

Aceite esencial de lippia alba y su efecto sobre colletotrichum gloeosporioides en frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.).

Essential oil of *Lippia alba* and effect of *Colletotrichum gloeosporioides* in guavas fruits (*Psidium guajava* L.)

Clemencia Guédez¹, Luis Cañazales¹, Carmen Castillo¹ y Rafael Olivar².

¹Universidad de Los Andes. Lab. Fitopatología y Control Biológico. NURR. ²MPPE. ETARZ. Adolfo Navas Coronado .

*Autor de correspondencia. Correo: cguédez@ula.ve

REUMEN

Colletotrichum gloeosporioides es un hongo post-cosecha que causan grandes pérdidas en la comercialización del fruto de guayaba. El control de esta enfermedad que comienza en la plantación, ha sido con productos químicos generando resistencia del hongo y contaminación al ambiente. Sin embargo, los aceites esenciales son una alternativa natural que ha resultado efectiva en el control microbiano. Se estudió la composición química del aceite esencial de ***Lippia alba*** y su efecto en el control de ***Colletotrichum gloeosporioides***. Se encontraron 21 componentes químicos de los cuales los mayoritarios fueron carvona y limoneno, así mismo, se determinó que a partir de la concentración del aceite de 0,75 mg/mL la inhibición del crecimiento micelial fue del 100% y, la concentración de 0,25 y 0,50mg/mL fue de 74,29% y 60% respectivamente; con un porcentaje de germinación de 9,4% y 6,4%. Este resultado evidencia que el aceite esencial de ***L. alba*** representa una alternativa viable para el control de este patógeno post-cosecha.

Palabras clave: Hongos postcosecha, ***Verbenaceae***, control natural.

ABSTRACT

Colletotrichum gloeosporioides is a postharvest fungi cause losses in marketing guava fruit. The control of this disease that begins in the plantation has been generating chemical resistance of the fungi and contamination environment. Essential oils are a natural alternative that has proven effective microbial control. The chemical composition of essential oil of ***Lippia alba*** and its effect in controlling were studied and 21 chemical components of which the majority were carvone and limonene, so that it was determined from the concentration of 0.75 mg oil / mL inhibition of mycelial growth is 100%, and concentration of 0.25 and 0,50mg / mL was of 74.29% and 60% respectively; with a germination percentage of 9.4% and 6.4%. This result

shows that the essential oil of *L. alba* represents an alternative for the control of this pathogenic postharvest.

Key words: postharvest, Verbenaceae, natural control.

INTRODUCCION

El guayabo (*Psidium guajaba* L.) es una planta de la familia de las mirtáceas, originario de América Tropical, en donde se encuentra tanto en forma silvestre como cultivada desde México hasta Brasil. El género *Psidium*, al cual pertenece la guayaba consta de unas 150 especies y algunas han sido estudiadas y seleccionadas para mejorar la calidad y aumentar la productividad (Mani *et al.*, 2011). El uso popular de la guayaba en productos elaborados tales como néctar, jugo, conservas, mermeladas, fruta en almíbar, alimentos para niños, refrescos, lácteos y panadería, la convierten en una de las frutas favoritas de miles de millones de personas en todo el mundo, particularmente en los trópicos y en los sub-trópicos cálidos y se están volviendo cada vez más notorias en los mercados de Europa y América del Norte (Pérez-Gutierrez *et al.*, 2008; Vieira *et al.*, 2008; Singh, 2011).

En Venezuela se cultiva mayormente en el estado Zulia, reportándose para el año 2000 como la zona más productora del país (Ministerio de Comercio, 2000). Sin embargo, el cultivo del guayabo se ha desplazado hacia la Costa Oriental (municipio Baralt) y Sur del Lago de Maracaibo, motivado a la problemática fitosanitaria que ha enfrentado en los últimos años, lo cual, ha conllevado a la disminución significativa de su producción comercial que para los años entre 1980-1997 presentaba su mayor repunte (Urdeneta, 2008). Entre las principales enfermedades en pre y post-cosecha que se han identificado en este cultivo de la zona, se encuentra la mancha marrón o antracnosis causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Bravo *et al.* 2005; Urdeneta *et al.* 2009); esta enfermedad ha tenido alta incidencia en zonas destinadas a la comercialización de guayabas y ha ocasionado aproximadamente un 40% de pérdidas económicas reflejadas en la etapa de post-cosecha o mercado; lo que hace inferir que el control químico se ha vuelto ineficaz para el manejo de este patógeno.

El uso reiterativo y cada vez en mayores dosis de agroquímicos para el control de esta enfermedad ha traído como consecuencia la resistencia de los patógenos y la contaminación del ambiente y seres humanos. En esta perspectiva, es una necesidad la utilización de otros métodos de control que sean eficientes y menos contaminantes. Dentro de las alternativas se encuentra la utilización de aceites esenciales que poseen propiedades antifúngicas y antimicrobianas. Los aceites esenciales de plantas son productos de alto valor comercial en el mercado mundial por sus múltiples aplicaciones en la industria de fragancias, aromas, medicamentos y otros productos con diferentes usos químicos como biocidas, principalmente antibacteriales y antifúngicos (Bandoni, 2002).

Dentro de esta perspectiva, el aceite esencial de *L. alba* está compuesto principalmente por dos tipos de compuestos químicos, los terpenoides y los fenilpropanoides (Hennebelle *et al.*, 2008; Hennebelle *et al.* 2006); Los aceites

esenciales de este género muestran un amplio espectro de actividades biológicas contra bacterias, hongos, parásitos, virus e insectos (Escobar *et al.*, 2010; Meneses *et al.*, 2009; Mesa-Arango *et al.*, 2009; Olivero *et al.*, 2009). Algunas especies de ***Lippia*** han revelado actividad contra hongos fitopatógenos (Deka *et al.*, 2010; Linde *et al.*, 2010; Regnier *et al.*, 2010).

En Venezuela, es reciente el uso de extractos y aceites esenciales y existen pocas referencias bibliográficas relacionadas con la utilización de aceites esenciales como antimicrobianos. En su mayoría, los estudios con plantas de orégano silvestre (***L. organoides***) existentes son con extractos acuosos o etanólicos. Rodríguez y Sanabria, (2005) evaluaron el efecto del extracto etanólico (EE) de esta planta para el control ***Rhizoctonia solani*** y ***Bipolaris maydis*** inhibiendo el crecimiento micelial. Bolívar *et al.* (2009) evaluaron los EE de ***Azadirachta indica***, ***Phyllanthus niruri***, ***Calotropis procera***, ***L. organoides***, ***Gliricidia sepium*** y ***Heliotropium indicum*** para el control de ***Colletotrichum gloeosporioides*** en frutos de mango (***Mangifera indica***) a una concentración de 2,5%; los EE de ***L. organoides*** y ***G. sepium*** redujeron la enfermedad en los frutos, en un 37% y 33% respectivamente. Vargas *et al.* (2009) evaluaron los EE de ***H. indicum***, ***L. organoides***, ***Ricinus communis*** y combinaciones de estos, para controlar la Sigatoka negra en plantas de plátano y encontraron que todos los extractos mostraron potencial antifúngico contra la enfermedad. Guédez *et al.* (2014) encontraron que el aceite esencial de ***Citrus sinensis*** es efectivo para controlar hongos post-cosecha en frutos de lechosa (***Carica papaya*** L.)

Las investigaciones referenciales sobre aceites esenciales en el manejo de enfermedades en la producción agrícola realizadas por investigadores a nivel mundial nos señala que este aceite esencial controlará la antracnosis en frutos de guayabo. El objetivo de esta investigación fue determinar la composición química de ***Lippia alba*** y su efecto sobre el hongo post-cosecha ***Colletotrichum gloeosporioides*** en frutos de guayaba.

MATERIALES Y METODO

1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL HONGO POST-COSECHA

Colletotrichum gloeosporioides.

El aislamiento de ***Colletotrichum gloeosporioides*** se realizó de frutos de guayaba que fueron cosechados en estado de madurez fisiológica en una plantación de guayabo en el municipio Baralt, se almacenaron hasta la aparición de síntomas de la enfermedad antracnosis. Para lo cual, se tomaron fragmento (1cm²) de tejido enfermo de epicarpio del fruto, previamente desinfectado con una solución de hipoclorito de sodio al 2 % durante 3 minutos y fueron colocados en medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA) para su crecimiento e identificación. La identificación del hongo se realizó a los 7 días de crecimiento en PDA, mediante preparados microscópicos con lactofenol y utilizando las claves de Barnett y Hunter (1986) y Hyde *et al.* (2009).

2. EXTRACCIÓN Y RENDIMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL DE ***Lippia alba***.

El material vegetal utilizado para la extracción del aceite esencial, fue procedente de plantas de la parroquia Cuicas municipio Carache estado Trujillo,

Venezuela. La muestra utilizada estuvo conformada por hojas, flores y tallo, (se cambió) las cuales, fueron pesados en una balanza digital (capacidad 3 kg) y seleccionados de forma manual manteniendo su homogeneidad y representatividad (frescura y color uniforme), posteriormente el material vegetal fue cortado finamente (1cm aproximadamente) y colocada en envases plásticos para su posterior utilización.

La extracción del aceite se realizó a través del método de hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHD), empleando un equipo de destilación, tipo Clevenger, con depósito de destilación y adaptación para calentamiento por radiación de microondas convencional, LG modelo MS1149SQP, con una potencia de salida de 800 vatios y frecuencia de radiación de 2,5 GHz. La mezcla aceite/agua obtenida se separó por decantación y fue almacenado en botellas de color ámbar de 10 ml, para posterior análisis químico. El rendimiento del AE (% p/p) se determinó mediante la fórmula: $P = (M1/M2)*100$ Donde: $M1$ es la masa final del aceite esencial; $M2$ la masa inicial del follaje; y 100 es un factor matemático.

3. DETERMINACIÓN DE LOS COMPONENTES QUÍMICOS DEL ACEITE ESENCIAL DE *Lippia alba*.

La identificación de los componentes presentes en el aceite esencial de *Lippia alba* se realizó por cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas, en el Centro de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. El aceite fue analizado en un Cromatógrafo de Gases acoplado a un Espectrómetro de Masas (GC-MS) Hewlett-Packard modelo 6890 serie II, provisto de una columna capilar HP-5 de 30 m de largo y 0.25 mm de diámetro interno. La identificación de los componentes de los aceites se realizó a través de la base de datos computarizada (Librería Wiley MS, 6ª ed.), confirmada por determinación de los Índices de Kovats (Adams, 1995), análisis que se llevó a cabo en un Cromatógrafo de Gases Perkin Elmer, modelo Autosystem, provisto igualmente de una columna HP-5 de 30 m de largo y utilizando un programa de temperaturas similar. El cálculo de los Índices de Kovats se realizó comparando los tiempos de retención de los componentes de cada aceite esencial con los tiempos de retención de una serie C-7 a C-22 de n-alcános, aplicando el programa Kovats-40.

4. EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Lippia alba* SOBRE EL CRECIMIENTO MICELIAL Y GERMINACIÓN DE *Colletotrichum gloeosporioides*.

4.1. *Crecimiento micelial*: El efecto del aceite esencial fue evaluada a través del crecimiento micelial y germinación del hongo *C. gloeosporioides*, utilizando el método de Costa Da Silva *et al.* (2012) con pequeñas modificaciones. Las concentraciones utilizadas de aceite esencial fueron de 0, 0,25, 0,5, 0,75, 1,0 y 1,5 (mg/mL), agregando tween 80 y diluida en medio de cultivo PDA a una temperatura de 40°C, y se pasó a cajas de Petri esterilizadas. Luego de 3 horas y solidificado el medio de cultivo, se procedió a colocar un disco de 0,5 cm de diámetro del micelio del hongo

C. gloeosporioides. Como control se utilizó medio de cultivo sin aceite esencial (0 ìl/L).

A partir de las 24 horas del crecimiento del hongo **C. gloeosporioides** a las condiciones establecidas, se realizó las mediciones del diámetro de crecimiento por 15 días y se calculó el porcentaje de inhibición.

$$\% I = 1 \left[\left(\frac{\emptyset \text{ Crecimiento micelio tratado}}{\emptyset \text{ Crecimiento micelio control}} \right) \right] \times 100 \quad (\text{Fórmula Manici et al, 1997}).$$

Donde: % I: Porcentaje de inhibición. \emptyset Diámetro micelio tratado: Crecimiento del hongo en las concentraciones de aceite esencial de **Lippia alba** en medio de cultivo PDA. \emptyset control en medio de cultivo PDA.

El diámetro de crecimiento del hongo se midió diariamente para cada tratamiento hasta los 9 días. Se realizaron cuatro repeticiones por cada tratamiento.

4.2. Germinación de conidios: Se colocó una capa de aproximadamente 3mm de grosor de medio de cultivo Agar-agua y aceite esencial de **Lippia alba** de acuerdo al tratamiento en las mismas concentraciones que para el estudio del crecimiento micelial en cajas de Petri, y se dejó solidificar a temperatura ambiente ($27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), 3 horas después se cortaron cuadrados 1,5 x1,5 cm en la cámara de aislamiento, los cuales, fueron colocados (puestos) en portaobjetos previamente esterilizados, inmediatamente se puso una alícuota de 10 ìl de suspensión de conidios con concentración de 2×10^4 conidios/mL que se entendió uniformemente. La primera evaluación se realizó a los 20 m (minutos), luego a los 40 m, a los 60 m (1 hora) y cada 2 h hasta las 8 h, otro conteo se realizó a las 24 y 48 h, se contaron 100 conidios por evaluación.

La cantidad de conidios germinados de los tratamientos fueron comparados con la cantidad del control absoluto y relativo (fungicida). Se consideraron conidios germinados aquellos donde el tamaño del tubo germinativo es igual o mayor que el tamaño del conidio.

La mejor dosis de aceite esencial que inhibe el crecimiento y la germinación de **C. gloeosporoides**, se determinó a través de un diseño completamente al azar, (Para la germinación de conidios se evaluó un análisis de medidas repetidas en el tiempo). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de medias Dunnett y Tukey entre los tratamientos, usando el programa SAS versión 9.3.1.

RESULTADOS Y DISCUSION

1. IDENTIFICACIÓN DE **Colletotrichum gloeosporioides** PROCEDENTES DE FRUTOS DE GUAYABA.

El color de las colonias del hongo en medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA) varía desde color blanco a rosado pálido, el micelio es ralo de consistencia semi-algodonosa y borde irregular; estas características macroscópicas, junto con el estudio microscópico relacionado con el tamaño de las conidios que osciló de 10 a 17 μm de largo y de 2 a 4 μm de ancho, conidios rectos y cilíndricos con

extremo redondeado, respaldado con las claves nos llevan a identificar el hongo como ***Colletotrichum gloeosporioides*** (Figura 1). Montero *et al.* (2010), Correa *et al.* (2007) encontraron características similares de las colonias de ***C. gloeosporioides*** y concluyeron que estos caracteres morfológicos son buenos descriptores de la diversidad del hongo (Montero *et al.*, 2010). La variabilidad en la coloración de los aislamientos del hongo ***C. gloeosporioides*** es considerada normal y ha sido registrada por Vinnere (2004) y Wharton y Dieguez (2004).



Figura 1. A. Antracnosis en frutos de guayaba. B y C. Colonia y conidios del hongo ***Colletotrichum gloeosporioides*** en PDA (40X).

2. EXTRACCIÓN Y RENDIMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Lippia alba*.

La extracción del aceite por hidrodestilación asistida por microondas se realizó en 25 min, y se obtuvo un rendimiento de 0,8%. Por su parte, Stashenko *et al.*, (2004) encontraron que el método de extracción puede afectar el rendimiento y la composición química del aceite esencial de ***Lippia alba*** y reportan rendimientos de 0,7% cuando se extrae aceite de ***L. alba*** por el método de hidrodestilación asistida por microondas en un tiempo de 30 minutos.

Senatore y Rigano (2001) analizaron aceites esenciales de dos especies de ***Lippia*** en Guatemala y encontraron que el rendimiento de ambas especies oscila entre 0,1% y 1,2%. Stashenko *et al* (2014), demuestran que el rendimiento del aceite esencial de ***L. alba*** depende del quimiotipo (Compuesto químico predominante) y según el registro nacional herbario colombiano el rendimiento para el quimiotipo carvona-citral es de 0,4% y del quimiotipo carvona es de 0,8%. Por otro lado, Delgado-ospina (2015) afirma que el contenido de aceites esenciales en una planta, es variable y depende principalmente de su metabolismo secundario, y en algunas especies se ha encontrado un contenido de hasta el 8 % en condiciones óptimas de extracción.

3. COMPONENTES QUÍMICOS DEL ACEITE ESENCIAL DE *Lippia alba*.

Se encontraron un total de 21 componentes químicos en el aceite esencial de ***L. alba*** y los principales componentes del aceite esencial con mayor porcentaje fueron: carvona (36,6%), Limoneno (29,2%), Bicyclosesquifelandreno (11,4%), Neral (10,3%), Geranial (6,5%), piperatenona (6,1%), piperitona (2,8%) y â-bourboneno (1,2%) (Tabla 1). Final del formulario

La especie *Lippia alba*, de la familia Verbenaceae, resulta de gran interés por la diversidad química de los metabolitos secundarios volátiles, presentes en sus aceites esenciales, y la variedad de usos botánicos y etnofarmacológicos (Hennebelle *et al.*, 2008). La composición química de los aceites esenciales obtenidos de *L. alba* dependen de factores geobotánicos, de las condiciones de cultivo, la edad y la parte de la planta empleada para la extracción y, del proceso de extracción (Castro *et al.*, 2002).

La calidad de los aceites esenciales está definida por la relación porcentual de cada uno de sus componentes, y existen factores como el contenido de humedad al momento de extracción que afectan la composición química de los aceites esenciales de *Lippia alba* y *L. origanoides*, el porcentaje del rendimiento y el componente mayoritario aumenta con el secado del material vegetal en estas especies de *Lippia* (Delgado-Ospina *et al.*, 2016) y existen factores como las variaciones de clima, suelo, época de cosecha, características genéticas de la planta, condiciones de secado y tiempo de almacenamiento que afectan la calidad de estos aceites (Montanari *et al.*, 2011); asimismo, el método de extracción utilizado genera cambios en el número y porcentaje de los componentes químicos en aceites esenciales (Stashenko *et al.*, 2004; Arango *et al.*, 2012).

Tabla 1. Composición química del aceite esencial de *Lippia alba*

Compuesto	Tipo	DB-5MS	DB-WAX	Cantidad Relativa %
β -Miraceno	MH	988	1241	0,6
p -cimeno	MH	1029	1250	0,2
Limoneno	MH	1034	1200	29,2
trans- β -Ocimeno	MH	1048	1253	0,3
Linalol	MO	1101	1553	0,3
trans- p -Menta-2,8-dien-1-ol	MO	1127	1580	0,4
cis-óxido de limoleno	MO	1138	1350	0,2
Borneol	MO	1182	1709	0,5
cis-Dihidrocarvona	MO	1204	1517	0,3
trans-Dihidrocarvona	MO	1212	1537	0,3
Neral	MO	1247	1589	10,3
Carvona	MO	1253	1732	36,6
Piperitona	MO	1264	1641	2,8
Geranial	MO	1277	1741	6,5
Piperitenona	MO	1350	1842	6,1
β -Bourboneno	SH	1396	1517	1,2
β -Gurjuneno	SH	1444	1447	0,3
γ -Gurjuneno	SH	1476	2210	0,1
Biciclosesquifelandreno	SH	1494	1624	11,4
Biciclogermacreno	SH	1510	1750	0,1
Culebol	SO	1529	1855	0,2

4.EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Lippia alba* SOBRE EL CRECIMIENTO MICELIAL Y LA GERMINACIÓN DE *Colletotrichum gloeosporioides*.

4.1. Crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* en diferentes concentraciones de aceite esencial de *L. alba*.

El aceite esencial de *L. alba* mostró actividad antifúngica frente a *C. gloeosporioides*, inhibiendo el crecimiento en un 100% a partir de concentración de 0,75 mg/mL, inhibición de 60,0% y 74,29% con las concentraciones de aceite esencial de 0,25 y 0,50 respectivamente (Tabla 2), el análisis de regresión del crecimiento micelial confirma la inhibición del crecimiento micelial de 100% con concentraciones superiores a 0,75 mg/mL, como lo indica la ecuación lineal (Figura 2). Los resultados muestran que conforme disminuye la concentración de aceite también disminuye la inhibición de los microorganismos.

Al comparar los tratamientos con el control (prueba Tukey) se diferencian 4 grupos, donde: Grupo I: 0,0 mg/mL (Control); grupo II: 0,25 mg/mL; grupo III: 0,5 mg/mL; 0,75 mg/mL y 1,0 mg/mL y grupo IV:1,5 mg/mL.

Tabla 2. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* por el aceite esencial de *L. alba* en diferentes concentraciones.

Concentración de AE (mg/mL)	Inhibición micelial	
	%	Tukey
0,0 (Control)	0	a
0,25	60,00	b
0,5	74,29	bc
0,75	100	c
1,0	100	c
1,5	100	c

Letras diferentes presentan diferencias significativas según Tukey (p<0,05).

Glamoèlija et al. (2011) demostraron que el aceite esencial de *L. alba* tiene actividad antifúngica con una concentración mínima inhibitoria (MIC, de la sigla en Inglés) en el intervalo de 0,300–1,250 mg/ mL y una concentración fungicida mínima (MFC, de la sigla en Inglés) en el intervalo de 0,600–1,250 mg/ mL. Por otra parte, el agente fungicida comercial Ketoconazol mostró MIC en un intervalo de 0,025– 0,500 mg/mL y MFC en un intervalo de 0,250–0,100 mg/mL. Otro agente fungicida, el Bifonazol, con menor actividad antifúngica, tuvo un MIC de 0,100– 0,200 mg/mL y MFC de 0,200–0,250 mg/mL. Shukla *et al.* (2009) informaron que el aceite esencial de *L. alba* ha causado 100% de inhibición del crecimiento de 9 hongos en 17 ensayados. No obstante, cuando se evaluó el geranial o neral aislado de este aceite esencial, causó 100% de inhibición del

crecimiento en 13 y 2 hongos en 17 ensayados, respectivamente. Por lo tanto, el geranial parece ser el principal componente fungicida del aceite esencial de *L. alba*.

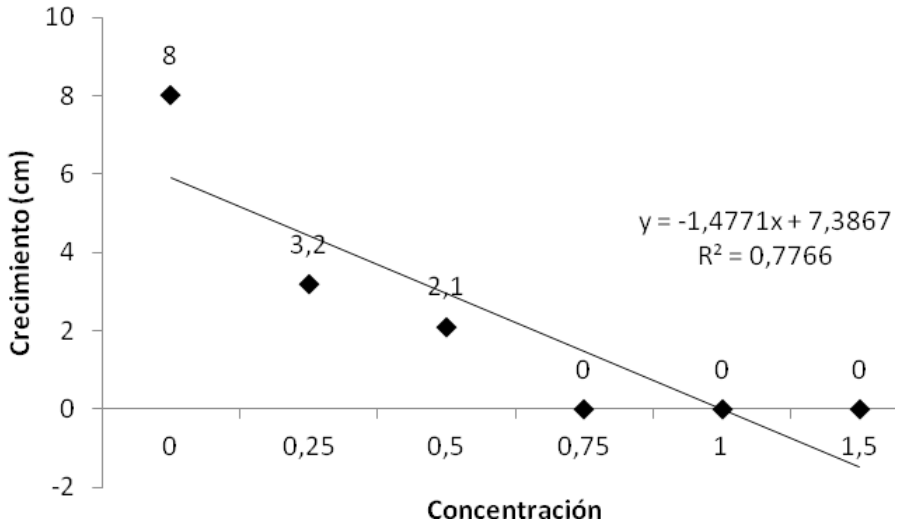


Figura 2. Efecto de diferentes concentraciones (0-1 mL/mL) de *L. alba* en el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* a los 9 días de incubación, a 27±1°C.

La actividad antifúngica general de aceites esenciales está bien documentada y se han realizado algunos estudios sobre los efectos de los aceites esenciales sobre los patógenos de post-cosecha. Se cree que estos aceites esenciales para desempeñar un papel en los mecanismos de defensa de las plantas contra los microorganismos fitopatógenos. La mayoría de los aceites esenciales han sido reportados para inhibir los hongos después de la cosecha en condiciones in vitro y el efecto informado de dieciocho aceites esenciales contra patógenos de frutas después de la recolección. El aceite de tomillo demostró ser el mejor inhibidor contra todos los patógenos probados, como *Lasodiopodia theobromae*; *Colletotrichum gloeosporioides*; *citrii Alternaria*; *Penicillium digitatum*; *B. cinérea* (Prakas y Sharma, 2013). Principio del formulario

Se han utilizado diferentes aceites esenciales de plantas muy efectivos, los cuales, inhiben el crecimiento micelial del hongo *C. gloeosporioides*. Carnelossi *et al.* (2011) evaluaron el efecto in vitro del aceite de *Cimbopogon citratus*, *Eucaliptus citriodora* y *Mentha arvensis* sobre el hongo *C. gloeosporioides* y observaron inhibición total del crecimiento de este patógeno. Por su parte, Combrick *et al.* (2011) encontraron que aceite esencial de *Cimbopogon citratus* inhibe el crecimiento de *C. gloeosporioides*, *Penicillium digitatum* y *Alternaria citrii*.

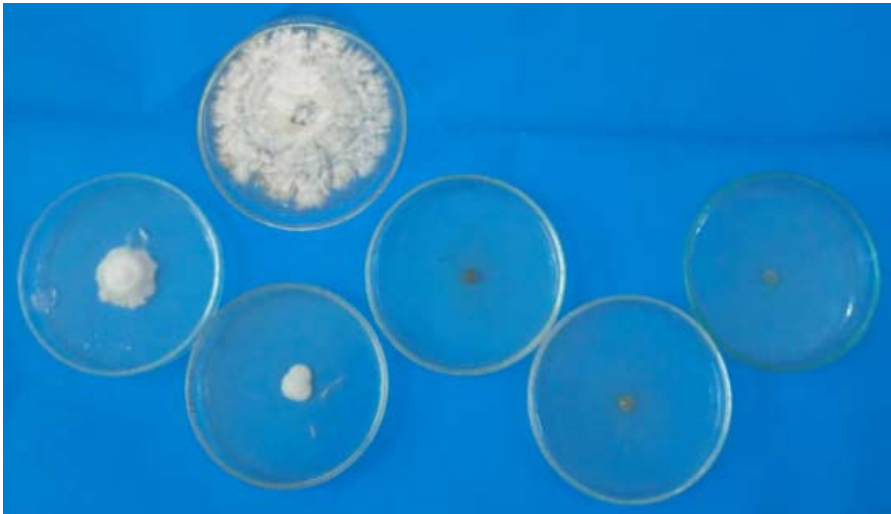


Figura 3. Actividad antifúngica de diferentes concentraciones del AE de *L. alba* sobre *C. gloeosporioides* a los 12 días de incubación, a $27\pm 1^\circ\text{C}$.

Rozwalka *et al.*, (2008) observaron inhibición total del crecimiento micelial de *Glomerella cingulata* y *C. gloeosporioides* aislados de frutos de guayaba, utilizando vapor de aceite esencial de *Zyzygium aromaticum* después del quinto día. Asimismo, Barrera-Necha *et al.*, (2008) verificaron la eficiencia de los aceites esenciales de *Cinnamomum zeylanicum* a 50, 100, 150, 200 y $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ sobre la germinación de conidios de *C. gloeosporioides* aislado de *Carica papaya L.*, con inhibición superior a 98%.

Souza-Junior *et al.* (2009), evaluaron el efecto fungitóxico de aceites esenciales de *Lippia sidoides*, *Ocimum gratissimum*, *Lippia citriodora*, *Cymbopogon citratus* y *Psidium guajava var pomifera* sobre *C. gloeosporioides* en condiciones *in vitro* incorporado a medio agar agua y PDA a partir de una concentración de $1\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$, e inhibieron totalmente la germinación de conidios y el crecimiento micelial, excepto el AE de *Psidium guajava var pomifera*.

Se han utilizado gran cantidad de aceites esenciales de plantas aromáticas para controlar el hongo *Colletotrichum* han demostrado ser muy efectivos, en este contexto, Vivas *et al* (2006), encontraron que el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* inhibe el 100% del crecimiento micelial de *Colletotrichum acutatum* en concentraciones superiores a $100\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$.

4.2 GERMINACIÓN DE CONIDIOS DE *C. gloeosporioides* EN FUNCIÓN A LA CONCENTRACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE *L. alba*.

La germinación de conidios de *C. gloeosporioides* en diferentes tratamientos con aceite esencial de *L. alba* y fungicida químico presentó diferencias significativas ($P < 0,05$) para las diferentes concentraciones, nos indica que la efectividad del AE es diferente con un 95% de confiabilidad.

Todas las concentraciones del AE evaluadas inhibieron la germinación de conidios de *C. gloeosporioides*. En las concentraciones de 0,25, 0,5, 0,75, 1 y 1,5 mg/mL la germinación de conidios fue de 9,6%, 6,4% respectivamente y a partir de la concentración de 0,75 mg/mL no germinaron los conidios, lo que demuestra gran efectividad de este AE sobre el hongo *C. gloeosporioides*, la cual, puede estar relacionada con la presencia de carvona como componente mayoritario.

La influencia de la variable tiempo resultó significativa ($Pd^{>0,05}$), lo que nos indica que la germinación de conidios es diferente a medida que transcurre el tiempo. Cuando se estudia la interacción Tratamiento x tiempo, el análisis detecta diferencias significativas ($Pd^{>0,05}$), esto sugiere que ambos afectan la germinación de conidios (Figura 2).

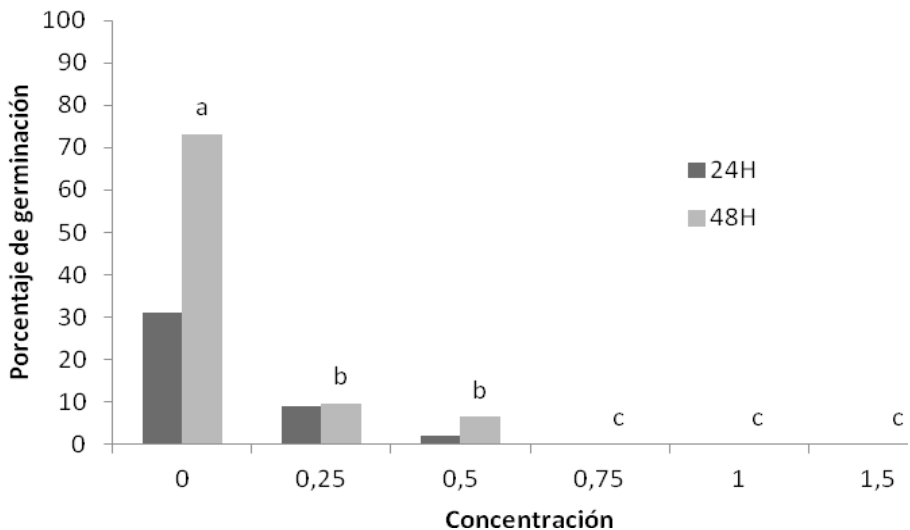


Figura 4. Porcentaje de germinación de conidios de *C. gloeosporioides* en diferentes concentraciones de AE de *L. alba*, a las 24 y 48 horas. Letras diferentes presentan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos (Tukey).

Baser (2008) y Suntres *et al.* (2015), estudiaron el efecto de la edad de las plantas de *L. alba* y *L. origanoides* y su composición química de los aceites esenciales y, sostienen que el carvacrol es responsable de la actividad biológica sobre microorganismos en concentraciones bajas, por lo que consideran que representan un gran potencial como antifúngicos, así como para otras aplicaciones clínicas.

CONCLUSIONES

El aceite esencial de *Lippia alba*, procedente de Cuicas, Carache estado Trujillo, con su componente mayoritario Carvona, representa una alternativa de control del hongo post-cosecha *Colletotrichum gloeosporioides* en frutos de guayaba a concentraciones bajas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHTA) de la Universidad de Los Andes por el financiamiento de este trabajo a través del proyecto Código: NURR-C-562-12-01-B.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, R.P. (1995). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL.
- Arango, O.; Bolaños, F.; Villota, O.; Hurtado, A.; y Toro, I. 2012a. Optimización del rendimiento y contenido de timol de aceite esencial de orégano silvestre obtenido por arrastre con vapor. Biot. Sector Agrop. Agroind. 10(2):217-226.
- Bandoni, A. (2002). Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica. Ciencia y Tecnología para el Desarrollo CYTED. Editorial de la Universidad Nacional de la Plata, La Plata - Argentina.
- Barnet, H. L. y Hunter B. B. (1986). Illustrated genera of imperfect fungi. Cuarta edición. Minesota. APS. Press. 218 p.
- Barrera-Necha, L. L., Bautista-Baños, S., Flores-Moctezuma, H. I. y Rojas-Estudillo, A. (2008). Efficacy of essential oils on the conidial germination, growth of *Colletotrichum gloeosporioides* (penz.) Penz. And Sacc. and control of postharvest diseases in papaya (*Carica papaya* L.). Plant Pathology Journal 7 (2): 174-178.
- Baser, K.H. (2008). Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. Curr Pharm Des. 14: 3106-3119.
- Bolívar K.; Sanabria, M.; Rodríguez, D.; Camacaro, M.; Ulacio, D.; Cumana L. y 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. Rev. UDO Agríc. 9 (1): 175-181.
- Bravo, V., Rodríguez D., Sanabria M. E., Marín-Larreal M., Santos R., Pérez E., y Sandoval L.. (2005). Momento de infección por *Dothiorella* sp. y aparición de síntomas de la pudrición apical del guayabo. Rev. Fac. Agron. (LUZ) 22: 365-376.
- Carnelossi, P.R.; Schwan-Estrada, K.R.F.; Cruz, M.E.; Itako, A.T.; Mesquini, R.M. (2009). Óleos essenciais no controle pós-colheita de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão. Revista Bra. Plant.Medic.11(4).399-406.
- Castro, D.M.; Ming, L.C.; Marques, M.O.M. (2002). Biomass production and chemical composition of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown Britt & Wilson in leaves on different plant parts in different seasons. Acta Hort. (ISHS) 569, 111-115.

- Combrinck, S.; Regnier, T. y Kamatou, G.P. (2011). In vitro activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. *Industrial Crops and Products*. 33(2): 344-349.
- Correa, L.; Lavalett, O.; Galindo, V. (2007). Uso de métodos multivariantes para la agrupación de aislamientos de *Colletotrichum* spp. con base en características morfológicas y culturales. *Rev.Fac. Nac. Agron.* 60, pp. 3671-3690.
- Deka Bhuyan, P.; Chutia, M.; Pathak, M. G.; y Baruah, P. (2010). Effect of essential oils from *Lippia geminata* and *Cymbopogon jwarancusa* on in vitro growth and sporulation of two rice pathogens. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 87 (11):1333 - 1340.
- Delgado-Ospina, J., Menjivar, J.C., y M.S. Sánchez. (2015). Influencia de la fertilización en la producción y composición del aceite esencial de *Lippia* organoides HBK (orégano criollo). *Rev.Cub. Plant. Medic.* 20(3):335-347.
- Delgado-Ospina, J., Sanchez-Orozco, M. y Bonilla-Correa, C. (2016). Efecto del secado y la edad de las plantas en la composición de los aceites esenciales de *Lippia alba* (Mill) N.E.BR ex Britton y P. Wilson y *Lippia organoides* Kunth. *Acta Agron.* 65(2):170-175.
- Escobar, P.; Leal, S. M.; Herrera, L. H.; Martínez, J.R.; y Stashenko, E. (2010). Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp. essential oils and their major components. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105:184 - 190.
- Glamoèlija, J., Sokoviæ M., Teševiæ V., Linde G.A., y Barros Colauto N. (2011). Chemical characterization of *Lippia alba* essential oil: an alternative to control green molds. *Brazilian J. Microbiol.* 42(4):1537-1546.
- Guédez, C. Cañizalez, L. Avendaño, L. Scorza, J. Castillo, C. Olivar, R. Méndez, Y. y Sánchez, L. (2014). Actividad antifúngica del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis* L) sobre hongos postcosecha en frutos de lechosa (*Carica papaya* L.). *Rev. Soc. Vzlana. Microbiol.* 34:81-85.
- Hennebelle T, Sahpaz S, Joseph H, Bailleul F. *Ethnopharmacology of Lippia alba.* *J Ethnopharmacol* 2008; 116(2): 211-222.
- Hennebelle, T.; Sahpaz, S.; Dermont, C.; Joseph, H.; y Bailleul, F. (2006). The essential oil of *Lippia alba*: Analysis of samples from French overseas departments and review of previous works. *Chem. Biodivers.* 3:1116 - 1125.
- Hyde, K.D., Cai, L., Cannon, P.F., Crouch, J.A., Crous, P.W., Damm, U., Goodwin, P.H., Chen, H., Johnston, P.R., Jones, E.B.G., Liu, Z.Y., McKenzie, E.H.C., Moriwaki, J., Noireung, P., Pennycook, S.R., Pfenning, L.H., Prihastuti, H., Sato, T., Shivas, R.G., Tan, Y.P., Taylor, P.W.J.,

- Linde, J. H.; Combrinck, S.; Regnier, T. J. C.; y Virijevic, S. (2010). Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lippia rehmannii* from South Africa. *Sud Afr. J. Bot.* 76:37 - 42.
- Mani, A., Mishra, R. and Thomas, G. (2011). Elucidation of Diversity among *Psidium* Species using Morphological and SPAR methods. *Journal of Phytology* 3(8): 53-61.
- Manici, L. M.; Lazzeri, L.; y Palmieri, S. (1997). In vitro fungitoxic activity of some glucosinolates and their enzyme-derived products toward plant pathogenic fungi. *J. Agric. Food Chem* 45(7):2768 - 2773.
- Meneses R.; Torres F.; Stashenko E.; y Ocazonez, R. (2009). Aceites esenciales de plantas colombianas inactivan el virus del dengue y el virus de la fiebre amarilla. *Salud UIS.* 41:23 - 243.
- Mesa-Arango A.; Montiel-Ramos J.; Zapata B.; Duran C.; Betancur-Galvis E.; y Stashenko, E. (2009). Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. *Mem.Inst. Oswaldo Cruz* 104:878 - 884.
- Montanari, R.M., Barbosa, L.C.A., Demuner, A.J., Silva, C.J., Carvalho, L.S., Andrade, N.J., (2011). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from verbenaceae species: alternative sources of (E)-caryophyllene and germacrene-D. *Quím. Nova* 34, 1550–1555.
- Montero-Tavera, V., Morales J. L., González M.M., Anaya J. L., Corona T. y Galvez A. (2010). Diversidad genética, patogénica y morfológica del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) de Michoacan, Mexico. *Rev. Mex. Cs. Agríc:*1 (2): 159-174.
- Olivero, J.; Caballero, G. K.; Jaramillo, C. B.; y Stashenko, E. (2009). Actividad repelente de los aceites esenciales de *Lippia organoides*, *Citrus sinensis* y *Cymbopogon nardus* cultivadas en Colombia frente a *Tribolium castaneum*, *Herbst.* *Salud UIS.* 41:244 - 250.
- Pérez Gutiérrez, R. M.; S. Mitchell and R. Vargas-Solis. (2008). *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J. Ethnopharmacol.* 117 (1): 1-27.
- Prakas M. y Sharma N. (2013). Application of essential oils: An alternative method for controlling postharvest losses. *Inter. Soc. Environ. Bot.* 19(3):1-7.
- Regnier, T.; Combrinck, S.; y Du Plooy, W. (2010). Evaluation of *Lippia scaberrima* essential oil and some pure terpenoid constituents as postharvest mycobiocides for avocado fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 57:176 - 182.
- Rodríguez, D. y Sanabria, M. (2005). Efecto del extracto de tres plantas silvestres