

BOLETÍN DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

IMPACTO DEL CULTIVO DE COBIA (<i>RACHYCENTRUM CANADUM</i>) SOBRE LAS COMUNIDADES BIOLÓGICAS DEL OESTE DE BAHÍA DE COCHINOS, CUBA. Alexander Lopeztegui Castillo, Pascual Rodríguez Cruzata y Diana Martínez Coello	7
EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>LIPPIA ALBA</i> SOBRE <i>COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIODES</i> (PENZ) PENZ Y <i>SACC.</i> EN FRUTOS DE GUAYABA (<i>PSIDIUM GUAJAVA L.</i>). Clemencia Guédez, Luis Cañizalez, Carmen Castillo y Rafael Olivar	21
ADHERENCIA Y FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA SOBRE SUPERFICIES ABIÓTICAS LISAS EN <i>STAPHYLOCOCCUS SPP.</i> AISLADOS DE QUESOS ARTESANALES E INDUSTRIALES. Jhoandry Rivera Salazar, Velina Aranaga Natera, Gisela Reyes Hernández, Orlans Vega Luzardo, Luigi Ciancio Zerpa, Lorena Atencio de Guíñez e Irene Zabala Díaz.	38
MORFOLOGÍA DE LA PIEL DE <i>THECADACTYLUS RAPICAUDUS</i> (REPTILIA: SQUAMATA: GEKKONIDAE). Ana Morán de Alvarez, Zulamita Medina de Aguilar, Teresa Martínez Leones, Alfredo Briceño y Magareth Voelger	56
INSTRUCCIONES A LOS AUTORES	70

Vol.52, N° 1, Abril 2018

UNA REVISTA INTERNACIONAL DE BIOLOGÍA
PUBLICADA POR LA
UNIVERSIDAD DEL ZULIA, MARACAIBO, VENEZUELA



Efecto del aceite esencial de *Lippia alba* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* (penz) penz y sacc. En frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.).

Clemencia Guédez^{1*}, Luis Cañizalez¹, Carmen Castillo¹ y Rafael Olivar².

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

*Autor de correspondencia. Correo: cguédez@ula.ve; clemencia.guedez@gmail.com

Resumen

Colletotrichum gloeosporioides es un hongo postcosecha que causa grandes pérdidas en la comercialización del fruto de guayaba. El control de esta enfermedad, que comienza en la plantación, ha sido con productos químicos que han generado resistencia del hongo y contaminación al ambiente. Sin embargo, los aceites esenciales son una alternativa natural que ha resultado efectiva en el control microbiano por lo cual se estudió la composición química del aceite esencial de *Lippia alba* y su efecto en el control *in vitro* de *C. gloeosporioides*. Se encontraron 21 componentes químicos, de los cuales los mayoritarios fueron carvona (36,6%) y limoneno (29,2%), así mismo se determinó que a partir de la concentración del aceite de 0,75 mg/ml la inhibición del crecimiento micelial fue del 100%, y a concentración de 0,25 y 0,50mg/ml fue de 74,29% y 60% respectivamente; con un porcentaje de germinación para las mismas dosis de 9,4% y 6,4%. Este resultado evidencia que el aceite esencial de *L. alba* representa una alternativa viable para el control de este patógeno en postcosecha.

Palabras clave: Hongos postcosecha; *C. gloeosporioides*; *C. alba*; Verbenaceae; metabolitos secundarios.

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

Abstract

Colletotrichum gloeosporioides is a postharvest fungi cause losses in comercial guava fruit. Disease control in the plantation, has been generating chemical resistance of: this pathogen and environment polution. Essential oils are a natural alternative that has proven effective microbial control. Chemical of *Lippia alba* essential oil and its effect in controlling were studied. Chemical components were found carvone (36,6%) and limonene (29,2%), are more common concentration of 0.75 mg oil / mL inhibition of mycelial growth is 100%, and concentration of 0.25 were found and 0,50mg / mL 74.29% is and 60% respectively; with a germination percentage of 9.4% and 6.4%. This result shows that the essential oil of *L. alba*, represents a alternative for the control of this pathogenic postharvest treatment.

Key words: Postharvest fungi, *C. gloeosporioides*, *C. alba*, Verbenaceae, metabolitos secundarios.

Introducción

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

En Venezuela, el guayabo se cultiva mayormente en el estado Zulia, en la Costa Oriental (municipio Baralt) y Sur del Lago de Maracaibo; sin embargo, debido a la problemática fitosanitaria en los últimos años, ha disminuido significativamente su producción comercial (Urdaneta et al. 2009). Para los años comprendido entre 1980 y 1997 la producción fue de 20.000 a 25.000 kg.ha-1.año-1 (Corzo 2000) y para el año 2008, el área sembrada era de 3.500 ha con una producción de 55.650 TM, y un rendimiento anual de 15,9 TM.ha-1 (Aular y Echeverría 2009).

Entre las enfermedades importantes en guayabo se encuentra la antracnosis, se presenta en el fruto y es causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Bravo et al. 2005). Se caracteriza por la presencia de una mancha redonda de color marrón que puede observarse en frutos en la plantación, pero su mayor daño se observa en postcosecha, ha tenido alta incidencia en zonas destinadas a la comercialización de guayabas y ha ocasionado aproximadamente un 40% de pérdidas económicas reflejadas en la etapa de postcosecha o mercado; lo que hace inferir que el control químico se ha vuelto ineficaz para el manejo de este patógeno (Lim y Manicon 2003; Gomes-Moraes et al. 2013).

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

Dentro de esta perspectiva, *Lippia alba* es una planta aromática perteneciente a la familia Verbenaceae, conocida comúnmente como “Cidrón”, “hierba luisa” (Venezuela), “erva-cidreira” (Brasil), “prontoalivio” (Colombia), juanilama en Costa Rica, salvia morada en la Argentina, entre otros. Su aceite esencial está compuesto principalmente por dos tipos de compuestos químicos, los terpenoides y los fenilpropanoides (Hennebelle et al. 2008; Hennebelle et al. 2006). Los aceites esenciales de este género muestran un amplio espectro de actividades biológicas contra bacterias, hongos, parásitos, virus e insectos (Escobar et al. 2010; Meneses et al. 2009; Mesa-Arango et al. 2009; Olivero et al. 2009). Algunas especies de *Lippia* spp han revelado actividad contra hongos fitopatógenos (Deka et al. 2010; Linde et al. 2016; Regnier et al. 2010).

En Venezuela, es reciente el uso de extractos y aceites esenciales, existen pocas referencias bibliográficas relacionadas con su utilización como antimicrobianos. En su mayoría, los estudios microbianos con orégano silvestre (*L. origanoides*) han sido, utilizando extractos acuosos etanólicos. Rodríguez y Sanabria (2005) encontraron que el extracto etanólico (EE) de *L. origanoides* inhibió el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* y *Bipolaris maydis*. Bolívar et al. (2009) descubrieron que los EE de *L. origanoides* y *G. sepium* redujeron la enfermedad antracnosis en los frutos de mango en un 37% y 33% respectivamente. Vargas et al. (2009) evaluaron los EE de *H. indicum*, *L. origanoides*, *Ricinus communis* y combinaciones de estos, para el control de la Sigatoka Negra en plátano y encontraron que todos los extractos fueron efectivos para el control de la enfermedad. Guédez et al. (2014) encontraron que el aceite esencial de *Citrus sinensis* fue efectivo para controlar los hongos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Penicillium indicum*, *Fusarium solani*, *Rhizopus stolonifer* y *Aspergillus flavus* en frutos de lechosa (*Carica papaya* L.).

Los estudios referenciales sobre aceites esenciales de plantas de la familia Verbenaceae en el manejo de enfermedades en la producción agrícola realizadas por investigadores a nivel mundial, señala que este aceite esencial controla la antracnosis en frutos de guayabo (Delgado-Ospina et al. 2016). El objetivo de este trabajo fue determinar la composición química de *L. alba* y efecto sobre el hongo postcosecha *C. gloeosporioides* en postcosecha sobre los frutos de guayaba.

Materiales y métodos

1. Aislamiento e identificación del hongo postcosecha *C. Gloeosporioides* en frutos postcosecha

El aislamiento de *C. gloeosporioides* se realizó de frutos de guayaba que fueron cosechados en estado de madurez fisiológica en una plantación de guayabo, Finca RFA ubicada en el sector Concesión 7, parroquia Libertador, municipio Baralt, estado Zulia, Venezuela (09°36'02" N, 70°58'33" O). Los frutos se almacenaron en bandejas plásticas a temperatura ambiente (27±1°C) hasta la aparición de síntomas de la enfermedad Antracnosis. De los síntomas se tomaron fragmentos (1cm²) del margen de tejido enfermo en el epicarpio del fruto, previamente desinfectado con una solución de hipoclorito de sodio al 2 % durante 3 minutos y se secaron en papel absorbente estéril. Se colocaron en medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA) para su crecimiento, la identificación del hongo se realizó a los 7 días de crecimiento en PDA, mediante preparados microscópicos con lactofenol y utilizando las claves de Barnett y Hunter (1986) y Hyde et al. (2010).

2. Extracción y rendimiento del aceite esencial de *Lippia alba*.

El material vegetal utilizado para la extracción del aceite esencial, fue procedente de plantas de la parroquia Cuicas, municipio Carache, estado Trujillo, Venezuela, (9°70'32,85"N-70°30'20,85"O), altitud 994 msnm y temperatura media de 26°C. Una muestra (3 kg) conformada por hojas y flores, fueron cortados finamente (1cm² aproximadamente) manteniendo su homogeneidad y representatividad.

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

3. Componentes químicos del aceite esencial de *Lippia alba*.

La identificación de los componentes presentes en el aceite esencial de *L. alba* se realizó por cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas, en

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

4. Efecto del aceite esencial de *Lippia alba* sobre el crecimiento micelial y germinación de *Colletotrichum gloeosporioides*.

4.1. Crecimiento micelial: el efecto del aceite esencial fue evaluado a través del crecimiento micelial y germinación del hongo *C. gloeosporioides*, utilizando el método de Costa Da Silva *et al.* (2012) con pequeñas modificaciones. Las concentraciones utilizadas de aceite esencial fueron de 0, 0,25, 0,5, 0,75, 1,0 y 1,5 (mg/mL^{-1}), agregando 3 gotas de adherente tween 80 a 1000 mL de medio de cultivo PDA (40°C), y se distribuyó 12 mL por caja de Petri. Luego de 3 horas, ya cuando el medio de cultivo se solidificó, se procedió a colocar un disco de 0,5 cm de diámetro del micelio del hongo *C. gloeosporioides* de 10 días de crecimiento, como testigo se utilizó medio de cultivo sin aceite esencial ($0 \mu\text{L}$).

A partir de las 24 horas del crecimiento del hongo *C. gloeosporioides* a las condiciones establecidas, se realizaron las mediciones del diámetro de crecimiento por 15 días y se calculó el porcentaje de inhibición. $\% I = (\text{Fórmula Manici } et al. 1997)$. Donde: $\%$: Porcentaje de inhibición. \emptyset Diámetro micelio tratado: Crecimiento del hongo en las concentraciones de aceite esencial de *L. alba* en medio de cultivo PDA. \emptyset control en medio de cultivo PDA. El diámetro de crecimiento del hongo se midió diariamente para cada tratamiento hasta los 9 días. Se realizaron cuatro repeticiones por cada tratamiento.

4.2. Germinación de conidios: Se colocó una capa de aproximadamente 3mm de grosor de medio de cultivo Agar-agua y aceite esencial de *L. alba* en cajas de Petri, de acuerdo al tratamiento en las mismas concentraciones que para el estudio del crecimiento micelial en cajas de Petri, y se dejó solidificar a temperatura ambiente ($27^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$), 3 horas después se cortaron cuadrados 1,5 x1,5 cm en la cámara de aislamiento los cuales fueron colocados en portaobjetos previamente esterilizados, inmediatamente se colocó una alícuota de 10 μL de suspensión de conidios con concentración de 2.10^4 conidios. mL^{-1} que se extendió uniformemente. Se evaluaron 100 conidios y se consideraron conidios germinados aquellos donde el tamaño del tubo germinativo es igual o mayor que el tamaño del conidio. Las evaluaciones se realizaron a los 20min, 40min, 60min (1hora), 2h, 4h, 6h, 8h, 24h y 48h.

La cantidad de conidios germinados de los tratamientos fueron comparados con la cantidad del control absoluto y relativo (fungicida). La dosis de aceite esencial que inhibe el crecimiento y la germinación de *C. gloeosporioides*, se analizó a través de un diseño completamente al azar, la germinación de conidios se comparó por medidas repetidas en el tiempo. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de medias Tukey entre los tratamientos, usando el programa SAS versión 9.3.1.

Resultados y discusión

1. Identificación de *Colletotrichum gloeosporioides* procedente de frutos de guayaba.

El color de las colonias del hongo en medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA) varió de blanco a beige, el micelio es ralo de consistencia semi-algodonosa y borde irregular, presencia de setas después de 14 días de crecimiento. El tamaño de las conidios osciló entre 10 a 17 μm de largo y de 2 a 4 μm de ancho, los conidios son rectos y cilíndricos con extremos redondeados; estas características permitieron identificarlo como *C. gloeosporioides* (Fig. 1). Montero et al. (2010) y Correa et al. (2007) encontraron características similares de las colonias de *C. gloeosporioides*, concluyeron que estos caracteres morfológicos de las colonias y los conidios son buenos descriptores de este hongo. La variabilidad en la coloración y la producción de setas de los aislamientos del hongo *C. gloeosporioides* son características propias del hongo y ha sido reconocida por Vinnere (2004), Whar-ton y Dieguez (2004).

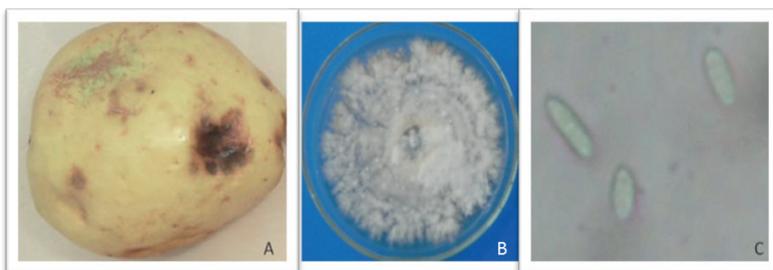


Fig. 1. A. Antracnosis en frutos de guayaba. B. Colonia de *Colletotrichum gloeosporioides* en PDA y C. Conidios del hongo (40X).

2. Extracción y rendimiento del aceite esencial de *Lippia alba*.

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

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

3. Componentes químicos del aceite esencial de *Lippia alba*.

Se encontró un total de 21 componentes químicos en el aceite esencial de *L. alba*; carvona (36,6%), Limoneno (29,2%), Biciclosesquifelandreno (11,4%), Neral (10,3%), Geranial (6,5%), piperatenona (6,1%), piperitona (2,8%) y β -bourboneno (1,2%) (Tabla 1).

Tabla 1. Inhibición del crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* a diferentes concentraciones del aceite esencial de *L. alba*.

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

Tipo de compuesto: hidrocarburo monoterpénico (MH), monoterpeneo oxigenado (MO), hidrocarburo sesquiterpénico (SH), sesquiterpeneo oxigenado (SO). Método de extracción del aceite: Hidrodestilación por microondas.

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

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

4. Efecto del aceite esencial de *Lippia alba* sobre el crecimiento micelial y la germinación de *Colletotrichum gloeosporioides*.

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

El aceite esencial de *L. alba* mostró actividad antifúngica sobre *C. gloeosporioides*, inhibiendo el crecimiento en un 100% a partir de la concentración de 0,75 mg.mL⁻¹, se logró una inhibición de 60,0% y 74,29% con 0,25 y 0,50 mg.mL⁻¹ respectivamente (Tabla 2); el análisis de regresión confirma la inhibición del crecimiento micelial de 100% con concentraciones superiores a 0,75 mg.mL⁻¹, como lo indica la ecuación lineal (Fig. 2). Los resultados mostraron que a medida que disminuye la concentración de aceite también disminuye la inhibición del crecimiento de los microorganismos. Al comparar los tratamientos con el control (prueba Tukey) se diferencian 4 grupos, donde: **Grupo I:** 0,0 mg/mL (Testigo); **grupo II:** 0,25 mg.mL⁻¹; **grupo III:** 0,5 mg.mL⁻¹; 0,75 mg.mL⁻¹; 1,0 mg.mL⁻¹ y **grupo IV:** 1,5 mg.mL⁻¹ (Fig. 3).

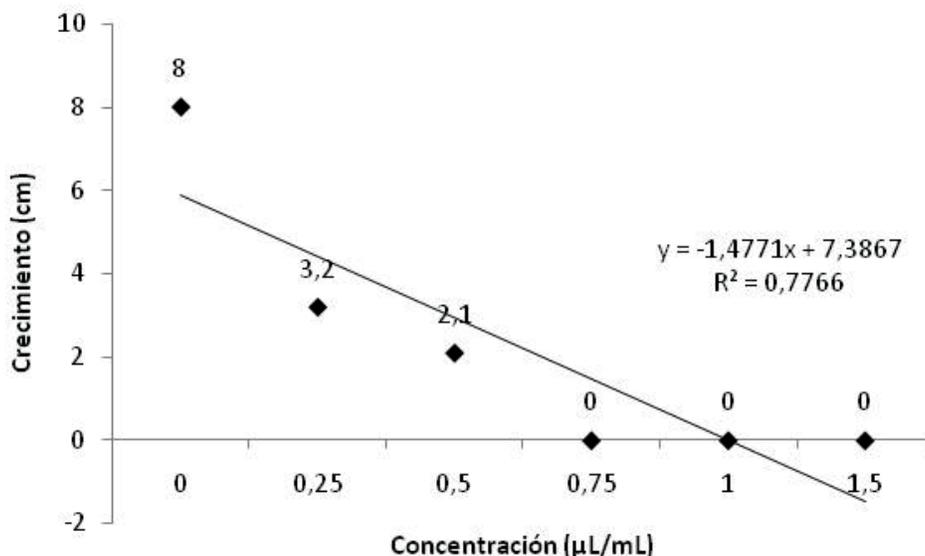


Figura 2. Efecto de diferentes concentraciones (0; 0,25; 0,5; 0,75, 1,0; 1,5µL/mL) de *L. alba* en el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* a los 9 días de incubación, a 27±1°C.

Tabla 2. Inhibición del crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* a diferentes concentraciones del aceite esencial de *L. alba*.

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

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

Glamočlija *et al.* (2011) demostraron que el aceite esencial de *L. alba* tiene actividad antifúngica con una concentración mínima inhibitoria (MIC, del Inglés) en el intervalo de 0,300–1,250 mg.mL⁻¹ y una concentración fungicida mínima (MFC, del Inglés) en el intervalo de 0,600–1,250 mg.mL⁻¹. Por otra parte, el agente fungicida comercial Ketoconazol mostró MIC en un intervalo de 0,025– 0,500 mg.mL⁻¹ y MFC en un intervalo de 0,250–0,100 mg.mL⁻¹. Otro agente fungicida, el Bifonazol, con menor actividad antifúngica, tuvo un MIC de 0,100– 0,200 mg.mL⁻¹ y MFC de

0,200–0,250 mg.mL⁻¹. Shukla et al. (2009) determinaron que el aceite esencial de *L. alba* ha causado 100% de inhibición del crecimiento de 9 hongos en 17 evaluados. No obstante, cuando se estudió el efecto del compuesto geranial aislado del aceite de *L. alba*, este inhibió el crecimiento de 13 hongos en 100% de 17 evaluados; sin embargo, el compuesto neral sólo inhibió el crecimiento en un 100% en 2 hongos. Por lo tanto, el geranial parece ser el principal componente fungicida del aceite esencial de *L. alba*

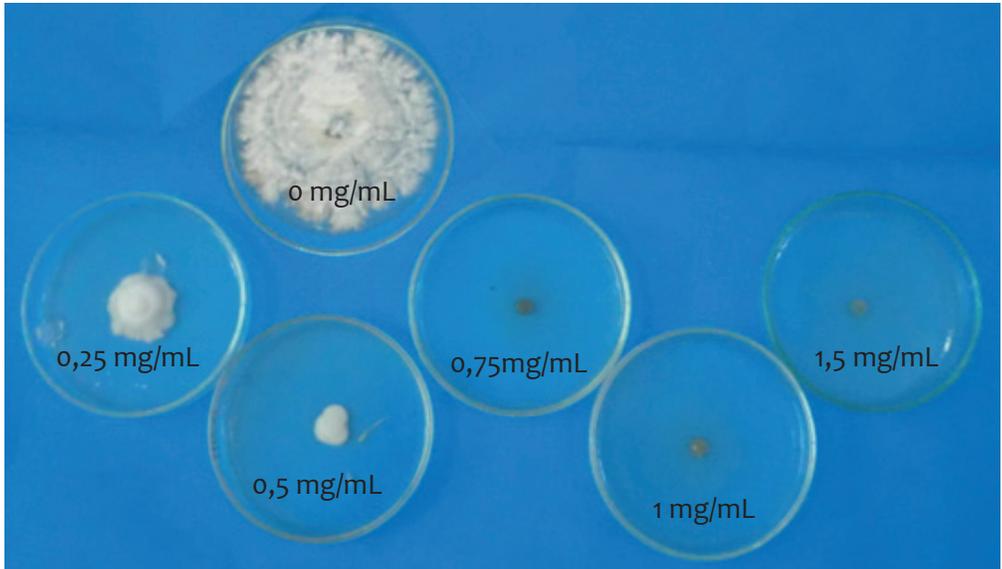


Figura 3. Crecimiento de *C. gloeosporioides* en diferentes concentraciones del AE de *L. alba* a los 12 días de incubación, a 27±1°C.

La actividad antifúngica general de aceites esenciales está bien documentada y se han realizado algunos estudios sobre su efectividad en patógenos de postcosecha. Se cree que podrían desempeñar un papel importante en los mecanismos de defensa de las plantas contra los microorganismos fitopatógenos. La mayoría de los aceites esenciales han sido reportados para inhibir los hongos después de la cosecha en condiciones *in vitro* y el efecto antifúngico de 18 aceites esenciales contra patógenos de frutas después de la recolección lo evidencian. El aceite de tomillo demostró ser el mejor inhibidor contra todos los patógenos probados, como *Lasodioplatheo bromae*; *Colletotrichum gloeosporioides*; *Penicillium digitatum*; *Botrytis cinerea* (Prakas y Sharma 2013).

Se han utilizado diferentes aceites esenciales efectivos para inhibir el crecimiento micelial del hongo *C. gloeosporioides*. Carnellosi et al. (2009) evaluaron el efecto *in vitro* del aceite de *Cimnopogon citratus*, *Eucaliptus citriodora* y *Mentha arvensis* sobre el hongo *C. gloeosporioides* y la inhibición total del crecimiento de

este patógeno. Por su parte, Combrick et al. (2011) también determinaron que aceite esencial de *Cimbopogon citratus* inhibe el crecimiento de *C. gloeosporioides*, además de los hongos *Penicillium digitatum* y *Alternaria citrii*.

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

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

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

4.2 Efecto del aceite esencial de *I. Alba* sobre la germinación de los conidios de *C. Gloeosporioides*.

La germinación de conidios de *C. gloeosporioides* en diferentes tratamientos con aceite esencial de *I. alba* y fungicida químico presentó diferencias significativas ($P\leq 0,05$) para las diferentes concentraciones, lo cual indica que el AE es efectivo para el desarrollo del hongo.

Todas las concentraciones del AE evaluadas inhibieron la germinación de los conidios de *C. gloeosporioides*. En las concentraciones de 0,25, 0,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ la germinación de conidios fue de 9,6%, 6,4% respectivamente y a partir de la concentración de 0,75 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ no hubo germinación de los conidios (0%); la efectividad del AE para controlar el hongo *C. gloeosporioides*, podría estar relacionada con la presencia del compuesto carvona.

La variable tiempo es significativa ($P\leq 0,05$), lo que indica que influye en la germinación de conidios, disminuyendo a medida que transcurre el tiempo. Igualmente, la interacción tratamiento x tiempo, presenta diferencias significativas ($P\leq 0,05$), lo que significa que la germinación de conidios depende de ambas variables (Fig. 4).

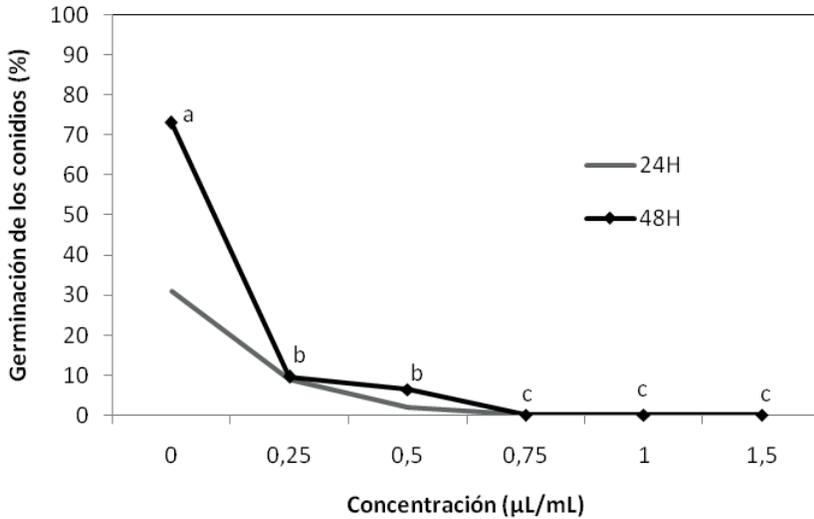


Figura 4. Porcentaje de germinación de conidios de *C. gloeosporioides* a diferentes concentraciones de AE de *L. alba*, a las 24 y 48 horas. Letras diferentes presentan diferencias significativas ($P < 0,05$) entre tratamientos (Tukey).

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

Conclusiones

El componente químico mayoritario del aceite esencial de *L. alba* fue Carvona (36,6%) seguido de limoneno con 29,2%. El AE de esta planta fue efectivo a concentraciones bajas para inhibir el crecimiento del hongo en medio de cultivo e impedir la germinación de conidios *C. gloeosporioides* y representa una alternativa de control no contaminante en el almacenamiento de frutos de guayaba.

Agradecimientos

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

Referencias bibliográficas

- ADAMS, R. P. 1995. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL. 456 p.
- ARANGO, O., F. BOLAÑOS, O. VILLOTA, A. HURTADO Y I. TORO. 2012. Optimización del rendimiento y contenido de timol de aceite esencial de orégano silvestre obtenido por arrastre con vapor. Biot. Sector Agrop. Agroind. 10(2): 217-226.
- AULAR, J. Y Y. ECHEVERRIA. 2009. "Cultivo, producción y poscosecha de la guayaba en Venezuela". En: Natale, W., Rozane, D., Souza, H., Amorim, D. (Ed.). Cultura da goiaba: do plantio à comercialização. Jaboticabal. FCAV-UNESP. 525-555 p.
- BANDONI, A. 2002. Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica. Ciencia y Tecnología para el Desarrollo CYTED. Editorial de la Universidad Nacional de la Plata, La Plata-Argentina. 418 p.
- BARNET, H. L. Y B. B. HUNTER. 1986. Illustrated genera of imperfect fungi. Cuarta edición. Minesota. APS. Press. 218 p.
- BARRERA-NECHA, L., L. S. BAUTISTA-BAÑOS., H. I. FLORES-MOCTEZUMA Y A. ROJAS-ESTUDILLO. 2008. Efficacy of essential oils on the conidial germination, growth of *Colletotrichum gloeosporioides* (penz.)Penz. and Sacc. and control of postharvest diseases in papaya (*Carica papaya* L.). Plant Pathology Journal 7 (2): 174-178.
- BASER, K. H. 2008. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. CurrPharm Des. 14: 3106-3119.
- BOLÍVAR, K., M. SANABRIA., D. RODRÍGUEZ., M. CAMACARO, D. ULACIO., L. CUMANA Y O. CRESCENTE. 2009. Potencial efecto fungicida de extractos vegetales en el desarrollo *in vitro* del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. y de la antracnosis en frutos de mango. Rev. UDO Agríc. 9 (1): 175-181.
- BRAVO, V., D. RODRÍGUEZ, M. E. SANABRIA., M. MARÍN-LARREAL., R. SANTOS., E. PÉREZ Y L. SANDOVAL. 2005. Momento de infección por *Dothiorella* sp. y aparición de síntomas de la pudrición apical del guayabo. Rev. Fac. Agron. (LUZ) 22: 365-376.
- CARNELOSSI, P. R., K. R. SCHWAN-ESTRADA, M. E. CRUZ, A. T. ITAKO Y R. M. MESQUINI. 2009. Óleos essenciais no controle pós-colheita de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão. Revista Bra. Plant. Medic. 11(4).399-406.
- CASTRO, D. M., L. C MING., M. O. Y MARQUES. 2002. Biomass production and chemical composition of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown Britt & Wilson in leaves on different plant parts in different seasons. Acta Hort. (ISHS) 569, 111-115.
- COMBRINCK, S., T. REGNIER Y G. P. KAMATOU. 2011. *In vitro* activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. Industrial Crops and Products. 33(2): 344-349.

- CORREA, L., O. LAVALETT Y V. Y. GALINDO. 2007. Uso de métodos multivariantes para la agrupación de aislamientos de *Colletotrichum* spp. con base en características morfológicas y culturales. *Rev.Fac. Nac. Agron.* 60:671-3690.
- CORZO, P. 2000. Situación de la fruticultura a nivel regional. Memorias. 1er. Encuentro Regional Sobre Fruticultura. Municipio Mara, estado Zulia, Venezuela, pp. 8–11.
- COSTA DA SILVA, A., P. ESTEVÃO DE SOUZA., J. MACHADO., B. MARQUES DA SILVA Y J. PEREIRA PINTO. 2012. Effectiveness of essential oils in the treatment of *Colletotrichum truncatum*-infected soybean seeds. *Trop. Plant. Pathol.* 37(5): 305-313.
- DEKA, B., P. M. CHUTIA., M.G. PATHAK Y P. BARUAH. 2010. Effect of essential oils from *Lippia geminata* and *Cymbopogon jwarancusa* on *in vitro* growth and sporulation of two rice pathogens. *J. Am. OilChem. Soc.* 87 (11): 1333 - 1340.
- DELGADO-OSPINA, J., J. C. MENJIVAR Y M.S. SÁNCHEZ. 2015. Influencia de la fertilización en la producción y composición del aceite esencial de *Lippia organoides* HBK (orégano criollo). *Rev.Cub. Plant. Medic.* 20(3): 335-347.
- DELGADO-OSPINA, J., M. SANCHEZ-OROZCO Y C. BONILLA-CORREA. 2016. Efecto del secado y la edad de las plantas en la composición de los aceites esenciales de *Lippia alba* (Mill) N.E.BR ex Britton y P. Wilson y *Lippia organoides* Kunth. *Acta Agron.* 65(2):170-175.
- ESCOBAR, P., S. M. LEAL, L. H. HERRERA, J. R. MARTINEZ Y E. STASHENKO. 2010. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp. essential oils and their major components. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105: 184 - 190.
- GLAMOČLIJA, J., M. SOKOVIĆ, V. TEŠEVIĆ, G. A. LINDE, Y N. BARROS-COLAUTO, 2011. Chemical characterization of *Lippia alba* essential oil: an alternative to control green molds. *Brazilian J. Microbiol.* 42(4): 1537–1546.
- GOMES-MORAES, S., F. OSAMA-TANAKA, N. MASSOLA-JUNIOR. (2013). Histopathology of *Colletotrichum gloeosporioides* on guava fruits (*Psidium guajava* L.). *Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal-SP.* 35(2): 657-664.
- GUÉDEZ, C., L. CAÑIZALEZ, L. AVENDAÑO, J. SCORZA, C. CASTILLO, R. OLIVAR, Y. MÉNDEZ Y L. SÁNCHEZ. 2014. Actividad antifúngica del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis* L) sobre hongos postcosecha en frutos de lechosa (*Carica papaya* L.). *Rev. Soc. Vzlana.Microbiol.* 34:81-85.
- HENNEBELLE, T., S. SAHPAZ H. JOSEPH Y F. BAILLEUL. 2008. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. *J. Ethnopharmacol.* 116(2): 211-222.
- HENNEBELLE, T., S. SAHPAZ, C DERMONT, H. JOSEPH Y F. BAILLEUL. 2006. The essential oil of *Lippia alba*: Analysis of samples from French overseas departments and review of previous works. *Chem. Biodivers.* 3: 1116 - 1125.

- HYDE, K. D., L. CAI, P. F. CANNON, J. A. CROUCH, P. W. CROUS, U. DAMM, P. H. GOODWIN, H. CHEN, P. R. JOHNSTON, E. B. JONES, Z. Y. LIU, E. H. MCKENZIE, J. MORIWAKI, P. NOIREUNG, S. R. PENNYCOOK, L. H. PFENNING, H. PRIHASTUTI, T. SATOR, G. SHIVAS, Y. P. TAN, P. W. TAYLOR, J. H. LINDE, S. COMBRINCK, T. J. REGNIER Y S. VIRIJEVIC. 2010. Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lippia rehmannii* from South Africa. *SudAfr. J. Bot.* 76: 37-42.
- LIM, T. Y B. MANICOM. 2003. Disease of guava. En: Ploetz, R.C. Diseases of tropical fruit crops. Homestead: Ed. CABI Publishing, cap. 12. p. 275-289.
- LINDE, G.; N. COLAUTO, A. SLANIS Y Z. GAZIM. 2016. Quimiotipos, extracción, composición y aplicaciones del aceite esencial de *Lippia alba*. *Rev. Bras. Pl. Med.* 18(1):191-200.
- MANI, A., R. MISHRA Y G. THOMAS. 2011. Elucidation of Diversity among *Psidium* Species using Morphological and SPAR methods. *Journal of Phytology* 3(8): 53-61.
- MANICI, L. M., L. LAZZERI Y S. PALMIERI. 1997. *In vitro* fungitoxic activity of some glucosinolates and their enzyme-derived products toward plant pathogenic fungi. *J. Agric. Food Chem* 45(7):2768-2773.
- MENESES, R. F., E. TORRES STASHENKO Y R. OCAZIOINEZ. 2009. Aceites esenciales de plantas colombianas inactivan el virus del dengue y el virus de la fiebre amarilla. *Salud UIS.* 41:23 - 243.
- MESA-ARANGO, A., J. MONTIEL-RAMOS, B. ZAPATA, C. DURAN, E. BETANCUR-GALVIS Y E. STASHENKO. 2009. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. *Mem.Inst. Oswaldo Cruz* 104:878 - 884.
- MONTANARI, R. M., L. C. BARBOSA, A. J. DEMUNER, C. J. SILVA, L. S. CARVALHO Y N. J. ANDRADE. 2011. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from verbenaceae species: alternative sources of (E)-caryophyllene and germacrene-D. *Quím. Nova* 34: 1550-1555.
- MONTERO-TAVERA, V., J. L. MORALES, M. M. GONZÁLEZ, J. L. ANAYA, T. CORONA, Y A. GALVEZ. 2010. Diversidad genética, patogénica y morfológica del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) de Michoacan, México. *Rev. Mex. Cs. Agríc.* 1(2): 159-174.
- OLIVERO, J.; G.K. CABALLERO, C. B. JARAMILLO Y E. STASHENKO. 2009. Actividad repelente de los aceites esenciales de *Lippia organoides*, *Citrus sinensis* y *Cymbopogon nardus* cultivadas en Colombia frente a *Tribolium castaneum*, *Herbst.* *Salud UIS.* 41:244 - 250.
- PÉREZ-GUTIÉRREZ, R. M., S. MITCHELL Y R. VARGAS-SOLIS. 2008. *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J.Ethnopharmacol.* 117 (1): 1-27.

- PRAKAS M. Y N. SHARMA. 2013. Application of essential oils: An alternative method for controlling postharvest losses. *Inter. Soc. Environ. Bot.* 19(3):1-7.
- REGNIER, T., S. COMBRINCK Y W. DU PLOOY. 2010. Evaluation of *Lippia scaberrima* essential oil and some pure terpenoid constituents as postharvest mycobiocides for avocado fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 57: 176 - 182.
- RODRÍGUEZ, D. Y M. SANABRIA. 2005. Efecto del extracto de tres plantas silvestres sobre la Rizoctoniosis: la mancha sureña del maíz y los patógenos que las causan. *Inter-ciencia*: 30(12):739-744.
- ROZWALKA, L. C.; M. L. LIMA, L. L. MIO Y T. NAKASHIMA. 2008. Extracts, decoctions and essential oils of medicinal and aromatic plants in the inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Glomerella cingulata* isolates from guava fruits. *Ciência Rural* 38(2): 301-307.
- SENATORE, F. D. Y Y. RIGANO. 2001. Essential oil of two *Lippia* spp. (Verbenaceae) growing wild in Guatemala. *Flavour Frag.* 16:169-171.
- SHUKLA, R., A. KUMAR, P. SINGH Y N. K. DUBEY. 2009. Efficacy of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil and its monoterpene aldehyde constituents against fungi isolated from some edible legume seeds and aflatoxin B1 production. *Inter. J. Food Microbiol.* 135(2):165-70.
- SINGH A Y T. MARAR. 2011. Inhibitory effect of extracts of *Syzygium cumini* and *Psidium guajava* on glycosidases. *J. Cell. Tissue Research.* 11:2535-2539.
- SOUZA-JÚNIOR, I. T., N. L. SALES Y E. R. MARTINS. 2009. Efeitofungitóxico de óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* isolado do maracujazeiro amarelo. *Biomas*, 22(3):77-83.
- STASHENKO, E., J. R. MARTÍNEZ, D. C. DURÁN, Y. CÓRDOBA Y D. CABALLERO. 2014. Estudio comparativo de la composición química y la actividad antioxidante de los aceites esenciales de algunas plantas del género *Lippia* (Verbenaceae) cultivadas en Colombia. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 38(supl.): 89-105.
- STASHENKO, E., B. E. JARAMILLO Y J. R. MARTÍNEZ. 2004. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its *in vitro* antioxidant activity. *J. Chromatog.* 1025: 93-103.
- SUNTRES, Z. E., J. COCCIMIGLIO Y M. ALIPOUR. 2015. The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. *Critical .Reviews in Food Science and Nutrition* 55, 304-318.
- URDANETA, L., D. ARAUJO Y A. DELGADO. 2009. Microorganismos fitopatógenos asociados a hojas y frutos del guayabo (*Psidium guajava* L.) en el municipio Baralt del estado Zulia. *Fitopatol. Venez.* 22: 19-20.

- VARGAS, J., D. RODRÍGUEZ, M. SANABRIA Y J. HERNÁNDEZ. 2009. Efecto de tres extractos vegetales sobre la Sigatoka Negra del plátano (*Musa AAB* cv. Hartón). *Rev. UDO Agríc.* 9 (1): 182-190.
- VIEIRA, L. M., M. S. SOUSA, J. MANCINI-FILHO Y A. LIMA. 2011. Fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro* de polpas de frutos tropicais. *Rev Brasil Fruticultura.* 33:888-897.
- VINNERE, O. 2004. Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi: a study on two extreme cases. Uppsala-weden. 42h. Thesis Doctor of Philosophy. Uppsala University. 72 pp.
- VIVAS, M. D., G. SILVA, H. COSTA, S. F. SILVEIRA Y A. J. PEREIRA. 2006. Inibicao *in vitro* do crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum* por extrato bruto aquoso e oleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf e *Eucalyptus citriodora* Hooker. *Fitopatología Brasileira* 31: 265.
- WHARTON, P. Y J. DIÉGUEZ. 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anales del Jardín Botánico de Madr*



**BOLETÍN DEL CENTRO DE
INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS**

Vol.52 N° 1 _____

*Esta revista fue editada en formato digital y publicada
en abril de 2018, por el **Fondo Editorial Serbiluz,**
Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela*