCE (2002), que exista una relativa homogeneidad genética constituyéndose una desventaja desde el punto de vista fitosanitario, haciendo que el manejo de enfermedades producidas por patógenos sea crecientemente costoso y complejo. De acuerdo con Tamayo (2000), la principal limitante en la producción de arveja en Colombia es la enfermedad denominada marchitez vascular, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*.

La marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum* en arveja es una de las enfermedades prevalentes y dañinas en cultivos intensivos. Esta enfermedad puede ocasionar pérdidas que varían del 30 al 50 % de la producción, dependiendo de la incidencia, especialmente, en variedades susceptibles y bajo condiciones climáticas favorables para el desarrollo del patógeno. Los síntomas de la enfermedad inician con una clorosis, seguida por el bajo crecimiento de las

plantas, que luego se marchitan y finalmente mueren (Tamayo, 2002; Buitrago *et al.*, 2006; FENALCE 2007).

El desconocimiento de alternativas de manejo de la enfermedad, sumando a 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 los agrosistemas, así como en la salud pública. Por esta razón diferentes investigadores 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 los aceites esenciales: terpenos, líganos, alcaloides, azúcares, esteroides, entre otros (Dixon, 2001).

Se ha demostrado que los componentes de los aceites esenciales poseen características antibacterianas y fungicidas, además son inocuos para el medio ambiente y para los consumidores. Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, generalmente son mezclas complejas de hasta más de cien componentes que pueden ser compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos.

Trabajos recientes sobre *L. origanoides* “orégano silvestre” han determinado alta actividad biológica del aceite esencial extraído por esta razón, se han 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 que ha presentado eficiencia en cuanto a estudios relacionados con la evaluación de tratamientos frente a diferentes fitopatógenos, inhibiendo su 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 (Zanandrea, 2004).

El Orégano silvestre (*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 son características atribuidas a carvacrol (38,6%) y Timol (60,3%), un compuesto químico que se encuentra en abundancia (Zanandrea, 2004).

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

Con base en lo anteriormente expuesto, se planteó el presente trabajo de investigación, con el objetivo de formular un biofúngicida a partir de una emulsión con aceite esencial de orégano silvestre (*Lippia organoides* H.B.K) frente al fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* causante de marchitez vascular de arveja (*Pisum sativum* L).

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las mayores pérdidas generadas en los cultivos son producidas principalmente por enfermedades que atacan la raíz de la planta en relación a otro tipo de afección (Malvick y Babadoost, 2002).

La pudrición de raíces en arveja es un problema mundial que puede reducir considerablemente el rendimiento y la calidad de la cosecha. Más de 20 hongos diferentes han sido implicados como agentes causantes en las diferentes regiones del mundo (Krafty Roberts, 1969; Tu, 1987; Osorio *et al.*, 2011).

En Colombia, la pudrición de las raíces en los cultivos de arveja es muy común en la mayor parte de las zonas productoras, Nariño, Cundinamarca, Boyacá y Antioquia reportan ampliamente este problema fitosanitario, la marchitez vascular se presenta en las primeras fases de desarrollo del cultivo (pre y pos emergencia). Las pérdidas oscilan entre 30% y 50% si no se toman medidas preventivas. La enfermedad puede causar pudriciones acuosas de las semillas o muerte prematura de éstas (Tamayo, 2000; Buitrago *et al.*, 2006).

En temperaturas del suelo por encima de 20°C, la enfermedad progresa rápidamente, las plantas pueden morir, a menudo en parches dentro del cultivo. Las plantas muertas sirven de reservorio de inóculo para la propagación de la enfermedad. Uno de los resultados de la infección por *Fusarium* es la madurez desigual entre las plantas en el campo, lo que conduce a la pérdida de rendimiento y reducción de la calidad de los productos (Everts, 2002).

Algunas especies de *Fusarium oxysporum* se distribuyen ampliamente y pueden matar entre 1% y 3% de las plantas en campos infectados. Las temperaturas cálidas del suelo son propicias para la propagación del inóculo, el daño puede variar significativamente de un año a otro y las pérdidas más graves se producen en los guisantes finales (Ocaña, 2008).

Arguello (2007), indica que el hongo ataca diferentes variedades de arvejas y es capaz de sobrevivir en rastrojos de cultivos anteriores y permanecer en el suelo por varios años.

El productor no cuenta con un tipo de control apreciable para el marchitamiento vascular ocasionado por *F. oxysporum* la utilización de productos de síntesis química no son eficientes (Zavaleta (2000). Según Rosero (2008) la baja eficiencia de productos químicos para el control de esta enfermedad promueve la búsqueda de otras alternativas como el control biológico.

2. JUSTIFICACIÓN

Para satisfacer la demanda a los mercados nacionales e internacionales y potenciales compradores de arveja en fresco es necesario mantener el control de enfermedades especialmente las producidas por hongos fitopatógenos como es el caso de *Fusarium oxysporum* f. sp *pisi*, ya que este causa las mayores pérdidas económicas dentro de la cadena productiva de esta leguminosa. En la última década se ha incrementado la tendencia al uso de extractos naturales como los aceites esenciales, como fuente de sustancias con actividad antifúngica frente a problemas fitosanitarios (Hernández *et al.*, 2007), siendo promisorio el estudio de recursos vegetales como el caso del orégano silvestre (*L. origanoides*), ampliamente es reportado por sus propiedades antifúngicas y antibacteriales por el contenido de Timol que es de 60,3% presente en este aceite esencial siendo beneficioso para el control de *Fusarium oxysporum* y el efecto biocida sobre éste.

Teniendo en cuenta este contexto, esta investigación se encaminó hacia el desarrollo de un producto de origen biológico para el control del fitopatógeno *Fusarium oxysporum* que afecta el sistema radical de la arveja, es por ello que se generó una matriz bio-polimérica que contenga el aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*) manteniendo su efecto antifúngico para la protección de las semillas de arveja ante este fitopatógeno; esta evaluación buscó obtener un producto que no cause efectos negativos en salud de los agricultores, del consumidor y vayan en pro de la conservación del ambiente, en comparación a los productos agroquímicos utilizados convencionalmente.

3. MARCO TEORICO

3.1 ARVEJA (PISUM SATIVUM L.)

La arveja (*Pisum sativum* L.) es uno de los cultivos más antiguos de la humanidad, hay evidencias del consumo de arvejas silvestres unos 10.000 años antes de Cristo, que fueron descubiertas por arqueólogos que exploraban la “Cueva Espiritu” en la frontera entre Burma y Tailandia. En una excavación arqueológica en Jarmo, al noreste de Irak, se encontraron arvejas que datan unos 7.000 A. C. Los restos arqueológicos de los pueblos de la Edad de Bronce en Suiza contienen rastros de arvejas de los años 3.000 a.C (FENALCE, 2010).

La arveja es un cultivo importante anualmente que impulsa la región templada del mundo y fue originalmente cultivada en la cuenca del Mediterráneo (FENALCE, 2010).

El Período de cosecha de este cultivo contempla de 12 a 18 semanas dependiendo del cultivar, bajo una temperatura optima entre los 10°C y 20°C (Zavaleta, 2000).

3.1.1 Taxonomía de Arveja:

Cuadro 1. Clasificación Taxonómica de la Arveja

Reino	Vegetal
Clase	Angiosperma
Subclase	Dicotiledóneas
Orden	Leguminosas
Subfamilia	Papilionaceae
Género	<i>Pisum</i>
Especie	<i>Sativum</i> L.
Nombre científico	<i>Pisum sativum</i> L.
Nombre común	Arveja, alberja, guisante, chicharo

Fuente: (Prado, 2008)

3.1.2 Morfología. Según la escala de BBCH (Bundesanstalt, Bundessortenamt, Chemical) (Meier, 2001), el desarrollo fenológico de la planta de arveja se puede describir con los siguientes pasos: germinación, desarrollo de hojas, crecimiento longitudinal de entrenudos, aparición del órgano floral, floración, formación y maduración de vainas, senescencia.

La planta de arveja presenta un rápido crecimiento de hábito indeterminado con tallos huecos angulares o redondeadas. Los primeros nodos son vegetativos dando lugar a ramas secundarias, los nodos posteriores son reproductivos. Las hojas constan de uno o más pares de folíolos opuestos soportados sobre peciolo junto con varios pares de zarcillos (que son esencialmente hojas modificadas). Esta planta presenta estípulas en la base de la hoja los cuales son también ovados pero mucho más grandes que los folíolos (Checa, 1993).

3.2 FUSARIUM OXYSPORUM F. SP. PISI.

3.2.1 Taxonomía del Fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*. El marchitez vascular de la arveja es causado por el fitopatógeno del suelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* (Lobo y Girard, 1983; Restrepo, 1991; Checa, 1993; Buriticá, 1999; Estupiñan y Ossa, 2007; Watson *et al.*, 2009; Osorio y Castaño, 2011).

Cuadro 2. Clasificación Taxonómica del Fitopatógeno.

Reino:	Fungi
División:	Ascomycota
Clase:	Sordariomycetes
Orden:	Hypocreales
Familia:	Nectriaceae
Género:	<i>Fusarium</i>
Especie:	<i>oxysporum</i>
Forma especial:	<i>pisi</i> .
Nombre científico	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>pisi</i> .

Fuente. Ossa, 2007.

F. oxysporum es un fitopatógeno del suelo de difícil control, su diseminación en el campo se efectúa a través de material de propagación infectado, fragmentos de plantas enfermas y movimiento de suelo infestado con clamidosporas, las cuales pueden sobrevivir hasta por más de 20 años (Haglund y Kraft, 2001). Este fitopatógeno tiene la capacidad de penetrar en los haces vasculares del centro de la raíz produciendo oclusión y de difundirse fácilmente sin activar los mecanismos de detección y defensa del huésped (Beckman y Roberts, 1995).

El género *Fusarium* incluye muchas especies que causan enfermedades de las plantas, ocasionando síntomas como marchitamiento vascular, pudrición de la raíz, tallos y frutos. Este género presenta un amplio rango de especies de tipo saprófito que cumplen su ciclo de vida en el suelo, siendo de amplia importancia económica en cultivos comerciales, como el caso de la especie *Fusarium*

oxysporum f sp. *pisi* (Basu *et al*, 1973, 1976; Checa, 1993, Burgess *et al*, 1994; Sañudo *et al.*, 2001).

Esta especie se caracteriza por ser cosmopolita que existe en muchas formas patogénicas, parasitando más de 100 especies de plantas Gimnospermas y Angiospermas, gracias a los diversos mecanismos que tiene el hongo para vencer las defensas de muchas plantas; y del cual hasta el momento no se conoce la fase perfecta (Kraft, 1995).

Este fitopatógeno presenta variantes dentro de la especie, particularmente con respecto a la especialización de la planta hospedante (Garces *et al.*, 2001). Determinada por el taxón forma especial (f. sp) corresponde a cepas cuyas características morfológicas y de cultivo son indistinguibles, pero muestran diferentes propiedades fisiológicas en su habilidad para parasitar un hospedante específico (Booth, 1975). Este taxón se ha empleado para categorizar aislamientos que causan enfermedades en una especie, género o familia, en particular (Bosland y Williams, 1987); por lo cual, aislamientos con el mismo rango de hospedantes, se asignan a una forma especial. Se han reportado más de 70 formas especiales del patógeno (Kistler, 1997).

Brayford (1996) indica que la especie *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* (FOP) (CJJ Hall) Snyder y Hansen, el cual afecta a la arveja y guisantes relacionados, presenta cuatro razas las cuales se reconocen sobre la base de patogenicidad diferencial de los cultivares de guisantes. Sin embargo, la Raza 1 la cual causa un marchitamiento característico, afecta de forma mundial las regiones de producción de guisantes (McPhee *et al.*, 1999).

La especie *F. oxysporum* f. sp. *pisi* que se encuentra en sus formas patógenas donde muchas son las especies más dañinas del género en enfermedades de las plantas. Además en los campos de cultivo es la especie más abundante en el género *Fusarium* (Leslie y Summerell, 2006; Smith, 2007).

3.2.2 Sintomatología de la Enfermedad de Marchitez Vascular de la Arveja.

Los síntomas iniciales en arveja (*P. sativum*) suelen aparecer cerca de la zona de unión de semillas cuando la planta está en la etapa de plántula pre ó post emergentes (Malvick y Babadoost, 2002). Los síntomas consisten en lesiones delgadas, de color marrón claro que comienza en las raíces absorbentes finas y progresa gradualmente a la raíz principal. En algunos casos todas las raíces son destruidas, dejando sólo restos debajo de la inserción de la semilla (Malvick y Babadoost, 2002).

El hongo *Fusarium oxysporum* invade el sistema de raíces de cultivares susceptibles y resistentes, pero los cultivares resistentes presentan un sistema de

protección al restringir la invasión del hongo mediante la producción de tapones vasculares (CharChar y Kraft, 1989).

Nemeskéri y Györi (2005) encontraron que existen cambios en el contenido de micronutrientes en las partes verdes de guisantes afectados por el hongo *Fusarium* que se relacionan con las reacciones inmunológicas a este patógeno.

Las lesiones en la zona radical, se agrandan ocasionando una contracción de tejido originado por el colapso de las células muertas corticales, y que se extiende a la parte superior por el tejido vascular, tomando una coloración marrón oscuro o rojiza pálida (Kraft, 1995; Haglund y Kraft, 2001); a razón de 2,5 a 5 cm por encima de la línea del suelo, uno a tres nudos (Kraft, 1995).

Las plantas afectadas por la enfermedad de la marchitez vascular de la arveja presentan un retraso en el crecimiento general, presentando una coloración amarillenta de las hojas inferiores en primer lugar, y progresivamente se abren paso a las hojas superiores (Burgess, 1994; Kraft, 1995). El margen de las hojas se torna rizo hacia abajo (Haglund y Kraft, 2001); en algunos casos, el vástago se hincha y se torna frágil a la línea del suelo (Kraft, 1995;); esto hace que la planta se caiga y sea afectada por otros patógenos como *Pythium* spp. (Malvick y Babadoost, 2002).

Dentro de las plantas afectadas por el hongo, se pueden encontrar plantas con baja severidad las cuales pueden producir vainas, sin embargo estos son irregulares en tamaño y variables en la madurez, con un contenido de azúcar bajo (Burgess, 1994; Buitrago *et al.*, 2000; Everts, 2002; Malvick y Babadoost, 2002). Con temperatura del suelo superior a 20°C la enfermedad progresa rápidamente y la planta muere (Checa, 1993; Everts, 2002).

3.2.3 Epidemiología de la Enfermedad de la Marchitez Vascular de la Arveja.

La pudrición de la raíz o marchitez vascular de la arveja causada por *F. oxysporum* ocurre generalmente en lotes que progresivamente aumentan de tamaño durante la temporada húmeda (Malvick y Babadoost, 2002).

Este hongo habita el suelo de forma saprofita sobreviviendo por periodos de hasta 10 años inicialmente en la capa de suelo cultivada en forma de clamidosporas una esporas asexuales de pared gruesa (Checa, 1993; Kraft, 1995); causando que este hongo se presente en el suelo casi de forma indefinida y que hace que el manejo de rotación con otros cultivos así como otras prácticas agrícolas sean inadecuados o ineficaces (Checa, 1993).

Según Everts (2002), indica que *F. oxysporum* también puede encontrarse en asociación con las raíces de los cultivos no hospedantes y restos de plantas, puesto que este patógeno tan pronto como llega a los tejidos vegetales, se

extiende formando micelio, esporas y microconidios los cuales pueden dar lugar a nuevo inoculo (Checa, 1993; Everts, 2002).

Por lo anterior, la diseminación de este patógeno se realiza de forma simple y bajo diferentes medios naturales como antrópicos; Hagedorn (1991) indica que *F. oxysporum* al ser un hongo de suelo, hace que cualquier actividad que se extienda en él, podrá propagarlo. Everts (2002), Haglund y Kraft (2001) señalan que es común que el transporte de la enfermedad de un campo a otro se realice con ayuda del viento y de agua (riego y lluvia); así como en la utilización de semilla contaminada o infectada, la cual se obtiene de cultivos anteriores sin criterio técnico, convirtiéndose este insumo en una fuente de enfermedades para futuros cultivos (Sañudo *et al.*, 1999).

La temperatura del suelo, variedad de arveja utilizada, y el tipo de suelo pueden afectar la tasa de propagación de la enfermedad (Everts, 2002; Nemeskéri y Györi, 2005).

3.3 ALTERNATIVAS DE MANEJO DE LA ENFERMEDAD.

3.3.1 Manejo varietal. Según Checa (1993), indica que la mejor manera de obtener resultados satisfactorios de manejo de la enfermedad del marchitez vascular de la arveja, depende principalmente en el desarrollo de cultivares resistentes.

En Colombia existen variedades resistentes disponibles, sin embargo, cuando el potencial de la enfermedad es muy alta, algunas de estas variedades no ofrecen un control suficiente y todavía puede haber una reducción en el rendimiento y la calidad. Por tanto no hay cultivares comerciales con inmunidad o resistencia de alto nivel al patógeno *Fusarium* spp. (Hagedorn, 1991).

3.3.2 Control sintético. Frame, (1998), indica que no existe un control apreciable del marchitamiento por *Fusarium* spp. de la utilización de productos de síntesis química (agroquímicos), por tanto no se recomiendan las aplicaciones con fungicidas.

3.3.4 Rotación de cultivos. Las prácticas de rotación son importantes, sin embargo Checa (1993), indica que el hecho que *F. oxysporum* pueda sobrevivir saprofitamente en el suelo y posea la capacidad de generar estructuras reproductivas de protección como clamidosporas hace que la práctica de rotación de cultivos sea ineficaz.

Estudios en rotación de cultivos de arveja con maíz en Maryland durante 3 años entre la siembra de guisantes, determinó que este intervalo de rotación no es tan eficaz para *Fusarium* pero sí para *Aphanomyces* y *Ascochyta*. Malvick y Babadoost (2002) recomiendan un plan de rotación de cultivos en el cual los guisantes se cultiven en la misma área una sola vez en 5 años o más.

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 los agros 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: terpenos, líganos, alcaloides, azúcares, esteroides, entre otros (Dixon, 2001).

3.3.5 Manejo biorracional. Según Dixon, (2001) esta clase de manejo consiste en utilizar plantas aromáticas para controlar a los microorganismos presentes en el suelo, los cuales afectan a distintos cultivos en su crecimiento y calidad.

3.4 ACEITES ESENCIALES (A.E)

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 aceites esenciales se caracterizan por contar con útiles metabolitos secundarios, estos bioproductos se caracterizan por la presencia de determinados compuestos de origen natural, los cuales forman parte de las estrategias defensivas de las plantas y son agrupados en compuestos nitrogenados, fenólicos y terpenoides. Dichos compuestos le proporcionan importantes características a los extractos, como son antiapetitivos, antivirales, antimicrobianos o repelentes, que permiten su utilización para proteger los cultivos e incrementar la calidad y su producción alimentaria, ya que tienen la propiedad de ser menos tóxicos y más fácilmente degradables (Rodríguez *et al.*, 2009).

Los aceites esenciales también llamados compuestos volátiles, son líquidos de consistencia aceitosa, aromáticos, obtenidos de los materiales vegetales (flores, los brotes, semillas, hojas, corteza, hierbas, madera, frutas y raíces). Pueden ser obtenidos por varios métodos, pero el más utilizado en la producción comercial es

por destilación con vapor. Se conocen aproximadamente 3.000 aceites esenciales, de los cuales 300 son comercialmente importantes en el mercado de las fragancias (Van y Leijten, 1999). Los aceites esenciales han demostrado poseer características insecticidas, antioxidantes, antibacteriano, antifúngico y antiviral (Burt, 2004; Kordali *et al.*, 2005).

Una posible alternativa para evitar el uso de fungicidas químicos es la utilización de las plantas medicinales y aromáticas las cuales contienen metabolitos con propiedades antifúngicas, que inhiben el desarrollo de los hongos. Puesto que en Colombia presenta una condición de alta heterogeneidad en la siembra de especies de plantas aromáticas y existen cerca de 120 especies con potencial productivo y con aptitud para ser cultivadas tales como la manzanilla, la limonaria, la albahaca, la hierbabuena y cilantro entre las más importantes, Otras aromáticas y especias ampliamente reconocidas son limoncillo, toronjil, cidrón, cardamomo, tomillo, caléndula, menta, mejorana, perejil, romero y orégano. La producción de aromáticas y especias en nuestro país se encuentra ubicada en las zonas frías y ligeramente templadas, sobresaliendo los departamentos de Antioquia (La Ceja, Yolombó, San Jerónimo, Marinilla y Rionegro), Cundinamarca (Chipaqué, cota, Fómeque, Anolaima, Funza, Chía, Mosquera), Cauca (Piendamó, Boquerón y Popayán) y Nariño (Pasto e Ipiales) (CCI, 2000).

3.4.1 Actividad Antimicrobiana y Antibacterial de Aceites Esenciales. Algunos antimicrobianos naturales se obtienen principalmente de hierbas, plantas, y especias. Lo más difícil es extraer, purificar, estabilizar e incorporar dicho antimicrobiano al alimento sin afectar su calidad sensorial y seguridad (Beuchat y Golden, 1989).

La mayor parte de los antimicrobianos para frutas y vegetales son bacteriostáticos (sistemas de conservación que impiden el desarrollo de gérmenes) o fungistáticos, en lugar de bactericidas (sistemas de conservación que destruyen los gérmenes) o fungicidas, por lo que su efectividad sobre los alimentos es limitada. Por otra parte, debido a que algunos microorganismos pueden no verse inhibidos o destruidos por las dosis convencionales de antimicrobianos utilizados individualmente, puede ser preferible utilizar una combinación de ellos, ampliando así el espectro de cobertura en la preservación de frutas y vegetales en general (Blanchard, 2000).

Recientemente, en la industria dedicada a la producción de frutas y vegetales, existe un considerable interés en los extractos y aceites esenciales derivados de las plantas debido a su propiedad de controlar el crecimiento de microorganismos patógenos tales como: *Fusarium spp.*, *Alternaria spp.*, *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp* y *Rhizopus spp.*, que han sido reportados como agentes causantes de enfermedades producidas por los alimentos y/o descomposición de los mismos (Soliman y Badeea, 2002; Tepe *et al.*, 2005; Viuda, 2007).

Para la evaluación 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).

El mecanismo de ataque de los antimicrobianos dentro de una célula se lleva a cabo en partes y/o funciones importantes para la sobrevivencia de la célula. Puede llevarse a cabo en la pared celular, membrana celular, en la síntesis de proteína, en su genética y en la síntesis de su genética. Esto puede causar daños irreparables a una célula. De varios de los antimicrobianos no se conoce aún su modo de acción, pero al actuar de forma diferente las combinaciones de estos pueden llevar a mejores resultados (Davidson y Branen, 1993).

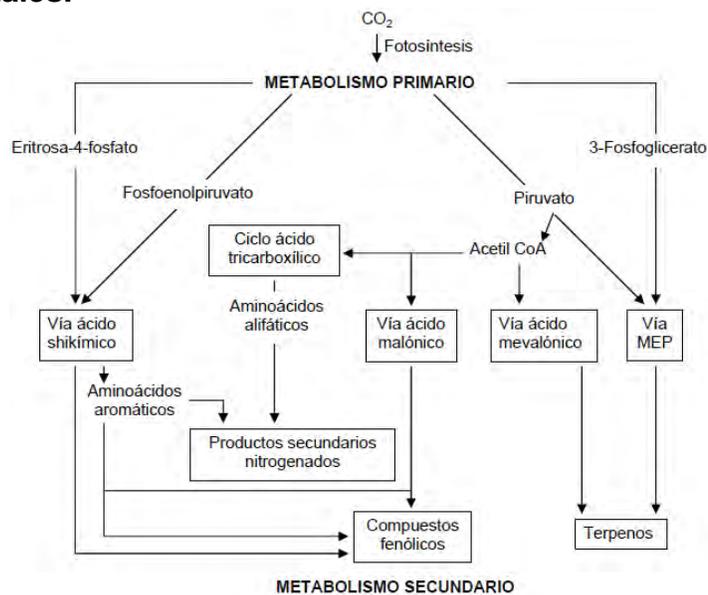
Existen pocos estudios enfocados a comprender el mecanismo involucrado en la inhibición microbiana por especias y sus aceites esenciales. Sin embargo, se supone que dada la estructura fenólica de muchos de los compuestos con actividad antimicrobiana presentes en las especias y sus aceites esenciales, el modo de acción debe ser similar al de otros compuestos fenólicos (Davidson, 1997).

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 (Kalemba y Kunicka, 2003).

3.4.2 Metabolismo Secundario Vegetal. Las plantas producen una amplia y variada gama de compuestos orgánicos que parecen no tener relación directa con su crecimiento y desarrollo, los cuales se conocen como metabolitos secundarios. Estos metabolitos tienen importantes funciones ecológicas en las plantas (Taiz *et al.*, 2002), a saber: Protegen las plantas contra animales herbívoros y microbios patógenos; Atraen insectos polinizadores o dispersores de semillas; protegen la planta durante los procesos de cicatrización y actividad Microbiana; intervienen en la regulación de los procesos de evaporación de agua; sirven de mecanismo de defensa y de comunicación con otros vegetales (alelopatía).

Los compuestos nitrogenados formados del metabolismo secundario de las plantas son principalmente alcaloides y *glucósidos cianogénicos*, los cuales son usualmente sintetizados a partir de algunos aminoácidos a saber: lisina, tirosina y triptófano. Según sean aminoácidos aromáticos o alifáticos, la biosíntesis sigue o la ruta del ácido shikímico o del ácido tricarbóxico, respectivamente (Taiz *et al.*, 2002).

Figura 1. Diagrama general de la biosíntesis de metabolitos secundarios en especies vegetales.



Fuente. Azcón y Talón, 2000.

Este tipo de metabolitos pueden ser aislados por diversos métodos, dentro de los cuales se encuentran: destilación-extracción simultánea con solvente (SDE) (Stashenko, 1999; Azcón y Talón, 2000), extracción con fluido supercrítico (SFE) (Braga, 2005), destilación con vapor (SD) (Stashenko, 1999), hidrodestilación (HD) (Dos Santos, 2004), hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHd) (Duran, 2005).

Para el control de diferentes plagas y enfermedades se ha venido realizando múltiples estudios sobre aceites esenciales (AE), extraídos de diferentes plantas, dada su acción anti fúngica, ya que están conformados por mezclas de un número variable de sustancias orgánicas olorosas y volátiles, que químicamente están constituidas por terpenos de bajo peso molecular, (Bittner *et al.*, 2009).

Los aceites esenciales son mezclas de sustancias obtenidas de plantas, que presentan como características principales su compleja composición química y su carácter fuertemente aromático, aunque evidentemente no todas las plantas contienen estas sustancias y las que lo presentan tienen una concentración tan

baja que hace imposible su obtención práctica (Ortuño, 2006). Los aceites esenciales (esencias o aceites volátiles) son: “productos de composición generalmente muy compleja que contienen los principios volátiles que se encuentran en los vegetales más o menos modificados durante su preparación. Se les llama aceites por su apariencia física y consistencia que es bastante parecida a los aceites grasos, pero se distinguen de ellos, porque al dejar caer unas gotas de esencia sobre el papel, éstas se volatilizan fácilmente sin dejar ninguna huella ni mancha grasosa (Gonzales, 2004).

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

Los monoterpenos presentes en aceites esenciales son compuestos que resultan menos perjudiciales que los fungicidas químicos desde el punto de vista ambiental (Sacchetti *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).

3.4.3 Actividad Antimicrobiana de la Familia Verbenacea. La familia *Verbenacea* comprende alrededor 75 géneros y 3000 especies, encontrándose distribuidas principalmente en regiones tropicales y subtropicales y en algunas zonas templadas. La familia verbenácea posee actividad antifúngica y actividad antibacteriana, de estas especies generalmente se encuentran en forma de arbustos, lianas y hierbas, algunas con espinas, presentan hojas opuestas, sin estípulas; poseen flores normalmente irregulares, bisexuales racemosas o cimosas, axilares o terminales; el cáliz tiene unos 4-5 lóbulos, con el limbo algo bilabiado; el fruto es una drupa, o con menor frecuencia una cápsula o esquizocarpo (García, 1992).

Son especies vegetales de interés económico por sus usos diversos, siendo fuentes de aceites o frutos comestibles, especies ornamentales (del género *Lantana*), se emplean en jardinería, algunas de ellas son utilizadas para aplicaciones etnomédicas (García, 1992; Humbolt, 2003).

Los aceites esenciales de varias especies de *Lippia* han presentado actividades antiplasmodia, insecticida, antibacterial, antifúngica y efectos de relajación muscular (Gupta, 1995; Wächter, 2001; Vale *et al.*, 2002).

Todas estas propiedades funcionales son determinadas por la composición química de las especies empleadas. Los efectos biológicos comunes de diferentes 25 especies de la familia *Verbenaceae* se deben a la presencia de metabolitos comunes que exhiben cierta bioactividad. Los compuestos comúnmente encontrados en los AEs de *Lippia* son: Limoneno, *p*-cimeno, alcanfor, linalool, α -pineno, timol y *trans*- β -cariofileno, entre algunos otros (Craveiro *et al.*, 1981; Pascual *et al.*, 2001).

3.4.4 Aceite Esencial de Orégano Silvestre (*Lippia organoides* H.B.K). Es una hierba perenne de 1 a 2 m de altura que presenta hojas ovadas con el ápice redondeado, flores blancas, pequeñas y muy aromáticas, el rendimiento de extracción del AE según Dos Santos, es de 4.6 %(p/p). Algunos de los sinónimos de esta especie botánica, son: *Lippia berterii* Spreng y *Lantana organoides* H.B.K (Santo *et al.*, 2004).

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* (Aligiannis, 2001). 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. 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 (Sivropoulou, 1996). Otros compuestos, como el *g*-terpineno y *r*-cimeno no mostraron actividad contra las bacterias estudiadas. Los valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para los aceites esenciales se han establecido entre 0.28-1.27 mg/mL para bacterias, y de 0.65-1.27 mg/mL para hongos (Aligiannis, 2001).

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 organoides* 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 son

características atribuidas a carvacrol, un compuesto químico que se encuentra en abundancia (Zanandrea, 2004).

3.4.4.1 Composición del Aceite Esencial de Orégano Silvestre (*Lippia origanoides* H.B.K). Los componentes más abundantes reportados para este aceite esencial son: α -terpineno, timol, acetato de timilo, carvacrol, metilcarvacrol, γ -terpineno, 1,8-cineole, *p*-cimeno, *trans*- β - cariofileno y umbellunona.

Oliveira *et al.* (2005), realizaron un estudio del aceite esencial de *Lippia origanoides* H.B.K. (Verbenacea). Se analizó la composición química del aceite esencial de las hojas por GC Y GC/MS, el cual mostro un alto contenido de monoterpeno oxigenados (60,0%), carvacrol (38,6%) y timol (18,5%) como principales constituyentes. La actividad antimicrobiana de este aceite esencial se determinó por el método de difusión en placa, mostrando zonas de inhibición muy importantes para todos los microorganismos probados.

Según Arango *et al.* (2012) en el departamento de Nariño el orégano silvestre (Alto Patía) representa un contenido de Timol de 91,9% a presión de 3.7 psig y tiempo de 3.7 horas. Lo cual es beneficioso para la inhibición de microorganismos.

Cuadro 3. Componentes mayoritarios de los AEs de *Lippia origanoides*

REFERENCIA	PAÍSES	AÑO	COMPONENTES MAYORITARIOS
Gallino	Brasil (Sao Paulo), Argentina.	1987	γ -Terpineno, <i>p</i> -cimeno, timol.
Velasco-Negueruela	Brasil (Cabeceiras), Brasil (Oriximiná).	1993	Acetato de timilo, γ -Terpineno, <i>p</i> -cimeno.
Dos Santos	Brasil (Cabeceiras).	2004	Carvacrol, γ -Terpineno, <i>p</i> -cimeno,
Oliveira	Brasil (Oriximiná).	2006	Carvacrol, <i>p</i> -cimeno, timol.

Fuente. Este estudio

3.4.4.2 Extracción del Aceite Esencial de Orégano Silvestre (*Lippia origanoides* H.B.K). 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 y por el tipo de técnica empleada para la extracción del aceite esencial.

3.4.4.3 Actividad Antifúngica y Antimicrobiana del Aceite Esencial de Orégano Silvestre (*Lippia organoides* H.B.K). El orégano es una hierba aromática que contiene principalmente timol y carvacrol en su aceite esencial; estos fenoles son responsables de las propiedades antibacterianas de orégano (Sallé 1991; Tainter y Grenis, 1993; Kintzios, 2002; Ultee *et al.*, 2002; Burt 2004). De tal manera que su aceite esencial fue uno de los primeros naturales antisépticos utilizados, lo que demuestra un efecto bactericida bien contra bacterias gram-positivas y bacterias gram-negativas (Exarchou *et al.*, 2002; Burt, 2004), así como que muestran tanto antifúngico y antioxidante (Sivropoulou *et al.*,

1996; Kintzios, 2002; Schanebergand y Khan, 2002; Botsoglou *et al.*, 2003; Baydar *et al.*, 2004; Skerget *et al.*, 2005).

En el aceite de orégano que crece en forma silvestre se ha encontrado la presencia dominante de carvacrol y timol (Russo *et al.*, 1998, Stachenko *et al.*, 1999). Se utiliza en la preparación de alimentos. 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, 1949; Domínguez, 1985; Lock de Ugaz, 1994 y Montes, 1996). 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. 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).

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 *Leishmaniachagasi* y parásitos *Trypanosomacruzi*.

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. La formulación de productos vegetales utilizado ha 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 *Uromycesap pendiculatuns*, la cenicilla *Erysiphecichora cearumy* el mildiu de la calabacita *Pseudoperonos poracubensis*. En cuanto a la técnica *in vitro* diferentes extractos de orégano (*Lippia origanoides H.B.K*) sobre el crecimiento, de *Xanthomona campestris*, *Cladosporium cladosporoide* y *Aspergillus niger*, Se utilizaron hojas secas de *Lippia graveolens*. El extracto total se obtuvo por el método de presurizado, el aceite esencial y las aguas madres por hidrodestilación. Este autor indica que existe inhibición del hongo *Aspergillus nigery Cladosporium cladosporoide* por efecto del aceite esencial.

3.5 RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES Y BIOPOLÍMEROS.

Recubrimientos Comestibles (RC) se utilizan indistintamente para referirse a la aplicación de matrices transparentes y comestibles sobre las superficies de los alimentos, con el fin de servir de empaque y de preservar su calidad. Sin embargo se distinguen por el modo en que son obtenidos y aplicados sobre el producto.

Un recubrimiento o cobertura comestible (RC) (coating) se define como una capa delgada de material comestible formado como un revestimiento sobre el alimento, mientras una película (film) comestible es una capa preformada y delgada elaborada con material comestible que una vez preparada puede disponerse sobre el alimento o entre los componentes del mismo (Krochta y De Mulder-Johnston, 1997). De forma general puede decirse que los recubrimientos se aplican en forma líquida sobre el alimento, normalmente por inmersión del producto en la solución con capacidad filmogénica, mientras que las películas elaboradas como láminas sólidas se aplican posteriormente sobre el alimento como envoltura (McHugh y Senesi, 2000).

Las investigaciones realizadas han mostrado que estos recubrimientos no pueden reemplazar las formas de los materiales de empaquetamiento tradicionales pues sus propiedades no son equivalentes a las de aquellos. Sin embargo, pueden constituirse en uno de los factores de estrés a aplicar en la preservación de alimentos. Sus atributos funcionales hacen que esto sea posible, ayudando a afrontar los desafíos inherentes a la producción, distribución y almacenamiento de alimentos nutritivos, seguros, de alta calidad, estables y económicos (Campos y col., 2011; Flores, 2007). Asimismo, pueden desarrollar una función complementaria de barrera por su baja permeabilidad al oxígeno, permitiendo usar envases tradicionales de menor espesor, contribuyendo así a disminuir los problemas ambientales generados por estos últimos.

3.5.1. Principales Componentes de los Recubrimientos Comestibles. La elaboración de los RC requiere de al menos un componente capaz de formar una matriz estructural, esta capacidad se atribuye a proteínas, polisacáridos y lípidos, cada uno de estos componentes con propiedades específicas y aplicables a los diferentes productos alimenticios teniendo en cuenta su principal mecanismo de degradación; los componentes pueden formar RC actuando de forma individual o en mezclas, aprovechando la sinergia de los componentes para proteger los productos que revisten. Muchas veces resulta imprescindible la adición de aditivos como los plastificantes a la formulación de estos recubrimientos, puesto que sin ellos la película resultante sería excesivamente frágil y muy poco flexible, además de los plastificantes se pueden incluir otros aditivos, como emulsificantes y tensoactivos, que dependiendo de la naturaleza de los biopolímeros, contribuirán a mejorar las propiedades mecánicas e indirectamente la funcionalidad del mismo.

3.5.2. Tipos de Recubrimientos comestibles. La capacidad de los biopolímeros para interactuar entre sí y con el resto de los componentes durante la formación del recubrimiento viene dado por su naturaleza, peso molecular, cargas, etc., es decir, la estructura del biopolímero condicionará la función del recubrimiento. En líneas muy generales, la formación de una red macromolecular de un biopolímero tipo hidrocoloide requiere de algunas etapas: en primer lugar la solubilización (parcial o total) que permita una ruptura de enlaces intermoleculares de baja energía que estabilicen a los polímeros en su estado nativo; de esta manera se facilita un reordenamiento y orientación de las cadenas poliméricas y una interacción con el resto de componentes que forman el recubrimiento (esta estructura se estabiliza durante el secado) (Cuq, Gontard, Cuq y Guilbert, 1998; Mauri y Añón, 2008).

Los biopolímeros proteicos forman redes macromoleculares tridimensionales que se estabilizan mediante diversos tipos de enlaces (interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, enlaces covalentes y puentes disulfuro), los cuales dependen de su composición a base de aminoácidos. Los enlaces se pueden favorecer durante el procesado, tanto por las soluciones en las que se encuentra como por el tratamiento térmico y modo de secado. Así, por ejemplo, una película a base de proteína de huevo, que contiene gran cantidad de cisteína, puede favorecer la formación de enlaces covalentes tipo puentes disulfuro en condiciones térmicas adecuadas, lo cual favorece la insolubilización del recubrimiento (Giménez, Gómez-Guillén, López-Caballero, Gómez-Estaca y Montero, 2012).

Los polisacáridos son polímeros hidrosolubles de cadena larga, que se emplean en la industria alimentaria para compactar, espesar y gelificar o bien para proporcionar dureza y textura crujiente a los alimentos (Catherine y Susan, 2002). Entre los polisacáridos utilizados en la preparación de películas y recubrimientos se encuentran la celulosa y sus derivados, almidón, pectinas, alginatos, carragenatos, quitosano, entre otros.

Los recubrimientos constituidos a base de Lípidos, como ceras y grasas fueron los primeros materiales utilizados para cubrir los alimentos. Las ceras se emplean desde hace siglos en China para la conservación de frutas, con datos que se remontan al siglo XII (Gontard, Thibault, Cuq y Guilbert, 1996; Krochta y Baldwin, 1994), mientras que la utilización de las grasas data del siglo XVI para prevenir la contracción de la carne (Baker, Baldwin y Nisperos-Carriedo, 1994; Kester y Fennema, 1986). Hoy en día, los lípidos solos o en combinación con otros compuestos, se aplican como envases comestibles en carnes, pescados, frutas, vegetales, semillas, caramelos, quesos, alimentos frescos, curados, congelados o procesados (Rhim y Shellhammer, 2005).

3.5.2.1. Recubrimientos constituidos a base de mezclas de Biopolímeros.

Los biopolímeros de diferente naturaleza o estructura se pueden combinar entre sí de tal manera que se compensen las ventajas y desventajas de cada uno de ellos. Así se han descrito películas y recubrimientos basados en mezclas de proteínas y polisacáridos, proteínas y lípidos o polisacáridos y lípidos. Estas combinaciones se consiguen: a) incorporando el componente inmisible (lípido) dentro de la solución filmogénica (hidrocoloide) mediante la formación de una emulsión, suspensión o dispersión, b) incorporando los diferentes componentes en sucesivas capas (películas y recubrimientos multicapa), o por último c) mezclando los compuestos con un disolvente en el que los diversos biopolímeros sean miscibles (Bourtoom, 2008; Kamper y Fennema, 1985; Krochta y De Mulder-Johnston, 1997).

Los recubrimientos comestibles a base de polisacáridos o proteínas suelen ser quebradizas y poco flexibles por lo que requieren de la adicción de plastificantes (Gennadios y Cols, 1994). Los plastificantes son compuestos de pequeño peso molecular que se añaden a las coberturas para mejorar su flexibilidad y propiedades mecánicas (Dangaran y Cols, 2009). Otro aspecto son los emulsificantes que son moléculas de superficie activa que se adsorben a la superficie de las gotas formadas durante la homogeneización formando una capa protectora que impide la agregación de las gotas. Los emulsificantes más comunes utilizados en la industria son proteínas anfifílicas (tienen regiones polares y no polares en la misma molécula), fosfolípidos y pequeñas moléculas surfactantes (McClements y Col, 2007); también sobresalen los espesantes que se caracterizan por modificar la textura (en forma de gel) la fase continua, lo cual mejora la estabilidad de la emulsión por retardar o prevenir el movimiento de las gotas. Los agentes espesantes más utilizados en la industria alimentaria son los polisacáridos. La selección del estabilizador más apropiado es uno de los factores más determinantes en las propiedades fisicoquímicas y vida útil de las emulsiones basadas en sistemas de distribución (McClements y Decker, 2000; McClements *et al.*, 2007). Y los surfactantes son moléculas anfifílica que tiene un grupo hidrofílico (cabeza), el cual tiene una alta afinidad por el agua y un grupo lipofílico o hidrofóbico (cola), el cual tiene una alta afinidad por el aceite. Los surfactantes pueden por tanto ser representados por la fórmula RX, donde X representa la cabeza hidrofílica y R la cola lipofílica. Las características de un surfactante particular dependen de la naturaleza de sus grupos hidrofílico (cabeza) y lipofílico (cola) (McClements, 1999).

3.5.3 Recubrimientos y biopolímeros a utilizar.

Lecitina de Soya: La lecitina es un fosfolípido, más en particular, un diglicérido de ácidos grasos saturados e insaturados, por ejemplo estearina, palmitina, ácido linoléico y/o ácido oleico, copulados con éster colina de ácido fosfórico, o una mezcla de dichos diglicéridos. La lecitina es capaz de formar una emulsión aceite-en-agua eminentemente estable, en la que, como fuente de nitrógeno, están presentes principalmente proteínas prácticamente intactas. Dicha emulsión también permanece estable tras una etapa de calentamiento (Campina *et al.*, 2000).

3.5.4 Goma Arábiga. La goma arábiga (*Acacia senegal*) es un biopolímero hidrofílico de elevado peso molecular clasificado como hidrocoloide. Se utiliza como ingrediente funcional en la industria alimentaria para el control de microestructura, textura, sabor y vida útil.

Este hidrocoloide es un hetero-polielectrolito complejo y ramificado con una columna vertebral de unidades de 1,3 β -galactopiranosas unidas a cadenas laterales de unidades de 1,6 galactopiranosas y finaliza en un ácido glucurónico o residuos de ácido 4-O-metil glucurónico. También contiene aproximadamente 2% de proteína unida covalentemente al carbohidrato a través de residuos de hidroxiprolina y serina, resultando en una mezcla de complejos de arabinogalactana-proteína, cada una conteniendo varias unidades de polisacáridos unidos a un núcleo común de proteína. Esta fracción de proteína asociada con una fracción de masa molecular elevada representa al menos el 30% de la goma total. Esta fracción proteica parece ser la responsable de las propiedades emulsificantes y estabilizantes del hidrocoloide. La cadena proteica hidrofóbica del híbrido proteína-polisacárido se fija en la interfase y los bloques de carbohidrato hidrofílico proveen una barrera fuertemente estérica hacia la coalescencia y floculación (Dickinson, 2003).

3.5.5 Alginato de sodio ácido. Los Alginatos son polisacáridos más abundantes presentes en las algas marinas. Comprenden hasta un 40 % de su peso seco. Son los componentes estructurales de la pared celular de las algas, cuya función principal es dar rigidez, emulsificantes, elasticidad, flexibilidad y capacidad para enlazar agua (Hernández *et al.*, 2005). El alginato es uno de los biopolímeros más versátiles y es ampliamente utilizado en la industria de alimentos y farmacéuticos. Sus principales propiedades son: estabilizante, espesante, gelificante y formador de recubrimientos (Junter y Vinet, 2009).

3.5.6 Soportar aditivos alimentarios. Pueden ser usados para incorporar agentes antimicrobianos, antioxidantes y otros, en localizaciones específicas de los alimentos. Así, se puede conseguir exaltar una propiedad funcional en forma localizada sin elevar excesivamente la concentración general del aditivo en el alimento.

Las películas y recubrimientos permiten añadir también otros compuestos con propiedades activas, antimicrobianos y antioxidantes principalmente, que protejan de la oxidación o inhiban el crecimiento microbiano tanto de patógenos como de responsables del deterioro. Recientemente se ha visto que las películas son adecuadas como portadoras de sustancias o bacterias con propiedades bioactivas (probióticos), con el fin de mejorar no sólo la conservación sino también para aportar determinadas propiedades beneficiosas a los alimentos. El desarrollo y diseño de envases con propiedades activas o bioactivas ha permitido sobretodo mejorar la vida útil de alimentos tan perecederos como son los productos pesqueros.

4. ESTADO DEL ARTE

Estudios de actividad biológica de esta especie demostraron, que el aceite esencial de la planta posee actividad antibacterial contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* MRSA y *Escherichia coli*, y antifúngica contra *Candida albicans* y *Candida tropicalis* (Dos Santos et al., 2004). Recientemente, Oliveira (2006) separó diferentes fracciones volátiles del AE de *Lippia origanoides* y determinó su efecto inhibitor del desarrollo de diferentes microorganismos; los resultados obtenidos demuestran que la eficiencia biológica es mayor para las fracciones con compuestos fenólicos, y va disminuyendo para las fracciones con alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas e hidrocarburos.

El alginato, un polisacárido derivado de algas marrones de origen marino (Phaeophyceae), se encuentra formando parte de la pared celular de las algas, de forma análoga a la celulosa y pectina en la pared celular de las plantas terrestres (Mancini y McHugh, 2000).

El alginato de sodio tiene la capacidad de retener agua o adsorbentes por lo que en la industria lo denominan súper adsorbente, es decir pueden formar retículos poliméricos tridimensionales que posee grupos hidrofílicos capaces de absorber grandes volúmenes de agua o fluidos biológicos y los retiene a baja presión según Hernandez et al. (2005)

En mayo 2005 se realizó una investigación en argentina sobre la Utilización de aceite esencial de lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf) como repelente de *Diuraphis noxia* kurdj. (Hemiptera: Aphididae) En trigo por Mónica Ricci, el objetivo del trabajo fue evaluar la actividad repelente del aceite esencial de lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf) sobre el pulgón ruso (*Diuraphis noxia* Kurdj.) en trigo (*Triticum aestivum* L.). El aceite esencial se formuló en solución acuosa empleando como emulsionantes propilenglicol al 5% y lecitina de soja al 0,5%. Las concentraciones evaluadas fueron 0,5; 1; 2; 3 y 4% y testigos en blanco, con cinco repeticiones por tratamiento. Se utilizaron dos técnicas de aplicación: impregnación de papeles y pulverización directa, cuando las plantas de trigo se encontraban al estado de dos hojas completamente desarrolladas.

En México del 2005, Miguel Ángel Aguilar Méndez realizó una tesis sobre propiedades físicas y mecánicas de películas biodegradables y su empleo en el recubrimiento de frutos de aguacate, en la investigación se estudiaron las propiedades mecánicas (resistencia a la ruptura y deformación), de barrera a gases (coeficiente de difusión al vapor de agua y permeabilidad al dióxido de carbono) y térmicas (temperatura de difusión y difusividad térmica). De películas elaboradas a partir de mezclas de gelatina- almidón. Las propiedades de las películas dependieron de las concentraciones de almidón y glicerol, así como el pH. A través de la metodología de superficie de respuesta se interpretaron los

resultados de las variables dependientes. La resistencia a la ruptura aumento significativamente a medida que la concentración disminuyo. La película más resistente (32.6N) fue obtenida a pH 6. la concentración de almidón y el pH fueron las variables que influyeron principalmente en la permeabilidad al dióxido de carbono. Para valuar su efecto como recubrimientos en la vida postcosecha de frutos de aguacate (variedad "Hass"). Los frutos recubiertos presentaron menor pérdida de peso, mayor firmeza y menores cambios en el color, con relación a los frutos de testigo. Además el patrón respiratorio climatérico, de los frutos recubiertos, fue retrasado por tres días. Por lo tanto, se puede concluir que los recubrimientos elaborados a partir de gelatina- almidón pueden ayudar a retrasar los procesos de maduración y prolongar la vida de anaquel de los frutos de aguacate.

Se han aplicado recubrimientos comestibles a base de hidrocoloides, formulados a partir de porciones de metil celulosa y quitosano en fresones almacenados en refrigeración observándose una ralentización del metabolismo de las muestras recubiertas, inducida por la modificación de la atmosfera interna de las misma (Vargas, et al., 2006).

Por otro lado Ribeiro et al., (2007), estudiaron la capacidad de recubrimientos a base de polisacáridos (almidón, carragenina y quitosano) para extender la vida de anaquel de frutos de fresa (*Fragaria ananasa* cv. Camarosa) y su posible aplicación industrial. La mínima perdida de firmeza fue obtenida en frutos recubiertos con carragenina adicionada con cloruro de calcio.

En Mayo de 2007 se desarrolló una investigación sobre composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol por Elena E. Stashenko, en donde se determinó la composición química de extractos de seis especies vegetales (tomillo, oréganos común, cimarrón, de castilla, rastrero y mejorana) Se evaluó la capacidad de atrapamiento del catión-radical ABTS+. [Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzo-tiazolina-6-sulfónico)] por los aceites esenciales. Según los resultados obtenidos de las especies se encontró que Orégano común presentó el más alto contenido de carvacrol (~54%); mientras que, el Tomillo presentó el mayor contenido de timol (34%). En cuanto a la capacidad antioxidante se destacan tres de ellos (Orégano común, Tomillo y Orégano de castilla) exhibieron capacidad antiradicalaria cercana al antioxidante BHT y uno (Orégano cimarrón) presentó mayor actividad que el BHT. Los aceites esenciales son potentes antioxidantes naturales, los cuales pueden ser usados en alimentos como posibles sustitutos de los antioxidantes sintéticos, pudiendo atrapar radicales libres y prevenir la oxidación.

En Mayo de 2007 se realizó el estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de *lippia alba*, *lippia organoides* y *phyla dulcis*, especies de la familia verbenaceae por Elena E. Stashenko, en donde se determinó por GC -MS la composición química de los aceites esenciales

de dos quimiotipos de *Lippia alba*, citral y carvona; *Lippia organoides* y *Phyla dulcis*. Se evaluó la actividad antioxidante de cada uno de los aceites, como una medida de la capacidad antirradicalaria. Los resultados obtenidos permitieron establecer que el aceite de *L. organoides*, fue la mezcla más promisorio dado que los resultados de actividad inhibitoria en promastigotes de *Leishmania chagasi* demostraron la efectividad de los aceites de *Lippia organoides* y *Lippia alba*, quimiotipo citral, mientras el aceite de *L. alba*, quimiotipo carvona, fue parcialmente activo, y la esencia de *Phyla dulcis* careció completamente de actividad.

En junio de 2008 se realizó un estudio sobre la actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium* sp. aislado de papaya (carica papaya) por Laura Leticia Barrera Necha, El efecto antifúngico de aceites esenciales y sus compuestos fue investigado en bioensayos de inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium* sp. Durante ocho días de incubación se midió el diámetro de la colonia y se determinó la tasa de crecimiento micelial. En general, el mejor efecto antifúngico fue observado con el aceite de *Thymus vulgaris*, el cual presentó una total inhibición a 200, 250 y 300 µg/ml. Los aceites de *Cinnamomum zeylanicum*, *Syzygium aromaticum* y *Teloxys ambrosioides*, exhibieron una inhibición del crecimiento micelial dependiente de la dosis al incrementarla de 100 a 300 µg/ml. Mientras que los aceites de *Allium sativum*, *Citrus aurantifolia*, *Ruta chalepensis*, *Mentha piperita* y *Eucalyptus globulus* no tuvieron actividad antifúngica en las diferentes concentraciones probadas. Todos los compuestos con excepción del cineol tuvieron un efecto fungicida o fungistático.

En el año 2009 se realizó un trabajo de grado por Gloria Vicuña Giraldo sobre el efecto antígenotóxico de los aceites esenciales de *Lippia Organoides* HBK, Del Timol y del Carvacrol contra el daño en el ADN inducido por bleomicina en el SOS chromotest en donde se determinó que los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales de los dos especímenes *lippia organoides* estudiados fueron Timol (58%) y timol(34%)/ carvacrol (26%) respectivamente, para comprobar o probar la antigenotoxicidad de este aceite se realizó por co-incubación del aceite esencial, el mutageno y las células. Se observó que los compuestos mayoritarios de los aceites protegen a las células contra la genotoxicidad inducida por el bleomicina por los compuestos timol y carvacrol.

En el 2009 se realizó la Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de la planta *Lippia organoides* H.B.K. Cultivada en el departamento del Quindío por Julieth Henao, en el cual Se realizó el estudio fitoquímico preliminar de las hojas de *Lippia organoides* H.B.K., llevado a cabo por varios métodos de extracción (percolación, soxhlet y lixiviación), utilizando solventes de diferentes polaridades como éter de petróleo, hexano, diclorometano y etanol. Se analizó el contenido de metabolitos secundarios, encontrando en los extractos polares flavonoides, taninos, glicósidos cardiotónicos, hidroquinonas y alcaloides, y en los

extractos apolares, carotenoides, glicósidos cardiotónicos y esteroides. La actividad antimicrobiana de los extractos polares y apolares se evaluó por el método de difusión en disco (Kirby–Bauer) modificado, utilizando bacterias Gram–negativas y Gram-positivas, hongos y levaduras, observando que los extractos apolares mostraron actividad de inhibición del crecimiento de los microorganismos evaluados, mientras que los extractos polares no mostraron actividad frente a los mismos microorganismos.

En junio de 2010 se realizó un estudio en actividad antifúngica de fracciones extracto etanólico y hojas *Lippia Origanoides* HBK Frente Patógeno *Fusarium oxysporum*, por Taciana Oliveira de Sousa. Las plantas medicinales tienen en su composición, sustancias que pueden desempeñar un papel importante en las interacciones planta-patógeno, los mecanismos de defensa de la planta está activando o actúan como sustancias fungitóxicas, como los fungicidas sintéticos, convirtiéndose en una alternativa prometedora para controlar de las plantas (Faria *et al.*, 2010) enfermedades. Los origanoides *Lippia* HBK (Verbenaceae) es un arbusto aromático o árbol pequeño (hasta 3 m de altura) nativa de América Central y el norte de Sudamérica de aceite esencial de las hojas tiene numerosas actividades biológicas y, recientemente, se determinó la actividad leishmanicida (Medeiros *et al.*; 2011). Es una abeja y conocido localmente como Planta de Rosemary-el-campo. Este estudio tuvo como objetivo evaluar el extracto de EtOH y fracciones de las hojas de *L. origanoides* HBK como la actividad antifúngica contra el patógeno de la planta *Fusarium oxysporum*.

En México del 2010, María Isabel Cuatzo Lozano realizó una tesis sobre el efecto de las condiciones de proceso en la conservación de alimentos encapsulados por el método de gelificación iónica. El objetivo del trabajo es establecer y evaluar las condiciones de proceso para obtener un alimento encapsulado en una matriz de alginato a través del método de gelificación iónica de alginato, inicialmente se caracterizó la permeabilidad del alginato a formar encapsulados que contenían una solución isotónica, posteriormente se evaluó el efecto de la temperatura y el pH en la permeabilidad del encapsulado de alginato. Se realizaron determinaciones de absorción de calcio y observaciones microscópicas de los encapsulados para determinar el efecto de las condiciones de proceso sobre los encapsulados. De acuerdo a los resultados de difusión de sólidos solubles se pudo obtener el polinomio del estudio de permeabilidad del alginato sometido a diferentes condiciones de elaboración, tales como pH y temperatura. Se elaboraron encapsulados con tres tipos de alimentos: cuitlacoche, durazno, y jugo uva-arándano y las variables de proceso que se estudiaron fueron: concentración de alginato (0.8, 1.0, 1.2%) y temperatura de proceso (25°C, 50°C y 75°C). Narváez *et al.*, (2010), evaluaron la efectividad de tres RC a partir de mucílago de linaza (ML) (70, 80 y 100%), quitosano (1%), Tween80 (0.1%), Glicerol(0.3%) y ácido láctico (0.5%). al término del estudio se registró que la evaluación global de las fresas recubiertas con A, B y C presentaron un menor daño en el IDC con

respecto a fresas testigo, en este estudio se logró un aumento significativo en la vida útil de fresas basado en los parámetros de color, textura y pérdida de peso.

En mayo 2011 se realizó una caracterización del agente causante de la pudrición de raíces de la arveja (*Pisum sativum* Linneo), pudrición de raíces de la arveja (*Pisum Sativum* Linneo), Caldas (Colombia) como autor Luz Adriana Osorio Gutiérrez, con el fin de determinar el agente causante de la enfermedad, sembraron trozos de tejido afectado en papa-dextrosa-agar, obteniéndose cultivos puros de un hongo, el cual se identificó comparando sus características micro y macroscópicas con claves taxonómicas especializadas. Posteriormente, se realizaron pruebas de patogenicidad en plántulas y semillas de arveja de la variedad Santa Isabel. Se identificó a *Fusarium* sp. Como agente causante de la enfermedad, encontrándose mayores similitudes con la especie *F. oxysporum*. Las pruebas de patogenicidad permitieron obtener una incidencia de la enfermedad del 90%, cuando la inoculación del hongo se hizo a través de heridas a las raíces, y del 73%, inoculándolo directamente a las semillas.

En este orden de ideas se realiza esta investigación para aplicar estos biopolímeros emulsificados a base de Carboximetil-celulosa (CMC), aceite esencial y alginato de sodio, con el fin de aplicarlo a las semillas de arveja para disminuir la incidencia del fitopatógeno *Fusarium oxysporum*.

5. OBJETIVOS DEL PROYECTO

5.1 OBJETIVO GENERAL

Formular un biofúngicida a partir de una emulsión con aceite esencial de orégano silvestre (*Lippia origanoides* H.B.K) frente al fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* causante de marchitez vascular de arveja (*Pisum Sativum* L.)

5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- Determinar la sensibilidad *in vitro* del fitopatógeno *F. oxysporum* al aceite esencial de orégano silvestre (*L. origanoides*).
- Desarrollar un biopolímero emulsificado capaz de contener aceite esencial de *L. origanoides* H.B.K.
- Evaluar un biofúngicida de *L. origanoides* para el manejo de *F. oxysporum* en arveja a nivel de invernadero.

6. METODOLOGÍA

6.1 OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO SILVESTRE (*LIPPIA ORIGANOIDES* H.B.K).

El material vegetal empleado en esta investigación fueron hojas secas de orégano silvestre (*Lippia origanoides* H.B.K) con el 3% de agua, obtenido de arbustos madurados de la zona del Alto Patía, vereda Alto de Mayo, municipio de Taminango (Nariño).

Figura 2. Ubicación del Alto Patía.



Fuente. Este estudio

6.1.1 extracción del aceite esencial de orégano silvestre. El aceite esencial fue extraído mediante la técnica de arrastre por vapor, según la metodología descrita por Bolaños y Villota (2010), usando vapor saturado a presión atmosférica 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. SE Determinó el rendimiento de este con la siguiente formula:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Peso del aceite esencial (Kg)}}{\text{Peso del material vegetal (Kg)}} * 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

6.2 AISLAMIENTO DEL FITOPATÓGENO FUSARIUM OXYSPORUM F. SP. PISI.

El aislamiento de *Fusarium oxysporum* f. sp *pisi*, se realizó colectando plantas de arveja con síntomas de pudrición de raíces en lotes comerciales del municipio de Contadero (Nariño). Las muestras de material vegetal se guardaron en bolsas de plástico debidamente selladas y rotuladas; posteriormente se llevaron al laboratorio de sanidad vegetal de la Universidad de Nariño, donde se lavaron con agua corriente y se colocaron en cámara húmeda para promover esporulación del fitopatógeno.

Siguiendo la metodología de Castaño *et al.* (1998), se sembraron segmentos de tejido afectados en cajas Petri con agar PDA (papa- dextrosa-agar 39 g/L de agua) en una cabina de flujo laminar BIOBASE/BBS-1300HGS y luego se introdujeron en una incubadora GEMMY (Convección forzada) a 26°C, hasta observar esporulación abundante en las cajas de Petri, posteriormente, se procedió a la identificación correcta del microorganismo asociado mediante claves taxonómicas especializadas de hongos (Booth, 1977; Barnett y Hunter, 1998; Castaño-Zapata y Salazar, 1998; Leslie y Summerell, 2006) y posteriormente se realizaron las pruebas de patogenicidad.

6.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO SILVESTRE (LIPPIA ORIGANOIDES H.B.K).

La evaluación de la actividad antifúngica del aceite esencial de orégano silvestre (*Lippia origanoides* H.B.K) se determinó mediante el crecimiento micelial *in vitro* del fitopatógeno *F. oxysporum* en medios de cultivo enmendados bajo concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$ emulsificando con tween 20 en relación 1:1 para cada caso. Como comparador se utilizó un testigo absoluto (agua destilada) como se describe en la Tabla 4.

Cuadro 4. Concentraciones de aceite esencial de orégano silvestre (L. organoides) evaluadas sobre F. oxysporum f. sp pisi.

Tratamiento	Concentración A.E. ($\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$)
T1	0
T2	100
T3	200
T4	300
T5	400
T6	500

Fuente. Esta investigación.

En cada caja de Petri se sembró discos de micelio del fitopatógeno 1,1 cm de diámetro obtenidos con un sacabocado a partir de aislamientos puros del fitopatógeno, este procedimiento se realizó en una cabina de flujo laminar BIOBASE/BBS-1300HGS, los aislamientos fueron sembrados 8 días antes del ensayo, el crecimiento micelial se registró y midió con el programa gráfico ImageJ (Rohlf, 2005), después de un período de incubación de 8 días a temperatura promedio de 22°C.

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

$$PC = \frac{DMCM - 1,1 \text{ cm}}{DMCA} * 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

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

Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), esta prueba se basa en la ausencia de crecimiento fúngico a una determinada concentración de aceite esencial; para ello se enfrenta diluciones seriadas de aceite esencial preparados en el medio de cultivo versus inóculos fúngicos. La menor concentración de la muestra (aceite esencial) que inhibe el crecimiento del microorganismo se conoce como Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) (Gamazo *et al.*, 2005).

6.3.1 Determinación de los Niveles de la Actividad Antifúngica sobre los Aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp *pisi* en Aceite Esencial de Orégano Silvestre (*Lippia organoides* H.B.K). El comportamiento *in vitro* del fitopatógeno se determinó, con relación al crecimiento radial de las colonias de *Fusarium oxysporum* f. sp *pisi* a los diferentes tratamientos.

Según Álvarez *et al.* (2010), a partir de la medida de clasificación de respuestas de aislamientos del fitopatógeno a productos biológicos a nivel de laboratorio se determinó la concentración efectiva media (EC₅₀).

- 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.

6.4 DISEÑO EXPERIMENTAL EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.

El ensayo se dispondrá siguiendo un Diseño Completamente al Azar (D.I.A), utilizando cinco repeticiones por tratamiento, los datos obtenidos a través de la evaluación del porcentaje de crecimiento fueron normalizados con la relación $\arccos(\sqrt{x})$. Se realizó un análisis estadístico ANOVA y prueba de comparación de medias de Tukey al 95% de confianza mediante el software estadístico Statgraphics Centurion XVI.I.

6.5 PREPARACIÓN DEL BIOPOLÍMERO EMULSIFICADO PARA EL BIOFÚNGICIDA.

6.5.1 Evaluaciones Preliminares. Se evaluaron diferentes formulaciones para el desarrollo de un recubrimiento polimérico capaz de contener el aceite esencial teniendo en cuenta la concentración mínima inhibitoria determinada en la etapa previa, para ello se estudiaron y evaluaron tres compuestos; lecitina de soya, goma arábica y alginato de sodio ácido.

Estos compuestos fueron sometidos a una evaluación preliminar donde se estudió su capacidad para formar soluciones estables que contienen el agente bioactivo (Aceite esencial), para ello se realizó el siguiente procedimiento:

6.5.2 Biopolímero emulsificado a base de Lecitina de Soya. Siguiendo la metodología de Moreno *et al.* (2001), se preparó el biopolímero de lecitina, donde se pesó y mezcló cantidades determinadas de agua y de lecitina con unas proporciones 1:1, 1,5:1 y 2:1 (p/p). Por otra parte se mezcló la fase oleosa constituida por aceite de orégano (*Lippia origanoides* H.B.K) y Tween 20 para emulsificar la solución.

6.5.3 Biopolímero emulsificado a base Goma arábica. De acuerdo la metodología de Ribeiro y Schubert (2003), se emulsificó el biopolímero, adicionando agua y proporciones de goma arábica 1:1, 1,5:1 (p/p) simultáneamente se homogenizó durante 60 segundos y se adicionó la fase oleosa constituida por aceite de orégano (*Lippia origanoides* H.B.K).

Las condiciones de mezcla para los biopolímero fueron con una agitación de 1600 r.p.m. en una plancha de calentamiento a 70°C, agitador digital IKA CMAG HS7 y un homogenizador análogo D160 durante 2 minutos.

6.5.4 Biopolímero emulsificado a base de Alginato de sodio ácido. Según la metodología de Rhim (2004), se desarrolló un biopolímero emulsificado pesando 1,5% de alginato de sodio y diluidos en 100 mL de agua destilada con agitación (1600 rpm), calentamiento (70°C), por un tiempo de 30 minutos hasta obtener un biopolímero homogéneo y estable.

6.5.5 Formulación del Biofúngicida. Las formulaciones evaluadas se desarrollaron manteniendo constante la cantidad de alginato de sodio ácido (1,5 %) y de glicerol (3 %) aditivo que actúa como plastificante. Con el fin de variar la tensoactividad de las formulaciones se adicionó Carboximetil-celulosa (CMC) en dos niveles (0,1% y 0,3 %), igualmente se evaluaron diferentes concentraciones de aceite esencial teniendo como base la concentración mínima inhibitoria CMI, obtenida en la primera etapa de la investigación. Las diferentes concentraciones de aceite esencial se mezclaron con Tween 20 en una proporción 1:2 las cuales se detallan en la Tabla 5.

La preparación de los recubrimientos se realizó disolviendo alginato de sodio ácido en agua destilada a 70 °C, esta mezcla se homogenizó durante 30 minutos, finalizado este tiempo se adicionó el glicerol y la mezcla aceite esencial y Tween 20, agitando durante 5 minutos más, obteniendo una emulsión estable.

Cuadro 5. Matriz experimental para las formulaciones del Biopolímero estudiado.

Tratamientos	Concentraciones de CMC (%)	Concentraciones de AE ($\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$)
T1	0,1	0
	0,1	200
	0,1	400
	0,1	600
	0,1	800
	0,1	1.000
T2	0,3	0
	0,3	200
	0,3	400
	0,3	600
	0,3	800
	0,3	1.000

Fuente. Este estudio

6.6 EVALUACIÓN DE LOS BIOPOLÍMEROS FORMULADOS.

La evaluación de las 12 formulaciones obtenidas se realizó mediante dos pruebas, la primera dirigida a evaluar la disminución en el porcentaje del halo de inhibición del fitopatógeno *F. oxysporum*, para ello se realizó una evaluación *in vitro* utilizando sensidiscos impregnados con las diferentes soluciones y la segunda prueba buscó determinar la existencia de algún tipo de incidencia y actividad biocida del biopolímero y/o sus componentes sobre la emergencia de las semillas de arveja.

6.7 PREPARACIÓN DE SENSIDISCOS CON EL BIOPOLÍMERO EMULSIFICADO DE CARBOXIMETIL-CELULOSA, ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO SILVESTRE Y ALGINATO DE SODIO ÁCIDO.

Para este ensayo se utilizó el método de difusión en agar con sensidiscos de diámetro 5mm obtenidos de papel filtro Whatman N°1, los cuales fueron esterilizados en Autoclave (Tipo olla ALL AMERICAN 50X & 75X) y almacenado en un lugar apropiado.

Una vez preparados los biopolimeros indicados en la Tabla 5, se sumergieron dos sensidiscos para ser impregnados con las soluciones para posteriormente ser dispuestos en los extremos de las caja de Petri, luego se ubicó el hongo de 5,125 cm de diámetro en el centro de la caja, las condiciones de crecimiento micelial fueron 39g/L de PDA, temperatura de 26°C por 15 días, transcurrido este tiempo se determinó el halo de inhibición micelial según la metodología de Chiriboga, (2009).

6.8 DISEÑO EXPERIMENTAL DEL BIOPOLÍMERO EMULSIFICADO.

Se utilizó un Diseño experimental Irrestrictamente al Azar (D.I.A) con arreglo factorial multinivel, donde el factor A: corresponde a las concentraciones de CMC (0,1 %CMC y 0,3 %CMC) y factor B las concentraciones del aceite esencial de orégano silvestre (200, 400, 600, 800 y 1.000 $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$) como se indica en la Tabla 5 y se determinó como variables de respuesta la disminución del fitopatógeno. Se realizó un análisis estadístico ANOVA y prueba de comparación de medias de Tukey al 95% de confianza mediante el software estadístico Statgraphics Centurion XVI.I.

6.9 PRUEBA DE EMERGENCIA.

La prueba de germinación estándar se realizó aplicando la metodología de Acosta y Eraso (2012), la cual establece disponer las diferentes muestras sobre una toalla de papel absorbente, humedecida en la parte superior con agua, por un periodo de 15 días a temperatura ambiente; para poder determinar el efecto de las soluciones evaluadas sobre la emergencia de las semillas; el resultado se expresó en porcentaje de emergencia usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Prueba de Emergencia} = \frac{C \cdot 100}{50} \quad \text{Ecuación 3}$$

C= Numero de arvejas que germinaron.

6.10 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA PRUEBA DE EMERGENCIA.

Para el anterior ensayo se dispuso de un diseño experimental Irrestrictamente al Azar (D.I.A) con arreglo factorial multinivel, donde el factor A: corresponde a las concentraciones de CMC (0,1 %CMC y 0,3 %CMC) y factor B las concentraciones del aceite esencial de orégano silvestre (200, 400, 600, 800 y 1.000 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$) como se indica en la Tabla 5 y se determinó como variables de respuesta el porcentaje de emergencia. Se realizó un análisis estadístico ANOVA y prueba de comparación de medias de Tukey al 95% de confianza mediante el software estadístico Statgraphics Centurion XVI.I.

6.11 EVALUACIÓN DEL BIOFÚNGICIDA EN INVERNADERO.

6.11.1 Prueba de Invernadero. El ensayo a nivel de invernadero se realizó en las instalaciones de la Universidad de Nariño, en este ensayo se priorizo los tratamientos que no incidieron en la emergencia de semillas de arveja impregnadas con el biofúngicida, posteriormente se dispusieron los tratamientos en suelo esterilizado en Autoclave (condiciones), se preparó el inóculo con el fitopatógeno *F. oxysporum* f. sp. *pisi* a una concentración de 1×10^5 conidias $\cdot \text{mL}^{-1}$ la cual se adicionó a cada bolsa con suelo esterilizado (0,5 Kg suelo/bolsa), concluida esta etapa se sembró para cada tratamiento (ver Tabla 5.) 3 semillas de arveja impregnadas inicialmente con el biofungicida y dos testigos absolutos, el primero inoculado con el fitopatógeno y el segundo sin inoculación; la unidad experimental para este ensayo fue de 12 repeticiones por tratamiento de acuerdo a lo establecido por Acosta y Eraso 2012.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.1 OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO SILVESTRE (*LIPPIA ORIGANOIDES* H.B.K).

En esta investigación se utilizó aceite esencial de orégano silvestre por presentar un alto contenido de Timol (60,3%) y además porque tiene propiedades antifúngicas frente a fitopatógenos de origen saprofito como es *F. oxysporum* como lo reporta Arango *et al.* (2012).

Cuadro 6. Condiciones de extracción del Aceite esencial de *Lippia origanoides* H.B.K mediante la técnica de arrastre por vapor.

Densidad de lecho (g/L)	Presión de Vapor (Psig)	Tiempo (Horas)	Rendimiento (%)
95,4	1	1	3,4

Fuente. Este estudio

La extracción se realizó mediante la metodología propuesta por Bolaños y Villota (2010), en las instalaciones de la Planta Piloto de la Universidad de Nariño, utilizando el equipo de arrastre por vapor con las condiciones de la Tabla 6, donde se sometieron 7 kilos de hojas secas de orégano silvestre con el 3% de agua y se obtuvo un volumen de 75 mL de aceite esencial de *Lippia origanoides*, para un total de 14 extracciones obteniendo \pm 1 Litro de aceite esencial con un rendimiento promedio de 3,4% como se observa en la Figura 8.

Los resultados obtenidos muestran valores acordes a los reportados por otros autores. Padulosi, (1996) y Bolaños y Villota, (2010) obtuvieron un rendimiento del 2% por la técnica de arrastre de vapor. En el estudio realizado por Dos Santos *et al.* (2004) obtuvieron un rendimiento de 4,6% (p/p) de *L. origanoides* en tres localidades del Brasil. Sánchez, (2006) obtuvo rendimientos del 3,55% por arrastre de vapor. En otra especie del mismo género *Lippia* se encontraron rendimientos del 4,3% (Rocha *et al.*, 2007), mientras que Lee *et al.* (2009) obtuvieron rendimientos del 2,5%. En la investigación por Escobar *et al.* (2010) en *L. origanoides* colectada del Cauca, Mercaderes obtuvieron un rendimiento del 2%. Igualmente en otros quimiotipos de *L. origanoides* reportadas por Stashenko *et al.* (2010) a una altura de 850 m.s.n.m, se encontraron rendimientos entre 2,4 - 3,1 %, los cuales varían según donde se cultivan. Arango *et al.* (2012) obtuvieron un rendimiento de 2,76 a 3,5% por el método de arrastre de vapor. Por el método de hidrodestilación se realizaron los siguientes estudios con Kulisic, *et al.* (2004) evaluaron un aceite de orégano obtenido mediante hidrodestilación reportando un rendimiento del 2,9%. Acevedo *et al.* (2009) obtuvieron un rendimiento mucho bajo

2,3% por el método de hidrodestilación asistida por radiación de microondas y un estudio con las dos técnica lo realizó Luque de Castro *et al.* (2006) obtuvieron rendimientos de 2,88% y 3% usando las técnicas de arrastre de vapor e hidrodestilación respectivamente.

Figura 3. Extracción de Aceite Esencial de Orégano Silvestre.

A	B	C	D
			
<p>Planta de orégano silvestre.</p>	<p>Hojas de orégano silvestre secas</p>	<p>Hojas en el equipo de arrastre por vapor.</p>	<p>Aceite esencial de Orégano silvestre.</p>

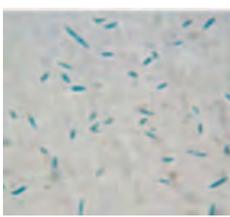
Fuente. Este estudio

7.1.1 Aislamiento del fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi. Se realizó teniendo en cuenta la metodología descrita por Castaño *et al.* (1998), para ello se sembró segmentos de tejido afectados en cajas Petri con agar PDA (papa-dextrosa-agar 39 g/L de agua) y se las dejó en la cámara de aislamiento del Laboratorio de Conservación y Calidad de Alimentos, para luego colocarlas en una incubadora GEMMY (Convección forzada) a 26°C, hasta observar esporulación abundante para luego ser purificado el hongo y poder proceder a la identificación correcta del fitopatógeno.

La identificación del hongo se realizó teniendo en cuenta microconidias, macroconidias, clamidoesporas y estructura de este según la metodología de Leslie y Summerell, (2006). Se obtuvo consistentemente un aislamiento fúngico con un crecimiento algodonoso inicialmente blanco, que con el transcurso de los días se empezó a tornar púrpura en la zona de mayor esporulación del hongo. Se logró observar conidias hialinas, principalmente de dos tipos, microconidias en forma oval o cilíndrica (Figura 4, B) y macroconidias fusiformes con o sin septos

(Figura 4, A), también se observaron clamidosporas globosas intercalares o terminales, solas o en pares (Figura 4, C), y una estructura en forma de un árbol ramificado, características propias del fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*, (Figura 4, D) que coincide con los resultados que obtuvo Booth, (1977); Burgess *et al.* (1994); Barnett y Hunter, (1998); Castaño-Zapata y Salazar, (1998); Leslie y Summerell, (2006) y Osorio-Gutiérrez y Castaño-Zapata, (2011).

Figura 4. Características microscópicas del fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*.

A	B	C	D
			
Macroconidias alargadas con septas.	Microconidias cilíndricas.	Clamidoesporas globosas intercalares.	Estructura del Fitopatógeno.

Fuente. Este estudio

7.2 LA SENSIBILIDAD DEL FITOPATÓGENO *FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP *PISI*.

7.2.1 Crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*. Para determinar el efecto biocida del aceite esencial de *L. organoides* sobre el fitopatógeno *F. oxysporum*, se estableció el siguiente rango de evaluación de 100, 200, 300, 400 y 500 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, obteniendo diferencia altamente significativa entre las concentraciones evaluadas generándose un P de 0,0001.

Cuadro 7. ANOVA para determinar el Crecimiento micelial *F. oxysporum* f. sp. pisi frente aceite esencial de *Lippia organoides* H.B.K.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	60,504	5	12,1008	766682,05	0,0001
Intra grupos	0,0003788	24	0,000015783		
Total (Corr.)	60,5044	29			

Fuente. Este estudio

La Tabla **ANOVA** descompone la varianza del valor normalizado del porcentaje de crecimiento micelial del fitopatógeno *F. oxysporum* en dos componentes: un componente entre grupos donde indica un $P=0,0001$ y un componente dentro de grupos. La razón-F para este caso es igual a 766682,05 lo que indica que el cociente entre el estimado entre grupos y el estimado dentro de grupos lo que significa que hay diferencia significativa entre los grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del valor normalizado del porcentaje de crecimiento del fitopatógeno, teniendo en cuenta un nivel de la concentración del aceite esencial ($\mu\text{L.mL}^{-1}$), además se presenta con un nivel del 95,0% de confianza.

Cuadro 8. Pruebas de Múltiple Rangos para el valor normalizado del porcentaje de crecimiento micelial y las concentración de aceite esencial ($\mu\text{L.mL}^{-1}$).

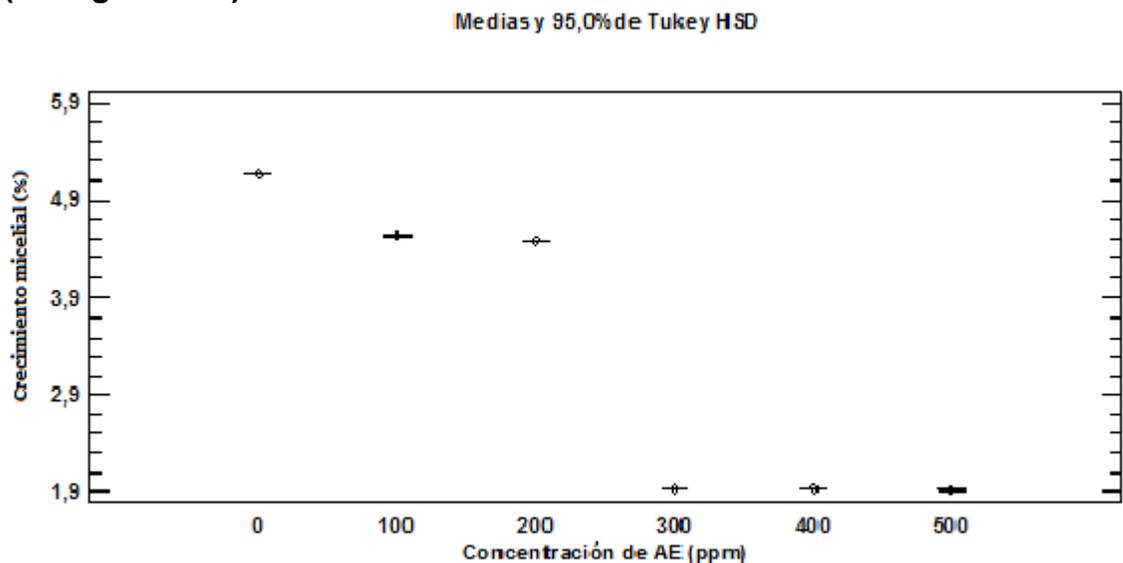
Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
500 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	5	1,9092	X
400 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	5	1,9262	X
300 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	5	1,9286	X
200 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	5	4,4886	X
100 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	5	4,533	X
0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	5	5,1702	X

Fuente. Este estudio

Esta Tabla 8 los grupos homogéneos el análisis estadístico de la adición de aceite esencial de orégano silvestre en el medio nutritivo genero una respuesta negativa en el crecimiento micelial del fitopatógeno a partir de la concentración de 100 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ se obtiene diferencias estadísticas en relación al testigo absoluto. También se determinó que tan solo las concentraciones de 300 y 400 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de aceite esencial fueron iguales estadísticamente en relación a la variable de crecimiento, en donde los resultados indican un efecto fungistático del aceite esencial sobre *F. oxysporum*. Y que en los demás tratamientos se muestra diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el

procedimiento de diferencia mínima significativa por la prueba de Tukey donde con este método hay un riesgo del 5,0% al decir la diferencia real es igual a 0%.

Gráfica 1. El porcentaje normalizado de crecimiento micelial fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* frente al aceite esencial de orégano silvestre (*L. organoides*).

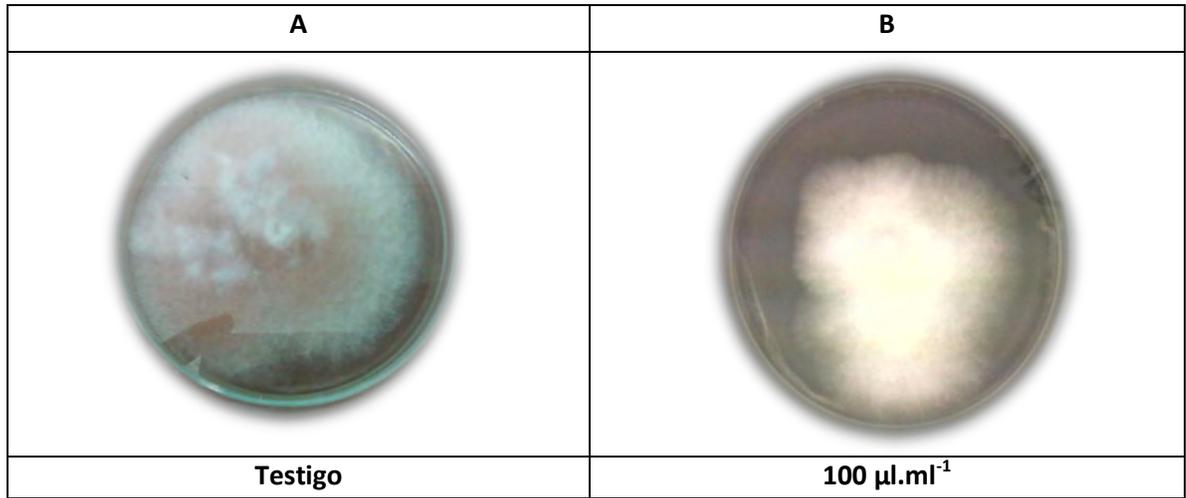


Fuente. Este estudio

Se determinó que las relaciones superiores del aceite esencial de orégano silvestre en los tratamientos T4, T5 y T6 (300, 400 y 500 $\mu\text{L.mL}^{-1}$) bajaron significativamente la velocidad de crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* a nivel *in vitro* según la metodología propuesta inicialmente, por el contrario los tratamientos T2 y T3 (100 y 200 $\mu\text{L.mL}^{-1}$) donde se presentó crecimiento micelial, reportado a las 192 horas de evaluación un crecimiento en el diámetro micelial de 6,245 y 6.122 cm en los tratamientos T2 y T3 respectivamente, en relación a 8,121 cm del comparador absoluto T1 (0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$) como se observa en la Gráfica 1.

La Gráfica 1 nos muestra que a mayor concentración de aceite esencial de orégano silvestre el crecimiento micelial del fitopatógeno es menor, esto se debe al contenido de Timol de *L. organoides* que es alto, presentando una actividad antifúngica sobre el fitopatógeno *F. oxysporum* f. sp. *pisi* y así evitando que su crecimiento se incremente. Se realizó una comparación del hongo que contiene aceite esencial y el testigo donde se presentó diferencia en la macro-morfología de la colonia que contiene aceite esencial, disminuyendo las coloraciones rojizas que se observa en una caja sin aplicación de aceite esencial con el testigo absoluto como se observa en la Figura 5,A.

Figura 5. Comparación del crecimiento del Fitopatógeno en caja Petri.



Fuente. Este estudio

El mecanismo de acción de los aceites esenciales sobre hongos se ha demostrado que los géneros *Origanum* (orégano), *Thymus vulgaris* (tomillo) y *Cinnamomum verum* (canela), entre otros, tienen propiedades antioxidantes, antibacteriales y antifúngicas relacionadas con los compuestos fenólicos, carvacrol y el timol que pueden ser utilizados bajo ciertas condiciones como fungicidas y bactericidas para evitar el crecimiento de micelial de fitopatógenos (Aballa y Rosen, 2001).

El crecimiento micelial del fitopatógeno *in vitro* con el aceite esencial de orégano silvestre se puede realizar una explicación del carácter ácido que afecta la permeabilidad de la membrana celular donde el contenido de Timol (60,3%) causa problemas en el intercambio de iones calcio, fósforo y magnesio (Fernández y Vega, 2001).

Según Márquez *et al.* (2007) el porcentaje de inhibición debe ser mayor al 20 % para demostrar que se detiene el crecimiento de los hongos, para esta investigación se presenta un porcentaje de inhibición de *F. oxysporum* f. sp. *pisi* que fue evaluado durante 192 horas, presentan un porcentaje de inhibición superior al 20% a un desde la concentración de 100 µL.mL⁻¹, para los tratamientos T2 y T3 la inhibición es de 37,54% y 38,76% respectivamente, resultados no tan pronunciados como los encontrados en los tratamientos T4, T5 y T6 donde la inhibición es de 88,67%, 100% y 100% respectivamente, estos porcentajes corresponden a niveles de inhibición altos en comparación con lo que reporta Márquez *et al.* (2007). Estos resultados demuestran que el aceite esencial de *L. organoides* H.B.K tiene propiedades antifúngicas que evitan que este fitopatógeno pueda desarrollarse normalmente como se describe en la Tabla 9.

Cuadro 9. Porcentaje de inhibición a nivel in vitro del fitopatógeno *F. oxysporum* f. sp. pisi frente aceite esencial de *Lippia origanoides* H.B.K.

Concentración del AE ($\mu\text{L.mL}^{-1}$)	Halo de inhibición (192 horas)
100	37,54
200	38,76
300	88,67
400	100
500	100

Fuente. Este estudio

Según lo anterior se concluye que se logró establecer el valor de uno o más factores a una constante, estableciendo los límites alto y bajo en ese valor. Según la metodología de Gamazo (2005) se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) es $400 \mu\text{L.mL}^{-1}$ como el valor donde se inhibe al fitopatógeno en un periodo de 192 horas.

Para determinar la actividad antifúngica a nivel *in vitro* teniendo en cuenta la metodología de Álvarez *et al.* (2010) se cataloga el crecimiento del hongo teniendo en cuenta el siguiente esquema.

- 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.

Cuadro 10. Determinación de los niveles de la actividad antifúngica sobre los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp pisi con el aceite esencial de orégano silvestre

Tratamientos Concentración AE ($\mu\text{L.mL}^{-1}$)	Porcentaje de crecimiento (%)	Características
100	62,46	Resistente
200	61,24	Resistente
300	11,33	Intermedio
400	0	Sensible
500	0	Sensible

Fuente. Este estudio

En la Tabla 10 se determinó que los tratamiento T2 y T3 tiene una respuesta de resistente, presentando un porcentaje mayor al 60% de lo cual se deduce que el aceite esencial incide sobre el crecimiento micelial del fitopatógeno y el

tratamiento de 300 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ presentó una respuesta de intermedio y las concentraciones más elevadas de aceite esencial de 400 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ y 500 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ obtuvieron una respuesta de sensible donde se ratifica el efecto biocida del aceite esencial.

Estos resultados son comparables con los obtenidos con aceite esencial de Tomillo donde Barrera y Garcia, (2008) y Balanta *et al.* (2013) evaluaron los compuestos carvacrol, timol y aldehído cinámico a concentraciones entre 200 y 300 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ contra el crecimiento de *Fusarium* sp, en papaya y como resultado se presentó una total inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium* sp., observando una correlación entre la actividad antifúngica del aceite esencial de tomillo y sus constituyentes; en otra investigación realizada por Cueto, (2010) determino la concentración mínima inhibitoria fue de 250 a 500 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ utilizando aceite esencial de *Lippia berlandieri* Schauer para controlar a *Fusarium oxysporum* que ataca los cultivos de tomate.

Después de analizar el comportamiento del crecimiento del fitopatógeno *F. oxysporum* f. sp *pisi* con la Técnica de Dilución en Agar, expresado como el crecimiento micelial de la Fase anterior. Se procedió a explorar un nuevo rango de evaluación y con una técnica *in vitro* diferente a la fase anterior, y la evaluación fue con la Técnica de Difusión en Agar utilizando sensidiscos con las siguientes concentraciones de aceite esencial de orégano silvestre 200, 400, 600, 800 y 1.000 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, constituyendo unos biopolímeros emulsificados capaces de contener al aceite esencial, con el fin de generar un biofungicida que pueda aplicarse sobre la semilla de arveja a manera de capa protectora frente al fitopatógeno presente en el suelo.

7.3 DESARROLLO DE UN BIOPOLÍMERO EMULSIFICADO CAPAZ DE CONTENER ACEITE ESENCIAL DE L. ORIGANOIDES COMO BIOFUNGICIDA.

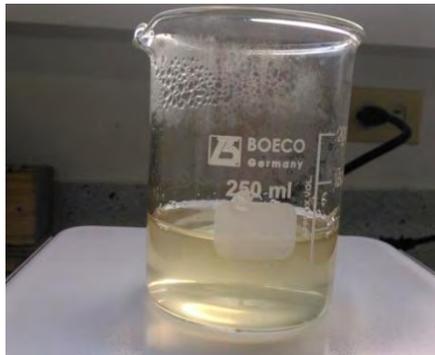
Tras la serie de pruebas mencionadas se determinó que las soluciones obtenidas de lecitina de soya y goma arábiga presentaron fenómenos de sedimentación y separación de fases, floculación y coalescencia de las partículas, además a pesar del uso del homogeneizador no se logró estabilidad y por consiguiente se descartó estas soluciones. Por lo tanto, se continuo trabajando con alginato de sodio acido, compuesto hidrocoloide cuyas propiedades formaron una solución homogénea, sin embargo fue necesario incrementar la viscosidad del fluido para mejorar la adhesión al grano, para ello se utilizó carboximetil-celulosa (CMC), el cual actuó como espesante generándole mayor consistencia a la solución, aumentando su tensoactividad y la capacidad para contener el aceite esencial de orégano silvestre.

Una vez determinado el valor de la concentración mínima inhibitoria (CMI) calculado en el numeral 8.2 que tuvo un valor de 400 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ se procedió a

preparar un biopolímero emulsificado con capacidad de contener a este compuesto bioactivo. El biopolímero se preparó teniendo como base de alginato de sodio ácido y carboximetil-celulosa (CMC) con el objetivo de que la emulsión del biopolímero tenga propiedades de adhesión cumpliendo con criterios de estabilidad molecular y física como se observa en la Figura 6.

Se caracterizó la solución biopolimérica que se obtuvo de hidratar como solución acuosa con funcionalidad de retención. Estas soluciones acuosas a base de alginato de sodio ácido y carboximetil-celulosa (CMC) son fluidos no-newtonianos o pseudoplásticos con un valor de viscosidad de 12,80 centipoises (cP) y con una densidad de 1,012 g/mL. La viscosidad de las soluciones acuosas depende de la concentración de alginato de sodio ácido, CMC y la longitud de las cadenas del que conforman al alginato. Al disolver el alginato en agua, las moléculas se hidratan y la solución gana viscosidad como se observa en la Figura 6. Presentando resultados similares fueron citados por Figueroa *et al.* (2011).

Figura 6. Preparación del biopolímero emulsificado a base de Alginato de sodio ácido, CMC y aceite esencial de orégano silvestre.



Fuente. Este estudio

El porcentaje de inhibición debe ser mayor al 20 % para evidenciar que se detiene el crecimiento de los hongos, para esta fase se presentó un porcentaje del halo de inhibición micelial de *F. oxysporum* f. sp. *pisi* evaluado a las 192 horas, que fue tratados con los tratamientos 1 y 2% CMC con el Biofúngicida dando como resultado que para T1 y T2 con 0 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ es 0,39% y 0,4 % respectivamente donde no hay inhibición por ser menor al 20%, para el tratamiento T2 – T6 con 200 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ el porcentaje de inhibición es de 30,024 Y 38,857% respectivamente lo que indica que la inhibición del fitopatógeno se presenta pero es baja en comparación con los resultados de los siguientes tratamientos y con las concentraciones superiores de aceite esencial de orégano silvestre de T3, T4, T5 y T6 con 400, 600, 800 y 1.000 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ la inhibición es de 34,559, 37, 867. 41,579 y 46,78% respectivamente lo que quiere decir que es inferior en comparación con

el tratamiento T7, T8, T9 y T10 con 400, 600, 800 y 1.000 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ donde la inhibición es de 94,076, 100, 100 y 100% respectivamente, ya que los porcentajes de inhibición son muy altos en comparación con lo que reporta Márquez *et al.* (2007), de lo cual se afirma que el Biofúngicida a base de aceite esencial *Lippia organoides* H.B.K, alginato de sodio ácido y Carboximetil-celulosa (CMC) tiene propiedades antifúngicas que evitan que este fitopatógeno pueda desarrollarse como se muestra en la Tabla 12.

Cuadro 11. Porcentaje de inhibición a nivel in vitro del fitopatógeno *F. oxysporum* f. sp. pisi frente al Biofúngicida.

Tratamientos	Concentración de CMC	Concentración de AE ($\mu\text{L.mL}^{-1}$)	Halo de Inhibición (192 horas)
T1	0,1	200	30,0243
T2	0,1	400	34,5586
T3	0,1	600	37,8671
T4	0,1	800	41,5786
T5	0,1	1.000	46,78
T6	0,3	200	38,8571
T7	0,3	400	97,0757
T8	0,3	600	100
T9	0,3	800	100
T10	0,3	1.000	100

Fuente. Este estudio

La prueba de sensidiscos determino que la interacción de Carboximetil-celulosa (CMC) y la proporción de aceite esencial correspondiente a los tratamientos T8 – T10 los cuales presentaron una proporción de aceite esencial de 600, 800 y 1.000 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ manteniendo una matriz con la adición de 0,3 % de CMC presentaron un halo de inhibición del 100%, en estos tratamientos el fitopatógeno presentó una distancia promedio entre el sensidisco y el micelio próximo de 0,534 cm; el tratamiento 7 (T7) el cual presentó una concentración de 400 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de aceite esencial con una concentración mínima inhibitoria del anterior ensayo presento un comportamiento aceptable con un porcentaje de halo de inhibición del 97,0757%; de manera general los tratamientos T1 – T5 los cuales mostraron el factor como 0,1 %CMC indicaron halos de inhibición inferiores a los obtenidos en los tratamientos T6 – T10. Los datos anteriores se describen en la Tabla 11.

El biopolímero emulsificado más estable se sometió a una evaluación *in vitro* con la técnica de difusión en agar con dos sensidiscos por caja. Esto se realizó con el fin de corroborar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial obtenido en el numeral 8.2, los resultados obtenidos se describen en la Tabla 12,

pero se determinó si existe diferencia significativa entre los datos generados en esta investigación.

Cuadro 12. Análisis de Varianza del halo de inhibición micelial del fitopatógeno frente al Biopolímero emulsificado.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Concentración de CMC	78,3689	1	78,3689	143,04	0,0001
B:Concentración de AE	69,41	1	69,41	126,68	0,0001
AB	20,5582	1	20,5582	37,52	0,0001
Bloques	0,0001927	5	0,000038558	0,00	1,0000
Error total	34,5174	63	0,547895		
Total (corr.)	202,855	71			

Fuente. Este estudio

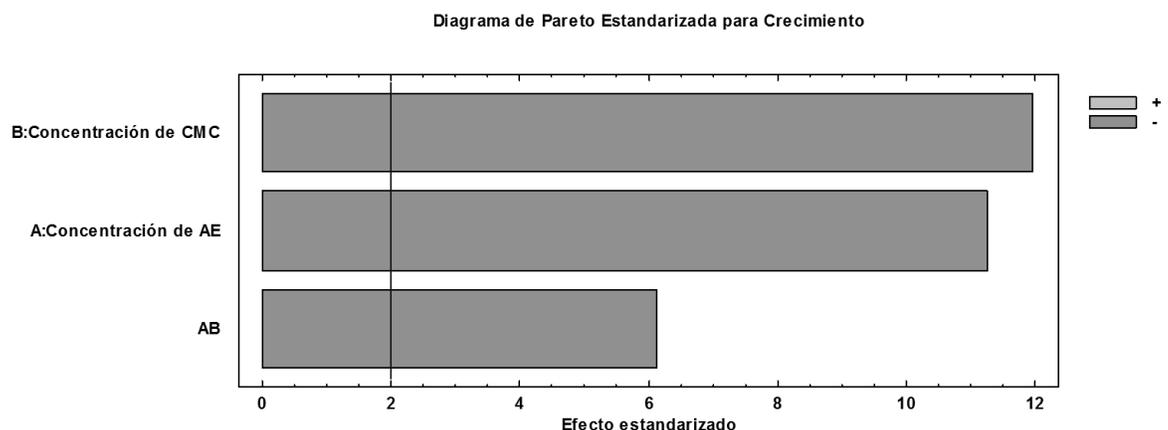
R-cuadrada = 82,9842 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 80,8234 porciento

Fuente. Esta investigación.

También se determinó que los dos factores A y B, así como su interacción (AB) presenta un efecto estadísticamente significativo frente a la variable de respuesta crecimiento micelial del fitopatógeno *F. oxysporum* f. sp. *pisi*.

Gráfica 2. Diagrama de Pareto del Biopolímero emulsificado para disminuir el halo de inhibición micelial del Fitopatógeno.

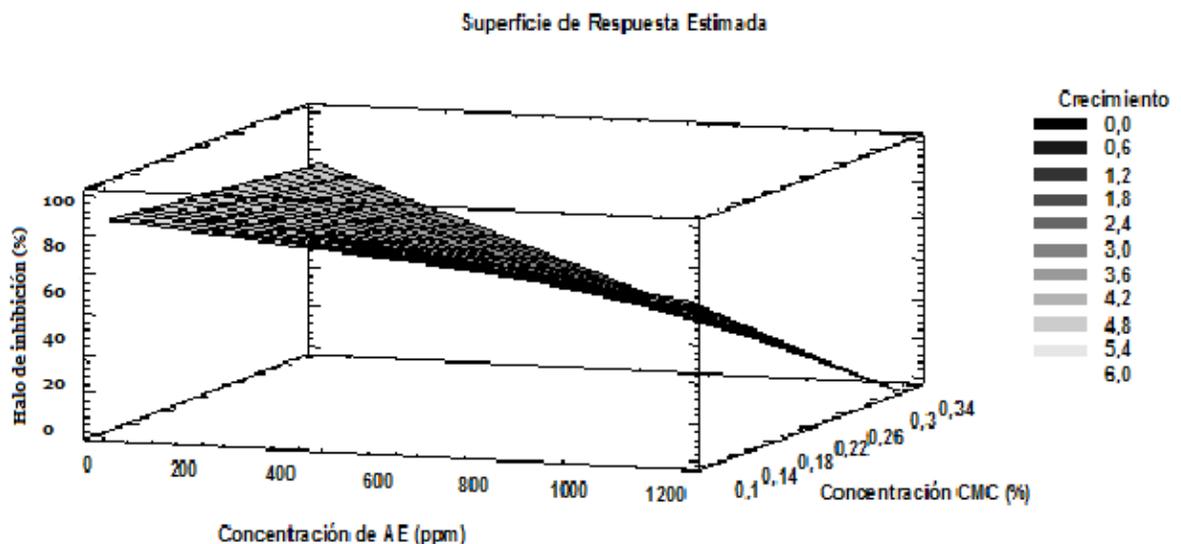


Fuente. Este estudio

Los resultados observados en la Tabla ANOVA son reiterados a través del Diagrama de Pareto (Gráfica 2) que indica el efecto inversamente proporcional

que los dos factores en estudio ejercen sobre el crecimiento del fitopatógeno, un efecto similar se presenta con la interacción que se genera entre factores (AB). Estos resultados se atribuyen al efecto antifúngico del A.E, efecto que aumenta con su concentración, así mismo la capacidad del CMC de brindarle cohesión molecular al biofúngicida formulado se ve reflejado en los resultados obtenidos en la Gráfica 2, puesto que a mayores cantidades porcentuales de CMC se logra preservar los compuestos activos del A.E en la matriz polimérica, todo ello reflejado en el descenso significativo del crecimiento micelial del fitopatógeno.

Gráfica 3. Superficie de Respuesta para los Tratamientos 1 y 2 a nivel in vitro a base de CMC, Alginato de sodio y a diferentes concentraciones de Aceite esencial de Orégano silvestre con Sensidiscos.



Fuente. Este estudio

Los resultados obtenidos en el análisis de superficie de respuesta presentan una tendencia en la cual las concentraciones más altas de aceite esencial sumadas a concentraciones altas de Carboximetil-celulosa se obtuvieron los resultados más bajos en relación al halo de inhibición micelial, con la técnica de sensidiscos confirmando el potencial biocida del biopolímero emulsificado con aceite esencial el cual a través de estos resultados se puede denominar a biofúngicida activo sobre *Fusarium oxysporum* como se observa en la Gráfica 3, posiblemente pueden ser explicados por la mayor retención y cohesión molecular de la matriz que alberga al aceite esencial teniendo en cuenta el contenido de Carboximetil-celulosa

En el 2013 se realizó un estudio sobre la Influencia de la concentración de la fase de aceite sobre la distribución del tamaño de gota y la estabilidad de emulsiones de aceite-en-agua, por Dapcevic Hadnadev con el objetivo de este estudio fue

investigar el efecto de la concentración de la fase de aceite, en diferentes condiciones de emulsificación relativa al tiempo de homogeneización y contenido de emulsionante, en la distribución y la estabilidad de maiz emulsiones aceite-en-agua tamaño de las gotas. Las emulsiones se prepararon con 3, 5, 10, y 20% w / w oleato de trietanolamina (calculado sobre la cantidad de aceite), 0,53% w / w carboximetilcelulosa (calculado sobre la cantidad de agua), y 5, 10, 20, 30, o 40% w / w de aceite, y se homogeneizaron 5, 10, 20, y 60 min. Se encontró que el aumento de concentración de la fase de aceite condujo a la reducción del área superficial específica y aumentar en polidispersidad de emulsión a menor concentración de emulsionante y menos intensa homogeneización. A concentraciones de emulsionantes $\leq 10\%$ y rangos de tiempo de homogeneización de 20-60min la variación no monótona en los parámetros de tamaños de gota con la concentración de aceite se observó, como resultado de la interacción entre oleato de trietanolamina y carboximetilcelulosa, que se confirmó por mediciones de la viscosidad. Aplicaciones prácticas: Las emulsiones son sistemas coloidales que pueden encontrarse en diferentes sectores industriales, tales como alimentos, productos farmacéuticos, cosméticos, industria petrolera, etc Determinación del tamaño de las gotas de la emulsión es probablemente la forma más importante de su caracterización, ya que influye en la propiedades de emulsión tales como reología, textura, estabilidad de caducidad, apariencia, sabor (Dapcevic *et al.*, 2013).

Estudios científicos en la utilización de CMC reportan que La modificación química en medios de reacción H₂O / DMF con y sin K₂CO₃ como catalizador, en diferentes condiciones de reacción y el uso de radiación de microondas con potencia controlada como fuente de calentamiento. Los derivados obtenidos carboximetilcelulosa hidrofóbicamente modificado (HM-CMC) se caracterizaron por espectroscopía FT-IR. Las propiedades de superficie activa y viscosimétricas de disoluciones acuosas de CMC no modificada y sus derivados HM-CMC fueron investigados. Las propiedades de superficie activa se estudiaron por la tensión superficial, la concentración micelar crítica y la eficiencia emulsionante. La complejación de CMC o algunos derivados de HM-CMC con tensioactivos catiónicos - bromuros de tetraalquilamonio (CnTAB) en medio acuoso se estudió mediante la medición de la tensión superficial. Los derivados estudiados mostraron, a pesar de los efectos de tensión-reducción moderada de la superficie, excelente actividad emulsionante para "aceite en agua" emulsiones de tipo comparable a la del emulsionante Tween comercial 20. Las propiedades viscométricas fueron investigados en el dominio diluido. Para todas las soluciones HM-CMC las viscosidades intrínsecas eran claramente inferiores a los de CMC, probablemente debido a la degradación molecular. El aumento de la constante de Huggins de algunos de los derivados son indicativos de interacciones hidrófobas intramoleculares. Los resultados sugieren que los derivados de HM-CMC y sus complejos con tensioactivos CnTAB pueden ser explotados como potenciales biosurfactantes en diversas aplicaciones industriales (Tomanova *et al.*, 2008).

Además los resultados obtenidos en esta prueba a través de la metodología de difusión en agar no pueden ser comparables sino rectificables de los obtenidos en la evaluación mediante la técnica de dilución en agar, esta prueba solamente indica la actividad del biofúngida y sentó las bases para extrapolación de la matriz funcional en las pruebas en invernadero. La evaluación de la eficacia del biofúngida en campo tiene muchas interferencias y resulta más compleja; al realizar la evaluación *in vitro* siempre dirige hacia que el producto sea más eficaz. Sin embargo, los ensayos *in vitro* solo dan una estimación indirecta del valor de la concentración mínima inhibitoria que para esta investigación fue de $400 \mu\text{l}.\text{ml}^{-1}$; por lo tanto, se tuvo que incrementar las concentraciones de aceite esencial por motivo de que las condiciones en un laboratorio son diferentes a las de un invernadero, debido a que en el laboratorio las condiciones son controladas y en el invernadero se presentan factores como la degradabilidad, persistencia, etc; que influyen sobre el crecimiento del fitopatógeno.

Se ha demostrado que en otros estudios la actividad antifúngica para especies del género *Lippia*, contiene alto porcentaje en compuestos fenólicos como Timol y Carvacrol, como en los siguientes casos: *Lippia sideoies* y *Lippia gracilis* (Lemos *et al.*, 1990), *Lippia graveolens* (Salgueiro *et al.*, 2003), *Lippia chevalieri* y *Lippia multiflora* (Bassole *et al.*, 2003) y *Lippia origanoides* (Dos Santos *et al.*, 2004); en esta investigación se encontró resultados similares en cuanto a *Lippia origanoides* H.B.K que por sus propiedades antifúngicas inhibió al fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *psi* a los compuestos fenólicos de Timol (60,3%) y Carvacrol (38,6%).

Otros estudios realizados demuestran que el aceite esencial de *L. origanoides* es un importante agente inhibidor del crecimiento de diferentes fitopatógenos, entre ellos se puede destacar; la investigación realizada por Rodríguez y Zanabria, (2005) donde se evaluó el efecto de tres extractos de plantas silvestres entre los que se encuentran el extracto de *L. origanoides* contra *Rhizoctonia solani* y *Bipolaris maydis* causantes de la marcha sureña del maíz, donde los resultados obtenidos muestran que *L. origanoides* fue efectivo contra los dos hongos en una concentración de 1,5% (v/v) o $14319 \mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$, causando una inhibición total de los patógenos y a una concentración de 0,5% (v/v) o $4773 \mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$ donde la reducción fue del 70 y 84% en *R. Solani* y *B. maydis* respectivamente. Bolívar *et al.*, (2009) desarrollo una investigación para determinar el potencial efecto fungicida de *Lippia origanoides* en el desarrollo *in vitro* del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. y de la antracnosis en frutos de mango en la cual se obtuvo un crecimiento menor del patógeno a una concentración del aceite esencial de $50 \mu\text{l}.\text{ml}^{-1}$. Otra investigación es la que realizó Santacruz y Pantoja, (2011) donde evaluaron muestras de aceite esencial de *L. origanoides* para usar como controlador potencial contra el patógeno *Phytophthora infestans* causante de la enfermedad del Tizón tardío o gota donde a las $10 \mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$ presento un porcentaje de inhibición del 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 de este. En

otra investigación que realizó Guerrero, (2012) sobre el cultivo de ají cayena, a este cultivo lo atacan una serie de enfermedades limitantes como marchitez causada por agente *Fusarium sp.*, y Antracnosis causada por *Colletotrichum sp.*, Por esta razón se busca el control de estas dos enfermedades con *Lippia organoides* donde la CMI es de $473.5 \mu\text{L.mL}^{-1}$ para controlar *Fusarium sp* y para *Colletotrichum sp* es de $236.75 \mu\text{L.mL}^{-1}$. Otra investigación es la que realizo Ruano y Figueroa, (2013) donde se determinó la CMI para el patógeno *R. solani* aislado de la papa causante de la costra negra que fue de $110 \mu\text{L.mL}^{-1}$ donde inhibe el crecimiento completamente lo que indica que este también es sensible a la presencia de los compuestos de *L. organoides*. Además esta diferencia se le puede atribuir a que los compuestos fenólicos a los cuáles se les atribuye la actividad antifúngica no estén en la misma proporción dado por Rodríguez *et al.*, (2007).

7.4 PRUEBA DE EMERGENCIA DE LAS SEMILLAS DE ARVEJA.

Figura 7. Prueba de Emergencia Estándar

	B	C
		
Semillas al inicio.	Semillas a los 8 días.	Semillas a los 15 días

Fuente. Este estudio

Cuadro 13. Análisis de Emergencia de las semillas de arveja impregnadas con el biopolímero.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Concentración de CMC	0,865709	1	0,865709	35,69	0,0001
B:Concentración de AE	9,41303	1	9,41303	388,10	0,0001
AB	0,0920857	1	0,0920857	3,80	0,0558
Bloques	0,113107	5	0,0226215	0,93	0,4660
Error total	1,52801	63	0,0242542		
Total (corr.)	12,0119	71			

Fuente. Este estudio

R-cuadrada = 87,2792 porciento

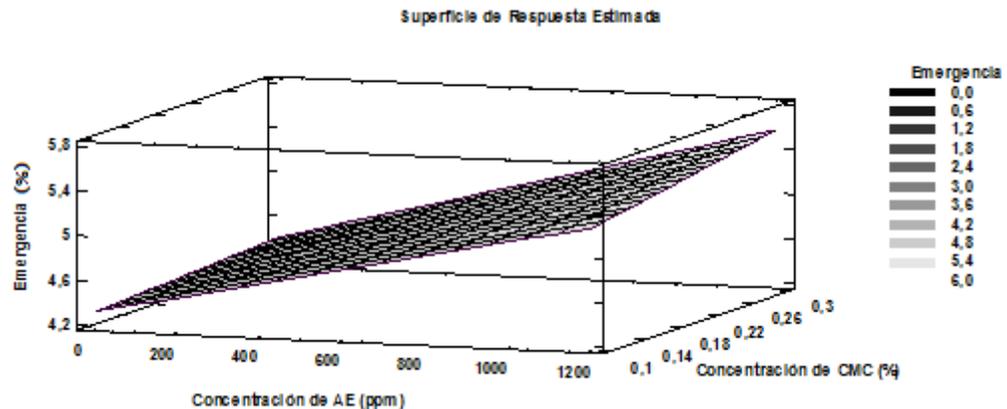
R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 85,6639 porciento

Fuente. Esta investigación.

La Tabla **ANOVA** presentó una variabilidad de emergencia de las semillas de arveja en piezas separadas para cada uno de los efectos. Demostrando que existe significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 2 efectos tienen un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%.

En cuanto a la prueba de emergencia de las semillas de arveja se obtuvo los siguientes resultados. Como primera parte el biopolímero emulsificado influye mucho en la emergencia de estas como se muestra en la Gráfica 4, donde también se evidencia que el agente precursor para que esto ocurra, es el aceite esencial de *Lippia organoides*, ya que al incrementar la concentración de éste más se va a adelantar este proceso de emergencia de las semillas de arveja.

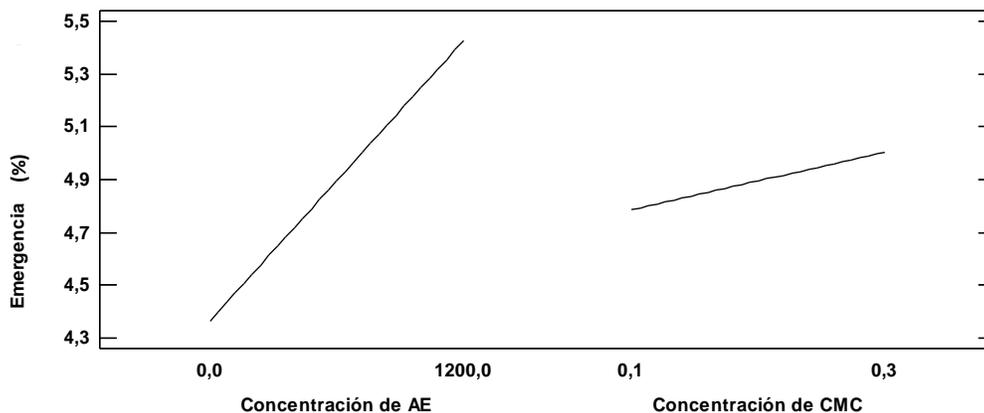
Gráfica 4. Prueba de Emergencia de las semillas de arveja impregnadas con el Biopolímero emulsificado.



Fuente. Este estudio

Gráfica 5. Efectos principales para la Emergencia de las semillas de arveja impregnadas por el biopolímero emulsificado.

Gráfica de Efectos Principales para Emergencia



Fuente. Este estudio

Según la Gráfica 7 se concluye que entre mayor sea el valor de la concentración de carboximetil-celulosa y la concentración de aceite esencial, donde el porcentaje de emergencia de las semillas de arveja va a ser superior por las propiedades que tiene el aceite esencial de servir a estas como un agente precursor de la permeabilidad logrando que el agua lo atraviese sin alterar su estructura interna y por ende evitando que las semillas se sequen. Se puede explicar este efecto de incrementar la velocidad de emergencia de las semillas de arveja por la propiedad de regulador de crecimiento que posee este aceite esencial por el contenido de Timol el cual es uno de los agentes que incide sobre la germinación de las semillas de arveja (Oliveira, 2007).

7.5 EVALUACIÓN DEL BIOFÚNGICIDA DE L. ORIGANOIDES PARA EL MANEJO DE F. OXYSPORUM EN ARVEJA A NIVEL DE INVERNADERO.

7.5.1 LA FORMULACIÓN DEL BIOFÚNGICIDA. Después de obtener el biopolímero emulsificado para el Biofúngicida y de comprobar que este no afecta con la emergencia de las semillas de arveja se procedió a realizar la prueba en el invernadero de la Universidad de Nariño.

7.5.2 Prueba de Invernadero. Después de haber realizado el ensayo de la técnica de difusión en agar con sensidiscos impregnados con el biopolímero emulsificado se logró determinar que el tratamiento que mostró el mejor comportamiento en la inhibición del fitopatógeno *F. oxysporum* en los Tratamientos T7 A T10 con 0,3% de CMC, Alginato de Sodio ácido y Aceite esencial de Orégano silvestre, ya que este impide que el aceite esencial se volatilice. Donde se realizó una inmersión de las semillas de arveja en el Biofúngicida durante 30 minutos con el fin de que se impregne en estas, posteriormente se las saco las semillas de la solución y se las coloco en unos recipientes plásticos a temperatura ambiente durante 15 minutos con el propósito de que se sequen; mientras se realizaba esto se hacia el llenado de las bolsas de libra con el suelo estéril y se hidrato cada bolsa con 100 mL de agua para luego realizar la inoculación con 5 mL de inóculo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* en cada bolsa, ya que por cada tratamiento se realizó 12 réplicas con el fin de que el diseño de experimentos sea más eficaz y más exacto. Luego se sembró las semillas de arveja impregnadas con el Biofúngicida 3 en cada bolsa para un total de 228 semillas, además pasando un día se las hidrato con 100 mL de agua.

En esta prueba se logró determinar que el efecto del biofúngicida si fue efectivo pero con los tratamientos T7, T8, T9 y T10 ya que en estos tratamientos no se generó presencia de la enfermedad de la marchitez vascular, donde los tallos y hojas no se presentó amarillamiento y por ende se puede decir que este si dio un buen resultado para controlar esta enfermedad y así poder ayudar con este producto a las personas dedicadas a este cultivo. En la siguiente Tabla 14 nos da a conocer el efecto que tiene el Biofúngicida.

Cuadro 14. Efecto del Tratamiento N°2 sobre *Fusarium oxysporum* f. sp pisi en arveja (*Pisum sativum* L.)

Tratamientos (0,3 %CMC)	Concentración de AE ($\mu\text{L.mL}^{-1}$)	N° de Plantas enfermas	Incidencia (%)
T1	0	34	94,44
T2	Testigo sin Inocular	0	0
T3	200	24	66,66
T4	400	9	25
T5	600	0	0*
T6	800	0	0*
T7	1.000	0	0*

Fuente. Este estudio

*Incidencia de la enfermedad según Márquez *et al.* (2007) debe ser $\leq 20\%$ para lograr un porcentaje de inhibición de la siguiente manera, el menor porcentaje de plantas marchitas fue con las concentraciones del aceite esencial de orégano silvestre de 600, 800 y 1.000 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, con una incidencia promedio del 0, 0 y 0% (Tabla 14); lo que corrobora los resultados obtenidos *in vitro*, con este biofúngicida observando una inhibición absoluta de *F. oxysporum* aislado de arveja.

A los 5 días inicia el crecimiento de las raíces de arveja en todos los tratamientos excepto en el testigo, corroborando que el aceite esencial incrementa la emergencia, 8 días después se forma el tallo, a 45 días se ve un crecimiento desigual existiendo presencia del fitopatógeno en los tratamiento 3 (200 $\mu\text{L.mL}^{-1}$) y en el testigo, se observó un crecimiento de 2 semillas de 3 por cada materia y posteriormente se realizó un raspado de la tierra, logrando identificar semillas con colación marrón característico de este hongo como lo reporta Pabón-Villalobos y Castaño-Zapata, (2012).

El mayor porcentaje de incidencia de la enfermedad se presentó en las plantas provenientes de semilla tratada previamente con *F. oxysporum* con 94,44% de plantas marchitas, seguido por la concentración de 200 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ con 66,66%, similar a la incidencia en el testigo (Tabla 14); resultados similares los obtuvo Pabón-Villalobos y Castaño-Zapata, (2012) en su investigación en el Manejo de la Pudrición Radical de la Arveja (*P. sativum* Linneo) Causada por *F. oxysporum* Schlechtend.

En estudios similares como en el de Krolow *et al.*, (2006), se evaluó la actividad antifúngica del aceite de orégano contra el patógeno *P. infestans* encontrando que en 100 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ se redujo el crecimiento en un 59,84%, comparando datos de

investigación se puede evidenciar que el aceite esencial de orégano silvestre (*L. organoides* H.B.K) del Alto Patía, tiene un efecto mayor sobre este patógeno dado que en una concentración más baja (75 ppm equivalentes a $75 \mu\text{L.mL}^{-1}$) se logra inhibir completamente el crecimiento del patógeno, tal efecto se le atribuye al alto contenido de timol (Pantoja y Santacruz, 2011).

Celis *et al*, (2007) afirman que el aceite esencial de La planta *Lippia organoides* es rico en compuestos fenólicos como el timol, el cual exhibe propiedades antioxidantes, antifúngicas contra *Candida albicans* y *Candida tropicalis* y antibacteriales contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, además, ha sido evaluada su citotoxicidad en células Vero, concluyéndose que es un Aceite esencial no tóxico (Castañeda, 2007).

García *et al.*, (2006) evaluaron la actividad antifúngica del aceite de orégano sobre el hongo *Aspergillus flavus*, el cual presentó una inhibición completa con una concentración de $250 \mu\text{L.mL}^{-1}$ y una dosis mínima fungicida de $1000 \mu\text{L.mL}^{-1}$. Se realizaron estudios en invernadero dado que los aislamientos *Fusarium* 040 y *Fusarium* 041 fueron obtenidos de plantas de tomate con síntomas de marchitamiento vascular y de pudrición de corona y raíz respectivamente, cada uno constituye una forma especial f. sp. *radicis-lycopersici* y f. sp. *lycopersici*, respectivamente (Hibar et ál., 2007) por lo cual, se esperaba un comportamiento diferente de estos dos aislamientos de *F. oxysporum*. Sin embargo, en la prueba de patogenicidad no se encontraron diferencias en el ascenso del patógeno por el xilema de las plantas inoculadas. La presencia de Fu040 y Fu041 en los haces vasculares demostró que estos tienen la capacidad de penetrar las raíces y colonizar el xilema, en contraste con las cepas no patogénicas de *F. oxysporum* las cuales, se limitan a colonizar la corteza de las raíces y no alcanzan el sistema vascular de las plantas (Fravel et ál., 2003). Esto permitió confirmar la capacidad patogénica de los aislamientos Fu040 y Fu041 de *F. oxysporum*.

La aplicación en campo de T. koningiopsis Th003 formulado como gránulos dispersables y dentro de un programa de manejo integrado de la pudrición del cuello y de la raíz del tomate, redujo significativamente la mortalidad de plantas en un 35%, resultado muy importante para los productores dada la dificultad para controlar la enfermedad con fungicidas. Adicionalmente, la implementación del manejo integrado contribuye en la reducción del uso de fungicidas químicos, y por ende la reducción de los efectos nocivos sobre el medio ambiente y el hombre. En la investigación de Herrera y Laurentin 2012 titulada Evaluación de la esporulación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami* en dos medios de cultivo y dos metodologías de inoculación en ajonjolí (*Sesamum indicum*), una de las estrategias más efectivas en el control de hongos fitopatógenos es la obtención de cultivares resistentes, lo cual requiere de un protocolo de inoculación eficaz para la identificación de germoplasma que tenga este atributo. En todo procedimiento de inoculación se requiere contar con suficiente material que actúe como propágulo inicial. Los objetivos del presente trabajo fueron evaluar la producción de esporas

de *Fusarium oxysporum* f.sp. sesami sobre dos medios de cultivo, así como evaluar dos metodologías de inoculación de este hongo sobre ajonjolí. Las metodologías de inoculación consistieron en: i. enfrentar a las plántulas a una suspensión de esporas, ii. enfrentar a las plántulas a micelio y esporas mezclados con un sustrato en bandejas plásticas. El medio papa dextrosa agar permitió una producción 4 veces mayor de clamidosporas, 5 veces mayor de macroconidios y 2 veces mayor de microconidios que el medio SNA (agar bajo en nutrientes). En relación a las metodologías de inoculación, la primera resultó en un 100% de incidencia y una severidad de 0,91, considerándose esta como el promedio sobre 10 plántulas de la relación longitud de la lesión entre longitud de la plántula. La segunda metodología resultó en un 50% de incidencia y una severidad de 0,68. Siendo ambas metodologías efectivas en lograr la enfermedad en plantas de ajonjolí, se podría considerar la segunda como más adecuada debido a que sus condiciones son más parecidas a las que se dan en campo, estableciéndose interacciones entre el sustrato, el hongo y la planta.

8. CONCLUSIONES

El rendimiento de aceite esencial obtenido de *Lippia origanoides* colectado en la zona del Alto Patía mediante la técnica de arrastre por vapor en esta investigación fue de 3,4% siendo valores promisorios para la producción de éste a escala industrial.

La evaluación a nivel *in vitro* usado mediante la técnica de dilución en agar determinó que el valor de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de 400 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ de aceite esencial de orégano silvestre sobre el fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*.

La Técnica de Difusión en Agar con sensidiscos determina la concentración mínima inhibitoria (CMI) que para este trabajo de investigación fue de 400 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Los biopolímeros emulsificados a base de lecitina y goma arábiga desarrollados en las condiciones de la presente investigación, presentaron fenómenos de sedimentación, flotación y separación de fases, impidiendo desarrollar una estructura molecular estable capaz de contener el agente bioactivo (Aceite esencial de *Lippia origanoides* H.B.K).

El biopolímero emulsificado a base de Carboximetil-celulosa, aceite esencial de orégano silvestre y alginato de sodio ácido no afecta la emergencia de las semillas de arveja, los resultados obtenidos en esta investigación evidenciaron una respuesta en la velocidad de emergencia de las semillas con la aplicación del biopolímero que contiene el aceite esencial.

El ensayo en invernadero determinó la efectividad del Biofúngicida aplicado sobre las semillas de arveja se determinó con mejor tratamiento 800 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ de aceite esencial de orégano silvestre más Carboximetil-celulosa 0,3% (T2) disminuyendo la incidencia del fitopatógeno en un 100% en relación al testigo absoluto.

9. RECOMENDACIONES

De acuerdo a la investigación realizada con el aceite esencial de *Lippia origanoides* H.B.K se plantean las siguientes recomendaciones:

Los resultados obtenidos en esta investigación sean extrapolados aun cultivo experimental, al cual se le aplique el biofungicida de *L. origanoides* para determinar la eficiencia de este producto de síntesis biológica.

Desarrollar biopolímeros emulsificados con otras materias primas explorando a profundidad la capacidad de retención de aceites esenciales como respuesta a la volatilización y conservación de su efecto inhibitorio.

BIBLIOGRAFIA

Aballa, A. and Rosen, J. P. 2001. The effects of stabilized extracts of sage and oregano on the oxidation of salad dressings, *European Food Research and Technology* . 212: 551-560.

Acevedo, A. Martínez, J.R. Stashenko, E. 2009. Cromatografía de gases como herramienta de estudio de la composición química y capacidad antioxidante de especies vegetales ricas en timol y carvacrol, cultivadas en Colombia, *Scientia Chromatographica*, 1 (1), 67-78.

Acosta, J. y Eraso, C. 2012. Evaluación de diferentes cepas *Trichoderma* spp para control del amarillamiento en arveja *Pisum sativum* L. en Nariño. Tesis de grado para optar título de Ingeniero Agronomo, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Nariño. Pasto, Colombia.

Agrios, G (2001) *Plant Pathology* 4th Ed., Academic Press, San Diego, USA.

Arguello, H.; Lastres, L.; Rueda, A. 2007. Programa de Manejo Integrado de Plagas en America Central (PROMIPAC-ZAMORANO-COSUDE). (Ed). Manual MIP en cucúrbitas. Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria. Escuela Agrícola Panamericana, Honduras. 244 p.

Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49: 4168-4170.

Álvarez, David; Delgado, Derian; Hurtado, Andrés. Evaluación de la concentración efectiva cincuenta (EC50) del extracto de fique (*Fucrea macrophylla* Vent) sobre *phytophthora infestans* (Mont) de Bary. *Memorias XXXVII Congreso Nacional/Internacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología*. Mexico, 2010.

Arango B., O., Bolaños, F., Villota, O., Hurtado B., A., y Toro, I. (2012). optimizacion del rendimiento y contenido de timol de aceite esencial de orégano silvestre Retrieved por arrastre con vapor. (Español). *Biotechnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial* , 10 (2), 217-226.

Aveyard, P., Cheng, K. K., Almond, J., Sherratt, E., Lancashire, R., Lawrence, T., et al. (1999). A cluster-randomised controlled trial of an expert system based on the transtheoretical (“stages of change”) model for smoking prevention and cessation in schools . *British Medical Journal Clinical Research* Ed, 319:948–953.

Azcón, J., y Talón, M. *Fundamentos de fisiología vegetal*. 1ª Ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid: 2000, 261 p.

Balanta, J. F., Ramirez, L., & Bejarano, L. D. C. (2013). Características fisicoquímicas y actividad antimicótica del extracto de tomillo sobre cepas *Fusarium oxysporum*. *Ingenium*, 7(17), 29-35.

Barrera, L., García, L. 2008. Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium* sp. aislado de papaya (*Carica papaya*). *Revista UDO Agrícola* 8 (1), 33-41

Bassole, N., Quattara, S., Nibie, R., Quattara, AT., Abore, I y Traore, A. 2013. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevelieriana* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. *Phytochemistry*.

Baydar, H., Sagdic, O., Özkan, G. and Karadogan, T. 2004. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* with commercial importance in Turkey. *J. Food Control* 15, 169–172.

Beckman, C. and E. Roberts. 1995. On the nature and generic basis for resistance and tolerance to wilt diseases of plants. *Advanced Botanical Research* 24(3): 35-77.
Becker, H., Scher, J., Speakman, J. y Zapp, J. 2005. Bioactivity Guided Isolation of Antimicrobial Compounds from *Lythrum salicaria*. *Fitoterapia*;76 (6): 580-584.

Bermúdez, A. 1999. Enfoques Metodológicos para la Investigación Etnobotánica sobre plantas Medicinales. *Memorias del Instituto de Biología Experimental. Caracas. Venezuela*. 2: 3-6.

Beteta, B. B. (2002). Desarrollo y caracterización farmacocinética y farmacológica de nuevas formulaciones parenterales de anfotericina B (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid).

Beuchat, L.R. y Golden, D.A. 1989. Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technol.* 43(1): 134-142.

Bittner, M.; Aguilera, M.; Hernández, V.; Arbert, C.; Becerra, J.; Casanueva, M. Actividad Fungistática de Extractos de Aceites Esenciales de *Peumus boldus* Mol., *Laureliopsis philippiana* (Looser) Schodde y *Laurelia sempervirens* (Ruiz y Pav.) Tul. (*Monimiaceae* chilenas). *Chil J Agric Res.* Vol.69 (1):30-37. (2009)

Barnett, H. L. & Hunter, B.B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth Edition. Minnesota, USA: Burgess Publishing Company. p. 218.

Blanchard J., 2000. Los antimicrobianos naturales refuerzan la seguridad en los alimentos. Disponible en: <http://www.directoalpaladar.com/2006/10/28-los-antimicrobianos-naturales-refuerzan-la-seguridad-en-los-alimentos> [Consulta 28/Oct./2007]

Bolaños, A.; Villota, O. 2010. Estudio del proceso de extracción de aceite esencial de orégano silvestre del alto patia (*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

Bolívar, K., Sanabria, M. E., Rodríguez, D., de Camacaro, M. P., Ulacio, D., Cumana, L., & Crescente, O. (2009). Potencial efecto fungicida de extractos vegetales en el desarrollo *in vitro* del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. y de la antracnosis en frutos de mango. *Revista UDO Agrícola*, 9(1), 175-181.

Booth, C. 1977. *Fusarium* laboratory guide to the identification of the major species. CMI, Commonwealth Agricultural Bureaux, England. p. 58.

Botsoglou, N.A., Govaris, A., Botsoglou, E.N., Grigoropoulou, S.H. and Papageorgiou, G. 2003. Antioxidant activity of dietary oregano essential oil and g-tocopheryl acetate supplementation in long-term frozen stored Turkey meat. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2930–2936.

Botz, L., Nagy, S. y Kocsis B. 2001. Detection of Microbiologically Active Compounds. En: Nyiredy S, editor. *Planar Chromatography*. Hungary: Springer; p 489-516.

Braga, M.E.M.; Ehlert, P.A.D.; Ming, K.C.; Meireles, M.A.A.; Supercritical fluid extraction from *Lippia alba*: global yields, kinetic data, and extract chemical composition, *J. Supercrit. Fluids*, 2005, 34, p.p. 149-156.

Brayford, D. 1996. IMI descriptions of fungi and bacteria: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. *Mycopath.* 133: 39-40.

Buitrago, E J.Y., Duarte C.J. y Sarmiento, A. 2006. El cultivo de la arveja en Colombia. Federación Nacional de Cultivadores de Cereales y Leguminosas-FENALCE y Fondo Nacional Cerealista. Ed. Produmedios. Bogotá. Colombia. p. 83.

Burgess L W, A B Summerell, S Bullock, K P Gott, D Backhouse (1994) *Laboratory Manual for Fusarium Research*. 3rd ed. Sydney University. Sydney, Australia. 133 p.

Buriticá, P. 1999. Directorio de patógenos y enfermedades de las plantas de importancia económica en Colombia. Instituto Colombiana Agropecuario, ICA – Universidad Nacional de Colombia, Medellín. PRODUMEDIOS, Santafé de Bogotá. 329 p

Burt SA, Reinders RD, Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *LettAppliedMicrobiol.* 2003; 36: 162-167.

Burt, S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223–253.

Campina Melkunie B.V. Hogeweg 9 NL-5301 LB Zaltbommel, NL. Emulsiones de aceite-en-agua estables al calor estabilizadas mediante hidrolizados. Oficina española de patentes y marcas. 16.11.2000.

Castañeda, M. L. 2007. Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas colombianas. Tesis de Grado, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, 166 p.

Castaño-Zapata, J. 1998. Prácticas de laboratorio de fitopatología. Práctica (20). Segunda edición. Universidad de Caldas. Facultad de Ciencias gropecuarias. Departamento de Fitotecnia. Escuela Agrícola Panamericana. Departamento de Protección Vegetal. p 103.

Castaño-Zapata, J. & Salazar, H. 1998. Illustrated guide for identification of plant pathogens. Universidad de Caldas. Manizales, Colombia. p. 108.

Celis, C., Escobar, P., Isaza, J., Stashenko, E., Martinez, J. 2007. Estudio Comparativo De La Composición y Actividad Biológica de los Aceites Esenciales Extraídos de *Lippia alba*, *Lippia organoides* y *Phyla dulcis*, especies de la familia Verbenacea. *Scientia et Technica* Año XIII, 33(1): 102-105.

Cerpa, M. 2007. Tesis doctoral. Hidrodestilacion de aceites esenciales: modelado y caracterización. Universidad de Valladolid. Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente. Valladolid, 304 pg.

Charchar, M, Kraft JM (1989). Response of near-isogenic pea cultivars to infection by *Fusarium oxysporum* f sp pisi races 1 and 5. *Can J Plant Sci* 69, 1335-1346.

Chiriboga, X. (2009). Análisis Fitoquímico. Extraído el 11 de julio, 2010 de <http://ridimedchag.fq.edu.uy/chiriboga.pdf>.

Chomnawang, M., Surassmo, S., Nukoolkarn, V. y Gritsanapan, W. 2005. Antimicrobial Effects of Thai Medicinal Plants against Acneinducing Bacteria. *J Ethnopharmacol*;101(1,3): 330-333.

Clint, J.H. “Surfactant Aggregation”, New York, 1991, Chapman and Hall.

Colorado, J., Galeano, E. y Martínez, A. 2005. Detección de la actividad antimicrobiana de la esponja marina *Svenzeazeai* mediante bioautografía directa. *Actualidades Biológicas*; 27 (1): 145-146.

Corporación Colombia Internacional, CCI. 2000. Manual del exportador de frutas, hortalizas y tubérculos en Colombia. Consulta: Agosto 2011. <http://www.cci.org.co/>. Craveiro, A.A.; Alencar, J.W.; Matos, F.J.A.; Andrade, C.H.S.; Machado, M.I.L., Essential oils from Brazilian Verbenaceae genus *Lippia*, *J. Nat. Prod.*, 1981, 44, p.p. 598-601.

Cueto, M. 2010. Determinación del efecto inhibitorio del aceite esencial y diferentes extractos de orégano (*Lippiaberlandierischauer*) 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.

Dapcevic Hadnadev, T., Dokić, P., & Krstonošić, V. (2013). Influencia de la concentración de la fase de aceite sobre la distribución del tamaño de gota y la estabilidad de emulsiones de aceite-en-agua. *European Journal of Lipid Ciencia y Tecnología*, 313-321.

Davidson, P.M. 2001. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. En: *Food Microbiology: and Fundamentals and frontiers*, 2 Ed. Doyle MP, LR Beuchat, TJ Montville (Eds.). ASM Press, Washington, D.C., USA. Chap. 29: 593-627

Davidson, P.M. y Branen, A.L. (Eds.). 1993. *Antimicrobials in foods*. Marcel Dekker, Inc New Cork. Citado en: López-Malo, A.2000. La preservación multiobjetivo de Alimentos.

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

Dickinson E. 2003. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids* 17:25-39.

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

Dos Santos, F.; Lopes, A.; Cito, A.M., 2004. Composition and biological activity of essential oils from *Lippia origanoides* H.B.K., *J. Essent.OilRes.*, 16, p.p. 504-506. Durán, D.C., Estudio del aceite esencial de *Lippia alba* (Verbenaceae) y de los aspectos fisiológicos en diferentes etapas de su crecimiento bajo tres niveles de luz, Tesis de grado (Química), Universidad Industrial de Santander, 2005, p.p.22-25.

Dziezak J.D. A focus on gums. *Food Technology*, v.45, nº3, p.115 (1991)

Dickinson, E. (1992) "An Introduction to Food Colloids", Oxford, Oxford University Press

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". *MemInstOswaldo Cruz*, 105(2): 184-190

Estupiñán, H. & Ossa, J. 2007. Efecto del agente causal de la marchitez vascular de la uchuva (*Physalis peruviana* L.) el hongo *Fusarium oxysporum* Schlecht., sobre algunas solanáceas y otras especies cultivadas afectadas por formas especiales del microorganismo. Tesis de pregrado. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.

Everts, KL (2002). Reducción de las aplicaciones de fungicidas y la resistencia de acogida para la gestión de tres enfermedades en calabaza cultivadas en un cultivo de cobertura no laboreo. *enfermedades de las plantas*, 86 (10), 1134-1141.

Exarchou, V., Nenadis, N., Tsimidou, M., Gerothanassis, P., Troganis, A. and Boskou, D. 2002. Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage, and summer savory. *J. Agric. FoodChem.* 50, 5294–5299.

Federación Nacional de Cultivadores de Cereales y Leguminosas, FENALCE. 2010. El cultivo de la arveja, historia y su importancia. Consulta: Agosto de 2011. En línea: http://www.fenalce.org/arch_public/arveja93.pdf.

Federación Nacional de Cultivadores de Cereales y Leguminosas, FENALCE. 2002. Documento interno. Estadísticas de Producción Nacional. Bogotá, Colombia. p. 1.

Fellows, P. 2007. Propiedades de superficie; Escaldado. En: Fellows, P (ed.). *Tecnología del procesado de los alimentos: Principios y práctica*. Editorial Acribia, Zaragoza, España. 16-17, 277-286.

Fernández, O y Vega, L. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo integral de plagas (Costa Rica). N° 62:96-100 Bruna, A 1991. Producción de frutas y hortalizas para uso agroindustrial. Fundación Chile, Santiago. P 977

Fletcher P. D. I. y Horsup D. I., (1992) *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 88, 855

Frame, A.D., Rios-Olivares, E., De Jesús, L., Oríz, D., Pagan, J., and Mendez, S. 1998. Plants from Puerto Rico with anti-*Mycobacterium tuberculosis* properties. *Puerto Rico Health Science Journal* 17:243-252.

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 *Svenzeazeai*. [Tesis doctoral] Universidad de Antioquia.

Gamazo C, López-Goñi I, Díaz R. Manual práctico de Microbiología. Tercera Edición. Barcelona; Masson S. A.; 2005

Garcés de Granada, E., Orozco de Amézquita, M., Rocío, B. G., Valencia, H. 2001. *Fusarium oxysporum* El hongo que nos falta conocer. Acta Biológica Colombiana. Vol. 6. No. 1.

García, Barriga, H., Flora medicinal de Colombia. Tomo II, Tercer Mundo Editores, Bogotá, 1992, p.p. 506-507.

García, E., Quezada, M., Moreno, J., Sánchez, G., Moreno, E., Pérez, M. 2006.

“Actividad antifúngica de aceites esenciales de canela (*Cinnamomum zeylanicum* blume) y oregano (*Origanum vulgare* L.) y su efecto sobre la producción de aflatoxinas en nuez pecanera”. Revista mexicana de fitopatología. Obregon. Mexico

Garti N. y Reichman D. 1993. Hydrocolloids as food emulsifiers and stabilizers. *Food Structure* 12:411-426.

Garti N. y Leser M.E. 2001. Emulsification properties of hydrocolloids. *Polym. Adv. Technol.* 12:123-135.

Gonzales Villa Ángela Andrea. Obtención De Aceites Esenciales y Extractos Etanolicos de Plantas Del Amazonas. Universidad Nacional De Colombia Sede Manizales (2004).

Gómez, M. 2006. «Aceites esenciales contra hongos fitopatógenos» Revista Andalucía Investiga: http://www.andaluciainvestiga.com/espanol/revista/revista_2004.asp.

Gonzales, A. 2005. Ensayos de efectividad de fungicidas *in vitro* frente a hongos de suelo. Utilidad para el conocimiento de las resistencias y el establecimiento de una pauta terapéutica adecuada. *Phytoma España*. No 173. 15-16 págs.

Griffin, W.C (1965).—«Emulsions in: Encyclopedia of Chemical Technology».— Vol. 8: 117-154, Interscience Publishers, New York, London, Sydney

Guerrero López, A. (2012). Evaluación de aceites esenciales de *Lippia origanoides* en el control de hongos fitopatógenos (*Fusarium* sp., y *Colletotrichum* sp.) en el cultivo de ají cayena *Capsicum annuum* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira).

Gupta, P. M., 270 Plantas medicinales iberoamericanas, Santa Fé de Bogotá, Colombia, 1995, 617p.

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.

Hagedorn, D.J. 1991. Handbook of pea diseases. Madison, Wisconsin. En: <http://learningstore.uwex.edu/assets/pdfs/A1167.pdf>. 27p. Consulta: Agosto de 2011.

Haglund, W. and J. Kraft 2001. Fusarium wilt. p. 14-16. In: Kraft, J.M. and Pflieger, F.L. (eds.). Compendium of pea diseases and pests. The American Phytopathological Society Press, Minnesota, USA. 84 p.

Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J. Appl. Microbiol. 1999; 86 (6): 985-990.

Hernandez E., Lopez G y Garcia P. 2005. Evaluación de derivados carboximetilados del Alginato de sodio como superabsorbente. Revista Cubana de Química. Vol XVII. 3:239-240.

Hernández, F., Guerrero, E. y Sánchez, 2007. Abies, Inhibición del crecimiento Micelial de *Rhizoctonia solani*.

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

Humbolt A. Estudio del mercado nacional de los aceites esenciales, 2003, Biocomercio sostenible, Instituto de Investigación de Recursos Biológicos

Junter, G; Vinet, F. 2009. Compressive properties of yeast cell-loaded Ca.alginate hidrogel layers: comparison with alginate- CaCO₃ microparticle composite gel structures. Chemical Engineering Journal, 145, 514-521.

Kalembe, D. y Kunicka, A. (2003). Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry. Poland*, 10 pag 813-829.

Kabalnov A.S. (1998) "Coalescence in Emulsions in Modern Aspects of Emulsions Science", B.P. Binks (Editor), Cambridge, , RSC

Katime, J.R. Quintana, M Villacampa (2003), Revista Iberoamericana de Polímeros, 4, 123.

Kintzios, S. 2002. *Oregano, The Genera Origanum and Lippia*, Taylor and Francis, London.

Kistler, H. C. 1997. Genetic diversity in the plant- pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*. 87: 474-479

Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., Fakir, A. Ala, A. and Yildirim, A. 2005. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 53: 9452- 9458.

Kraft, J.M. y Roberts, D.D. 1969. Influence of soil water and temperature on the pea root rot complex caused by *Pythium ultimum* and *Fusarium solani* f. sp. *Pisi*. *Phytopathology* 59:149-152.

Krolow, V. Bauer, C. Costa, J. 2006. Efeito de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de *Phytophthora infestans* em batata. Resumos do I Congresso Brasileiro de Agroecologia Rev. Bras. de Agroecologia/ Vol. 1 No. 1.

Kulusic, 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.

Lee, S.; Najiah, M.; Wendy, W.; Nadirah, M. 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Syzygium aromaticum* flower bud (Clove) against fish systemic bacteria isolated from aquaculture sites. *Front. Agric. China*. 3:332-336.

Lemos, T., Matos, F., Alencar, J., Craveiro, A., Clark, A., y Micchesney, J. 1990. Antimicrobial activity of essential oils of brasillian plant. *Phytotherapy Research*, 4(2). 82-84p

Leslie, J. F., & Summerell, B. A. 2006. *The Fusarium laboratory manual*. lackwell Publishing, Ames, IA, U.S.A. p. 387.

Lifshitz M y V.V. Slezov, Zh. Ex. Teor. Fiz., 35, 479 (1958)

Lobo A, M. & Girard O, E.L. 1983. Arveja. En: Manual de asistencia técnica (28). Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Bogotá (Colombia). pp. 245-251

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

Luque de Castro, M.D.; Jimenez, M.M.; Fernandez, V. 2006. Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from plants. *Trends Anal. Chem*. 18: 708-716.

Malvick, D. and M. Babadoost. 2002. Root Rots of Pea: Report on Plant Disease 911 Urbana, IL University of Illinois Extension.

Mancuso J.R., McClements D.J. y Decker E.A. 1999. The effects of surfactant type, pH, and chelators on the oxidation of salmon oil-in-water emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 47(10):4112-4116.

Márquez, R. (2005). Obtención de emulsiones parenterales mediante el método de transición de fases. Universidad de los Andes, Laboratorio FIRP. Mérida, Venezuela.

Márquez, R. Dela Rosa, C. Mercado, A. 2007. Actividad antifúngica del extracto total de las hojas frescas de *Pedilanthus tithymaloides*. *Scientia et Técnica*. Mayo. N° 33.

Martinez, A. 2003. "aceites esenciales". Profesor facultad química farmacéutica. Universidad de antioquia. Medellín.

McClements D.J. 1999. Food emulsions. Principles, practice and techniques. CRC Press, Boca Raton, USA. 378 p.

McClements D.J. y Decker E.A. 2000. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *J. Food Sci.* 65(8):1270-1282.

McClements D.J. Decker E.A. y Weiss J. 2007. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *J. Food Sci.* 72(8):109-124.

McPhee K.E., Tullu A., Kraft J.M., Muehlbauer F.J.(1999): Resistance to Fusarium wilt race 2 in the *Pisum* core collection. *Journal of American Society of Horticulture Science*, 124: 28–31.

Meier U. 2001. Estadios de las plantas mono y dicotiledóneas. 2ª ed., Centro Federal de Investigaciones Biológicas para Agricultura y Silvicultura, Alemania.. 149 p.

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*. ObregonMexico. Vol 18

Morton, Atlas of medicinal plants of Middle América, Vol I, Springfield, Illinois, 1981, p.p. 745-750.

Moreno, M. A., Frutos, P. y Ballesteros, M. P. 2001. "Lyophilizedlecithinbasedoilwatermicroemulsions as a new and lowtoxicdeliverysystemforAmphotericin B". Pharm. Res.18(3): 344-351.

Muhammad, I., El Sayed, K.A., Mossa, J.S., Al-Said, M.S., El-Ferally, F.S. y Clark, A.M. 2000. Bioactive 12-Oleanene Triterpene and Secotriterpene Acids from *Maytenus undata*. J Nat Prod; 63: 605-610.

Nawar W.W. 1993. Lípidos. En: Fennema O.R. (ed). Química de los alimentos. Editorial Acribia, Zaragoza, España. 157-236.

Nemeskeri, E., & Győri, Z. (2005). Micronutrients and yield quality of pea (*Pisum sativum* L.) varieties susceptible to *Fusarium oxysporum*. Acta Agronomica Hungarica, 53(2), 211-222.

Ocaña, A. 2008. Alerta *Fusarium* raza 4 amenaza los cultivos. Disponible en: http://www.freshplaza.es/news_detail.asp?id=8711 Consultado en febrero 2010.

Olaya, J. M. *Et al.* Manual de extracción de aceites esenciales de plantas aromáticas. Banco de proyectos CORPOEDUAGRO. 35pg. Año 2000.

Oliveira, D., Leitaó, G. G. Bizzo, H. R. y Lopez, D.2005. Chemical and antimicrobialanalyses of essentialoil of *Lippia origanoides* H.B.K Departamento de productos.Naturais e Alimentos, Faculdade de Farma´cia – UFRJ, cetro de ciencias da sau de Bloco A 2º andar. Universidadde Federal de Rio de Janeiro. Ilha do funda´o, 21941-590, Rio de Janeiro, Brazil.

Ortuño Sánchez, Manual Práctico De Aceites Esenciales, Aromas Y Perfumes Edición Aiyana pág. 6, 8 (2006).

Osorio-Gutiérrez, L y Castaño-Zapata, J. 2011. Caracterización Del Agente Causante De La Pudrición De Raíces De La Arveja (*Pisum Sativum* Linneo), Enfermedad Endémica En El Municipio De Manizalescaldas (Colombia).

Pabón-Villalobos, J y Castaño-Zapata, J. (2012). Manejo de la Pudrición Radical de la Arveja (*Pisum Sativum* Linneo) Causada por *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: FR.

Padulosi, S. 1996. Orégano. Proccedings of the IPGRI Internacional Workshop on Orégano. Bari (Italia), 182 p.

Pantoja, D., Santacruz, L. 2011. Evaluación de la actividad antioxidante y antifúngica del aceite esencial de orégano Silvestre (*Lippia origanoides* Kunth) del alto Patia. Tesis pregrado. Universidad de Nariño. Facultad Ingeniería Agroindustrial. Pasto, Colombia.

Pascual, M. E.; Slowing, K.; Carretero, E.; Sanchez, D., and Villar, A., *Lippia*: Traditional uses, chemistry and pharmacology: a review, *J. Ethnopharm.*, 2001, 76, p.p. 204-214.

Prado L, (2008). "Evaluación agronómica de dos líneas de arveja (*Pisum sativum* L) y su efecto a la fertilización química y orgánica, en el Cantón Chimbo". Tesis de Ingeniero Agrónomo. Bolívar, Ecuador.

Rangel D., García I., Velasco J., Buitrago 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.*

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

Ra Ximhai Universidad Autónoma Indígena de México enero / abril Vol. 7 numero 1 2011.

Restrepo, R. L.J. 1991. Cultivemos la arveja. Coleccionable No.26. La Patria. Manizales. p.15.

Ribeiro H.S., Ax K. y Schubert H. 2003. Stability of lycopene emulsions in food systems. *J. Food Sci.* 68(9):2730-2734.

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.
Rodríguez Aida T., Daysi Morales y M. A. Ramírez, efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento *in vitro* de hongos fitopatógenos, *Cultivos Tropicales* 21(2):79-82, 2000.

Rodriguez, D y Zanabria, M. 2005. Efectos de los extractos de tres plantas silvestres sobre rhizoctoniosis, la mancha sureña del maíz y los patogenos que las causan. *INCI, dic.*, vol 30, no.12,p. 739-744. ISSN 0378-1844.

Rodriguez, N., Gallegos, J., Gonzalez, R., Ramos, M., Rodriguez, M., Reynosa, R., Rocha, A., Roque, M. 2007. Antioxidant effect of oregano (*Lippia berlandieri* v. Sahuer) essential oil and mother liquors. *Food Chem.* 102: 330-335.

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.

Rosero, G. A. 2008. Evaluación de cuatro cepas de *Trichoderma sp.* y sus combinaciones para el control de *Fusarium oxysporum* en Sandía (*Citrullus lannatus*). Proyecto especial presentado para optar al título de Ingeniero Agrónomo en el grado académico de Licenciatura. Honduras. 26 p.

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.

Salager, J. L. (1999b), Formulaci3n, composici3n y fabricaci3n de emulsiones para obtener las propiedades deseadas - Estado del arte - Parte B: Propiedades de las emulsiones y su medici3n, Cuaderno FIRP 747-B, Universidad de los Andes, Laboratorio FIRP. M3rida, Venezuela.

Salamanca, M. y Sanchez, M. 2009. "extraction y characterization de la oleoresin del or3gano (*Origanum vulgare*)". Trabajo de grado. Universidad tecnol3gica de pereira. Facultad de tecnolog3a: escuela de tecnolog3a qu3mica. Pereira. Colombia
Salguiero, L., Cavaleiro, C., Gonc, Alvess, M., y Cunha, A. 2003. Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Lippia graveolens* from Guatemala. *Planta M3dica.* 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

Salle, J. 1991. *Les Huiles Essentielles*, Frison-Roche, Paris.

Sanchez, F. 2006. Extracci3n de aceites esenciales. Experiencia Colombiana. II Segundo congreso internacional de plantas medicinales y aromáticas. Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira.

Santos, F. J. B., Lopes, J. A. D., Cito, A. M. G. L., Oliveira, E. H., Lima, S. G., & Reis, F. A. M. (2004). Composition and biological activity of essential oils from *Lippia organoides* H.B.K. *Journal of Essential Oil Research*, 16, 504–506.

Sañudo, B.; Arteaga, G.; Betancourth, C.; Coral, S.; Orozco, C. 2007. La arveja como opción competitiva en la Región Andina. Universidad de Nariño. San Juan de Pasto, 92 p.

Sañudo, B.; Checa, O.; Arteaga, G. 2001. Perspectivas para el desarrollo agrícola de la zona triguera de Nariño. Ed. Universidad de Nariño. Colombia: Pasto. 214p.
Schanebergand, B.T. and Khan, I.A. 2002. Comparison of extraction methods for marker compounds in the essential oil of lemon grass by GC. *J. Agric. Food Chem/ 50*, 1345–1349.

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

Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras, T. and Arsenakis, M. 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. *J. Agric. Food Chem/ 44*, 1202–1205.

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 ApplMicrobiol* 91, 1011–1022.

Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Rizner-hras, A., Simonic, M. and Knez, Z. 2005. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *J. Food Chem*. 89, 191–198.

Smith, S.N (2007). An overview of ecological and habitat aspects in the genus *Fusarium* with special emphasis on the soil-borne pathogenic forms. *Plant Pathology Bulletin*, 16: 97-120.

Soliman, K.M. and Badeea, R.I. 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food Chem. Toxicol.* 40, 1669–1675.

Stashenko, E. E.; Martinez, J. R.; Macku, C.; Shibamoto, T.; 1993. HRGC and GC-MS analisis of essential oil from Colombian ylang-ylang, *J.High Resotl. Chromatogr.*,16, p.p. 441-444

Stashenko, E.E.; Cervantes, M.; Combariza, Y; Fuentes, H.; Martinez, J.R., 1999. HRGC/FID and HRGC/MSD análisis of the secondary metabolites obtained by different extraction methods from *Lepechinia 146 schiedeana*, and *in vitro* evaluation of its antioxidant activity, *J. High.Resolut.Chromatogr.*, 22:(6), p.p. 343-349

Stashenko, E.; Ruíz, C.A.; Arias, G.; Durán, D.C.; Salgar, W.; Cala, M.; Martínez, M.R. 2010. *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS analysis and PCA. *J. Sep. Sci.* 33: 93-103.

- Stauffer, C.E. (1999). Emulsifiers (Eagan; St. Paul Minnesota) pag. 91.
- Tainter, D. and Grenis, A. 1993. *Spices and Seasonings; A Food Technology Handbook*, pp. 99–102, VCH, New York.
- Taiz, L.; Zeiger, E., Plant Physiology, 3^a ed., Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts, EE.UU., 2002, p.p.283-307.
- Tamayo, P.J. 2000. Enfermedades del cultivo de la arveja en Colombia: Guía de reconocimiento y control. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Corpoica, Fenalce, Sena y SAC. p. 49.
- Tomanova, V., Srokova, I., Malovikova, A., y Ebringerova, A. (2008). Surface-active and viscous behavior of HM-CMC in aqueous solutions. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 484, 238.
- Tanford C. 1980 “The hydrophobic effect. Formation of Micelles and Biological Membranes” (2^a edición), New York, Wiley
- Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M. and Polissiou, M. 2005. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chem.* 90, 333–340.
- Tu, J.C. 1987. Integrated control of the pea root rot disease complex in Ontario. *PlantDis.* 71 (1):9-13.
- Ultee, A., Bennik, M. and Moezelaar, R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1561–1568.
- Vale, T.G.; Furtado, E.C.; Santos, K.G.; Viana, G.S.B., Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, *Phytomed.*, 2002, 9, p.p. 709-714.
- Van de Braak S.A. and Leijten G.C.J.J. 1999. Essential Oils and Oleoresins: A Survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union. CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam, p. 116.
- Vele G, Milano B, Fernández A, Williams B, Michelangeli F (1999) Plantas medicinales recopiladas en la etnobotánica nacional y el uso herbal por la población Venezolana. *Memorias del Instituto de Biología Experimental (Caracas, Venezuela)* 2: 169-172.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J.A. 2007. Antifungal Activities of Thyme, Clove and Oregano Essential Oils. *J Food Safety* 27:91-101.

Wächter, R.G.A.; Valcic, S.; Franzblau, S.G.; Suarez, E.; Timmermann, B.N., Antitubercular activity of triterpenoids from *Lippia turbinata*, *J. Nat. Prod.*, 2001, 64, p.p. 37-41.

Zanandrea, I.; Juliano D.; Andréa, B.; Juliane, L. y Veridiana K. 2004. Atividade do óleo essencial de orégano contra fungos patogênicos do arroz: crescimento micelial em placas. Universidade Federal de Pelotas Departamento de Agronomia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*

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