

Información Importante

La Universidad de La Sabana informa que el(los) autor(es) ha(n) autorizado a usuarios internos y externos de la institución a consultar el contenido de este documento a través del Catálogo en línea de la Biblioteca y el Repositorio Institucional en la página Web de la Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad de La Sabana.

Se permite la consulta a los usuarios interesados en el contenido de este documento, para todos los usos que tengan finalidad académica, nunca para usos comerciales, siempre y cuando mediante la correspondiente cita bibliográfica se le dé crédito al trabajo de grado y a su autor.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, La Universidad de La Sabana informa que los derechos sobre los documentos son propiedad de los autores y tienen sobre su obra, entre otros, los derechos morales a que hacen referencia los mencionados artículos.

BIBLIOTECA OCTAVIO ARIZMENDI POSADA
UNIVERSIDAD DE LA SABANA
Chía - Cundinamarca

**BIOACTIVIDAD DE HIDROSOLES, ACEITES ESENCIALES Y MEZCLAS DE
EXTRACTOS DE ESPECIES VEGETALES PARA EL CONTROL DE
Rhizoctonia solani, *Phytophthora infestans* Y *Fusarium oxysporum* EN EL
CULTIVO DE PAPA (*Solanum tuberosum*)**

YOMAIRA LISNEDY USCÁTEGUI MALDONADO

**UNIVERSIDAD DE LA SABANA
FACULTAD DE INGENIERÍA
MAESTRÍA EN DISEÑO Y GESTIÓN DE PROCESOS
ÉNFASIS BIOPROCESOS**

2013

**BIOACTIVIDAD DE HIDROSOLES, ACEITES ESENCIALES Y MEZCLAS DE
EXTRACTOS DE ESPECIES VEGETALES PARA EL CONTROL DE
Rhizoctonia solani, *Phytophthora infestans* Y *Fusarium oxysporum* EN EL
CULTIVO DE PAPA (*Solanum tuberosum*)**

**Trabajo de grado para optar al título de Magister en
Diseño y Gestión de Procesos**

**Presentado por
YOMAIRA LISNEDY USCÁTEGUI MALDONADO**

**Director
ROSA ERLIDE PRIETO CORREA**

**UNIVERSIDAD DE LA SABANA
FACULTAD DE INGENIERÍA
MAESTRÍA EN DISEÑO Y GESTIÓN DE PROCESOS
ÉNFASIS BIOPROCESOS**

2013

Nota de aceptación

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Chía (Cundinamarca), 04 de Octubre de 2013

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico primero a Dios y a la Virgen de Manare por sus infinitas bendiciones durante mi vida.

También dedico esta tesis a mis padres, por sus enseñanzas, por su apoyo incondicional, por su comprensión y por su paciencia.

De igual forma, se la dedico a mis tías (Paulina, Angelina y Leonor), que me animan en todo lo que hago y siempre están ahí cuando las necesito.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por ser mi guía en todos los momentos y no dejarme desfallecer en tiempos difíciles.

Quiero agradecer de manera muy especial a mi directora de tesis, la Dra. Erlide Prieto por la confianza depositada en mí, por la oportunidad que me brindó de iniciarme en la investigación desde mi pregrado, y por sus enseñanzas y orientaciones durante toda esta etapa.

A la Universidad de La Sabana, Colciencias y Cámara de Comercio de Bogotá por permitir la realización de este proyecto el cual estaba enmarcado dentro de los objetivos de un proyecto conjunto de las tres entidades.

A los profesores de la maestría y especialmente a los profesores de planta de la Universidad de La Sabana por sus conocimientos y apoyo durante este proceso.

A mis compañeros del postgrado y amigos en general, que con su ejemplo, experiencias, apoyo y amistad sirvieron de estímulo para seguir adelante.

A los auxiliares de los laboratorios de la facultad de Ingeniería por su apoyo y colaboración durante las largas jornadas de investigación.

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
TABLA DE CONTENIDO.....	vi
LISTA DE TABLAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ANEXOS.....	x
RESUMEN.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES Y REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
1.1. GENERALIDADES DEL CULTIVO DE LA PAPA (<i>Solanum tuberosum</i>)....	3
1.2. PLAGAS Y ENFERMEDADES DE LA PAPA (<i>Solanum tuberosum</i>).....	4
1.2.1. Efectos nocivos de hongos presentes en el cultivo de la papa (<i>Solanum tuberosum</i>).....	7
1.3. TRATAMIENTOS CONTRA PLAGAS Y ENFERMEDADES.....	13
1.3.1. Especies vegetales.....	15
1.3.1.1. Compuestos fenólicos.....	18
1.3.1.1.1. Capacidad antioxidante.....	19
1.3.1.1.2. Capacidad antimicrobiana.....	20
1.3.2. Aplicaciones con metabolitos secundarios.....	21
1. OBJETIVOS.....	28
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	28
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
3. JUSTIFICACIÓN.....	29
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
4.1. MATERIALES.....	33
4.1.1. Material biológico.....	33
4.1.2. Material vegetal.....	33
4.1.3. Reactivos.....	34
4.2. METODOLOGÍA.....	35

4.2.1. Identificación de compuestos químicos.....	35
4.2.2. Polifenoles totales.....	35
4.2.3. Actividad antioxidante.....	36
4.2.4. Actividad fungicida	39
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
5.1. Identificación de compuestos químicos.....	41
5.2. Polifenoles totales.....	53
5.3. Actividad antioxidante.....	57
5.3.1. Preliminares (Macro-Métodos).....	58
5.3.2. Ensayos finales (Micro-Métodos)	61
5.4. Actividad fungicida	68
5.4.1. Concentración Mínima Inhibitoria (Micro-método).....	69
5.4.2. Difusión en disco en agar (Macro-método).....	75
5.4.3. Mezclas de extractos para formular un bioinsumo	83
CONCLUSIONES	93
RECOMENDACIONES.....	96
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
ANEXOS	118

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Especies vegetales utilizadas en la investigación	34
Tabla 2. Compuestos químicos mayoritarios identificados por GC-MS	41
Tabla 3. Polifenoles Totales en hidrosoles y aceites esenciales de 17 especies vegetales	55
Tabla 4. IC ₅₀ de 10 especies vegetales por medio de DPPH	58
Tabla 5. Actividad antioxidante de 17 especies vegetales por medio de ABTS	59
Tabla 6. Actividad antioxidante de hidrosoles de 17 especies vegetales.....	61
Tabla 7. Actividad antioxidante de aceites esenciales de 17 especies vegetales ..	62
Tabla 8. Actividad fungicida de 17 hidrosoles de especies vegetales contra <i>P. infestans</i> , <i>F. oxysporum</i> y <i>R. solani</i>	70
Tabla 9. Actividad fungicida de 17 aceites esenciales de especies vegetales contra <i>P. infestans</i> , <i>F. oxysporum</i> y <i>R. solani</i>	71
Tabla 10. Screening de actividad fungicida de cada extracto (Difusión en disco) ..	76
Tabla 11. Compuestos químicos del aceite esencial de Tomillo que no están presentes en otras especies evaluadas	81
Tabla 12. Mezclas de extractos para formulación de bioinsumos	83
Tabla 13. Actividad antioxidante de las mezclas de extractos	84
Tabla 14. Máxima concentración de inhibición de las mezclas contra los hongos <i>P. infestans</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>R. solani</i>	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Compuestos mayoritarios de hidrosoles de especies vegetales	44
Figura 2. Compuestos mayoritarios de aceites esenciales de especies vegetales	45
Figura 3. (a) <i>Phytophthora infestans</i> en agar arveja, (b) <i>Fusarium oxysporum</i> en agar PDA, (c) <i>Rhizoctonia solani</i> en agar PDA	69
Figura 4. Hongos retados sobre rodajas de papa: (a) <i>P. infestans</i> , (b) <i>F. oxysporum</i> (c) <i>R. solani</i>	69
Figura 5. Porcentaje de inhibición de hidrosoles de especies vegetales contra los hongos <i>P. infestans</i> , <i>F. oxysporum</i> y <i>R. solani</i>	72
Figura 6. Porcentaje de inhibición de aceites esenciales de especies vegetales contra los hongos <i>P. infestans</i> , <i>F. oxysporum</i> y <i>R. solani</i>	73
Figura 7. Porcentaje de inhibición de hidrosoles de especies vegetales contra los hongos <i>P. infestans</i> , <i>F. oxysporum</i> y <i>R. solani</i>	74
Figura 8. Porcentaje de inhibición de aceites esenciales de especies vegetales contra los hongos <i>P. infestans</i> , <i>F. oxysporum</i> y <i>R. solani</i>	74
Figura 9. <i>F. oxysporum</i> . (a) Blanco, (b) Aceite esencial de tomillo, (c) Control positivo.....	77
Figura 10. IC ₅₀ de seis aceites esenciales de especies vegetales contra los hongos <i>P. infestans</i> , <i>F. oxysporum</i> y <i>R. solani</i>	80
Figura 11. IC ₅₀ de mezclas de especies vegetales contra los hongos <i>P. infestans</i> , <i>F. oxysporum</i> y <i>R. solani</i>	85
Figura 12. Fotografías de control negativo, Mezcla X y control positivo a concentraciones de (a) 4 µL, (b) 5 µL y (c) 6 µL (d) blanco, para <i>P. infestans</i> , <i>F. oxysporum</i> y <i>R. solani</i>	87
Figura 13. Compuestos mayoritarios de las mezclas con actividad fungicida	90

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. Composición química de diecisiete extractos vegetales y cromatogramas del hidrosol y aceite esencial de Tomillo.....	118
ANEXO B. Comparación de metabolitos secundarios entre especies vegetales de hidrosoles.....	130
ANEXO C. Comparación de metabolitos secundarios entre especies vegetales de aceites esenciales	135
ANEXO D. Curva de calibración de Polifenoles Totales	140
ANEXO E. Curvas de calibración para calcular IC ₅₀ de los extractos evaluados por medio del método de DPPH.....	141
ANEXO F. Curva de calibración para determinar ABTS (Macro-método)	150
ANEXO G. Curva de calibración para determinar DPPH (Micro-método)	151
ANEXO H. Curva de calibración para determinar ABTS (Micro-método)	152
ANEXO I. Curva de calibración para determinar FRAP (Micro-método).....	153
ANEXO J. Resultados de actividad fungicida de extractos de especies vegetales	154
ANEXO K. Resultados de actividad fungicida de extractos de especies vegetales	162
ANEXO L. Curvas para determinar IC ₅₀ de aceites esenciales de especies vegetales contra <i>P. infestans</i> , <i>F. oxysporum</i> y <i>R. solani</i>	170

RESUMEN

Uno de los objetivos del milenio es garantizar la conservación del medio ambiente. Para llegar a cumplir con ese objetivo, actualmente se promueve el uso de productos de origen biológico para que sean utilizados contra agentes nocivos y de esta forma se disminuya el uso de productos químicos que generan daños al medio ambiente. A partir de esto, se estudian metabolitos secundarios de especies vegetales que pueden ser usados para controlar hongos en cultivos transitorios como la papa (*Solanum tuberosum*). Con base en revisión bibliográfica sobre metabolitos presentes en las plantas, se seleccionaron diecisiete especies vegetales de las cuales se obtuvo el hidrosol y el aceite esencial con el objetivo de evaluar su bioactividad (polifenoles, actividad antioxidante y fungicida) para utilizarlos como biocontroladores contra tres hongos fitopatógenos (*Phytophthora infestans*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*) que atacan el cultivo de papa. A estos extractos (hidrosoles y aceites esenciales) se les determinó la composición química por cromatografía de gases-masas (CG-MS), donde se observó que la cantidad de metabolitos para cada extracto oscila entre 2 y 61 en hidrosoles y entre 1 y 77 en los aceites esenciales; y los porcentajes de cantidad relativa variaron entre <0,1 y 88,2% para hidrosoles, y entre <0,1 y 100% para aceites. El análisis de polifenoles totales mostró que el hidrosol de Romero (*Rosmarinus officinalis*) (67,6 mg/g) y el aceite de Tomillo (*Thymus vulgaris*) (29,5 mg/g) presentaron la mayor concentración. La capacidad antioxidante evaluada bajo las condiciones del ensayo por medio de DPPH, ABTS y FRAP determinó que el hidrosol de Romero, y los aceites esenciales de Tomillo y Menta Poleo (*Mentha pulegium*) fueron los que obtuvieron la mayor capacidad. Al evaluar la actividad fungicida se encontró inhibición al 100% de los tres hongos con los aceites de Hierbabuena (*Mentha spicata*), Menta Poleo, Milenrama (*Achillea millefolium*), Romero, Ruda (*Ruta graveolens*) y Tomillo; siendo el aceite de Tomillo el que presentó la mejor actividad, lo que coincide con los principales resultados sobre polifenoles totales y actividad antioxidante de los aceites. Con base en los resultados obtenidos de composición y propiedades bioactivas se

propusieron y evaluaron tres formulaciones preliminares que pudieran remplazar el uso de insumos agroquímicos que resultan altamente contaminantes para el medio ambiente, encontrándose que la actividad antioxidante y fungicida fue mayor que la de los extractos puros e incluso mayor a la actividad de un fungicida comercial sistémico bajo las mismas condiciones del ensayo.

Palabras claves: Actividad fungicida, hidrosoles, aceites esenciales, especies vegetales, fitopatógenos, bioinsumos.

INTRODUCCIÓN

La tendencia actual gira en torno a la búsqueda de la diversificación de productos de origen natural, con el objetivo de proteger los cultivos de plagas y enfermedades. Estas plagas disminuyen cosechas, incrementan costos o simplemente generan un daño a los productos ya cosechados. Dentro de los métodos de control biológico o control natural se tienen los bioinsumos de origen vegetal, aprovechando las características que tienen las especies vegetales, como son una variada cantidad de metabolitos secundarios que favorecen el control de especies fitófagas (plagas y enfermedades) que afectan de forma directa o indirecta los cultivos que hacen parte de la canasta familiar de los hogares en muchas partes del mundo. Debido a la estabilidad y concentración de los principios activos de cada una de las especies, se puede llegar a sustituir o remplazar el método de control químico que presenta efectos negativos como por ejemplo la generación de resistencia de las especies fitófagas. Adicionalmente, los agroquímicos se vuelven ineficientes, causando daños a la salud de las personas que los manipulan y presentando efectos irreversibles al ecosistema.

Uno de los cultivos de mayor importancia para el consumo de los humanos es el de la papa (*Solanum tuberosum*), una planta ampliamente distribuida en las zonas de clima frío y que tiene una alta capacidad de adaptación a diferentes tipos de suelos. Las cosechas de estos cultivos se ven fuertemente afectadas por el ataque de especies fitófagas entre las que se pueden mencionar bacterias, virus, hongos, entre otros. Como consecuencia de esto, los agricultores se han visto en la necesidad de buscar métodos de control que eviten o prevengan el ataque de los patógenos. Algunos de los métodos que han sido utilizados para prevenir estos ataques es la rotación de cultivos por ciclos, selección de semillas de buena calidad y libre de infecciones, uso de fertilizantes químicos para incrementar rendimientos de la producción y la utilización de agroquímicos para prevenir o disminuir el ataque de patógenos.

En la dieta de los colombianos, la papa se encuentra en el tercer renglón entre los productos agrícolas del país. La papa tiene mayor presencia en la canasta familiar de alimentos de los habitantes de menores ingresos económicos. Adicionalmente la superficie cultivada en Colombia es de 170 mil hectáreas, con una producción anual de 3 millones de toneladas, observando mayor área cultivada en los departamentos de Boyacá, Cundinamarca y Nariño. Caracterizándose por el amplio número de agroquímicos que utiliza y consecuentemente, la necesidad de disminuir sus impactos sobre el medio ambiente, ofreciendo una alternativa natural.

Debido al incremento en la utilización de agroquímicos en Colombia la lista de argumentos ambientalistas o a favor de la salud humana cada vez es más extensa debido a los impactos nocivos que tienen algunas moléculas de síntesis sobre la salud humana, la vida microbiana, la mesoflora, los insectos y las especies vegetales sometidas directa o indirectamente a fumigaciones con estas moléculas.

El objetivo de la presente investigación es evaluar la bioactividad y composición química de hidrosoles, aceites esenciales y mezclas de estos obtenidos a partir de diecisiete especies vegetales para utilizarlos en el control de *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora infestans* y *Fusarium oxysporum* presentes en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) desarrollando la formulación preliminar de un bioinsumo que ataque los fitopatógenos presentes en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum*).

Con este proyecto se busca diversificar la oferta actual en bioinsumos de origen vegetal, los cuales constituyen alternativas viables en términos agrícolas y ambientales a la problemática del uso exponencial de agroquímicos de síntesis utilizados con fines fertilizantes, bactericidas, fungicidas e insecticidas.

ANTECEDENTES Y REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. GENERALIDADES DEL CULTIVO DE LA PAPA (*Solanum tuberosum*)

La papa (*Solanum tuberosum* ssp. *Tuberosum*) es una planta herbácea, dicotiledonea, monóica y anual que puede medir hasta un metro de altura. Pertenece a la familia de las Solanáceas y junto con el tomate, el pimiento, la berenjena y la papa, forman un grupo de cultivos importantes, que por ser especies alimenticias, son utilizados por los humanos en la alimentación cotidiana (Bryan, G. 2007). La parte comestible de la planta es el tallo modificado conocido como tubérculo, éste se encuentra al final de cada estolón y funciona como un órgano de almacenamiento; la forma, color y textura de piel de los tubérculos puede variar mucho con el cultivar. Es una planta que se ha convertido en una importante fuente de alimentación humana (López, A. 2007).

El cultivo es originario de la cordillera Andina de Sudamérica, costas e islas del sur de Chile y es la principal actividad agrícola de clima frío. La papa es un vegetal excelente desde el punto de vista nutricional, ocupando el cuarto lugar entre los principales cultivos alimenticios del mundo y es superada solamente por gramíneas como el trigo, arroz y maíz (Carrillo, Y. y col., 2010; Yang, Y. y col., 2011).

En Colombia el cultivo de papa ocupa el tercer renglón entre los productos agrícolas del país, con 90 mil productores y una producción anual de alrededor de 3 millones toneladas y 170 mil hectáreas sembradas. Los rendimientos del cultivo son de 18 toneladas/hectárea y su consumo per cápita de 62 kg/habitante (casi el doble del promedio mundial). Este cultivo se caracteriza por ser de autoconsumo, por esta razón se presentan cultivos en minifundios donde aproximadamente el 95% de ellos tienen cultivos menores a tres hectáreas de tierra (Salazar, C. y Betancourth, C. 2009; Redepapa, 2013).

Las personas encargadas de dichos cultivos presentan un bajo nivel de escolaridad lo que genera un limitado acceso a los factores de producción, servicios públicos, salud, asistencia técnica agrícola, obras de infraestructura, entre otros. Es así como el sistema de producción se caracteriza por manejar una tecnología tradicional en el 90% de los casos. La tecnología convencional tradicional tiene como características principales el monocultivo, el uso intensivo de fertilizantes, uso intensivo de plaguicidas, uso de maquinaria, entre otros. Es decir, utiliza diferentes factores productivos que se enfocan en asegurar altos rendimientos en los cultivos, sin considerar el uso racional de los recursos naturales y la sostenibilidad del medio ambiente, lo que a su vez contribuye a la aparición de plagas (Suárez, S. 2004; Rosquete, C. 2011).

1.2. PLAGAS Y ENFERMEDADES DE LA PAPA (*Solanum tuberosum*)

Diversas enfermedades de cultivos causadas por hongos, oomicetos, bacterias, virus, Nematodos, fitoplasmas e insectos, se han convertido en una de las importantes limitaciones en la obtención de productos para la alimentación. La evolución de nuevas enfermedades de las plantas hace parte normal de los ecosistemas y los cultivos en producción, pero se convierten en una preocupación cuando pasan a ser causa fundamental de pérdidas en los cultivos. Es así como se tienen enfermedades de plantas que en promedio, han sido responsables de hasta un 26% en la pérdida de rendimiento de la agricultura mundial. En ocasiones se puede generar una pérdida del terreno hasta en un 100% (Khan, M. y col., 2011; Sharma, R. y col., 2009; Monsalve, Z. y col., 2012).

Son muchas las plagas y enfermedades que atacan el cultivo de la papa. Existen los Nematodos que tienen la capacidad de alimentarse y reproducirse en la papa. La mayoría de estos consumen los nutrientes de raíces, sin provocar daños significativos al cultivo. Sin embargo, algunos de estos, por ejemplo *Trichodorus* y especies de *Paratrachodorus*, son extremadamente nocivos, porque son tóxicos para las raíces y además transmiten virus. En otros casos los Nematodos solo

causan un pequeño daño directo pero facilitan las infecciones secundarias por la presencia de hongos, que pueden ser considerablemente destructivos. Las consecuencias del ataque de Nematodos se ve reflejado en una baja del rendimiento de los cultivos debido a la disminución del tamaño y pérdida de peso de los tubérculos, y en el retardo del crecimiento de la planta (Mugniéry, D. y Phillips, M. 2007).

Los insectos pueden causar disminución en la producción y calidad de los tubérculos en un 30-70% si no se controlan de forma rutinaria. Entre los insectos que afectan los cultivos de la papa se tiene el escarabajo de la papa de Colorado, *Leptinotarsa decemlineata* (Chrysomelidae); áfidos (*Aphididae*) que transmiten virus; polillas de la papa, *Phthorimaea operculella*; *Symmetrischema tangolias*, *Tecia* (*Scrobipalopsis*) solanivora; gorgojos andinos de la papa, *Premnotrypes* spp. (Curculionidae) y salta hojas de la papa, *Empoasca fabae* (Harris) (Cicadellidae); entre otros. La mayoría de los insectos son vectores potenciales de transmisión de agentes patógenos. Algunos insectos dañan partes de las raíces lo que da como resultado una generación de plantas débiles o la pérdida de la misma. Los insectos del suelo tienen menores efectos sobre los rendimientos de los tubérculos, pero el daño causado en gran medida puede reducir la calidad del mismo (Radcliffe, E. y Lagnaoui, A. 2007).

Los virus del cultivo de papa hacen parte de los patógenos más peligrosos por las pérdidas económicas causadas, a pesar de los programas que han sido generados para contrarrestarlos, como por ejemplo el uso de semillas certificadas, lo que ha reducido la prevalencia de los virus en los cultivos de ciertas áreas cultivadas. Entre los virus que han sido encontrados en estos cultivos en diferentes partes del mundo se pueden mencionar los siguientes: *Potato leafroll luteovirus* (PLRV), *Potato Y potyvirus* (PVY), *Potato X potexvirus* (PVX), *Potato S potyvirus* (PVS), *Potato M potyvirus* (PVM), *Potato A potyvirus* (PVA), *Tospovirus* (TSWV) entre otros, (Valkonen, J. 2007).

Los patógenos bacterianos son otra amenaza de los cultivos de papa. Dichos patógenos se multiplican rápidamente y causan pérdidas significativas. Una de las principales bacterias que afectan estos cultivos es *Ralstonia solanacearum*, también conocida como *Pseudomonas solanacearum* y *Burkholderia solanacearum*, es una bacteria Gram-negativa no formadora de esporas, aerobia y móvil que causa la marchitez bacteriana, también conocido como podredumbre parda. *Clavibacter michiganensis* ssp. *Sepedonicus*, es el agente causante de la podredumbre anular bacteriana. Este patógeno se ha descrito con los siguientes nombres: *Corynebacterium sepedonicum*, *Bacterium sepedonicum*, *Aplanobacter sepedonicum*, entre otros. Es una bacteria Gram-positiva, no móvil y aeróbica. *Erwinias pectolíticas*, son responsables de las enfermedades del follaje conocidas como pierna negra, pudrición del tallo, así como la podredumbre blanda bacteriana en los tubérculos. Las contaminaciones bacterianas tienen mayor propagación durante la cosecha y la clasificación de los tubérculos. Un tubérculo podrido puede llegar a contaminar hasta 100 kg de papas durante el almacenamiento (Van der Wolf, J. y De Boer, S. 2007).

Entre los microorganismos fitopatógenos que afectan los cultivos se tiene los hongos, que pertenecen al grupo fitopatógeno que más enfermedades ocasiona y por lo tanto, sobre el que más investigación se ha realizado. Se ha determinado que a nivel mundial los hongos fitopatógenos son los que tienen un porcentaje representativo en cuanto al nivel de pérdidas ocasionadas sobre los cultivos. Es así como se tienen daños no sólo a nivel biológico sino también a nivel de la producción biológica, es decir a la alteración que existe en el crecimiento y desarrollo de las plantas hospedantes atacadas por los hongos. Al hablar de pérdidas económicas se relaciona directamente con la pérdida de características como sabor, textura, color y forma (Pérez, M. y col., 2010).

Los hongos son causantes de la pudrición en la post-cosecha de frutas y hortalizas frescas durante su almacenamiento y transporte, convirtiéndose en una de las causas más importantes pérdidas económicas en la fase de

comercialización. Entre los hongos patógenos más significativos en la post-cosecha se encuentran *Botrytis cinérea*, *Monilinia laxa*, *Penicillium spp.*, y *Aspergillus spp.*, entre otros (Gatto, M. y col., 2011; Minuto, A. y col., 2006; Overy, D. y col., 2005). El control de post-cosecha de estos patógenos es muy eficiente si se realiza por medio de fungicidas químicos (Minuto, A. y col., 2006). Sin embargo, el reducido número de principios activos autorizados, el aumento de la resistencia de algunos hongos patógenos de post-cosecha en contra de los pocos autorizados fungicidas, y la creciente demanda de los consumidores, calidad de frutas y verduras seguras, han incrementado los esfuerzos para desarrollar alternativas hacia la búsqueda de otro tipo de controles (Gatto, M. y col., 2011).

1.2.1. Efectos nocivos de hongos presentes en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum*)

Los patógenos fúngicos que atacan los cultivos de papa poseen ciertas estrategias para reconocer al hospedante adecuado, penetrar e invadir el tejido vegetal, y a su vez tienen la capacidad de superar las defensas de la planta y optimizar su crecimiento dentro de la misma. Para llegar a esto, los hongos tienen que percibir las señales químicas y físicas del hospedante y responder con los cambios metabólicos y morfogenéticos requeridos para el desarrollo patogénico. Es así como se presentan cambios sobre el crecimiento de las hifas, la adhesión a la superficie vegetal, la diferenciación de las estructuras de infección especializadas y la secreción de enzimas líticas y fitotoxinas (González, I., y col., 2012).

El cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) se encuentra frecuentemente limitado por las enfermedades generadas por diferentes especies de hongos. Existen diversos hongos patógenos que atacan el cultivo de la papa entre los que se encuentran *Aecidium cantense*, *Alternaria solani*, *Colletotrichum coccodes*, *Erysiphe cichoracearum*, *Fusarium coeruleum*, *Fusarium javanicum*, *Fusarium eumartii*, *Geotrichum candidum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phytophthora erythroseptica*, *Phytophthora infestans*, entre otros (Termorshuizen, A., 2007).

1.2.1.1. *Phytophthora infestans*

Las especies de *Phytophthora* generan daños en diversos cultivos como palma Africana (*Elaeis guinensis*), cacao (*Theobroma cacao*), papaya, berenjena, tomate, papa (*Solanum tuberosum*), palmito, caucho, entre otros. Se observan diferentes clases de enfermedades como son el tizón, el mildiú, la pudrición en el tronco, copa y raíces; manchas y tizón de hojas así como la pudrición de los peciolos; caída de los frutos; y la pudrición de la yema apical o el corazón seguida de la muerte de la planta (Brurberg, M. y col., 2011; Pérez, M. y col., 2010; Zhu, G. y col., 2008).

Phytophthora spp comprende más de 700 especies, las cuales no tienen pigmentos fotosintéticos, poseen dos flagelos en las zoosporas y los gametos masculinos, contiene paredes formadas por celulosa o polímeros similares a celulosa; es un fitopatógeno muy importante por el tipo de enfermedades que ocasiona en las plantas, pertenece al phylum Oomycota, del reino eukaryota. En comparación con los hongos verdaderos, las plantas y animales, los oomicetos de *P. infestans* se caracterizan por su capacidad de adaptarse rápidamente para superar los genes de resistencia desarrollados en las plantas hospederas, puesto que tiene un genoma altamente flexible y adaptable. El genoma de *P. infestans* está caracterizado por ser el más grande en comparación con las especies de oomicetos (Apel, H. y col., 2003; Fauconnier, M. y col., 2008; Guo, J. y col., 2006; Whisson, S. y col., 2005; Wang, X. y col., 2006).

Los oomicetos no sólo se ven como los hongos, sino que también se comportan como los hongos y utilizan el mismo mecanismo para atacar a las plantas. Del mismo modo, las proteínas que utilizan las plantas para combatir oomicetos tienen la misma estructura de las proteínas que invaden los hongos. Los análisis genéticos en el hospedante y el patógeno han demostrado que este modelo también se adapta al sistema de papa- *P. infestans* (Brunnera, F. y col., 2002;

Sharma, N. y col., 2004; Guo, J. y col., 2006; Laxalt, A. y col., 2002; Polkowska-Kowalczyk, L. y col., 2004).

Una de las enfermedades más importantes y más estudiadas en el cultivo de la papa es el tizón tardío generada por el hongo fitopatógeno *P. infestans*, enfermedad que en el año de 1845 provocó en Irlanda una de las más grandes hambrunas de las que se tiene registro, lo que generó la muerte de miles de personas y una gran emigración de la población de dicho país. El patógeno se encuentra distribuido ampliamente en todas las regiones donde se cultiva papa (Wang, X. y col., 2004; Whisson, S. y col., 2005; Skottrup, P. y col., 2007; Zhu, G. y col., 2008; Gallou, A. y col., 2011). Actualmente, se calcula que las pérdidas mundiales ocasionadas por la enfermedad ascienden a 6,7 billones de dólares (Mosalve Z. y col., 2012)

Cuando el hongo se encuentra expuesto a altos grados de humedad y temperatura, se producen esporangios que liberan zoosporas móviles, que son trasladadas a las zonas de alargamiento de nuevas raíces por nutrientes que son naturalmente exudados en esta zona radicular. En contacto con la raíz, las zoosporas se enquistan, germinan y después infectan el área de la zona de alargamiento. Una vez que el hongo ha penetrado en la punta de la raíz, la infección puede avanzar en el córtex, produciendo la podredumbre de toda la raíz. Se manifiesta como pequeñas manchas pálidas o verde oscuras de forma irregular que se expanden rápidamente, formando grandes lesiones necróticas de color café oscuro. El ciclo se puede repetir mientras las condiciones sean favorables y se disponga de tejido susceptible (Whisson, S. y col., 2005; López, A. 2007; Carrillo, Y. y col., 2010; Pérez, M. y col., 2010; Brurberg, M. y col., 2011).

1.2.1.2. *Fusarium oxysporum*

F. oxysporum es un hongo que exhibe colonias variables y suele presentar dos tipos de estas, una es de tipo micelial que se caracteriza por la producción de micelio aéreo, algodonoso, que tiene una coloración variable, de blanco a rosado

durazno, pero usualmente con un tinte púrpura o violeta más intenso en la superficie y pocas microconidias. El otro tipo de colonias es de tipo pionotal con la formación de poco o ningún micelio aéreo y bastantes microconidias. A su vez, este hongo presenta tres clases de esporas como son las microconidias, las macroconidias y las clamidosporas. *F. oxysporum* se subdivide en razas fisiológicas, con base en su especificidad patogénica sobre determinadas variedades de una misma especie de planta, razón por la cual las pruebas de patogenicidad y las características de virulencia de los aislamientos del hongo son el principal criterio para diferenciar las formas especiales de *F. oxysporum* y sus razas fisiológicas (Garcés, E. y col., 2001).

Fusarium spp. (*F. solani*, *F. sambucinum*, *F. avenaceum*, *F. culmorum* y *F. oxysporum*, entre otros) son hongos patógenos presentes en una amplia variedad de cultivos, en particular en el cultivo de la papa donde generan enfermedades denominadas pudrición seca, pudrición de tallo y marchitez de plantas, que se convierten en una amenaza a nivel mundial. Estos patógenos por lo general sobreviven como esporas resistentes en el suelo o dentro de los tejidos de la planta afectada durante un largo período de tiempo. Aunque algunas infecciones se pueden desarrollar en los tubérculos antes de la cosecha, la mayoría de estas se producen cuando el hongo entra a los tubérculos a través de heridas presentes en su superficie por que el patógeno no tiene capacidad para infectar el peridermo o lenticelas de tubérculos enteros. Cuando se tienen tubérculos infectados, generalmente el hongo se mantiene en la superficie de los mismos, lo que genera contaminación a envases, equipos de recolección y almacenamiento, y a su vez se facilita la inoculación de las heridas de otros tubérculos que sean provocadas durante el transporte, especialmente cuando se trata de semillas que han sido cortadas. La semilla entera o fraccionada que sea infectada se pudre y afecta el suelo que queda adherido a la superficie de los tubérculos cosechados y que se encuentran en buen estado. Es así como las heridas provocadas durante la cosecha, el almacenaje, transporte o fraccionamiento de semillas son las

principales vías para que se produzca la infección (Al-Mughrabi, K. 2010; D'Ippólito, S- y col., 2010).

F. oxysporum es un hongo de suelo que infecta plantas a través de las raíces y coloniza los vasos del xilema en el tallo, por lo que se genera un retraso en el crecimiento y una marchitez vascular de la planta desencadenando así la muerte de la misma (González, I. y col., 2012). Cuando la infección es sobre el tubérculo se observa la superficie hendida y blanda, que luego se vuelve rugosa y resquebraja. La superficie del tubérculo presenta contorno irregular, con el tejido cortical arrugado y plegado; los tejidos se vuelven oscuros, se desintegran y presentan una consistencia seca y un color que varía del castaño claro al negro opaco. La infección se va extendiendo lentamente y el peridermo correspondiente a las partes lesionadas se hunde y arruga, formando anillos concéntricos a medida que el tejido se va secando. Del peridermo muerto pueden emerger pústulas que contienen micelio y esporas. Los tubérculos podridos se arrugan y finalmente se momifican (Ficha de categorización, 2012).

1.2.1.3. *Rhizoctonia solani*

Otra enfermedad fungosa que causa daño al cultivo de la papa es la rizoctoniasis generada por el hongo *Rhizoctonia solani* Kühn. Es un hongo con capacidad de modificar el citoplasma a través de su sistema de hifas, lo que permite que el hongo crezca muy rápido, incluso en circunstancias donde se carece de nutrientes. Además, el hongo puede colonizar la materia orgánica fresca. Dicho hongo se encuentra en numerosas áreas productivas, y afecta todas las fases del cultivo desde la germinación hasta la cosecha. Las plantas infectadas tienden a producir tubérculos deformes, lo que reduce el rendimiento comercial (Vaillant, D. y col., 2009).

R. solani es una forma imperfecta de *Thanatephorus cucumeris*. *R. solani*, es la fase patogénica y se caracteriza porque no produce conidias, las hifas son de color marrón oscuro, las células son multinucleadas y la base de la célula que da

origen a una ramificación tiene una constricción. Es un hongo que no produce esporas asexuales y por lo tanto no tiene ningún medio fiable para asegurar su dispersión a largas distancias. Presenta esporas sexuales llamadas basidiosporas pero estas raras veces se producen. A pesar de la ausencia de esporas, *R. solani* sobrevive en condiciones desfavorables por medio de la formación de esclerocios que contiene una masa compacta de micelios. La densidad de inóculo de *R. solani* es altamente variable y en general no se correlaciona con la incidencia de la enfermedad (Anees, M. y col., 2010).

El daño a los cultivos de la papa por *R. solani* se presenta principalmente bajo la superficie del suelo, donde sólo los tejidos jóvenes como tallos subterráneos y estolones son particularmente susceptibles al ataque, lo que ocasiona cancro en brotes, tallos, estolones y raíces, lo que disminuye el crecimiento de las plantas, además de la costra negra, que corresponde a la formación de esclerocios sobre la piel de los tubérculos, disminuyendo su calidad comercial (Giovannini, C. y col., 2005).

El potencial hídrico, la temperatura, el pH, y la nutrición, son algunos de los factores ambientales que tienen una influencia significativa en la enfermedad causada por *R. solani*, los esclerocios germinan y el micelio se desarrolla infectando los brotes y tallos que se encuentran en desarrollo. La formación de esclerocios sobre la superficie de los nuevos tubérculos ocurre en condiciones de suficiente humedad y temperatura óptima de 18°C, sin embargo, el máximo desarrollo de esclerocios se produce cuando los tubérculos que se encuentran listos para ser cosechados se mantienen en el campo por un tiempo prolongado (Ritchie, F. y col., 2006). Según Giovannini, C. y col., 2005, cuando se tiene el inóculo en forma de esclerocios se presenta mayor grado de potencial patogénico y por lo tanto representa una importante fuente de inóculo, sin embargo, la patogenicidad de los aislamientos es variable, lo que sugiere una amplia diversidad genética dentro de la población.

1.3. TRATAMIENTOS CONTRA PLAGAS Y ENFERMEDADES

Para llevar a cabo el control y manejo de las enfermedades generadas por hongos fitopatógenos existen diversos métodos como el manejo cultural, control químico, control biológico y control genético.

Con el surgimiento de diversas enfermedades en las plantas y la generación de perjuicios sobre los cultivos, el control químico es uno de los métodos más eficaces para el manejo de los mismos. Debido a esto, numerosos plaguicidas químicos son frecuentemente aplicados para controlar ciertas enfermedades. La gran mayoría de fungicidas actúan en forma preventiva, evitando la colonización y penetración del patógeno sobre el hospedero. No obstante, los plaguicidas químicos por lo general ofrecen un control satisfactorio de las enfermedades, pero la utilización de dichos compuestos genera algunos efectos adversos en las plantas, animales y el ecosistema. Es así como después de años de uso, empezó a generarse resistencia de los hongos contra los compuestos químicos utilizados y a la vez incremento la contaminación ambiental, daños a la seguridad y a la salud pública. La intensidad de la resistencia depende del tipo de fungicida y del tipo de patógeno que se está tratando (Gamboa, R. y col., 2003; Rodríguez, D. y Sanabria, M. 2005; López, A. 2007; Reinoso, Y. y col., 2007; Zhu, G. y col., 2008; Rosquete, C. 2011; Monsalve, Z. y col., 2012).

El uso intensivo de agroquímicos ha creado una elevada toxicidad a los suelos observándose que la materia orgánica de los mismos se pierde por la reducción de la actividad enzimática y la biomasa microbiana. Debido a todos los efectos negativos generados por la utilización de los plaguicidas, en ciertas regiones se ha llegado a prohibir su uso para evitar mayor alteración ambiental (Khan, M. y col., 2011; Sharma, R. y col., 2009). Uno de los métodos utilizados para disminuir estos efectos nocivos es incrementar la técnica de rotación de cultivos o adición de material exógeno. El impacto de diferentes especies de cultivos usados en varias combinaciones hacen que los ciclos de las enfermedades se interrumpan o en el

caso de las leguminosas que fijan N_2 para el siguiente cultivo diferente a leguminosas. La descomposición de los residuos de cultivos proveen varios minerales, como por ejemplo macro y micronutrientes, los cuales son esenciales para la nutrición de la planta y para incrementar el contenido de materia orgánica (Srivastava, R. y col., 2007). Otra opción para favorecer el medio ambiente equivale a potencializar los métodos biológicos con bactericidas, fungicidas e insecticidas para el control de los fitófagos que atacan los diferentes cultivos (Zapata, R. y col., 2003; Hernández-Castillo y col. 2008).

El control biológico consiste en ubicar un organismo que sea antagónico a un patógeno, e incorporar éste patógeno en el hábitat del antagónico, de esta forma se puede reducir la población total o parcial del patógeno por medio de la capacidad natural para regular poblaciones de forma efectiva (Motta-Delgado, P. y Murcia-Ordoñez, B. 2011). Es así como surgen los bioinsumos para el control biológico de plagas y enfermedades en los principales cultivos agrícolas, que se caracterizan por ser altamente específicos contra las plagas o enfermedades objetivo. Ellos permiten conservar la productividad de los cultivos evitando contaminaciones sin poner en riesgo la salud de las personas que están en contacto directo o indirecto con los mismos, lo que favorece la práctica de una agricultura sustentable con menos empleo de productos químicos (Nava-Pérez y col., 2012).

Los bioplaguicidas se obtienen de materiales naturales entre los que se encuentran animales, plantas, microorganismos y minerales. Se dividen en dos grupos, el primero, plaguicidas microbianos, que incluyen bacterias, hongos, virus y protozoos; y el segundo, plaguicidas bioquímicos, entre los que están hormonas, reguladores del crecimiento de plantas e insectos, enzimas y sustancias de señalización química (Nava-Pérez y col., 2012).

Los plaguicidas microbianos se caracterizan por ser efectivos y por tener una alta especificidad y elevada patogenicidad contra una o más plagas de un cultivo de

importancia económica. Los microorganismos antagonistas utilizan diferentes mecanismos para inhibir el crecimiento de patógenos, por medio de la producción de metabolitos antimicrobianos, competencia por el espacio y por los nutrientes, y generación de mecanismos de defensa por parte de las plantas. En un estudio sobre el control de enfermedades en cultivos de tomate y zanahoria se utilizaron microorganismos antagonistas del hongo *Trichoderma* encontrándose que todos los aislados del hongo presentaban una reducción significativa de los Nematodos presentes en los cultivos por lo que los autores afirman que ésta puede ser una técnica efectiva para llevar a cabo el control de estos (Affokpon, A. y col., 2011; Collange, B. y col., 2011; Sharma, R. y col., 2009).

Los plaguicidas bioquímicos o botánicos son derivados de partes o de los ingredientes activos de las plantas. El efecto nocivo de los extractos vegetales se puede manifestar de diversas maneras como por ejemplo, toxicidad, mortalidad, inhibición del crecimiento, supresión de comportamiento reproductivo y reducción de la fertilidad y fecundidad. Es así como extractos derivados de especies vegetales han incrementado su interés científico por la presencia de actividad antimicrobiana, debida a la presencia de compuestos fenólicos, que presentan una rica fuente de biocidas y conservantes. Algunos de estos compuestos pueden ser derivados del ácido hidroxibenzoico, cumárico y derivados del ácido cafeico, los flavonoides y cumarinas, catequina, epicatequina, las proantocianidinas, los taninos, etc. (Zapata, R. y col., 2003; Lizcano, M. 2007; Polkowska-Kowalczyk, L. y col., 2007; Ruiz, C. 2008; Alzate, A. y col. 2009; Ávalos y Pérez, 2009; Carrillo, Y. y col., 2010; Gatto, M. y col., 2011).

1.3.1. Especies vegetales

En los últimos años la sociedad mundial ha priorizado los aspectos ambientales, y ha conducido una serie de investigaciones hacia el descubrimiento de nuevas alternativas para el manejo integrado de plagas y enfermedades, con menos efectos negativos al ambiente (Rodríguez, D. y Sanabria, M. 2005). Una de estas

alternativas es el uso de productos derivados de plantas donde se separan los componentes con alguna propiedad fisicoquímica y se obtiene de esta forma un extracto acuoso, que contiene todos los compuestos hidrosolubles de las mismas (Bandoni, A. y col., 2009), y aceites esenciales (terpenos, lignanos, alcaloides, esteroides), entre otros (Reinoso, Y. y col., 2007; Vaillant, D. y col., 2009).

Diversos extractos de especies vegetales presentan propiedades biocidas por la presencia de fitoquímicos bioactivos que son biodegradables, no tóxicos para los humanos, animales ni medio ambiente. Esta propiedad presenta un gran potencial para enfrentar plagas y enfermedades que generan pérdidas económicas en cultivos de interés (Gamboa y col., 2003; Lira-Saldivar, 2003). Desde el punto de vista bioquímico, las plantas desarrollan dos tipos de compuestos que les permiten tener una defensa al ataque de los hongos, uno de estos compuestos son los denominados antifúngicos constitutivos o inhibitinas, los cuales existen en la estructura de las plantas para detener la invasión de hongos; y los otros se conocen como las fitoalexinas que se producen como respuesta a la infección de patógenos más específicos por reacciones bioquímicas rápidas como la hidrólisis enzimática. Aunque según estudios realizados, se ha demostrado que dentro de una misma especie vegetal, una sustancia puede actuar en un órgano como inhibitina y en otro como fitoalexina (Montes, R. y col. 2000).

Las plantas tienen por lo general dos tipos de metabolismo conocidos como metabolismo primario y secundario. El metabolismo primario es aquel donde se forman diversos compuestos esenciales para la vida celular denominados metabolitos primarios entre los que se encuentran azúcares simples, aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos, polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, entre otros. El metabolismo secundario desarrollado por otras rutas metabólicas genera los metabolitos secundarios, dentro de los que se encuentran los responsables de los aromas de las plantas conocidos como aceites esenciales que son mezclas de compuestos alifáticos simples, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos, que hacen parte de los monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos. La biosíntesis de los metabolitos secundarios depende de

situaciones de estrés como ataque de microorganismos o insectos, falta de nutrientes, condiciones ambientales extremas, entre otros (Zapata, R. y col., 2003; Lizcano, M. 2007; Ruiz, C. 2008; Alzate, A. y col. 2009; Ávalos y Pérez, 2009; Carrillo, Y. y col., 2010).

A nivel mundial existen alrededor de 250.000 especies vegetales de las cuales sólo se conoce el 10% de ellas, considerándose como medicinales alrededor de 12 mil especies en total (Lizcano, M. 2007). En alguna literatura, el número de plantas aromáticas reportado se acerca a 3000 y de ellas sólo se comercializan 250. Aproximadamente el 65% del mercado de esencias proviene de especies cultivadas, el 1% de especies silvestres y el 33% de árboles, mayormente, explotaciones forestales (Ruíz, C. 2008). Según estadísticas de la Organización Mundial de la Salud, el 80% de la población mundial utiliza plantas medicinales para afrontar los problemas primarios de salud, ya sea dentro de las estrategias de cobertura sanitaria implementadas por los diferentes gobiernos, así como por propia utilización arraigada en costumbres ancestrales y culturales. Es por esto que en la actualidad las investigaciones se encuentran centradas en el estudio y desarrollo de nuevos medicamentos provenientes de especies vegetales, ya sea a través del empleo de la planta entera o sus extractos, el aislamiento de sus principios activos o a través de la hemisíntesis química tomando como punto de partida una molécula vegetal (Debenedetti, S. 2002).

Las plantas medicinales corresponden a aquellas especies vegetales cuyas partes o extractos presentan un principio activo, compuesto químico propio de la planta, que ejerce una acción farmacológica, benéfica o perjudicial, sobre un organismo vivo y por lo tanto se utilizan como drogas o medicamentos para el tratamiento de alguna afección o enfermedad que padece un individuo o animal (Montesdeoca, V. 2010).

Las plantas aromáticas son aquellas plantas medicinales cuya importancia económica radica en poseer principios activos que la hacen útil y que se encuentra

total o parcialmente en esencias o aceites esenciales. Los principios activos se pueden encontrar en hojas, tallo, bulbos, rizomas, raíz, flores, semillas y frutos.

Las plantas condimentarias son hierbas y arbustos de plantas aromáticas, por tanto medicinales, que por sus características organolépticas presentan aromas y sabores característicos e intensos que suelen utilizarse en la cocina como aderezos.

Algunas de las plantas domesticadas en Colombia y que se utilizaron en este proyecto por sus capacidades biológicas fueron ajeno, ají, ajo, altamisa, caléndula, cebolla roja, cola de caballo, hierbabuena, higuera, hinojo, manzanilla, menta poleo, milenrama, ortiga, romero, ruda y tomillo.

1.3.1.1. Compuestos fenólicos

Las plantas sintetizan una gran cantidad de moléculas orgánicas, como consecuencia de su metabolismo secundario. De esta forma se tienen los fenoles que generalmente se localizan en todas las partes de las plantas y su concentración es variable a lo largo del ciclo vegetativo. Los compuestos fenólicos comprenden a todas aquellas sustancias que poseen varias funciones fenol, nombre popular del hidroxibenceno, unido a estructuras aromáticas o alifáticas que frecuentemente se encuentran como derivados de ésteres, éteres y glicósidos. Los compuestos fenólicos se clasifican en fenoles simples, ácidos fenólicos, acetofenonas y ácidos fenil acéticos, cumarinas, benzofenonas y estilbenos, xantonas y flavonoides (Sánchez, M. y López, P. 208).

Estos compuestos participan de diversas funciones, como la asimilación de nutrientes, síntesis proteica, actividad enzimática, fotosíntesis, formación de componentes estructurales, alelopatía y defensa ante los factores adversos del ambiente. Son en gran medida responsables de las propiedades del color, características sensoriales (sabor, astringencia, dureza, etc.), características

nutritivas y propiedades antioxidantes de los alimentos de origen vegetal. Según se ha visto, los compuestos fenólicos han mostrado una amplia variedad de actividades biológicas: antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria, inmunomoduladora, antiviral, antiproliferativa, antimutagénica, anticarcinogénica, acciones vasodilatadoras, y prevención de enfermedades coronarias y desordenes neurodegenerativos (Politeo, O. y col., 2009).

1.3.1.1.1. Capacidad antioxidante

Las plantas aromáticas son una buena fuente de antioxidantes naturales tales como los compuestos fenólicos, vitaminas, minerales, colorantes naturales y enzimas. En el caso de los compuestos fenólicos, su capacidad antioxidante se debe a la elevada reactividad del grupo fenol la que depende del número y la localización de los grupos hidroxilo que contienen en su estructura, porque cuentan con uno o más anillos aromáticos con al menos un sustituyente hidroxilo, lo que les facilita secuestrar radicales libres, debido a la facilidad con la que el átomo de hidrógeno desde el grupo hidroxilo aromático puede ser donado a la especie radical, y a la estabilidad de la estructura resultante que soporta un electrón desapareado (Larrea, J. 2012).

Un radical libre es una especie química definida, una molécula o fragmento de molécula, que contiene uno o más electrones desapareados en su orbital externo lo que lo convierte en un compuesto altamente inestable y fugaz, con gran capacidad de formar otros radicales libres por reacciones químicas en cadena. Tienen una vida media del orden de milisegundos debido a su gran reactividad, aunque ella varía según el tipo de radical libre (Alzate, L.M. y col., 2011; Calderón Hidalgo, 2007).

Existen diferentes clases de radicales libres, entre las que se tienen las Especies Reactivas del Oxígeno (EROs) y las Especies Reactivas del Nitrógeno (ERNs). De estas especies reactivas, las más frecuentes y entre ellas las más distinguidas en

los sistemas biológicos son las EROs, entre las que se encuentra el anión superóxido (O_2^-), estado de reducción del oxígeno de un electrón, formado en muchas reacciones de autooxidación, es relativamente poco reactivo, pero potencialmente tóxico, porque puede iniciar reacciones que den lugar a otros intermediarios a su vez muy reactivos; el radical hidroxilo (HO), es el estado de reducción de tres electrones de la molécula de oxígeno, es la especie más reactiva, con una vida media estimada de alrededor de 10^{-9} segundos; y los radicales formados en la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados (alcoxilo (alkO) y alquilperoxilo (alkOO)). Los radicales libres inician y causan la peroxidación de los lípidos (triglicéridos, fosfolípidos, lipoproteínas), particularmente aquellos que componen las membranas celulares (Alzate, L.M. y col., 2011).

Los antioxidantes son moléculas que a bajas concentraciones, respecto a las de un sustrato oxidable, retardan o previenen su oxidación. El antioxidante al chocar con el radical libre cede un electrón, se oxida y se transforma en un radical libre débil no tóxico. Los compuestos fenólicos estabilizan los radicales libres al ceder un hidrógeno de sus grupos hidroxilos, formándose un puente de hidrógeno entre dos grupos cercanos. El grado de actividad de los compuestos fenólicos y de otros muchos antioxidantes, está relacionado con el número de grupos hidroxilo que posee la molécula (Toapanta, S. 2012).

1.3.1.1.2. Capacidad antimicrobiana

Como ya se mencionó, son muchos los compuestos fenólicos esenciales para la vida vegetal, como por ejemplo, la defensa que suministran a las plantas contra ataques microbianos (Apak, R. y col., 2007). Por lo tanto, se han utilizado para prevenir el crecimiento de bacterias nativas y contaminantes en post-cosecha. Nychas, J. (1995), reportó la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales obtenidos a partir de orégano, tomillo, salvia, romero, clavo, cilantro, el ajo y la cebolla contra bacterias y hongos. También, Gachkar, L. y col. (2007), informaron

de la composición química, actividad antibacteriana y antioxidante de los aceites esenciales de *Cuminum cyminum* y *Rosmarinus officinalis* obtenidos por destilación de vapor. Los aceites esenciales de plantas se han utilizado durante miles de años para la conservación de alimentos, productos farmacéuticos, en medicina alternativa y terapias naturales.

1.3.2. Aplicaciones con metabolitos secundarios

Uno de los objetivos de desarrollo del milenio es garantizar el sustento del medio ambiente, es así como se presenta un incremento en el interés por la utilización de productos de origen biológico que sean amigables al ambiente. Por tal motivo, hoy en día se observa un amplio interés en el uso de bioinsumos y la utilización de biotecnologías agrícolas para obtener un mejoramiento en la calidad de vida de los productores, bajos costos, fácil acceso y que no generen contaminación. Un bioinsumo es un producto de origen biológico utilizado con fines de nutrición vegetal, manejo integral de plagas o mejoramiento de las características del suelo. Incluye agentes biológicos para el control de plagas, inoculantes biológicos, bioabonos, inóculos microbiales para compostaje y productos bioquímicos (Zambrano y Riaño, 2008; Wagner, M.L. 2007). Entre las propiedades que debe presentar un bioinsumo se tiene que no debe exhibir efectos nocivos a los humanos y animales que estén en contacto directo con el mismo, ser efectivo a bajas concentraciones, presentar una eficacia para un amplio rango de patógenos, se debe producir de forma fácil, debe ser económico, fácil de almacenar, entre otros (Murcia y Salamanca, 2006).

Los extractos acuosos de las especies vegetales están conformados por elementos activos producto del metabolismo vegetal, es decir, contienen gran cantidad de sustancias químicas que interactúan de modo sinérgico (Viveros, J. y Castaño, J., 2006). Los aceites esenciales, que hasta hace poco eran empleados solamente en la industria farmacéutica y cosmética, en la actualidad tienen gran importancia por su efecto en el control de plagas y enfermedades de las plantas

(Alzate, A. y col., 2009). Los aceites esenciales y los extractos vegetales son mezclas complejas de metabolitos secundarios que cubren un amplio espectro de efectos farmacológicos mostrando diversas propiedades biológicas (García, C., 2010)

Según Lizcano, M. (2007), la capacidad antifúngica del tomillo (*Thymus vulgaris*) es atribuida a la presencia de compuestos monoterpénicos fenólicos donde la reactividad de los grupos hidroxifenólicos forman puentes de hidrógeno con los sitios activos de diversas enzimas, lo que trae como consecuencia un rompimiento de la membrana citoplasmática del microorganismo destruyendo la capacidad selectiva y permitiendo el escape de compuestos intracelulares lo que genera una inhibición del microorganismo.

Son muchos los estudios que se han realizado sobre diferentes especies de plantas por su actividad contra variadas especies de hongos fitopatógenos (Gamboa, R. y col., 2003; Zapata, R. y col., 2003; Rodríguez, D. y Sanabria, M. 2005; Viveros, J. y Castaño, J., 2006; Lizcano, M. 2007; Hernández-Castillo, F.D. y col. 2008; Alzate, A. y col., 2009; Salazar, C. y Betancourth, C., 2009; Carrillo, Y. y col., 2010; Osuagwu, G. y Edeoga, H., 2010; Saldarriaga, L. y col., 2010; entre otros). La formulación de productos vegetales se ha centrado en extractos acuosos y hexánicos, polvos, aceites esenciales y metabolitos secundarios antifúngicos. Según los estudios elaborados se determinó que las plantas con las que se han realizado los ensayos interactúan con los hongos y la respuesta de los patógenos varía desde la estimulación biológica hasta la completa inhibición (Montes, R. y col. 2000).

Abou-Jawdah, Y. y col. (2002), utilizaron extractos de éter de petróleo y metanol de nueve especies vegetales para evaluar la actividad fungicida *in vitro* contra nueve hongos fitopatógenos (*Botrytis cinerea*, *Alternaria solani*, *Penicillium sp.*, *Cladosporium sp.*, *Fusarium oxysporum f. sp. melonis*, *Verticillium dahlia*, *Phytophthora infestans* y *Rhizoctonia solani*), encontrando que los extractos de

éter de petróleo presentan mayor porcentaje de inhibición contra los hongos que el extracto con metanol.

Lira-Saldivar, R.H., (2003), evaluó los extractos de arbustos de la gobernadora (*Larrea tridentata*) los cuales presentaron acción antifúngica bajo condiciones *in vitro* en por lo menos 17 hongos fitopatógenos que causan grandes pérdidas económicas. Entre los principales compuestos presentes en la resina de la gobernadora se encuentran los lignanos fenólicos, saponinas, flavonoides, aminoácidos y minerales. Se evaluó el efecto fungicida de la gobernadora utilizando extractos crudos de cloroformo y etanol sobre los hongos *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Pythium sp. Pringsh.* y *Rhizopus migricans* Ehrenb, presentando inhibición sobre los mismos. De igual forma el autor llegó a concluir que la efectividad para inhibir el crecimiento de los hongos es independiente de los solventes utilizados.

Soylu, E. y col. (2005), realizaron un estudio en el que analizaron la actividad fungicida de los aceites esenciales de diferentes plantas aromáticas contra la inhibición de crecimiento del hongo *P. infestans*. Y encontraron que todas las muestras presentaban inhibición del hongo en estudio.

El aceite esencial y el extracto metanólico de *Mentha longifolia ssp. longifolia* se utilizaron para evaluar la actividad antimicrobiana contra 30 microorganismos, donde se encontró que el aceite esencial presenta inhibición en 15 hongos, mientras que con el extracto metanólico se mantienen prácticamente inactivos. Los hongos evaluados fueron: *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus varicolor*, *Fusarium acuminatum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium tabacinum*, *Moliniana* (Gulluce, M. y col., 2007).

El aceite esencial de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* Linn se utilizó para evaluar la actividad fungicida contra varias especies de hongos. Se observó inhibición completa del hongo *Aspergillus flavus* a 100 µg/ml y de igual forma se

presenta toxicidad contra *Aspergillus flavus* Link., *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Botryodiplodia theobromae*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii*, *Macrophomina* (Kumar, R. y col. 2007).

En otra investigación se utilizaron extractos etanólicos de plantas medicinales los cuales presentaron actividad fungitóxica frente a hongos micotóxicos (*Aspergillus section flavi*) aislados de alimentos balanceados. Los autores recomiendan aislar los metabolitos secundarios responsables de dicha actividad para su probable aplicación como antifúngicos naturales (Quiroga, E.N. y col. 2007).

Se empleó el aceite esencial de *Salvia hydrangea* para determinar sus componentes por medio de GC-MS, se identificaron 44 compuestos diferentes, de los cuales los más representativos fueron: alcanfor, α -humuleno, cis-sesquisabineno hidrato, mirmirtenol, b-bisabolol y 1,8-cineol. Con este aceite se evaluó el efecto fungicida sobre 33 hongos, presentando inhibición al 100%: *Fusarium incarnatum*, *Fusarium nivale*, *Alternaria solani*, *Pythium ultimum* y *Rhizoctonia solani* (Kotan, R. y col. 2008).

El comportamiento de 14 aceites esenciales de especies vegetales fueron evaluadas contra diferentes cepas de hongos y se determinó que el aceite de *Thymus vulgaris* L. presenta total inhibición contra la cepa de *Aspergillus flavus* y exhibe un amplio espectro fungicida contra *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium herbarum*, *Curvularia lunata*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria alternata* y *Botryodiplodia theobromae* (Kumar, A. y col., 2008).

Rivera, D. y col. (2010), evaluaron el efecto de diferentes mezclas de agroquímicos sobre *Azotobacter chroococcum* AC1. Al evaluar la mezcla de los agroquímicos se presenta un efecto inhibitorio mayor probablemente porque existe sinergia de todos o de algunos de los componentes de la mezcla.

Según el Boletín de Fitopatologías (2007), la empresa Gruidag International S.A. de C.V. que pertenece a la industria química, desarrolló un producto de amplio espectro (FITO SP) que actúa como fungicida-bactericida de alta eficiencia biológica y está compuesto por una mezcla de metilen bistiocianato y 2-(Tiocianometiltiobenzotiazol). Dicha empresa demostró la eficiencia del producto sobre hongos como *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Streptomyces* y bacterias como *Bacillus* y *Erwinias*.

Almádoz, J. y col. (2009), desarrollaron un desinfectante de semilla efectivo en el cultivo de frijol para el control de saltahojas (*Empoasca krameri*), mosca blanca (*Bemisia tabaci*) y el crisomélido (*Diabrotica balteata*), y en el control de enfermedades *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp., *Rhizoctonia* sp. y *M. phaseolina*. Dicho desinfectante consta de una mezcla de tres ingredientes activos: el thiamethoxam – insecticida sistémico neonicotinoide, el difenoconazol, fungicida del grupo de los triazoles y el mefenoxam, fungicida de la familia de las fenilaminas.

La formulación de productos vegetales se ha centrado en extractos acuosos y hexánicos, polvos, aceites esenciales y metabolitos secundarios antifúngicos. Según los estudios elaborados se determinó que las plantas con las que se han realizado los ensayos interactúan con los hongos y la respuesta de los patógenos varía desde la estimulación biológica hasta la completa inhibición (Montes, R. y col. 2000).

Abou-Jawdah, Y. y col. (2002), utilizaron extractos de éter de petróleo y metanólicos de nueve especies vegetales para evaluar la actividad fungicida in vitro contra nueve hongos fitopatógenos (*Botrytis cinerea*, *Alternaria solani*, *Penicillium* sp. *Cladosporium* sp., *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*, *Verticillium dahlia*, *Phytophthora infestans* y *Rhizoctonia solani*), y se encontró que los extractos de éter de petróleo presentan mayor porcentaje de inhibición contra los hongos que el extracto con metanol.

Lira-Saldivar, R.H. (2003), evaluó los extractos de arbustos de la gobernadora (*Larrea tridentata*) los cuales presentaron acción antifúngica bajo condiciones *in vitro* en por lo menos 17 hongos fitopatógenos de gran importancia económica. Entre los principales compuestos presentes en la resina de la gobernadora se encuentran los lignanos fenólicos, saponinas, flavonoides, aminoácidos y minerales. Según los resultados, los extractos crudos de cloroformo y etanol de la gobernadora presentaron acción fungicida contra *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Pythium sp. Pringsh.* y *Rhizopus migricans Ehrenb.* De igual forma el autor concluyó que la efectividad para inhibir el crecimiento de los hongos es independiente de los solventes utilizados.

El aceite esencial y el extracto metanólico de *Mentha longifolia ssp. Longifolia*, fueron utilizados para evaluar su actividad antimicrobiana contra 30 microorganismos (*Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus variecolor*, *Fusarium acuminatum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium tabacinum*, *Moliniana*, entre otros), y se observó que el aceite esencial presenta inhibición en 15 hongos, mientras que el extracto metanólico no presenta actividad alguna (Gulluce, M. y col., 2007).

El aceite esencial de *Salvia hydrangea* fue analizado por medio de GC-MS, identificando 44 compuestos diferentes, los más representativos fueron alcanfor, α -humuleno, cis-sesquisabineno hidrato, mirmirtenol, β -bisabolol y 1,8-cineol. Con este aceite se evaluó el efecto fungicida sobre 33 hongos patógenos y se observó inhibición completa contra *Fusarium incarnatum*, *Fusarium nivale*, *Alternaria solani*, *Pythium ultimum* y *Rhizoctonia solani* (Kotan, R. y col. 2008).

El comportamiento de 14 aceites esenciales de especies vegetales fueron evaluadas contra diferentes cepas de hongos y se determinó que el aceite de *Thymus vulgaris* L. presenta total inhibición contra la cepa de *Aspergillus flavus* y exhibe un amplio espectro fungicida contra *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium*

herbarum, *Curvularia lunata*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria alternata* y *Botryodiplodia theobromae* (Kumar, A. y col., 2008).

La actividad fungicida de cinco monoterpenos (mentol, timol, alcanfor, citronelal y 1,8 cineol) que se encuentran normalmente en los aceites esenciales, se evaluó sobre un aislado de *Rhizoctonia solani*, causante de la rizoctoniasis en papa. Cada uno de los monoterpenos fueron empleados en concentraciones de 0.5, 0.1 y 0.05% (p/v) Los resultados encontrados revelaron que timol, mentol y citronelal tuvieron el 100% de inhibición sobre el hongo en estudio (Vaillant, D. y col. 2009).

La ruda (*Ruta graveolens*) es un arbusto de hojas perennes que contiene diversos metabolitos secundarios incluyendo fumarocumarinas, alcaloides como la quinolona y la acridona y flavonoides que le confieren su carácter biológico (Stashenko, E. y col., 2000; García, C. y col., 2010).

1. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la bioactividad y composición química de hidrosoles y aceites esenciales de diecisiete especies vegetales para la formulación preliminar de un bioinsumo en el control de los hongos *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*, presentes en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum*).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la concentración de polifenoles totales, actividad antioxidante y fungicida de los extractos (hidrosoles y aceites esenciales) de diecisiete especies vegetales para establecer la relación con la composición química de los extractos y la inhibición de los hongos presentes en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum*)

Desarrollar 3 formulaciones preliminares de bioinsumos con los aceites esenciales e hidrosoles que presenten las mejores características de bioactividad hacia los hongos presentes en el cultivo de papa, evaluando su bioactividad frente a una formulación comercial de amplio espectro utilizado para ese cultivo

3. JUSTIFICACIÓN

Uno de los cultivos más importantes en Colombia es el de la papa (*Solanum tuberosum*) por la cantidad de tierra cultivada y por la importancia en la alimentación de los colombianos. Las personas encargadas de dichos cultivos presentan un bajo nivel de escolaridad lo que genera un limitado acceso a los factores de producción, servicios públicos, salud, asistencia técnica agrícola, obras de infraestructura, entre otros. Es así como el sistema de producción se caracteriza por manejar una tecnología tradicional en el 90% de los casos. La tecnología tradicional tiene como características principales el uso intensivo de fertilizantes, uso intensivo de plaguicidas, uso de maquinaria, entre otros. Es decir, utiliza diferentes factores productivos que se enfocan en asegurar altos rendimientos en los cultivos, sin considerar el uso racional de los recursos naturales y la sostenibilidad del medio ambiente (Suárez, S. 2004).

Las principales enfermedades generadas por hongos que afectan el cultivo de la papa en Colombia son: gota de la papa (*Phytophthora infestans*), tizón temprano (*Alternaria solani*), roya común (*Puccinia pittieriana*), cenicilla o mildew polvoso (*Erysiphe cichoracearum*), rizoctoniasis (*Rhizoctonia solani*), mortaja blanca o palomillo (*Rosellinia* sp), rosa polvosa (*Spongospora subterranea*), marchitez temprana (*Verticillium albo-atrum*), podredumbre – fusariosis (*Fusarium* spp) (Piñeros, C. 2009).

La gota o tizón tardío, causada por el hongo Oomyceto (*P. infestans*), es probablemente la enfermedad más importante que ataca el cultivo de la papa en el mundo, causando las mayores pérdidas en el cultivo en todo el mundo. Solamente en Latinoamérica se estima una reducción o pérdida del 30-35% de la producción total. El conocimiento de esta enfermedad es muy importante, así como las condiciones ambientales de la zona de influencia, sobre todo teniendo en cuenta que todo material vegetal sobre o dentro del cual se desarrollen estructuras del

agente casual, es fuente de inóculo de *P. infestans* y permite su multiplicación y diseminación. En algunas de las áreas paperas, el cultivo de la papa se encuentra durante todo el año en diversos estados fisiológicos, lo cual permite que los ciclos vegetativos de la mayoría de las enfermedades se presenten permanentemente (Sánchez, G. 2000).

De otro lado, según indican investigaciones en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, la Rizoctoniasis de la papa, también conocida como costra negra por la presencia de esclerocios en la superficie de los tubérculos afectados, se trata de una enfermedad que reduce la producción de papa entre el 10% y el 26% (Blanco, D. 2013).

El uso intensivo de fertilizantes sintéticos en el cultivo buscando prevenir plagas y enfermedades genera con el tiempo una resistencia de dichos microorganismos y hace que los productos se vuelvan ineficientes y que sólo generan daños a la salud y al ecosistema (Zapata, R. y col., 2003). Con referencia a lo anterior es necesario potencializar los métodos biológicos para el control de los cultivos. En la actualidad existe una creciente demanda de los consumidores por utilizar o consumir productos agrícolas sin residuos agroquímicos o con bajas trazas de estos. En ese sentido se hace necesaria la evaluación de prácticas limpias y amigables enfocadas a disminuir aplicaciones de agroquímicos y así obtener cultivos con valor agregado que mejoren la calidad de vida tanto de productores como de consumidores (Rodríguez, D. y Sanabria, M. 2005; Salazar y Betancourth, 2009).

Frente al uso creciente de agroquímicos tanto en Colombia como en numerosos países del mundo, la lista de argumentos ambientalistas o a favor de la salud humana cada vez es más amplia, por los impactos nocivos de las diferentes moléculas de síntesis sobre la salud humana, la vida microbiana, la mesoflora, los insectos y las especies vegetales sometidas directa o indirectamente a las fumigaciones de estas moléculas. Es así como se están buscando alternativas

más respetuosas del medio ambiente y de la salud de los trabajadores mediante el aprovechamiento de mecanismos naturales bacterianos o vegetales que permiten asegurar el control de plagas y enfermedades (Rodríguez y Sanabria 2005; Carrillo, Y. y col., 2010).

En Colombia se presenta un notable incremento en la producción de bioinsumos de extractos vegetales a pesar de que la biodiversidad de muchas ecorregiones aún no ha sido ampliamente explorada, ni química ni genéticamente, lo que representa un amplio potencial para investigar.

Las investigaciones realizadas sobre las actividades antimicrobianas que presentan diversas especies vegetales reportan la efectividad de ciertos compuestos activos de las plantas sobre microorganismos específicos, pero dichas investigaciones se basan en tomar de forma independiente los compuestos, es decir, trabajan aceites esenciales o extractos acuosos de forma separada. En referencias bibliográficas se encuentra que existe un incremento de la actividad antimicrobiana cuando se mezclan compuestos de diferentes fertilizantes sintéticos, pero según las nuevas regulaciones y tendencias, éstos deben ser remplazados para beneficiar el medio ambiente y la salud de las personas (Rodríguez y Sanabria 2005). Por tal motivo en este proyecto se evaluaron diecisiete especies vegetales para determinar la composición química y bioactividad de los hidrosoles, aceites esenciales y mezclas sobre el crecimiento de *P. infestans*, *F. oxysporum* y *R. solani*, presentes en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum*). Es así como en la Universidad de la Sabana se desarrolló un proyecto de investigación sobre “Diseño de un prototipo piloto para la obtención de Bioinsumos agrícolas de origen vegetal con actividad fungicida e insecticida para el cultivo de *Solanum tuberosum*”, del cual hace parte la presente investigación. De esta forma se espera responder a la siguiente pregunta global: ¿Cuál es el comportamiento de la bioactividad de extractos y aceites esenciales de diecisiete especies vegetales con actividad fungicida, cuando se mezclan en

diferentes proporciones frente a *Phytophthora infestans*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* presentes en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum*)?

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIALES

4.1.1 Material biológico

Los microorganismos utilizados en este proyecto fueron: *Phytophthora infestans*, donado por la Universidad Nacional de Colombia, facultad de Agronomía, laboratorio de Fitopatología. *Fusarium oxysporum*, adquirido en la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica), Laboratorio Nacional de Diagnóstico Fitosanitario; y *Rhizoctonia solani*, cedido por la Pontificia Universidad Javeriana. Los hongos *F. oxysporum* y *R. solani* se mantienen en agar papa-dextrosa (PDA) a 25°C, y *P. infestans* en agar arveja a 25°C por un tiempo máximo de 7 días cada uno.

4.1.2 Material vegetal

Los hidrosoles y aceites esenciales de cada una de las especies vegetales utilizadas, fueron adquiridos durante el desarrollo del proyecto denominado “Diseño de un prototipo piloto para la obtención de Bioinsumos agrícolas de origen vegetal con actividad fungicida e insecticida para el cultivo de *Solanum tuberosum*” del cual hace parte esta investigación. Las especies vegetales utilizadas, fueron seleccionadas a partir de una matriz sobre información fitoquímica y bioactividad fungicida e insecticida de las especies seleccionadas, desarrollada por la empresa beneficiaria del proyecto FARMAVERDE CTA. En la Tabla 1, se encuentra el listado de las especies seleccionadas y el tipo de extracto que se utilizó en esta investigación.

Tabla 1. Especies vegetales utilizadas en la investigación

Nombre Común	Nombre Científico	Tipo de extracto	
		Hidrosol	Aceite esencial
Ajenjo	<i>Artemisia absinthium</i>	x	x
Ají	<i>Capsicum frutescens</i>	x	x
Ajo	<i>Allium sativum</i>	x	x
Altamisa	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	x	x
Caléndula	<i>Calendula officinalis</i>	x	x
Cebolla roja	<i>Allium cepa</i>	x	x
Cola de caballo	<i>Equisetum bogotense</i>	x	x
Hierbabuena	<i>Mentha spicata</i>	x	x
Higuerilla	<i>Ricinus communis</i>	x	x
Hinojo	<i>Foeniculum vulgare</i>	x	x
Manzanilla	<i>Matricaria recutita</i>	x	x
Menta poleo	<i>Mentha pulegium</i>	x	x
Milenrama	<i>Achillea millefolium</i>	x	x
Ortiga	<i>Urtica dioica</i>	x	x
Romero	<i>Rosmarinus officinalis</i>	x	x
Ruda	<i>Ruta graveolens</i>	x	x
Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i>	x	x

4.1.3 Reactivos

ABTS•+ (2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline- 6-sulfonic acid) diammonium salt), DPPH• (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine), BHA (3-tert-Butyl-4-hydroxyanisole), BHT (2,6-di-tert-Butyl-4-methylphenol), Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid), y persulfato potásico ($K_2S_2O_8$), fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Chemical Company. El metanol y el etanol eran de grado HPLC. Acetato de sodio ($C_2H_3NaO_2$), ácido acético (CH_3CO_2H), tricloruro férrico ($FeCl_3 \cdot H_2O$), sulfato de hierro ($FeSO_4 \cdot 2H_2O$) y ácido clorhídrico (HCl), ácido gálico, reactivo de Folin-Ciocalteu y ácido ascórbico fueron de Panreac. Papa-Dextrosa-Agar (PDA) y Agar-Agar fueron de Scharlau.

4.2. METODOLOGÍA

4.2.1. Identificación de compuestos químicos

La identificación de los compuestos químicos volátiles de cada uno de los extractos a evaluar se realizó por medio de Cromatografía de gases con espectrometría de masas (GC/MS) en el laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander.

Para el caso de los hidrosoles, la extracción-concentración simultánea de los compuestos de la fase vapor de las muestras se llevó a cabo usando la técnica de microextracción en fase sólida (HSSPME), por monitoreo en fase vapor (*headspace*) empleando una fibra de sílice fundida recubierta con PDMS/DVB de 65 μm de espesor.

La preparación de las muestras de aceite esencial se llevó a cabo por dilución e inyección directa de los aceites esenciales al equipo cromatográfico.

El análisis cromatográfico se realizó en un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Plus* acoplado a un detector selectivo de masas (MSD, Agilent Technologies 5973) operado en el modo de barrido completo de radiofrecuencias (full scan). La columna empleada en el análisis fue DB-5MS (J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU) [5%-fenilpoli(dimetilsiloxano), 60 m x 0.25 mm x 0.25 μm]. La inyección se realizó en modo *Split* (30:1) y con el dispositivo de SPME.

4.2.2. Polifenoles totales

Para determinar los polifenoles totales se utilizó el método Folin-Ciocalteu descrito por Vásquez, A. y col. (2007). El método de Folin-Ciocalteu activado con una base, como carbonato de sodio, se basa en la reducción de un complejo fosfowolframato-fosfomolibdato por compuestos fenólicos generando productos en la reacción de color azul que absorben a una longitud de onda de 750 nm (Stratil,

P. y col. 2006). Este método utiliza como patrón y referencia el ácido gálico. El método fue adaptado para el uso de microplatos con el siguiente procedimiento: a 210 µL de agua destilada se le adicionaron 30 µL extracto, 15 µL del reactivo de Folin Ciocalteu, se dejó reposar durante 5 minutos, y luego se adicionaron 45 µL de carbonato de sodio al 20%. Se dejó reaccionar por 120 minutos. Los ensayos fueron efectuados en un equipo iMark™ Microplate Reader a una longitud de onda de 750 nm. La curva de calibración se elaboró con ácido gálico a concentraciones entre 10 y 150 mg/mL. El contenido total de polifenoles se expresó como equivalentes de ácido gálico/100 g de planta seca. Todas las medidas fueron realizadas por triplicado.

4.2.3. Actividad antioxidante

4.2.3.1. DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)

El método del DPPH, consiste en que este radical tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por reacción con una sustancia antioxidante (Sharma, O. y col. 2009). La evaluación de la actividad se realizó por macro y micro-cuantificación.

Macro-método. La macro cuantificación se llevó a cabo como se describe por Mishra, K. y col., (2012), cuyo procedimiento consistió en preparar 5 concentraciones diferentes por triplicado de cada extracto a evaluar. De cada una de estas soluciones se tomaron 0,5 mL y se mezclaron con 2,0 mL de solución metanólica de DPPH• (20 mg/L), se incubaron por 30 minutos en la oscuridad y se leyó a una longitud de onda de 517 nm, utilizando un espectrofotómetro Thermo Scientific GENESYS™ 10S Biomate UV/VIS. Se determinó el porcentaje de disminución de absorbancia en los extractos por medio de la siguiente ecuación (Ec. 1):

$$\% \text{ disminución Abs} = \frac{\text{Abs control} - \text{Abs extracto}}{\text{Abs control}} * 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

Se graficó la concentración del extracto contra porcentaje de disminución de la absorbancia y se interpoló el valor IC_{50} . La actividad antioxidante de cada uno de los extractos evaluados es expresada como IC_{50} , y se definió como la concentración del extracto evaluado requerida para producir una disminución del 50% de la concentración inicial del DPPH•.

Micro-método. Se determinó la actividad antioxidante por medio de la micro-cuantificación utilizando el método DPPH descrito por Rojas-Barquera y Narváez-Cuenca (2009) adaptado a microplatos (platos de 96 pozos) por Nuengchamnon, N. y col. (2009). Se preparó una solución stock de DPPH• 0,6 mM en metanol y se almacenó a $-20^{\circ}C$ en la oscuridad. A partir de esta solución se realizaron diluciones con metanol hasta obtener una solución con una absorbancia de $1,1 \pm 0,02$ a 515 nm. Se elaboró una curva de calibración con Trolox a concentraciones entre 0 y 150 $\mu g/mL$. Para la reacción se colocaron 75 μL del extracto a evaluar y 150 μL de DPPH• ajustado a la absorbancia de trabajo y se incubaron los microplatos durante 30 minutos en la oscuridad. Se realizó la lectura de los platos en el equipo iMark™ Microplate Reader a una longitud de onda de 515 nm. Las medidas se realizaron por triplicado. BHA y BHT se utilizaron como controles positivos. Los resultados de capacidad antioxidante se expresaron como equivalentes Trolox.

4.2.3.2. ABTS (2,2-azinobis-(3 etilbenzotiazolin-6-sulfónico)

Otra forma de determinar la capacidad antioxidante es utilizar el método del ABTS•+ basado en la oxidación del ABTS por el persulfato potásico para formar el radical ABTS•+, que es reducido en presencia de antioxidantes donadores de hidrógeno. La evaluación de la actividad por el método del ABTS se realizó por macro y micro-cuantificación.

Macro-método. El ensayo por macro-cuantificación se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Erkan, N. et al. (2008). El radical catión (ABTS•+) se obtuvo por medio de la reacción de ABTS• 3,5 mM con 1,25 mM (concentración

final) de persulfato de potasio y se conservó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 12 h. La solución se diluyó con etanol hasta obtener una absorbancia de $0,70 \pm 0,02$ a 732 nm utilizando un espectrofotómetro Thermo Scientific GENESYS™ 10S Biomate UV/VIS. Se elaboró una curva de calibración con Trolox a concentraciones entre 5 y 50 μM . Para la reacción se colocaron 2000 μL de solución de ABTS•+ con 500 μL de cada uno de las diluciones a evaluar. Se dejó reaccionar por 30 minutos en la oscuridad. Todos los extractos fueron evaluados por triplicado. Se realizó la lectura en espectrofotómetro a 732 nm. La actividad antioxidante de cada uno de los extractos evaluados es interpolada de la ecuación de la recta y los resultados se expresaron como equivalentes Trolox.

Micro-método. Se preparó una solución de ABTS 3,5 mM con 10% de persulfato potásico 12,5 mM y se almacenó a -20°C en la oscuridad. La solución de trabajo se preparó por medio de la dilución de la solución stock con buffer fosfato pH 7,4 hasta obtener una absorbancia de $0,8 \pm 0,02$ a 735 nm. Se elaboró una curva de calibración con Trolox a concentraciones entre 0 y 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para la reacción se colocaron 50 μL del extracto a evaluar y 200 μL de ABTS•+, se incubaron los microplatos durante 30 minutos en la oscuridad. Se realizó la lectura de los platos en el equipo iMark™ Microplate Reader a una longitud de onda de 735 nm. Las medidas se realizaron por triplicado. BHA y BHT se utilizaron como controles positivos. Los resultados de capacidad antioxidante se expresaron como equivalentes Trolox.

4.2.3.3. FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

De igual forma se determinó la capacidad antioxidante por medio del método FRAP que se fundamenta en la capacidad de reducir el complejo formado por el hierro (III) y TPTZ hasta hierro (II)-TPTZ, mediante un donante de electrones (antioxidante), formándose un compuesto de color azul que presenta un máximo de absorción a 595 nm. La medida espectrofotométrica a esa longitud de onda es proporcional a la capacidad reductora de la muestra. La metodología a seguir fue

adaptada a microplatos según lo descrito por Müller, L. y col. (2010), el procedimiento para preparar el reactivo fue el siguiente: se colocaron en 10 volúmenes de 300 mmol/L de buffer acetato (pH 3,6), 10 volúmenes de 20 mmol/L de FeCl₃ y un volumen de 10 mmol/L de TPTZ en 40 mmol/L de HCl. Se elaboró una curva de calibración con Trolox a concentraciones entre 50 y 400 µM. Para la reacción se tomaron 50 µL del extracto a evaluar y 200 µL de FRAP. Se incubaron los microplatos durante 8 minutos en la oscuridad. Se realizó la lectura de los platos en el equipo iMark™ Microplate Reader a una longitud de onda de 595 nm. Las medidas se realizaron por triplicado. BHA y BHT se utilizaron como controles positivos. Los resultados de capacidad antioxidante se expresaron como equivalentes Trolox.

4.2.4. Actividad fungicida

Para la multiplicación de los patógenos, se emplearon los medios de agar-arveja (cuya composición es: 60 gramos de arveja, 20 gramos de sacarosa, 20 gramos de agar y 1 litro de agua destilada) y agar- papa-dextrosa (PDA) (39 kg/L). Los subcultivos para mantener los hongos se lograron mediante la transferencia de una cantidad micelial sobre el agar respectivo fresco bajo condiciones de laboratorio. Luego de subcultivar cada uno de los hongos de trabajo, se activó su virulencia mediante la inoculación del patógeno en rodajas (0.5-1.00 cm de grosor) de papa variedad Tuquerreña previamente desinfectada (15 minutos en hipoclorito de sodio al 2% y etanol al 96% por 1 minuto). Al cabo de cinco días se observó el crecimiento del micelio. Este micelio fue nuevamente sembrado en medio de cultivo respectivo (Díaz, M. y col., 2003). La determinación de la actividad fungicida se realizó por macro y micro-cuantificación.

Micro-método: Concentración Mínima Inhibitoria. El efecto inhibitorio se llevó a cabo según los procedimientos descritos por Broekaert y col. (1990) y Muñoz, A. (2008), mediante microplatos de 96 pozos estériles. El crecimiento se sigue por la variación de la densidad óptica (DO) del microcultivo. El procedimiento fue el

siguiente: se prepararon soluciones a concentraciones de 10, 20, 30, 40, y 50 µg/mL de los extractos a evaluar disueltos en caldo papa dextrosa (PDB) por triplicado. A 80 µL de una suspensión de esporas de cada uno de los hongos en una concentración de $2,5 \times 10^4$ esporas/mL se adicionaron 20 µL de cada una de las diluciones de los extractos. Se dejó reposar 30 minutos y se realizó la lectura del microplato en el equipo iMark™ Microplate Reader a una longitud de 490 nm. Se incubó el microplato a 25°C durante 48 horas y luego se realizó una nueva lectura del microplato a 490 nm. El porcentaje de inhibición fue calculado con la siguiente fórmula (Ec. 2):

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Abs inicial (0 h)} - \text{Abs final (48h)}}{\text{Abs inicial (0 h)}} * 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

Macro-método: difusión en disco en agar. Se desarrollaron los protocolos de Cano, C. y col., (2008) y Al-Reza, S. y col., (2010), con algunas modificaciones: en 20 mL de agar fundido a 35°C se mezcló de forma aséptica 1 mL de la suspensión fúngica (1×10^4 UFC/mL) y se sirvió en caja de petri desechable (94x16mm). Luego de gelificar el agar, se colocaron discos de papel Whatman estériles de 6 mm de diámetro sobre el agar. Se adicionaron 10 µL de cada uno de los extractos a evaluar. Se dejó reposar por 30 minutos a temperatura ambiente y se incubaron las cajas a 25°C entre 5-15 días según el hongo en evaluación. Se obtuvo un registro fotográfico y por medio del software de ImageJ se determinó el halo de inhibición. Las cajas sin extracto se utilizaron como control negativo. Como control positivo se utilizó el fungicida agrícola sistémico Zellus. Los ensayos se realizaron por triplicado para cada tipo de extracto.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Identificación de compuestos químicos

La identificación tentativa de los compuestos en la fase vapor monitoreada por HS-SPME/GC-MS, operado en el modo de barrido completo de radiofrecuencia (full scan) de las muestras, se estableció con base en sus espectros de masas, usando las bases de datos de Adams, Wiley 138 y NIST05. En el Anexo A se presenta la composición química de cada extracto evaluado y los cromatogramas del hidrosol y aceite esencial de Tomillo (*Thymus vulgaris*), respectivamente. Según estos resultados, se observa que la cantidad de compuestos para cada extracto oscila entre 2 y 61 para los hidrosoles de Higuierilla (*Ricinus communis*) y de Hierbabuena (*Mentha spicata*), respectivamente; y entre 1 y 77 para los aceites de Ají (*Capsicum frutescens*) y de Hierbabuena, respectivamente. Los aceites esenciales naturales están conformados por mezclas muy complejas que pueden contener aproximadamente entre 20 y 60 componentes en concentraciones bastante diferentes, las cuales se caracterizan por tener dos o tres componentes principales a altas concentraciones (alrededor del 20 al 70%) en comparación con los componentes presentes en cantidades trazas (Bakkali, F. y col. 2008), lo que coincide con lo encontrado para los hidrosoles y aceites presentados en la Tabla 2, donde se muestra la identificación tentativa y la cantidad relativa (%) de los componentes mayoritarios presentes en las muestras analizadas.

Tabla 2. Compuestos químicos mayoritarios identificados por GC-MS

Nombre Común	Cantidad relativa de compuestos químicos (%)				
	Hidrosol		Aceite esencial		
Ajenjo	timol	46,7	<i>tocoferol</i>	25,1	
	trans-tujona	24,6	<i>trans-turjona</i>	20,4	
				<i>trans-2-heptenal</i>	16,1
				dietiltalato	10,4

Tabla 2. (Continuación)

Nombre Común	Cantidad relativa de compuestos químicos (%)			
	Hidrosol		Aceite esencial	
Ají	alcanfor	22,5	tocoferol	100,0
	hexadecenoato de etilo	19,5		
	hexadecanoato de etilo	15,2		
	1,8-cineol	11,2		
Ajo	dialil trisulfuro	36,2	sesamin	36,4
	alcanfor	16,0	alcanfor	32,2
	1,8-cineol	15,1	compuesto PM 446	18,0
	timol	10,4		
Altamisa	β -bisaboleno	18,9	linoleato de etilo	49,2
	α -curcumeno	17,6	oleato de etilo	25,6
	germacreno D	14,5	hexadecanoato de etilo	17,5
	γ -curcumeno	15,4		
Caléndula	1,8-cineol	21,3	linoleato de etilo	53,9
	timol	17,7	oleato de etilo	27,3
	cis-dihidrocarvona+dihidrocarveol	11,7		
Cebolla roja	linoleato de etilo	45,3	timol	33,0
	hexadecanoato de etilo	31,7	γ -terpineno	27,6
	oleato de etilo	23,1	tocoferol	25,6
			<i>p</i> -cimeno	13,7
Cola de caballo	trans- β -cariofileno	19,4	<i>trans</i> -2-heptenal	28,7
	δ -cadineno	18,4	<i>trans</i> -2, <i>trans</i> -4-decadienal	18,7
	β -bisaboleno	15,5	<i>trans,cis</i> -2,4-decadienal	14,1
	β -elemeno	10,1	tocoferol	13,5
			linoleato de etilo	11,8
Hierbabuena	carvona	24,2	<i>carvona</i>	16,9
	isomentona	19,4	isomentona	13,6
	pulegona	13,9		
Higuerilla	alcanfor	53,3	escualeno	55,7
	Isomentona	46,7	trans- β -farneseno	17,1
			cis-espiroeter	19,0
Hinojo	<i>trans</i> -anetol	30,5	trans-anetol	38,2
	fenchona	28,2	fenchona	20,3
	timol	20,8	tocoferol	13,5

Tabla 2. (Continuación)

Nombre Común	Cantidad relativa de compuestos químicos (%)			
	Hidrosol		Aceite esencial	
Manzanilla	trans- β -farneseno	13,7	cis-espiroeter	27,6
	oxido A de α -bisabolol	10,4	oxido A de α -bisabolol	21,8
			linoleato de etilo	12,4
Milenrama	trans- β -cariofileno	22,1	sabineno	46,6
	1,8-cineol	14,9	1,8-cineol	9,6
	terpinen-4-ol	14,4	trans- β -cariofileno	8
	sabineno	12,5		
Ortiga	1,8-cineol	20,7	sesamin	57,8
	alcanfor	20,3	compuesto PM 446	27,4
	α -pineno	9,8		
Romero	timol	14,6	alcanfor	24,4
	hedicariol	12,6	1,8-cineol	15,9
	alcanfor	11,3	α -pineno	9,3
			canfeno	8,4
			β -pineno	6,7
			limoneno	3,7
			borneol	3,4
			β -mirceno	2,9
			acetato de bornilo	2,8
			γ -terpineno	2,4
			verbenona	2,3
			α -felandreno	1,9
			β -felandreno	1,6
Ruda	2-undecanona	70,6	2-undecanona	53,0
	2-nonanona	10,4	2-nonanona	11,7
	2-tridecanona	4,9	geijereno	4,6
	NI	3,1	2-undecanol	3,9
	2- dodecanona	2,9	2-tridecanona	3,3
			derivado del 3,4-	3,2
			dioximetilen-1-fenilo	
			compuesto PM 254	2,6
			2-dodecanona (ramificada)	2,5

Tabla 2. (Continuación)

Nombre Común	Cantidad relativa de compuestos químicos (%)			
	Hidrosol		Aceite esencial	
Tomillo	timol	88,2	Timol	29,6
	carvacrol	7,3	p-cimeno	22,1
			γ-terpineno	19,3
			trans-β-cariofileno	3,4
			α-terpineno	3,0
			linalool	3,0
			carvacrol metiléter	2,9
			β-mirceno	2,1
			α-tujeno	1,6
			carvacrol	1,5
			terpinen-4-ol	1,2
			α-pineno	1,1
			borneol	1,0

Al analizar los compuestos químicos de los extractos evaluados se observa un total de 173 metabolitos diferentes para los hidrosoles y 153 metabolitos para los aceites esenciales. Con estos metabolitos se realizó una matriz para determinar los compuestos comunes entre las diferentes hidrosoles y aceites evaluados (Anexos A y B) y en las Figuras 1 y 2 se presentan los compuestos comunes para hidrosoles y aceites, respectivamente.

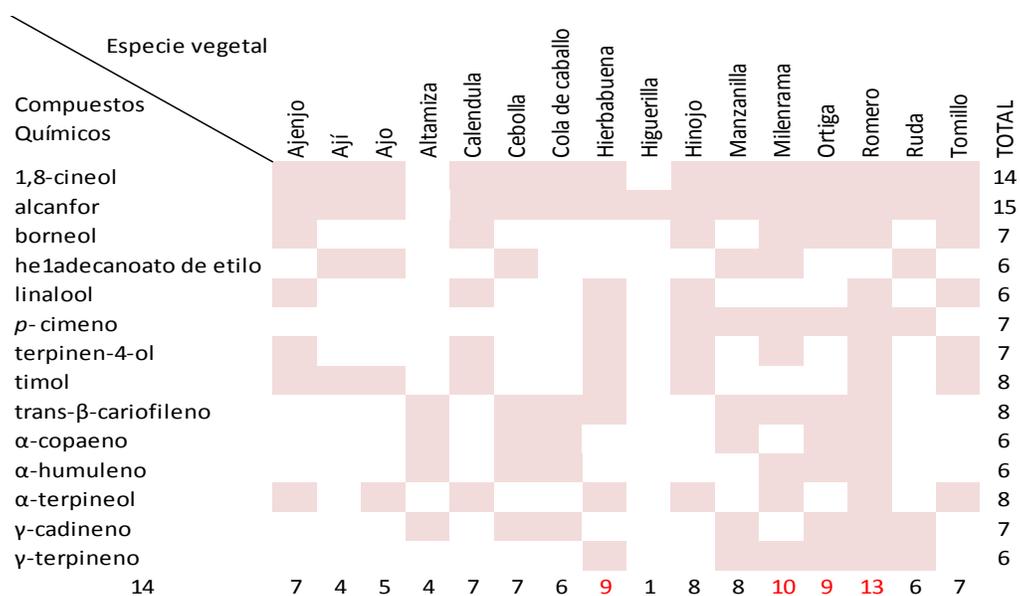


Figura 1. Compuestos mayoritarios de hidrosoles de especies vegetales

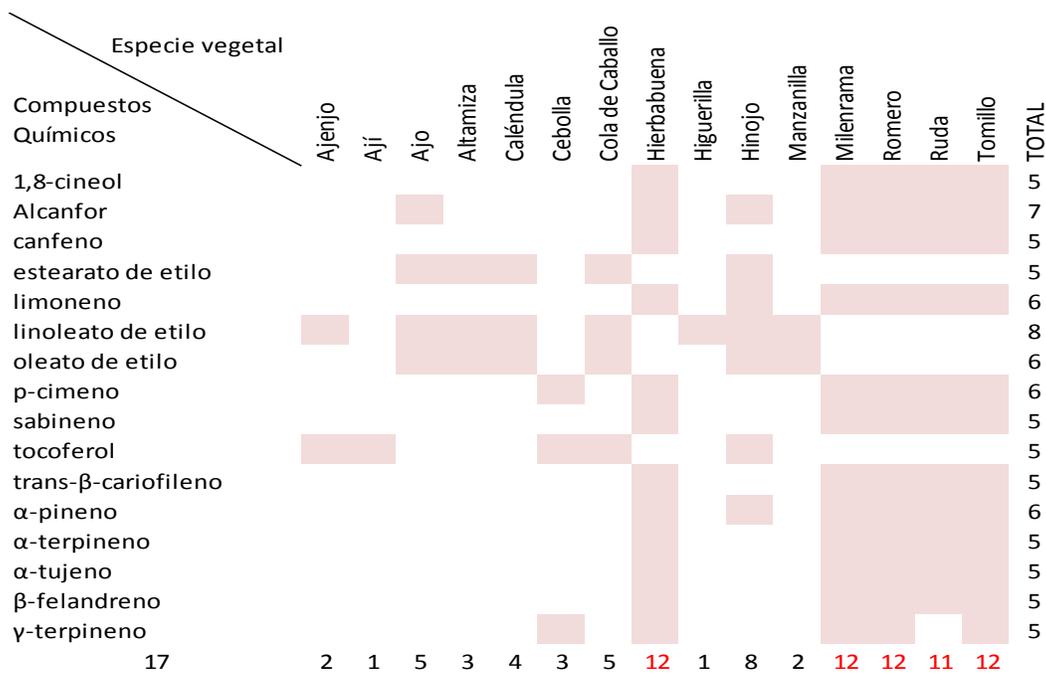


Figura 2. Compuestos mayoritarios de aceites esenciales de especies vegetales

Como se observa en la Figura 1 para los hidrosoles, las especies que presentan mayor números de metabolitos comunes son hierbabuena, milenrama, ortiga y romero. Mientras que para los aceites esenciales (Figura 2), las especies con mayor número de metabolitos comunes son hierbabuena, milenrama, romero, ruda y tomillo.

Al comparar los porcentajes o cantidad relativa de los metabolitos encontrados en los hidrosoles y aceites analizados con los reportados en literatura, se observa una gran variación en cuanto a cantidad y concentración de los mismos, debido probablemente a los efectos térmicos e hidrolíticos que ocurren en los diferentes métodos de extracción. En el caso de los métodos que utilizan irradiaciones y temperaturas elevadas se alcanzan a presentar cambios considerables en cuanto a cantidad y tipo de compuestos volátiles (Okoh, O. y col., 2010). Esto se puede explicar por los factores que influyen en este método, la potencia y el tiempo de irradiación. Una combinación de potencia baja o moderada, con una exposición larga de tiempo suele ser la recomendada. Cuando se somete el analito a una

exposición prolongada de una potencia alta, se corre el riesgo de degradación térmica del mismo. La ruptura de la pared celular se lleva a cabo a temperatura alta cuando se mantiene a una mayor potencia, generando una lixiviación de impurezas además del analito deseado. Si se utilizan bajos niveles de energía es probable que la ruptura celular sea lenta y poco selectiva (Mandal, V. y col., 2007).

Además, la variabilidad de la composición y el rendimiento de los aceites esenciales, es debido a factores intrínsecos como la estructura genética, subespecies, y la edad de las plantas; o a factores extrínsecos tales como el clima, las prácticas agronómicas, las condiciones del cultivo (origen geográfico, malezas presentes que compiten por nutrientes con la planta, el tipo de fertilización utilizada), o métodos de aislamiento (Hudaib, M. y col., 2002; Goodner, K. y col., 2006; Bounatirou, S. y col., 2007; Celiktas, O. y col., 2007; Ardila, M., y col., 2009; Telsi, I. y col., 2010; Szumny, A. y col., 2010; Zaouali, Y. y col., 2010).

Adicionalmente, las variaciones en cuanto a la composición porcentual de los metabolitos de una misma especie están influenciadas por las diferentes rutas metabólicas que están estrechamente relacionadas con la información genética en las especies vegetales (Tounsi, M. y col., 2010).

Por otra parte, se debe tener en cuenta también el método y tiempo de extracción puesto que influyen tanto en la cantidad del aceite esencial producido, como en su composición química. Es así como, las muestras que alcanzan temperaturas cercanas a los 100°C, pueden presentar cambios químicos en sus componentes termolábiles, así como procesos colaterales indeseables, tales como la hidrólisis de ésteres, polimerización de aldehídos o descomposición de otros compuestos. (Mendivelso, D. y col. 2007),

Con base en el análisis de los metabolitos mayoritarios comunes presentes en los extractos de las especies vegetales (Figuras 1 y 2) y su relevancia como posibles agentes fungicidas según lo reportado en bibliografía, se seleccionaron los aceites

esenciales de hierbabuena (*Mentha spicata*), milenrama (*Achillea millefolium*), romero (*Rosmarinus officinalis*), ruda (*Ruta graveolens*) y tomillo (*Thymus vulgaris*), para un análisis más detallado.

Para el caso del aceite de romero (*Rosmarinus officinalis*), se encontraron dos compuestos mayoritarios principalmente alcanfor y 1,8-cineol (25,4% y 14,9% respectivamente) siendo aproximadamente el 40% del total de los compuestos. La cantidad de monoterpenos oxigenados (borneol, alcanfor, terpeno-4-ol, linalol, α -terpeneol y 1,8-cineol) fue de 46,4% y la de monoterpenos hidrocarbonados (α -pineno, canfeno, β -pineno, mirceno, β -felandreno) de 28,9%, siendo mayores a los obtenidos por Okoh, O. y col. (2010) en África, quienes utilizaron aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. obtenido por hidrodestilación (HD) y extracción por microondas libre de solvente (SFME), donde la cantidad de monoterpenos oxigenados corresponde a un 28,60% para SFME y un 26,98% para la extracción HD y los monoterpenos hidrocarbonados 19,95% para HD y 13,8% para el aceite extraído por SFME, lo que indicaría que el método de extracción utilizado en nuestro caso resulto más eficiente o nuestras especies vegetales tienen una mayor composición de estos metabolitos.

Szumny, A. y col.,(2010), al evaluar la influencia del método de secado (convección (CD), microondas al vacío (VMD), y una combinación de estos (CPD-VMFD)) en los compuestos volátiles de una mezcla de hojas, ramas y tallos de romero (*Rosmarinus officinalis* L), se encontró que en cada uno de los extractos se identificaron 34 compuestos volátiles con diferentes concentraciones, donde los compuestos mayoritarios fueron α -pineno (22,6-28,6%), acetato de bornilo (10,8-13,3%), canfeno (8,1-10,2%) 1,8-cineol (9,1-9,9%) y alcanfor (6,5-7,5%), mientras que el extracto de romero de este estudio se secó a temperatura ambiente y se encontraron 39 compuestos volátiles siendo los más abundantes alcanfor (24,4%) 1,8 cineol (15,9%), α -pineno (9,3%), canfeno (8,4%) y β -pineno (6,7%), por lo tanto podemos concluir que el tipo de secado es otra variable que influye en la cantidad de compuestos y en la concentración de los mismos.

En otros estudios, Zaouali, Y. y col., (2010), determinaron la composición química de *R. officinalis var. troglodytorum* y *R. officinalis var. Typicus* y encontraron que las variaciones en cuanto a la composición del aceite se deben a las variedades de la planta. En este caso los componentes principales identificados fueron 1,8-cineol (47,2 - 27,5%) y alcanfor (12,9 - 27,9%) de la *var. typicus* y *var. troglodytorum*, respectivamente. Al comparar estos resultados con los obtenidos en esta investigación se observa que los porcentajes de estos metabolitos estuvieron entre 24,4 y 15,9% para alcanfor y 1,8-cineol, respectivamente, valores que se encuentran dentro del rango determinado por Zaouali Y. y col., (2010), lo que nos permite afirmar que la composición del aceite esencial varía según el cariotipo de la planta.

De otro lado, las diferencias que se presentan sobre la composición del aceite esencial de romero también podrían deberse al hecho de que en algunos estudios utilizan hojas, ramas y tallos mezclados, mientras que en muchos otros sólo se utiliza una de estas partes de la planta de forma independiente. Los compuestos volátiles no se distribuyen por igual en las diferentes partes de las plantas, por ejemplo, si se tiene en cuenta los principales metabolitos que se reportan para el aceite de romero, se puede decir que α -pineno se acumula principalmente en las hojas, mientras que otros compuestos, como β -pineno, mirceno, 1,8-cineol, alcanfor, y linalol se distribuyen por igual entre las hojas, flores y tallos, por último, canfeno y borneol se acumulan principalmente en los tallos. Por lo general, las partes de la planta que se emplean para realizar la extracción del aceite son las partes aéreas, que comprenden hojas, ramas y flores (Szumny, A. y col., 2010).

En cuanto a los componentes mayoritarios de la ruda (*Ruta graveolens* L.), como se observa en la Tabla 2, encontramos que la 2 undecanona con 53% y 2-nonanona 11,7% componen el 65% del aceite esencial, mientras que en el hidrosol estos compuestos representan el 81%. Al comparar estos resultados con los obtenidos por Stashenko, E. y col. (2000), quienes utilizaron

independientemente hojas, flores, tallos y raíces de *R. graveolens* L., cultivadas en Bucaramanga, encontraron que para las hojas, los constituyentes principales fueron de mayor a menor: 2-nonanona, chalepina, 2-undecanona, chalepensina y bergapteno. En el caso de las flores, se encontró 2-undecanona, chalepensina, rutamarina, psoraleno, 2-nonanona y bergapteno. En los tallos se encontró chalepensina, 2-undecanona, bergapteno, kokusaginina y psoraleno. Por último, las raíces contienen geijereno, 6-(39,59-benzodioxil)-3,3-dimetil-1-hexeno, dictamnino, rutacultina y bergapteno. Los componentes de mayor porcentaje en cada caso presentaron valores de 8,9-13,4-13,0-19,3% para hojas, flores, tallos y raíces, respectivamente. Si se analiza el total de 2-undecanona de las diferentes partes de la planta encontramos que ellos obtuvieron 32.2% siendo este valor inferior al obtenido en este estudio (53,0%) donde se utilizó toda la parte aérea de la planta. Por lo tanto podemos inferir que la región geográfica también es otro factor que afecta la concentración y el tipo de metabolitos en una especie vegetal.

Así mismo, Tounsi, M. y col., (2010) realizaron extracciones del aceite esencial de *Ruta chalepensis* cultivada y silvestre por hidro-destilación, utilizando diferentes partes de la planta (hojas, flores, tallos y frutas) en la etapa de la floración, donde los compuestos que predominaron en los aceites fueron 2-undecanona (con variaciones entre 0,17-60,5% y 26,7-44,1% para las plantas cultivadas y silvestres, respectivamente) y 2-nonanol (variando entre 11,6- 45,1% y 0,86- 40,5% para plantas cultivadas y silvestres, respectivamente). Al analizar las hojas y las flores de las plantas cultivadas para comparar con los resultados del grupo, se observa que para 2-undecanona las hojas tienen un 36,58% y las flores un 33,54%, valores inferiores a los encontrados en esta investigación, donde el resultado fue de 53%, esto sugiere un posible efecto sinérgico porque en este caso se empleó de forma combinada hojas y flores. Adicional a esto, las variaciones observadas podrían estar relacionadas con la diferenciación morfológica producida durante el ciclo fenológico y los factores climáticos. Por ejemplo, se ha descrito que, asociado al aumento de altitud o a la reducción del período vegetativo, algunas plantas tienden a adelantar su crecimiento lo que implica algunas ventajas para la planta, como

pueden ser el incremento de la producción anual, el acaparamiento de recursos básicos, o la reducción de daños por herbívoros; pero también algunas desventajas, como aumentar el riesgo de sufrir daños por heladas tardías o de disminuir demasiado pronto las reservas hídricas del suelo lo que aumenta la duración del período de estrés hídrico estival. En realidad, los adelantos o retrasos de la brotación en diferentes años se basan en la plasticidad fenotípica de las plantas y responden a la necesidad de alcanzar la estación más favorable para el crecimiento disponiendo de la máxima cantidad posible de hojas recientes y muy productivas (Montserrat, G. y col., 2004).

En cuanto a los constituyentes del aceite de tomillo (*Thymus vulgaris*), como se observa en la Tabla 2 el timol se encuentra como compuesto mayoritario con una abundancia relativa de 88,2% y 29,6% para el hidrosol y el aceite respectivamente. Hudaib, M. y col., (2002) en Italia, realizaron un monitoreo al aceite de *Thymus vulgaris* cosechado en diferentes ciclos vegetativos: inicio, durante, después y final del ciclo vegetativo (plantas de 2 años); y dos etapas luego del ciclo de vida (plantas de 5 años), para observar si se presentaba variación de la composición química, y se encontró que la planta cosechada a los 5 años, se caracterizaba por presentar bajos niveles de monoterpenos hidrocarbonados (γ -terpineno) y niveles altos de monoterpenos oxigenados (linalol y borneol), fenoles monoterpenicos (timol), derivados de éter de metilo (carvacrol), sesquiterpenos (β -cariofileno) y derivados oxigenados (óxido de cariofileno) en comparación con todas las otras muestras. De otro lado, la planta cosechada a los 2 años, presentó altos contenidos de fenoles monoterpenicos (timol: 51,2% y carvacrol: 4%), coincidiendo con los resultados reportados en este estudio para esta especie (Tabla 2) con un crecimiento menor a 2 años.

Así mismo, Lee, S. y col., (2005) en Corea, encontraron para *T. vulgaris* que los compuestos que constituyen casi tres cuartas partes de los volátiles totales cuantificados más importantes fueron timol (72%) e iso-timol (carvacrol) (5,7%), seguidos por monoterpenos oxigenados, linalol (4,0%), α -terpineol (2,4%), 1,8-

cineol (2,1%), y borneol (2,0%). Si observamos en la Tabla 2, el tomillo, presenta concentraciones menores de estos metabolitos casi en un 50%, pero se conserva la tendencia donde el timol es el constituyente principal y los demás constituyentes aunque en menor proporción también están presentes en nuestros extractos.

De igual forma, el timol hace parte de los constituyentes mayoritarios del aceite de tomillo en el estudio realizado por Goodner, K. y col., (2006), en España donde determinaron si existía variabilidad entre *Thymus hyemalis* L. y *T. vulgaris*. Para esto tomaron cinco estados fenológicos durante el ciclo vegetativo de las plantas, y se encontró que los compuestos mayoritarios en el aroma de *T. hyemalis* eran linalol, borneol, timol y β -damascenona. Y para el caso de *T. vulgaris*, los compuestos mayoritarios eran eucaliptol, borneol, acetato terpinilo y β -damascenona. Timol y p -cimeno fueron los compuestos que se observaron en *T. hyemalis* pero no en *T. vulgaris*, los cuales se incrementan en las etapas maduras de los ciclos vegetativos. En *T. vulgaris* el cambio más representativo con respecto a los ciclos vegetativos se observó para el eugenol que se hace inexistente en las etapas maduras. Caso contrario a lo encontrado en este estudio donde *T. vulgaris* presentó los valores más altos para el timol. Con esto se reafirma la gran variabilidad que se presenta en plantas del mismo género pero de diferente especie.

Igualmente Bounatirou, S. y col. (2007) en Portugal, determinaron la composición química del aceite esencial de *T. capitatus* en diferentes fases de desarrollo de la planta, e identificaron que el carvacrol fue el componente principal en todas las fases con valores del 73%, 74% y 66% en la fase vegetativa, floración y post-floración, respectivamente. El aceite también se caracterizó por presentar altos niveles de p -cimeno (5-17%), c -terpineno (2-14%) y β -cariofileno (1-4%). El p -cimeno mostró un máximo cuando el carvacrol estaba en su mínimo, esto probablemente debido a que el p -cimeno es el precursor de carvacrol. En nuestro caso se puede observar que el porcentaje de p -cimeno es de 22,1% mientras que el carvacrol es de 1,5%, lo que nos indica que la variación en composición y

concentración de los metabolitos en el aceite de tomillo dentro de los diferentes períodos de desarrollo puede ser discutido a través de la correlación entre el precursor de monoterpenos (ρ -cimeno y γ -terpineno) y el producto de terpenos fenólicos (timol y carvacrol), el cual se produce al final de la ruta biosintética (Hudaib, M. y col., 2002).

Para el caso de los componentes principales de *Mentha spicata* (hierbabuena), observamos que los componentes principales tanto para el aceite como para el hidrosol fueron la carvona (16,9 y 24,6% respectivamente), isomentona (13,6 y 19,4% respectivamente), pulegona (9,9 y 13,9% respectivamente), e isomentol (6,2 y 7,4% respectivamente) representando un 46,6% del total de sus componentes volátiles en el aceite y un 65,3% en el hidrosol. Chauhan, R. y col. (2009), evaluaron la composición del aceite de *M. spicata* cultivada en zonas subtropicales y templadas de la India, donde carvona era el componente principal con valores entre 49,62-76,65%, seguido por limoneno que varió entre 9,5-22,31%, hallando una correlación entre la cantidad de carvona y de limoneno, debido a que el aceite de mayor cantidad de carvona presentó el menor valor de limoneno. Para la *M. spicata* de este estudio se encontró que el monoterpeno oxigenado carvona es el principal componente del aceite con un valor de 16,9% y el del limoneno fue de 4,5%, con lo que se puede afirmar que los quimiotipos ricos en carvona se encuentran principalmente en *M. spicata* (Zhao, D. y col., 2013).

Caso contrario sucede en la investigación de Telci, I. y col. (2010) en Turquía, donde determinaron la composición del aceite esencial de *M. spicata* y encontraron que los monoterpenos oxigenados como pulegona (26,71-29,56%) y piperitona (22,17-28,16%), fueron el grupo de terpenoides más importante en el aceite. Los resultados revelaron que los monoterpenos hidrocarbonados (α -limoneno y β -felandreno) fueron los principales componentes en las plantas de clima templado, mientras que el trans- β -cariofileno y germacreno D, fueron los principales sesquiterpenos hidrocarbonados en el aceite de climas cálidos. En este caso otra vez se corrobora el hecho de la gran variabilidad que se presenta en las

plantas del mismo género y especie debido a las condiciones geográficas de donde proviene cada especie vegetal.

Los componentes mayoritarios del aceite esencial y del hidrosol de la milenrama (*Achillea millefolium*), que se muestran en la Tabla 2 corresponden al sabineno y 1,8 cineol para el aceite (46,6 y 9,6% respectivamente) y trans- β -cariofileno, 1,8 cineol, terpin-4-ol y sabineno (22,1, 14,9, 14,4, y 12,5% respectivamente) en el hidrosol, constituyendo un 56,2% del total de los volátiles en el aceite y un 63,9% en el hidrosol. Mockute, D. y col., (2003) en Lituania, encontraron que el sabineno estaba en un rango de 1,5 a 8,5% y el 1,8-cineol entre 3,1 y 16,8%. Siendo mayor la concentración de sabinol para nuestra especie y estando dentro del rango encontrado por Mockuete, D. y col., (2003) el 1,8 cineol. Nuevamente como se observa a lo largo del análisis de la composición de las plantas aquí estudiadas la variabilidad en concentraciones y componentes en estos aceites depende del sitio geográfico del cual provengan.

Por otro lado, Candan, F. y col., (2003) en Turquía, identificaron eucaliptol (24,6%), alcanfor (16,7%), α -terpineol (10,2%), β -pineno (4,2%), y borneol (4,0%) como componentes principales, siendo estos muy diferentes a los encontrados en este estudio, por lo que coincidimos con lo expresado por estos autores quienes afirman que la variación en la composición del aceite esencial de *Achillea millefolium* también está relacionado con la maduración de la planta, por lo que varía considerablemente la cantidad creciente de los monoterpenos en relación con los sesquiterpenos.

5.2. Polifenoles totales

La necesidad de determinar la capacidad antioxidante de los componentes activos de los extractos vegetales es importante cuando se busca su actividad biológica o bioactividad. Debido a que la capacidad antioxidante está relacionada con el

contenido de compuestos fenólicos, se determinó primero el contenido de polifenoles totales de los extractos en evaluación.

Debido a la heterogeneidad de los compuestos fenólicos naturales y la posible interferencia de otras sustancias fácilmente oxidables en los materiales vegetales, se han utilizado varios métodos para la determinación de fenoles totales y ninguno ha sido denominado como el mejor. Entre los diferentes métodos se tienen el método de Folin-Denis (FD), el método de Folin-Ciocalteu (FC), titulación de permanganato, colorimetría con sales de hierro, y la absorbancia ultravioleta. En la mayoría de los casos, el FC se ha encontrado que es preferido en comparación con los otros métodos, debido a que se basa en la transferencia de electrones en medios alcalinos a partir de compuestos fenólicos al complejo ácido fosfomolibdico/fosfotúngstico para formar complejos de color azul que se determinan espectroscópicamente (Dai, J. y Mumper, R., 2010).

Por la naturaleza general de la química de FC, este método mide fenoles totales y otros sustratos de oxidación. Los otros sustratos de oxidación presentes en los extractos pueden afectar las mediciones de fenoles totales de una manera inhibitoria o aditiva. Los efectos inhibidores se deben a los oxidantes que compiten con el reactivo de FC y/o a la oxidación con aire después que la muestra ha sido tratada con el reactivo alcalino. Este es uno de los motivos por los que el reactivo de FC se adiciona antes del reactivo alcalino. Los efectos aditivos se producen a partir de aminas aromáticas, altos niveles de azúcar o ácido ascórbico en las muestras. Sin embargo, a pesar de estas desventajas, el ensayo de FC es simple y reproducible y ha sido ampliamente utilizado para la cuantificación de compuestos fenólicos en extractos de plantas (Dai, J. y Mumper, R., 2010).

La cantidad de polifenoles totales en los aceites esenciales e hidrosoles de las 17 especies estudiadas fueron determinados espectrofotométricamente de acuerdo al método de Folin-Ciocalteu y calculado como equivalentes de ácido gálico. La ecuación que se ajusta a la curva es $y = 0.1037 * x + 0.0291$, con un $R^2 = 0.997$.

El ajuste de la curva fue verificado mediante tratamiento estadístico por medio de la prueba del t-Student, determinándose que la pendiente es significativamente diferente de cero, el intercepto es estadísticamente igual a cero y existe una correlación entre la variable dependiente y la variable independiente (ver datos en el Anexo D). Los resultados de la cantidad de polifenoles totales para cada hidrosol y aceite esencial se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Polifenoles Totales en hidrosoles y aceites esenciales de 17 especies vegetales

Nombre Común	mg Ácido Gálico/g muestra	
	Hidrosol	Aceite esencial
<i>Ajenjo</i>	0,024 ± 0,00	0,017 ± 0,01
Ají	0,032 ± 0,00	0,036 ± 0,01
Ajo	0,164 ± 0,01	0,298 ± 0,04
Altamisa	0,075 ± 0,01	0,029 ± 0,01
Caléndula	0,049 ± 0,01	0,104 ± 0,01
Cebolla roja	0,043 ± 0,00	0,011 ± 0,01
Cola de caballo	0,079 ± 0,01	0,026 ± 0,01
Hierbabuena	0,057 ± 0,01	0,260 ± 0,02
Higuerilla	0,396 ± 0,03	Nd
Hinojo	0,065 ± 0,01	0,223 ± 0,05
Manzanilla	2,439 ± 0,06	0,227 ± 0,00
Menta poleo	0,068 ± 0,00	0,530 ± 0,03
Milenrama	0,385 ± 0,03	0,070 ± 0,01
Ortiga	0,228 ± 0,02	0,090 ± 0,01
Romero	67,599 ± 1,12	0,121 ± 0,01
<i>Ruda</i>	1,331 ± 0,03	0,792 ± 0,03
Tomillo	0,346 ± 0,02	29,496 ± 0,85

La cantidad de Polifenoles totales está dada como medias ±S.D. (n=3)

Nd: no determinado

Como se puede observar en la Tabla 3, el contenido de polifenoles totales en las muestras estudiadas oscila entre 0,024 mg/g a 67,6 mg/g para los hidrosoles, y alrededor de 0,011 mg/g a 29,5 mg/g para los aceites esenciales, siendo el hidrosol de romero (*R. officinalis*) y el aceite de tomillo (*T. vulgaris*) los de mayor concentración. Los altos resultados obtenidos para el hidrosol de romero (67,6 mg A. gal/g muestra) y el aceite esencial de tomillo (29,5 mg A gal/g muestra), convierten a estas plantas en especies apropiadas para el aislamiento de

principios activos como los compuestos fenólicos, que son los responsables de la actividad antioxidante (Yesil-Celiktas, O. y col., 2007).

Celiktas, O. y col., (2007) en Turquía utilizaron extracción de CO₂ supercrítico con hojas de *Rosmarinus officinalis*, considerando como fuentes de variabilidad la localización del cultivo (regiones de clima frío, moderadamente caliente y otra de clima más caliente), y el tiempo de cosecha (Diciembre, Marzo, Junio y Septiembre), que como se vio anteriormente afectan la composición del extracto y por ende modifica sus capacidades biológicas. El contenido de fenoles totales vario entre 34,1-119,0 mg ácido gálico/g de extracto. La variabilidad más grande se presentó por efecto de la localización del cultivo, es así como de los tres sitios escogidos, la región más caliente presentó los resultados más altos (82,3-119 mg/g) y en los otros lugares los valores fueron más bajos (34,1-60,4 mg/g, respectivamente). Estos resultados concuerdan con los encontrados en este proyecto (67,6 mg AG/g), donde las diferencias pueden explicarse en términos de coordenadas geográficas, el clima y las condiciones ecológicas. La acumulación diferencial de fenoles en las diferentes partes de la planta, por ejemplo las hojas, puede estar relacionada con sus células (es decir, mesófilo, epidermis y tejidos específicos, y el grosor de la cutícula, cloroplastos, tricomas) o sus cambios fisiológicos y estructurales durante el crecimiento (es decir, potencial de agua, el espacio intercelular.) como respuesta a los cambios ambientales (Zaouali, Y. y col., 2013).

La concentración de compuestos fenólicos es mayor en los extractos aislados a partir de las plantas que contienen quimiotipos fenólicos, es decir, es mayor en aquellos aceites esenciales que contienen notable concentración de timol y carvacrol, como se observa en la Tabla 2 sobre la composición relativa del aceite esencial de tomillo. Roby, M. y col. (2013) en Egipto, utilizaron *Thymus vulgaris* L. en diferentes solventes de extracción (metanol, etanol, éter dietílico, y hexano). La cantidad de fenoles totales varió en los diferentes extractos en un rango 8,1-3,9 mg equivalentes de ácido gálico/g de materia seca. El extracto en metanol

presentó el valor más alto de fenoles totales con 8,10 mg de equivalente de ácido gálico/g de peso seco. Para el caso del extracto en etanol, la concentración fue de 7,30 mg de equivalentes de ácido gálico/g de peso seco. Estos resultados sugieren que el metanol y el etanol son mejores disolventes que los otros en la extracción de compuestos fenólicos debido a su polaridad y a la buena solubilidad para los componentes fenólicos a partir de materiales vegetales (Loziene, K. y col., 2007).

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, se puede decir que la variación de los resultados depende de diferentes factores tales como el método de extracción y las características generales de las plantas. Según Dai, J. y Mumper, R. (2010), la cuantificación de compuestos fenólicos en un extracto de una planta se ve influenciada también por la naturaleza química del analito empleado, el método de ensayo, la selección de los patrones, la presencia de sustancias que interfieren, entre otros.

En términos generales, los compuestos fenólicos, que están ampliamente distribuidos en las plantas, se considera que desempeñan un importante papel como antioxidantes dietéticos en la prevención del daño oxidativo y en los sistemas vivos pueden proporcionar protección contra el cáncer, arteriosclerosis coronaria y los procesos de envejecimiento (Zegura, B. y col., 2011).

5.3. Actividad antioxidante

Para determinar la capacidad antioxidante no es fácil utilizar un parámetro análogo y relativamente simple, debido a que esta propiedad es generada por moléculas de diversos tipos, con distinta relación de estructura. Es así como una parte de estos ensayos se basan en la medición de la capacidad que tienen los compuestos antioxidantes para reaccionar con un radical libre determinado (DPPH, ABTS), o el potencial que tales compuestos tendrían para reducir un

complejo formado entre los iones Fe(III) y el reactivo TPTZ. Los tres métodos anteriores son de transferencia de electrones, pero en el caso de los dos primeros, puede existir cierta participación de la transferencia de átomos de hidrógeno, considerándose también como métodos de transferencia secundarios o marginales (Bleaju, M. 2007).

Por lo anterior, es recomendable emplear diferentes métodos para la determinación de capacidad antioxidante. Para este estudio, se determinó esta actividad por tres métodos DPPH, ABTS y FRAP. Los ensayos espectrofotométricos se basan en medir la capacidad de un antioxidante para reducir un oxidante, el cual cambia de color cuando se reduce. El grado de cambio de color (aumento o disminución de absorbancia a una determinada longitud de onda) está correlacionado con la concentración de antioxidantes en los extractos.

5.3.1. Preliminares (Macro-Métodos)

Para el caso del DPPH, se utilizaron diferentes concentraciones de diez extractos iniciales para calcular el porcentaje de inhibición del radical libre, y con estos resultados se elaboró una curva de concentración versus porcentaje de inhibición (ver gráficas Anexo E). Luego con la línea de tendencia, se interpoló el valor IC₅₀, es decir, la concentración del extracto requerida para producir una disminución del 50% de la concentración inicial del radical DPPH. Los resultados del IC₅₀ para los hidrosoles y aceites esenciales seleccionados se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. IC₅₀ de 10 especies vegetales por medio de DPPH

Nombre Común	Hidrosol			Aceite esencial		
	Concentración (µg/mL)	IC ₅₀	R ²	Concentración (µg/mL)	IC ₅₀	R ²
Ají	Nd			1000-5000	9,762	0,989
Ajo	10000-50000	434,500	0,827	Nd		
Altamisa	9000-50000	129,500	0,985	10000-50000	99,463	0,991
Cebolla roja	Nd			1000-5000	10,207	0,994
Cola de caballo	10000-50000	298,890	0,993	1000-5000	11,440	0,992

Tabla 4. (Continuación)

Nombre Común	Hidrosol			Aceite esencial		
	Concentración (µg/mL)	IC ₅₀	R ²	Concentración (µg/mL)	IC ₅₀	R ²
Manzanilla	2000-10000	6,037	0,998	2000-10000	15,508	0,998
Milenrama	1000-5000	16,950	0,996	1000-5000	6,604	0,998
Romero	50-250	0,133	0,998	1000-5000	0,246	0,989
Ruda	2000-10000	17,689	0,996	500-2500	5,871	0,998
Tomillo	2500-12500	302,650	0,883	1000-5000	14,689	0,994

La determinación de DPPH está dada como medias ±S.D. (n=3)

Nd: no definido

Al igual que en la determinación de actividad antioxidante por medio de DPPH, se hizo un análisis preliminar para el ABTS. Es así como se realizó la curva de calibración (ver gráfica en el Anexo F) cuya línea de tendencia fue $y = -0.005 * x + 0.4499$, con un $R^2 = 0.998$. El ajuste a la curva fue verificado mediante tratamiento estadístico por medio de la prueba del t-Student, determinándose que la pendiente es significativamente diferente de cero, el intercepto es estadísticamente igual a cero y existe una correlación entre la variable dependiente y la variable independiente. Los resultados de la capacidad antioxidante para los hidrosoles y los aceites esenciales se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Actividad antioxidante de 17 especies vegetales por medio de ABTS

Nombre Común	Concentración Equivalentes de Trolox (µM)	
	Hidrosol	Aceite esencial
<i>Ajenjo</i>	718,00 ± 50,330	4.582,67 ± 210,640
Ají	128,57 ± 8,670	3.598,00 ± 151,440
Ajo	313,57 ± 3,380	1.319,00 ± 11,550
Altamisa	1.892,33 ± 36,670	795,67 ± 29,630
Caléndula	524,9 ± 26,77	1.284,67 ± 132,830
Cebolla roja	88,57 ± 1,760	15.556,67 ± 437,160
Cola de caballo	987,60 ± 25,400	637,51 ± 437,160
Hierbabuena	94,57 ± 2,400	70.900,00 ± 577,350

Tabla 5. (Continuación)

Nombre Común	Concentración Equivalentes de Trolox (μM)	
	Hidrosol	Aceite esencial
Higuerilla	3.112,33 \pm 8,160	5.323,33 \pm 470,220
Hinojo	178,57 \pm 2,670	862,33 \pm 291,570
Manzanilla	4.222,67 \pm 173,330	16.756,67 \pm 176,380
Menta poleo	574,27 \pm 15,720	180.566,67 \pm 7881,060
Milenrama	5.996,00 \pm 128,580	67.900,00 \pm 8020,810
Ortiga	5.742,67 \pm 481,290	2.358,00 \pm 120,550
Romero	105.566,67 \pm 11.348,030	10.690,00 \pm 1249,000
Ruda	12.929,33 \pm 381,110	313.133,33 \pm 13968,220
Tomillo	6.690,00 \pm 513,160	2.698.000,00 \pm 52915,030

La determinación de ABTS está dada como medias \pm S.D. (n=3)

La actividad antioxidante por medio del DPPH para los primeros extractos bajo las condiciones del ensayo dio como mejor resultado el hidrosol de romero (*Rosmarinus officinalis*) con un IC_{50} de 0,133 a una concentración entre 50 y 250 $\mu\text{g/mL}$ y el aceite esencial de romero con IC_{50} de 0,246 a una concentración entre 1 y 5 mg/mL de aceite. La cantidad de extracto de una planta necesaria para disminuir la concentración del radical DPPH inicial en un 50% (IC_{50}) es un parámetro ampliamente utilizado para medir la actividad antioxidante, por lo que, cuanto menor sea el IC_{50} , mayor es el poder antioxidante, de igual forma en estos resultados se tiene en cuenta la concentración a la que se determinó la reacción.

Para el caso de la capacidad antioxidante por medio del ABTS (Tabla 5), el ensayo dio como mejor resultado el hidrosol de romero con un valor de 105.566,67 μM de equivalentes Trolox coincidiendo con lo encontrado por medio del DPPH (Tabla 4), y el aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) con un valor de 2'689.000,00 μM de equivalentes trolox.

5.3.2. Ensayos finales (Micro-Métodos)

Se elaboraron las curvas de calibración con Trolox para determinar la capacidad antioxidante de los extractos por medio de los radicales DPPH, ABTS y FRAP (ver gráficas en Anexo G, Anexo H y Anexo I respectivamente). La línea de tendencia para el DPPH fue $y = -0.0045 * x + 0.8767$, con un $R^2 = 0.996$; para el ABTS fue $y = -0.0115 * x + 0.6238$, con un $R^2 = 0.999$; y para FRAP fue $y = 0.005 * x + 0.0443$, con un $R^2 = 0.999$. Con estas líneas de tendencia, por interpolación se determinó la capacidad antioxidante para hidrosoles y aceites esenciales cuyos resultados se muestran en la Tabla 6 y la Tabla 7, respectivamente. El ajuste de las curvas fue verificado mediante tratamiento estadístico por medio de la prueba del t-Student, determinándose que la pendiente es significativamente diferente de cero, el intercepto es estadísticamente igual a cero y existe una correlación entre la variable dependiente y la variable independiente.

Tabla 6. Actividad antioxidante de hidrosoles de 17 especies vegetales

Nombre Común	DPPH	ABTS	FRAP
	Equivalentes Trolox ($\mu\text{g/mL}$)	Equivalentes Trolox ($\mu\text{g/mL}$)	Equivalentes Trolox (μM)
<i>Ajenjo</i>	6,70 \pm 1,21	7,54 \pm 0,79	386,39 \pm 0,40
Ají	14,98 \pm 6,32	6,47 \pm 0,84	21,79 \pm 0,29
Ajo	12,49 \pm 5,99	9,61 \pm 1,01	332,65 \pm 0,53
Altamisa	5,60 \pm 1,78	9,96 \pm 2,02	649,27 \pm 5,81
Caléndula	Nd	5,56 2,33	159,59 0,93
Cebolla roja	12,49 \pm 0,96	5,65 \pm 0,28	221,05 \pm 0,27
Cola de caballo	3,69 \pm 1,34	6,47 \pm 0,78	291,46 \pm 0,64
Hierbabuena	2,89 \pm 0,89	5,21 \pm 1,21	154,33 \pm 1,40
Higuerilla	4,21 \pm 2,17	9,55 \pm 1,27	542,12 \pm 5,25
Hinojo	4,28 \pm 1,33	4,28 \pm 0,89	24,46 \pm 0,87
Manzanilla	8,83 \pm 1,46	23,73 \pm 3,09	1.843,27 \pm 20,28
Menta poleo	3,99 \pm 0,34	17,85 \pm 1,62	321,59 \pm 2,45
Milenrama	11,69 \pm 1,25	22,19 \pm 2,46	1878,6 \pm 4,06
Ortiga	3,03 \pm 0,58	9,52 \pm 1,75	750,63 \pm 4,91
Romero	165,71 \pm 2,42	10.949,00 \pm 0,88	5.771,93 \pm 90,08
Ruda	26,20 \pm 0,83	42,86 \pm 5,15	4.131,87 \pm 19,37
Tomillo	5,53 \pm 1,04	27,84 \pm 1,56	1458,6 \pm 6,11

Tabla 6. (Continuación)

Nombre Común	DPPH	ABTS	FRAP
	Equivalentes Trolox ($\mu\text{g/mL}$)	Equivalentes Trolox ($\mu\text{g/mL}$)	Equivalentes Trolox (μM)
BHA	11.945,10 \pm 4,80	24.807,00 \pm 1,24	Nd
BHT	12.568,20 \pm 2,10	202.065,00 \pm 3,78	Nd

La determinación de actividad antioxidante está dada como medias \pm S.D. (n=3)

Nd: no definido

Tabla 7. Actividad antioxidante de aceites esenciales de 17 especies vegetales

Nombre Común	DPPH	ABTS	FRAP
	Equivalentes Trolox ($\mu\text{g/mL}$)	Equivalentes Trolox ($\mu\text{g/mL}$)	Equivalentes Trolox (μM)
<i>Ajenjo</i>	28,11 \pm 3,03	8,30 \pm 4,59	811,45 \pm 0,35
Ají	57,58 \pm 7,90	3,76 \pm 10,54	1.147,45 \pm 9,74
Ajo	21,51 \pm 0,67	1,08 \pm 2,17	2.115,63 \pm 29,69
Altamisa	9,63 \pm 1,90	2,51 \pm 0,73	670,92 \pm 11,15
Caléndula	16,30 \pm 3,16	7,25 \pm 1,16	1.118,25 \pm 32,19
Cebolla roja	43,65 \pm 1,34	33,19 \pm 3,26	847,19 \pm 7,50
Cola de caballo	26,49 \pm 1,37	6,35 \pm 2,92	453,6 \pm 48,33
Hierbabuena	77,15 \pm 1,21	447,80 \pm 0,68	1.114,52 \pm 11,72
Higuerilla	40,28 \pm 2,23	93,77 \pm 1,21	1.698,63 \pm 8,29
Hinojo	33,83 \pm 2,37	3,70 \pm 1,37	615,45 \pm 15,11
Manzanilla	86,97 \pm 4,76	179,07 \pm 1,89	17.292,0 \pm 35,28
Menta poleo	93,94 \pm 5,50	477,20 \pm 0,98	56.286,0 \pm 740,09
Milenrama	54,35 \pm 2,21	215,46 \pm 1,60	13.337,2 \pm 105,40
Ortiga	11,83 \pm 2,23	5,74 \pm 4,20	927,19 \pm 3,88
Romero	26,64 \pm 1,62	177,62 \pm 0,81	332,79 \pm 13,52
Ruda	79,64 \pm 0,99	9.289,00 \pm 0,53	1682,3 \pm 63,81
Tomillo	164,46 \pm 2,17	13.627,00 \pm 0,46	949,32 \pm 8,71
BHA	11.945,10 \pm 4,80	24.807,00 \pm 1,24	Nd
BHT	12.568,20 \pm 2,10	202.065,00 \pm 3,78	Nd

La determinación de actividad antioxidante está dada como medias \pm S.D. (n=3)

Nd: no definido

Al analizar la capacidad antioxidante para los hidrosoles (Tabla 6) se observa que para los tres métodos utilizados el hidrosol de romero (*Rosmarinus officinalis*)

presentó los mejores resultados bajo las condiciones de ensayo, a pesar de mostrar valores inferiores a los encontrados para los controles positivos (BHA y BHT). Estos resultados coinciden con los hallados en los preliminares como se observa en la Tabla 4 y Tabla 5 para los hidrosoles determinados por medio de DPPH y ABTS, donde el hidrosol de romero presenta la más alta actividad antioxidante comparada con las otras especies.

Estos resultados son superiores a los reportados por Zaouali, Y. y col., (2010) en Túnez, donde utilizaron *R. officinalis var. troglodytorum* y *R. officinalis var. Typicus* encontrando valores promedio entre 6,0 y 28.5 µg/mL por medio de DPPH, y entre 16.53 y 21.77 mM/L por FRAP. Estas variaciones son atribuidas a diferencias en la composición química de los extractos de acuerdo a las regiones de cultivo, las condiciones ambientales y agronómicas, el tiempo de la cosecha, la etapa de desarrollo de las plantas y el método de extracción. La actividad antioxidante podría explicarse parcialmente por las altas cantidades de alcanfor, acetato de linalilo y α -thujene. Las diferencias en el poder antioxidante de una misma especie vegetal puede deberse al hecho de la difícil forma de atribuir el efecto antioxidante de los extractos vegetales al total o a uno o algunos de los compuestos activos. Cada compuesto en mayor o menor grado, puede tener una contribución significativa a la actividad antioxidante.

De igual forma, Celiktas, O. y col., (2007) en Turquía, determinaron la actividad antioxidante por medio de ABTS del hidrosol de *Rosmarinus officinalis* obtenido a partir de CO₂ supercrítico cuyas variables fueron la localización del cultivo y el tiempo de cosecha. Los resultados encontrados oscilaron entre 7,4 y 3,1 mM Trolox/kg de material húmedo, los cuales no presentaban diferencias significativas estadísticamente, sin embargo el tiempo de cosecha presentó mayor influencia sobre la actividad del hidrosol. Además, los autores afirman que los compuestos responsables de la actividad antioxidante son diterpenos fenólicos, tales como el ácido carnósico, carnosol, rosmanol, epi- e iso-rosmanol y el componente fenólico del ácido rosmarínico.

Al analizar los resultados de los aceites esenciales (Tabla 7) se puede observar que el aceite de tomillo presenta los valores más altos al determinar la actividad antioxidante por medio de DPPH y ABTS, y el aceite de menta poleo presenta los mejores resultados al emplear el método de FRAP, coincidiendo estos resultados con los preliminares por el método de ABTS donde el aceite de tomillo presenta los valores más altos (Tabla 5).

El aceite esencial de tomillo, presenta los mejores resultados de actividad captadora de radicales libres para estos ensayos, por lo cual se podría afirmar que su alto contenido de γ -terpineno (19,3%) es el responsable de dicha actividad. Aunque el mecanismo de la acción antioxidante de los aceites esenciales no se conoce con toda certeza, un estudio realizado por Fotti, M., Ingold, K.U. (2003), sugieren que el γ -terpineno, presente en varios aceites esenciales, actúa como antioxidante al retardar la peroxidación del ácido linoléico, porque los radicales peroxilo formados a partir de éste (HOO-) reaccionan rápidamente con los radicales peroxilo del ácido linoléico.

Bounatirou, S. y col. (2007) en Portugal, determinaron la actividad antioxidante del aceite esencial de *Thymus capitatus* en diferentes fases del desarrollo de la planta, por medio de DPPH entre 100–1000 mg/L, obteniendo máximos valores en un intervalo de 500 y 1000 mg/L para los aceites en la fase de floración y post-floración, que a su vez se caracterizaron por presentar los valores más elevados en su contenido de monoterpenos oxigenados (66-86%). Todas las muestras de aceites esenciales presentaron actividad antioxidante, pero las diferencias estadísticas significativas se observaron cuando al comparar las diferentes etapas de desarrollo como fue el estado vegetativo, floración y post-floración.

Resultados diferentes se obtienen cuando las extracciones del tomillo se hacen con solventes como metanol, etanol, éter dietílico y hexano donde los valores de IC_{50} oscilaron entre 0.0011 y 0.0022, cuando se empleó el metanol como solvente

de extracción. En este caso, los valores de actividad captadora de radicales libres del tomillo podrían estar asociados al alto contenido de componentes fenólicos entre los que se encuentran ácido cinámico, ácido ferúlico, ácido rosmarénico y rosmarenato metílico (Roby, M. y col. 2013).

Como se presentó en los resultados de la Tabla 3, el aceite esencial de tomillo fue el que presentó los mejores resultados sobre la cantidad de polifenoles totales y por ende elevados resultados sobre su capacidad antioxidante (Tabla 7). Hoy en día, el aceite esencial de tomillo y sus componentes ganan interés debido a su estado seguro, la amplia aceptación por los consumidores, y la explotación para el uso funcional de usos múltiples. Hay un creciente interés en antioxidantes, especialmente los destinados a prevenir efectos nocivos de radicales libres en los humanos y para prevenir el deterioro de las grasas y de otros constituyentes de los productos alimenticios. En ambos casos, hay una cierta preferencia por los antioxidantes de origen natural en lugar de los sintéticos (Bounatirou, S. y col. 2007). El aceite esencial de *T. capitatus* parece actuar como donador de electrones. El potencial reductor, puede ser debido a las sustituciones de los di-y monohidroxis en el anillo aromático que poseen una potente habilidad de donar hidrógenos.

Con lo anterior se puede afirmar que la actividad antioxidante obtenida por el método DPPH, ABTS y FRAP está correlacionada con el contenido de compuestos fenólicos totales (Ramos, E. y col., 2008). Aunque Dai, J. y Mumper, R. (2010), afirman que el ensayo de compuestos fenólicos de Folin-Ciocalteu también se considera como otro ensayo de la capacidad antioxidante debido a que su mecanismo básico es como una reacción de oxidación/reducción, al observar los resultados de polifenoles totales para los hidrosoles (Tabla 3), se tiene como valor más alto al hidrosol de romero lo que coincide con todos los resultados de la capacidad antioxidante como se muestra en la Tabla 6. Para el caso de los polifenoles de los aceites esenciales, se puede mencionar que de mayor a menor los aceites más representativos en cuanto a sus resultados fueron tomillo, ruda,

menta poleo, hierbabuena, manzanilla, entre otros (Tabla 3), lo que coincide con el orden de los resultados encontrados para la capacidad antioxidante (Tabla 7).

Al generalizar los métodos empleados, la utilización del radical libre del DPPH *in vitro* permite tener una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo*. Este método muestra una elevada estabilidad dado que tiene un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa, mientras que otros radicales libres como el ABTS tienen que ser generados tras una reacción que puede ser química, enzimática o electroquímica (Ramos, E. y col., 2008).

Entre las ventajas del método ABTS se tienen su elevada reproducibilidad, su uso flexible en diferentes medios tales como acuosos o lipofílicos de extractos de plantas, alimentos y fluidos fisiológicos, ya que el reactivo es soluble tanto en medios solventes acuosos como orgánicos. El radical ABTS reacciona suavemente con antioxidantes, y puede ser usado en un amplio rango de pH del medio de reacción.

El método FRAP se basa en la comparación de la cantidad total de antioxidantes con la capacidad de reducción de la muestra. FRAP es un método rápido, fácil de manejar y sus resultados altamente reproducibles (Politeo, O. y col., 2009). En cuanto a las diferencias que presentan los resultados obtenidos con los otros métodos de capacidad antioxidante se sabe que FRAP presenta resultados más bajos debido a la reacción incompleta del reactivo tripiridyltriazine de hierro (III) con algunos flavonoides y ácidos fenólicos (Özyürek et al. 2012).

Los iones metálicos de transición pueden estimular la peroxidación lipídica por dos mecanismos, el primero es participación en la generación de especies inicialistas y el segundo es mediante la aceleración de la descomposición de la peroxidación de hidroperóxidos lipídicos en otros componentes que son capaces de sustraer hidrógeno, perpetuando la reacción en cadena de la reacción de peroxidación lipídica (Bounatirou, S. y col. 2007). De hecho, el carvacrol, que uno de los

componentes del aceite esencial de especies de tomillo, y que no se encuentra en el romero, por ejemplo, es un compuesto mono-hidroxiado que no es capaz de formar complejos con Fe^{2+} , por lo tanto no presenta actividad quelante de metales. Esta puede ser una de las razones por la cual este aceite esencial, no presentó mayor capacidad antioxidante mediante el método FRAP a diferencia de los otros métodos de determinación (DPPH y ABTS).

FRAP es poco sensible a compuestos antioxidantes del tipo tiol (-SH). El método FRAP puede presentar interferencias tanto en la cinética de la reacción de oxidación como en la cuantificación de algunos compuestos fenólicos.

En términos generales, la actividad antioxidante es debida a diferentes factores, como la prevención de iniciación de la cadena, la descomposición de peróxidos, la prevención de la abstracción continúa de hidrógenos, eliminación de radicales libres, reduciendo la capacidad antioxidante, y la unión de catalizadores de transición de iones metálicos. Por lo tanto, es importante que para evaluar la eficacia de los antioxidantes, se utilicen varios métodos analíticos y diferentes sustratos (Bounatirou, S. y col. 2007).

La capacidad antioxidante en una especie vegetal en primer lugar viene dada por la suma de las capacidades antioxidantes de cada componente, y en segundo lugar, ésta depende del microambiente en el que se encuentre el compuesto, pudiendo interactuar entre sí, produciéndose efectos sinérgicos o inhibitorios (Muñoz, A. y col., 2007). Es así como las condiciones ambientales pueden afectar la composición química de las plantas, lo que se ve reflejado en el contenido de antioxidantes. Este es uno de los motivos por los cuales es conveniente evaluar las muestras para una determinada especie recolectada en diferentes lugares, debido a que se presentan diferencias entre muestras que pertenecen a la misma especie en el mismo lugar (Özyürek, M. 2012) como se observa con los resultados logrados en nuestra investigación.

Las diferencias encontradas con las distintas metodologías pueden ser en cierta medida explicadas por las diversas cantidades relativas de compuestos de menor importancia en los aceites, lo que puede tener un efecto significativo sobre el efecto antioxidante del aceite esencial (Bounatirou, S. y col. 2007).

El elevado uso de antioxidantes naturales, especialmente los de origen vegetal, en forma de extractos definidos químicamente han sido estudiados ampliamente durante los últimos 20 años. La mayoría de los antioxidantes aislados de las plantas son los polifenoles. Las especies vegetales más utilizadas como fuente de antioxidantes son el romero, la salvia y el tomillo (Zegura, B. y col., 2011), lo que concuerda con los resultados encontrados en este estudio para polifenoles totales y actividades antioxidantes.

Las sustancias naturales, como los aceites esenciales e hidrosoles de especies vegetales han logrado un gran interés científico debido a su potencial como fuente de antioxidantes naturales y compuestos biológicamente activos (Naeini, A, y col., 2010). En Colombia existe gran cantidad de especies vegetales, nativas y foráneas, que por las condiciones generales de las plantas, las características de suelo, altitud media y demás condiciones generan metabolitos secundarios que pueden ser utilizados en controles biológicos en búsqueda de un aprovechamiento ventajoso.

5.4. Actividad fungicida

Se evaluaron los aceites esenciales y los hidrosoles de las 17 especies vegetales estudiadas en este estudio, para la actividad fungicida contra los hongos patógenos que atacan el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum*).

Bajo las condiciones de laboratorio, la estructura macro-morfológica de los hongos evaluados *P. infestans*, *F. oxysporum* y *R. solani* se presentan en la Figura 3.

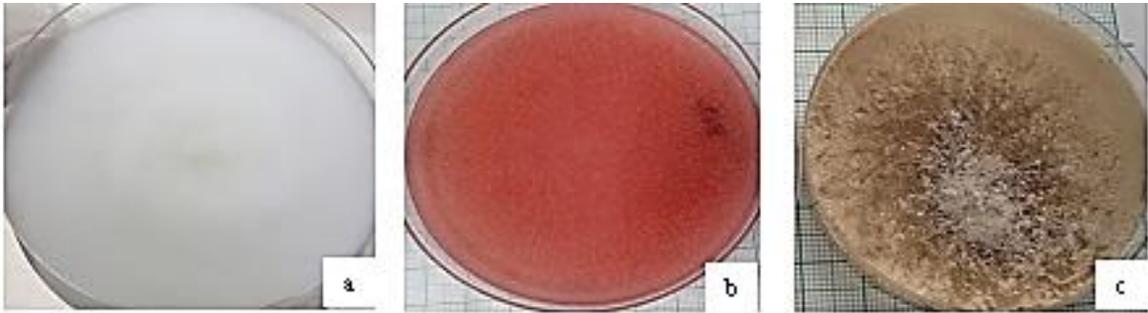


Figura 3. (a) *Phytophthora infestans* en agar arveja, (b) *Fusarium oxysporum* en agar PDA, (c) *Rhizoctonia solani* en agar PDA

Los tres hongos fueron retados para activar su virulencia como se muestra en la Figura 4 para el caso de *P. infestans*, *F. oxysporum* y *R. solani* sobre rodajas de papa.



Figura 4. Hongos retados sobre rodajas de papa: (a) *P. infestans*, (b) *F. oxysporum* (c) *R. solani*

Con estas cepas retadas se trabajó para calcular el porcentaje de inhibición de cada uno de los extractos por medio de la concentración mínima inhibitoria y la difusión en disco en agar.

5.4.1. Concentración Mínima Inhibitoria (Micro-método)

Los hongos fueron evaluados con los hidrosoles y aceites esenciales a diferentes concentraciones. Inicialmente se ensayaron concentraciones de 1 a 5 $\mu\text{g/mL}$. Los resultados de mayor porcentaje de inhibición para cada hidrosol y aceite esencial

se muestran en las Tablas 8 y 9, respectivamente (ver resultados completos en el Anexo J), y en las Figuras 5 y 6 se presentan los resultados para cada hidrosol y aceite esencial, que presentan actividad fungicida mayor al 50% para cada hongo evaluado.

Tabla 8. Actividad fungicida de 17 hidrosoles de especies vegetales contra *P. infestans*, *F. oxysporum* y *R. solani*

Nombre Común	Porcentaje de Inhibición (%)					
	<i>R. solani</i>		<i>F. oxysporum</i>		<i>P. infestans</i>	
Ajenjo	51,5	± 32,8	37,2	± 24,4	35,9	± 2,7
Ají	41,5	± 21,5	16,8	± 9,3	39,0	± 24,7
Ajo	80,4	± 16,5	21,2	± 8,4	60,0	± 33,8
Altamisa	61,4	± 20,6	43,3	± 21,2	39,5	± 3,9
Caléndula	79,9	± 10,9	62,5	± 8,5	72,4	± 7,9
Cebolla Roja	41,8	± 34,4	18,3	± 6,4	52,7	± 9,7
Cola de Caballo	78,1	± 4,0	38,8	± 13,3	36,4	± 5,1
Hierbabuena	34,5	± 24,5	11,6	± 11,2	62,0	± 2,2
Higuerilla	56,8	± 21,1	12,2	± 53,7	35,5	± 3,2
Hinojo	35,5	± 38,9	13,5	± 1,8	50,4	± 16,5
Manzanilla	67,4	± 21,6	36,9	± 22,4	36,2	± 3,2
Menta Poleo	45,7	± 8,3	38,2	± 6,7	47,5	± 1,0
Milenrama	79,2	± 5,7	39,0	± 15,3	47,3	± 3,5
Ortiga	71,8	± 2,7	51,8	± 10,9	49,4	± 43,3
Romero	68,0	± 15,7	45,4	± 10,6	50,4	± 4,2
Ruda	37,1	± 49,8	19,8	± 0,3	57,7	± 34,3
Tomillo	72,3	± 6,6	34,7	± 9,2	52,0	± 0,4

La determinación de actividad fungicida está dada como medias \pm S.D. (n=3)

Según la Tabla 8 los hidrosoles que inhiben a *R. solani* en un porcentaje mayor a 50% son ajenjo, ajo, altamisa, caléndula, cola de caballo, manzanilla, milenrama, ortiga, romero, y tomillo, presentando la mayor actividad el hidrosol de ajo, seguido por la caléndula, milenrama, cola de caballo y tomillo (80, 4 y 72,3%). Para *F. oxysporum* solo la caléndula y la ortiga presentaron un porcentaje de inhibición mayor a 50% y para *P. infestans* ajo, caléndula, cebolla roja, hierbabuena, ruda y tomillo, siendo el hidrosol de caléndula el de mayor porcentaje de inhibición (72,4%), seguido por el de hierbabuena (62%). También se puede observar que

solo el hidrosol de caléndula presenta inhibición mayor a 50% para los tres hongos.

Tabla 9. Actividad fungicida de 17 aceites esenciales de especies vegetales contra *P. infestans*, *F. oxysporum* y *R. solani*

Nombre Común	Porcentaje de Inhibición (%)		
	<i>R. solani</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. infestans</i>
Ajenjo	66,8 ± 28,2	17,6 ± 3,4	37,3 ± 9,4
Ají	33,0 ± 9,9	42,4 ± 47,4	32,8 ± 15,3
Ajo	80,8 ± 15,4	25,1 ± 15,0	27,5 ± 5,1
Altamisa	55,2 ± 12,6	31,8 ± 1,7	28,8 ± 14,8
Caléndula	57,9 ± 23,3	7,3 ± 10,8	35,4 ± 5,8
Cebolla Roja	38,1 ± 28,6	11,3 ± 3,3	22,8 ± 20,5
Cola de Caballo	81,9 ± 12,0	41,0 ± 10,1	25,8 ± 15,1
Hierbabuena	100,0 ± 0,5	87,4 ± 7,5	23,8 ± 10,5
Higuerilla	65,5 ± 1,4	48,5 ± 25,3	20,9 ± 3,8
Hinojo	75,9 ± 21,3	33,0 ± 13,2	23,4 ± 25,3
Manzanilla	72,9 ± 23,2	72,2 ± 0,5	22,0 ± 5,8
Menta Poleo	99,2 ± 0,0	92,8 ± 9,0	43,8 ± 23,4
Milenrama	89,7 ± 7,7	93,1 ± 3,5	36,4 ± 5,0
Ortiga	72,3 ± 16,4	29,1 ± 17,1	38,9 ± 10,3
Romero	66,1 ± 18,0	40,0 ± 23,7	4,3 ± 3,7
Ruda	99,1 ± 1,0	88,7 ± 1,0	21,8 ± 8,6
Tomillo	99,9 ± 0,8	98,6 ± 2,6	76,8 ± 31,2

La determinación de actividad fungicida está dada como medias \pm S.D. (n=3)

Los aceites esenciales que inhibieron a *R. solani* en un porcentaje mayor al 50% se presentan en la tabla 9. Se observa que la mayoría de los aceites inhiben a este hongo, a diferencia de los hidrosoles, donde solo dos aceites presentan una inhibición por debajo del 50% (ají (33%) y cebolla roja (38%)). También se encontró que el aceite de hierbabuena presentó una inhibición del 100% y los aceites de menta poleo, ruda y tomillo del 99%, seguido del aceite de milenrama con 89,7%. Para *F. oxysporum* se encontró que los aceites que presentaron inhibición por encima del 50% fueron manzanilla hierbabuena, menta poleo, milenrama, ruda y tomillo, siendo el tomillo el de mayor inhibición (98,6%). Para *P. infestans* solo el tomillo presentó un porcentaje de inhibición mayor al 50%.

Además, se observa que el aceite de tomillo es el único que presenta inhibición para los tres hongos.

En los resultados de las Tablas 8 y 9 se observa que las desviaciones estándar son grandes por lo que la reproducibilidad de los resultados no es muy confiable. Sin embargo, se realizaron las Figuras 5 y 6 para inferir de los resultados la tendencia sobre la inhibición que presentaron los extractos.

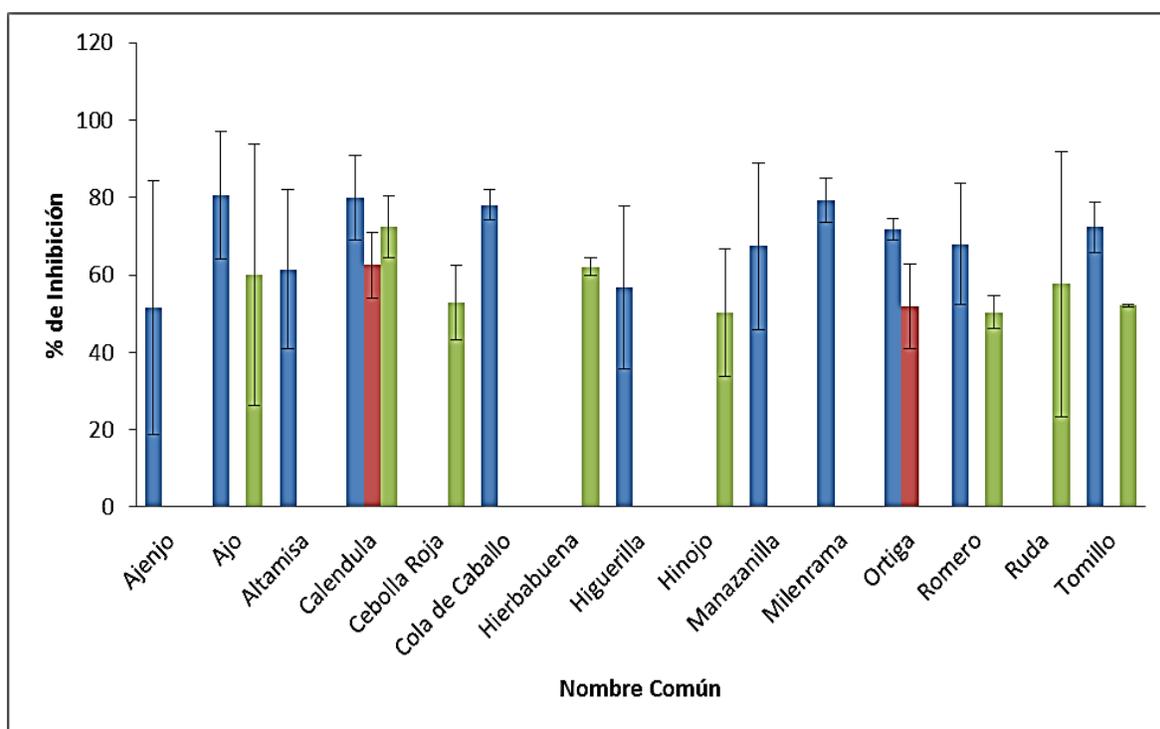


Figura 5. Porcentaje de inhibición de hidrososles de especies vegetales contra los hongos *P. infestans* (■), *F. oxysporum* (■) y *R. solani* (■). Concentraciones de hidrososles entre 1-5 µg/mL. El porcentaje de inhibición está dado como medias ±S.D. (n=3)

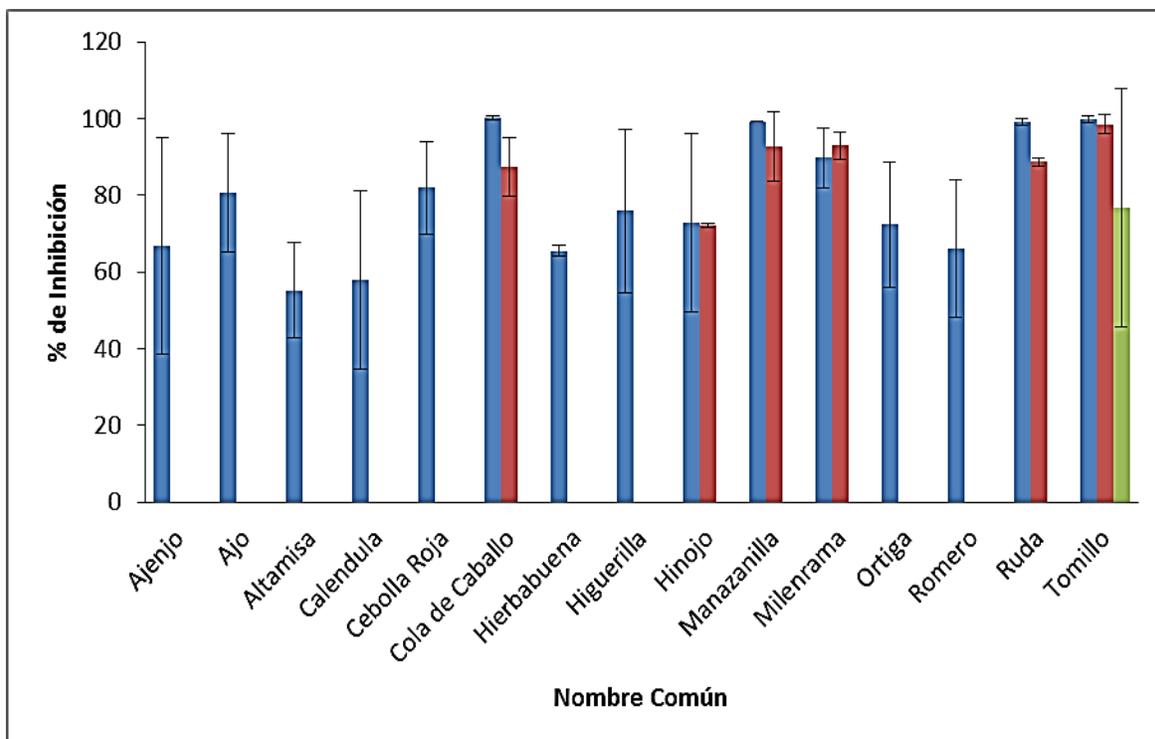


Figura 6. Porcentaje de inhibición de aceites esenciales de especies vegetales contra los hongos *P. infestans* (■), *F. oxysporum* (■) y *R. solani* (■). Concentraciones de hidrosoles entre 1-5 µg/mL. El porcentaje de inhibición está dado como medias ±S.D. (n=3)

En las figuras 5 y 6, se puede observar que el hidrosol de caléndula fue el que presentó inhibición de los tres hongos evaluados (Figura 5) con un porcentaje entre el 60 y 80%, y para el caso de los aceites esenciales, fue el aceite de tomillo (Figura 6) con un porcentaje de inhibición entre el 70 y 100%.

Dadas las desviaciones tan altas en el ensayo anterior se realizó otro ensayo, donde se incrementaron las concentraciones de los extractos entre 10 y 50 µg/mL. Los resultados de este ensayo se presentan en el Anexo K, pero igual que en el caso de los ensayos anteriores, los valores de las desviaciones estándar encontradas para los extractos no permiten una buena reproducibilidad de los datos. De todas formas, se analizaron los resultados y se contrastaron con los anteriores para ver si se encontraba el mismo comportamiento o definitivamente los resultados no eran confiables. (Figura 7 y 8).

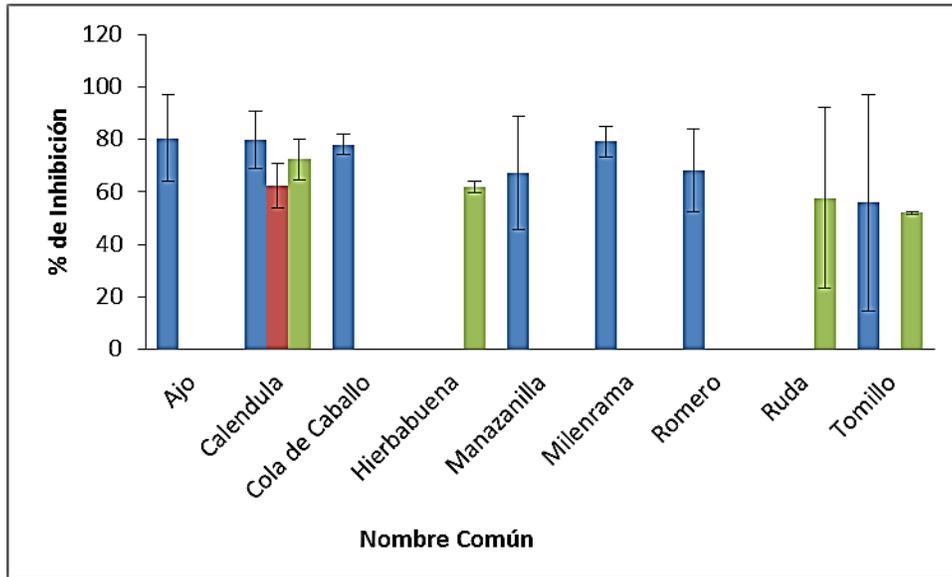


Figura 7. Porcentaje de inhibición de hidrosoles de especies vegetales contra los hongos *P. infestans* (■), *F. oxysporum* (■) y *R. solani* (■). Concentraciones de hidrosoles entre 10-50 µg/mL. El porcentaje de inhibición está dado como medias ±S.D. (n=3)

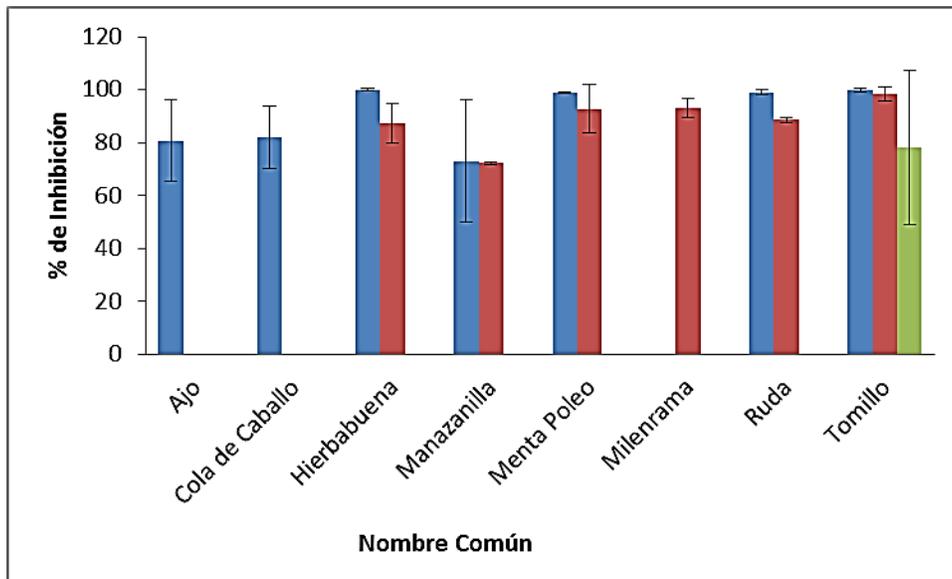


Figura 8. Porcentaje de inhibición de aceites esenciales de especies vegetales contra los hongos *P. infestans* (■), *F. oxysporum* (■) y *R. solani* (■). Concentraciones de hidrosoles entre 10-50 µg/mL. El porcentaje de inhibición está dado como medias ±S.D. (n=3)

Como se observa en la Figura 7, el hidrosol de caléndula presentó inhibición de los tres hongos en evaluación con un porcentaje entre el 60 y 80%, y para el caso de los aceites esenciales (Figura 8), el aceite de tomillo inhibió los tres hongos con un porcentaje de inhibición entre el 70 y 100%. Estos resultados coinciden con los ensayos realizados a menor concentración de extractos. Desafortunadamente, no se pudo encontrar la concentración más eficiente para inhibir los hongos evaluados, lo único que se puede afirmar es que el hidrosol de caléndula y el aceite de tomillo afectan el crecimiento de los hongos evaluados. De igual forma, al comparar la Figura 5 con la Figura 7, se observa que los hidrosoles de ajo, caléndula, cola de caballo, hierbabuena, milenrama y romero bajo las condiciones del ensayo, tienen efecto positivo sobre la inhibición de por lo menos uno de los hongos de interés. En el caso de los aceites esenciales (Figura 6 y 8), se tienen los aceites de ajo, cola de caballo, hierbabuena, manzanilla, menta poleo y ruda inhiben por lo menos uno de los hongos.

En consecuencia de lo anterior, y al observar que los resultados entre réplicas tienen una desviación estándar muy irregular, lo que representa una baja reproducibilidad de la técnica, posiblemente por la baja solubilidad de los aceites o el color característico de algunos de los extractos (por ejemplo, el hidrosol de romero presenta un color café oscuro, el aceite de milenrama tiene un color azul oscuro, entre otros) lo que puede afectar la lectura de la absorbancia, se decidió optar por el método de difusión en disco en agar con el fin de verificar los resultados obtenidos por el método espectrofotométrico y encontrar la concentración de inhibición adecuada para cada hongo.

5.4.2. Difusión en disco en agar (Macro-método)

Para determinar el efecto fungicida de los extractos empleados se utilizó la difusión en disco, que se basa en la difusión radial de cada extracto, desde discos de papel estériles impregnados con los mismos. Si se presenta un efecto fungicida se evita el crecimiento del hongo en la zona de difusión formándose un halo visible

y medible por medio del software ImageJ. Se considera que la actividad fungicida está directamente relacionada con el diámetro de la zona de inhibición del crecimiento del hongo empleado.

Con cada hongo de interés y los 17 extractos (hidrosoles y aceites esenciales) se realizó un diseño factorial completo (screening) por triplicado, con el fin de determinar si los extractos presentaban inhibición cuando éste se utilizaba sin diluciones sobre los hongos (10 µL de extracto puro). Los ensayos fueron realizados de forma independiente, es decir, cada una de las réplicas por separado. Los resultados sobre el screening de los extractos se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Screening de actividad fungicida de cada extracto (Difusión en disco)

Nombre Común	<i>P. infestans</i>		<i>F. oxysporum</i>		<i>R. solani</i>	
	Hidrosol	Aceite esencial	Hidrosol	Aceite esencial	Hidrosol	Aceite esencial
Ajenjo	-	-	-	-	-	-
Ají	-	-	-	-	-	-
Ajo	-	-	-	-	-	-
Altamisa	-	-	-	-	-	-
Caléndula	-	-	-	-	-	-
Cebolla roja	-	-	-	-	-	-
Cola de caballo	-	-	-	-	-	-
Hierbabuena	-	+	-	+	-	+
Higuerilla	-	-	-	-	-	-
Hinojo	-	-	±	-	-	-
Manzanilla	-	-	±	-	-	-
Menta poleo	-	+	-	+	-	+
Milenrama	-	+	-	+	-	+
Ortiga	-	-	-	-	-	-
Romero	-	+	±	+	-	+
Ruda	-	+	±	+	-	+
Tomillo	-	+	-	+	-	+

La determinación de actividad fungicida está dada como medias \pm S.D. (n=3)

- : 0% de inhibición

± : <10% de inhibición

+ : 100% de inhibición

En la Figura 9, se presenta la comparación entre el control negativo (blanco), el control positivo (fungicida comercial) y el aceite esencial de tomillo cuando actúa sobre *F. oxysporum*.

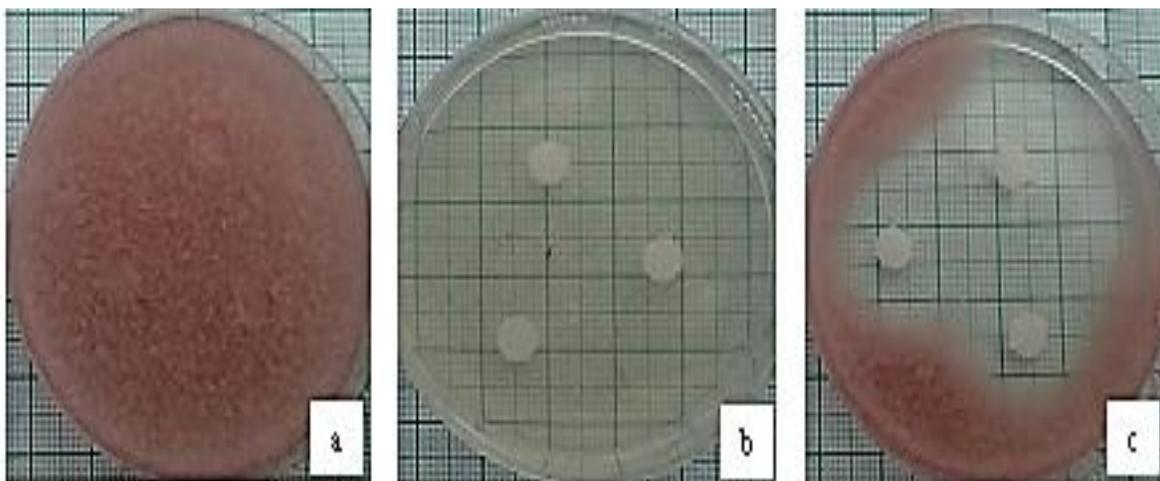


Figura 9. *F. oxysporum*. (a) Blanco, (b) Aceite esencial de tomillo, (c) Control positivo

Comparando con la literatura encontramos que nuestros resultados coinciden con los reportados para estos aceites. Por ejemplo para el aceite de ruda se ha demostrado que sus compuestos químicos tienen propiedades antiespasmódicas, citotóxicas, antirreumático, antihipertensivo, antiséptico para la piel y repelente, fungicida e insecticida, siendo éstas últimas propiedades aprovechadas en cultivos por ser inocuos para el medio ambiente, para los consumidores y para el efectivo control postcosecha (Barrera, L. y col., 2008; Grigorjev, C. y col., 2010; Naveda, G. y col., 2010).

Debido a la cantidad de monoterpenos que contiene la hierbabuena se puede utilizar como repelente para insectos porque afecta el crecimiento y desarrollo y puede resultar tóxico para los mismos. De igual forma se puede utilizar esta planta como fungicida y bactericida.

La actividad antimicrobiana del romero se le atribuye a sus distintos componentes como sus compuestos fenólicos (ácido carnósico, carnosol, y ácido rosmarínico) y a los principales agentes activos contenidos en el aceite esencial como son: pineno, canfeno, 1,8-cineol, limoneno, alcanfor, linalol, D-linalol, borneol y su acetato, terpeno y cariofileno, los cuales se encuentran identificados en el aceite utilizado para este proyecto (Ardila, M., y col., 2009; Estrada, S. 2010).

El aceite esencial de romero contiene como componentes mayoritarios gran cantidad de monoterpenos como α -pineno, β -pineno, mirceno, 1,8-cineol y borneol. Estos compuestos presentan elevadas capacidades antimicrobianas debido a que facilitan la ruptura de la membrana integrada de los microorganismos. Otra importante característica de los aceites esenciales es su hidrofobicidad, que permite que penetren componentes lipídicos a la membrana celular y la mitocondria, lo que altera la estructura de la célula permitiendo la liberación de moléculas fundamentales para esta lo que lleva a la eventual muerte de los microorganismos expuestos (Okoh, O. y col., 2010).

En el tomillo, está comprobado que sus componentes fenólicos, timol y carvacrol, tienen actividad antibacteriana, antiviral y fungicida sobre diferentes tipos de microorganismos aún aquellos que ya son resistentes a la medicina tradicional (Estrada, S. 2010).

El aceite esencial de tomillo ha sido reconocido por su actividad antibacteriana y antifúngica, razón por la cual se emplean industrialmente en la preparación de desinfectantes de uso humano, enjuagues bucales y otros agentes antimicrobianos utilizados a nivel doméstico (Álzate, D. y col., 2009). Es así como en la investigación de Bounatirou, S. y col. (2007) en Portugal, con el aceite de *Thymus capitatus* extraído a diferentes fases del desarrollo de la planta, determinaron la actividad antimicrobiana por medio de difusión en agar en discos contra *Bacillus cereus*, *Salmonella* sp., *Listeria innocua*, cuatro cepas de *Staphylococcus aureus* (C15, ATCC 25923, CFSA-2) y *S. aureus* (MRSA-2),

encontraron que los aceites esenciales aislados durante la fase vegetativa no presentaron actividad, mientras que si se observaron elevadas actividades antibacterianas en las fases de floración y post-floración. *S. aureus* ATCC 25923 fue la cepa más susceptible a los aceites en la etapa de floración.

Con los resultados de la Tabla 10, se seleccionaron los extractos que presentaban inhibición al 100% para los tres hongos, es decir solo seis aceites esenciales debido a que los hidrosolubles no presentaron actividad a la concentración evaluada. Los aceites seleccionados fueron hierbabuena (*Mentha spicata*), menta poleo (*Mentha pulegium*), milenrama (*Achillea millefolium*), romero (*Rosmarinus officinalis*), ruda (*Ruta graveolens*) y tomillo (*Thymus vulgaris*). Extractos que coinciden con las tendencias observadas en los ensayos de concentración mínima inhibitoria sobre los aceites esenciales y de igual forma coinciden con los principales resultados sobre polifenoles totales y actividad antioxidante determinados en los numerales anteriores.

Con los aceites seleccionados se determinó el porcentaje de inhibición contra los tres hongos empleando diferentes concentraciones de los aceites. De igual forma se realizó un ensayo independiente con un testigo comercial como blanco positivo. Las concentraciones utilizadas estuvieron entre 1 y 6 μL de cada aceite. Con estas concentraciones se realizó una curva (Anexo L) para determinar el IC_{50} de cada aceite. Los resultados se presentan en la Figura 10.

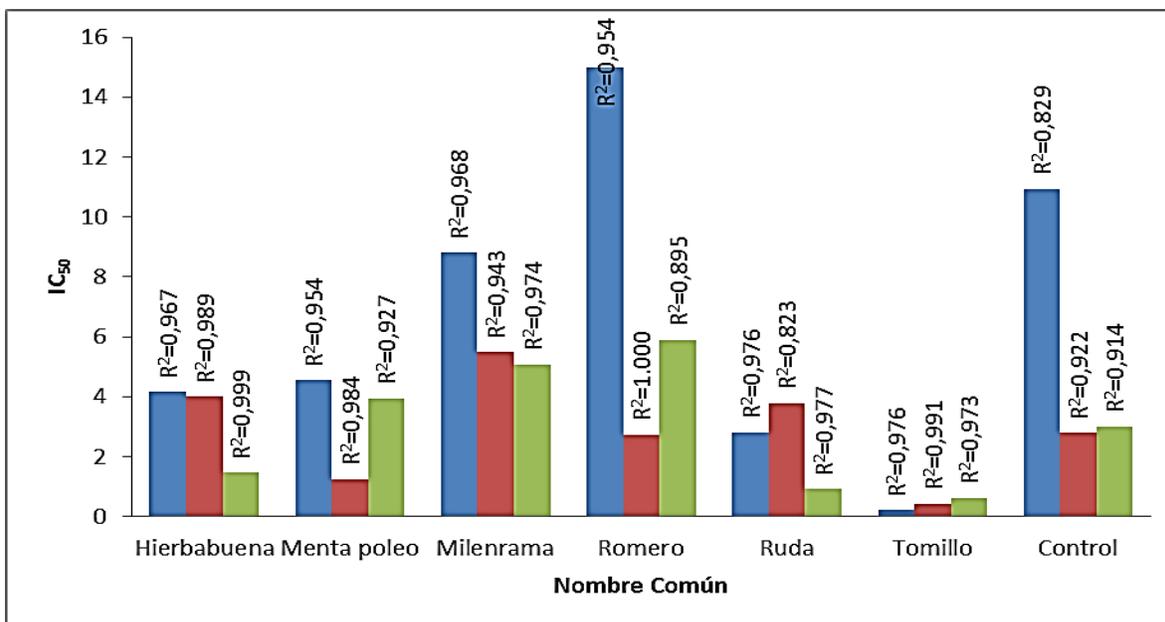


Figura 10. IC₅₀ de seis aceites esenciales de especies vegetales contra los hongos *P. infestans* (■), *F. oxysporum* (■) y *R. solani* (■). Concentraciones de aceites entre 1-6 µL. El IC₅₀ está dado como medias ±S.D. (n=3)

Como se observa en la Figura 8, el aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*), es el que presenta los mejores valores para los tres hongos bajo las condiciones del ensayo al comparar con los otros aceites, e incluso muestra mayor eficiencia que el fungicida comercial lo que concuerda con los resultados más altos sobre actividad antioxidante, polifenoles totales y de hecho con lo que han publicado en otras investigaciones sobre determinaciones antimicrobianas. La acción fungicida de los componentes de los aceites esenciales, se debe al carácter lipofílico de su esqueleto de hidrocarburos y principalmente al carácter hidrofílico de sus grupos funcionales (García, C. y col., 2010), razón por la cual los extractos que presentaron actividad fungicida son aceites esenciales.

Adicional a esto, al observar los metabolitos secundarios presentes aceite esencial de tomillo se encontró que contiene 10 compuestos en diferentes concentraciones que no están presentes en ninguno de los otros aceites evaluados, los cuales están enlistados en la tabla 11, donde se resalta la presencia de carvacrol, p-

cimeneno y timol metiléter que han sido reportados como posibles responsables de la actividad fungicida que presenta el tomillo.

Tabla 11. Compuestos químicos del aceite esencial de Tomillo que no están presentes en otras especies evaluadas

Compuesto Químico
1-octen-3-ol
2-metilbutanoato de metilo
acetato de timilo
carvacrol
cis-dihidrocarvona
epi- α -cadinol
p-cimeneno
propanoato de geranilo
timol metiléter
γ -eudesmol

De igual forma, se ha encontrado que el carvacrol y el timol causan alteraciones en la morfología de las hifas lo que genera una reducción en los diámetros de las estas al igual que una lisis de las mismas. Además, el carvacrol actúa como un intercambiador de protones, reduciendo de este modo el gradiente de pH a través de la membrana citoplasmática, lo que disminuye la fuerza motriz de protones causando la muerte celular. De otro lado, parece posible que ambos compuestos pueden interferir con las enzimas de la pared celular como quitina sintasa o quitinasa, así como con las α - y β -glucanasas de los hongos (Numpaque, M. y col., 2011).

Barrera, L. y col., (2008), evaluaron los compuestos carvacrol, timol y aldehído cinámico a concentraciones entre 200 y 300 $\mu\text{g/mL}$ contra el crecimiento de *Fusarium sp.* y como resultado se presentó una total inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium sp.*, observando una correlación entre la actividad antifúngica del aceite esencial y sus constituyentes

El Carvacrol ha sido considerado como un biocida, que genera perturbaciones en la membrana bacteriana acarreado fugas de ATP intracelular y de iones de potasio lo que conduce a la muerte celular. Se considera que los componentes químicos menores de los aceites esenciales tienen una posible interacción entre ellos, lo que podría incrementar la actividad microbiana. Otro constituyente, como c-terpineno, ha presentado buenas actividades debido a su posible efecto sinérgico o antagónico (Bounatirou, S. y col. 2007).

García, C. y col. (2010), reportan actividad antimicrobiana para fenoles como timol, carvacrol y eugenol. Para el caso del tomillo (*Thymus vulgaris*), la presencia de dichos compuestos expresan el más alto espectro de actividad en contra de los microorganismos, debido a la naturaleza ácida de su grupo hidroxilo el cual forma un puente de hidrógeno con un centro enzimático activo.

Kumar, A. y col. (2008) en la India, emplearon aceites esenciales de 14 angiospermas para evaluar su actividad fungicida contra cepas de *Aspergillus flavus*, donde el aceite esencial de tomillo presentó inhibición del 100% del hongo a una concentración de 0,7 $\mu\text{L/mL}$. De igual forma, se evaluó la inhibición que presenta el tomillo contra ocho hongos contaminantes de alimentos como *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium herbarum*, *Curvularia lunata*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria alternata* y *Botryodiplodia theobromae*. Según los resultados se observó inhibición del 80% con 2 de ellos y con los otros se llegó al 100% de inhibición. Los resultados presentan al aceite de tomillo como potencial conservante botánico en el control ecológico de deterioro biológico de los alimentos durante el almacenamiento.

Vaillant y col. (2009), realizaron un estudio sobre la actividad fungicida de cinco monoterpenos (mentol, timol, alcanfor, citronelal y 1,8 cineol) que se encuentran normalmente en los aceites esenciales. Estos monoterpenos fueron empleados en concentraciones de 0.5, 0.1 y 0.05% (p/v) para evaluar el efecto inhibitorio que presentan sobre *Rhizoctonia solani*, causante de la rizoctoniasis en el cultivo de

papa. Los resultados indican que timol, mentol y citronelal presentan inhibición del 100% sobre el hongo evaluado. Estos resultados coinciden con los reportados en este estudio sobre actividad fungicida debido a que el timol es uno de los principales componentes del aceite de tomillo.

5.4.3. Mezclas de extractos para formular un bioinsumo

La selección de los extractos para las mezclas se basó en los resultados de los ensayos preliminares y finales de la bioactividad de los extractos independientes. A partir de estos ensayos se propondrá la formulación preliminar de tres bioinsumos con las mejores características de bioactividad hacía los hongos presentes en el cultivo de papa. Se llevó a cabo la formulación de 9 tipos de mezclas de las cuales tres fueron mezclas de hidrosoles y aceites; otras tres mezclas de solos aceites esenciales; y las últimas tres corresponden a mezclas de solo hidrosoles. A cada una de estas mezclas se les determinó la capacidad antioxidante por medio de DPPH y ABTS y la capacidad fungicida contra los tres hongos evaluados en este estudio.

Se plantearon las mezclas de extractos en una relación de 1:1:1 (v/v) como se muestra en la Tabla 12, para de esta forma bosquejar la posible formulación de un bioinsumo para el cultivo de papa.

Tabla 12. Mezclas de extractos para formulación de bioinsumos

Código	Extractos		
S	H- Ruda	H- Hierbabuena	A- Tomillo
T	H- Caléndula	A- Hierbabuena	A- Tomillo
U	H- Ajo	A- Hierbabuena	A- Ruda
X	A- Hierbabuena	A- M. Poleo	A- Tomillo
Y	H- Hierbabuena	A- M. Poleo	A- Ruda
Z	A- Milenrama	A- Ruda	A- Tomillo
20	H- Hinojo	H- Romero	H- Ruda
21	H- Milenrama	H- Romero	H- Tomillo
22	H- Ajo	H-Caléndula	H- Hierbabuena

A: aceite esencial

H: hidrosol

Los resultados de actividad antioxidante determinada por medio del micro-método de radicales de DPPH y ABTS se presentan en la Tabla 13.

Tabla 13. Actividad antioxidante de las mezclas de extractos

Nombre de Mezcla	DPPH (Equivalentes de Trolox (µg/mL))	ABTS (Equivalentes de Trolox (µg/mL))
Mezcla S	12.209,00 ± 5,136	920.100,00 ± 1,356
Mezcla T	10.009,70 ± 2,750	857.500,00 ± 0,252
Mezcla U	5.237,20 ± 4,157	115.450,00 ± 0,761
Mezcla X	9.203,30 ± 5,498	1.068.600,00 ± 3,374
Mezcla Y	6.065,60 ± 3,991	159.265,00 ± 2,710
Mezcla Z	9.995,00 ± 1,540	1.055.500,00 ± 1,142
Mezcla 20	15.815,80 ± 1,621	132.480,00 ± 3,235
Mezcla 21	15.632,50 ± 0,458	128.550,00 ± 1,666
Mezcla 22	2.605,40 ± 6,378	16.713,00 ± 1,145
BHA	11.945,10 ± 4,800	24.807,00 ± 1,236
BHT	12.568,20 ± 2,098	202.065,00 ± 3,781
FUNG	2.055,50 ± 1,759	16.335,00 ± 0,448

La determinación de la actividad antioxidante está dada como medias ±S.D. (n=3)

Con estos resultados se puede observar y comprobar el efecto sinérgico que presentan las mezclas de hidrosoles y aceites esenciales en cuanto a su capacidad antioxidante. Si volvemos a los resultados de DPPH de hidrosoles y aceites de forma independiente (Tablas 6 y 7, respectivamente), encontramos que la mayor actividad se obtuvo para el hidrosol de Romero con un valor de 165,71 µg/mL y para el aceite esencial de tomillo con un valor de 164,46 µg/mL, valores que se encuentra por debajo de los controles positivos BHA y BHT (Tabla 12). Para las mezclas el valor máximo se presentó para la mezcla 20 (15.815,80 µg/mL) y para la mezcla 21(15.632,50 µg/mL), valores superiores incluso a los encontrados en los controles positivos. Adicionalmente, se puede observar que el extracto que presentó la mayor actividad antioxidante por éste método es el que

influye sobre el resultado de las mezclas, debido a que las dos mezclas que presentan los valores más altos en este ensayo son las que contienen hidrosol de Romero en su composición (ver Tabla 11 composición de las mezclas).

De igual forma ocurre con el ABTS donde el valor máximo para los extractos independientes fue la del aceite de Tomillo con un valor de 13.627,00 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla 7), valor inferior al de los controles positivos. Pero de nuevo en las mezclas se presenta una sinergia, donde el valor máximo encontrado fue para la mezcla X (1.068.600,00 $\mu\text{g/mL}$), dato superior a los resultados encontrados para los controles. Asimismo, se puede decir que las mezclas que contenían el aceite de Tomillo en su composición fueron las que presentaron los valores más altos en este ensayo.

Los resultados de la capacidad fungicida de las mezclas contra los tres hongos estudiados se muestran en la Figura 11.

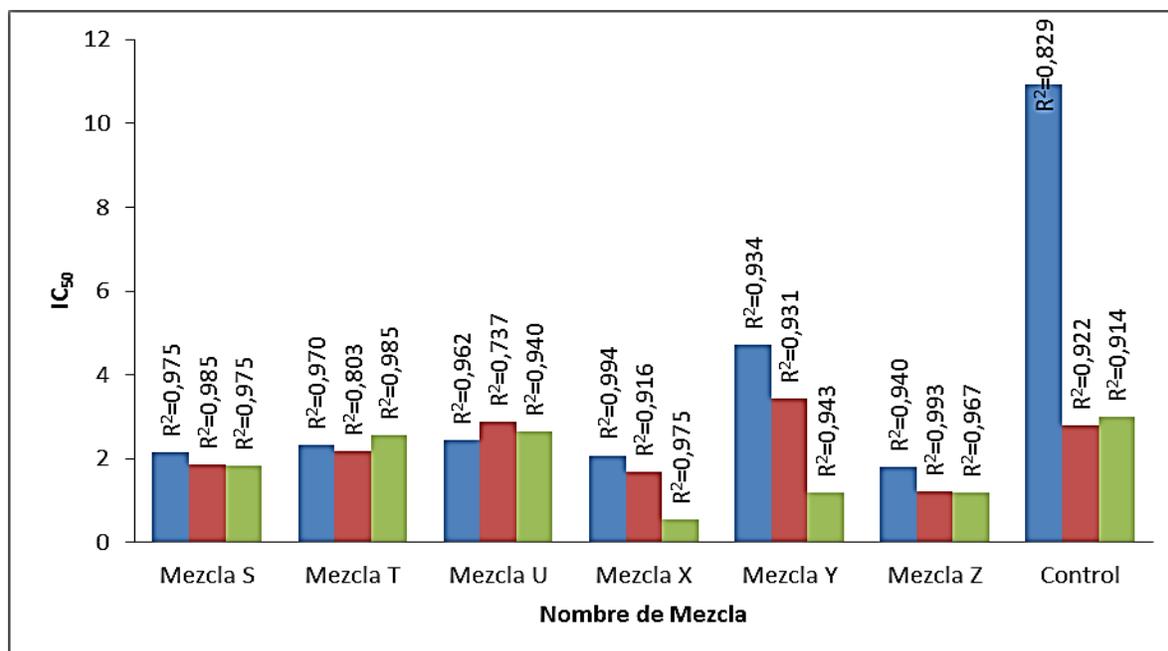


Figura 11. IC₅₀ de mezclas de especies vegetales contra los hongos *P. infestans* (■), *F. oxysporum* (■) y *R. solani* (■).
 Concentraciones de mezclas entre 1-6 μL
 El IC₅₀ está dado como medias \pm S.D. (n=3)

Según los resultados de la Figura 11 se puede observar que los valores del IC₅₀ son inferiores a los encontrados para el control (fungicida comercial) lo que indica que todas las mezclas propuestas (excepto las de solo hidrosoles) son eficientes para inhibir el crecimiento de los tres hongos evaluados. De otro lado, si se observa que la cantidad de extracto que se utiliza para la formulación de las mezclas corresponde a un tercio de cada extracto comparado con la determinación de capacidad fungicida de los extractos independientes, se puede afirmar que las mezclas presentan un resultado muy satisfactorio en el control de estas enfermedades y además permiten disminuir la cantidad de extracto utilizado.

Las mezclas al igual que el control positivo (fungicida) fueron ensayadas bajo las mismas concentraciones a las cuales se evaluaron los aceites de forma independiente, es decir, concentraciones entre 1 y 6 µL de cada una de las mezclas. Las concentraciones de las mezclas a la cual se presentó la mayor inhibición de los hongos se presentan en la Tabla 14.

Tabla 14. Máxima concentración de inhibición de las mezclas contra los hongos *P. infestans*, *F. oxysporum*, *R. solani*

Código Mezclas	<i>P. infestans</i>		<i>F. oxysporum</i>		<i>R. solani</i>	
	Conc (µL)	% de Inhibición	Conc (µL)	% de Inhibición	Conc (µL)	% de Inhibición
Mezcla S	4	100,00	6	100,00	4	100,00
Mezcla T	4	100,00	6	53,63	4	100,00
Mezcla U	6	100,00	6	24,08	6	100,00
Mezcla X	4	100,00	6	96,42	4	100,00
Mezcla Y	6	92,29	6	19,15	6	92,29
Mezcla Z	5	100,00	6	57,22	5	100,00
Control	6	23,75	6	40,58	6	23,75

Como se observa en la Tabla 14, todas las mezclas planteadas presentan mayor porcentaje de inhibición comparado con el control positivo para los hongos de *P. infestans* y *R. solani*, en el caso de *F. oxysporum*, las mezclas **U** y **Y** tienen un

valor inferior al presentado por el control y la mezcla **T** tiene un valor superior, cercano al del control.

En la Figura 12, se presenta una comparación fotográfica para las concentraciones de 4, 5 y 6 μL de la mezcla **X** actuando sobre los tres hongos en evaluación.

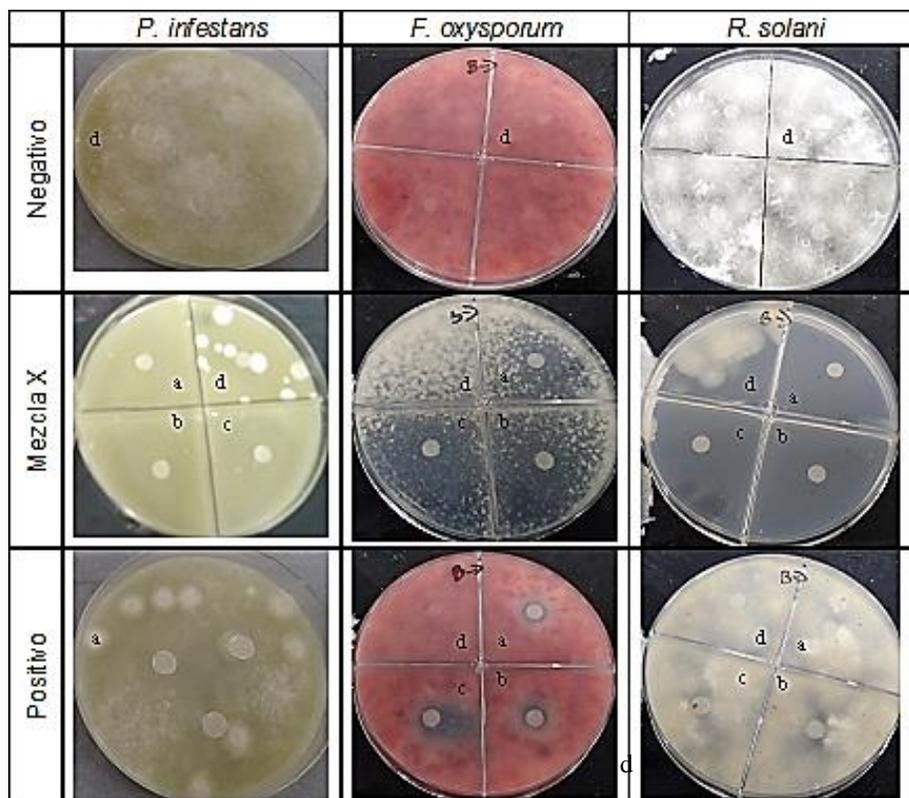


Figura 12. Fotografías de control negativo, Mezcla X y control positivo a concentraciones de (a) 4 μL , (b) 5 μL y (c) 6 μL (d) blanco, para *P. infestans*, *F. oxysporum* y *R. solani*

Se observa que los mejores resultados para este ensayo, los presentan las mezclas que están compuestas sólo de aceites esenciales (Figura 11), debido al gran número de componentes químicos o al sinergismo de todas o algunas de sus moléculas. Es probable que varios componentes de los aceites esenciales desempeñen un papel importante en cada una de sus propiedades como la fragancia, la densidad, la textura, el color y, sobre todo, la penetración celular, la

atracción lipófilica o hidrófilica y la fijación en las paredes y membranas celulares. Esto es importante porque la distribución del aceite en la célula determina los diferentes tipos de reacciones de radicales producidos, dependiendo de su compartimentación en la célula (Gill, A.O. y col., 2002; Canillac, N. y Mourey, A. 2002; Bakkali, F. y col. 2008).

Dai, J. y Mumper, R. (2010), afirman que se presentan efectos mutuamente sinérgicos entre los diferentes compuestos fenólicos o con otros antioxidantes no fenólicos y es generalmente aceptado que una combinación de compuestos fenólicos y otros antioxidantes presenten un mejor efecto antioxidante que el compuesto individual puro. Es así como algunos estudios han llegado a concluir que los aceites esenciales pueden ser agentes antimicrobianos más eficaces que sus componentes purificados (Gill, A.O. y col., 2002; Canillac, N. y Mourey, A. 2002), lo que sugiere que los componentes de menor importancia son críticos para la actividad y pueden tener un efecto sinérgico.

Los aceites esenciales, como típicos lipófilos, al pasar a través de la pared celular y la membrana citoplasmática, rompen la estructura de las diferentes capas de polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos que la permeabilizan. La penetración del agente antimicrobiano en la célula microbiana puede ser perturbada por la formación de una capa de grasa en las células. Los cambios fisiológicos en bacterias tales como la modificación en la composición de la membrana también pueden dar lugar a alteración de la interacción con el agente antimicrobiano (Canillac, N. y Mourey, A. 2002).

En las células eucariotas, los aceites esenciales pueden provocar la despolarización de las membranas mitocondriales por la disminución del potencial de membrana, lo que afecta el ciclo de los iones de Ca^{++} y otros canales iónicos y reduciendo el gradiente de pH, afectando la bomba de protones y el pool de ATP. Ellos cambian la fluidez de las membranas, que se convierten anormalmente permeables dando lugar a la liberación de radicales, citocromo C, iones de calcio y

proteínas, como en el caso de estrés oxidativo y la insuficiencia bioenergética. La permeabilización de las membranas mitocondriales interna y externa conduce a la muerte celular por apoptosis y necrosis. Parece que las reacciones en cadena de la pared celular o la membrana celular externa invaden toda la célula, a través de las membranas de diferentes organelos tales como mitocondrias y peroxisomas. Estos efectos sugieren una actividad prooxidante de los fenoles (Bakkali, F. y col. 2008). Las alteraciones de las envolturas celulares, dependen del estado de crecimiento celular, las células en división son más sensibles probablemente porque los aceites esenciales penetran más eficazmente a los sitios en desarrollo.

Algunos compuestos de productos naturales como las vitaminas A, C, E, flavonoides, polifenoles o sobre todo los componentes fenólicos que muestran capacidades antioxidantes, pueden después de penetrar en las células, ser oxidados por ROS y por lo tanto generar especies radicales adicionales como fenoxilo, hidroxilo y los radicales superóxido y peróxido de hidrógeno. De hecho, los antioxidantes mediante la interacción con ROS se convierte en prooxidantes que son capaces de oxidar lípidos, proteínas y ADN. Al parecer, las defensas intracelulares basados en la glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, catalasa, superóxido dismutasa, son insuficientes para inhibir estas reacciones prooxidantes, y las defensas celulares generadas por antioxidantes naturales pueden ser insuficientes. Volátiles terpénicos y componentes fenólicos de los aceites esenciales pueden funcionar como prooxidantes al afectar el estado redox celular. Esto puede generar la apoptosis o necrosis celular incluyendo el daño a las proteínas y el ADN y efectos citotóxicos generales (Bakkali, F. y col. 2008; Dai, J. y Mumper, R., 2010).

Por lo tanto se puede inferir que los aceites esenciales pueden actuar principalmente como prooxidantes por intermedio de sus constituyentes volátiles como componentes fenólicos, terpenos o terpenoides, que se convierten ellos mismos en prooxidantes.

En la Figura 11 no se muestran resultados de las mezclas con códigos 20, 21 y 22 porque no presentaron inhibición con el volumen de mezcla utilizado a pesar de que las mezclas 20 y 21 presentaron valores elevados de capacidad antioxidante comparada con los patrones de BHA y BHT, con lo que se concluye que las mezclas de solo hidrosoles no presentan actividad fungicida a bajas concentraciones, sino solo cuando se utilizan concentraciones superiores. Lo ideal en estos casos es buscar concentraciones bajas de los extractos para que sean utilizados en la formulación de bioinsumos, lo que representaría una disminución en los costos de producción.

En la Figura 13, se encuentra la comparación de los compuestos mayoritarios de las mezclas que presentaron actividad fungicida.

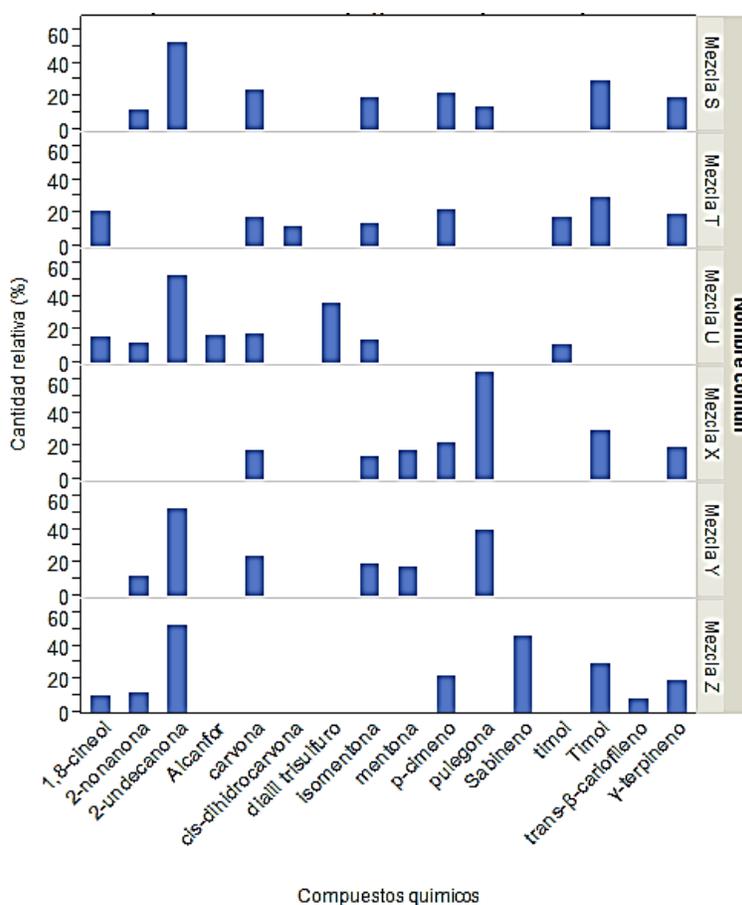


Figura 13. Compuestos mayoritarios de las mezclas con actividad fungicida

Precisamente, Bounatirou, S. y col. (2007) reportan que existe evidencia que demuestra que los componentes de menor importancia del tomillo tienen un papel fundamental en la actividad biológica, posiblemente mediante la producción de un efecto sinérgico con los otros componentes. Es así como diversos estudios se enfocan en la búsqueda de los compuestos responsables de dicha actividad. Los fenoles parecen jugar un papel destacado. Estos fenoles terpénicos unen los grupos aminos e hidroxilaminos de las proteínas de la membrana bacteriana lo que altera su permeabilidad y por ende causa la muerte de las bacterias. Es así, como se ha reportado que el aceite esencial de tomillo tiene actividad antimicrobiana mediada por timol y carvacrol, como componentes fenólicos mayoritarios del aceite. De la Figura 13 se observa que el timol está presente en cuatro de las 6 mezclas que presentaron inhibición.

También se observa que de los seis aceites esenciales que presentaron actividad fungicida, tienen en total 12 compuestos mayoritarios (Figura 13), de los cuales el 90% corresponde a monoterpenos (10% éter, 50% cetonas, 30% carburos y 10% fenoles), y el 10% restante corresponde a sesquiterpenos. Según Bakkali, F. y col. (2008), los monoterpenos son los que se forman a partir del acoplamiento de dos unidades de isopreno (C₁₀), y son las moléculas más representativas que constituyen alrededor del 90% de los aceites esenciales y permiten una gran variedad de estructuras a las cuales se les atribuyen propiedades antimicrobianas.

A los compuestos volátiles como timol, carvacrol, p-cimeno, γ -terpineno, borneol, α -pineno, alcanfor, 1,8 cineol, entre otros, se les atribuye como responsables de la actividad antimicrobiana de algunos aceites esenciales (Davidson y Naidu, 2000). En este caso, el timol y el p-cimeno se encuentran en cuatro de las mezclas realizadas; y el 1,8-cineol está en tres de las mezclas lo que explicaría el potencial de estas mezclas como formulaciones para bioinsumos en el control fungicida del cultivo de papa.

Finalmente, basados en los resultados de actividad antioxidante y fungicida obtenidos para las mezclas evaluadas, se propone una formulación preliminar de tres bioinsumos de la siguiente forma, Bioinsumo 1: hidrosoles de Hierbabuena y Ruda con aceite esencial de Tomillo; Bioinsumo 2: aceites esenciales de Hierbabuena, Menta Poleo y Tomillo; Bioinsumo 3: aceites esenciales de Milenrama, Ruda y Tomillo; en una relación de 1:1:1 (v/v) para su posible uso como controladores de los hongos *P. infestans*, *F. oxysporum* y *R. solani* en cultivos transitorios como el de papa (*Solanum tuberosum*).

CONCLUSIONES

Diecisiete especies vegetales cultivadas en la región de Cundinamarca fueron utilizadas para determinar la composición química y la bioactividad de sus extractos (hidrosoles y aceites esenciales).

El análisis de la composición cualitativa y cuantitativa de cada uno de los extractos por GC-MS presentó gran variabilidad en cuanto a la cantidad (entre 1 y 77) y concentración (<0.1 y 100%) de los metabolitos, confirmando la información encontrada en la literatura, donde diferentes factores influyen sobre la composición y concentración de metabolitos en las especies vegetales, como lo son la estructura genética de las especies, el medio ambiente, las condiciones generales de los cultivos y los métodos empleados para la extracción, entre otros.

Se encontró que el contenido más alto de polifenoles totales en las muestras estudiadas fue mayor en aquellos extractos cuya concentración de compuestos fenólicos contienen quimiotipos fenólicos, es decir, los extractos que en su composición química presentan metabolitos como el timol y carvacrol, tal como el hidrosol de Romero y el aceite esencial de Tomillo. Se observó mediante la confrontación con literatura que las variaciones en concentración de polifenoles están relacionadas con la acumulación diferencial de fenoles en las diferentes partes de la planta, que a su vez presenta variabilidad dependiendo de los cambios ambientales a los cuales se exponen las especies vegetales.

La capacidad antioxidante bajo las condiciones del ensayo por medio de DPPH, ABTS y FRAP, presentaron los mejores resultados para el hidrosol de Romero y los aceites de Tomillo y Menta Poleo correspondiendo a las especies con el mayor contenido de polifenoles totales, es decir, a mayor cantidad de polifenoles mayor actividad antioxidante. Se observó también que las diferencias en el poder antioxidante de una misma especie vegetal pueden atribuirse al hecho de la variabilidad en la composición y porcentaje de metabolitos de los extractos puesto

que no se puede atribuir este efecto tan solo al compuesto mayoritario o algunos o a todos los metabolitos que han reportado actividad. Cada compuesto en mayor o menor grado, puede tener una contribución significativa a la actividad antioxidante.

Se encontró que los aceites esenciales (Hierbabuena, Menta poleo, Milenrama, Romero, Ruda y Tomillo) tienen mayor capacidad fungicida que sus respectivos hidrosoles, dado el carácter lipofílico del esqueleto de hidrocarburos y principalmente el carácter hidrofílico de sus grupos funcionales, observándose que existe una relación directa entre la composición del aceite, especialmente, su contenido fenólico, actividad antioxidante y actividad fungicida.

El aceite de Tomillo presentó el mejor porcentaje de inhibición contra los tres hongos evaluados, debido al elevado contenido de polifenoles totales que exhibió. Por lo tanto, se puede inferir que su efectiva actividad fungicida es debida a su elevada capacidad antioxidante, la cual puede estar asociada a la presencia de algunos metabolitos como timol, carvacrol, p-cimeno, γ -terpineno, borneol, α -pineno, alcanfor, 1,8 cineol, entre otros, que han mostrado actividad biológica.

Las formulaciones elaboradas a partir de los aceites e hidrosoles con las mejores actividades presentaron valores de capacidad antioxidante superiores a los encontrados para los extractos puros observándose sinergia posiblemente entre los diferentes compuestos fenólicos o con otros antioxidantes no fenólicos, lo que genera un mejor efecto antioxidante.

En cuanto a las propiedades fungicidas se puede concluir que también existen efectos mutuamente sinérgicos entre los diferentes compuestos químicos que contiene cada uno de los extractos, sabiendo que los extractos son una mezcla de numerosas moléculas complejas y que existe la posibilidad de que sus efectos biológicos sean el resultado de un sinergismo de todos los compuestos o que sólo reflejen los de las principales moléculas que presentan mayor porcentaje de cantidad relativa de acuerdo con el análisis GC-MS.

Bajo las condiciones del ensayo se obtuvo un bioinsumo que inhibe el crecimiento de los tres hongos evaluados al 100% empleando bajas concentraciones, lo que genera una perspectiva a futuro en busca de controladores fungicidas amigables con el medio ambiente.

RECOMENDACIONES

Al observar la variabilidad de la composición de los aceites esenciales en cuanto a diferentes orígenes geográficos, se recomienda continuar el estudio de las especies con mayor potencial, probando diferentes localidades del cultivo en el país (altitud, suelo, temperatura, etc.), con el fin de encontrar las mejores condiciones de adaptabilidad de las mismas.

Es necesario evaluar diferentes concentraciones de los extractos que conforman las mezclas propuestas para lograr óptimos de mezclas que presenten mejor inhibición de los hongos que atacan el cultivo de la papa.

Determinar la composición de cada mezcla por medio de GC-MS.

Es necesario realizar un estudio de viabilidad económica desde el cultivo de las especies hasta la obtención de los extractos para determinar la mejor opción de las mezclas a realizar.

Es indispensable determinar la estabilidad de las mezclas.

Determinar el tiempo necesario para repetir la dosis de aplicación de las mezclas a los hongos para prevenir el crecimiento de los mismos.

Realizar estudios *in vivo* para determinar la eficacia de las mezclas formuladas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abou-Jawdah, Y., Sobh, H., Salameh, A. 2002. Antimycotic activities of selected plant flora, growing wild in lebanon, against phytopathogenic fungi. J Agric Food Chem. 50:3208-3213

Affokpon, A., Coyne, D., Htay, C., Agbede, R., Lawouin, L., Coosemans, J. 2011. Biocontrol potential of native *Trichoderma* isolates against root-knot nematodes in West African vegetable production systems. Soil Biology & Biochemistry, 43, 600-608

Almándoiz, J., Rodríguez, F., Palacios, J., Díaz, J. 2009. Efectividad biológica del fungicida/insecticida thiamethoxan 20% + difenoconazol 20% + mefenoxan 2% ps sobre insectos y enfermedades en frijol (*Phaseolus vulgaris* Lin.). Fitosanidad, Vol. 13, No. 3, pp. 210-217

Al-Mughrabi, K. 2010. Biological control of *Fusarium* dry rot and other potato tuber diseases using *Pseudomonas fluorescens* and *Enterobacter cloacae*. Biological Control 53, 280–284

Al-Reza, S., Rahman, A., Ahmed, Y., Chul Kang, S. 2010. Inhibition of plant pathogens in vitro and in vivo with essential oil and organic extracts of *Cestrum nocturnum* L. Pesticide Biochemistry and Physiology 96, 86–92

Alzate, A., López, K., Marín, A., Murillo, W. 2009. Evaluación preliminar de la actividad fungicida de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus tereticornis*, Myrtaceae) y cáscara de naranja (*Citrus sinensis*, Rutaceae) sobre algunos hongos filamentosos. Revista Tumbaga, Vol. 4. pp. 59-71

Alzate, L. M., Jiménez, C., Londoño, J. 2011. Aprovechamiento de residuos agroindustriales para mejorar la calidad sensorial y nutricional de productos avícolas. *Producción + Limpia*, 6(1), 108-127

Anees, M., Edel-Hermann, V., Steinberg, C. 2010. Build up of patches caused by *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology & Biochemistry* 42, 1661-1672

Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Esin, S., Bektaşoğlu, B., Berker, K., Özyurt, D. 2007. Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules*, 12, 1496-1547

Apel, H., Paudyal, M., Richter, O. 2003. Evaluation of treatment strategies of the late blight *Phytophthora infestans* in Nepal by population dynamics modeling. *Environmental Modelling & Software*. 18, 355–364

Ardila, M., Vargas, A., Pérez, J., Mejía, L. 2009. Ensayo preliminar de la actividad antibacteriana de extractos de *Allium sativum*, *Coriandrum sativum*, *Eugenia Caryophyllata*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis* y *Thymus vulgaris* frente a *Clostridium perfringens*. *Biosalud*, Vol. 8, 47–57, ISSN 1657-9550

Ávalos, A., Pérez, E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca, Serie Fisiología Vegetal*. Vol. 2, No. 3, pp. 119-145

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* 46: 446–475

Bandoni, A., Di Leo Lira, P., Baren, C. 2009. ¿Son realmente útiles los aceites esenciales?. *Blacpma*. Vol. 8, No. 5, pp. 317-322.

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

Blanco, D. 2013. News: Una investigadora colombiana descubre una bacteria capaz de controlar la Rizoctoniasis de la papa. En PotatoPro Services for the Potato Industry.

Bleoju, M. 2007. Estudio de estabilidad y algunas propiedades tecnológicas de pigmentos sintetizados por *Epicoccum nigrum*. Master oficial en seguridad y biotecnología alimentarias. 20p

Bounatirou, S., Smiti, S., Miguel, M., Faleiro, L., Rejeb, M., Neffati, M., Costa, M., Figueiredo, A., Barroso, J., Pedro, L. 2007. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link. Food Chemistry 105:146–155

Broekaert, W., Terras, F., Cammue, B., Vanderleyden, J. 1990. FEMS Microbiology Letters 69:55-60

Brunnera, F., Wirtza, W., Roseb, J., Darvillb, A., Goversc, F., Scheela, D., Nurnberger, T. 2002. A b-glucosidase/xylosidase from the phytopathogenic oomycete, *Phytophthora infestans*. Phytochemistry. 59, 689–696

Brurberg, M., Elameen, A., Le, V., Nærstad, R., Hermansen, A., Lehtinen, A., Hannukkala, A., Nielsen, B., Hansen, J., Andersson, B., Yuen, J. 2011. Genetic analysis of *Phytophthora infestans* populations in the Nordic European countries reveals high genetic variability. Fungal Biology 115, 335-342

Calderón Hidalgo, P. (Julio de 2007). Determinación de las propiedades antioxidantes de jugos de naranja comerciales sometidos a distintas condiciones de almacenamiento. Tesis de grado. Guatemala

Candan, F., Unlu, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmenc, A., Askin, H. 2003. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium subsp. millefolium* Afan. (*Asteraceae*). Journal of Ethnopharmacology 87, 215–220

Canillac, N., Mourey, A. 2004. Effects of several environmental factors on the anti-*Listeria monocytogenes* activity of an essential oil of *Picea excelsa*. International Journal of Food Microbiology 92, 95– 103

Cano, C., Bonilla, P., Roque, M., Ruiz, J. 2008. Actividad antimicótica in vitro y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (Muña). Rev Peru Med Exp Salud Publica. 25(3):298-301

Carrillo, Y., Gómez, M., Cotes, J., Núñez, C. 2010. Efecto de algunos aceites esenciales sobre el crecimiento de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary en condiciones de laboratorio. Rev Agronomía Col. Vol. 28, No. 2, pp. 245-253

Celiktas, O., Bedir, O., Vardar, F. 2007. In vitro antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts treated with supercritical carbon dioxide. Food Chemistry 101:1457–1464

Chauhan, R.S., Kaul, M.K., Shahi, A.K., Kumar, A., Ram, G., Tawa, A. 2009. Chemical composition of essential oils in *Mentha spicata* L. accession [IIIM(J)26] from North-West Himalayan region, India. industrial crops and products 29, 654–656

Collange, B., Navarrete, M., Peyre, G., Mateille, T., Tchamitchian, M. 2011. Review. Root-knot nematode (*Meloidogyne*) management in vegetable crop production: The challenge of an agronomic system analysis. *Crop Protection* 30, 1251-1262

D'Ippólito, S., Martín, M., Salcedo, M., Atencio, H., Casalongué, C., Godoy, A., Fiol, D. 2010. Transcriptome profiling of *Fusarium solani* f. sp. *eumartii* -infected potato tubers provides evidence of an inducible defense response. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 75, 3-12

Dai, J., Mumper, R. 2010. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352; doi:10.3390/molecules15107313

Davidson, P.M., Naidu, A.S. 2000. Phyto-phenols. In *Natural Food Antimicrobial Systems* ed. Naidu, A.S. pp. 265–294. LLC, Boca Raton, FL: CRC Press

Debenedetti, S., Muschietti, L., vanBaren, C., Clavin, M., Broussalis, A., Martino, V., Houghton, P.J., Warhurst, D., Steele, J., 2002. In vitro antiplasmodial activity of extracts of Argentinian plants. *J. Ethnopharmacol.* 80, 163–166

Díaz, M., Fajardo, D., Moreno, J., García, C., Núñez, V. 2003. Identificación de Genes R1 y R2 que confieren resistencia a *Phytophthora infestans* en genotipos colombianos de papa. *Revista Colombiana de Biotecnología*. Vol V, No.2, 40 - 50

Erkan, N., Ayranci, G., Ayranci, E. 2008. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry* 110:76–82

Estrada,S. 2010. Determinación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*) y tomillo (*Thymus vulgaris*). Tesis de grado. Riobamba, Ecuador

Fauconnier, M., Rojas, J., Dupuis, B., Delaplace, P., Frettinger, P., Gosset, V., Jardin, P. 2008. Changes in oxylipin synthesis after *Phytophthora infestans* infection of potato leaves do not correlate with resistance. *Plant Physiology and Biochemistry*. 46, 823-831

Ficha de categorización. DGSV-CNRF-Departamento de Análisis de Riesgo de Plagas. México. 2012. *Fusarium oxysporum* f. sp. Tuberosi

Fitopatologías. 2007. Fito TSP. Investigación y desarrollo. Fitotecnologías. Vol 1, N°1.

Foti, M., Ingold, K.U. 2003. Mechanism of Inhibition of Lipid Peroxidation by γ -Terpinene, an Unusual and Potentially Useful Hydrocarbon Antioxidant. *J. Agric. Food Chem.*, 51 (9), pp 2758–2765 DOI: 10.1021/jf020993f

Gachkar, L., D. Yadegari., M.B. Rezaei., M. Taghizadeh., S.A. Astaneh, I. Rasooli. 2007. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosemarinus officinalis* essential oils. *Food Chem.*, 102: 898-904

Gallou, A., Lucero, H., Cranenbrouck, S., Suárez, J., Declerck, S. 2011. Mycorrhiza induced resistance in potato plantlets challenged by *Phytophthora infestans*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 76, 20-26

Gamboa, R., Hernández, F., Guerrero, E., Sánchez, A. 2003. Inhibición del crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora infestans* Mont. (De Bary) con extractos vegetales metanólicos de hojásén (*Flourensia cernua* D.

C.), mejorana (*Origanum majorana* L.) y trompetilla [*Bouvardia ternifolia* (Ca.) Schlecht.] Revista Mexicana de Fitopatología, Vol. 21, No. 001, pp. 13-18

Garcés, E., Orozco, M., Bautista, G., Valencia, H. 2001. *Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta conocer. Acta Biológica Colombiana, Vol. 6 No. 1:7

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

Gatto, M., Ippolito, A., Linsalata, V., Cascarano, N., Nigro, F., Vanadia, S., Di Venere, D. 2011. Activity of extracts from wild edible herbs against postharvest fungal diseases of fruit and vegetables. Postharvest Biology and Technology. 61, 72–82

Gill, A., Delaquis, P., Russo, P., Holley, R.A. 2002. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. International Journal of Food Microbiology 73, 83– 92

Giovannini, C., Andrade, N., Valenzuela, E., Castro, I., Contreras, A. 2005. Caracterización morfológica y patogénica de *Rhizoctonia solani* Kühn a partir de tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L) provenientes de diferentes predios de la X región de Chile. IDESIA (Chile) Volumen 23, N°1:13-18

González, I., Arias, Y., Peteira, B. 2012. Aspectos generales de la interacción *Fusarium oxysporum* f.sp. lycopersici-tomate. Rev. Protección Veg. Vol. 27 No. 1: 1-7

Goodner, K., Mahattanataweea, K., Plotto, A., Sotomayor, J., Jordán, M. 2006. Aromatic profiles of *Thymus hyemalis* and Spanish T. vulgaris essential oils by GC–MS/GC–O. Industrial Crops and Products 24:264–268

Grigorjev, C., Brizuela, N. 2010. Efectos de ruda ssp sobre la actividad del músculo liso gastrointestinal aislado de rata. Revista de la Facultad de Ciencias Médicas; 67(2): 73-76

Gulluce, M., Sahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A., Polissiou, M., Adiguzel, A., Ozkan, H. 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. Longifolia. Food Chemistry. 103:1449-1456

Guo, J., Jiang, R., Kamphuis, L., Govers, F. 2006. A cDNA-AFLP based strategy to identify transcripts associated with avirulence in *Phytophthora infestans*. Fungal Genetics and Biology 43, 111–123

Hernández-Castillo, F.D., Lira-Saldivar, R.H., Cruz-Chávez, L., Gallegos-Morales, G., Galindo-Cepeda, M.E., Padrón-Corral, E., Hernández-Suárez, M. 2008. Potencial antifúngico de cepas de *Bacillus* spp. y extracto de *Larrea tridentata* contra *Rhizoctonia solani* en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.). Revista internacional de Botánica Experimental. YTON. Vol. 77, pp. 241-252

Hudaib, M., Speroni, E., Di Pietra, A., Cavrini, V. 2002. GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 29: 691–700

Khan, M., Majid, S., Mohidin, F., Khan, N. 2011. A new bioprocess to produce low cost powder formulations of biocontrol bacteria and fungi to control fusarial wilt and root-knot nematode of pulses. Biological Control. 2-11

Kotan, R., Kordali, S., Cakir, A., Kesdek, M., Kaya, Y., Kilic, H. 2008. Antimicrobial and insecticidal activities of essential oil isolated from Turkish *Salvia hydrangea* DC. ex Benth. Biochemical Systematics and ecology. 36:360-368

Kumar, A., Shukla, R., Singh, P., Shekhar, C., Kishore, N. 2008. Assessment of *Thymus vulgaris* L. essential oil as a safe botanical preservative against post harvest fungal infestation of food commodities. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9:575–580

Kumar, R., Kumar, A., Dubey, N., Tripathi, Y. 2007. Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* oil as a potential source of antifungal, antiaflatoxic and antioxidant activity. *International Journal of Food Microbiology*. 115:159-164

Larrea, J. 2012. Obtención de extractos polifenólicos a partir de uva para uso alimentario. Tesis de Maestría, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Pública de Navarra, 99 p

Laxalt, A., Latijnhouwers, M., Hulten, M., Govers, F. 2002. Differential expression of G protein a and b subunit genes during development of *Phytophthora infestans*. *Fungal Genetics and Biology* 36, 137–146

Lee, S., Umamo, K., Shibamoto, T., Lee, K. 2005. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chemistry* 91:131–137

Lira-Saldivar, R.H. 2003. Estado actual del conocimiento sobre las propiedades biocidas de la gobernadora [*Larrea tridentata* (D.C. Coville)]. Gerencia de biopolímeros, Centro de Investigación en Química Aplicada. *Revista Mexicana de Fitopatología*, Julio-Diciembre, Vol. 21, No. 2. Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. Ciudad Obregón, México. pp. 214-222

Lizcano, M. 2007. Evaluación de La actividad antifúngica del extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*) contra *Botrytis cinérea*, *Fusarium oxysporum* y *Sclerotinia*

sclerotiorum. Tesis de grado Microbiología Agrícola y Veterinaria. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. 71 pp.

López, A. 2007. Pruebas de eficiencia in vitro y bajo invernadero de cepas de *Trichoderma spp.* para control de *Phytophthora infestans* en el cultivo de papa *Solanum tuberosum* para establecer un banco de microorganismos. Tesis de grado Ingeniero agropecuario. Escuela politécnica del ejército departamento de ciencias de la vida carrera de ciencias agropecuarias. 110 p

Loziene, K., Venskutonis, P., Sipailien, A., Labokas, J. 2007. Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes. Food Chemistry 103, 546–559

Mandal, V., Mohan, Y., Hemalatha. S. 2007. Microwave Assisted Extraction – An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research. Pharmacognosy Reviews. Vol 1, 1, 7-18

Mendivelso, P., Olivares, M. 2007. Estudio de los metabolitos secundarios volátiles en hojas frescas y secas de *Pelargonium graveolens* (geranio), en función del método de extracción y su estado de desarrollo vegetativo. Tesis de grado. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga

Minuto, A., Gullino, M., Lamberti, F., D'Addabbo, T., Tescari, E., Ajwa, H., Garibaldi, A. 2006. Application of an emulsifiable mixture of 1,3-dichloropropene and chloropicrin against root knot nematodes and soilborne fungi for greenhouse tomatoes in Italy. Crop Protection. 25, 1244-1252

Mishra, K., Ojha, H., Kumar, N. 2012. Estimation of antiradical properties of antioxidant using DPPH assay: A critical review and results. Food Chemistry 130. 1036-1043

Mockute, D., Judzentiene, A. 2003. Variability of the essential oils composition of *Achillea millefolium* ssp. *millefolium* growing wild in Lithuania. *Biochemical Systematics and Ecology* 31, 1033–1045

Monsalve, Z., Monsalve, M., Urrea, A., Zapata, J. 2012. Expresión diferencial durante la interacción *Solanum tuberosum* - *Phytophthora infestans*. *Rev. colomb. biotecnol* Vol.14, 1

Montes, R., Cruz, V., Martínez, G., Sandoval, G., García, R., Zilch, S., Bravo, L., Bermúdez, K., Flores, H.E., Carvajal, M. 2000. Propiedades antifúngicas en plantas superiores. Análisis retrospectivo de investigaciones. *Revista Mexicana de Fitopatología*, Julio-Diciembre, Vol. 18, No. 2. Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. Ciudad Obregón, México. pp. 125-131

Montesdeoca, V. 2010. Elaboración y control de calidad de comprimidos fitofarmacéuticos de ajeno (*Artemisia absinthium* L.) romero (*Rosmarinus officinalis* L.) y manzanilla (*Matricaria chamomilla* L. para combatir la menstruación dolorosa. Tesis de grado. Escuela Superior Politécnica del Chimborazo. Riobamba, Ecuador

Montserrat, G., Palacio, S., Milla, R. 2004. Fenología y características funcionales de las plantas leñosas mediterráneas. Cap 5. En: Valladares, *Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante*. Páginas 129-162. Ministerio de Medio Ambiente, EGRAF, S. A., Madrid. ISBN: 84-8014-552-8

Motta-Delgado, P., Murcia-Ordoñez, B. 2011. Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Ambiente & Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*. V 6, N° 2:77-90

Mugniéry, D., Phillips, M. 2007. The Nematode Parasites of Potato. Part VI Pests and Diseases. Potato biology and biotechnology advances and Perspectives. Edited by Dick Vreugdenhil. Elsevier The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford OX5 1GB, UK

Muñoz, A. 2008. Caracterización de distintos péptidos antimicrobianos con actividad frente hongos fitopatógenos de interés agroalimentario. Tesis doctoral, Valencia. España

Muñoz, A., Ramos-Escudero, F., Alvarado-Ortiz, C., Castañeda, B. 2007. Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. Rev Soc Quím Perú, 73, N° 3:142-149

Murcia, D., Salamanca, M. 2006. Búsqueda de microorganismos potenciales controladores de *Bephratelloides maculicollis* plaga de *Annona muricata* L. en algunos cultivos de los departamentos de Tolima y Cundinamarca. Tesis de grado Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. 79 pp.

Naeini, A., Ziglari, T., Shokri, H., Khosravi, A. 2010. Assessment of growth-inhibiting effect of some plant essential oils on different *Fusarium* isolates. Journal de Mycologie Médicale 20: 174-178

Nava-Pérez, E., García-Gutiérrez, C., Camacho-Báez, J., Vázquez-Montoya, E. 2012. Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas. Ra Ximhai, V 8, N° 3:17-29

Naveda, G. 2010. Establecimiento de un proceso de obtención de extracto de ruda (*Ruta graveolens*), con alto contenido de polifenoles. Tesis de grado. Quito, Ecuador. 118p

Nuengchamnong, N. Krittasilp, K., Ingkaninan, K., 2009. Rapid screening and identification of antioxidants in aqueous extracts of *Houttuynia cordata* using LC-ESI-MS coupled with DPPH assay. *Food Chemistry* 117, 750-756

Numpaque, M., Oviedo, L., Gil, J., García, C., Durango, D. 2011. Thymol and carvacrol: biotransformation and antifungal activity against the plant pathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* and *Botryodiplodia theobromae*. *Trop. plant pathol.* vol.36:1, 3-13

Nychas, J. 1995. Natural antimicrobials from plants. En: Gould G.W. (Ed.), *New Methods of Food Preservation* (p.59-89). London : Champman & Hall

Okoh, O., Sadimenko, A., Afolayan, A. 2010. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. *Food Chemistry* 120:308–312

Osuagwu, G., Edeoga, H. 2010. Effect of fertilizer treatment on the antimicrobial activity of the leaves of *Ocimum gratissimum* (L.) and *Gongronema latifolium* (Benth). *Afr J Biotechnol.* Vol. 9 (52), pp. 8918-8922

Overy, D., Frisvad, J., Steinmeier, U., Thrane, U. 2005. Clarification of the agents causing blue mold storage rot upon various flower and vegetable bulbs: implications for mycotoxin contamination. *Postharvest Biology and Technology* 35, 217–221

Özyürek, M., Bener, M., Güçlü, K., Dönmez, A., Süzgeç-Selçuk, S., Pırıldar, S., Meriçli, A., Apak, R. 2012. Evaluation of antioxidant activity of *Crataegus* species collected from different regions of Turkey. *Rec. Nat. Prod.* 6:3, 263-277

Pérez, M., Peñaranda, L., Herzo, M. 2010. Impacto, manejo y control de enfermedades causadas por *Phytophthora palmivora* en diferentes cultivos. Programa de Microbiología. Facultad de Ciencias Básicas. Universidad de Pamplona. 71 pp

Piñeros, C. 2009. Recopilación de la investigación del sistema productivo papa criolla. Convenio SADE 045/06. Secretaria de Agricultura y Desarrollo Económico (Gobernación de Cundinamarca)

Politeo, O., Jukic, M., Milos, M. 2009. Comparison of chemical composition and antioxidant activity of glycosidically bound and free volatiles from clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). DOI: 10.1111/j.1745-4514.2009.00269.x

Polkowska-Kowalczyk, L., Wielgat, B., Maciejewska, U. 2004. The elicitor-induced oxidative processes in leaves of *Solanum* species with differential polygenic resistance to *Phytophthora infestans*. Journal of Plant Physiology 161, 913–920

Quiroga, E.N., Sgariglia, M.A., Soberón, J.R., Sampietro, D.A., Vattuone, M.A. 2007. Acción fungitóxica de extractos vegetales sobre hongos productores de micotoxinas. IX Simposio Argentino y XII Simposio Latinoamericano de Farmacobotánica. Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas. Vol. 6, No. 5. pp. 162-163

Radcliffe, E., 2007. agnaoui, A. Insect Pests in Potato. Part VI Pests and Diseases. Potato biology and biotechnology advances and Perspectives. Edited by Dick Vreugdenhil. Elsevier The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford OX5 1GB, UK

Ramos, E., Castañeda, B., Ibáñez, L. 2008. Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas. Rev Acad Peru Salud 15(1):42-46

Redepapa. 2013. Socios en Colombia se plantean el reto de revalorizar la papa- Red Electrónica de la Papa, Redepapa. En: <http://redepapa.org/2013/03/04/socios-de-issandes-en-Colombia-se-plantean-el-reto-de-revalorizar-la-papa/> Fuente de cifras FAO-STAT 2011- No.2 – 28 de febrero 2013

Reinoso, Y., Vaillant, D., Casadesús, L., García, E., Pazos, V. 2007. Selección de cepas de *Bacillus* y otros géneros relacionados para el control biológico de hongos fitopatógenos. Fitosanidad, Vol. 11, No. 1, pp. 35-40

Ritchie, F., McQuilken, M., Bain, R. 2006. Effects of water potential on mycelial growth, sclerotial production, and germination of *Rhizoctonia solani* from potato

Rivera, D., Camelo, M., Estrada, G., Obando, M., Bonilla, R. 2010. Efecto de diferentes plaguicidas sobre el crecimiento de *Azotobacter chroococcum*. Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XXI, Nº 1. Julio. Pp. 94-102

Roby, M., Sarhan, M., Selim, K., Khaleel, K. 2013. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. Industrial Crops and Products 43:827– 831

Rodríguez, D., Sanabria, M. 2005. Efecto del extracto de tres plantas silvestres sobre la rizoctoniosis, la mancha sureña del maíz y los patógenos que los causan. Interciencia, Vol. 30, No. 12

Rojas-Barquera, D., Narváez-Cuenca, C. 2009. Determinación de vitamina C, compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de frutas de guayaba

(*Psidium guajava* L.) cultivadas en Colombia. Quim. Nova, Vol. 32, No. 9, 2336-2340

Rosquete, C. 2011. Evaluación de impacto de la supresión de endosulfán en el agroecosistema Güira de Melena, Artemisa, Cuba. Tesis de Master en Agroecología y Agricultura Sostenible. Facultad de Agronomía. Universidad Agraria de la Habana. Mayabeque. p. 93

Ruiz, C. 2008. Estudio de los metabolitos secundarios volátiles de *Lippia origanoides* H.B.K., en tres estados fenológicos. Tesis de grado Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander. 159 p

Salazar, C., Betancourth, C. 2009. Evaluación de extractos de plantas para el manejo de polilla guatemateca (*Tecia solanivora*) en cultivos de papa en Nariño, Colombia. Agron Colomb. Vol. 27, No. 2, pp. 219-226

Saldarriaga, L., Sánchez, M., Bonilla, C., Salvador, M., Sánchez, M., Torres, H. 2010. Evaluación agroindustrial de los aceites esenciales de *Artemisa dracunculosa* L. *Franseria artemisioides* Willd, *Salvia officinalis* L. en condiciones del Valle del Cauca. Acta Agronómica. Vol. 59, No. 3, pp. 294-302

Sánchez, G. 2000. Rhodax 70 WP nuevo mecanismo de acción para el manejo de la gota de la papa (*Phytophthora infestans*). Papas Colombianas 2000 con el mejor entorno ambiental, Vol. 3, N°1-2, 125-126

Sánchez, M. y Lopez, P. 2008. Biosensores amperométricos de tirosinasa para la determinación de compuestos fenólicos en medios acuosos y no acuosos. Tesis de grado. Universidad Complutense de Madrid

Sharma, N., Gruszewski, H., Park, S., Holm, D., Vivanco, J. 2004. Purification of an isoform of patatin with antimicrobial activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 42, 647–655

Sharma, O., Bhat, T. 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry* 113, 1202-1205

Sharma, R., Singh, D., Singh, R. 2009. Review. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control*. 50, 205-221

Skottrup, P., Nicolaisen, M., Justesen, A. 2007. Rapid determination of *Phytophthora infestans* sporangia using a surface plasmon resonance immunosensor. *Journal of Microbiological Methods*. 68, 507–515

Soylu, E., Soylu, S., Kurt, S. 2006. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans* *Mycopathologia*, Vol. 161, No. 2, pp. 119-128

Srivastaba, R., Roseti, D., Sharma, A. 2007. The evaluation of microbial diversity in a vegetable based cropping system under organic farming practices. *Applied Soil Ecology*, 36, 116-123

Stashenko, E., Acosta, R., Martínez, J. 2000. High-resolution gas-chromatographic analysis of the secondary metabolites obtained by subcritical-fluid extraction from Colombian rue (*Ruta graveolens* L.). *J. Biochem. Biophys. Methods* 43:379–390

Stratil, P., Klejdus, B., Kubán, V. 2006. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables – evaluation of spectrophotometric methods. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 54, 607-616

Suárez, S. 2004. Guía ambiental para el cultivo de la papa. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. República de Colombia. Dirección de Desarrollo Sectorial Sostenible. Fedepapa. 56 pp

Szumny, A., Figiel, A., Gutiérrez-Ortíz, A., Carbonell-Barrachina, A. 2010. Composition of rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis*) as affected by drying method. *Journal of Food Engineering* 97:253–260

Telci, I., Demirtasb, I., Bayramc, E., Arabacid, O., Kacar, O. 2010. Environmental variation on aroma components of pulegone/piperitone rich spearmint (*Mentha spicata* L.). *Industrial Crops and Products* 32, 588–592

Termorshuizen, A. 2007. Fungal and Fungus-Like Pathogens of Potato. *Potato Biology and Biotechnology: Advances and Perspectives*. 643-665

Toapanta, S. 2012. Cambios en la capacidad antioxidante durante el almacenamiento de uvilla (*Physalis peruviana* L.) orgánica sin capuchón tratada con radiación UV-C. Tesis pregrado, Ingeniería de Alimentos, Universidad Tecnológica Equinoccial, 85 p

Tounsi, M., Wannes, W., Ouerghemmi, I., Msaada, K., Smaoui, A., Marzouk, B. 2011. Variation in essential oil and fatty acid composition in different organs of cultivated and growing wild *Ruta chalepensis* L. *Industrial Crops and Products* 33:617–623

Vaillant, D., Romeu, C., Ramos, E., González, M., Ramírez, R., González, J. 2009. Efecto inhibitorio in vitro de cinco monoterpenos de aceites esenciales sobre un aislado de *Rhizoctonia solani* en papa (*Solanum tuberosum*). *Fitosanidad*, Vol. 13, No. 3, pp. 197-200

Valkonen, J. 2007. Viruses: Economical Losses and Biotechnological Potential. Part VI Pests and Diseases. Potato biology and biotechnology advances and Perspectives. Edited by Dick Vreugdenhil. Elsevier The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford OX5 1GB, UK

Van der Wolf, J., De Boer, S. Bacterial Pathogens of Potato. Part VI Pests and Diseases

Vásquez, A., Cala, M., Miranda, I., Tafur, G., Martínez, J., Stashenko, E. 2007. Actividad antioxidante y contenido total de fenoles de extractos etanólicos de *Salvia aratocensis*, *Salvia Sochensis*, *Bidens reptans* y *Montanoa ovalifolia*. Scientia et Technica Año XIII, No 33, UTP. ISSN 0122-1701

Viveros, J., Castaño, J. 2006. Evaluación in vitro de extractos vegetales sobre *Mycosphaerella fijiensis* morelet. Agron. Vol. 14, N° 1. pp. 37-50

Wagner, M.L. 2007. Bioprospección. La búsqueda de sustancias bioactivas. IX Simposio Argentino y XII Simposio Latinoamericano de Farmacobotánica. Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas. Vol. 6, No. 5, p. 37

Wang, X., El Hadrami, A., Adam, L., Daayf, F. 2006. Local and distal gene expression of pr-1 and pr-5 in potato leaves inoculated with isolates from the old (US-1) and the new (US-8) genotypes of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Environmental and Experimental Botany. 57, 70–79

Whisson, S., Avrova, A., Lavrova, O., Pritchard, L. 2005. Families of short interspersed elements in the genome of the oomycete plant pathogen, *Phytophthora infestans*. Fungal Genetics and Biology 42, 351–365

Yang, Y., Xiao, L., Hu, X. 2011. Study on the Relationship Between the Toxin of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary and Resistance of Potato. *Agricultural Sciences in China*. 10(2): 238-245

Yesil-Celiktas, O., Nartopb, P., Gurelb, A., Bedirb, E., Vardar-Sukan, F. 2007. Determination of phenolic content and antioxidant activity of extracts obtained from *Rosmarinus officinalis*' calli. *Journal of Plant Physiology* 164:1536—1542

Zambrano, C., Riaño, P.A. 2008. Rentabilidad de las empresas productoras de bioinsumos registradas ante el ICA. Bogotá, Colombia

Zaouali, Y., Bouzaine, T., Boussaid, M. 2010. Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food and Chemical Toxicology* 48:3144–3152

Zaouali, Y., Chograni, H., Trimech, R., Boussaid, M. 2013. Changes in essential oil composition and phenolic fraction in *Rosmarinus officinalis* L. var. *typicus* Batt. organs during growth and incidence on the antioxidant activity. *Industrial Crops and Products* 43, 412–419

Zapata, R., Sanabria, M., Rodríguez, D. 2003. Reducción del desarrollo de hongos fitopatógenos con extracto de cardón lefaria (*Cereus deficiens* Otto & Diert). *Interciencia*, Vol. 28, No. 5

Zegura, B., Dobnik, D., Niderlc, M., Filipic, M. 2011. Antioxidant and antigenotoxic effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extracts in *Salmonella typhimurium* TA98 and HepG2 cells. *environmental toxicology and pharmacology* 32:296–305

Zhao, D., Wen Xu, Y., Yanga, G., Husainib, A., Wu, W. 2013. Variation of essential oil of *Mentha haplocalyx* Briq. and *Mentha spicata* L. from China. *Industrial Crops and Products* 42, 251– 260

Zhu, G., Huang, F., Feng, L., Qin, B., Yang, Y., Chen, Y., Lu, X. 2008. Sensitivities of *Phytophthora infestans* to Metalaxyl, Cymoxanil, and Dimethomorph. *Agricultural Sciences in China*. 7(7): 831-840

ANEXOS

ANEXO A. Composición química de diecisiete extractos vegetales y cromatogramas del hidrosol y aceite esencial de Tomillo

AJENJO-HIDROSOL					
Compuesto	%A	Compuesto	%A	Compuesto	%A
timol	46,7	iso-3-tujanol	1,3	pulegona	0,4
trans-tujona	24,6	citronelol	1,3	eudesmol	0,4
terpinen-4-ol	5,3	1,8-cineol	1,2	globulol	0,3
carvacrol	2,7	eugenol	1,2	γ -eudesmol	0,3
elemol	2,3	verbenona	0,9	tau-cadinol	0,3
cis-tujona	2	α -cadinol	0,6	tau-muurolol	0,3
alcanfor	1,7	intermedeol	0,6	óxido B de α -bisabolol	0,3
α -terpineol	1,4	jasmona	0,5	acetato de timilo	0,2
geraniol	1,4	borneol	0,4	α -bisabolol	0,2
linalool	1,3				

AJÍ-HIDROSOL					
Compuesto	%A	Compuesto	%A	Compuesto	%A
alcanfor	22,5	pentadecanoato de etilo	9,2	Valerato de hexilo	3,2
hexadecanoato de etilo	19,5	timol	7,2	Acetato de bornilo	2,5
hexadecanoato de etilo	15,2	linolenato de etilo	3,6	γ -himachaleno	2,5
1,8-cineol	11,2	linoleato de etilo	3,3		

AJO-HIDROSOL					
Compuesto	%A	Compuesto	%A	Compuesto	%A
dialil trisulfuro	36,2	timol	10,4	hexadecanoato de etilo	2,2
Alcanfor	16,0	α -terpineol	2,6	linoleato de etilo	1,8
1,8-cineol	15,1				

ANEXO A. (Continuación)

ALTAMISA-HIDROSOL					
Compuesto	%A	Compuesto	%A	Compuesto	%A
β -bisaboleno	18,9	trans- β -farneseno	3,5	α -gurjuneno	0,7
ar-curcumeno	17,6	β -sesquifelandreno	2,1	α -isocomeno	0,5
γ -curcumeno	15,4	cis- α -bergamoteno	1,9	α -copaeno	0,4
Germacreno D	14,5	trans- β -cariofileno	1,7	calareno	0,4
dietil ftalato	8,7	δ -cadineno	1,4	γ -cadineno	0,4
biciclogermacreno	5,9	α -humuleno	0,9	dauceno	0,3
α -farneseno	4,8				

CALÉNDULA-HIDROSOL					
Compuesto	%A	Compuesto	%A	Compuesto	%A
1,8-cineol	21,3	terpinen-4-ol	2,4	carvacrol	0,7
timol	17,7	α -terpineol	1,6	eugenol	0,7
cis-dihidrocarvona+ dihidrocarveol	11,7	α -cadinol	1,6	globulol	0,7
pulegona	7	linalool	1,2	tau-muurolol	0,6
isomentona	6,7	mentona	1,2	trans-pinocarveol	0,5
citronelol	5,4	trans- dihidrocarvona	1,2	citronelal	0,5
carvona	4,6	borneol	0,9	verbenona	0,4
alcanfor	3,5	neral	0,9	piperitona	0,2
isomentol	3,5	geranial	0,8	muurola-4,10(14)-dien-1- β -ol	0,2
elemol	2,5				

CEBOLLA-HIDROSOL					
Compuesto	%A	Compuesto	%A	Compuesto	%A
Linoleato de etilo	45,3	Hexadecanoato de etilo	31,7	oleato de etilo	23,1

COLA DE CABALLO-HIDROSOL					
Compuesto	%A	Compuesto	%A	Compuesto	%A
trans- β -cariofileno	19,4	α -humuleno	8,8	α -copaeno	3
δ -cadineno	18,4	γ -muuroleno	6,3	1,8-cineol	2,9
β -bisaboleno	15,5	γ -cadineno	4,7	alcanfor	2,7
β -elemeno	10,1				

ANEXO A. (Continuación)

HIERBABUENA-HIDROSOL					
Compuesto	%A	Compuesto	%A	Compuesto	%A
benzaldehído	<0,1	dihidrocarveol	3,4	jasmona	0,2
β -mirceno	<0,1	mentona	2,7	3-metilbutanal	0,1
α -felandreno	<0,1	cis-dihidrocarvona	2,6	2-metilbutanal	0,1
1,4-cineol	<0,1	neo-dihidrocarveol	2,4	2-metilbutanoato de etilo	0,1
α -terpineno	<0,1	3-octanol	1,5	2,5-dietiltetrahidrofurano	0,1
acetato de 4-metil-3-hexanilo	<0,1	isopulegona	1,5	3-octanona	0,1
artemisa cetona	<0,1	trans-carveol	1,2	<i>p</i> -cimeno	0,1
óxido de cis-linalool	<0,1	linalool	0,6	limoneno	0,1
1-nonen-3-ol	<0,1	piperitona	0,6	γ -terpineno	0,1
2,2,6-trimetil-2H-piran-3(4H)-ona	<0,1	1-octen-3-ol	0,5	2-nonanona	0,1
cis- <i>p</i> -Ment-2-en-1-ol	<0,1	α -terpineol	0,5	fenchona	0,1
eugenol	<0,1	trans-dihidrocarvona	0,5	acetato de 1-octen-3-ilo	0,1
δ -cadineno	<0,1	cis-carveol	0,5	trans-tujona	0,1
espatulenol	<0,1	timol	0,5	acetato de bornilo	0,1
1,10-di-epi-cubenol	<0,1	acetato de iso-dihidrocarvilo	0,5	dihidroedulan	0,1
α -cadineno	<0,1	piperitenona	0,5	cis-acetato de carvilo	0,1
carvona	24,2	alcanfor	0,4	β -bourboneno	0,1
isomentona	19,4	<i>trans-sabinol</i>	0,3	trans- β -cariofileno	0,1
pulegona	13,9	2-undecanona	0,3	trans-muurolol	0,1
isomentol	7,4	acetato de mentilo	0,3	óxido B de α -bisabolol	0,1
terpinen-4-ol	6,6	3-metilciclohexanona	0,2	α -cadinol	0,1
1,8-cineol	4,6	acetato de 3-octilo	0,2		

HIGUERILLA-HIDROSOL			
Compuesto	%A	Compuesto	%A
Alcanfor	53,3	Isomentona	46,7

ANEXO A. (Continuación)

HINOJO-HIDROSOL					
Compuesto	%A	Compuesto	%A	Compuesto	%A
α -terpineno	<0,1	citronelol	0,9	pulegona	0,3
<i>trans</i> -anetol	30,5	1,8 cineol	0,7	acetato de 1,3,3-trimetil-2-oxabicilo[2.2.2] octan-6-ilo	0,3
Fenchona	28,2	carvona	0,7	acetato de fenchilo	0,2
timol	20,8	cis-p-Ment-2-en-1-ol	0,6	óxido de piperitona	0,2
terpinen-4-ol	3,9	verbenona+cis-piperitol	0,5	α -cadinol	0,2
alcanfor	1,9	<i>trans</i> -p-Ment-2-en-1-ol	0,4	α -felandreno	0,1
estragol	1,8	mentona	0,4	<i>p</i> -cimeno	0,1
<i>p</i> -anisaldehído	1,6	borneol	0,4	β -felandreno	0,1
carvacrol	1,6	elemol	0,4	<i>p</i> -cimen-8-ol	0,1
α -terpineol	1	linalool	0,3	globulol	0,1

MANZANILLA-HIDROSOL					
Compuesto	%A	Compuesto	%A	Compuesto	%A
<i>trans</i> - β -farneseno	13,7	α -muuroleno	3,9	decanoato de etilo	1,9
Oxido A de α -bisabolol	10,4	β -selineno	3,7	α -copaeno	1,7
hexadecanoato de etilo	6,8	limoneno	3,6	2-metilbutanoato de etilo	1,6
artemisia cetona	6	<i>trans</i> - β -cariofileno	3,6	1,1-dietoxi-3-metilbutano	1,6
2-undecanona	6	γ -muuroleno	3,6	α -longipineno	1,6
óxido de bisaboleno	5,2	<i>p</i> -cimeno	2,8	1,1-dietoxibutano	1,4
γ -cadineno	5	γ -terpineno	2,6	alcanfor	1,4
óxido B de α -bisabolol	4,8	1,8-cineol	2	Tolueno	1,2
β -bourboneno	3,9				

MILENRAMA-HIDROSOL					
Compuesto	%A	Compuesto	%A	Compuesto	%A
<i>trans</i> - β -cariofileno	22,1	hexadecanoato de etilo	2,7	<i>p</i> -cimeno	0,8
1,8-cineol	14,9	2-undecanona	1,5	terpinoleno	0,7
Terpinen-4-ol	14,4	α -terpineno	1,4	6-metil-2-hepten-2-ona	0,6
Sabineno	12,5	β -mirceno	1,2	cis-hidrato de sabineno	0,4
alcanfor	8,3	α -tujeno	1,1	<i>trans</i> -hidrato de sabineno	0,4
γ -terpineno	7,3	β -pineno	1	acetato de bornilo	0,4
borneol	3,5	α -terpineol	0,9	limoneno	0,2
α -humuleno	3	α -pineno	0,8		

ANEXO A. (Continuación)

ORTIGA-HIDROSOL					
Compuesto	%A	Compuesto	%A	Compuesto	%A
1,8-cineol	20,7	γ -cadineno	2,7	α -muuroleno	1,4
alcanfor	20,3	limoneno	2,6	trans- calameneno	1,3
α -Pineno	9,8	α -copaeno	2,6	β -mirceno	1,1
canfeno	7,2	β -bisaboleno	2,6	α -humuleno	1
γ -muuroleno	5,6	palmitato de etilo	2,5	3-octanona	0,9
β -pineno	4,3	<i>p</i> -cimeno	2,1	borneol	0,8
acetato de bornilo	3,6	isomentona	1,5	γ -terpineno	0,7
trans- β -cariofileno	3,5	β -felandreno	1,4		

ROMERO-HIDROSOL					
Compuesto	%A	Compuesto	%A	Compuesto	%A
Timol	14,6	α -cadinol	2,5	α -humuleno	1,1
Hedcariol	12,6	α -eudesmol	2,3	α -muuroleno	1,1
Alcanfor	11,3	trans- β -cariofileno	2,2	óxido de cariofileno	1
1,8-cineol	5,3	epi- α -cadinol	2,1	1-epi-cubenol	1
geraniol	4,6	γ -eudesmol	2	γ -cadineno	0,9
acetato de bornilo	4,6	α -terpineol	1,8	β -elemeno	0,7
citronelol	4,4	acetato de citronelilo	1,8	carvacrol metiléter	0,4
borneol	3,7	β -bisaboleno	1,7	isopulegol	0,3
δ -cadineno	3,7	linalool	1,3	<i>p</i> -cimeno	0,2
<i>tau</i> -muurolol	3,1	terpinen-4-ol	1,2	γ -terpineno	0,2
verbenona	2,5	γ -muuroleno	1,2	α -copaeno	0,2
acetato de geraniol	2,5				

RUDA-HIDROSOL					
Compuesto	%A	Compuesto	%A	Compuesto	%A
β -felandreno	<0,1	2-decanona	1,5	carvacrol metiléter	0,2
2-undecanona	70,6	geijereno	1,4	α -pineno	0,1
2-nonanona	10,4	<i>p</i> -cimeno	0,9	canfeno	0,1
2-tridecanona	4,9	hexadecanoato de etilo	0,3	β -pineno	0,1
NI	3,1	limoneno	0,2	1,8-cineol	0,1
2- dodecanona	2,9	γ -terpineno	0,2	γ -cadineno	0,1
NI	2,7	alcanfor	0,2		

ANEXO A. (Continuación)

TOMILLO-HIDROSOL					
Compuesto	%A	Compuesto	%A	Compuesto	%A
2-metilbutanoato de metilo	<0,1	terpinen-4-ol	0,9	geraniol	0,2
acetato de isopentilo	<0,1	borneol	0,7	benzaldehído	0,1
citronelol	<0,1	isoforona	0,5	1-octen-3-ol	0,1
timol	88,2	1,8-cineol	0,3	<i>p</i> -cimen-8-ol	0,1
carvacrol	7,3	alcanfor	0,3	α -terpineol	0,1
linalool	1,1				

AJENJO-ACEITE					
Compuesto	%A	Compuesto	%A	Compuesto	%A
<i>trans</i> -2-heptenal	16,1	<i>trans,cis</i> -2,4-decadienal	7,4	linoleato de etilo	7,8
<i>trans</i> -turjona	20,4	dietilftalato	10,4	<i>tocoferol</i>	25
<i>cis</i> -miróxido	6,6				

AJÍ-ACEITE	
Compuesto	%A
<i>tocoferol</i>	100

AJO-ACEITE					
Compuesto	%A	Compuesto	%A	Compuesto	%A
dialil disulfuro	0,3	palmitato de etilo	1,7	estearato de etilo	0,8
Compuesto PM 152	0,4	linoleato de etilo	5,1	sesamin	36,4
alcanfor	32,2	oleato de etilo	4,7	Compuesto PM 446	18
<i>endo</i> -isocanfona	0,4				

ALTAMISA-ACEITE					
Compuesto	%A	Compuesto	%A	Compuesto	%A
hexadecanoato de etilo	17,5	oleato de etilo	25,6	estearato de etilo	7,7
linoleato de etilo	49,2				

ANEXO A. (Continuación)

CALÉNDULA-ACEITE					
Compuesto	%A	Compuesto	%A	Compuesto	%A
<i>trans,cis</i> -2,4-decadienal	0,5	palmitato de etilo	8,9	linoleato de etilo	53,9
<i>trans</i> -2, <i>trans</i> -4-decadienal	0,7	linoleato de metilo	1,2	oleato de etilo	27,3
miristato de etilo	0,1	oleato de metilo	0,6	estearato de etilo	4,4
palmitato de metilo	0,1	estearato de metilo	0,1	vitamina E (α -tocoferol)	2,2

CEBOLLA-ACEITE					
Compuesto	%A	Compuesto	%A	Compuesto	%A
<i>p</i> -cimeno	13,7	timol	33	tocoferol	25,6
γ -terpineno	27,6				

COLA DE CABALLO-ACEITE					
Compuesto	%A	Compuesto	%A	Compuesto	%A
<i>trans</i> -2-heptenal	28,7	palmitato de etilo	3,1	estearato de etilo	2
<i>trans,cis</i> -2,4-decadienal	14,1	linoleato de etilo	11,8	tocoferol	13,5
<i>trans</i> -2, <i>trans</i> -4-decadienal	18,7	oleato de etilo	8		

HIERBABUENA-ACEITE					
Compuesto	%A	Compuesto	%A	Compuesto	%A
pimaradieno	<0,1	sabineno	0,7	α -gurjuneno	0,3
<i>carvona</i>	16,9	<i>trans</i> -carveol	0,7	β -copaeno	0,3
isomentona	13,6	isopulegona	0,6	epizonareno	0,3
pulegona	9,9	<i>trans</i> - β -farneseno	0,6	β -bisabolenol	0,3
isomentol	6,2	α -humuleno	0,6	γ -cadineno	0,3
<i>cis</i> -dihidrocarvona +dihidrocarveol	4,9	diocetilftalato	0,6	1,10-di-epi-cubenol	0,3
limoneno	4,5	1-octen-3-ol + β -pineno	0,5	alcanfor	0,2
acetato de mentilo	2,7	3-octanol	0,5	<i>acetato de bornilo</i>	0,2
terpinen-4-ol	2,5	<i>p</i> -cimeno	0,5	α -copaeno	0,2
<i>acetato de iso-dihidrocarvilo</i>	2,4	<i>cis</i> -carveol	0,5	jasmona	0,2
mentona	2,2	terpinoleno	0,4	α -cadineno	0,2
β -bourboneno	2,2	<i>trans</i> -muurolo-3,5-dieno	0,4	óxido B de α -bisabolol	0,2
2-undecanona	2,1	<i>epi</i> -biciclo sesquifelandreno	0,4	compuesto oxigenado PM 232	0,2

ANEXO A. (Continuación)

HIERBABUENA-ACEITE (Continuación)					
Compuesto	%A	Compuesto	%A	Compuesto	%A
<i>trans</i> - β -cariofileno	2	α -muuroleno	0,4	cis-espiroeter	0,2
γ -terpineno	1,8	<i>trans</i> -calameneno	0,4	α -tujeno	0,1
β -mirceno	1,7	<i>tau</i> -muurolol	0,4	canfeno	0,1
1,8-cineol	1,5	α -pineno	0,3	α -felandreno	0,1
<i>timol</i>	1,2	<i>trans</i> - β -ocimeno	0,3	eugenol	0,1
γ -curcumeno	1,2	linalool	0,3	ar-curcumeno	0,1
β -felandreno	1	<i>trans</i> -sabinol	0,3	elemol	0,1
δ -cadineno	1	α -terpineol	0,3	espatulenol	0,1
α -terpineno	0,9	<i>trans</i> -dihidrocarvona	0,3	óxido de cariofileno	0,1
germacreno D	0,9	piperitona	0,3	trimetil-2-pentadecanona	0,1
acetato de 1-octen-3-ilo	0,8	piperitenona	0,3	<i>trans</i> -Spiroeter	0,1
acetato de 3-octilo	0,8	<i>cis</i> -acetato de carvilo	0,3		

HIGUERILLA-ACEITE					
Compuesto	%A	Compuesto	%A	Compuesto	%A
<i>trans</i> - β -farneseno	17,1	escualeno	55,7	linoleato de etilo	8,1
cis-espiroeter	19				

HINOJO-ACEITE					
Compuesto	%A	Compuesto	%A	Compuesto	%A
α -pineno	3,1	<i>p</i> -anisaldehido	4,8	linoleato de etilo	5,5
limoneno	1,5	<i>trans</i> -anetol	38,2	oleato de etilo	3,9
fenchona	20,3	dietilftalato	4,4	estearato de etilo	0,7
alcanfor	0,5	palmitato de etilo	1,7	tocoferol	13,5
estragol	1,7				

MILENRAMA-ACEITE					
Compuesto	% A	Compuesto	% A	Compuesto	% A
Sabineno	46,6	diocetilftalato	1,7	oxido de cariofileno	0,6
1,8-cineol	9,6	camazuleno	1,6	α -terpineol	0,5
<i>trans</i> - β -cariofileno	8	cis-hidrato de sabineno	1,3	terpinoleno	0,4
β -mirceno	3,7	<i>p</i> -cimeno	1,2	germacreno D	0,3
γ -terpineno	3,4	α -humuleno	1,2	β -felandreno	0,2

ANEXO A. (Continuación)

MILENRAMA-ACEITE (Continuación)					
Compuesto	% A	Compuesto	% A	Compuesto	% A
α -tujeno	2,9	Canfeno	1,1	verbenona	0,2
β -pineno	2,9	α -terpineno	1	β -bisaboleno	0,2
borneol	2,5	trans-hidrato de sabineno	1	1-octeno	0,1
α -pineno	2,3	acetato de bornilo	0,9	7-metilocteno	0,1
alcanfor	2,1	limoneno	0,8	α -felandreno	0,1
terpinen-4-ol	1,7				

ORTIGA-ACEITE					
Compuesto	%A	Compuesto	%A	Compuesto	%A
<i>trans</i> -2-heptenal	1,5	palmitato de etilo	1,1	estearato de etilo	0,7
<i>trans,cis</i> -2,4-decadienal	0,7	linoleato de etilo	5,2	sesamin	57,8
<i>trans</i> -2, <i>trans</i> -4-decadienal	0,8	oleato de etilo	4,7	Compuesto PM 446	27,4

ROMERO-ACEITE					
Compuesto	%A	Compuesto	%A	Compuesto	%A
Alcanfor	24,4	3-octanona	1,4	triciclono	0,4
1,8-cineol	15,9	<i>trans</i> - β -cariofileno	1,2	<i>cis</i> -pinocanfona	0,4
α -pineno	9,3	β -bisaboleno	1,2	Tuja, 2,4(10)-dieno	0,2
canfeno	8,4	terpinoleno	1,1	3-octanol	0,2
β -pineno	6,7	terpinen-4-ol	1,1	citronelal	0,2
limoneno	3,7	α -terpineol	1,1	α -copaeno	0,2
borneol	3,4	α -terpineno	1	γ -cadineno	0,2
β -mirceno	2,9	<i>p-cimeno</i>	1	β -sesquifelandreno	0,2
acetato de bornilo	2,8	α -humuleno	0,7	oxido de cariofileno	0,2
γ -terpineno	2,4	δ -cadineno	0,6	sabineno	0,1
verbenona	2,3	α -tujeno	0,5	<i>p</i> -menta-1(7),8-dieno	0,1
α -felandreno	1,9	linalool	0,5	<i>trans</i> - β -ocimeno	0,1
β -felandreno	1,6	γ -muuroleno	0,5	<i>cis</i> -hidrato de sabineno	0,1

ANEXO A. (Continuación)

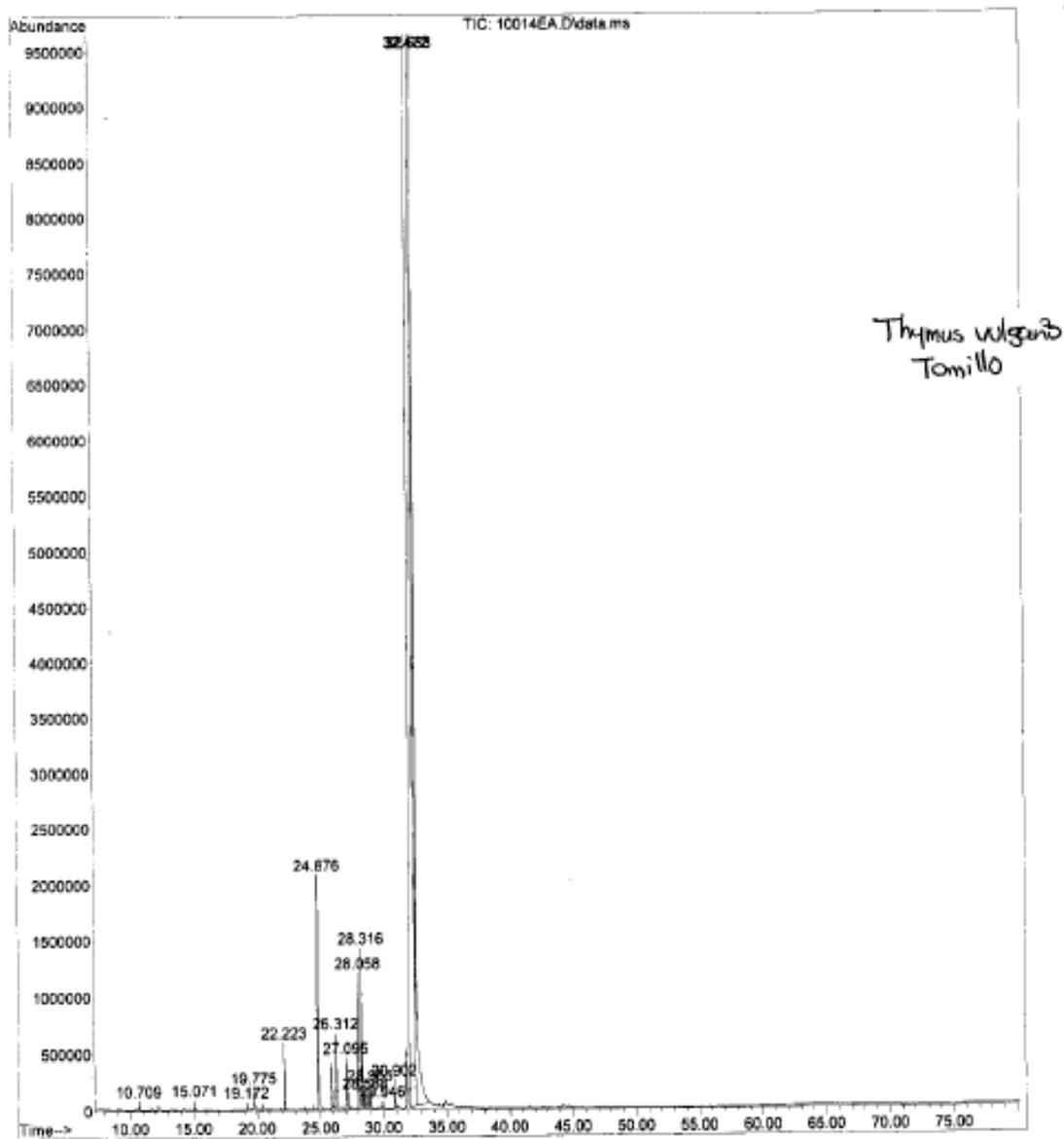
RUDA-ACEITE					
Compuesto	%A	Compuesto	%A	Compuesto	%A
α -tujeno	<0,1	γ -terpineno	1	acetato de octilo	0,2
β -felandreno	<0,1	compuesto oxigenado	1	cis-espiroeter	0,2
2-undecanona	53,0	<i>p</i> -cimeno	0,6	α -pineno	0,1
2-nonanona	11,7	trans- β -cariofileno	0,6	canfeno	0,1
geijereno	4,6	trans- β -farneseno	0,6	sabineno	0,1
2-undecanol	3,9	derivado del 3,4-dioximetilen-1-fenilo	0,5	β -pineno	0,1
2-tridecanona	3,3	2-tridecanona (ramificada)	0,4	β -mirceno +2-octanona	0,1
derivado del 3,4-dioximetilen-1-fenilo	3,2	alcanfor	0,3	2-pentilfurano	0,1
compuesto PM 254	2,6	isogeijereno	0,3	α -terpineno	0,1
2-dodecanona (ramificada)	2,5	diociltalato	0,3	1,8-cineol	0,1
2-nonanol	2,3	limoneno	0,2	carvacrol metileter	0,1
2-dodecanona	2,1	citronelal	0,2	trans-Spiroeter	0,1
2-decanona	1,8	isomentona	0,2	bergapteno	0,1
pregeijereno	1,2				

TOMILLO-ACEITE					
Compuesto	%A	Compuesto	%A	Compuesto	%A
<i>p</i> -cimeno	22,1	δ -3-careno	0,2	timol metiléter	0,1
γ -terpineno	19,3	α -terpineno	3	carvacrol metiléter	2,9
Timol	29,6	limoneno	0,8	acetato de bornilo	0,1
2-metilbutanoato de metilo	0,1	β -felandreno	0,3	carvacrol	1,5
triciclono	<0,1	1,8-cineol	0,8	acetato de timilo	0,2
α -tujeno	1,6	trans- β -ocimeno	0,1	trans- β -cariofileno	3,4
α -pineno	1,1	cis-hidrato de sabineno	0,3	propanoato de geranilo	0,1
canfeno	0,8	terpinoleno	0,2	α -humuleno	0,1
sabineno	0,2	<i>p</i> -cimeneno	0,1	germacreno D	0,5
1-octen-3-ol	0,5	linalool	3	γ -muuroleno	0,1
β -pineno	0,3	alcanfor	0,7	γ -cadineno	0,2
3-octanona	0,1	borneol	1	δ -cadineno	0,2
β -mirceno	2,1	terpinen-4-ol	1,2	óxido de cariofileno	0,3
3-octanol	0,1	α -terpineol	0,2	γ -eudesmol	0,1
α -felandreno	0,3	cis-dihidrocarvona	0,1	<i>epi</i> - α -cadinol	0,1

ANEXO A. (Continuación)

TOMILLO - HIDROSOL

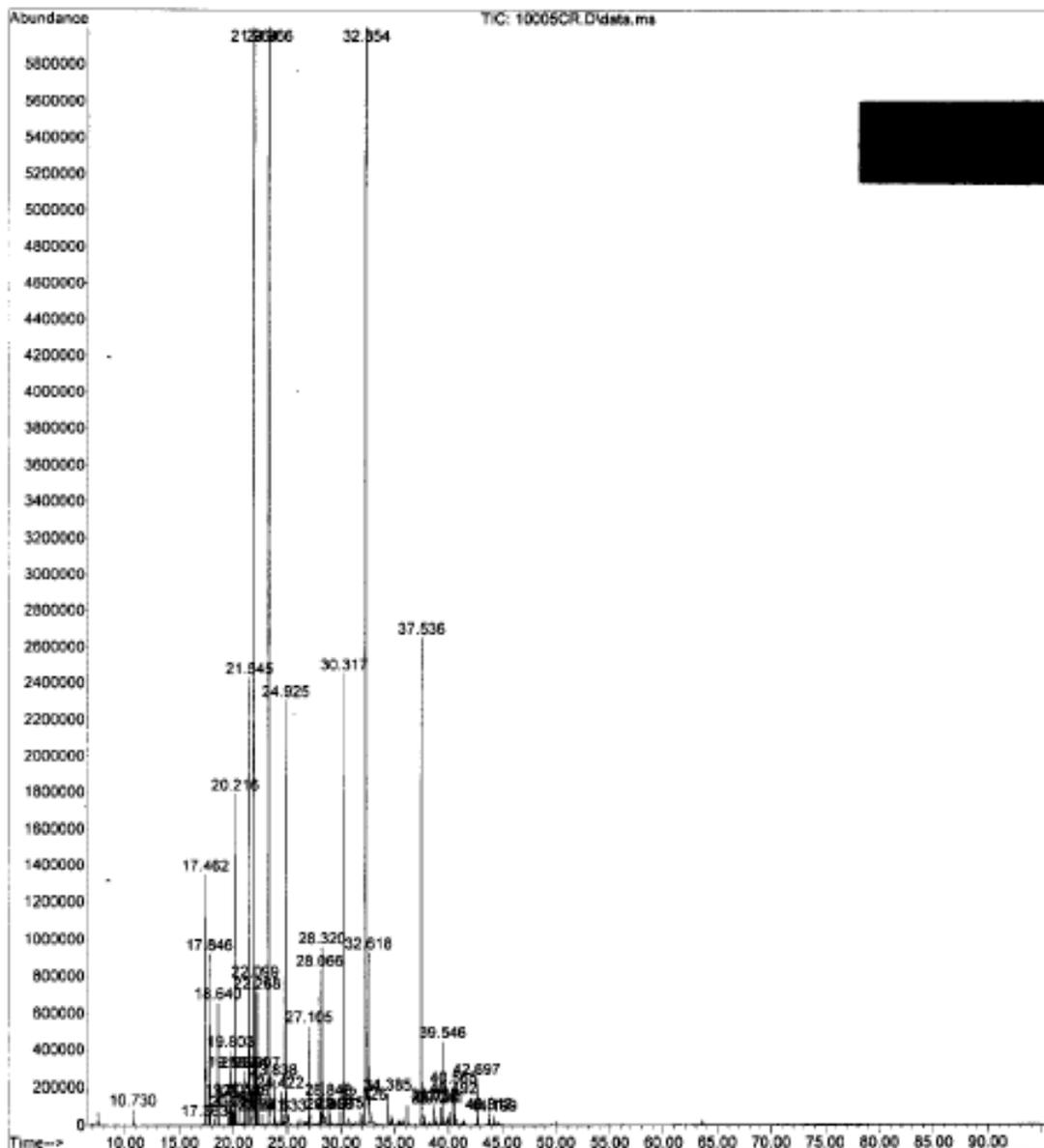
File :D:\msdchem\1\DATA\2011\GC-05\983100\230811S\10014EA.D
Operator : ELENA STASHENKO
Acquired : 31 Aug 2011 16:09 using AcqMethod AESPLITSPME.M
Instrument : 6890 Plus - S973N
Sample Name: 10014EA
Misc Info : Nombre científico: Thymus vulgaris.
Vial Number: 100



ANEXO A. (Continuación)

TOMILLO -ACEITE ESENCIAL

File : D:\msdchem\1\DATA\2011\GC-05\983100\130811\10005CR.D
Operator : Elena Stashenko-DIS
Acquired : 15 Aug 2011 15:28 using AcqMethod AESPLIT.M
Instrument : 6890 Plus - 5973N
Sample Name: 10005CR
Misc Info : NOMBRE CIENTIFICO: THYMUS VULGARIS
Vial Number: 10



ANEXO B. Comparación de metabolitos secundarios entre especies vegetales de hidrosoles

Especie vegetal Compuestos Químicos	Especie vegetal															TOTALES	
	Ajenjo	Ají	Ajo	Altamisa	Caléndula	Cebolla	Cola de caballo	Hierbabuena	Higuerilla	Hinojo	Manzanilla	Milenrama	Ortiga	Romero	Ruda		Tomillo
1,1-dietoxi-3-metilbutano											x						1
1,1-dietoxibutano											x						1
1,4-cineol								x									1
1,8-cineol	x	x	x		x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	14
1,10-di-epi-cubenol								x									1
1-epi-cubenol														x			1
1-nonen-3-ol								x									1
1-octen-3-ol								x								x	2
2- dodecanona															x		1
2,2,6-trimetil-2H-piran-3(4H)-ona								x									1
2,5-dietiltetrahidrofurano								x									1
2-decanona															x		1
2-metilbutanal								x									1
2-metilbutanoato de etilo								x			x						2
2-metilbutanoato de metilo																x	1
2-nonanona								x							x		2
2-tridecanona															x		1
2-undecanona								x			x	x			x		4
3-metilbutanal								x									1
3-metilciclohexanona								x									1
3-octanol								x									1
3-octanona								x					x				2
6-metil-2-hepten-2-ona												x					1
acetato de 1,3,3-trimetil-2-oxabicyclo[2.2.2] octan-6-ilo										x							1
acetato de 1-octen-3-ilo								x									1
acetato de 3-octilo								x									1
acetato de 4-metil-3-hexanilo								x									1
acetato de bornilo		x						x				x	x	x			5
acetato de citronelilo														x			1
acetato de fenchilo										x							1
acetato de geranilo														x			1
acetato de iso-dihidrocarvilo								x									1

ANEXO B. (Continuación)

Especie vegetal Compuestos Químicos																TOTALES	
	Ajenjo	Aji	Ajo	Altamisa	Caléndula	Cebolla	Cola de caballo	Hierbabuena	Higuerilla	Hinojo	Manzanilla	Milenrama	Ortiga	Romero	Ruda		Tomillo
acetato de isopentilo																x	1
acetato de mentilo								x									1
acetato de timilo	x																1
alcanfor	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	15
ar-curcumeno				x													1
artemisa cetona								x									1
artemisia cetona											x						1
benzaldehído								x								x	2
biciclogermacreno				x													1
borneol	x				x					x		x	x	x		x	7
calareno				x													1
canfeno													x		x		2
carvacrol	x				x					x						x	4
carvacrol metiléter														x	x		2
carvona					x			x		x							3
cis-acetato de carvilo								x									1
cis-carveol								x									1
cis-dihidrocarvona								x									1
cis-dihidrocarvona+dihidrocarveol					x												1
cis-hidrato de sabineno												x					1
cis-p-Ment-2-en-1-ol								x		x							2
cis-tujona	x																1
cis- α -bergamoteno				x													1
citronelal					x												1
citronelol	x				x					x				x		x	5
dauceno				x													1
decanoato de etilo											x						1
dialil trisulfuro			x														1
dietil ftalato				x													1
dihidrocarveol								x									1
dihidroedulan								x									1
elemol	x				x					x							3
epi- α -cadinol														x			1
espatulenol								x									1
estragol								x		x							2

ANEXO B. (Continuación)

Especie vegetal Compuestos Químicos																TOTALES	
	Ajenjo	Aji	Ajo	Altamisa	Caléndula	Cebolla	Cola de caballo	Hierbabuena	Higuerilla	Hinojo	Manzanilla	Milenrama	Ortiga	Romero	Ruda		Tomillo
eudesmol	x																1
eugenol	x				x												2
fenchona								x		x							2
geijereno															x		1
geranial					x												1
geraniol	x													x		x	3
germacreno D				x													1
globulol	x				x					x							3
Hediculariol														x			1
hexadecanoato de etilo		x	x			x					x	x			x		6
hexadecenoato de etilo		x															1
intermedeol	x																1
iso-3-tujanol	x																1
isoforona																x	1
isomentol					x			x									2
isomentona					x			x	x				x				4
isopulegol														x			1
isopulegona								x									1
jasmona	x							x									2
limoneno								x			x	x	x		x		5
linalool	x				x			x		x				x		x	6
Linoleato de etilo		x	x			x											3
linolenato de etilo		x															1
mentona					x			x		x							3
muurolo-4,10(14)-dien-1-β-ol					x												1
neo-dihidrocarveol								x									1
neral					x												1
NI															x		1
NI															x		1
oleato de etilo						x											1
Oxido A de α-bisabolol											x						1
óxido B de α-bisabolol	x							x			x						3
óxido de bisaboleno											x						1
oxido de cariofileno														x			1
óxido de cis-linalool								x									1

ANEXO B. (Continuación)

Especie vegetal Compuestos Químicos	Especie vegetal														TOTALES		
	Ajenjo	Aji	Ajo	Altamisa	Caléndula	Cebolla	Cola de caballo	Hierbabuena	Higuerilla	Hinojo	Manzanilla	Milenrama	Ortiga	Romero		Ruda	Tomillo
óxido de piperitenona										x							1
palmitato de etilo													x				1
<i>p</i> -anisaldehído										x							1
<i>p</i> -cimen-8-ol										x						x	2
<i>p</i> -cimeno								x		x	x	x	x	x	x		7
pentadecanoato de etilo		x															1
piperitenona								x									1
piperitona					x			x									2
pulegona	x				x			x		x							4
sabineno												x					1
tau-cadinol	x																1
tau-muurolol	x				x									x			3
terpinen-4-ol	x				x			x		x		x		x		x	7
terpinoleno												x					1
timol	x	x	x		x			x		x				x		x	8
Tolueno											x						1
trans- calameneno													x				1
<i>trans</i> -anetol										x							1
trans-carveol								x									1
trans-dihidrocarvona					x			x									2
trans-hidrato de sabineno												x					1
trans-muurolol								x									1
trans-pinocarveol					x												1
trans- <i>p</i> -Ment-2-en-1-ol										x							1
<i>trans</i> -sabinol								x									1
trans-tujona	x							x									2
trans- β -cariofileno				x		x	x	x			x	x	x	x			8
trans- β -farneseno				x							x						2
Valerato de hexilo		x															1
verbenona	x				x									x			3
verbenona+cis-piperitol										x							1
α -bisabolol	x																1
α -cadineno								x									1
α -cadinol	x				x			x		x				x			5
α -copaeno				x		x	x				x		x	x			6

ANEXO B. (Continuación)

Especie vegetal Compuestos Químicos	Especie vegetal																
	Ajenjo	Aji	Ajo	Altamisa	Caléndula	Cebolla	Cola de caballo	Hierbabuena	Higuerilla	Hinojo	Manzanilla	Milenrama	Ortiga	Romero	Ruda	Tomillo	TOTALES
α -eudesmol														x			1
α -farneseno				x													1
α -felandreno								x		x							2
α -gurjuneno				x													1
α -humuleno				x		x	x					x	x	x			6
α -isocomeno				x													1
α -longipineno											x						1
α -muuroleno											x		x	x			3
α -pineno												x	x		x		3
α -terpineno								x		x		x					3
α -terpineol	x		x		x			x		x		x		x		x	8
α -tujeno												x					1
β -bisaboleno				x		x	x						x	x			5
β -bourboneno								x			x						2
β -elemeno						x	x							x			3
β -felandreno										x			x		x		3
β -mirceno								x				x	x				3
β -pineno												x	x		x		3
β -selineno											x						1
β -sesquifelandreno				x													1
γ -cadineno				x		x	x				x		x	x	x		7
γ -curcumeno				x													1
γ -eudesmol	x													x			2
γ -himachaleno		x															1
γ -muuroleno						x	x				x		x	x			5
γ -terpineno								x			x	x	x	x	x		6
δ -cadineno				x		x	x	x						x			5
173	28	11	7	19	28	13	10	65	2	30	25	23	23	34	20	16	

ANEXO C. Comparación de metabolitos secundarios entre especies vegetales de aceites esenciales

Especie vegetal Compuestos Químicos	Ajenjo	Aji	Ajo	Altamiza	Calendula	Cebolla	Cola de caballo	Hierbabuena	Higuerilla	Hinojo	Manzanilla	Milenrama	Romero	Ruda	Tomillo	TOTALES
1,8-cineol								x				x	x	x	x	5
1,10-di-epi-cubenol								x								1
1-octen-3-ol															x	1
1-octen-3-ol + β -pineno								x								1
1-octeno												x				1
2-decanona														x		1
2-dodecanona											x			x		2
2-dodecanona (ramificada)														x		1
2-metilbutanoato de metilo															x	1
2-nonanol														x		1
2-nonanona														x		1
2-pentilfurano														x		1
2-tridecanona														x		1
2-tridecanona (ramificada)														x		1
2-undecanol														x		1
2-undecanona								x						x		2
3-octanol								x					x		x	3
3-octanona													x		x	2
7-metilocteno												x				1
acetato de 1-octen-3-ilo								x								1
acetato de 3-octilo								x								1
acetato de bornilo								x				x	x		x	4
acetato de iso-dihidrocarvilo								x								1
acetato de mentilo								x								1
acetato de octilo														x		1
acetato de timilo															x	1
Alcanfor			x					x		x		x	x	x	x	7
ar-curcumeno								x								1
bergapteno														x		1
borneol												x	x		x	3
camazuleno												x				1
canfeno								x				x	x	x	x	5

ANEXO C. (Continuación)

Especie vegetal Compuestos Químicos															TOTALES	
	Ajenjo	Aji	Ajo	Altamiza	Calendula	Cebolla	Cola de caballo	Hierbabuena	Higuerilla	Hinojo	Manzanilla	Milenrama	Romero	Ruda		Tomillo
carvacrol															x	1
carvacrol metileter														x	x	2
carvona							x									1
cis-acetato de carvilo							x									1
cis-carveol							x									1
cis-dihidrocarvona															x	1
cis-dihidrocarvona+dihidrocarveol							x									1
cis-espiroeter								x		x						2
cis-hidrato de sabineno											x	x			x	3
cis-miróxido	x															1
cis-pinocanfona												x				1
cis-spiroéter							x							x		2
citronelal												x	x			2
compuesto oxigenado														x		1
compuesto oxigenado PM 232							x									1
Compuesto PM 152			x													1
compuesto PM 254														x		1
Compuesto PM 446			x													1
derivado del 3,4-dioximetilen-1-fenilo														x		1
derivado del 3,4-dioximetilen-2-fenilo														x		1
dialil disulfuro			x													1
dietilftalato	x								x							2
diocetilftalato							x				x			x		3
elemol							x									1
endo-isocanfona			x													1
epi-biciclosesquifelandreno							x									1
epizonareno							x									1
epi- α -cadinol															x	1
escualeno								x								1
espatulenol							x									1
estearato de etilo			x	x	x		x		x							5
estearato de metilo					x											1
estragol									x							1
eugenol							x									1

ANEXO C. (Continuación)

<div style="text-align: center;">Especie vegetal</div> <div style="text-align: left;">Compuestos Químicos</div>	Ajenjo	Aji	Ajo	Altamiza	Calendula	Cebolla	Cola de caballo	Hierbabuena	Higuerilla	Hinojo	Manzanilla	Milenrama	Romero	Ruda	Tomillo	TOTALES
fenchona										x						1
geijereno														x		1
germacreno D								x				x			x	3
hexadecanoato de etilo				x							x					2
isogeijereno														x		1
isomentol								x								1
isomentona								x						x		2
isopulegona								x								1
jasmona								x								1
limoneno								x		x		x	x	x	x	6
linalool								x					x		x	3
linoleato de etilo	x		x	x	x		x		x	x	x					8
linoleato de metilo					x											1
mentona								x								1
miristato de etilo					x											1
oleato de etilo			x	x	x		x			x	x					6
oleato de metilo					x											1
Oxido A de α -bisabolol											x					1
óxido B de α -bisabolol								x			x					2
óxido de bisaboleno											x					1
oxido de cariofileno								x				x	x		x	4
palmitato de etilo			x		x		x			x						4
palmitato de metilo					x											1
<i>p</i> -anisaldehido										x						1
<i>p</i> -cimeneno															x	1
<i>p</i> -cimeno						x		x				x	x	x	x	6
pimaradieno								x								1
piperitenona								x								1
piperitona								x								1
<i>p</i> -menta-1(7),8-dieno													x			1
pregeijereno														x		1
propanoato de geranilo															x	1
pulegona								x								1
sabineno								x				x	x	x	x	5
sesamin			x													1

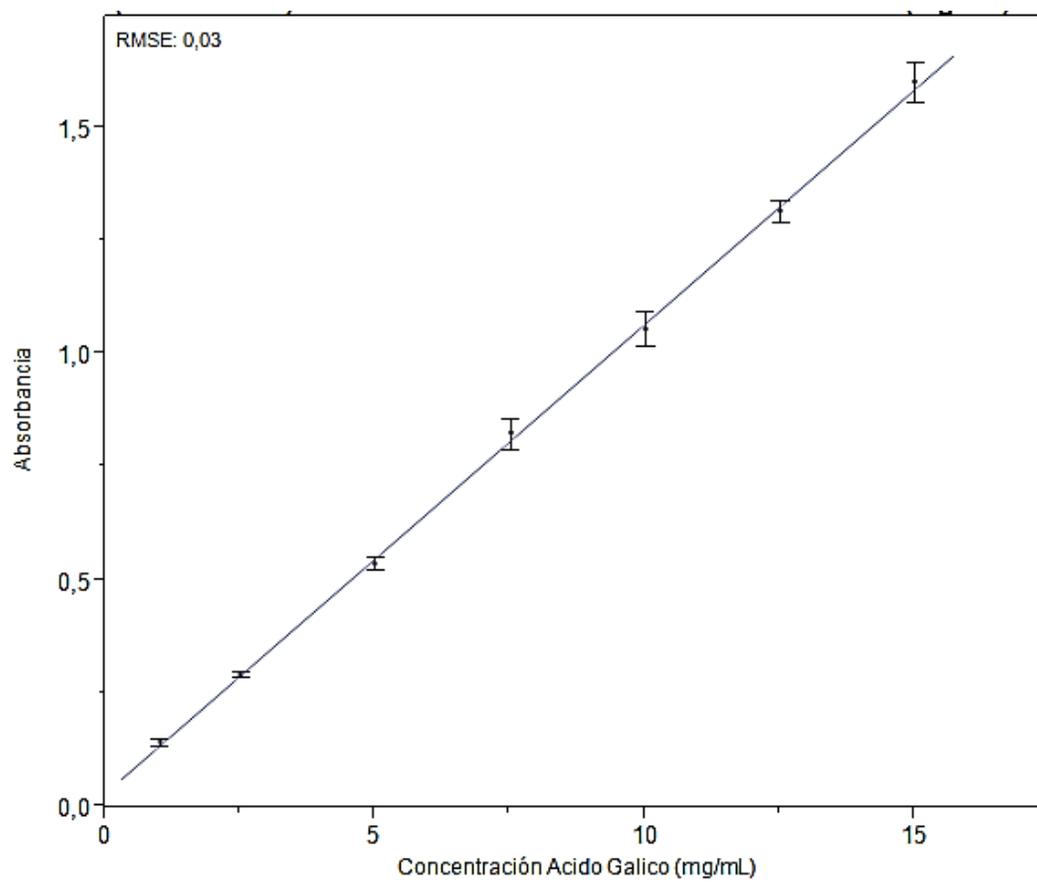
ANEXO C. (Continuación)

Especie vegetal Compuestos Químicos															TOTALES	
	Ajenjo	Aji	Ajo	Altamiza	Calendula	Cebolla	Cola de caballo	Hierbabuena	Higuera	Hinojo	Manzanilla	Milenrama	Romero	Ruda		Tomillo
tau-muurolol								x								1
terpinen-4-ol								x				x	x		x	4
terpinoleno								x				x	x		x	4
timol						x		x							x	3
timol metiléter															x	1
tocoferol	x	x				x	x			x						5
<i>trans,cis-2,4</i> -decadienal					x		x									2
<i>trans-2,trans-4</i> decadienal	x				x		x									3
<i>trans-2</i> -heptenal	x						x									2
trans-anetol										x						1
trans-calameneno								x								1
trans-carveol								x								1
trans-dihidrocarvona								x								1
trans-espiroéter											x					1
trans-hidrato de sabineno												x				1
trans-muurolo-3,5-dieno								x								1
trans-sabinol								x								1
trans-spiroéter								x						x		2
<i>trans</i> -turjona	x															1
trans- β -cariofileno								x				x	x	x	x	5
trans- β -farneseno								x	x		x			x		4
trans- β -ocimeno								x					x		x	3
triciclono													x		x	2
trimetil-2-pentadecanona								x								1
tuja.2,4(10)-dieno													x			1
verbenona												x	x			2
vitamina E (α -tocoferol)					x											1
α -cadineno								x								1
α -copaeno								x					x			2
α -felandreno								x				x	x		x	4
α -gurjuneno								x								1
α -humuleno								x				x	x		x	4
α -muuroleno								x								1
α -pineno								x		x		x	x	x	x	6
α -terpineno								x				x	x	x	x	5

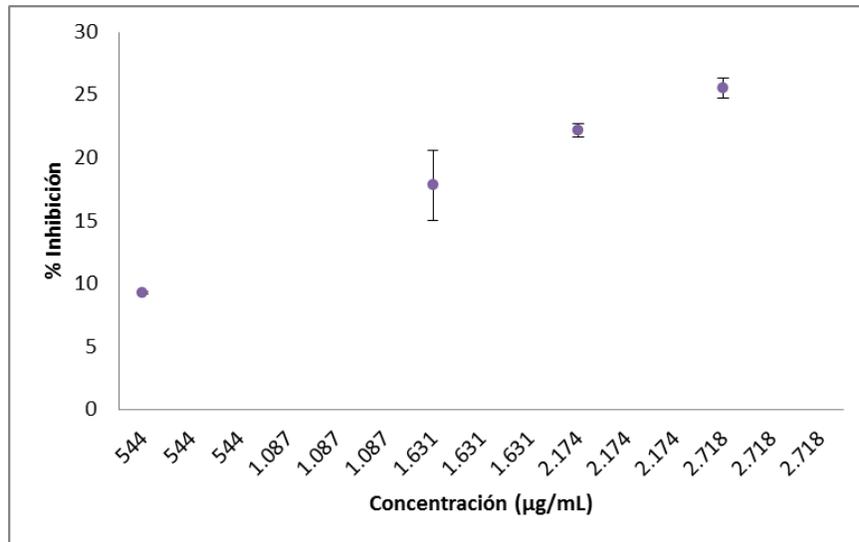
ANEXO C. (Continuación)

Especie vegetal Compuestos Químicos															TOTALES	
	Ajenjo	Aji	Ajo	Altamiza	Calendula	Cebolla	Cola de caballo	Hierbabuena	Higuerilla	Hinojo	Manzanilla	Milenrama	Romero	Ruda		Tomillo
α -terpineol								x				x	x		x	4
α -tujeno								x				x	x	x	x	5
β -bisaboleno								x				x	x			3
β -bourboneno								x								1
β -copaeno								x								1
β -felandreno								x				x	x	x	x	5
β -mirceno								x				x	x		x	
β -mirceno+2-octanona														x		1
β -pineno												x	x	x	x	4
β -sesquifelandreno													x	x	x	3
γ -cadineno								x					x			2
γ -curcumeno								x								1
γ -eudesmol															x	1
γ -muuroleno													x		x	2
γ -terpineno						x		x				x	x		x	5
δ -3-careno															x	1
δ -cadineno								x					x		x	3

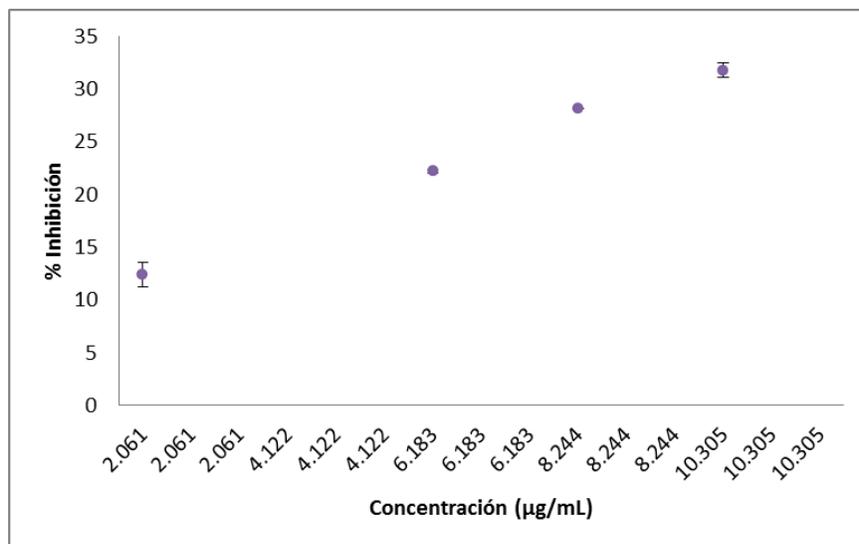
ANEXO D. Curva de calibración de Polifenoles Totales



ANEXO E. Curvas de calibración para calcular IC₅₀ de los extractos evaluados por medio del método de DPPH

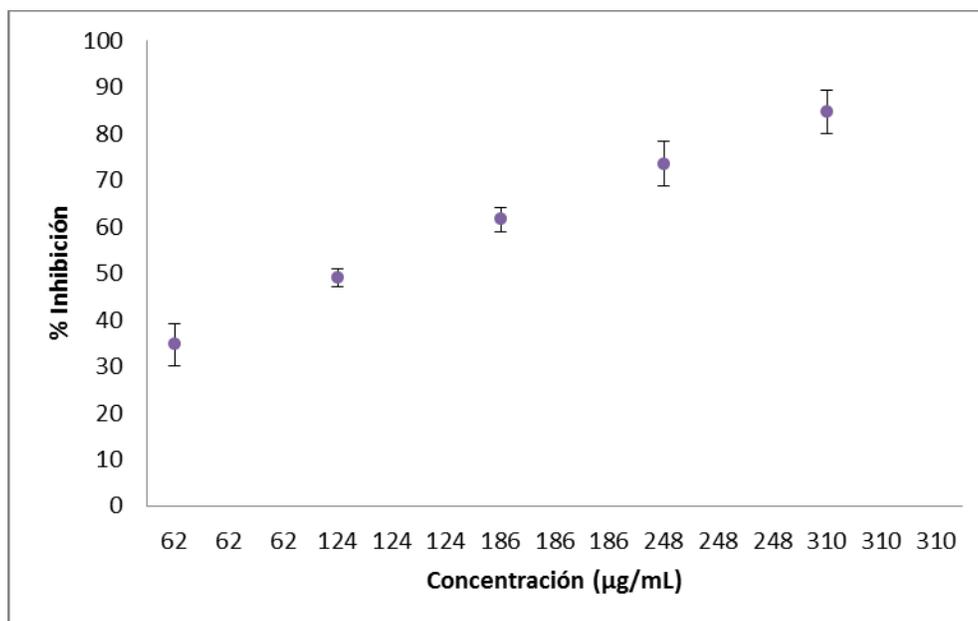


Aceite esencial de Ruda. $y = 0.0076 * x + 5.3767$, $R^2 = 0.998$

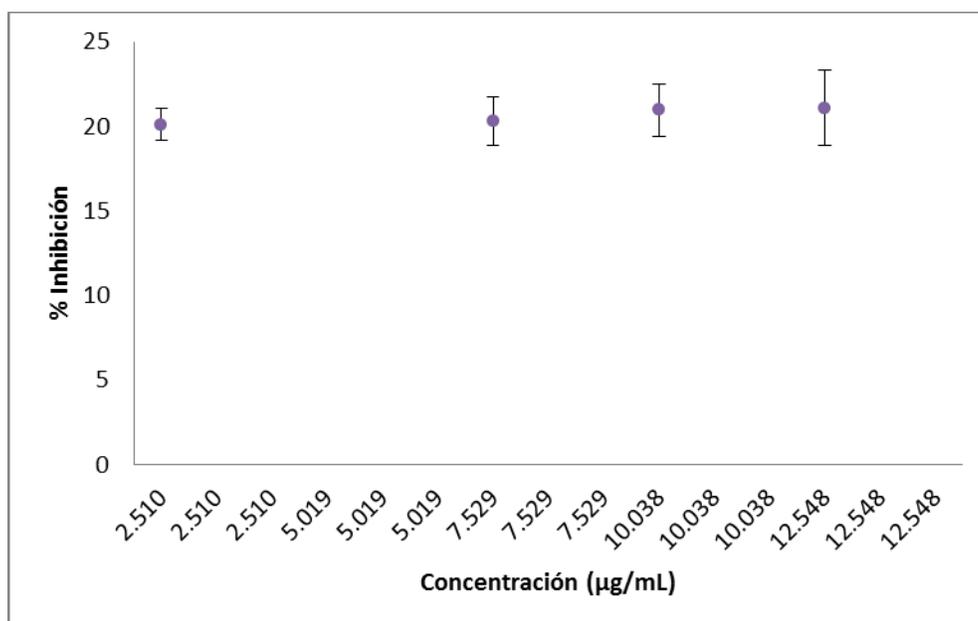


Hidrosol de Ruda. $y = 0.0024 * x + 7.5461$, $R^2 = 0.996$

ANEXO E. (Continuación)

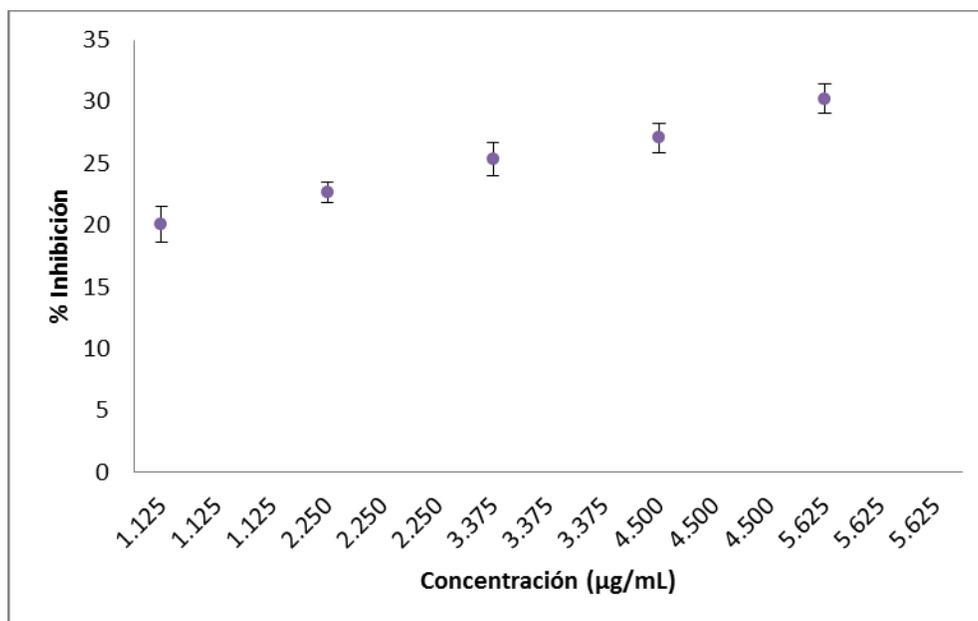


Hidrosol de Romero $y = 0,2008x + 23,219$, $R^2 = 0,9977$

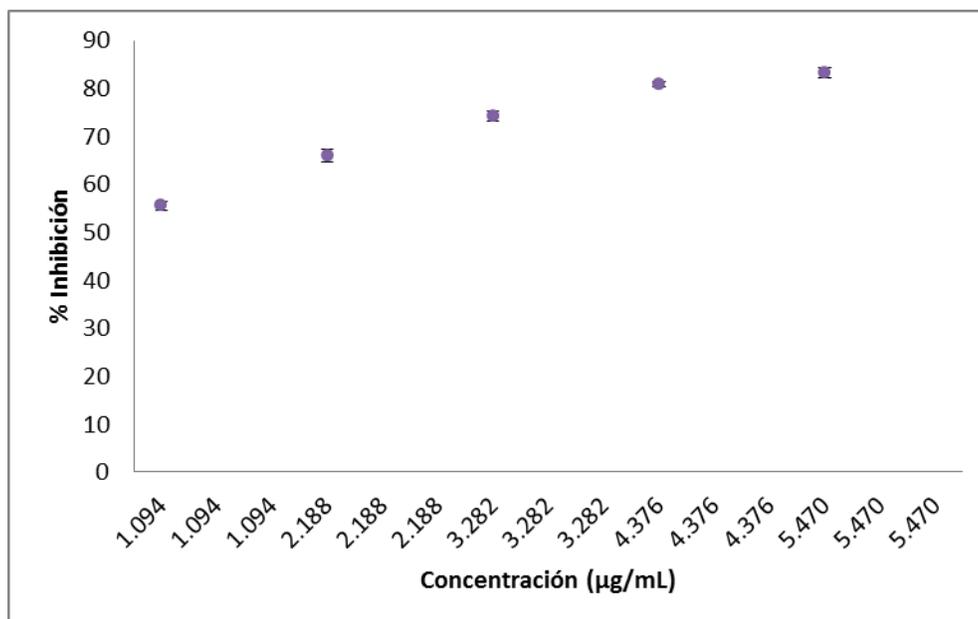


Hidrosol de Tomillo $y = 0,0001x + 19,735$, $R^2 = 0,8834$

ANEXO E. (Continuación)

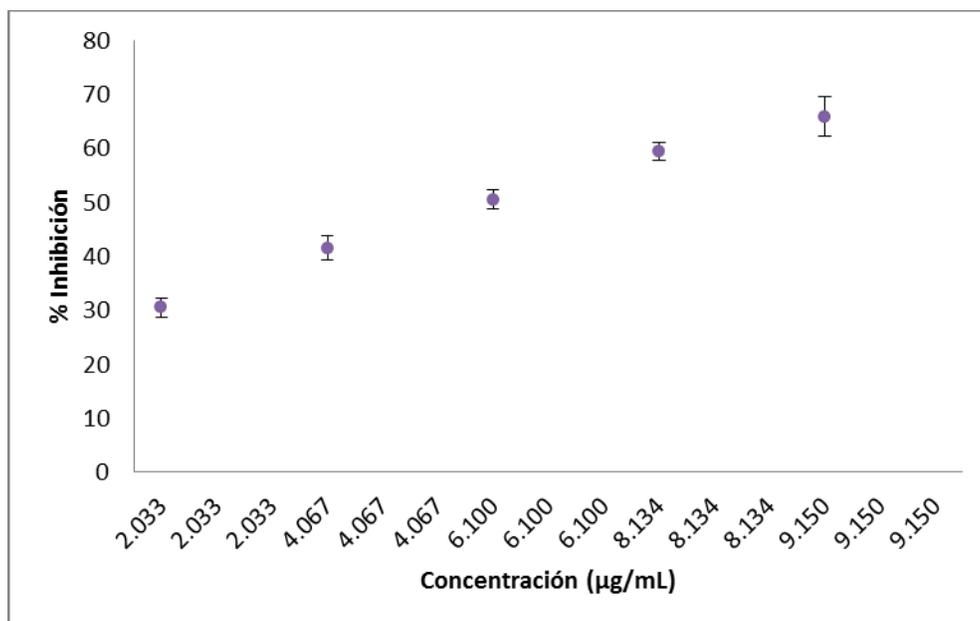


Aceite esencial de Tomillo, $y = 0,0022x + 17,685$, $R^2 = 0,9944$

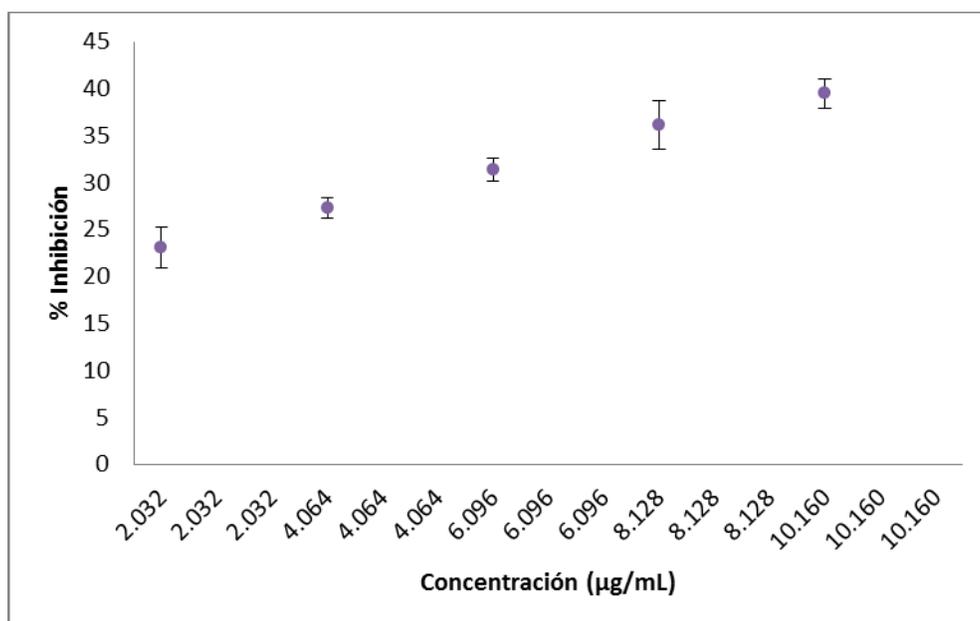


Aceite esencial de Romero, $y = 0,0077x + 48,103$, $R^2 = 0,9891$

ANEXO E. (Continuación)

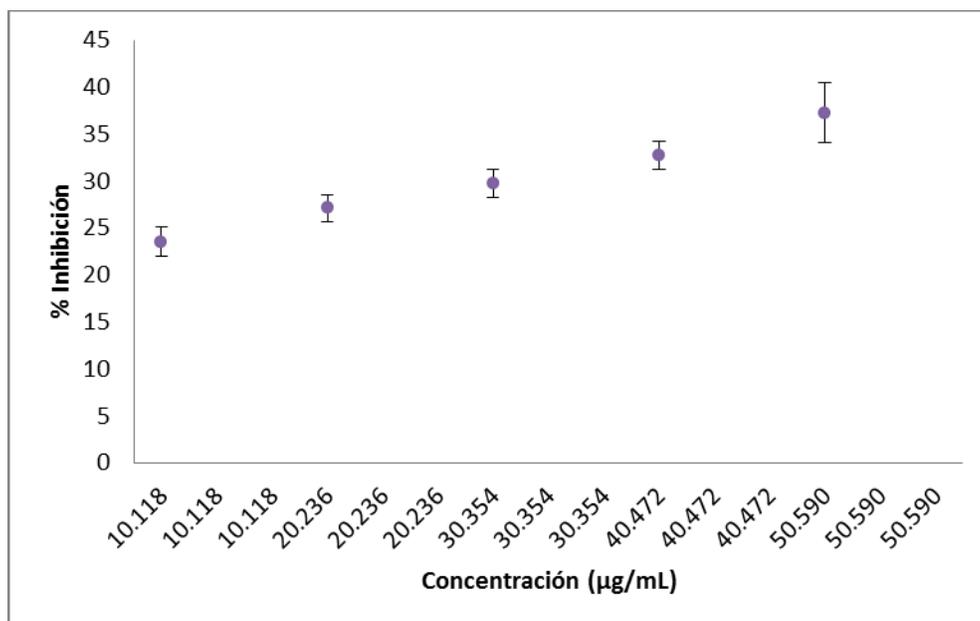


Hidrosol de Manzanilla, $y = 0,0048x + 21,022$, $R^2 = 0,9975$

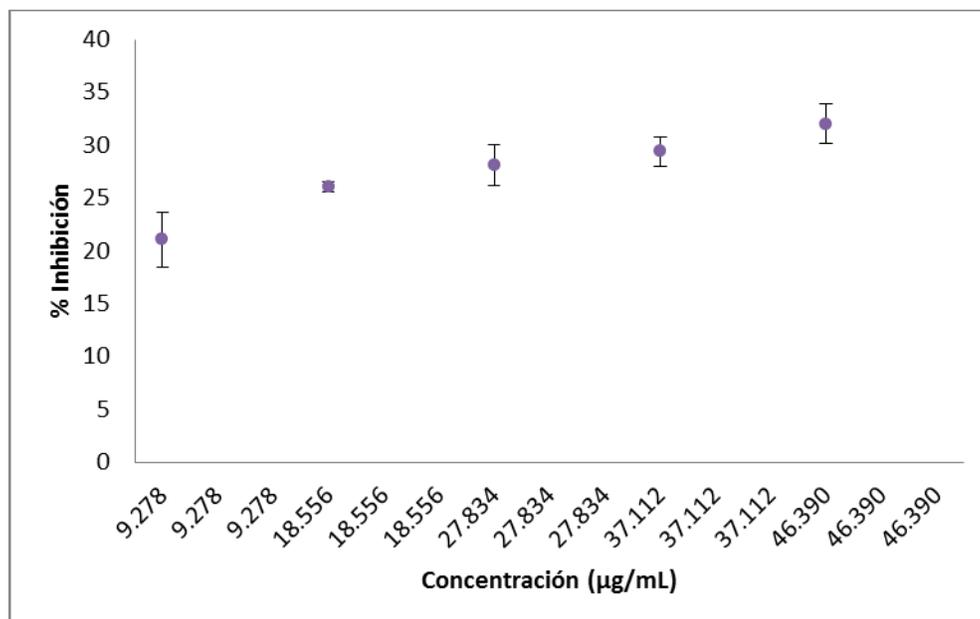


Aceite esencial de Manzanilla, $y = 0,002x + 18,984$, $R^2 = 0,998$

ANEXO E. (Continuación)

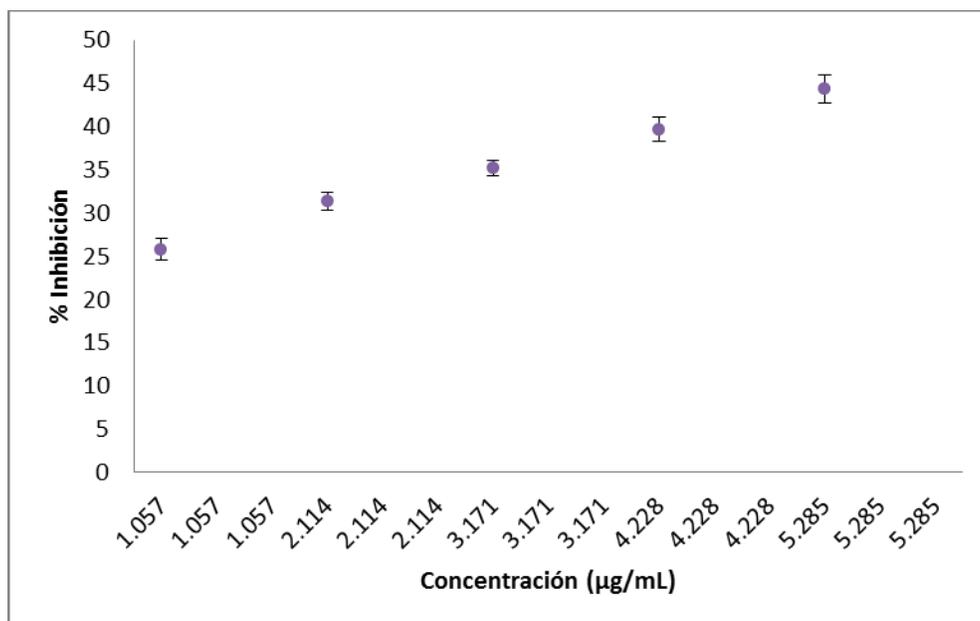


Aceite esencial de Altamisa, $y = 0,0003x + 20,161$, $R^2 = 0,991$

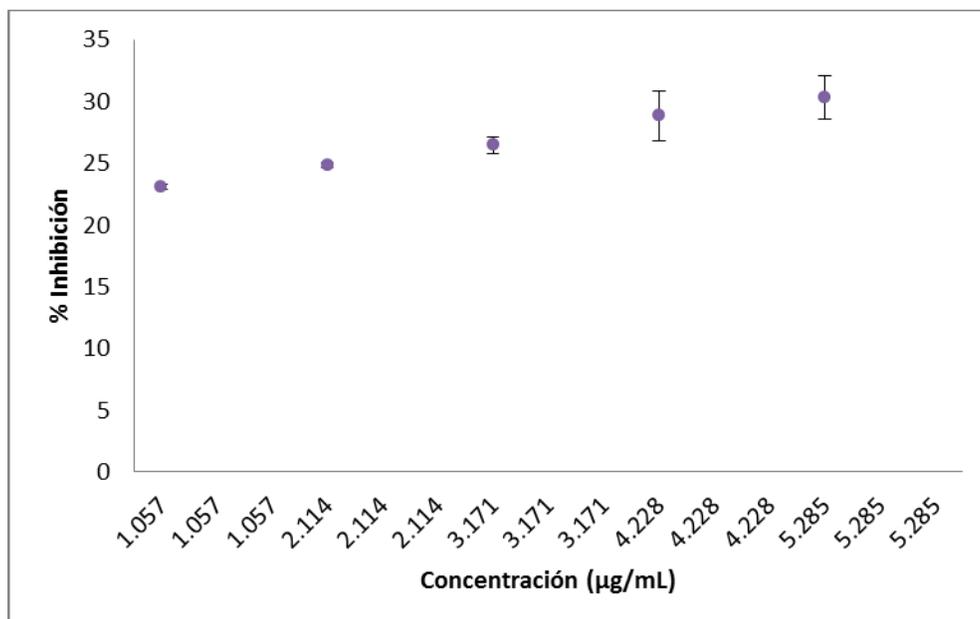


Hidrosol de Altamisa, $y = 0,0002x + 24,1$, $R^2 = 0,9848$

ANEXO E. (Continuación)

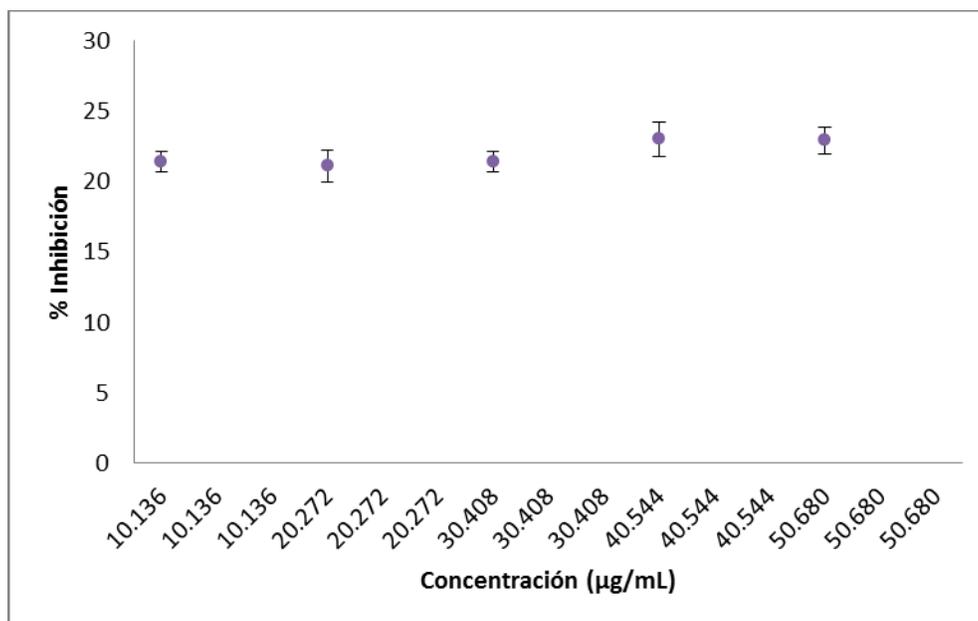


Aceite esencial de Milenrama, $y = 0,0043x + 21,602$, $R^2 = 0,9976$

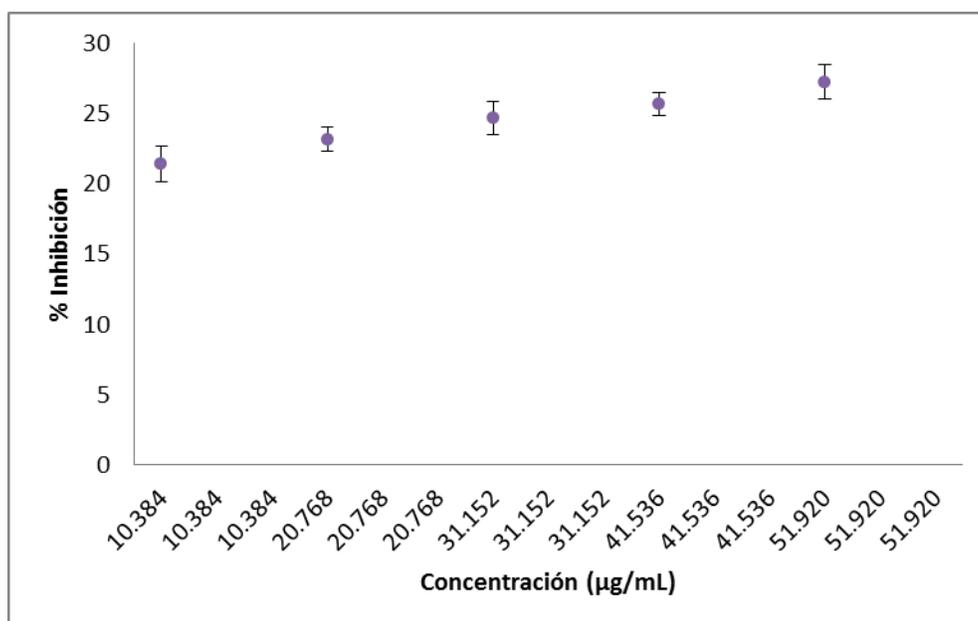


Hidrosol de Milenrama, $y = 0,0017x + 21,185$, $R^2 = 0,9958$

ANEXO E. (Continuación)

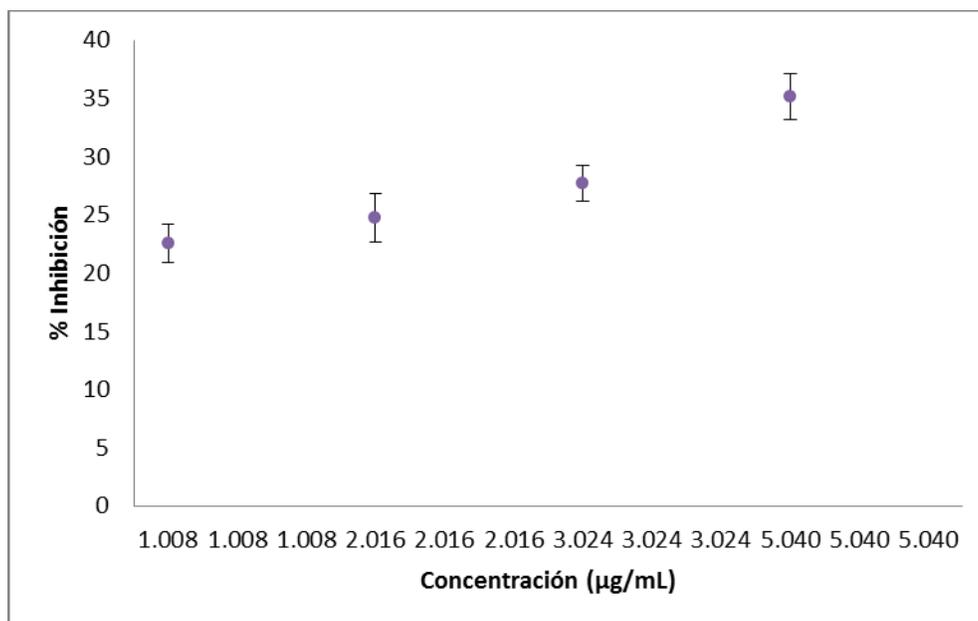


Hidrosol de Ajo, $y = 7E-05x + 19,585$, $R^2 = 0,8274$

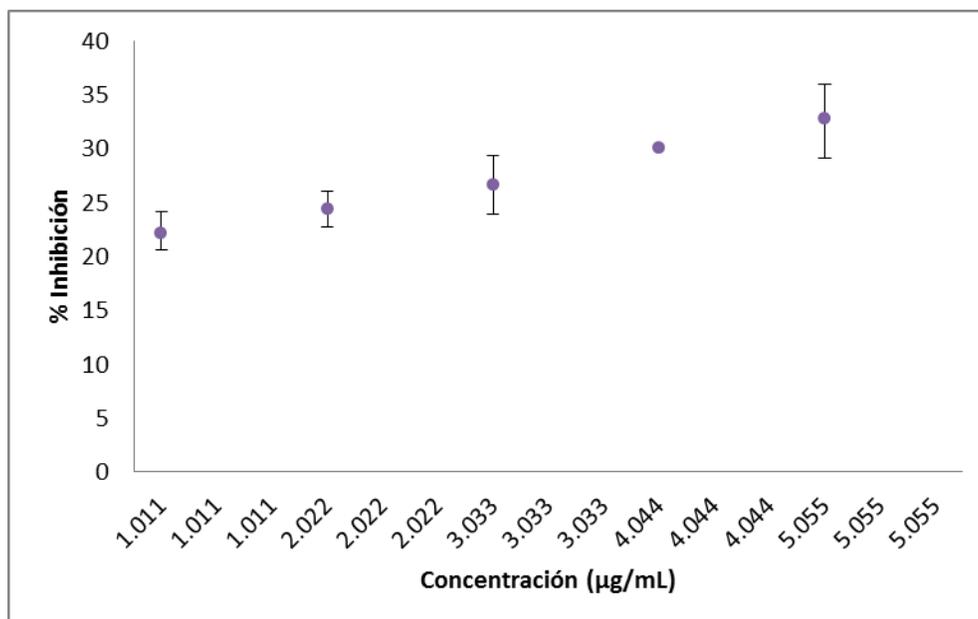


Hidrosol de Cola de Caballo, $y = 0,0001x + 20,111$, $R^2 = 0,9926$

ANEXO E. (Continuación)

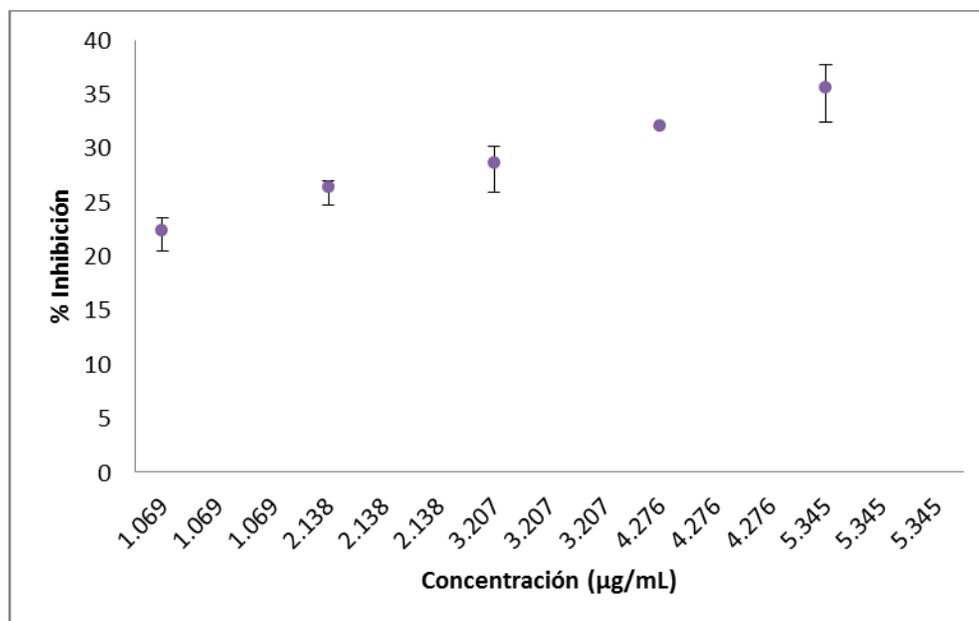


Aceite esencial de Ají, $y = 0,0032x + 18,763$, $R^2 = 0,9886$



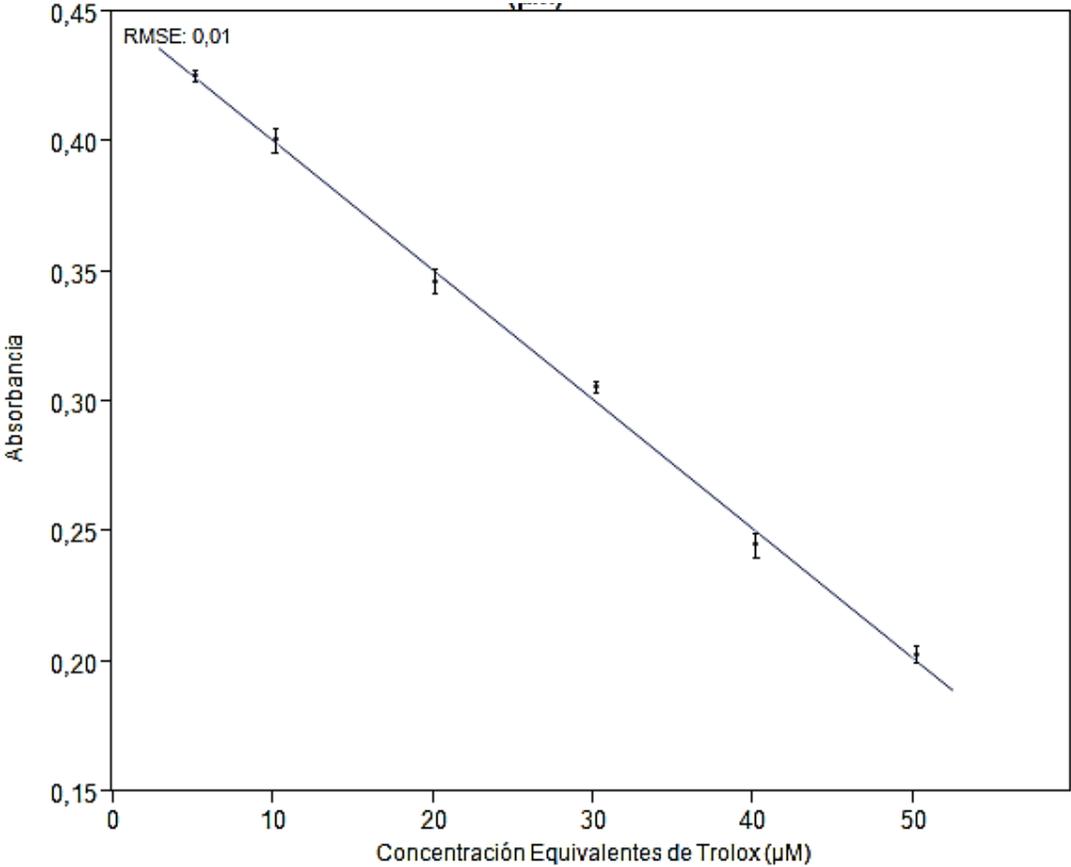
Aceite esencial de Cola de Caballo, $y = 0,0027x + 19,113$, $R^2 = 0,9921$

ANEXO E. (Continuación)

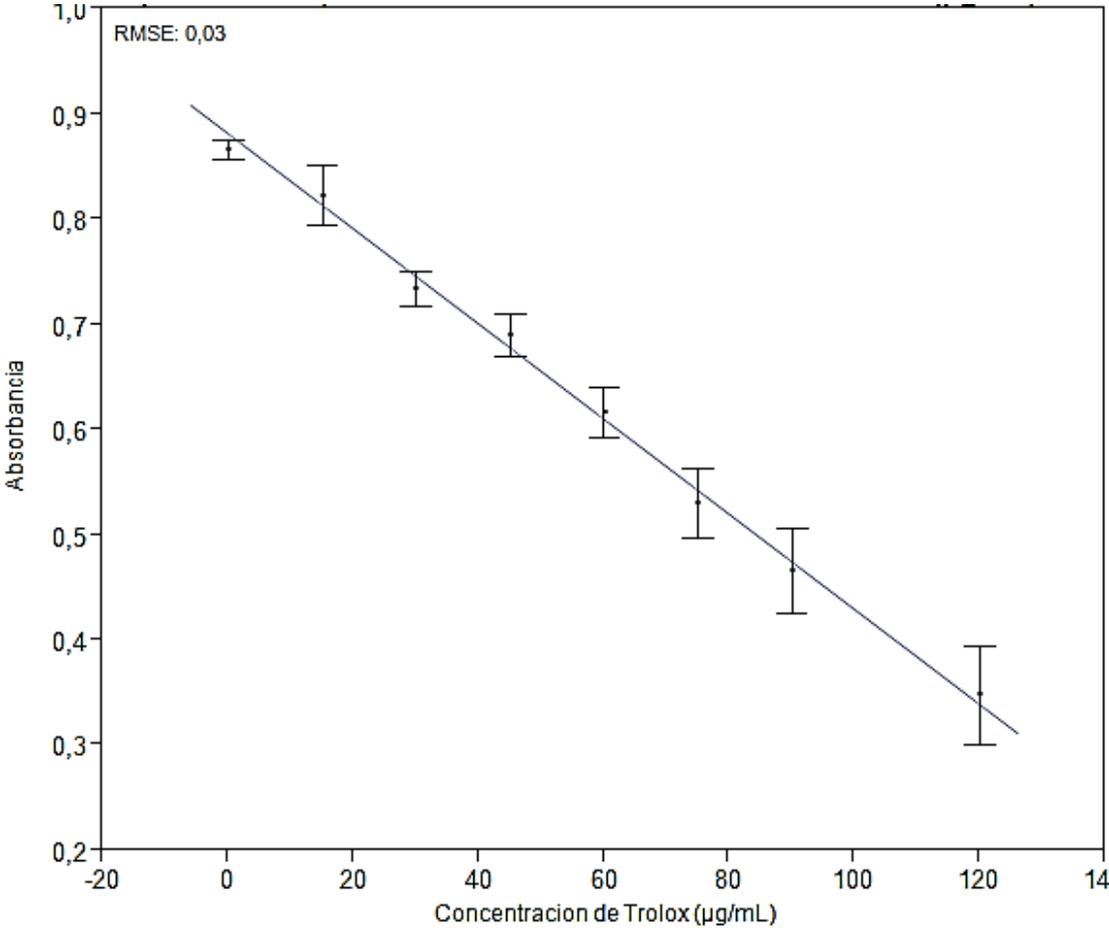


Aceite esencial de cebolla roja, $y = 0,003x + 19,379$, $R^2 = 0,9939$

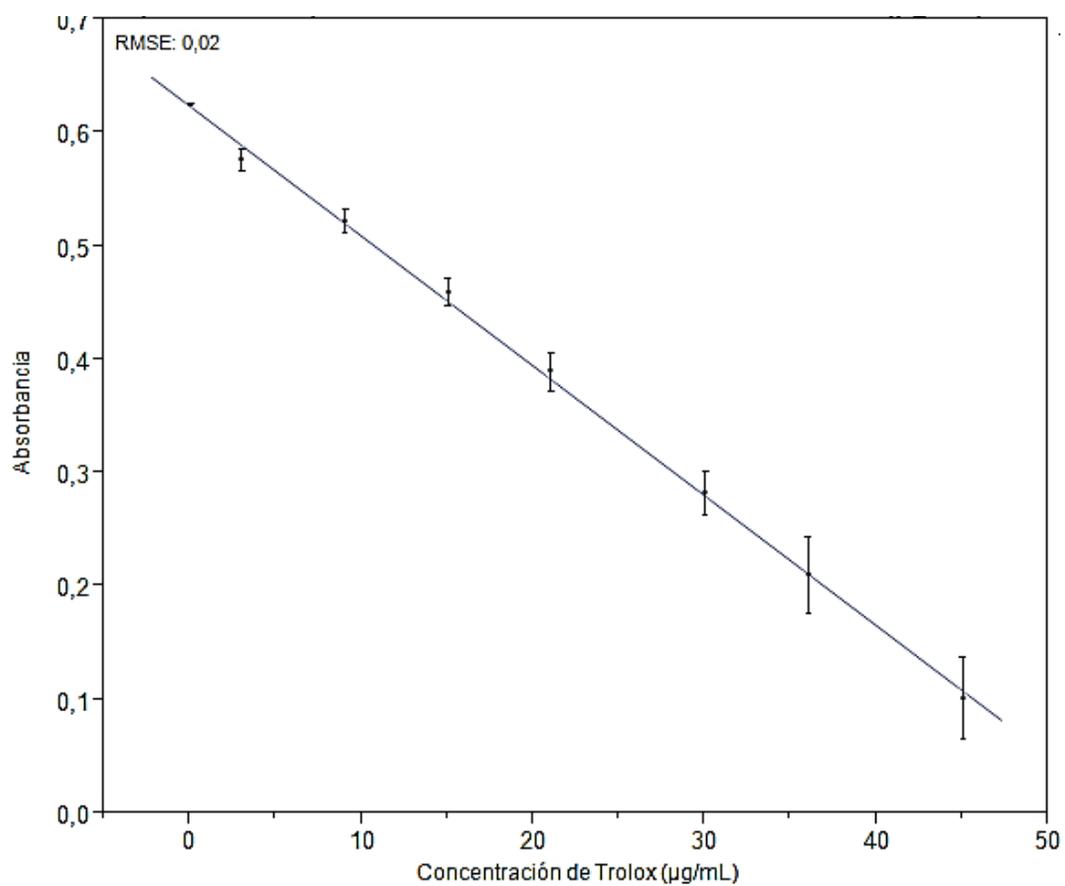
ANEXO F. Curva de calibración para determinar ABTS (Macro-método)



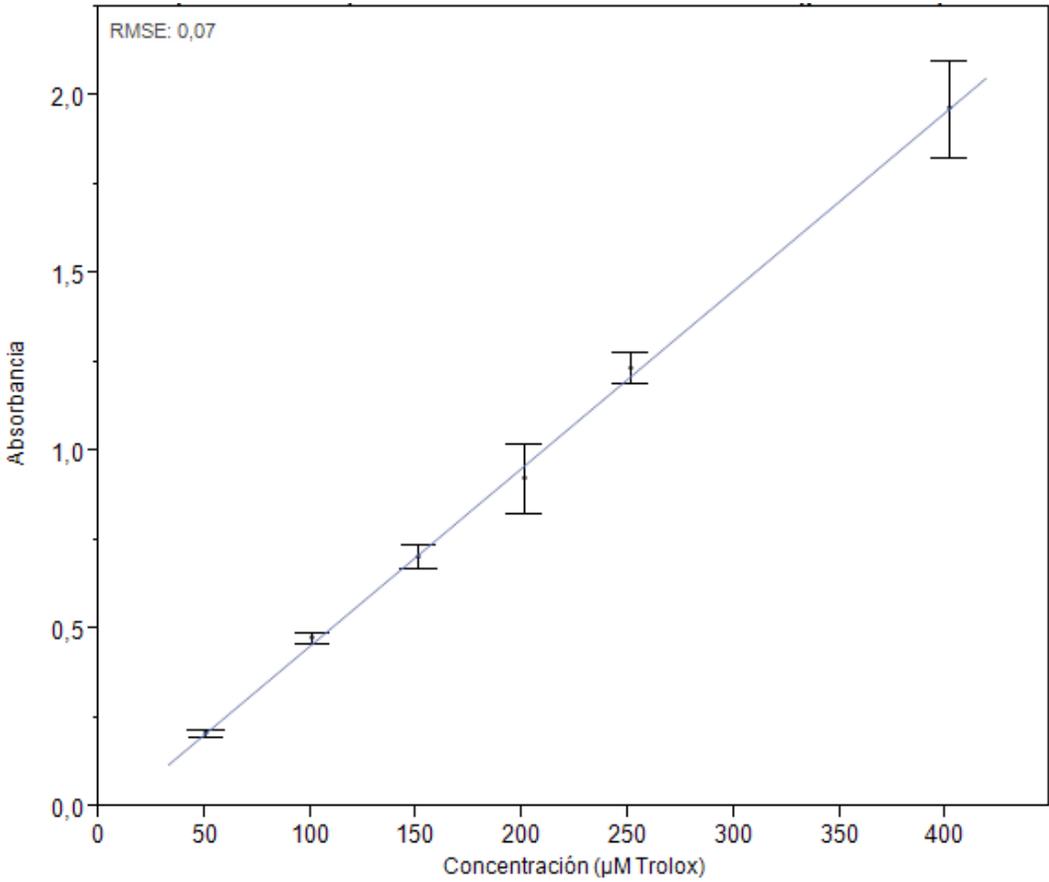
ANEXO G. Curva de calibración para determinar DPPH (Micro-método)



ANEXO H. Curva de calibración para determinar ABTS (Micro-método)



ANEXO I. Curva de calibración para determinar FRAP (Micro-método)



**ANEXO J. Resultados de actividad fungicida de extractos de especies
vegetales**

Actividad fungicida contra P. infestans

Nombre Común	Conc (µg/mL)	Hidrosol		Aceite esencial	
Ajenjo	1	26,31	± 11,138	6,39	± 6,393
	2	35,93	± 2,749	-0,79	± -0,789
	3	31,65	± 2,053	-5,84	± -5,841
	4	34,54	± 6,528	37,33	± 37,332
	5	27,85	± 9,091	-33,62	± -33,623
Ají	1	38,96	± 24,714	-8,13	± 51,059
	2	35,50	± 8,168	11,68	± 25,999
	3	-1,59	± 26,943	32,83	± 15,307
	4	33,91	± 4,044	13,65	± 32,594
	5	36,94	± 3,756	17,28	± 19,710
Ajo	1	59,98	± 33,752	4,03	± 24,312
	2	30,83	± 7,585	6,47	± 29,309
	3	10,39	± 31,859	27,47	± 5,102
	4	23,67	± 18,272	-6,31	± 40,334
	5	41,99	± 5,448	14,36	± 22,924
Altamisa	1	39,11	± 4,113	-12,11	± 7,003
	2	39,49	± 3,896	28,76	± 14,767
	3	21,79	± 32,129	16,82	± 15,457
	4	32,42	± 21,838	-2,02	± 8,572
	5	26,26	± 16,505	19,01	± 16,082
Caléndula	1	51,52	± 22,496	14,84	± 13,542
	2	66,76	± 5,340	16,73	± 12,482
	3	68,59	± 13,421	-4,66	± 37,642
	4	62,39	± 25,290	29,28	± 5,337
	5	72,39	± 7,896	35,36	± 5,787
Cebolla roja	1	20,59	± 27,603	18,23	± 9,654
	2	41,90	± 3,708	22,81	± 20,536
	3	52,72	± 9,668	-21,31	± 12,833
	4	50,46	± 12,643	-19,65	± 64,754
	5	31,46	± 4,763	-15,86	± 10,327
Cola de caballo	1	36,41	± 5,066	12,94	± 26,681
	2	7,94	± 17,155	25,81	± 15,077
	3	14,43	± 11,511	13,34	± 27,093
	4	3,56	± 34,659	12,87	± 12,650
	5	20,06	± 7,511	2,53	± 14,494
	2	47,52	± 0,961	3,24	± 21,570

ANEXO J. (Continuación)

Actividad fungicida contra P. infestans

Nombre Común	Conc (µg/mL)	Hidrosol	Aceite esencial
Hierbabuena	1	43,00 ± 8,727	4,89 ± 18,373
	2	41,32 ± 1,660	13,10 ± 16,923
	3	44,16 ± 9,222	18,31 ± 18,257
	4	47,67 ± 18,510	13,26 ± 7,571
	5	62,05 ± 2,218	23,76 ± 10,529
Higuerilla	1	35,50 ± 3,247	-10,60 ± 18,407
	2	25,88 ± 2,166	-19,18 ± 28,347
	3	31,94 ± 8,926	20,94 ± 3,821
	4	9,67 ± 8,205	-8,16 ± 36,650
	5	-6,40 ± 23,793	16,32 ± 21,913
Hinojo	1	39,68 ± 4,934	23,36 ± 25,349
	2	47,43 ± 6,061	7,02 ± 15,618
	3	50,36 ± 16,458	-14,29 ± 46,732
	4	47,52 ± 15,207	8,76 ± 12,215
	5	20,20 ± 39,488	3,95 ± 23,335
Manzanilla	1	28,38 ± 6,661	21,36 ± 15,198
	2	35,74 ± 4,403	18,84 ± 3,280
	3	36,22 ± 3,192	8,75 ± 21,983
	4	11,54 ± 39,543	-3,70 ± 1,717
	5	12,27 ± 23,953	21,95 ± 5,755
Menta poleo	1	42,47 ± 7,724	14,84 ± 2,967
	2	47,52 ± 0,961	3,24 ± 21,570
	3	44,54 ± 1,583	43,80 ± 23,395
	4	41,41 ± 5,374	11,92 ± 10,038
	5	29,34 ± 14,841	23,76 ± 11,297
Milenrama	1	27,80 ± 19,219	36,42 ± 5,048
	2	12,17 ± 41,865	11,27 ± 19,270
	3	25,30 ± 31,659	17,07 ± 5,065
	4	37,95 ± 15,027	13,46 ± 20,761
	5	47,28 ± 3,546	13,71 ± 11,787
Ortiga	1	49,40 ± 43,304	21,23 ± 4,108
	2	24,00 ± 1,093	21,70 ± 0,710
	3	20,35 ± 2,625	-4,42 ± 29,805
	4	25,25 ± 0,803	38,91 ± 10,338
	5	38,86 ± 2,113	-13,97 ± 57,839

ANEXO J. (Continuación)

Actividad fungicida contra P. infestans

Nombre Común	Conc (µg/mL)	Hidrosol		Aceite esencial	
Romero	1	50,36	± 4,223	-10,77	± 34,752
	2	19,72	± 43,624	-29,69	± 60,569
	3	40,84	± 4,339	-31,03	± 25,232
	4	33,33	± 4,962	-1,60	± 10,885
	5	33,96	± 6,566	4,29	± 3,694
Ruda	1	36,27	± 9,463	21,78	± 8,578
	2	57,67	± 34,305	-5,76	± 23,499
	3	37,76	± 5,167	11,37	± 1,777
	4	39,11	± 19,572	13,65	± 0,854
	5	37,42	± 23,202	16,34	± 5,448
Tomillo	1	34,10	± 6,207	38,77	± 10,528
	2	31,31	± 11,974	32,63	± 5,111
	3	-	± 63,374	57,53	± 36,980
	4	30,74			
	5	52,04	± 0,382	45,92	± 17,952
		45,31	± 6,975	76,79	± 31,178

Actividad fungicida contra F. oxysporum

Nombre Común	Conc (µg/mL)	Hidrosol		Aceite esencial	
Ajenjo	1	35,91	± 21,707	12,38	± 11,213
	2	6,42	± 7,826	3,01	± 11,773
	3	37,21	± 24,409	12,84	± 3,409
	4	8,43	± 22,860	13,95	± 3,975
	5	20,29	± 12,555	17,55	± 3,442
Ají	1	16,21	± 1,608	42,44	± 47,389
	2	16,10	± 7,832	5,83	± 9,263
	3	-5,33	± 41,291	31,70	± 59,823
	4	11,15	± 2,159	-19,32	± 43,293
	5	16,76	± 9,285	-6,81	± 17,739
Ajo	1	20,18	± 3,208	6,16	± 5,699
	2	12,13	± 1,336	20,10	± 5,128
	3	21,16	± 8,355	15,19	± 6,291
	4	3,05	± 9,006	25,15	± 15,032
	5	-5,06	± 22,048	17,16	± 3,266

ANEXO J. (Continuación)

Actividad fungicida contra F. oxysporum

Nombre Común	Conc (µg/mL)	Hidrosol		Aceite esencial	
Altamisa	1	43,31	± 21,248	26,98	± 7,002
	2	13,22	± 20,770	16,76	± 0,300
	3	15,34	± 16,925	15,06	± 1,935
	4	31,83	± 21,287	24,62	± 7,610
	5	28,62	± 14,654	31,76	± 1,679
Caléndula	1	62,51	± 8,515	7,33	± 10,848
	2	55,22	± 4,948	5,37	± 2,214
	3	38,41	± 6,553	2,23	± 5,476
	4	52,67	± 9,060	-7,73	± 2,344
	5	48,31	± 5,355	0,52	± 7,101
Cebolla roja	1	16,43	± 3,204	4,85	± 9,209
	2	15,67	± 7,700	-5,89	± 19,153
	3	18,28	± 6,447	6,81	± 6,952
	4	2,18	± 39,039	11,33	± 3,340
	5	13,55	± 15,830	5,50	± 9,249
Cola de caballo	1	38,79	± 13,347	28,95	± 17,378
	2	15,89	± 8,502	41,00	± 10,051
	3	10,50	± 7,352	32,87	± 9,485
	4	4,95	± 0,490	25,34	± 22,760
	5	16,92	± 4,347	40,86	± 7,182
Hierbabuena	1	11,59	± 11,162	40,80	± 5,119
	2	9,09	± 8,976	61,62	± 4,375
	3	5,77	± 8,302	77,28	± 5,613
	4	7,02	± 8,466	87,43	± 7,492
	5	7,62	± 4,408	74,26	± 11,876
Higuerilla	1	0,33	± 6,850	20,89	± 6,303
	2	7,07	± 25,020	30,26	± 8,752
	3	-14,42	± 63,273	47,61	± 34,609
	4	10,01	± 42,737	48,46	± 25,257
	5	12,24	± 53,705	19,71	± 60,420
Hinojo	1	13,55	± 1,790	33,01	± 13,205
	2	5,50	± 6,639	26,98	± 6,132
	3	7,13	± 14,383	10,15	± 8,045
	4	2,23	± 2,310	9,17	± 17,452
	5	-6,09	± 25,071	26,46	± 5,319

ANEXO J. (Continuación)

Actividad fungicida contra F. oxysporum

Nombre Común	Conc (µg/mL)	Hidrosol		Aceite esencial	
Manzanilla	1	11,86	± 1,177	51,34	± 30,488
	2	36,94	± 22,394	53,11	± 25,696
	3	11,48	± 12,236	46,63	± 23,714
	4	8,60	± 47,859	48,79	± 7,375
	5	26,50	± 19,468	72,17	± 0,494
Menta poleo	1	29,27	± 16,020	68,04	± 10,477
	2	38,25	± 6,684	74,26	± 8,630
	3	14,20	± 3,723	76,88	± 11,750
	4	31,72	± 14,119	92,80	± 9,044
	5	16,32	± 4,239	88,80	± 8,980
Milenrama	1	22,52	± 16,472	93,06	± 3,542
	2	26,44	± 28,008	68,63	± 7,302
	3	19,97	± 17,416	54,49	± 11,433
	4	35,31	± 25,794	54,03	± 18,052
	5	39,01	± 15,305	67,13	± 11,112
Ortiga	1	19,97	± 14,405	21,48	± 9,923
	2	0,44	± 9,123	17,94	± 3,924
	3	47,50	± 14,100	17,35	± 4,645
	4	51,80	± 10,865	29,14	± 17,092
	5	-11,21	± 24,919	17,55	± 4,389
Romero	1	38,41	± 6,887	24,62	± 5,018
	2	42,76	± 17,624	17,29	± 4,346
	3	38,96	± 22,733	26,85	± 2,414
	4	22,74	± 26,811	29,80	± 2,894
	5	45,43	± 10,553	40,01	± 23,679
Ruda	1	4,73	± 4,859	54,94	± 9,266
	2	-18,01	± 40,077	46,50	± 4,995
	3	7,62	± 6,887	50,88	± 15,735
	4	19,80	± 0,326	88,15	± 10,382
	5	8,76	± 2,174	88,67	± 0,982
Tomillo	1	9,74	± 7,113	94,89	± 4,782
	2	20,35	± 21,406	98,56	± 2,599
	3	16,38	± 19,815	94,56	± 0,632
	4	33,73	± 20,089	96,46	± 1,394
	5	34,71	± 9,232	91,16	± 1,783

ANEXO J. (Continuación)

Actividad fungicida contra R. solani

Nombre Común	Conc (µg/mL)	Hidrosol		Aceite esencial	
Ajenjo	1	51,52	± 32,834	11,50	± 48,026
	2	6,74	± 55,060	16,18	± 17,751
	3	-38,32	± 59,684	66,79	± 28,236
	4	-16,75	± 96,124	38,08	± 31,749
	5	39,96	± 29,920	48,11	± 28,202
Ají	1	25,40	± 54,998	11,68	± 12,873
	2	32,41	± 33,115	31,57	± 9,768
	3	22,49	± 7,785	24,76	± 57,300
	4	41,47	± 21,502	32,97	± 9,881
	5	2,78	± 58,217	30,78	± 5,736
Ajo	1	80,43	± 16,478	42,52	± 27,781
	2	-13,79	± 68,053	17,70	± 73,598
	3	9,65	± 73,608	80,78	± 15,416
	4	3,50	± 21,133	52,31	± 23,814
	5	28,95	± 31,136	58,82	± 13,917
Altamisa	1	61,45	± 20,624	55,23	± 12,556
	2	42,33	± 34,563	26,64	± 22,481
	3	41,88	± 35,716	50,30	± 14,173
	4	48,11	± 30,219	47,20	± 8,798
	5	26,63	± 72,663	49,39	± 8,676
Caléndula	1	71,37	± 3,892	17,82	± 24,198
	2	74,47	± 4,617	21,47	± 47,815
	3	69,96	± 1,575	38,87	± 21,058
	4	79,93	± 10,856	57,91	± 23,349
	5	74,15	± 1,025	38,87	± 5,214
Cebolla roja	1	8,65	± 49,937	-9,00	± 88,820
	2	-19,53	± 37,527	38,08	± 28,558
	3	-4,19	± 21,999	26,46	± 0,587
	4	-13,97	± 67,604	14,17	± 79,720
	5	41,83	± 34,425	34,25	± 30,489
Cola de caballo	1	78,11	± 3,980	68,61	± 12,288
	2	68,05	± 21,947	73,72	± 17,603
	3	37,87	± 12,642	72,45	± 18,942
	4	66,82	± 18,893	76,58	± 10,159
	5	69,14	± 14,733	81,93	± 11,958

ANEXO J. (Continuación)

Actividad fungicida contra R. solani

Nombre Común	Conc (µg/mL)	Hidrosol		Aceite esencial	
Hierbabuena	1	18,62	± 32,078	81,51	± 23,549
	2	-3,14	± 35,509	97,08	± 2,887
	3	-2,14	± 37,857	98,84	± 0,795
	4	-6,24	± 42,840	100,00	± 0,527
	5	34,55	± 24,549	97,38	± 1,741
Higuerilla	1	45,84	± 31,439	53,22	± 15,867
	2	56,76	± 21,137	65,51	± 1,425
	3	17,98	± 28,637	50,36	± 29,503
	4	32,13	± 12,846	50,36	± 65,761
	5	-11,83	± 5,254	64,23	± 27,027
Hinojo	1	17,52	± 81,784	10,04	± 52,525
	2	35,55	± 38,889	34,06	± 10,923
	3	11,29	± 46,594	19,10	± 10,276
	4	17,30	± 76,387	16,12	± 50,381
	5	-4,32	± 76,617	75,91	± 21,332
Manzanilla	1	67,36	± 21,645	55,41	± 33,617
	2	53,66	± 24,771	34,67	± 37,246
	3	16,02	± 2,749	42,64	± 49,133
	4	30,18	± 56,275	58,88	± 13,765
	5	31,00	± 38,686	72,93	± 23,178
Menta poleo	1	42,19	± 48,330	93,07	± 8,914
	2	18,80	± 36,473	98,42	± 1,475
	3	45,33	± 15,342	99,21	± 0,000
	4	45,70	± 8,331	94,16	± 4,567
	5	-22,58	± 23,926	98,78	± 0,105
Milenrama	1	69,96	± 44,202	89,72	± 7,745
	2	66,59	± 46,444	85,77	± 10,532
	3	66,91	± 33,167	63,87	± 9,211
	4	69,37	± 23,491	47,69	± 61,555
	5	79,20	± 5,740	65,94	± 29,520
Ortiga	1	6,10	± 126,617	68,92	± 30,727
	2	40,96	± 72,340	40,21	± 37,845
	3	22,85	± 81,949	72,32	± 16,379
	4	71,78	± 2,677	67,82	± 20,611
	5	-24,90	± 60,269	56,39	± 34,088

ANEXO J. (Continuación)

Actividad fungicida contra R. solani

Nombre Común	Conc (µg/mL)	Hidrosol	Aceite esencial
Romero	1	24,40 ± 57,588	27,19 ± 62,243
	2	44,52 ± 35,562	35,34 ± 44,559
	3	4,55 ± 48,761	45,80 ± 28,193
	4	46,70 ± 30,173	53,22 ± 22,449
	5	68,00 ± 15,735	66,06 ± 18,039
Ruda	1	-0,73 ± 31,420	92,21 ± 9,746
	2	37,14 ± 49,825	96,17 ± 3,011
	3	-0,64 ± 34,167	97,81 ± 1,636
	4	3,05 ± 54,806	98,11 ± 1,425
	5	23,53 ± 11,960	99,09 ± 1,005
Tomillo	1	55,94 ± 41,239	99,03 ± 0,105
	2	72,33 ± 6,566	99,82 ± 0,365
	3	-19,39 ± 54,587	99,15 ± 1,295
	4	37,41 ± 96,379	99,88 ± 0,823
	5	49,39 ± 58,413	96,17 ± 2,386

ANEXO K. Resultados de actividad fungicida de extractos de especies vegetales

<i>Actividad fungicida contra P. infestans</i>				
Nombre Común	Conc (µg/mL)	Hidrosol	Aceite esencial	
Ajenjo	10	26,31 ± 11,138	6,39 ± 25,474	
	20	35,93 ± 2,749	-0,79 ± 7,363	
	30	31,65 ± 2,053	-5,84 ± 13,520	
	40	34,54 ± 6,528	37,33 ± 9,409	
	50	27,85 ± 9,091	-33,62 ± 53,529	
Ají	10	38,96 ± 24,714	-8,13 ± 51,059	
	20	35,50 ± 8,168	11,68 ± 25,999	
	30	-1,59 ± 26,943	32,83 ± 15,307	
	40	33,91 ± 4,044	13,65 ± 32,594	
	50	36,94 ± 3,756	17,28 ± 19,710	
Ajo	10	59,98 ± 33,752	4,03 ± 24,312	
	20	30,83 ± 7,585	6,47 ± 29,309	
	30	10,39 ± 31,859	27,47 ± 5,102	
	40	23,67 ± 18,272	-6,31 ± 40,334	
	50	41,99 ± 5,448	14,36 ± 22,924	
Altamisa	10	39,11 ± 4,113	-5,21 ± 6,572	
	20	39,49 ± 3,896	33,15 ± 13,858	
	30	21,79 ± 32,129	21,94 ± 14,506	
	40	32,42 ± 21,838	4,26 ± 8,045	
	50	26,26 ± 16,505	23,99 ± 15,092	
Caléndula	10	51,52 ± 22,496	14,84 ± 13,542	
	20	66,76 ± 5,340	16,73 ± 12,482	
	30	68,59 ± 13,421	-4,66 ± 37,642	
	40	62,39 ± 25,290	29,28 ± 5,337	
	50	72,39 ± 7,896	35,36 ± 5,787	
Cebolla roja	10	20,59 ± 27,603	18,23 ± 9,654	
	20	41,90 ± 3,708	22,81 ± 20,536	
	30	52,72 ± 9,668	-21,31 ± 12,833	
	40	50,46 ± 12,643	-19,65 ± 64,754	
	50	31,46 ± 4,763	-15,86 ± 10,327	
Cola de caballo	10	36,41 ± 5,066	12,94 ± 26,681	
	20	7,94 ± 17,155	25,81 ± 15,077	
	30	14,43 ± 11,511	13,34 ± 27,093	
	40	3,56 ± 34,659	12,87 ± 12,650	
	50	20,06 ± 7,511	2,53 ± 14,494	

ANEXO K. (Continuación)

Actividad fungicida contra P. infestans

Nombre Común	Conc (µg/mL)	Hidrosol	Aceite esencial
Hierbabuena	10	43,00 ± 8,727	4,89 ± 18,373
	20	41,32 ± 1,660	13,10 ± 16,923
	30	44,16 ± 9,222	18,31 ± 18,257
	40	47,67 ± 18,510	13,26 ± 7,571
	50	62,05 ± 2,218	23,76 ± 10,529
Higuerilla	10	35,50 ± 3,247	-3,79 ± 17,274
	20	25,88 ± 2,166	-11,84 ± 26,602
	30	31,94 ± 8,926	25,81 ± 3,586
	40	9,67 ± 8,205	-1,50 ± 34,393
	50	-6,40 ± 23,793	21,47 ± 20,564
Hinojo	10	39,68 ± 4,934	23,36 ± 25,349
	20	47,43 ± 6,061	7,02 ± 15,618
	30	50,36 ± 16,458	-14,29 ± 46,732
	40	47,52 ± 15,207	8,76 ± 12,215
	50	20,20 ± 39,488	3,95 ± 23,335
Manzanilla	10	28,38 ± 6,661	26,20 ± 14,262
	20	35,74 ± 4,403	23,84 ± 3,078
	30	36,22 ± 3,192	14,36 ± 20,630
	40	11,54 ± 39,543	2,68 ± 1,612
	50	12,27 ± 23,953	26,76 ± 5,401
Menta poleo	10	42,47 ± 7,724	14,84 ± 2,967
	20	47,52 ± 0,961	3,24 ± 21,570
	30	44,54 ± 1,583	43,80 ± 23,395
	40	41,41 ± 5,374	11,92 ± 10,038
	50	29,34 ± 14,841	23,76 ± 11,297
Milenrama	10	27,80 ± 19,219	40,33 ± 4,738
	20	12,17 ± 41,865	16,73 ± 18,084
	30	25,30 ± 31,659	22,18 ± 4,753
	40	37,95 ± 15,027	18,78 ± 19,483
	50	47,28 ± 3,546	19,02 ± 11,061
Ortiga	10	49,40 ± 43,304	21,23 ± 4,108
	20	24,00 ± 1,093	21,70 ± 0,710
	30	20,35 ± 2,625	-4,42 ± 29,805
	40	25,25 ± 0,803	38,91 ± 10,338
	50	38,86 ± 2,113	-13,97 ± 57,839

ANEXO K. (Continuación)

Actividad fungicida contra P. infestans

Nombre Común	Conc (µg/mL)	Hidrosol		Aceite esencial	
Romero	10	50,36	± 4,223	-3,95	± 32,612
	20	19,72	± 43,624	-21,70	± 56,840
	30	40,84	± 4,339	-22,97	± 23,678
	40	33,33	± 4,962	4,66	± 10,215
	50	33,96	± 6,566	10,18	± 3,466
Ruda	10	36,27	± 9,463	21,78	± 8,578
	20	57,67	± 34,305	-5,76	± 23,499
	30	37,76	± 5,167	11,37	± 1,777
	40	39,11	± 19,572	13,65	± 0,854
	50	37,42	± 23,202	16,34	± 5,448
Tomillo	10	34,10	± 6,207	42,54	± 9,880
	20	31,31	± 11,974	36,78	± 4,796
	30	-30,74	± 63,374	60,14	± 34,704
	40	52,04	± 0,382	49,25	± 16,847
	50	45,31	± 6,975	78,22	± 29,259

Actividad fungicida contra F. oxysporum

Nombre Común	Conc (µg/mL)	Hidrosol		Aceite esencial	
Ajenjo	10	35,91	± 21,707	12,38	± 11,213
	20	6,42	± 7,826	3,01	± 11,773
	30	37,21	± 24,409	12,84	± 3,409
	40	8,43	± 22,860	13,95	± 3,975
	50	20,29	± 12,555	17,55	± 3,442
Ají	10	16,21	± 1,608	42,44	± 47,389
	20	16,10	± 7,832	5,83	± 9,263
	30	-5,33	± 41,291	31,70	± 59,823
	40	11,15	± 2,159	-19,32	± 43,293
	50	16,76	± 9,285	-6,81	± 17,739
Ajo	10	20,18	± 3,208	6,16	± 5,699
	20	12,13	± 1,336	20,10	± 5,128
	30	21,16	± 8,355	15,19	± 6,291
	40	3,05	± 9,006	25,15	± 15,032
	50	-5,06	± 22,048	17,16	± 3,266

ANEXO K. (Continuación)

Actividad fungicida contra F. oxysporum

Nombre Común	Conc (µg/mL)	Hidrosol		Aceite esencial	
Altamisa	10	43,31	± 21,248	26,98	± 7,002
	20	13,22	± 20,770	16,76	± 0,300
	30	15,34	± 16,925	15,06	± 1,935
	40	31,83	± 21,287	24,62	± 7,610
	50	28,62	± 14,654	31,76	± 1,679
Caléndula	10	62,51	± 8,515	7,33	± 10,848
	20	55,22	± 4,948	5,37	± 2,214
	30	38,41	± 6,553	2,23	± 5,476
	40	52,67	± 9,060	-7,73	± 2,344
	50	48,31	± 5,355	0,52	± 7,101
Cebolla roja	10	16,43	± 3,204	4,85	± 9,209
	20	15,67	± 7,700	-5,89	± 19,153
	30	18,28	± 6,447	6,81	± 6,952
	40	2,18	± 39,039	11,33	± 3,340
	50	13,55	± 15,830	5,50	± 9,249
Cola de caballo	10	38,79	± 13,347	28,95	± 17,378
	20	15,89	± 8,502	41,00	± 10,051
	30	10,50	± 7,352	32,87	± 9,485
	40	4,95	± 0,490	25,34	± 22,760
	50	16,92	± 4,347	40,86	± 7,182
Hierbabuena	10	11,59	± 11,162	40,80	± 5,119
	20	9,09	± 8,976	61,62	± 4,375
	30	5,77	± 8,302	77,28	± 5,613
	40	7,02	± 8,466	87,43	± 7,492
	50	7,62	± 4,408	74,26	± 11,876
Higuerilla	10	0,33	± 6,850	20,89	± 6,303
	20	7,07	± 25,020	30,26	± 8,752
	30	-14,42	± 63,273	47,61	± 34,609
	40	10,01	± 42,737	48,46	± 25,257
	50	12,24	± 53,705	19,71	± 60,420
Hinojo	10	13,55	± 1,790	33,01	± 13,205
	20	5,50	± 6,639	26,98	± 6,132
	30	7,13	± 14,383	10,15	± 8,045
	40	2,23	± 2,310	9,17	± 17,452
	50	-6,09	± 25,071	26,46	± 5,319

ANEXO K. (Continuación)

Actividad fungicida contra F. oxysporum

Nombre Común	Conc (µg/mL)	Hidrosol		Aceite esencial	
Manzanilla	10	11,86	± 1,177	51,34	± 30,488
	20	36,94	± 22,394	53,11	± 25,696
	30	11,48	± 12,236	46,63	± 23,714
	40	8,60	± 47,859	48,79	± 7,375
	50	26,50	± 19,468	72,17	± 0,494
Menta poleo	10	29,27	± 16,020	68,04	± 10,477
	20	38,25	± 6,684	74,26	± 8,630
	30	14,20	± 3,723	76,88	± 11,750
	40	31,72	± 14,119	92,80	± 9,044
	50	16,32	± 4,239	88,80	± 8,980
Milenrama	10	22,52	± 16,472	93,06	± 3,542
	20	26,44	± 28,008	68,63	± 7,302
	30	19,97	± 17,416	54,49	± 11,433
	40	35,31	± 25,794	54,03	± 18,052
	50	39,01	± 15,305	67,13	± 11,112
Ortiga	10	19,97	± 14,405	21,48	± 9,923
	20	0,44	± 9,123	17,94	± 3,924
	30	47,50	± 14,100	17,35	± 4,645
	40	51,80	± 10,865	29,14	± 17,092
	50	-11,21	± 24,919	17,55	± 4,389
Romero	10	38,41	± 6,887	24,62	± 5,018
	20	42,76	± 17,624	17,29	± 4,346
	30	38,96	± 22,733	26,85	± 2,414
	40	22,74	± 26,811	29,80	± 2,894
	50	45,43	± 10,553	40,01	± 23,679
Ruda	10	4,73	± 4,859	54,94	± 9,266
	20	-18,01	± 40,077	46,50	± 4,995
	30	7,62	± 6,887	50,88	± 15,735
	40	19,80	± 0,326	88,15	± 10,382
	50	8,76	± 2,174	88,67	± 0,982
Tomillo	10	9,74	± 7,113	94,89	± 4,782
	20	20,35	± 21,406	98,56	± 2,599
	30	16,38	± 19,815	94,56	± 0,632
	40	33,73	± 20,089	96,46	± 1,394
	50	34,71	± 9,232	91,16	± 1,783

ANEXO K. (Continuación)

Actividad fungicida contra R. solani

Nombre Común	Conc (µg/mL)	Hidrosol		Aceite esencial	
Ajenjo	10	51,52	± 32,834	11,50	± 48,026
	20	6,74	± 55,060	16,18	± 17,751
	30	-38,32	± 59,684	66,79	± 28,236
	40	-16,75	± 96,124	38,08	± 31,749
	50	39,96	± 29,920	48,11	± 28,202
Ají	10	25,40	± 54,998	11,68	± 12,873
	20	32,41	± 33,115	31,57	± 9,768
	30	22,49	± 7,785	24,76	± 57,300
	40	41,47	± 21,502	32,97	± 9,881
	50	2,78	± 58,217	30,78	± 5,736
Ajo	10	80,43	± 16,478	42,52	± 27,781
	20	-13,79	± 68,053	17,70	± 73,598
	30	9,65	± 73,608	80,78	± 15,416
	40	3,50	± 21,133	52,31	± 23,814
	50	28,95	± 31,136	58,82	± 13,917
Altamisa	10	61,45	± 20,624	55,23	± 12,556
	20	42,33	± 34,563	26,64	± 22,481
	30	41,88	± 35,716	50,30	± 14,173
	40	48,11	± 30,219	47,20	± 8,798
	50	26,63	± 72,663	49,39	± 8,676
Caléndula	10	71,37	± 3,892	17,82	± 24,198
	20	74,47	± 4,617	21,47	± 47,815
	30	69,96	± 1,575	38,87	± 21,058
	40	79,93	± 10,856	57,91	± 23,349
	50	74,15	± 1,025	38,87	± 5,214
Cebolla roja	10	8,65	± 49,937	-9,00	± 88,820
	20	-19,53	± 37,527	38,08	± 28,558
	30	-4,19	± 21,999	26,46	± 0,587
	40	-13,97	± 67,604	14,17	± 79,720
	50	41,83	± 34,425	34,25	± 30,489
Cola de caballo	10	78,11	± 3,980	68,61	± 12,288
	20	68,05	± 21,947	73,72	± 17,603
	30	37,87	± 12,642	72,45	± 18,942
	40	66,82	± 18,893	76,58	± 10,159
	50	69,14	± 14,733	81,93	± 11,958

ANEXO K. (Continuación)

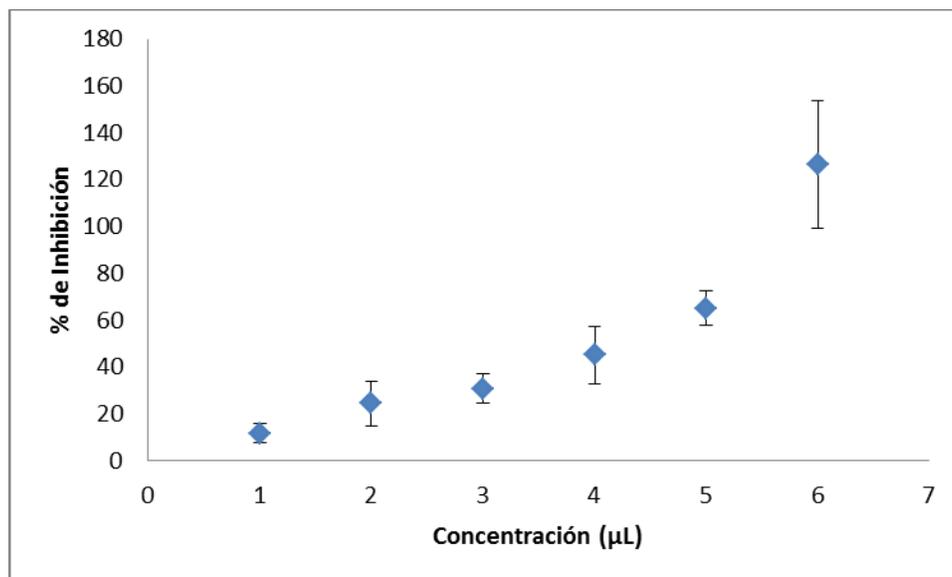
Actividad fungicida contra R. solani

Nombre Común	Conc (µg/mL)	Hidrosol		Aceite esencial	
Hierbabuena	10	18,62 ±	32,078	81,51 ±	23,549
	20	-3,14 ±	35,509	97,08 ±	2,887
	30	-2,14 ±	37,857	98,84 ±	0,795
	40	-6,24 ±	42,840	100,00 ±	0,527
	50	34,55 ±	24,549	97,38 ±	1,741
Higuerilla	10	45,84 ±	31,439	53,22 ±	15,867
	20	56,76 ±	21,137	65,51 ±	1,425
	30	17,98 ±	28,637	50,36 ±	29,503
	40	32,13 ±	12,846	50,36 ±	65,761
	50	-11,83 ±	5,254	64,23 ±	27,027
Hinojo	10	17,52 ±	81,784	10,04 ±	52,525
	20	35,55 ±	38,889	34,06 ±	10,923
	30	11,29 ±	46,594	19,10 ±	10,276
	40	17,30 ±	76,387	16,12 ±	50,381
	50	-4,32 ±	76,617	75,91 ±	21,332
Manzanilla	10	67,36 ±	21,645	55,41 ±	33,617
	20	53,66 ±	24,771	34,67 ±	37,246
	30	16,02 ±	2,749	42,64 ±	49,133
	40	30,18 ±	56,275	58,88 ±	13,765
	50	31,00 ±	38,686	72,93 ±	23,178
Menta poleo	10	42,19 ±	48,330	93,07 ±	8,914
	20	18,80 ±	36,473	98,42 ±	1,475
	30	45,33 ±	15,342	99,21 ±	0,000
	40	45,70 ±	8,331	94,16 ±	4,567
	50	-22,58 ±	23,926	98,78 ±	0,105
Milenrama	10	69,96 ±	44,202	89,72 ±	7,745
	20	66,59 ±	46,444	85,77 ±	10,532
	30	66,91 ±	33,167	63,87 ±	9,211
	40	69,37 ±	23,491	47,69 ±	61,555
	50	79,20 ±	5,740	65,94 ±	29,520
Ortiga	10	6,10 ±	126,617	68,92 ±	30,727
	20	40,96 ±	72,340	40,21 ±	37,845
	30	22,85 ±	81,949	72,32 ±	16,379
	40	71,78 ±	2,677	67,82 ±	20,611
	50	-24,90 ±	60,269	56,39 ±	34,088

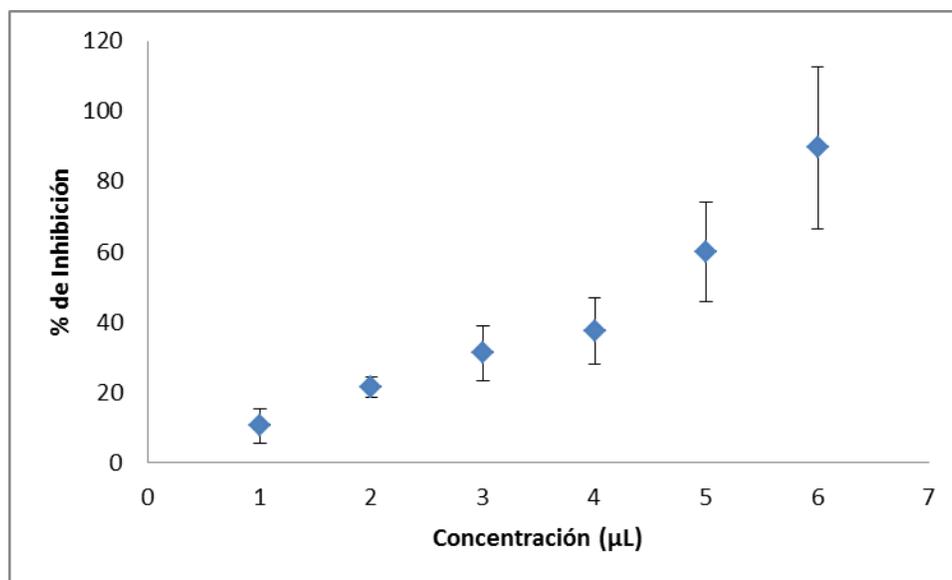
ANEXO K. (Continuación)***Actividad fungicida contra R. solani***

Nombre Común	Conc (µg/mL)	Hidrosol		Aceite esencial	
Romero	10	24,40	± 57,588	27,19	± 62,243
	20	44,52	± 35,562	35,34	± 44,559
	30	4,55	± 48,761	45,80	± 28,193
	40	46,70	± 30,173	53,22	± 22,449
	50	68,00	± 15,735	66,06	± 18,039
Ruda	10	-0,73	± 31,420	92,21	± 9,746
	20	37,14	± 49,825	96,17	± 3,011
	30	-0,64	± 34,167	97,81	± 1,636
	40	3,05	± 54,806	98,11	± 1,425
	50	23,53	± 11,960	99,09	± 1,005
Tomillo	10	55,94	± 41,239	99,03	± 0,105
	20	72,33	± 6,566	99,82	± 0,365
	30	-19,39	± 54,587	99,15	± 1,295
	40	37,41	± 96,379	99,88	± 0,823
	50	49,39	± 58,413	96,17	± 2,386

ANEXO L. Curvas para determinar IC₅₀ de aceites esenciales de especies vegetales contra *P. infestans*, *F. oxysporum* y *R. solani*

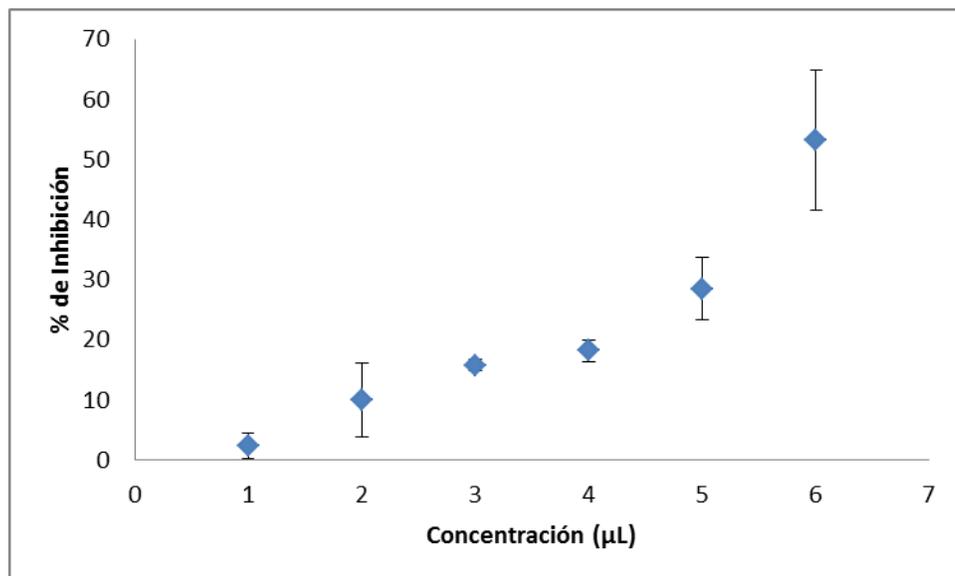


Aceite esencial de Hierbabuena contra *P. infestans*

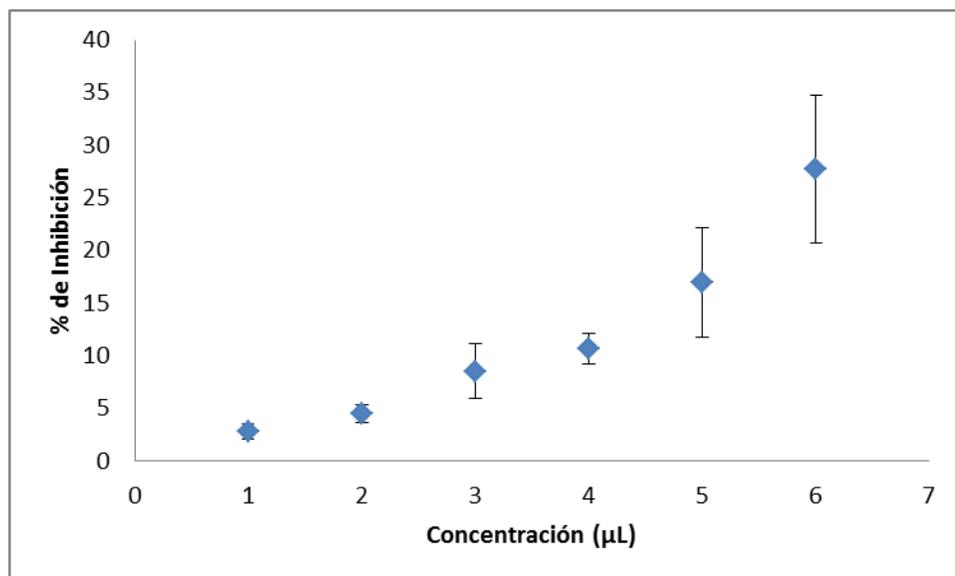


Aceite esencial de Menta Poleo contra *P. infestans*

ANEXO L. (Continuación)

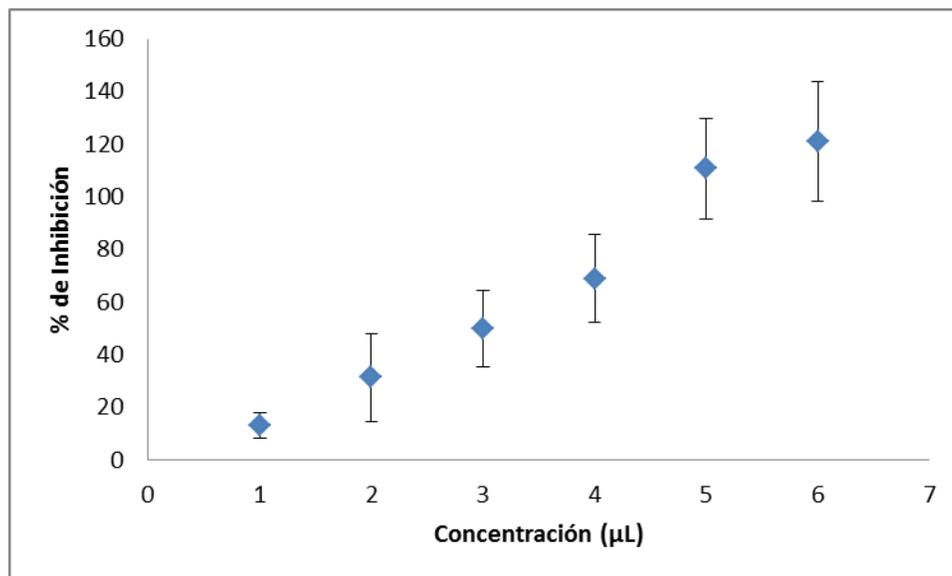


Aceite esencial de Milenrama contra *P. infestans*

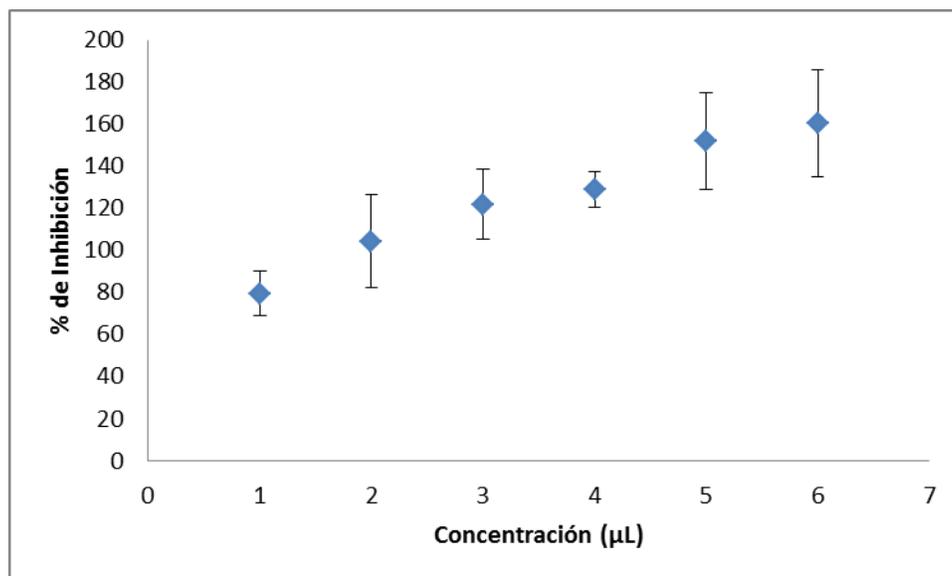


Aceite esencial de Romero contra *P. infestans*

ANEXO L. (Continuación)

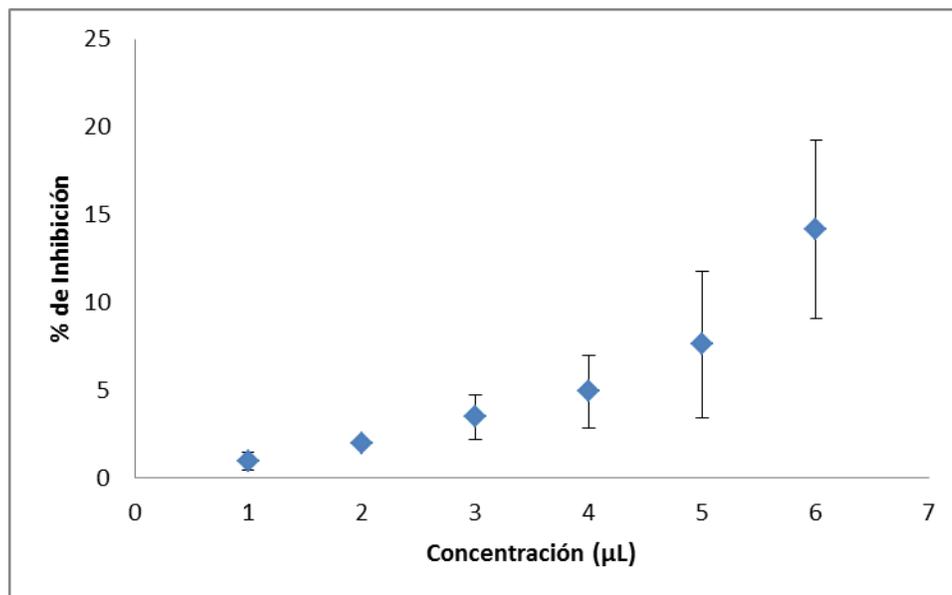


Aceite esencial de Ruda contra *P. infestans*

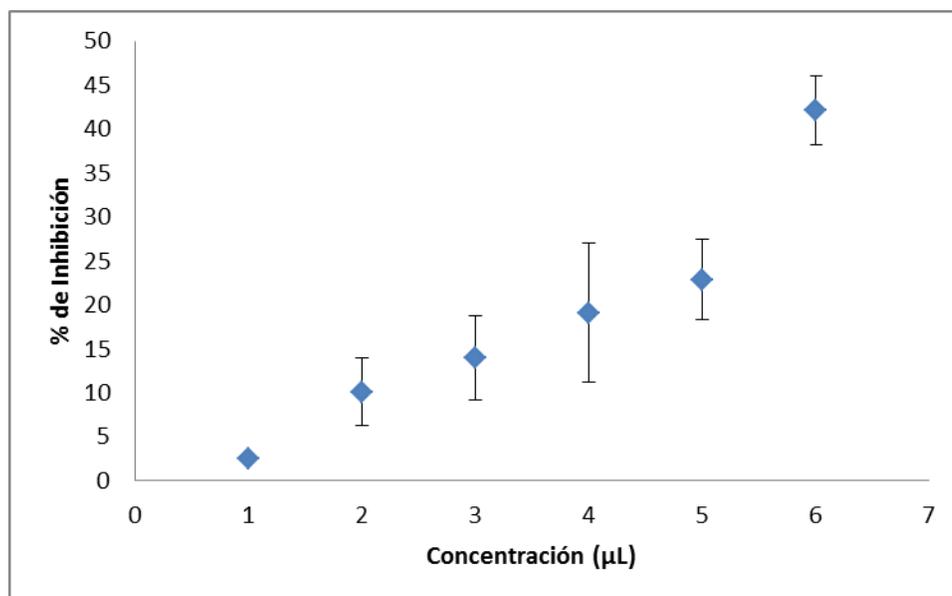


Aceite esencial de Tomillo contra *P. infestans*

ANEXO L. (Continuación)

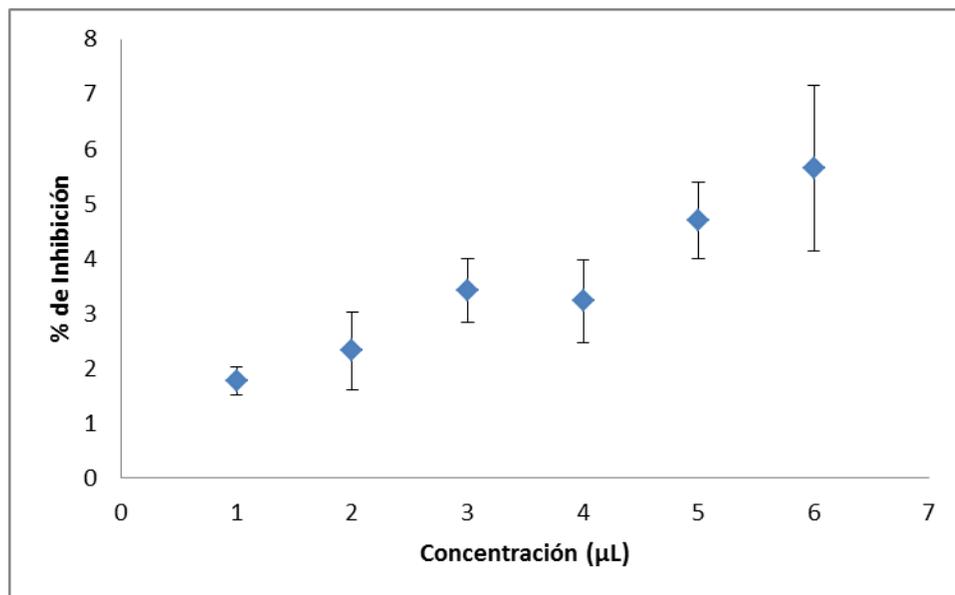


Aceite esencial de Hierbabuena contra *F. oxysporum*

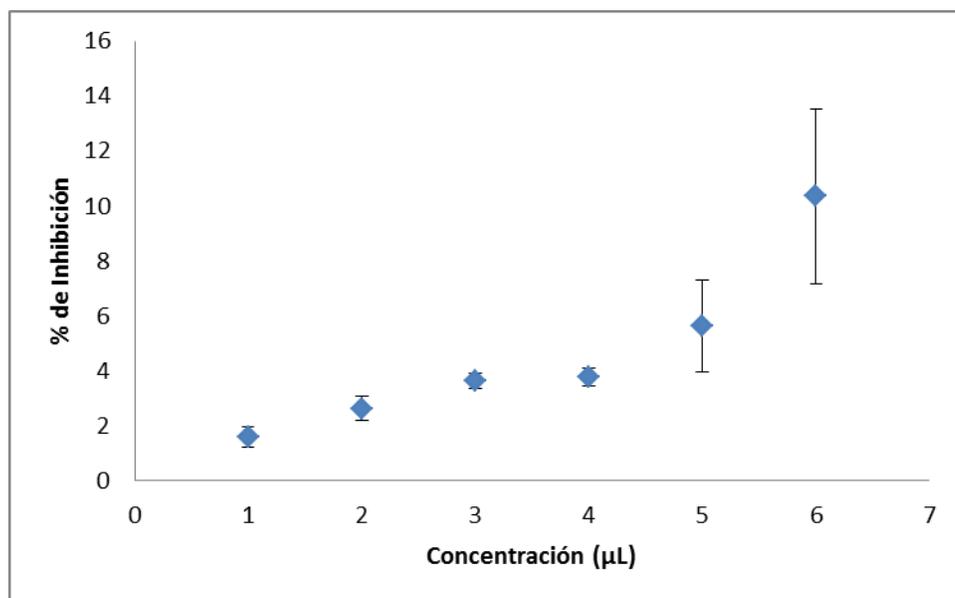


Aceite esencial de Menta Poleo contra *F. oxysporum*

ANEXO L. (Continuación)

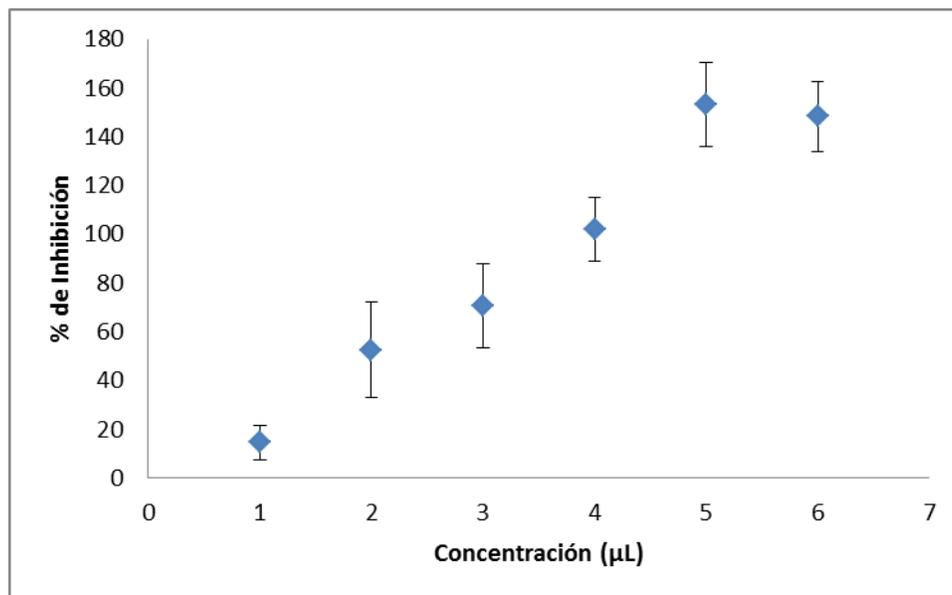


Aceite esencial de Milenrama contra *F. oxysporum*

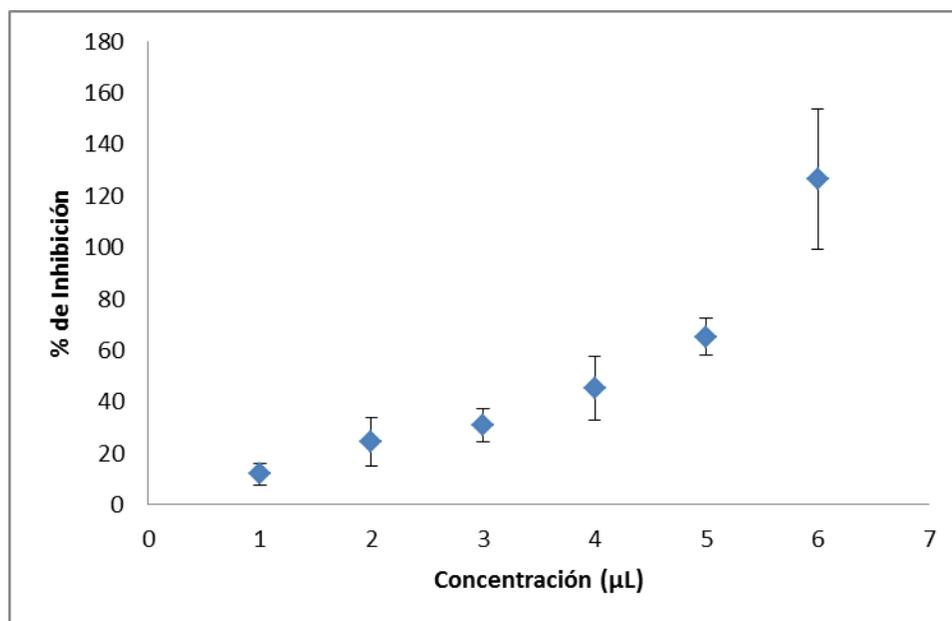


Aceite esencial de Ruda contra *F. oxysporum*

ANEXO L. (Continuación)

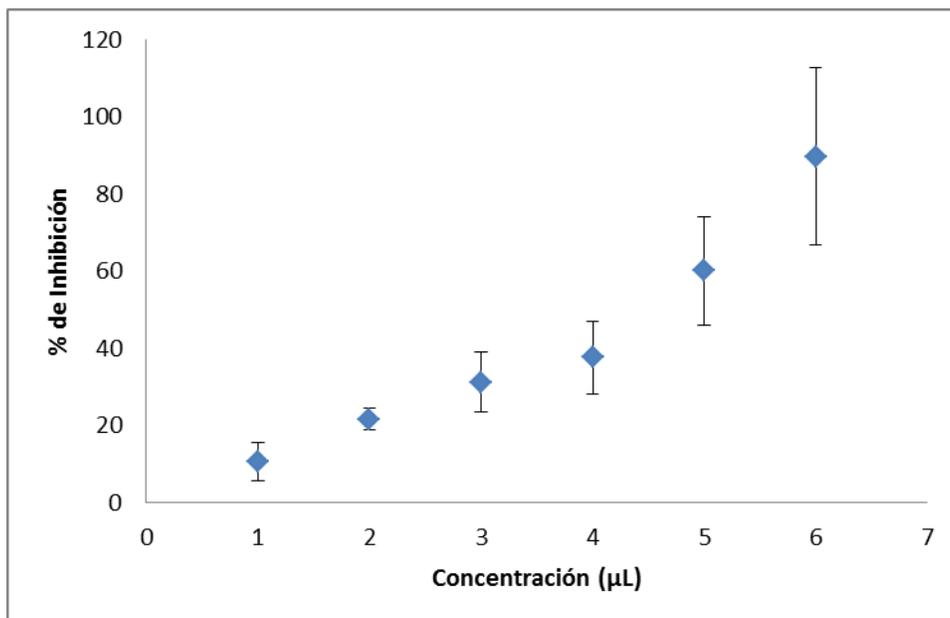


Aceite esencial de Tomillo contra *F. oxysporum*

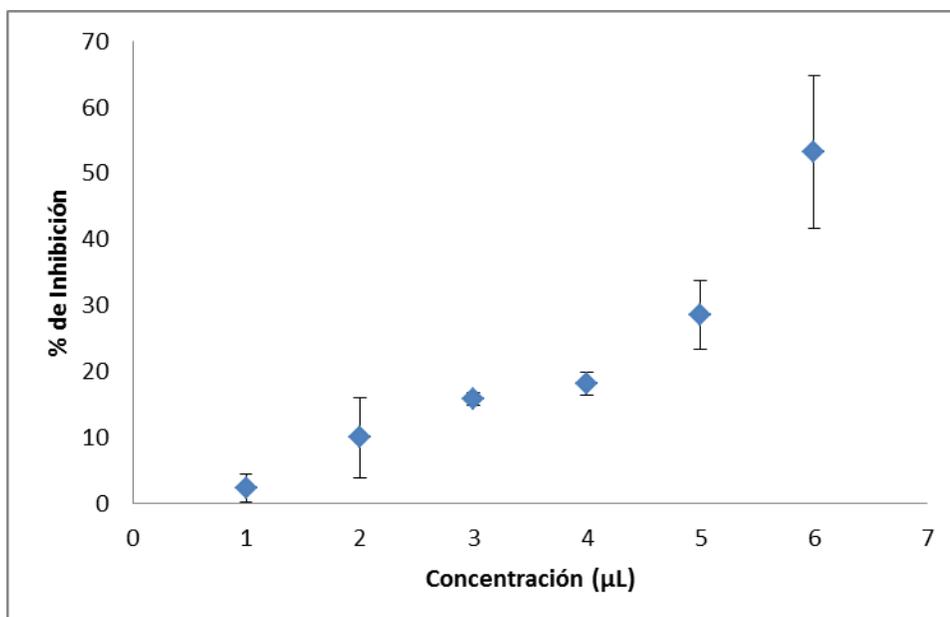


Aceite esencial de Hierbabuena contra *R. solani*

ANEXO L. (Continuación)

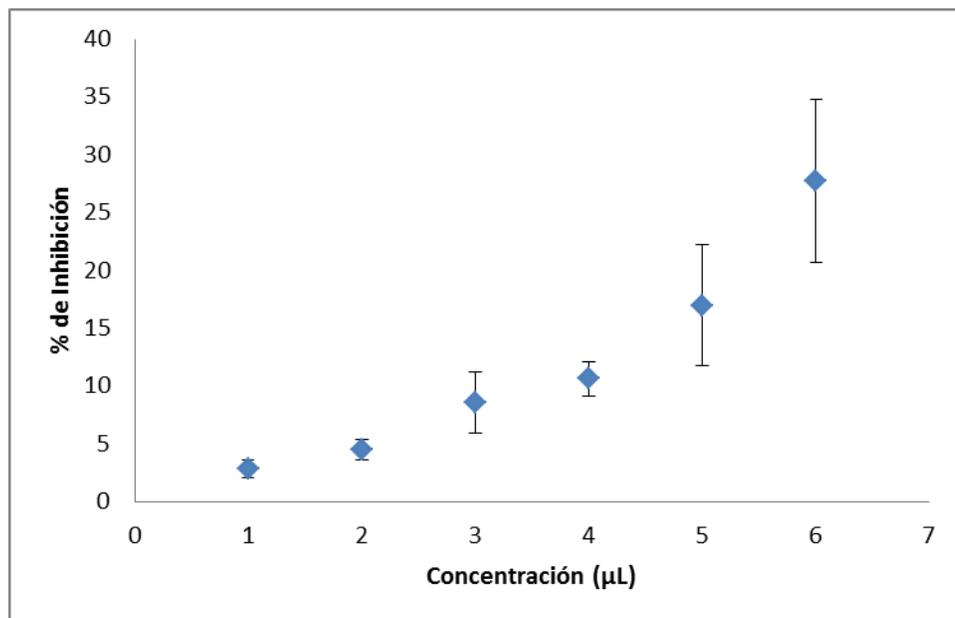


Aceite esencial de Menta Poleo contra *R. solani*

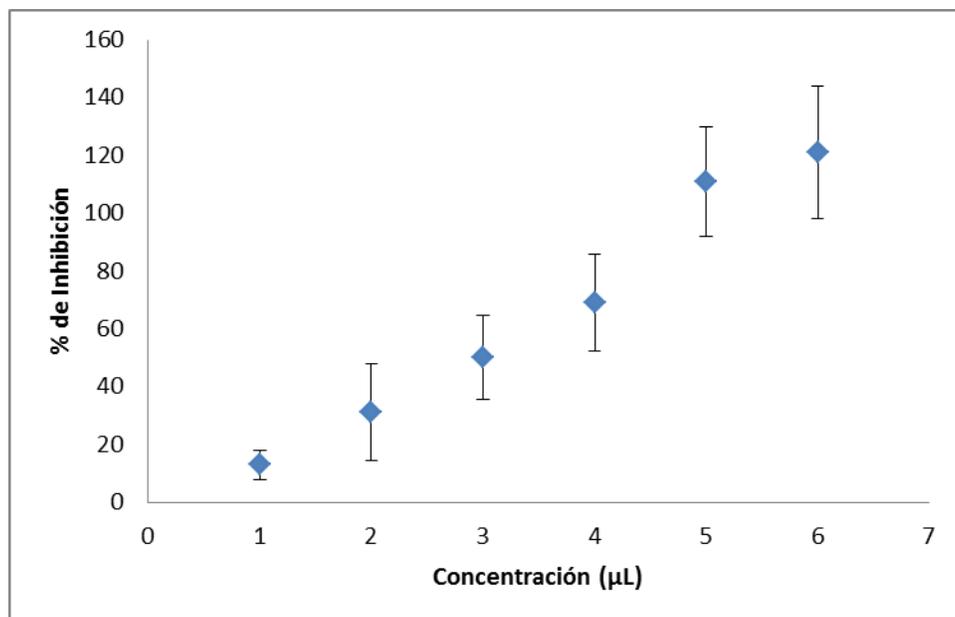


Aceite esencial de Milenrama contra *R. solani*

ANEXO L. (Continuación)

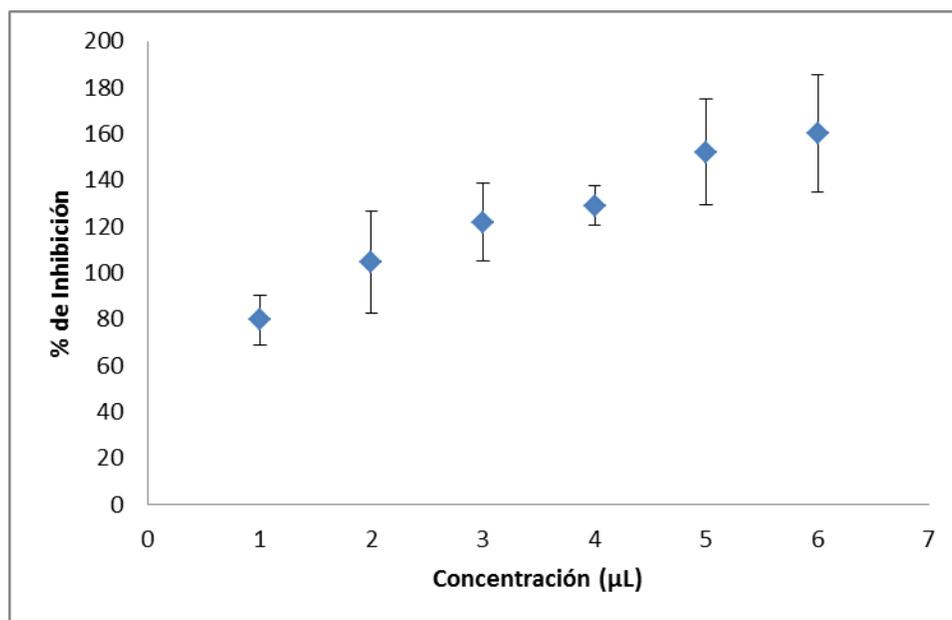


Aceite esencial de Romero contra *R. solani*



Aceite esencial de Ruda contra *R. solani*

ANEXO L. (Continuación)



Aceite esencial de Tomillo contra *R. solani*