

(Énfasis en Gestión en recursos Naturales)



**DOCINADE**  
Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo

Tesis de Doctorado

**Potencial fitoprotector de los aceites esenciales  
de diez plantas colombianas en semillas y  
plántulas de Tomate (*Solanum lycopersicum*  
L.)**

**Jovanna Acero Godoy**

**Dr. Tomás de Jesús Guzmán Hernández**  
Director de Tesis

**Dra. Ruth Mélida Sánchez Mora**  
Asesor de Tesis

**Dra. Martha Lucía Posada Buitrago**  
Asesor de Tesis

Bogotá, Colombia, marzo 2023

## **MIEMBROS DEL TRIBUNAL EXAMINADOR**

Dr. José Vega Baudrit  
Representante del Consejo Central de Posgrado

Dr. David Valverde Barquero  
Coordinador del posgrado o su representante

Dr. Tomás de Jesús Guzmán Hernández  
Tutor de tesis

Dra. Martha Lucía Posada Buitrago  
Miembro del Comité Asesor

Dra. Ruth Mélida Sánchez Mora  
Miembro del Comité Asesor

Jovanna Acero Godoy  
Sustentante

## Tabla de contenidos

|   |    |
|---|----|
| Índice de figuras .....   | 7  |
| Índice de tablas.....   | 10 |
| Declaración de autenticidad.....  | 11 |
| Agradecimientos.....  | 12 |
| Dedicatoria .....   | 13 |
| Resumen .....   | 14 |
| Palabras claves .....   | 15 |
| Abstract .....  | 16 |
| Keywords.....   | 17 |
| 1. Introducción.....  | 18 |
| 2. Marco teórico.....   | 20 |
| 2.1. Tomate <i>Solanum lycopersicum</i> L.....  | 20 |
| 2.1.1. Generalidades y ciclo fenológico del cultivo.....  | 21 |
| 2.1.2. Producción de tomate <i>Solanum lycopersicum</i> L.....                                      | 22 |
| 2.2. Microorganismos patógenos del cultivo de tomate.....   | 23 |
| 2.3. <i>Ralstonia solanacearum</i> .....  | 24 |
| 2.3.1. Clasificación de <i>Ralstonia Solanacearum</i> .....   | 24 |
| 2.3.2. Infección por <i>Ralstonia Solanacearum</i> .....  | 25 |
| 2.3.3. Infección por <i>Ralstonia solanacearum</i> en tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.)..... | 27 |
| 2.4. Tratamiento de <i>Ralstonia solanacearum</i> .....   | 28 |
| 2.5. Aceites esenciales características, síntesis y propiedades.....                                | 30 |
| 2.5.1. Aceites esenciales como solución a los plaguicidas químicos convencionales...                | 32 |
| 2.5.2. Aceites esenciales y <i>Ralstonia solanacearum</i> .....                                     | 34 |
| 2.6. Métodos de extracción de los aceites esenciales.....   | 36 |
| 2.6.1. Hidrodestilación.....  | 36 |

|  |    |
|--|----|
| 2.6.2. Destilación por arrastre con vapor. ....                                    | 36 |
| 2.6.3. Hidrodifusión. ....   | 37 |
| 2.6.4. Extracción con solventes. ....  | 37 |
| 2.6.5. Maceración. ....  | 37 |
| 2.6.6. Enfleurage. ....  | 38 |
| 2.6.7. Extracción de fluidos supercríticos. ....                                   | 38 |
| 2.6.8. Líquido de extracción subcrítico. ....                                      | 38 |
| 2.7. Plantas promisorias para la obtención de aceites esenciales en Colombia. .... | 39 |
| 2.7.1. <i>Cymbopogon</i> sp.: ....   | 39 |
| 2.7.2. <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf. ....                                | 40 |
| 2.7.3. <i>Foeniculum vulgare</i> (Mill). ....                                      | 40 |
| 2.7.4. <i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E. Br. ....                                    | 40 |
| 2.7.5. <i>Mentha</i> sp. ....  | 41 |
| 2.7.6. <i>Origanum</i> sp.: ....   | 41 |
| 2.7.7. <i>Origanum majorana</i> : ....   | 42 |
| 2.7.8 <i>Rosmarinus officinalis</i> . ....   | 42 |
| 2.7.9. <i>Tagetes lucida</i> cav. ....   | 43 |
| 2.7.10. <i>Thymus vulgaris</i> : ....  | 43 |
| 3. Objetivos. ....   | 44 |
| 3.1. Objetivo general ....   | 44 |
| 3.2. Objetivos específicos. ....   | 44 |
| 4. Metodología. ....   | 45 |
| 4.3.1. Material vegetal e identificación taxonómica. ....                          | 45 |
| 4.3.2. Extracción y rendimiento de los aceites esenciales. ....                    | 45 |
| 4.3.3. Densidad relativa del aceite esencial 20º C e índice de refracción. ....    | 46 |
| 4.3.4. Cromatografía Gases - Espectrometría de Masas (GC-MS). ....                 | 46 |
| 4.3.5. <i>Ralstonia solanacearum</i> . ....  | 47 |

|  |     |
|--|-----|
| 4.3.6. Método de difusión en agar. ....  | 47  |
| 4.3.7. Determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB), método micro dilución. .... | 48  |
| 4.3.8. Estudio cinético de letalidad bacteriana:.....  | 49  |
| 4.3.9. Prueba de germinación de semilla.....   | 49  |
| 4.3.10. Prueba de infección.....   | 49  |
| 4.3.11. Prueba de bioestimulación de crecimiento.....  | 50  |
| 4.3.12. Análisis estadístico. ....   | 50  |
| 5. Resultados y discusión. ....  | 52  |
| 5.1. Obtención e identificación del material vegetal. ....   | 52  |
| 5.2. Extracción, rendimiento y características físico/químicas de los aceites esenciales: .....                                      | 52  |
| 5.3. Determinación del perfil cromatográfico de los aceites esenciales: .....  | 54  |
| 5.4. Prueba de difusión en agar para <i>R. solanacearum</i> :.....   | 67  |
| 5.5. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida para <i>R. solanacearum</i> .....                           | 75  |
| 5.6. Curvas de letalidad de <i>Ralstonia solanacearum</i> contra los aceites esenciales: .....                                       | 85  |
| 5.7. Porcentaje de crecimiento de semillas: .....  | 97  |
| 5.8. Severidad de la enfermedad en <i>Solanum lycopersicum</i> L. ....   | 101 |
| 5.9. Bioestimulación de plantas de tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.):.....  | 106 |
| 6. Conclusiones y recomendaciones.....   | 110 |
| 6.1. Conclusiones.....   | 110 |
| 6.2. Recomendaciones:.....   | 111 |
| 7. Referencias .....   | 112 |
| 8. Anexos.....   | 136 |
| Anexo 1. Plaza Samper Mendoza. Mercado Nacional de Hierbas.....  | 136 |
| Anexo 2. Certificación taxonómica del material vegetal Herbario nacional colombiano .....  | 136 |

|   |     |
|---|-----|
| Anexo 3. Equipo de destilación por arrastre con vapor.....  | 141 |
| Anexo 4. Equipo de Cromatografía de Gases Masas. PUJ laboratorio de cromatografía<br>.....  | 142 |
| Anexo 5. Cromatogramas GM.....  | 143 |
| Anexo 6. Observación de <i>Ralstonia solanacearum</i> . 3A. Coloración de gram de <i>R. solanacearum</i> bacilos gram negativos. 3B. Crecimiento en agar TCZ..... | 148 |
| Anexo 7. Halos de inhibición producidos por los aceites esenciales y el control.....  | 148 |
| Anexo 8. Curva patrón <i>Ralstonia solanacearum</i> vs absorbancia (600nm).....   | 149 |
| Anexo 9. Siembra de diluciones seriadas, 24 horas después de incubación en pozo.  | 149 |
| Anexo 10. Prueba de infección con los diferentes aceites esenciales .....   | 150 |
| Anexo 11. Productos obtenidos tipo artículos científicos .....  | 152 |

## Índice de figuras

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Ciclo fenológico del cultivo de Tomate <i>Solanum lycopersicum</i> y sus diferentes etapas. Tomado de (Cámara de comercio Bogotá, 2015).....   | 22 |
| Figura 2. Invasión de la planta de tomate por la bacteria <i>R. solanacearum</i> . (A) Primeros estadios de la invasión ingresando por las raíces laterales, <i>R. solanacearum</i> círculos amarillos. (B) Sección transversal de una raíz, multiplicación de <i>R. solanacearum</i> en los espacios intercelulares, causando plasmólisis de las células epidérmicas. (C) Ascenso de la bacteria por el xilema causando obstrucción vascular y marchitamiento. Tomado de (Xue et al., 2020).....  | 28 |
| Figura 3. Producción de compuestos primarios y secundarios para la formación de aceites esenciales (Yin & Dickschat, 2022).....  | 33 |
| Figura 4. Análisis por componentes de los aceites esenciales.....  | 61 |
| Figura 5. Evaluación del porcentaje de inhibición de los aceites esenciales por prueba de ANOVA y Tukey. *Cy: <i>Cymbopogon</i> sp., Tl: <i>Tagetes lucida</i> , Fv: <i>Foeniculum vulgare</i> , Cc: <i>Cymbopogon citratus</i> , Om: <i>Origanum majorana</i> , Me: <i>Mentha</i> sp., Or: <i>Origanum</i> sp., La: <i>Lippia alba</i> , R: <i>Rosmarinus officinalis</i> , Tv: <i>Thymus vulgaris</i> , Rf: rifampicina; los números corresponden a las concentraciones de los aceites esenciales. *Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. Recuadro rojo tratamientos sobresalientes, recuadro azul testigo..... | 69 |
| Figura 6 Comparación del aceite esencial de Cc: <i>Cymbopogon citratus</i> en sus diferentes concentraciones contra Rf: rifampicina. *Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.....   | 70 |
| Figura 7. Porcentaje de inhibición entre La: <i>Lippia alba</i> y Rf: rifampicina. *letras diferentes presentan diferencias estadísticamente significativas. ....  | 70 |
| Figura 8. Diferencias estadísticas entre RO: <i>Rosmarinus officinalis</i> y Rf: rifampicina. *Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. ....   | 71 |
| Figura 9. Comparación del aceite esencial de Tl: <i>Tagetes lucida</i> en sus diferentes concentraciones contra rifampicina. *Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. ....  | 71 |
| Figura 10. Análisis de conglomerados con respecto a las UFC contra los diferentes aceites esenciales.....  | 81 |
| Figura 11. Curva de letalidad de CC: <i>Cymbopogon citratus</i> . CMB: concentración mínima inhibitoria, CMI: concentración mínima bactericida. ....   | 86 |

|   |     |
|---|-----|
| Figura 12. Curva de letalidad de FV: <i>Foeniculum vulgare</i> . CMB: concentración mínima inhibitoria, CMI: concentración mínima bactericida. ....   | 87  |
| Figura 13. Curva de letalidad de OR: <i>Origanum sp.</i> , CMB: concentración mínima inhibitoria, CMI: concentración mínima bactericida. ....   | 87  |
| Figura 14. Curva de letalidad TI: <i>Tagetes lucida</i> . CMB: concentración mínima inhibitoria, CMI: concentración mínima bactericida. ....  | 88  |
| Figura 15. Curva de letalidad LA: <i>Lippia alba</i> . CMB: concentración mínima inhibitoria, CMI: concentración mínima bactericida.....  | 88  |
| Figura 16. Curva de letalidad CY: <i>Cymbopogon sp.</i> CMB: concentración mínima inhibitoria, CMI: concentración mínima bactericida. ....  | 89  |
| Figura 17. Curva de letalidad OM: <i>Origanum majorana</i> . CMB: concentración mínima inhibitoria, CMI: concentración mínima bactericida. ....   | 89  |
| Figura 18. Curva de letalidad RO: <i>Rosmarinus officinalis</i> . CMB: concentración mínima inhibitoria, CMI: concentración mínima bactericida. ....  | 90  |
| Figura 19. Curva de crecimiento de TO: <i>Thymus vulgaris</i> . CMB: concentración mínima inhibitoria, CMI: concentración mínima bactericida. ....  | 90  |
| Figura 20. Curva de crecimiento de ME: <i>Mentha sp.</i> CMB: concentración mínima inhibitoria, CMI: concentración mínima bactericida. ....   | 91  |
| Figura 21. Tratamientos cuyos resultados en las curvas de letalidad son similares al control negativo. *Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. Cy: <i>Cymbopogon sp.</i> , TI: <i>Tagetes lucida</i> , Fv: <i>Foeniculum vulgare</i> , Cc: <i>Cymbopogon citratus</i> , Om: <i>Origanum majorana</i> , Me: <i>Mentha sp.</i> , Or: <i>Origanum sp.</i> , La: <i>Lippia alba</i> , R: <i>Rosmarinus officinalis</i> , Tv: <i>Thymus vulgaris</i> , Rf: rifampicina. Recuadro azul control químico, recuadro rojo tratamientos sobresalientes. .... | 94  |
| Figura 22. Porcentajes de germinación de semilla de tomate en 4 tiempos. *Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. Cy: <i>Cymbopogon sp.</i> , TI: <i>Tagetes lucida</i> , Fv: <i>Foeniculum vulgare</i> , Cc: <i>Cymbopogon citratus</i> , Om: <i>Origanum majorana</i> , Me: <i>Mentha sp.</i> , Or: <i>Origanum sp.</i> , La: <i>Lippia alba</i> , Ro: <i>Rosmarinus officinalis</i> , Tv: <i>Thymus vulgaris</i> , Ace: acetona. ....   | 99  |
| Figura 23. Índice de severidad presentado por <i>Ralstonia solanacearum</i> en plantas de tomate con 10 aceites esenciales. *Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. Cy: <i>Cymbopogon sp.</i> , TI: <i>Tagetes lucida</i> , Fv: <i>Foeniculum vulgare</i> , Cc: <i>Cymbopogon citratus</i> , Om: <i>Origanum majorana</i> , Me: <i>Mentha sp.</i> , Or: <i>Origanum sp.</i> , La: <i>Lippia alba</i> , Ro: <i>Rosmarinus officinalis</i> , Tv: <i>Thymus vulgaris</i> , Ace: acetona. ....  | 102 |



Figura 24. Área bajo la curva de plantas de tomate infectadas con *Ralstonia solanacearum* y tratadas con aceites esenciales. \*Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. Cy: *Cymbopogon* sp., Tl: *Tagetes lucida*, Fv: *Foeniculum vulgare*, Cc: *Cymbopogon citratus*, Om: *Origanum majorana*, Me: *Mentha* sp., Or: *Origanum* sp., La: *Lippia alba*, Ro: *Rosmarinus officinalis*, Tv: *Thymus vulgaris*, Ace: acetona. .... 103

Figura 25. Número de hojas por planta promedio, sobrevivientes a la enfermedad. \*Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. Cy: *Cymbopogon* sp., Tl: *Tagetes lucida*, Fv: *Foeniculum vulgare*, Cc: *Cymbopogon citratus*, Om: *Origanum majorana*, Me: *Mentha* sp., Or: *Origanum* sp., La: *Lippia alba*, Ro: *Rosmarinus officinalis*, Tv: *Thymus vulgaris*, Ace: acetona. .... 104

Figura 26. Determinación de plantas vivas post-enfermedad. \*Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. Cy: *Cymbopogon* sp., Tl: *Tagetes lucida*, Fv: *Foeniculum vulgare*, Cc: *Cymbopogon citratus*, Om: *Origanum majorana*, Me: *Mentha* sp., Or: *Origanum* sp., La: *Lippia alba*, Ro: *Rosmarinus officinalis*, Tv: *Thymus vulgaris*, Ace: acetona..... 105

Figura 27. Peso seco de plántulas de tomate postratamiento con aceites esenciales. No se presentan diferencias estadísticamente significativas. Cy: *Cymbopogon* sp., Tl: *Tagetes lucida*, Fv: *Foeniculum vulgare*, Cc: *Cymbopogon citratus*, Om: *Origanum majorana*, Me: *Mentha* sp., Or: *Origanum* sp., La: *Lippia alba*, Ro: *Rosmarinus officinalis*, Tv: *Thymus vulgaris*, Ace: acetona..... 107

Figura 28. Número de hojas en plántulas de tomate tratadas con aceites esenciales. No se presentan diferencias estadísticamente significativas. Cy: *Cymbopogon* sp., Tl: *Tagetes lucida*, Fv: *Foeniculum vulgare*, Cc: *Cymbopogon citratus*, Om: *Origanum majorana*, Me: *Mentha* sp., Or: *Origanum* sp., La: *Lippia alba*, Ro: *Rosmarinus officinalis*, Tv: *Thymus vulgaris*, Ace: acetona..... 107

## Índice de tablas

|  |    |
|--|----|
| Tabla 1. Producción, rendimiento y área cosechada de tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.) 2017-2020 en Colombia..... | 23 |
| Tabla 2. Severidad de la enfermedad para <i>Ralstonia solanacearum</i> .....   | 50 |
| Tabla 3. Rendimiento Aceites esenciales/Biomasa, densidad e índice de refracción.....                                    | 53 |
| Tabla 4. Resumen del compuesto principal y secundario de cada AE. ....   | 55 |
| Tabla 5. Cuantificación de compuestos por medio de GC-MS, de las 10 plantas.....   | 56 |
| Tabla 6 Porcentaje de efecto inhibitor de los aceite esencial contra <i>Ralstonia solanacearum</i> . ....                | 68 |
| Tabla 7 Determinación de la densidad óptica y UFC para cada uno de los aceites esenciales .....                          | 76 |
| Tabla 8. CMI y CMB para <i>Ralstonia solanacearum</i> .....  | 77 |
| Tabla 9. Análisis de conglomerados para la variable UFC de todos los tratamientos.....                                   | 80 |
| Tabla 10. Tratamientos con mayor efecto de inhibición contra <i>Ralstonia solanacearum</i> ..                            | 93 |
| Tabla 11. Porcentaje de germinación de las semillas de tomate en 4 tiempos para los aceites esenciales (CMI).....        | 98 |

## Declaración de autenticidad

Yo Jovanna Acero Godoy, estudiante del Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo, declaro que la Tesis Doctoral que presenté para su exposición y defensa titulada “Potencial fitoprotector de los aceites esenciales de diez plantas colombianas en semillas y plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)” y comité asesor de tesis son el Dr. Tomás de Jesús Guzmán Hernández (director de tesis), Dra. Ruth Mélida Sánchez Mora (asesora) y la Dra. Martha Lucía Posada Buitrago (asesora), es original y que todas las fuentes utilizadas para su realización han sido debidamente citadas en el mismo. Este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en esta u otra institución.

Bogotá, Colombia a 31 de mayo de 2023.

Jovanna Acero Godoy

## Agradecimientos

A la Facultad de ciencias de la salud de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; a la Dra. Elizabeth Gil Archila, Dr. Luis Enrique Cuca Suárez, Dr. Wilman Antonio Delgado Ávila, Dr. Mauricio Soto Suárez, quienes me abrieron las puertas de sus laboratorios en la Pontificia Universidad Javeriana, Universidad Nacional de Colombia y Centro de investigación AGROSAVIA (Bogotá-Colombia); al Dr. Tomás de Jesús Guzmán Hernández mi director de tesis, a mis asesoras Martha Lucía Posada Buitrago directora del grupo de investigación CEPARIUM y Ruth Mélida Sánchez Mora directora del grupo de investigación Biotecnología y Genética de la UCMC, a David Sánchez, Magda Rocío Gómez Marroquín, Yajaira Romero Barrera, Ligia Consuelo Sánchez Leal, Rafael Cely Bonilla, Jenny Granados Herrera, Erika Patricia Martínez Lemus, Julieth Marcela Mayorga Rodríguez, Luisa Acero Arias, Mariana Caicedo Cubillos, Andrea Lovera Sotelo, Eliana Torres, Juanita Méndez, a mis compañeros del doctorado por su apoyo incondicional, al personal auxiliar de todos los laboratorios por donde pasé.

## **Dedicatoria**

A mi familia, María Teresa Godoy López, Paula Helena Gómez Acero, David Sánchez, Manlio Acero Larrota y Alan Godoy y su esposa.

## Resumen

El fitopatógeno *Ralstonia solanacearum*, ataca una amplia variedad de cultivos incluyendo el tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en el cual produce marchitez vascular y los métodos de control químico usados para combatirlo afectan contra el medio ambiente, el ser humano y los animales. Por esta razón, esta investigación presenta como alternativa a los aceites esenciales. Dichos elementos son una mezcla de compuestos con propiedades antimicrobianas, antifúngicas y antioxidantes entre otras. El objetivo fue determinar el efecto antibacteriano de diez aceites esenciales contra *Ralstonia solanacearum* e inhibir “*in vivo*” la enfermedad en la planta. Se identificaron taxonómicamente 10 plantas, se extrajeron los aceites esenciales por arrastre con vapor, se determinó el rendimiento de producción (% p/p), la densidad y el índice de refracción; se caracterizaron los compuestos por cromatografía CG-MS. Además, se realizaron pruebas de porcentaje de inhibición del microorganismo en soporte sólido, concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) por medio de la técnica de Kirby Bauer y se evaluaron curvas de letalidad a 72 horas de ensayo para los 10 aceites esenciales. La CMI de cada aceites esencial se evaluó en semillas de *Solanum lycopersicum* L. para determinar el porcentaje de germinación a diferentes tiempos de inmersión (1,0, 5,0, 30 y 60 minutos); posteriormente, se infectaron plántulas de tomate con 21 días de crecimiento con *Ralstonia solanacearum* a una concentración de  $1 \times 10^9$  UFC/mL y como tratamiento, se asperjaron los aceites esenciales en las CMI de manera edáfica cada 3 días y se determinó la escala de severidad de la enfermedad por parte del patógeno. Para finalizar se utilizaron los aceites esenciales a las CMI para evaluar la estimulación del crecimiento en plantas sanas con 21 días de crecimiento. Para las diferentes pruebas se realizaron análisis de varianza a un nivel de significancia de 0,05, prueba de comparación múltiple de Tukey y Dunnett; análisis de componentes principales con el objetivo de reducir la dimensionalidad y con las puntuaciones de la primera componente se realizó análisis de conglomerado empleando el método de varianza mínima de Ward y la distancia Euclídea al cuadrado. Los resultados arrojaron que el mayor rendimiento del aceite esencial fue para *Rosmarinus officinalis* (0,86%) en cambio para *Mentha* sp., y *Foeniculum vulgare* los rendimientos estuvieron al orden de 0,11%; entre los componentes mayoritarios que se identificaron en los aceites esenciales estaban metil chavicol, geranial, Anetol E, limoneno,  $\gamma$ -terpineno,  $\alpha$ -pineno, mentol y mentona y su concentración variaba dependiendo de la planta. Para la prueba de porcentaje de inhibición, el aceite esencial que produjo el mayor

resultado fue *Cymbopogon citratus* (180 mg/mL) con 184,94% (halo de inhibición 32,15 mm). Para la prueba de CMI y CMB, la concentración más baja de los aceites esenciales fue *Cymbopogon* sp., (CMI 0,315 mg/mL y CMB 0,625 mg/mL) y para las curvas de letalidad se utilizó tanto las CMI y CMB, los aceites esenciales de *Cymbopogon citratus*, *Foeniculum vulgare*, *Lippia alba*, *Origanum* sp., y *Tagetes lucida*, produjeron inhibición de crecimiento a las 72 h de ensayo. El porcentaje de germinación de todos los aceites esenciales fue mayor en un minuto (81,53%) con respecto a los otros tiempos. El aceite esencial que generó mayor porcentaje de supervivencia de las plantas y menor presentación de la enfermedad fue *Origanum* sp., con un 40% de plantas sanas, sin embargo, no se presentó diferencia significativa con los demás aceites esenciales. Según este estudio, es el de *Origanum* Sp. el aceite esencial que tiene mayor potencial en la parte investigativa y comercial.

## Palabras claves

Antimicrobianos; bioestimulación, bioplaguicidas; monoterpenos; sesquiterpenos.

## Abstract

The phytopathogen *Ralstonia solanacearum* attacks a wide variety of crops including tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in which it produces vascular wilt and the chemical control methods used to combat it are harmful to the environment, humans and animals. For this reason, this research presents essential oils as an alternative. These elements are a mixture of compounds with antimicrobial, antifungal and antioxidant properties, among others. The objective of the present work was to determine the antibacterial effect of ten essential oils against *Ralstonia solanacearum* and to inhibit "in vivo" the disease in the plant. Ten plants were taxonomically identified, the essential oils were extracted by steam entrainment, the production yield (% w/w), density and refractive index were determined; the compounds were characterized by GC-MS chromatography. In addition, tests were carried out for percentage inhibition of the microorganism on solid support, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) by Kirby Bauer technique and lethality curves were evaluated at 72 hours of testing for the 10 essential oils. The MIC of each essential oil was evaluated on seeds of *Solanum lycopersicum* L. to determine the percentage of germination at different immersion times (1.0, 5.0, 30 and 60 minutes); subsequently, tomato seedlings with 21 days of growth were infected with *Ralstonia solanacearum* at a concentration of  $1 \times 10^9$  CFU/mL and as a treatment, the essential oils were sprayed on the MICs in an edaphic manner every 3 days and the scale of severity of the disease by the pathogen was determined. Finally, the essential oils were used at the CMI to evaluate growth stimulation in healthy plants with 21 days of growth. For the different tests, analysis of variance at a significance level of 0.05, Tukey and Dunnett's multiple comparison test, analysis of principal components with the objective of reducing dimensionality and with the scores of the first component, cluster analysis using Ward's minimum variance method and Euclidean squared distance were performed. The results showed that the highest yield of essential oil was for *Rosmarinus officinalis* (0.86%) while for *Mentha* sp. and *Foeniculum vulgare* the yields were in the order of 0.11%; among the major components identified in the essential oils were methyl chavicol, geranial, Anethole E, limonene,  $\gamma$ -terpinene,  $\alpha$ -pinene, menthol and menthone and their concentration varied depending on the plant. For the percentage inhibition test, the essential oil that produced the highest result was *Cymbopogon citratus* (180 mg/mL) with 184.94% (inhibition halo 32.15 mm); for the MIC and CMB test, the lowest concentration of the essential oils was *Cymbopogon* sp., (MIC 0.315 mg/mL and BMC 0.625 mg/mL); for the lethality curves both



MIC and BMC were used, the essential oils of *Cymbopogon citratus*, *Foeniculum vulgare*, *Lippia alba*, *Origanum* sp., and *Tagetes lucida*, produced growth inhibition at 72 h of assay. The germination percentage of all essential oils was higher at one minute (81.53%) with respect to the other times. The essential oil that generated the highest percentage of plant survival and the lowest disease presentation was *Origanum* sp., with 40% of healthy plants; however, there was no significant difference with the other essential oils. According to this study, *Origanum* sp., is the essential oil with the greatest research and commercial potential.

## Keywords

Antimicrobials, biopesticides; biostimulation, monoterpenes; sesquiterpenes;

## 1. Introducción.

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.), clasificado anteriormente como *Lycopersicum esculentum* Mill, pertenece a la familia de las Solanáceas; es una planta originaria de América y cultivada en todo el mundo, siendo China, India y Estados Unidos los mayores productores. En Colombia, el llamado tomate “chonto”, es la segunda hortaliza de mayor importancia, está presente en 24 de los 32 departamentos; se cultiva entre los 800 y 2400 m.s.n.m. a libre exposición, con semicubierta y bajo invernadero. Se calcula que para el año 2020 se produjeron en el país 576.633 toneladas. Norte de Santander es el departamento con mayor producción, seguido por Antioquia y Boyacá. En Colombia existen diferentes variedades cultivadas de tomate y el tipo “chonto” posee una alta demanda de consumo, lo que lo convierte en una de las hortalizas de mayor importancia en el PIB agrícola. (Burbano E. & Vallejo Cabrera, 2017; FAO, 2022; Guzmán et al., 2017).

El cultivo de tomate es altamente susceptible a enfermedades tanto fúngicas como bacterianas, entre las cuales se encuentran hongos fitopatógenos transmitidos por el suelo como *Pythium* spp., *Sclerotium rolfisii*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria solani* y *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp., y *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, que causan enfermedades tales como *damping off* o marchitamiento fúngico, pudrición de raíz, tallo y marchitez. Entre las bacterias que afectan el cultivo, la literatura menciona *Pseudomonas syringae* pv. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Ralstonia solanacearum*. Para efectos de esta investigación, la observación se centra en la última bacteria mencionada. (Prasad et al., 2017).

Debido a lo anterior, las plagas y enfermedades producidas por nemátodos, hongos, oomicetos, bacterias y virus que afectan el cultivo de tomate disminuyen el rendimiento de este y aumentan los costos de producción. Por lo tanto, el agricultor debe utilizar mayor cantidad de plaguicidas y fungicidas (organofosforados y carbamatos) que son persistentes en altas concentraciones en suelo, agua y plantas. Además, algunos microorganismos que afectan diversos cultivos han modificado las rutas metabólicas por medio de genes de resistencia a los tratamientos convencionales, lo cual hace cada vez más difícil erradicarlos y agota las opciones de tratamiento ante las enfermedades que se presentan. Las anteriores condiciones conllevan a un aumento en la dosis del plaguicida en el cultivo, lo que genera afectación al medio ambiente y al ser humano (Huttner et al., 2013).

Como una forma de enfrentar la problemática, se ha visto la necesidad de buscar plaguicidas de tipo biológicos que disminuyan el daño en el medio ambiente, el uso de sustancias tóxicas, los costos de producción y aumenten la productividad del cultivo. En este sentido, los aceites esenciales de plantas aromáticas se presentan como una posible solución a los tratamientos convencionales, con resultados que han demostrado ser eficaces gracias a varios estudios que hacen uso de estos mismos, corroborando tanto *in vitro* como *in vivo* sus propiedades anti-insecticidas, antifúngicas, antibacterianas, antiprotozoales, antioxidantes, entre otras. Esto por causa de la gran variedad de compuestos volátiles como citral, carvona, mirceno que actuarían como inhibidores del crecimiento de los microorganismos fitopatógenos.

Dada la gran biodiversidad vegetal que tiene Colombia, el presente estudio propone la extracción de aceites esenciales de diez plantas para ser utilizadas contra *Ralstonia solanacearum*, tanto en laboratorio como en los individuos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) infectados con el patógeno. De esta forma, se propone en este análisis determinar si alguno de los diez aceites produce actividad antimicrobiana contra *Ralstonia solanacearum* “*in vitro*” y una vez obtenidas las concentraciones a la que los aceites generan actividad antimicrobiana, realizar pruebas “*in vivo*” con plantas sanas de tomate infectadas con el patógeno.

A partir de lo descrito se precisa si los aceites esenciales pueden disminuir el porcentaje de aparición y severidad de la enfermedad en plantas y servir como bioestimulantes de las mismas. Al mismo tiempo, se genera un aporte al conocimiento debido a que los datos obtenidos en la presente investigación permitirán demostrar que los aceites esenciales son antimicrobianos contra el patógeno vascular *Ralstonia solanacearum* y pueden ser utilizados en campo. Además, se resalta el menor impacto ambiental de los aceites esenciales versus los plaguicidas químicos convencionales.

## 2. Marco teórico.

En la agricultura, los primeros químicos que se usaron en cultivos como el tomate *Solanum lycopersicum* L. fueron polvos o extractos de plantas que se utilizaron antes del surgimiento de los compuestos orgánicos sintéticos en la primera mitad del siglo XX. Entre estas plantas estuvieron el tabaco, el crisantemo y la rotenona. Estas fueron usadas contra distintos insectos. A medida que las civilizaciones avanzaban y se desarrollaba la tecnología industrial lo hacía también la agricultura y se desarrollaron plaguicidas químicos sintéticos que disminuyeron las plagas en los cultivos de importancia económica, pero afectaron al medio ambiente, a los animales y al ser humano (Villa-Martínez et al., 2014).

Con el comienzo del nuevo milenio y el deterioro de los recursos naturales surge la preocupación por el desarrollo sostenible para la preservación del medio ambiente y el planteamiento de una agricultura que minimice su impacto en los ecosistemas. Por tal motivo se proponen nuevas alternativas de producción y control de plagas que produzcan un mínimo impacto ambiental.

Es en este marco en el que propuestas como la descrita en este trabajo cobran singular importancia. Tal hecho se sustenta en que los aceites esenciales obtenidos de plantas poseen propiedades bactericidas que representan una nueva alternativa para el control de microorganismos patógenos y un menor impacto sobre el ambiente, los alimentos y la salud humana (Ambrosio et al., 2017). Adicionalmente, se ha demostrado que su uso es eficaz contra patógenos que producen enfermedades en las plantas como el tomate *Solanum lycopersicum* L. (Villa-Martínez et al., 2014).

### 2.1. Tomate *Solanum lycopersicum* L.

Es una planta originaria de los Andes e importada a Europa en el siglo XVI. El tomate es considerado un alimento protector por su valor nutritivo y sus nutrientes como betacarotenos, flavonoides, vitaminas, licopeno, este último ha demostrado tener actividad antioxidante y anticancerígena. (Gerszberg et al., 2015).

Pertenece a la división Magnoliophyta, clase Magnoliopsida, orden Solanales, familia Solanáceae, en 1753 Linnaeus lo clasificó en el género *Solanum* como *Solanum lycopersicum*. Por su parte, en 1754 Philip Miller lo renombró como *Lycopersicum esculentum* Mill. Al mismo tiempo, gracias a las herramientas de genómica se determinó que era una solanácea y se reintrodujo a dicho género.

Es una planta diploide con  $2n=24$  cromosomas, dicotiledónea, herbácea y perenne, que se desarrolla de forma rastrera o semierecta o erecta. Su tallo, inicialmente de apariencia herbácea, es grueso, pubescente, anguloso y de color verde, mide de 2,0 cm a 4,0 cm de ancho. Del tallo principal se desprenden tallos secundarios, la hoja es pinnada y compuesta, presenta de 7 a 9 folíolos peciolados lobulados con borde dentado, alterno, opuesto y de color verde, está recubierta de pelos glandulares, la flor es perfecta y regular, posee sépalos (5-6), pétalos (5) y estambres (5-6) se insertan en la base del ovario (2 o más segmentos) y están dispuestos de forma helicoidal, las flores se agrupan en inflorescencias. (Cámara de comercio Bogotá, 2015; López Marín, 2017).

El sistema radicular está compuesto de una raíz principal, raíces secundarias y adventicias que absorben y transportan nutrientes; su estructura presenta epidermis, córtex y cilindro vascular. El fruto en estado inmaduro es verde; y maduro, en su mayoría, es rojo, aunque algunas veces presenta otras tonalidades. Es una baya bilocular o plurilocular sub esférica, globosa o alargada que puede alcanzar un peso desde 20 g hasta 600 g. El fruto está constituido por el pericarpio, tejido placentario y las semillas (2,0 x 4,0 x 5,0 mm) que suelen ser ovoides, comprimidas y parduzcas las cuales están embebidas en masa mucilaginosas. Cada semilla está compuesta por el embrión, el endospermo y la cubierta seminal. La composición nutricional de las semillas suele ser proteína, 32%, grasas totales 27%, y fibra, 18%. Además, de ácido gálico, ácido *trans*-cimánico y quercetina. (Kumar et al., 2021; López Marín, 2017).

### **2.1.1. Generalidades y ciclo fenológico del cultivo.**

El tomate es una hortaliza con alta diversidad genética, la rusticidad de la planta permite que sea poco exigente a las condiciones del suelo y se puede desarrollar al aire libre o bajo condiciones de invernadero. Sin embargo, necesita un buen drenaje. El pH del suelo óptimo oscila entre 6,0 y 6,5. El cultivo prospera más fácilmente en climas secos con una temperatura ideal entre 18 y 30° C. Por su parte, la humedad relativa debe oscilar entre 60% y 80%. En lo que tiene que ver con la iluminación, requiere 6 horas diarias de luz. Para su correcto desarrollo, también necesita una precipitación anual entre 1500 y 2500 mm y una conductividad eléctrica que oscile entre 1,5 y 20 dS/m. (Cámara de comercio Bogotá, 2015; Guzmán et al., 2017).

El cultivo presenta cinco etapas que comienzan por el establecimiento de la planta la cual germinará de cuatro a siete días después de ser plantada. El proceso continúa el crecimiento vegetativo en el cual la planta crece, florece y desarrolla frutos (hasta 120 días); inicia la floración y cuaja (etapa en la que se puede realizar la polinización) esta se da entre el día 20 al 40, continúa el desarrollo y crecimiento del fruto en el que se acumula la mayor cantidad de materia seca por último termina con la madurez fisiológica y cosecha que se logra entre 80 a 120 días después del trasplante (figura 1) (Burbano E. & Vallejo Cabrera, 2017).

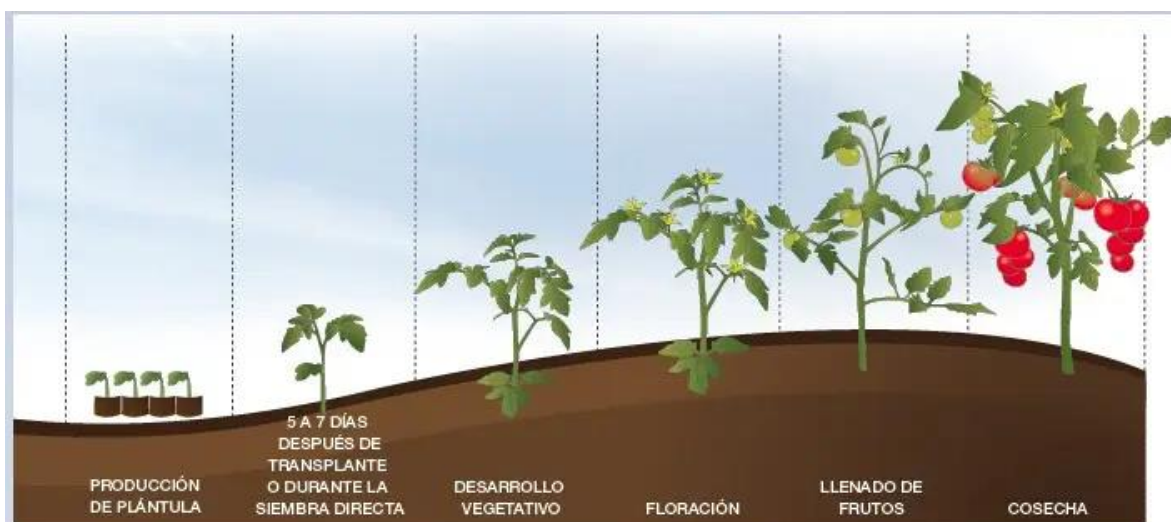


Figura 1. Ciclo fenológico del cultivo de Tomate *Solanum lycopersicum* y sus diferentes etapas. Tomado de (Cámara de comercio Bogotá, 2015).

### 2.1.2. Producción de tomate *Solanum lycopersicum* L.

El tomate *Solanum lycopersicum* L., es una de las hortalizas más importantes en el mundo debido a su área sembrada, su valor nutricional y amplia distribución geográfica (Burbano E. & Vallejo Cabrera, 2017). Para su almacenamiento y transporte los frutos deben estar sanos, limpios y poseer firmeza acorde con su grado de madurez, además, es necesario minimizar las operaciones de manipulación del producto y mantener la cadena de frío. (Cámara de comercio Bogotá, 2015). En Colombia, el tomate ocupa un renglón importante en la economía Nacional. Los departamentos con mayor producción son Norte de Santander, Antioquia y Boyacá. Estos dos últimos trabajan en su mayoría en condiciones de invernadero. En cuanto a la presencia en el mercado internacional, el tomate es exportado a Antillas Holandesas, Aruba, Ecuador y España (tabla1) (FAO, 2022). La distribución porcentual de costos de producción en el cultivo de tomate en Colombia indica

que la mano de obra es el rubro con mayor participación con un 45,04%. Los materiales de infraestructura representan el 28,66%, los insumos el 18,96%; otros costos, el 8,32% (DANE, 2022).

Tabla 1. Producción, rendimiento y área cosechada de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) 2017-2020 en Colombia.

|                                   | 2017   | 2018   | 2019   | 2020   |
|-----------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| <b>Producción de tomate (ton)</b> | 473772 | 596279 | 556692 | 576733 |
| <b>Rendimiento (hg/ha)</b>        | 476680 | 592487 | 656631 | 656647 |
| <b>Área cosechada (ha)</b>        | 9939   | 10064  | 8478   | 8783   |

Fuente: (FAO, 2022).

## 2.2. Microorganismos patógenos del cultivo de tomate.

Existe una gran variedad de organismos y microorganismos que afectan el cultivo de tomate y la postcosecha. Tal afección se da por diferentes condiciones de base: (a) un microorganismo capaz de producir enfermedad por diversos factores de virulencia; (b) una planta incapaz de defenderse por condiciones de estrés; y (c) un ambiente físico químico hostil. A partir de las condiciones descritas, la enfermedad se desarrolla en distintas etapas (infección, colonización, reproducción, supervivencia y diseminación). (Burbano E. & Vallejo Cabrera, 2017).

Entre los hongos que producen enfermedades en el tomate se encuentran *Alternaria solani* (tizón temprano), *Stemphylium solani* (mancha gris), *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (marchitez), *Oidium lycopersici* y *Oidium silicua* (polvillo o cenicilla) y *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., y *Pythium* spp., que producen secadera en plántulas o mal de los almácigos. No obstante, se resalta el hecho de que no son los únicos hongos que afectan el cultivo.

Otro grupo de importancia que altera las condiciones del cultivo de tomate es el que se refiere a los virus. En este conjunto se encuentran TSWV (Virus del bronceado del tomate) y ToMV (Virus del mosaico del tomate) que producen la peste negra de la planta de tomate; y el oomiceto *Phytophthora infestans* que causa tizón tardío.

Para terminar, se tiene en cuenta que están bacterias tales como *Pseudomonas corrugata* (médula hueca); *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (chancro bacteriano); *Xanthomonas* spp., (mancha bacteriana); *Erwinia carotovora* subsp.; *carotovora*

(podredumbre blanda); y *Ralstonia solanacearum* (marchitamiento bacteriano), que es el objeto de investigación del presente trabajo. (Cámara de comercio Bogotá, 2015).

### **2.3. *Ralstonia solanacearum*.**

*Ralstonia solanacearum* E.F.(Smith) Yabuuchi et al. Emend. Safni et al. también tuvo otros nombres como *Bacillus solanacearum* (Smith 1896); *Burkholderia solanacearum* (Smith 1896) (Yabuuchi y Arakawa 1993); *Pseudomonas solanacearum* (Smith 1896) (Smith 1914); y, por último, *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) (Yabuuchi et al. 1995). Inicialmente estaba clasificada como miembro del género *Bacterium*, pero gracias a métodos basados en DNA se determinó que pertenecía al filo proteobacteria, clase  $\beta$ -proteobacteria, orden Burkholderiales, familia Burkholderiaceae. Entonces se transfirió al género *Burkholderia* y posteriormente al género *Ralstonia*. Es un bacilo Gram negativo, aerobio, no esporulado, móvil. Su tamaño oscila entre 0,5 a 0,7 x 1,5 a 2,0  $\mu\text{m}$ . En lo que tiene que ver con la temperatura de crecimiento, está entre 27° C y 32° C. La bacteria tiene la capacidad de oxidar glucosa; es oxidasa y catalasa positivas. Adicionalmente, el bacilo es reductor de nitratos, e hidroliza el almidón (Yabuuchi et al., 1995).

Con la disposición anterior, el bacilo forma un complejo de especies *R. solanacearum* (RSSC). Es decir, crea un grupo de aislamientos relacionados cuyos miembros individuales pueden representar más de una especie. Con esas características, puede infectar más de 50 familias y 200 especies de plantas diferentes. La bacteria está clasificada en diferentes filotipos. Crece de manera selectiva en el medio de cultivo Tetrazolium (TZC), en el cual produce una colonia entre 48 y 72 horas a 28° C, la cual es cremosa, elevada con centro rojizo y bordes semitransparentes (García et al., 2019; Manickam et al., 2021; Puigvert et al., 2021; Safni et al., 2014; Sreedevi et al., 2013).

#### **2.3.1. Clasificación de *Ralstonia Solanacearum*.**

*R. solanacearum* ha sido clasificada en 5 razas de acuerdo con el huésped que infectan. La raza 1 ataca un gran número de plantas (papa, tomate, berenjena, tabaco, jengibre y algunas malezas) y es prevalente en el sureste de Estados Unidos de América como también en Asia, África y Suramérica. La raza 2 afecta a musáceas y heliconias; prevalece principalmente en sureste de África y América Central. La raza 3 ataca exclusivamente a la papa y se asocia a tomate en ambientes fríos. La raza 4 está asociada a jengibre y se encuentra en Asia y Hawái. Finalmente, la raza 5 se encuentra en China y afecta principalmente el cultivo de mora (Safni et al., 2014).



Para ampliar la información anterior, se tiene en cuenta que la bacteria está dividida en 6 biovares, de acuerdo con sus propiedades bioquímicas y capacidad de utilización de diversas fuentes de carbono. Desde el punto de vista genético, la especie se ha segmentado en dos divisiones (I y II). La división I está representada por los biovares 3, 4 y 5 que se han encontrado en Asia; y la división II está compuesta por los biovares 1, 2 y N2 de origen americano. No obstante, dentro del biovar 1 existe un subgrupo de origen africano. También existen 4 filotipos debido a su procedencia geográfica (Asia, América, Indonesia y África). Cada filotipo está conformado por secuevares o grupo de cepas altamente conservadas en una región del genoma correspondiente al gen endoglucanasa (*egl*). Esto es lo que tiene que ver con el caso de *R. solanacearum*. (Ceballos et al., 2014; Safni et al., 2014; Shekhar Solankey & Shamim, 2022).

La secuenciación del genoma completo de *R. solanacearum* determinó que consta de dos unidades replicativas y un cromosoma de aproximadamente 3,7 Mb. Además de un mega plásmido de 1,6 a 2,3 MB que en conjunto codifican aproximadamente 5000 proteínas. En su genoma se encontraron entre 400 a 600 genes únicos. En cuanto al desarrollo de la afección, se conocen dos vías de secreción de proteínas tipo II (T2SS) y III (T3SS), las cuales son de gran importancia para el progreso de la enfermedad en las diferentes plantas que infecta. Del avance de la infección se hablará en el siguiente apartado (Baroukh et al., 2022; Corral et al., 2020; Safni et al., 2014).

### **2.3.2. Infección por *Ralstonia Solanacearum*.**

*R. solanacearum* está incluida en la lista A2 de la European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) de plagas recomendadas para la reglamentación (EPPO, 2018). Esta bacteria es un microorganismo que sobrevive en suelo y agua por largos periodos de tiempo. Dicha característica, le permite infectar con mayor facilidad las raíces de la planta al detectar los exudados radiculares. En esta medida, penetra través de la zona de elongación radicular o puntos de emergencia secundaria de la raíz. Los espacios intercelulares de la raíz (apoplastos) son la primera línea de defensa para evitar la invasión del fitopatógeno, sin embargo, una vez el mismo coloniza el cilindro vascular se extiende hacia el xilema. El xilema presenta tubos denominados tráqueas y traqueidas con paredes lignificadas y perforaciones laterales que permiten el transporte de agua. Allí, en el líquido, alcanza una alta densidad celular y ocluye la vasculatura por la producción de un exopolisacárido (EPS I); produce, además, poligalacturonasas (Pgl A, Peh B y Peh C), endoglucanasas (Egl) y una pectinmetilesterasa (Pme). Como elemento adicional, también

fabrica polifenol oxidasas (PPOs) (lacasas y tirosinasas) y exoglucanasa (1-4  $\beta$  celobiosidasa) que ayudan en la degradación del pared celular. Como elemento adicional está la creación de tílides que contribuyen a evitar la movilización de nutrientes y agua produciendo estrés hídrico. La cadena de deterioro causada por el patógeno agudiza la sintomatología de la marchitez y por consiguiente acelera la muerte de la planta (Baroukh et al., 2022; Puigvert et al., 2021; Sreedevi et al., 2013; Thomas & Upreti, 2014).

Con respecto a los sistemas de expresión de proteínas II y III, el modo de secreción de proteínas tipo II (T2SS) ayuda en la translocación de exoproteínas por la membrana externa de la bacteria. De esta manera, se involucran 12 genes, entre ellos el gen *pilD* que determina la síntesis del pili tipo IV. Entre la expresión de los factores de patogenicidad también se encuentra PhcA, un regulador transcripcional de la familia LysR, que coordina la expresión de EPS y enzimas degradadoras (N. Chen et al., 2023).

Por otro lado, el sistema tipo III (T3SS) está codificado por los genes *hrp*, los cuales producen un pili-Hpr que permite la translocación de proteínas a través de la pared celular vegetal. Otras 3 proteínas secretadas al medio extracelular son PopA, PopB y PopC que ayudan en el proceso de infección celular. El sistema tipo III está también regulado por una cascada (PrhJ, HrpG y HrpB). Se dice que la mencionada cascada responde al menos a dos señales ambientales: una cuando crece en un medio similar al apoplasto y otra, específicamente, cuando se encuentra en la célula vegetal (N. Chen et al., 2023; García et al., 2019).

La forma de reconocimiento entre la bacteria y la célula vegetal diana se da a través de PrhA, ya que dichas señales transfieren la expresión de *hrpB* a través de la cascada PrhA-PrhR/PrhI-PrhJ-HrpG. Así se activa el gen *eps* que produce EPS en etapas tardías de la infección. Una vez se infectan los espacios intercelulares se induce la expresión de *hrpB*, y al alcanzar la densidad celular límite se activa *phcA*; que también colabora en la producción de EPS. De allí se produce una infección sistémica de la planta. Lo anterior muestra que es evidente la cooperación que debe existir entre T2SS y T3SS para el proceso de producción de enfermedad, el cual se divide en dos estados: el estado temprano que incluye invasión y proliferación en espacios intercelulares e invasión de vasos xilemáticos y el estado posterior que es proliferación y producción de EPS en vasos xilemáticos (N. Chen et al., 2023; Puigvert et al., 2021).

### 2.3.3. Infección por *Ralstonia solanacearum* en tomate (*Solanum lycopersicum* L.).

Las cepas que afectan a la planta de tomate pertenecen a la raza 1 (Bv1, Bv3 y Bv4) y a la raza 3 [Bv2 y Bv2Tropical (Bv2T)]. Las cepas Bv2 son menos activas metabólicamente que las cepas Bv2T (Soto et al., 2011). *R. solanacearum* causa marchitez bacteriana produciendo las mayores pérdidas económicas en los cultivos de tomate de 0% a 90% (Yuliar et al., 2015). El microorganismo coloniza la superficie radicular al ingresar por heridas o puntas de las raíces emergentes secundarias; infecta el xilema, degrada la pared celular liberando celulasa y pectinasa e inhibe la translocación de nutrientes y agua. Agregado a lo anterior, el patógeno se desplaza rápidamente a la parte aérea a través del sistema vascular. En estados avanzados la infección causa marchitez, clorosis y muerte de la planta. El microorganismo puede sobrevivir por largos periodo de tiempo en suelo y su distribución es cosmopolita. *R. solanacearum* afecta más a plantas jóvenes (figura 2) (Baroukh et al., 2022; Murti et al., 2021).

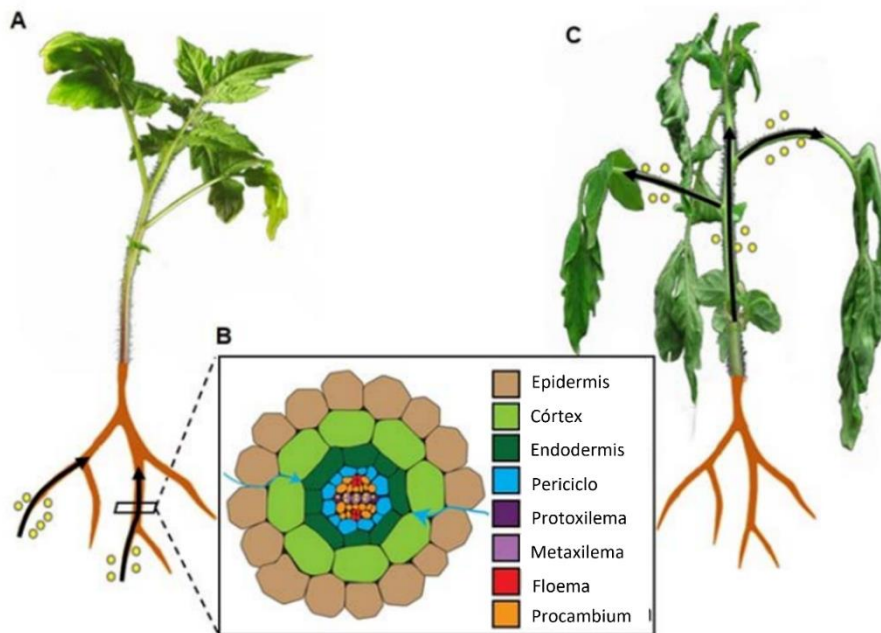


Figura 2. Invasión de la planta de tomate por la bacteria *R. solanacearum*. (A) Primeros estadios de la invasión ingresando por las raíces laterales, *R. solanacearum* círculos amarillos. (B) Sección transversal de una raíz, multiplicación de *R. solanacearum* en los espacios intercelulares, causando plasmólisis de las células epidérmicas. (C) Ascenso de la bacteria por el xilema causando obstrucción vascular y marchitamiento. Tomado de (Xue et al., 2020).

Por su parte, la planta de tomate (*S. lycopersicum* L.) tiene un sistema de defensa inmunitaria con el que intentará combatir la primera infección en algunos casos gracias a genes *R* (en plantas de tomate resistentes a la marchitez). La respuesta induce a las células a producir una serie de compuestos que permitirían la activación del sistema inmunitario por la producción de metabolitos primarios y secundarios (Murti et al., 2021). La incidencia de la infección puede perjudicar a pocas plantas dispersas enfermas, pero también puede causar la muerte rápida de las mismas, ya que la bacteria se propaga rápidamente hacia arriba del sistema vascular. Las primeras hojas que muestran marchitez son las hojas más antiguas antes que las hojas jóvenes y retraso en el crecimiento. Si se corta transversalmente un tallo se pueden observar gotas diminutas de un exudado viscoso blanco. (Baroukh et al., 2022).

## **2.4. Tratamiento de *Ralstonia solanacearum*.**

El control de la marchitez bacteriana producida por *Ralstonia solanacearum* es difícil. Sin embargo, se han desarrollado varias estrategias para intentar suprimir la enfermedad, desde el saneamiento de cultivos, pasando por la diversidad en el material de siembra, la rotación de sembrados, el desarrollo de variedades resistentes a la enfermedad, el control biológico, entre otras (Aslam et al., 2017). Adicionalmente, el uso de bactericidas se ha vuelto habitual con los consecuentes perjuicios al medio ambiente, el ser humano y los animales.

Entre las técnicas de tipo cultural que se han sugerido a nivel de cultivos para disminuir la presentación de la enfermedad están la rotación e intercalado de cultivos con otros menos susceptibles a la enfermedad. No obstante, la estrategia puede convertirse en un arma de doble filo atrayendo a otros patógenos que puedan afectar la producción. Islam y Toyota (2004), por su parte, demostraron que la enfermedad en tomate fue suprimida agregando estiércol de granja y aves de corral, dada la alta actividad microbiana que se agrega al suelo. Adhikari y Basyat (1998) informaron el retraso en la sintomatología de 1 a 3 semanas al utilizar primero maíz, caupí, damisela y después tomate susceptible a la enfermedad. (Tahat & Sijam, 2010).

El uso de métodos químicos para el control de la enfermedad además de ser costoso ha sido difícil dada la localización del microorganismo en el xilema y su capacidad de sobrevivir en el suelo. Aun así, para el control de la enfermedad en tomate se han utilizado suspensiones de validamicina A y validoxilamina; además de combinaciones de metilbromuro, 1,3-dicloropropeno y cloropicrina los cuales reducen la incidencia de la enfermedad del 72% al 90%; se han utilizado además sustancias bactericidas tales como triazolotiadiazina y sulfato de estreptomicina (40 mg/kg<sup>-1</sup> de suelo). En este sentido, se ha propuesto además que el acibenzolar-s-metil (ASM) y timol pueden producir resistencia sistémica pero el uso de estos químicos permanece en el ambiente por muchos años y produce el deterioro de este. Ahora bien, compuestos como silicio y quitosano pueden reducir la incidencia de la enfermedad (Yuliar et al., 2015).

Existen métodos biológicos que consisten en la aplicación de diferentes microorganismos. (bacterias y hongos). Estos compuestos al ser usados proveen diversas ventajas tales como ser potencialmente autosuficientes, propagarse por sí solos desde su establecimiento inicial. Aplicando procedimientos de este tipo se logra la supresión de la enfermedad a largo plazo mediante una competencia por espacio y nutrientes, antibiosis, parasitismo e inducción de resistencia sistemática. Entre las bacterias mencionadas mayoritariamente por tener efecto de controlador biológico contra *Ralstonia solanacearum* encontramos *Pseudomonas* spp., *Bacillus amyloliquifaciens*, *B. cereus* y *Serratia marcescens*. Estas en muchos casos actúan también como promotores de crecimiento vegetal, se han mencionado además nuevos microorganismos poco comunes que aumentan las posibilidades de utilizar el control biológico como herramienta sólida y segura en un futuro, tales como: *Acinetobacter* sp., *Burkholderia nodosa*, *B. sacchari*, *B. terricola*, *B. pyrrocinia*, *Bacillus thuringiensis* (induce defensas relacionadas con los genes PR-1 ácido quitinasa y β 1,3-glucanasa ejerciendo resistencia contra *Ralstonia solanacearum*), *Chryseobacterium daecheongense*, *C. indologenes*, *C. luteola*, *Clostridium* sp., *Delftia acidovorans*, *Enterobacter* sp., *Flavobacterium johnsoniae*, *Paenibacillus macerans*. *Stenotrophomona maltophila*. Los mecanismos de supresión de estos microorganismos pueden ser explicados por competencia, inducción de resistencia sistémica, antibiosis, producción de enzimas degradadoras de la pared celular y por los sideróforos (Yuliar et al., 2015).

Finalmente, otro de los procedimientos usados en campo tiene que ver con algunos “no pesticidas químicos” que tienen potencial para ser usados en los cultivos y controlar la bacteria. Así se intenta no causar daño al medio ambiente. Entre dicho grupo, se resalta

para fines de ubicar este trabajo, el caso de los aceites esenciales, una propuesta natural a nivel de pesticidas verdes que está siendo estudiada (Yuliar et al., 2015).

## **2.5. Aceites esenciales características, síntesis y propiedades.**

La Organización Mundial de la Salud (OMS), reconoce a la medicina tradicional (MT) como un sistema de salud, el cual está basado en diversas prácticas terapéuticas, entre ellas el uso de plantas medicinales. A su vez, la fitoterapia es una actividad que se ha desarrollado desde tiempos inmemorables y el ser humano ha utilizado las propiedades de algunas plantas para su beneficio como el tratamiento de infecciones y enfermedades. En esta vía, muchos de los compuestos activos de las plantas son el soporte de la industria farmacéutica y su campo de aplicación no se restringe solamente a la medicina humana, sino también al tratamiento de animales y control de biológico en cultivos. La farmacopea europea define los aceites esenciales como productos olorosos que tienen una composición compleja, obtenidos a partir de un extracto vegetal crudo, ya sea obtenidos por vapor de agua, destilación en seco o un método mecánico (Aziz et al., 2018; Shekhar Solankey & Shamim, 2022).

Los aceites esenciales, también llamados aceites volátiles, aceites etéreos o esencias generalmente son líquidos lícidos y móviles. La mayoría son incoloros o de color amarillo pálido, aunque algunos son de color intenso. El olor típico de los aceites esenciales depende de los órganos, especies y orígenes de las plantas. Estos aceites tienen un alto índice de refracción y rotación óptica como resultado de la gran cantidad de compuestos asimétricos. En lo que tiene que ver con la densidad relativa, la de los aceites esenciales es menor que la del agua, aunque existen varias excepciones. Los aceites esenciales generalmente se reconocen como hidrofóbicos y son ampliamente solubles en grasas, alcoholes y demás solventes orgánicos. Además, pueden ser oxidados para formar productos resinosos a través de la polimerización (Sharifi-Rad et al., 2017). Se conocen aproximadamente 3000 aceites esenciales, de los cuales 300 son comercialmente importantes en el mercado de las fragancias. Se debe agregar que han demostrado además poseer numerosas propiedades medicinales como antiinflamatorios, insecticidas, antioxidantes, antitumorales, antibacterianos, antifúngicos, antivirales antiprotozoarios, insecticidas, anticancerígenos y como preservante de alimentos entre otras (Acero-Godoy et al., 2019; Aziz et al., 2018; García-Torcoroma et al., 2017; Moghaddam & Mehdizadeh, 2017; Ruíz-Rico et al., 2017; Sánchez-Humala et al., 2017; Soares et al., 2017).

Los aceites esenciales son sintetizados por la planta y depende de varios factores intrínsecos (genotípicos, sexuales, estacionales, ontogénicos) y extrínsecos (propiedades ecológicas y ambientales); dan el aroma característico a flores, árboles, frutos, hierbas, especies y semillas. Los aceites esenciales se encuentra en las estructuras celulares de la epidermis más específicamente de las glándulas secretoras especializadas conocidas como tricomas glandulares; su función tiene que ver con la defensa química ya que actúan contra depredadores, insectos, microorganismos (Mao et al., 2018; Reyes-Jurado, 2014).

La composición de los aceites esenciales incluye principalmente compuestos lipofílicos y altamente volátiles, los principales compuestos son terpenoides y fenilpropanoides. Los terpenoides son también llamados terpenos o isoprenoides, son extremadamente variables, con diferentes esqueletos carbonados y una amplia variedad de derivados oxigenados como alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas, éteres, peróxidos y fenoles. La unidad estructural del aceite esencial (isopreno,  $C_5H_8$ ) actúa como monómero que se acumula en unidades repetitivas para formar los grupos terpenos y la combinación determina el nombre que se les asigna. Los hemiterpenos los que están compuestos por una unidad de isopreno; los monoterpenos por dos, los sesquiterpenos por tres y los diterpenos por cuatro unidades (Kachur & Suntres, 2020; Matos et al., 2019).

Por su parte, los fenilpropanoides contienen una o más unidades  $C_6-C_3$ , siendo el  $C_6$  un anillo de benceno el cual se constituyen en la molécula madre para la biosíntesis de numerosos polifenoles vegetales estructurales y funcionalmente diversos (ácidos y ésteres fenólicos simples, derivados glicosilados de fenilpropanoides primarios, flavonoides, isoflavonoides, estilbenos, cumarinas, curcuminoides, lignanos, etc.) (Jahangeer et al., 2021).

Las dos vías principales de producción de los terpenoides son la vía del ácido mevalónico (AMV) la cual ocurre en el citoplasma y permite la generación de sesquiterpenos, triterpenos, esteroides y terpenos originados en la mitocondria, y la vía del metil eritritol 4-fosfato (MEP), que ocurre en los plastidios (Verdeguer et al., 2020).

En la AMV se condensan tres moléculas de Acetil-CoA gracias a la acción de una tiolasa y la hidroximetilglutaril CoA sintetasa, se forma 3-hidroximetilglutaril CoA (HMG-CoA) el cual se reduce por el  $NADPH+H^+$  y forma ácido mevalónico (unidad de 5 carbonos, específica para la síntesis de terpenos) este sufre diferentes reacciones hasta formar Isopentil difosfato (IPP) y/o su dímero dimetilalil difosfato (DMAPP).

Por otro lado, en la vía MEP el producto final también es IPP y DMAPP. Sin embargo, el primer compuesto intermediario es 1 desoxi-d-xilulosa-5 fosfato (DXP) formado a partir de la glucosa, piruvato y d-gliceraldehído 3 fosfato. En otro punto, la cadena de DXP es reestructurada hasta formar 2-C-metil-d-eritritol 4-fosfato (MEP), así sufre modificaciones posteriores y dando origen a las moléculas IPP y DMAPP (figura 3) (Jahangeer et al., 2021; Yin & Dickschat, 2022).

### **2.5.1. Aceites esenciales como solución a los plaguicidas químicos convencionales.**

Los aceites de diversas plantas han demostrado poseer numerosas propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, antivirales, antiprotozoarias, antifúngicas, insecticidas, anticancerígenas, entre otras (Acero-Godoy et al., 2019; García-Torcoroma et al., 2017; Ngom et al., 2018; Orchard & van Vuuren, 2017; Ortiz de Elguea-Culebras et al., 2018).

Existen diferentes reportes con microorganismos de interés clínico, veterinario y agrícola en el que se utilizan los aceites esenciales. Se destaca, por ejemplo, el efecto insecticida que estos proveen el contra patógeno de diversos cultivos de importancia económica *Tecia solanivora*. En este caso, los aceites esenciales *M mollis* y *L. bullata* ambos de la familia Lamiacea, quienes resultaron activos contra las larvas a las 24 horas de aplicación. Así se obtuvieron valores de  $CL_{50}$  0,020  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$  y 0,113  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$  respectivamente. El efecto larvicida que se produce se debe a la sinergia entre los diferentes compuestos de los aceites esenciales (Ramírez-Mancilla et al., 2019).

Los aceites esenciales de *Melissa officinalis*, *Salvia officinalis*, *Coriandrum sativum*, *Thymus vulgaris*, *Mentha piperita* y *Cinnamomum verum*, han probado tener efecto inhibitorio contra la fumonisina que ataca las semillas de trigo. Además, se ha reportado la actividad antifúngica contra *Fusarium* spp., de los aceites esenciales de *Teloxys ambrosioides*, *Mentha spicata*, *Ruta chalepensis*, *Thymus vulgaris*, *Cinamomum verum*, *Syzygium aromaticum*, *Allium sativum*, *Citrus aurantifolia* y *Eucalyptus globulus* (Sumalan et al., 2013; Villa-Martínez et al., 2014).

El aceite esencial de *Lippia alba*, ha sido evaluado para determinar el efecto antifúngico contra diversos hongos tales como: *Aspergillus ochraceus* (ATCC12066), *Aspergillus versicolor* (ATCC11730), *A. niger* (ATCC6275), *A. fumigatus* (ATCC9142), *Penicillium ochrochloron* (ATCC9112), *Penicillium funiculosum* (ATCC10509), *Trichoderma viride*



(IAM5061). Los investigadores determinaron la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima fungicida (CMF). Para este caso, los resultados del estudio

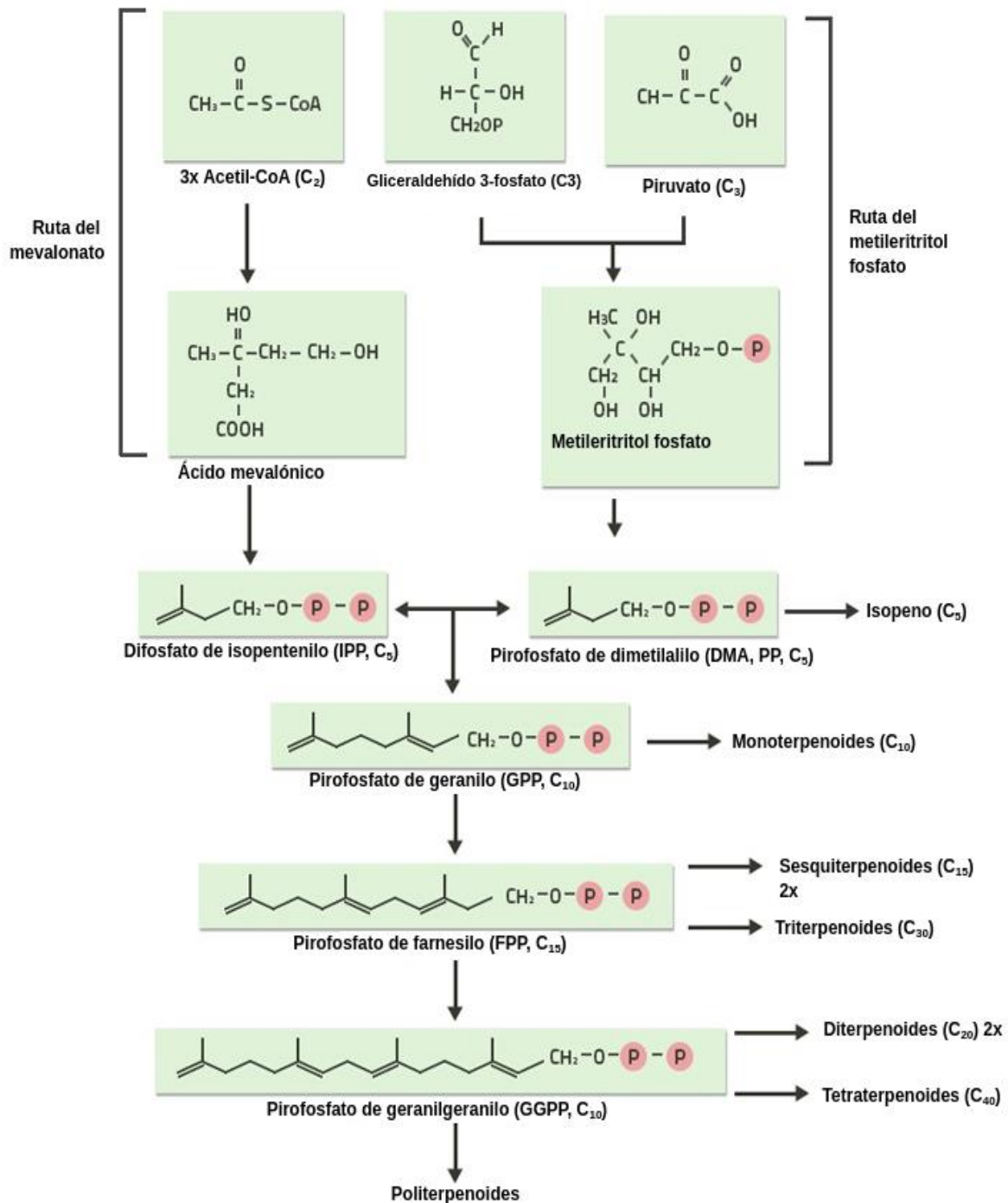


Figura 3. Producción de compuestos primarios y secundarios para la formación de aceites esenciales. Tomado de (Yin & Dickschat, 2022).

demonstraron lo siguiente: una actividad media a moderada en lo que tiene que ver con el aceite esencial de *L. alba*. Los estudios mostraron una CMI en un rango de 0,300-1,250 mg/mL, y una CMF en un rango de 0,60-1,250 mg/mL para los hongos probados en el estudio. Por su parte en las pruebas realizadas con el agente fungicida ketoconazol se evidenció una CMI en un rango de 0,025-0,500 mg/mL y una CMF en un rango de 0,250-0,100 mg/mL Bifonazol, a su vez, mostró menor actividad antifúngica con una CMI de 0,100-0,200 mg/mL y CMF de 0,200-0,250 mg/mL (Glamočlija et al., 2011).

Por otro lado, se han evaluado los aceites esenciales de *Phytolacca dioica* L. y *Ziziphus spina-christi* L. sobre el crecimiento de patógenos bacterianos que originan pudrición blanda y marrón de la papa como (*Ralstonia solanacearum*, *Dickeya solani*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Enterobacter cloacae* y *Bacillus pumilus*). Los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) para el extracto de la fruta *Z. spina-christi* variaron de 32 a 125 µg/mL contra las bacterias estudiadas; para *P. dioica*, los valores de CMI variaron de 32 a 64 µg/mL. En este sentido, los extractos de frutas *P. dioica* y *Z. spina-christi* exhibieron diferentes niveles de actividad contra el crecimiento del patógeno que produce la pudrición parda de la papa (El-Hefny et al., 2018).

### **2.5.2. Aceites esenciales y *Ralstonia solanacearum*.**

En diversos trabajos se han evaluado bioplaguicidas tipo aceites esenciales. Se resalta de estos que son menos persistentes en el medio ambiente ya que se degradan rápidamente con la luz solar y la humedad. Aunado a lo anterior los aceites esenciales son menos fitotóxicos y gracias a la mezcla de compuestos pueden trabajar de forma sinérgica reduciendo el patógeno por medio de diferentes modos de acción (Opondo et al., 2022). En este contexto los aceites esenciales pueden ejercer acción antimicrobiana ya que por sus características lipofílicas son capaces de destruir la pared y membrana celular. De esta manera, hacen posible la fuga de electrolitos, la pérdida de constituyentes intracelulares, el aumento de la conductividad eléctrica de las bacterias, la concentración de ácido nucleico en la suspensión celular, la inhibición del metabolismo respiratorio y la disminución de la actividad metabólica bacteriana (Alonso-Gato et al., 2021; Chang et al., 2022).

En 2018 se extrajeron tres quimiotipos del aceite esencial de *Pimenta racemosa* var *racemosa* (quimiotipo 1 con aroma a hierba de limón, quimiotipo 2 con aroma a anís y quimiotipo 3 con aroma a clavo) por hidrodestilación y emulsificados con Tween 20 en proporción 1:1 para ser probados contra *Ralstonia solanacearum* filotipo IIB4NPB; de

acuerdo con los resultados obtenidos el quimiotipo más efectivo que inhibe *Ralstonia solanacearum* fue el tipo 3 pues a las 48 horas de incubación no se observó crecimiento en las cajas de petri en ninguna de las concentraciones probadas (0,01% a 0,14% v/v). Para este caso, la CMI fue de 0,03%, para el quimiotipo 1 y para el 2 la inhibición en el crecimiento se dio a la concentración de 0,14% (Deberdt et al., 2018).

En 2019, se probaron tres aceites esenciales obtenidos de las especies *Corymbia citriodora* (hoja), *Cupressus sempervirens* y *Lantana camara* (parte aérea) por medio de hidrodestilación. Para el experimento se determinó que el mayor compuesto para cada uno de los aceites esenciales fue  $\alpha$ -citronelal (56,55%), cedrol (22,17%) y *trans*-cariofileno (16,24%) respectivamente. En esta medida, se evaluó la actividad antimicrobiana de los mismo contra 8 aislamientos de *R. solanacearum* filotipo II procedente de papa. El resultado demostró que el aceite esencial de *L. camara* a una concentración de 5000  $\mu\text{g/mL}$  tuvo los efectos más altos de inhibición contra RsMo2, RsSc1 y Rs48 con zonas de inhibición de (17,33 mm; 16,33 mm y 17,5 mm), respectivamente. Mientras tanto, el aceite esencial de *C. citriodora* mostró actividad inhibitoria contra RsBe2 (IZ 14 mm), RsFr4 y RsNe1 ambos con IZ de 13,66 mm. Estos resultados indican que los aceites esenciales de la presente investigación podrían llegar a tener efecto antimicrobiano (Mohamed et al., 2019).

Para continuar con la cronología, en 2021 se probó *in vitro* la efectividad del aceite esencial obtenido de las hojas de *Tagetes patula* L. contra *Ralstonia solanacearum* biovar 2, encontrando como compuesto más abundante piperitona (42,95%) y se determinó una CMB de 50  $\mu\text{g/mL}$  y la concentración media máxima efectiva fue de 306  $\mu\text{g/mL}$  (Villada-Ramos et al., 2021).

En 2022 trabajaron con el aceite esencial de *Tithonia diversifolia* (Botón de oro), extraído por hidrodestilación de las hojas y las flores obteniéndose un rendimiento de entre 0,08% y 0,18% (p/p). De esta manera, se analizaron los componentes por espectrometría de masas y FT-IR, y se cuantificó un 16% de ácido palmítico. Para el análisis, la bacteria *Ralstonia solanacearum* fue aislada de plantas de papas enfermas e identificada como raza 3 biovar III, así se establecieron halos de inhibición con el aceite esencial (250  $\mu\text{g/mL}$ ) de 11,82% (Opondo et al., 2022). Los anteriores trabajos mencionados son sólo algunas investigaciones en las que se han utilizado los aceites esenciales de diferentes plantas como posibles tratamientos alternativos contra *Ralstonia solanacearum* el cual puede afectar el cultivo de tomate y producir grandes pérdidas económicas; en Colombia los

aceites esenciales son utilizados en agroquímicos con sustancias como la trementina para insecticidas.

## **2.6. Métodos de extracción de los aceites esenciales.**

Los métodos de extracción de aceites esenciales pueden ser categorizados de dos formas, los métodos clásicos o convencionales descritos en los primeros seis numerales a continuación y métodos innovadores, los cuales generalmente son modificaciones adicionales a técnicas convencionales. Con los segundos, se busca evitar la hidrólisis, isomerización y oxidación de los aceites esenciales, disminuyendo costos, consumo de energía, tiempo y producción de CO<sub>2</sub> (Aziz et al., 2018).

### **2.6.1. Hidrodestilación.**

Es uno de los métodos más antiguos y simples que se utilizan para la obtención de los aceites esenciales. En este, se realiza la inmersión del material dentro de un recipiente con agua y se lleva el agua a calentamiento. El recipiente donde se encuentra el material está conectado a un condensador para convertir nuevamente el vapor en líquido y un decantador para recoger lo condensado; la principal ventaja del método es la capacidad que tiene el agua de proteger el aceite esencial extraído sin sobrecalentarse. En tiempos relativamente reciente, esta técnica ha sido modificada con nuevos dispositivos como son el microondas, (hidrodestilación asistida por microondas) con la cual se disminuye el tiempo de destilación y aumenta la energía de disipación (Aziz et al., 2018).

### **2.6.2. Destilación por arrastre con vapor.**

Es conocido como uno de los métodos de mayor prevalencia para la extracción de aceites esenciales debido a que es un proceso versátil, flexible y que permite la manipulación de pequeños a grandes volúmenes de material. No obstante, presenta algunas desventajas tales como el alto consumo de agua y energía en el proceso, la pérdida de compuestos volátiles, y amplios periodos de extracción.

El proceso se basa en una separación de materiales sensibles a la temperatura como son los aceites esenciales insolubles en agua. El principio básico del proceso permite que una mezcla de compuestos se destile a una temperatura significativamente menor que la de los constituyentes individuales correspondientes y sus puntos de ebullición. En el caso de los aceites esenciales, estos tienen puntos de ebullición hasta los 200°C o más, sin embargo,

en presencia del vapor de agua dichas sustancias se volatilizan a 100° C por presión atmosférica (Božović et al., 2017).

El procedimiento se realiza de la siguiente manera: un contenedor con agua se calienta y permite que el vapor pase por un tubo conectado a un alambique donde se encuentra el material fresco. Paso seguido, el vapor se difunde por el material vegetal desde el inferior del contenedor, lo cual ablanda las hojas, tallos y permite que los aceites esenciales se evaporan con el agua. Para que el proceso sea exitoso, la temperatura del sistema debe ser constante. Al final, la mezcla agua-aceite esencial converge en un sistema de enfriamiento y la mezcla se condensa para formar una bicapa líquida, en la que el aceite esencial queda en la fracción superior. Allí es separado y almacenado. Dicho método fue utilizado en la presente investigación (Anexo 3) (Božović et al., 2017).

### **2.6.3. Hidrodifusión.**

En esta técnica se utiliza vapor. El material vegetal se encuentra seco y el vapor se suministra desde la parte superior del contenedor, además de ser a baja presión o al vacío y con temperaturas que pueden ser inferiores a los 100° C. En este método se adiciona el microondas, optimizando tiempos, rendimientos y disminuyendo sus costos del mismo (Aziz et al., 2018).

### **2.6.4. Extracción con solventes.**

Es un método costoso y demanda mucho tiempo. Esta técnica es utilizada para plantas que deben estar preferiblemente secas y molidas, cuyos materiales no toleran el calor (material floral). Para la extracción, se utilizan solventes como hexano, etanol, acetona, o éter de petróleo. El proceso se realiza un proceso de calentamiento, filtración y evaporación, con lo cual se forma un compuesto aromático ceroso que contiene no solamente el aceite esencial, sino también grasas y ceras (resinoide). Este producto se mezcla con alcohol absoluto reteniendo el aceite esencial y se destila a baja temperatura (Shankar et al., 2021).

### **2.6.5. Maceración.**

Este método también es denominado infusión de aceite. Se utiliza con material vegetal seco, generalmente semillas, nueces o granos. El material vegetal se muele en polvo, se agrega un solvente y se agita. Posteriormente, se filtra y se recoge el filtrado (Shankar et al., 2021).

### **2.6.6. Enfleurage.**

Es un antiguo método que no es el más común para la extracción de aceite esencial. Para lograrlo, utiliza grasa, ya sea vegetal o animal, y puede hacerse en frío o caliente. En cuanto al método en frío, el material vegetal que generalmente es de tipo floral se coloca en placas de vidrio previamente untadas con grasa y se presiona durante aproximadamente una semana. Pasado este tiempo, el material vegetal se renueva y al final la grasa queda impregnada con la esencia de las flores. De dicho proceso se obtiene una pomada de enfleurage. Tal mezcla incluye la solución grasa/esencia. Al final, el compuesto principal es separado con etanol a evaporación. El segundo método es muy similar. La diferencia radica en que la grasa se calienta una vez se junta con el material vegetal (Aziz et al., 2018).

### **2.6.7. Extracción de fluidos supercríticos.**

Es una de las técnicas consideradas innovadoras para la extracción de aceite esencial, en ella se utiliza un fluido supercrítico como solvente, cada fluido se caracteriza por un punto crítico (temperatura y presión críticas). Para el fin propuesto, el principal solvente crítico utilizado es el CO<sub>2</sub>, por ser económico, seguro, tener alta difusividad, no ser agresivo con moléculas termolábiles, no ser tóxico ni inflamable, y ser inerte. Además como el CO<sub>2</sub> es gaseoso a temperatura ambiente y presión ordinaria (condiciones críticas: 30,9° C y 73,8 bar), el analito es fácilmente recuperable (Xu et al., 2011). El proceso se da por una serie de compresiones, con su respectivo calentamiento. Es por eso por lo que al intervenir el material vegetal donde volatiliza los aceite esencial. Posteriormente se da una descompresión y se separa del aceite esencial, el CO<sub>2</sub>. Por lo tanto, este queda libre y es enrutado nuevamente al sistema para su reciclaje (Aziz et al., 2018).

### **2.6.8. Líquido de extracción subcrítico.**

Es el uso de agua en estado subcrítico para la obtención de aceite esencial. Esto sucede porque el líquido alcanza una presión superior a la presión crítica y más baja que la temperatura crítica. Este método ofrece varias ventajas como menor viscosidad del líquido en estado subcrítico, menor densidad, mayor difusividad gas-líquido. Así mismo, es una técnica rápida (15 minutos) que trabaja a temperaturas más bajas que las convencionales, es rentable y sencilla (Shankar et al., 2021).

## 2.7. Plantas promisorias para la obtención de aceites esenciales en Colombia.

En 2014 el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Corpoica y La Universidad Nacional de Colombia realizaron un estudio para identificar las especies de plantas medicinales y aromáticas (PAMC) de mayor uso en las regiones Pacífico, Caribe y norte del Cauca; estas regiones han sido tradicionalmente productoras de PAMC, pero no cuentan con sistemas de transformación que les permitan incrementar su valor o insertarse efectivamente en el comercio nacional (Tofiño Rivera, 2017).

Gracias al anterior estudio, se priorizaron doce especies relevantes para estas zonas: *Ocimum basilicum* L., *Aloe vera*, *Calendula officinalis* L., *Zingiber officinale*, *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, *Anthemis nobilis* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Mentha spicata* L., *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson, *Lippia organoides*, *Ruta graveolens* L. y *Melissa officinalis* L. A pesar de que muchos agricultores están interesados en agregar valor a sus cultivos, la producción de plantas como materia prima para productos sofisticados requiere procesos estandarizados y reglamentarios particulares. También sucede que el área sembrada de cultivos comerciales PAMC es aún pequeña en comparación con el área agrícola total sembrada en Colombia. Los mencionados sembradíos ocupan menos del 1,0% de la superficie con cerca de 2600 ha en todo el país. El dato referido evidencia un bajo desarrollo en el cultivo, comercio y transformación de las PAMC en la cadena agrícola colombiana. Este hecho contrasta con la presencia de una amplia biodiversidad vegetal en el país. Para entender las características de los componentes inspeccionados en este trabajo, a continuación se describe el material vegetal con el que se laboró en la presente investigación (Tofiño Rivera, 2017). Posterior a su denominación, se realiza la descripción de cada uno de los ejemplares vegetales utilizados.

### 2.7.1. *Cymbopogon* sp.:

*Cymbopogon* sp., es una hierba de la familia Poaceae, cultivada en regiones subtropicales y tropicales de Asia, África y América. Ha sido usada en medicina tradicional para tratar flatulencia, problemas digestivos, dolores de cabeza y reumatismo entre otros. El aceite esencial de las hojas de *Cymbopogon* sp., se usa comúnmente en perfumes, cosméticos y como repelente de insectos (Suwitchayanon et al., 2017; Toledo et al., 2016). La densidad del aceite esencial es de 0,887 g/mL aproximadamente; entre los compuestos que se han cuantificado están principalmente monoterpenos de oxígeno (90,61%), como citronelal

(27,87%), geraniol (22,77%), geranial (14,54%), citronelol (11,85%) y neral (11,21%) como compuestos principales, estos monoterpenos se derivan del geranil difosfato y están relacionados biosintéticamente (Toledo et al., 2016).

### **2.7.2. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.**

Es una especie ampliamente distribuida en regiones tropicales y subtropicales, en Colombia. En su denominación común es conocida como limonaria. El *Cymbopogon citratus* es una planta perenne, alta, de hoja angosta y larga con inflorescencia. A esta se le atribuyen diferentes propiedades medicinales como antitusivo, analgésico, antiemético, anti cardiópático, antitérmico, antiinflamatorio, productor de efecto diurético y antiespasmódico, diaforético y anti alérgico. Adicionalmente, es utilizada en las industrias de alimentos (aromatizantes), perfumes y cosméticos, lo cual conlleva un valor agregado de la planta (Dègnon et al., 2019). El análisis de la composición química del aceite esencial arroja que posee una gran variedad de compuestos entre los que predominaba geranial (45,11%), neral (32,16%) y mirceno (7,85%) (Acero Godoy et al., 2020; Ralambondrainy et al., 2018).

### **2.7.3. *Foeniculum vulgare* (Mill).**

Hierba perteneciente a la familia Apiaceae (Umbelliferae), nativa de las regiones de la cuenca del Mediterráneo oriental y del Cáucaso. El conocido como hinojo fue traído a Suramérica durante la época de la colonización. *F. vulgare* es una planta medicinal aromática, utilizada como antiespasmódico. También se ha aplicado como antiséptico del aparato genitourinario, calmante, expectorante, lactagogo, estimulante, tónico y vermífugo. En la parte gastronómica, se destaca su uso como condimento. En la dinámica industrial, se ha desarrollado su uso en productos cosméticos. Presenta una altura de 40-90 cm, hojas inferiores extendidas hasta de 30 cm de largo, y hojas superiores más estrechas. En el aceite esencial se pueden cuantificar compuestos tales como *trans*-anathole (45,34%) (Hussein et al., 2016; Shabani et al., 2019).

### **2.7.4. *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br.**

*Lippia alba* (Mill.) N.E. Br, pertenece a la familia Verbenaceae, la cual está constituida por 175 géneros y 2800 especies. Se encuentra desde Texas hasta Argentina a alturas de 1800 m.s.n.m. Ha sido detectada también en la India y en Australia. Según sea su ubicación geográfica recibe diferentes nombres comunes como: bálsamo de limón (Brasil), juanilama (Costa Rica), quita dolor (Cuba), salvia santa (Guatemala), hierba buena (México), pronto



alivio (Colombia), salvia morada (Argentina), hierba luisa (Venezuela). Se caracteriza por ser una hierba perenne, en ocasiones puede llegar a ser un arbusto hasta de 1,7 m de altura, con un fuerte olor a limón, lima o menta. La planta presenta hojas membranáceas, pecioladas, pubescentes, opuestas o ternadas y su extremidad muestra formas variable con un ápice puntiagudo, cuneiforme o decumbente y la frontera dentada (excepto sobre la base); posee flores aromáticas o no, de color azul a rosado, lila a violeta. Algunas veces la floración puede ser blanca o amarilla en la superficie interna. Esta especie presenta gran variedad química y morfológica y ha sido utilizada de forma popular para el tratamiento de la hipertensión, problemas digestivos, náuseas, problemas cardiovasculares, resfriados, asma y tos. Además, se le han atribuido propiedades sedantes, ansiolíticas, antiúlceras, antifúngicas, antimicrobianas, antiprotozoal, antioxidantes, antiespasmódicas, anticonceptivas y antiinflamatorias. Entre los compuestos que se han encontrado por hidrodestilación para el aceite esencial están linalool (69,2%), seguido de 1,8-cineol con un 3,9%; germancreno D (2,9%),  $\beta$ -cariofileno (2,3%) y sabineno (1,0%) (Acero-Godoy et al., 2019; Aular et al., 2016; García-Cuellar et al., 2014; Linde et al., 2016; Santos et al., 2016; Saroj et al., 2019; Silva et al., 2016).

### **2.7.5. *Mentha* sp.**

Es considerada una planta medicinal importante perteneciente a la familia Lamiacea, comúnmente conocida como menta. Su utilización data de los antiguos egipcios y fue documentada en la farmacopea islandesa del siglo XIII. Esta planta crece en zonas templadas del mundo; posee una altura entre 50 a 90 cm de alto, tallos ramificados violetas purpúreos o teñidos. Sus aceites esenciales son extraídos de la parte aérea, ya sea de hojas frescas o secas. La menta ha sido utilizada en medicina tradicional para tratar inflamaciones de la mucosa oral, colon irritable y problemas respiratorios. Entre los compuestos que presenta en aceite esencial se encuentra D-carvona 49,27% y limoneno 37,18% (Rosato et al., 2018; Singh & Pandey, 2018; Sousa Barros et al., 2015).

### **2.7.6. *Origanum* sp.:**

Como la menta, el *Origanum* sp. pertenece a la familia Lamiacea. Se presenta como una planta herbácea, perenne, con hojas apinadas. A nivel de la medicina tradicional ha sido utilizada para tratar desórdenes alimentarios, resfriados, dolores de cabeza, problemas menstruales, prurito, depresión, entre otros. No solo se muestra con una gran actividad biológica antimicrobiana, antiinflamatoria, antiséptica, anticancerígena, sino que su uso

abarca la industria farmacéutica, culinaria, aromatizante y la perfumería. La caracterización química (CG-MS) del aceite esencial demuestra la presencia de compuestos tales como terpinen-4-ol (38,35%), hidrato de *trans*-sabineno (10,06%),  $\gamma$ -terpineno (8,04%),  $\alpha$ -terpineol (7,32%),  $\alpha$ -terpineno (4,51%), hidrato de *cis*-sabineno (4,27%), y 4-terpinil acetato (4,13%) (Benedec et al., 2018; Fikry et al., 2019).

### **2.7.7. *Origanum majorana*:**

Es una planta perenne herbácea que pertenece a la familia Lamiacea (familia de la menta). Su lugar de origen es Chipre y la región del este mediterráneo, aunque crece en América, norte de África y Europa central. Es un arbusto perenne que crece anualmente. Tiene una medida, cuando ha alcanzado su desarrollo, de 30 a 60 cm de alto. En lo que tiene que ver con sus hojas; estas son suaves, simples y pecioladas. Su uso fue descrito inicialmente por Hipócrates como agente antiséptico. Hoy en día, en cuanto al uso culinario, se utiliza como especia o condimento y, a nivel medicinal, como antiespasmódico, para desórdenes nerviosos, enfermedades cardiovasculares, dolores reumáticos, epilepsia, insomnio y flatulencias. Hay que mencionar además que se han realizado estudios donde se le atribuyen propiedades anticancerígenas, antioxidantes y antifúngicas. En la cuantificación del aceite esencial se han obtenido componentes tales como hidrato de *cis*-sabineno (46,27%), terpinen-4-ol (23,43%),  $\gamma$ -terpineno (13,76%),  $\alpha$ -terpineno (8,38%), sabineno (8,17%), hidrato de *trans*-sabineno (7,34%) y  $\alpha$ -terpineol (4,17%) (Vasudeva & Prernar, 2015; Verma et al., 2016).

### **2.7.8 *Rosmarinus officinalis*.**

Esta planta es ampliamente conocida en Colombia como romero. Medicinal y aromática, es ampliamente utilizada en todo el mundo. Pertenece a la familia Lamiacea. Es arbustiva con tallos prismáticos, las hojas son estrechas, agudas y pequeñas, tienen forma de espigas de color verde brillante con márgenes revolutos y tallos leñosos y ramificados. Algunos antropólogos y arqueólogos han encontrado evidencia de que dicha hierba fue utilizada por sus virtudes medicinales, culinarias y cosméticas en el antiguo Egipto, Mesopotamia, China e India. Entre los compuestos presentes en el aceite esencial se han identificado que la gran mayoría de compuestos son monoterpenos tales como 1,8-cineol (54,6%), canfor (12,27%), borneol (9,66%),  $\alpha$ -pineno (7,09%),  $\beta$ -pineno (3,81%) y canfeno (3,09%) (Ben Kaab et al., 2019; Borges et al., 2019).

### **2.7.9. *Tagetes lucida* cav.**

Es una planta de la familia Asterácea. Es, a su vez, la más diversa de las angiospermas. Se le puede hallar en regiones tropicales y subtropicales. La amplia distribución de esta familia se debe a la capacidad de dispersión de sus estructuras secretoras. El género *Tagetes* incluye de 50 a 55 especies que abarcan desde EE. UU. hasta Argentina. Se le ha conferido gran importancia en la industria agrícola, alimenticia, cosmética y medicinal, gracias a su amplia gama de metabolitos secundarios. En Colombia, es conocida como anisillo. En su condición de hierba perenne, su tamaño puede llegar hasta los 80 cm de altura. Respecto a su fisiología, produce tallos glabros ramificados, hojas simples, enteras y flores amarillas. Desde la cultura popular, se le han puesto diversos nombres comunes tales como hierbanís, jericón Santa María, hierba añil, periquillo, anisillo. En las prácticas tradicionales se usan las flores y las hojas para combatir diversos problemas gastrointestinales y tratamiento de anemia, entre otros. Existen diversos trabajos que cuantifican los compuestos del aceite esencial, logrando identificar el 95,7% de 4-alilanisol o estragol (metil chavicol) (Anaya-Gutiérrez et al., 2022; Caballero-Gallardo et al., 2022; Macías-Camacho et al., 2021).

### **2.7.10. *Thymus vulgaris*:**

*T. vulgaris*, pertenece a la familia Lamiacea, es una planta anual con aspecto herbáceo que crece en muchas partes del mundo. Su uso más común en la medicina se da como agente expectorante, antitusivo, anti broncolítico, antiespasmódico, y por sus propiedades antihelmínticas, carminativas y diuréticas. También se usa como hierba culinaria y es una fuente conocida de agente aromatizante. La planta contiene olor aromático y sabor picante cálido. Su fragancia proviene del aceite esencial que da, a su vez, el saborizante para fines culinarios, así como proporciona las propiedades medicinales. Los estudios mostraron que aunado a tener propiedades antioxidantes, *T. vulgaris* puede actuar como antimicrobiano y relajante muscular. El aceite esencial de la planta tiene una amplia variedad de compuestos tales como o-timol (38,7%), furano, tetrahidro-3-metilo (12,19%), timol (3,82%), p-cimeno (2,77%),  $\gamma$ -terpineno (1,18%), cariofileno (9,1%) (Al-Asmari et al., 2017; Gedikoğlu et al., 2019).

### 3. Objetivos

#### 3.1. Objetivo general

Evaluar el potencial fitoprotector de los aceites esenciales de diez plantas medicinales y aromáticas (PAMC) frente al patógeno vascular *Ralstonia solanacearum* que ataca a semillas y plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.).

#### 3.2. Objetivos específicos

1. Identificar físico químicamente los aceites esenciales obtenidos de diez plantas medicinales y aromáticas (PAMC).
2. Determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* de los aceites esenciales contra *Ralstonia solanacearum*.
3. Establecer la actividad de los aceites esenciales en semillas y plántulas de tomate en condiciones de invernadero y su respuesta frente a *Ralstonia solanacearum*, mediante la caracterización de la respuesta aceites esenciales -semilla, aceites esenciales -plántulas y porcentaje de aparición de la enfermedad.

## 4. Metodología.

### 4.3.1. Material vegetal e identificación taxonómica.

El insumo vegetal para la realización del proyecto fue adquirido en el centro de acopio, ubicado en la localidad de Los Mártires en Bogotá, denominado “Plaza de mercado Samper Mendoza” o “Mercado Nacional de las hierbas” (Bogotá, Colombia) (Anexo 1). Este mercado, especializado en plantas aromáticas y medicinales, cuenta con un portafolio de 3000 especies de diferentes regiones para la venta y comercialización.

Para la realización de las pruebas se aseguró contar con un mismo proveedor, cuyo material provenía de la Sabana de Bogotá. Las muestras vegetales fueron identificadas taxonómicamente en el herbario nacional colombiano, ubicado en la Universidad Nacional de Colombia. Allí, el material se entregó prensado y correctamente marcado con nombre del recolector, número de recolecta, nombre común del espécimen, usos, caracteres de campo, fecha de recolección, datos geográficos y nombre del proyecto al que pertenecía.

### 4.3.2. Extracción y rendimiento de los aceites esenciales.

El procedimiento de extracción de los aceites esenciales se realizó la Universidad Nacional de Colombia (sede Bogotá), en el laboratorio de productos Naturales y vegetales, de la siguiente manera: las hojas del material vegetal fresco de cada planta fueron sometidas a destilación por arrastre con vapor. Para tal fin, se usó un equipo de destilación que comprendía un vaso de extracción de 12 L, una caldera o alambique con una capacidad máxima para 2,0 kg y una trampa tipo Clevenger para la recolección y separación de los aceites esenciales. Cada extracción se realizó en un lapso de 3,0 horas. Las extracciones, luego, fueron conservadas con sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) (Anexo 3) y posteriormente trasladadas a una fase de enfriamiento constante a  $-10^\circ\text{C}$ . Todas las extracciones de los aceites esenciales se hicieron por triplicado.

El rendimiento de los aceites esenciales con respecto a su biomasa vegetal se calculó por medio de la fórmula:

$$\% \text{rendimiento} = \frac{\text{PESO } g \text{ DE A.E.}}{\text{PESO } g \text{ MATERIAL VEGETAL.}} * 100 \text{ (Ecuación 1)}$$

Donde, g de aceite esencial (g DE A.E.) son los gramos de los aceites esenciales obtenidos y PESO g MATERIAL VEGETAL corresponde al peso en gramos del material vegetal fresco (Granados et al., 2014).

#### 4.3.3. Densidad relativa del aceite esencial 20° C e índice de refracción.

Con el fin de medir la densidad relativa, se empleó el método oficial AOAC 940.28 de 1990. A su vez, se utilizó un picnómetro limpio y seco de 1,0 mL de capacidad, el cual se pesó vacío en una balanza analítica (de 4 decimales) hasta que se obtuvo un peso constante. Después, se llenó con 1,0 mL del aceite esencial, se tapó y se limpió el exceso de muestra. Acto seguido, se pesó el conjunto y, por diferencia de pesos, se determinó la densidad relativa del aceite esencial empleando la ecuación 2. Cada evaluación se realizó por triplicado (AOAC, 1995).

$$\text{Densidad } \rho \left( \frac{g}{mL} \right) = \frac{(\text{peso picnómetro+muestra})-(\text{peso picnómetro}) (g)}{\text{Vol.AE en mL}} \quad (\text{Ecuación 2}).$$

Para el índice de refracción se utilizó el método oficial AOAC 919.28:1990. La prueba fue realizada utilizando un refractómetro marca *Sper Scientific*, Antes de la determinación se limpió el prisma del refractómetro con etanol y agua destilada, con la ayuda de una pipeta automática se colocaron 50 µL de muestra en el prisma del aceite esencial a 20 °C, cada evaluación se realizó por triplicado (AOAC, 1995).

#### 4.3.4. Cromatografía Gases - Espectrometría de Masas (GC-MS).

Los aceites esenciales obtenidos se analizaron en la Pontificia Universidad Javeriana (Bogotá), en el laboratorio de cromatografía por GC-MS. Fue usado un cromatógrafo de gases *Shimadzu GC 2010*, con inyector *split/splitless* acoplado a un detector selectivo de masas MS/GCT 8040, modo de ionización EI analizador de masas triple cuadrupolo y dos sistemas de separación (Anexo 4). El primer sistema empleó una columna apolar RTX-5MS (60 m x 0,25 mm x 0,25 µm) bajo las siguientes condiciones de operación: el gas de arrastre fue helio a un flujo de 1,5 mL/min. La temperatura del horno se programó desde 40°C (2 min) hasta 125°C (2 min) a 4°C/min, luego se incrementó hasta 160°C (5 min) a 4°C/min, posteriormente se aumentó hasta 220°C (8 min) a 5°C/min y, finalmente, se llevó a 280°C (4 min) a 5°C/min. La temperatura en el puerto de inyección fue de 250°C y la de la línea de transferencia de 290°C, la relación de *split* 1:20 y el voltaje de ionización fue de 70 eV a una corriente de 60 µA. La adquisición de los espectros de masas se realizó en un rango de masas entre 30-600 m/z. El segundo sistema de separación fue una columna polar DB-WAX (60 m×0,25 mm×0,25 µm) operada bajo las mismas condiciones excepto por la programación de la temperatura del horno que se dio de la siguiente forma: 45°C (4 min) hasta 250°C (8 min) a 4°C/min. Se inyectó 1,0 µl de cada solución analizada. Dilución 1/40 (25 µl aceite a 1,0 mL utilizando hexano como diluyente).

La identificación de los compuestos se basó en la comparación de los índices de retención (IR) y sus espectros de masas con los reportados en las librerías NIST08, Wiley 9L, Pherobase y en Adams (Adams, 2007). Los IR se calcularon teniendo en cuenta los tiempos de retención de una serie homóloga de n-alcenos (C8 – C28) corridos bajo las mismas condiciones de análisis cromatográficas que el aceite esencial. La integración de la corriente iónica total, expresada en porcentaje de área, se utilizó como un parámetro aproximado para determinar la composición relativa del aceite.

#### **4.3.5. *Ralstonia solanacearum*.**

La bacteria *Ralstonia solanacearum* utilizada en este estudio es propiedad de la Corporación colombiana de investigación AGROSAVIA, pertenece a un aislamiento obtenido de tomate cuya nomenclatura de cepario es 32/C3, la cual estaba conservada a -80°C en glicerol, y según la caracterización molecular que se hizo en trabajos anteriores se determinó que pertenece al filotipo americano II patógena para tomate; la bacteria fue activada en medio TZC durante 48 a 72 horas a 28°C y se le continuaron haciendo pases cada tres días para tenerla activa fisiológicamente durante el desarrollo del presente trabajo (Vargas Baquero, 2020).

Para los posteriores ensayos de inoculación del patógeno en plantas se siguió el protocolo sugerido por Vargas en 2020, en el cual el microorganismo se activó en 5,0 mL de caldo nutritivo e incubó a 28°C durante 24 horas. Una vez finalizado el tiempo de incubación se inocularon frascos de 800 mL de caldo nutritivo y se pusieron en agitación-incubación durante 24 horas a 28°C a 100 r.p.m. hasta lograr una D.O. de 1,0 nm lo que equivale a  $1 \times 10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup> (Vargas Baquero, 2020).

#### **4.3.6. Método de difusión en agar.**

La actividad antimicrobiana de cada aceite esencial se evaluó por medio del método de difusión en pozo (perforación en gel de agar), en el cual se realizaron 6 perforaciones con un diámetro de 5,0 mm con un sacabocado y se sellaron con 10 µl del mismo agar, para evitar la dispersión de los aceites esenciales en el fondo de la caja. La cepa de *R. solanacearum* se homogenizó en caldo nutritivo hasta alcanzar una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/mL y se inoculó en la superficie de todo el medio. En cada uno de los pozos se colocaron 20 µl de los diferentes aceites esenciales a 24 concentraciones diferentes (500, 280, 240, 200, 180, 160, 140, 120, 100, 80, 60, 50, 40, 20, 10, 5,0, 2,0, 1,0, 0,5, 0,25, 0,10, 0,05, 0,025, 0,01 mg/mL). Los aceites esenciales se diluyeron con acetona. Como controles

negativos se utilizaron acetona y agua destilada, y como control positivo rifampicina. Una vez inoculadas las cajas se sometieron a un proceso de incubación, a 28°C, durante 24 a 48 horas. Posterior a la incubación se midió en mm el halo de inhibición del crecimiento y se calculó para cada aceite esencial el porcentaje de efecto inhibitorio relativo, con respecto al control positivo (ecuación 3) (Ramírez & Marín Castaño, 2009).

$$\% \text{ efecto inhibitorio} = \frac{\text{Media diámetro halo de inhibición}}{\text{Diámetro halo inhibición control positivo}} \times 100 \text{ (Ecuación 3)}$$

#### **4.3.7. Determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB), método micro dilución.**

La CMI es la concentración más baja de la sustancia que puede inhibir el crecimiento del 95% de un microorganismo después de incubar durante 24 horas y la CMB es la concentración más baja que puede inhibir el crecimiento de un microorganismo después de ser subcultivado en un medio libre del compuesto evaluado. Para este procedimiento se utilizó el método de microdilución (ISO 10932, IDF 223:2010). Se suspendió una colonia de bacterias en 5,0 mL de caldo nutritivo y se incubó a 28°C durante 24 horas en agitación, después se realizó una dilución para obtener un valor de absorbancia en el espectrofotómetro que correspondía a una concentración de  $1,5 \times 10^8$  ufc/mL (0,1 D.O a 600 nm). A su vez, se prepararon una serie de diluciones de los aceites esenciales con acetona, y en una caja de Elisa de 96 pozos con un volumen final de trabajo de 200  $\mu$ l, se colocaron 2,0  $\mu$ l del microorganismo para obtener una concentración final de  $1,0 \times 10^6$  ufc/mL y 10  $\mu$ l del aceite esencial diluido, además de caldo nutritivo como medio de crecimiento. Como control positivo se utilizó *R. solanacearum* con el medio de cultivo únicamente sin aceite esencial, como control negativo se utilizó el microorganismo con el medio de cultivo (caldo nutritivo) y rifampicina 5,0  $\mu$ g/mL; se evaluó además la acetona para determinar que no generará inhibición en el crecimiento de la bacteria ya que era el diluyente de los aceites esenciales. Para comprobar, se midió la absorbancia en el tiempo 0 y 24 horas después. Cada prueba se realizó por triplicado (Balouiri et al., 2016).

En su lugar, para determinar la concentración mínima bactericida (CMB), se sembraron asépticamente en agar alícuotas de la suspensión bacteriana (100  $\mu$ l) que no mostraban turbidez visible. La CMB se consideró como la concentración más baja de aceite esencial que inhibe el crecimiento de colonias visibles en el medio (Orzali et al., 2020).



#### **4.3.8. Estudio cinético de letalidad bacteriana:**

Las curvas de letalidad se realizaron con los resultados obtenidos de las CMB y CMI, al determinar en 72 horas el comportamiento *R. solanacearum* frente a los diferentes aceites esenciales, suministrando así información dinámica tanto de la actividad bactericida como bacteriostática. Las curvas se realizaron en placas de Elisa de 96 pozos con un volumen final de trabajo de 200  $\mu$ l, con 2,0  $\mu$ l del microorganismo y 10  $\mu$ l del aceite esencial y el volumen restante con medio de cultivo. Las placas se colocaron en el equipo *Synergy HT* a 28°C durante 72 horas en agitación media, con controles positivos y negativos para el ensayo y se incluyó la acetona como tratamiento para determinar si no actúa como inhibidor del crecimiento bacteriano (Ramírez & Marín Castaño, 2009).

#### **4.3.9. Prueba de germinación de semilla.**

Se realizaron pruebas de germinación con semillas de la variedad de tomate Santa Cruz Kada, obtenida comercialmente, las cuales fueron desinfectadas con alcohol al 70% durante 1 minuto. Después, se lavaron con agua destilada y se sumergieron en solución de hipoclorito de sodio al 1,0% durante 5 minutos. Posteriormente, se lavaron 5 veces con agua destilada y se dejaron secar. Seguido a la desinfección, las semillas se sumergieron en los aceites esenciales utilizando la concentración mínima inhibitoria durante 4 tiempos (60, 30, 5 y 1 minutos) y se dejaron secar. La unidad experimental consistió en el uso de 20 semillas por cada aceite esencial y por cada tiempo. Además, se realizaron 3 repeticiones en el tiempo (Mirmostafae et al., 2020).

#### **4.3.10. Prueba de infección.**

El experimento se realizó en plántulas de tomate variedad Santa Cruz Kada, inicialmente crecidas en turba (con fertilizante foliar complejo NPK Wuxal-Bayer) y trasplantadas a suelo estéril en cuarto de bioensayo a una temperatura de 28°C y una humedad relativa de 60%. Cuando contaban con 21 días de crecimiento se inocularon con 15 mL de suspensión bacteriana de *R. solanacearum* ajustada a concentración de  $1 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> que corresponde a una lectura de absorbancia de 1,0 (longitud de onda de 600 nm).

La evaluación de los 10 aceites esenciales se hizo por separado en cada unidad experimental adicionando cada 7 días 2,0 mL de cada aceite esencial a la CMI probada en laboratorio en el suelo. Se contó además con un tratamiento sin inocular con la bacteria y uno con acetona ya que es el compuesto en el que se diluyen los aceites esenciales. Las plántulas se observaron cada 3 días, en un transcurso de 15 días. Para registrar la

incidencia de la enfermedad se usó la ecuación 4 y para determinar el porcentaje de reducción de la enfermedad (ecuación 5). La severidad se determinó cada 3 días, durante 15 días usando la escala descrita por Zheng (2017) (tabla 2)(Vargas Baquero, 2020; Zheng et al., 2017).

$$\text{incidencia de la enfermedad} = \frac{\text{número de plantas enfermas}}{\text{número total de plantas}} * 100 \text{ (Ecuación 4)}$$

El porcentaje de reducción de la enfermedad se determinó por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de reducción} = \frac{\text{Control}-\text{Tratamiento}}{\text{Control}} * 100 * \text{(Ecuación 5)}$$

Tabla 2. Severidad de la enfermedad para *Ralstonia solanacearum*

| GRADOS | CRITERIO                    |
|--------|-----------------------------|
| 0      | Sin síntomas observables    |
| 1      | ¼ de las hojas marchitas    |
| 2      | ½ de las hojas se marchitan |
| 3      | ¾ de las hojas se marchitan |
| 4      | Muerte de la planta         |

Tomada de (Zheng et al., 2017).

#### 4.3.11. Prueba de bioestimulación de crecimiento.

Para determinar si los aceites esenciales generaban efecto estimulante en las plantas, semillas de tomate variedad Santa Cruz Kada fueron sembradas en turba (con fertilizante foliar complejo NPK Wuxal-Bayer). Después fueron trasplantadas a suelo estéril en cuarto de bioensayo a una temperatura de 28°C y una humedad relativa de 60%. A los 21 días de crecimiento se les aplicó cada uno de los aceites esenciales en la CMI determinada anteriormente de manera foliar y en suelo. Se usaron 2,0 mL por aspersion y una aplicación cero como control. Finalmente, se realizaron observaciones de área bajo la curva, número de hojas promedio y peso seco (Souri & Bakhtiarizade, 2019).

#### 4.3.12. Análisis estadístico.

El análisis estadístico para las diferentes pruebas de la presente investigación fue realizado de la siguiente manera. Para identificar compuestos en los aceites esenciales se realizó además una técnica de análisis multivariado por medio de la evaluación de componentes principales. Esto con el fin de reducir la dimensionalidad de los datos originales y, a partir de la construcción del Biplot, observar en un espacio bidimensional la contribución de cada variable a las componentes y su posible relación con los elementos medidos. Es decir, es

posible determinar gráficamente si una o un conjunto de variables están vinculadas con un grupo de elementos sobre los cuales se tomaron los datos. Con el fin de determinar la posible relación de las plantas y su composición química, se efectuó un análisis de componentes principales. En el análisis se retuvieron los primeros 5 componentes principales que explican el 75% de la variabilidad de los datos. Con los autovectores de las dos primeras componentes se construyó el Biplot y se analizó su proyección y la relación con los materiales vegetales.

Para el análisis estadístico del método de difusión en agar, se realizó análisis de varianza a un nivel de significancia de 0,05 con el fin de determinar el efecto de 30 tratamientos sobre el crecimiento del microorganismo y también una prueba de comparación múltiple de Tukey.

Para determinar el efecto de los tratamientos sobre el cambio en la absorbancia y en el número de unidades formadoras de colonias (UFC), se realizó un análisis de varianza a un nivel de significancia de 0,05 y prueba de comparación múltiple de Tukey. La variable UFC fue transformada empleando la expresión  $\log(x_i+1)$ . Además, se aplicó análisis de componentes principales con el objetivo de reducir la dimensionalidad y con las puntuaciones de la primera componente se realizó análisis de conglomerado empleando el método de varianza mínima de Ward y la distancia Euclídea al cuadrado.

Para las curvas de letalidad se realizó un análisis de varianza con medidas repetida en el tiempo empleando la corrección de simetría compuesta. Así fue posible determinar el efecto de los aceites esenciales sobre el crecimiento de la bacteria a los tiempos 24, 48 y 72 horas. También se realizó prueba de comparación múltiple de Tukey y Dunnett. En total se probaron 21 tratamientos.

Para determinar el efecto de los aceites y el tiempo de inmersión sobre las semillas de tomate se realizó un análisis de varianza y prueba de comparación múltiple de Tukey. Para determinar el efecto de los tratamientos sobre el índice de severidad, área bajo la curva, número de hojas promedio y porcentaje de plantas vivas, se realizó análisis de varianza y prueba de comparación múltiple de Tukey y Dunnett; el experimento contó con 10 repeticiones técnicas y 3 repeticiones en el tiempo. Por último, para la prueba de bioestimulación en plantas de tomate *Solanum lycopersicum* L., se realizó análisis de varianza para determinar el efecto de los aceites sobre el peso seco y número de las hojas de las plántulas de tomate.

## 5. Resultados y discusión.

### 5.1. Obtención e identificación del material vegetal.

Los aceites esenciales se han convertido en una opción natural para ser usados en diferentes ámbitos científicos. En este ámbito, cobra singular importancia la articulación de la investigación con la seguridad alimentaria y la disminución del uso de agroquímicos que afectan a los ecosistemas y al ser humano. Todas las plantas del presente estudio tienen un costo por kilo de material entre 1 a 2 dólares. El material vegetal identificado en el herbario nacional colombiano fue: *Cymbopogon* sp., *Cymbopogon citratus*, *Foeniculum vulgare*, *Lippia alba*, *Mentha* sp., *Origanum* sp., *Origanum majorana*, *Rosmarinus officinalis*, *Tagetes lucida*, *Thymus vulgaris*. Se debe aclarar que con tres de las plantas del estudio solo se pudo hacer la identificación taxonómica hasta género (*Cymbopogon* sp., *Mentha* sp., *Origanum* sp.). A pesar de esto, las características de estas permitieron establecer que corresponden taxonómicamente a *Cymbopogon nardus*, *Mentha x piperita*, *Origanum vulgare* (comunicación oral). Uno de los elementos que este trabajo considera fundamentales tiene que ver con la identificación taxonómica precisa del material vegetal, puesto que los nombres comunes de algunas plantas varían de una región a otra (Anexo 2).

### 5.2. Extracción, rendimiento y características físico/químicas de los aceites esenciales:

El método de extracción elegido fue el de arrastre por vapor, se realizaron las destilaciones por arrastre por vapor de las 10 plantas por triplicado de material fresco (hojas y tallos). Los datos de rendimiento, densidad e índice de refracción son mostrados en la tabla 3.

Tabla 3. Rendimiento Aceites esenciales/Biomasa, densidad e índice de refracción.

| Nombre científico                    | Rendimiento Biomasa (p/p %) | Densidad (g/mL)     | Índice de refracción  |
|--------------------------------------|-----------------------------|---------------------|-----------------------|
| <i>Cymbopogon</i> sp.                | 0,30 ± 0,09                 | 0,82 ± 0,041        | 1,4780 ± 0,006        |
| <i>Cymbopogon citratus</i>           | 0,13 ± 0,04                 | 0,86 ± 0,028        | 1,4871 ± 0,002        |
| <i>Foeniculum vulgare</i>            | 0,11 ± 0,02                 | 0,93 ± 0,018        | 1,5322 ± 0,005        |
| <i>Lippia alba</i>                   | 0,62 ± 0,31                 | 0,86 ± 0,020        | 1,4895 ± 0,003        |
| <i>Mentha</i> sp.                    | 0,11 ± 0,05                 | 0,90 ± 0,058        | 1,4755 ± 0,001        |
| <i>Origanum</i> sp.                  | 0,45 ± 0,07                 | 0,92 ± 0,001        | 1,4800 ± 0,001        |
| <i>Origanum majorana</i>             | 0,16 ± 0,02                 | 0,87 ± 0,019        | 1,4877 ± 0,003        |
| <b><i>Rosmarinus officinalis</i></b> | <b>0,86 ± 0,12</b>          | <b>0,83 ± 0,046</b> | <b>1,4738 ± 0,001</b> |
| <i>Tagetes lucida</i>                | 0,28 ± 0,10                 | 0,95 ± 0,030        | 1,5121 ± 0,018        |
| <i>Thymus vulgaris</i>               | 0,31 ± 0,10                 | 0,86 ± 0,010        | 1,4882 ± 0,003        |

± se muestra la desviación estándar de las mediciones, todos los datos se analizaron por triplicado. (p/p%). Porcentaje peso/peso en gramos. Negrilla: aceite esencial con mayor rendimiento (%p/p).

Las investigaciones que se realizan con aceites esenciales muestran diversas formas de obtención, en donde el método de hidroddestilación es el más común. En cambio, el utilizado en la presente investigación fue arrastre por vapor ya que ofrece ventajas por ser un método sencillo, de bajo costo, así como permite la manipulación de grandes volúmenes de material. Todos los aceites esenciales fueron obtenidos de las hojas, a pesar de que existen otras estructuras que también los contienen. Para el parámetro que tiene que ver con el rendimiento el mayor porcentaje se obtuvo con *Rosmarinus officinalis* (0,86%), seguido por *Lippia alba* (0,62%). Los rendimientos más bajos se determinaron para *Foeniculum vulgare* y *Mentha* sp., con un (0,11%). En otro sentido, ninguno de aceites esenciales extraídos superó el 1,0 % de rendimiento mientras que diversos autores han obtenido rendimientos superiores por ejemplo *Cymbopogon* sp., 1,33%, *Foeniculum vulgare* entre 1,67% a 1,84%, *Rosmarinus officinalis* 1,2%, *Thymus vulgaris* 1,8%. Solamente para *Lippia alba* se obtuvieron rendimientos similares a los nuestros (0,6%) y para *Tagetes lucida* el resultado de los investigadores fue inferior al presente 0,03%.

Los factores que determinan el rendimiento y la composición química de un aceite esencial son difíciles de aislar y terminan interrelacionándose entre sí. A nivel de la planta, dependen del órgano, grado de madurez, origen geográfico, genética, el cultivo, condiciones edafológicas, geográficas, periodos de recolección, altitud, radiación solar, entre otros. Además que también influye el método de extracción pues puede incidir en la obtención de mayor o menor cantidad de aceite, porque pueden presentarse fugas en el sistema lo que influye en el rendimiento, se requieren alcanzar una alta temperatura y que esta se

mantenga constante durante todo el proceso lo que también puede influir en no obtener completamente todo el aceite esencial presente (Abuhlega et al., 2018; Ben Kaab et al., 2019; Della Pepa et al., 2019; Dhifi et al., 2016; Gedikoğlu et al., 2019; Ghasemian et al., 2020; Kamsu et al., 2019; Machiani et al., 2018; Saroj et al., 2019; Ursulino et al., 2019; Wu et al., 2019; Zarate-Escobedo et al., 2018).

Con respecto a las densidades obtenidas, todas estuvieron por debajo de la unidad. Además, el parámetro índice de refracción cuantificado puede ser usado para identificar compuestos, determinar la pureza de los aceites esenciales y analizar la proporción de mezclas binarias homogéneas de componentes conocidos, esto ocurre porque el IR (Índice de Retención) de una solución mixta es un promedio ponderado de los IR de los componentes de las mezclas, en los aceites esenciales el IR estará influenciado por la composición química del mismo. Por lo tanto, este parámetro podría ser útil como una medida de pureza y calidad oscilando entre 1,45 a 1,5; en nuestro caso los valores oscilaron entre 1,4738 y 1,5322 valores que coinciden con la mayoría de autores que ha trabajado con los mismo aceites (Delgado Ospina et al., 2016; Vasudeva & Prernar, 2015).

### **5.3. Determinación del perfil cromatográfico de los aceites esenciales:**

Los aceites esenciales en general se caracterizan porque, aunque son una amplia variedad de compuestos, tienen dos o tres componentes principales en altas concentraciones (20%-70%). Lo anterior quiere decir que, de las 10 plantas utilizadas en el presente estudio, los compuestos fueron fraccionados e identificados por GC-MS, en la tabla 4 se presenta el compuesto principal y secundario por aceite esencial, en la tabla 5 se presentan todos los compuestos presentes en los 10 aceites esenciales.

Se obtuvieron un total de 59 compuestos, clasificados entre monoterpenos y sesquiterpenos. Para *Cymbopogon citratus* se identificaron 14 compuestos. En su caso, los de mayor concentración fueron geranial 41,88% y geraniol 28,13%; *Cymbopogon* sp., arrojó un total de 18 compuestos (geranial 45,27% y citronelal 17,22%); en *Foeniculum vulgare* se identificaron 12 compuestos (anetol E 65,78% y  $\alpha$ -terpineno 10,10%); de *Lippia alba* se identificaron 17 compuestos (limoneno 49,91% y carvona 21,19%); por su parte, *Mentha* sp arrojó un total de 25 compuestos, (mentol 31,55% y chavicol (estragol) 16,90%). A su vez, *Origanum majorana* fue la planta a la que más compuestos se le identificaron para un total de 28 ( $\gamma$ -terpineno 17,32% y *trans*-sabineno hidrato 9,36%). Del mismo género se encuentra *Origanum* sp. con 26 compuestos identificados, (mentona 26,37% y chavicol

23,73%); en el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* se identificaron 24 compuestos ( $\alpha$ -pineno 22,47% y eucaliptol 16,80%); para *Tagetes lucida*, se identificaron un total de 6 compuestos (mayor concentración, metil chavicol 94,21% y  $\beta$ -mirceno 1,51%). Finalmente, para *Thymus vulgaris* se identificaron un total de 22 compuestos ( $\gamma$ -terpineno 33,47% y p-cimeno 17,20%).

Gracias a la gran variedad de compuestos encontrados y la sinergia entre los mismos, pueden ser utilizados como antimicrobianos contra patógenos tanto bacterias y hongos que afectan el cultivo de tomate (Sonam Chouhan et al., 2017) (Anexo 5). Una vez analizados los compuestos que se encontraban en cada una de las plantas utilizadas en el presente estudio, se procedió a realizar el análisis de componentes principales (figura 4).

|                  | Asteraceae               | Poaceae            |                       | Apiaceae                     | Verbenaceae       | Lamiaceae         |                                       |                     |                           |                              |
|------------------|--------------------------|--------------------|-----------------------|------------------------------|-------------------|-------------------|---------------------------------------|---------------------|---------------------------|------------------------------|
| Planta           | <i>T. lucida</i>         | <i>C. citratus</i> | <i>Cymbopogon sp.</i> | <i>F. vulgare</i>            | <i>L. alba</i>    | <i>Mentha sp.</i> | <i>O. majorana</i>                    | <i>Origanum sp.</i> | <i>R. officinalis</i>     | <i>Thymus vulgaris</i>       |
| Comp. principal  | Metil Chavicol (94,21%)  | Geranial (41,88%)  | Geranial (45,27%)     | Anetol E (65,78%)            | Limoneno (49,91%) | Mentol (31,55%)   | $\gamma$ -Terpineno (17,32%)          | Mentona (26,37%)    | $\alpha$ -Pineno (22,47%) | $\gamma$ -Terpineno (33,47%) |
| Comp. secundario | $\beta$ -Mirceno (1,51%) | Geraniol (28,13%)  | Citronelal (17,22%)   | $\alpha$ -Terpineno (10,10%) | Carvona (21,19%)  | Chavicol (16,90%) | <i>Trans</i> Sabineno-hidrato (9,36%) | Chavicol (23,76%)   | Eucaliptol (16,80%)       | P-cimeno (17,20%)            |
| Comp. por planta | 6                        | 17                 | 27                    | 12                           | 24                | 28                | 34                                    | 27                  | 25                        | 29                           |
| Comp. no ident.  | 1,87 %                   | 4,13%              | 3,9%                  | 4,16%                        | 5,10%             | 2,32%             | 5,30%                                 | 4,4%                | 4,2%                      | 6,10%                        |

Tabla 4. Resumen del compuesto principal y secundario de cada AE.

Comp: compuestos. Ident: identificados.

Tabla 5. Cuantificación de compuestos por medio de GC-MS, de las 10 plantas.

| N. | T.R.   | I.R LIT | COMPUESTO                | CLAS | Cymbopogon sp. |              | Cymbopogon citratus |       | Foeniculum vulgare |              | Lippia alba |              | Mentha sp. |       |
|----|--------|---------|--------------------------|------|----------------|--------------|---------------------|-------|--------------------|--------------|-------------|--------------|------------|-------|
|    |        |         |                          |      | IK             | %A           | IK                  | %A    | IK                 | %A           | IK          | %A           | IK         | %A    |
| 1  | 12,062 | 809     | Octeno 2Z                | ALC  |                |              |                     |       |                    |              |             |              |            |       |
| 2  | 15,052 | 926     | Triciclo                 | MH   |                |              |                     |       |                    |              |             |              |            |       |
| 3  | 15,260 | 931     | $\alpha$ -Tujeno         | MH   |                |              |                     |       |                    |              |             |              | 929        | 0,40  |
| 4  | 15,526 | 939     | $\alpha$ -Pineno         | MH   |                |              |                     |       | 937                | 8,64         |             |              | 937        | 0,70  |
| 5  | 16,157 | 953     | Canfeno                  | MH   |                |              |                     |       |                    |              | 952         | 0,53         |            |       |
| 6  | 17,188 | 976     | Sabineno                 | MH   |                |              |                     |       |                    |              | 978         | 0,55         |            |       |
| 7  | 17,192 | 980     | $\beta$ -Pineno          | MH   |                |              |                     |       | 981                | 0,80         |             |              | 978        | 11,20 |
| 8  | 17,772 | 991     | $\beta$ -Mirceno         | MH   | 992            | 0,46         |                     |       | 993                | 0,77         | 992         | 0,80         | 993        | 0,85  |
| 9  | 17,498 | 1002    | $\alpha$ -Felandreno     | MH   |                |              | 994                 | 16,16 | 1010               | 1,34         |             |              | 1009       | 0,91  |
| 10 | 18,383 | 1017    | $\alpha$ -Terpineno      | MH   |                |              |                     |       | 1010               | <b>10,10</b> |             |              | 1007       | 0,75  |
| 11 | 19,132 | 1024    | p-Cimeno                 | MH   |                |              |                     |       |                    |              |             |              |            |       |
| 12 | 19,277 | 1026    | o-Cimeno                 | MH   | 1029           | 4,20         |                     |       |                    |              |             |              | 1029       | 1,23  |
| 13 | 19,429 | 1029    | Limoneno                 | MH   |                |              |                     |       | 1034               | 2,37         | <b>1035</b> | <b>49,91</b> | 1035       | 2,75  |
| 14 | 19,434 | 1031    | Eucaliptol               | MO   | 1037           | 0,78         | 1033                | 0,49  | 1045               | 0,65         |             |              | 1035       | 0,55  |
| 15 | 20,000 | 1050    | B-Ocimeno E              | MH   | 1050           | 0,50         | 1050                | 0,68  |                    |              | 1041        | 0,81         |            |       |
| 16 | 20,610 | 1059    | $\gamma$ -Terpineno      | MH   | 1063           | 0,61         |                     |       |                    |              | 1066        | 1,06         | 1063       | 2,37  |
| 17 | 20,990 | 1070    | Cis-Sabineno hidrato     | MO   |                |              |                     |       |                    |              |             |              |            |       |
| 18 | 21,760 | 1088    | $\alpha$ -terpinoleno    | MH   |                |              |                     |       |                    |              |             |              | 1093       | 0,70  |
| 19 | 22,049 | 1096    | Linalol                  | MO   | 1095           | 0,83         | 1089                | 0,98  | 1095               | 0,77         | 1102        | 0,63         |            |       |
| 20 | 22,319 | 1097    | Trans-Sabineno hidrato   | MO   |                |              |                     |       |                    |              |             |              |            |       |
| 21 | 22,373 | 1123    | 3-Octanol acetato        | ALC  |                |              |                     |       |                    |              |             |              | 1123       | 0,91  |
| 22 | 24,302 | 1153    | Citronelal               | MO   | 1153           | <b>17,22</b> |                     |       |                    |              |             |              |            |       |
| 23 | 24,390 | 1146    | Canfor                   | MO   |                |              |                     |       |                    |              |             |              | 1156       | 0,79  |
| 24 | 24,448 | 1163    | Trans $\beta$ -Terpineol | MO   |                |              | 1160                | 0,80  |                    |              |             |              | 1160       | 1,42  |
| 25 | 24,570 | 1152    | Mentona                  | MO   |                |              |                     |       |                    |              |             |              |            |       |
| 26 | 24,729 | 1164    | Isocitral Z              | MO   | 1164           | 0,83         | 1166                | 1,11  |                    |              |             |              |            |       |
| 27 | 25,130 | 1169    | Borneol                  | MO   |                |              |                     |       |                    |              |             |              |            |       |



|    |        |      |                               |    |             |              |             |              |      |             |              |      |              |              |      |
|----|--------|------|-------------------------------|----|-------------|--------------|-------------|--------------|------|-------------|--------------|------|--------------|--------------|------|
| 28 | 25,081 | 1171 | Mentol                        | MO |             |              | 1171        | 1,23         |      |             |              |      | <b>1175</b>  | <b>31,55</b> |      |
| 29 | 25,400 | 1177 | Terpinen 4-ol                 | MO | 1167        | 0,92         | 1186        | 1,50         |      |             | 1184         | 0,75 | 1186         | 6,70         |      |
| 30 | 26,035 | 1188 | $\alpha$ -Terpineol           | MO |             |              |             |              |      |             |              |      | 1199         | 6,60         |      |
| 31 | 26,500 | 1208 | <i>Trans</i> -Piperitol       | MO |             |              |             |              |      | 1207        | 2,54         |      | 1215         | 0,72         |      |
| 32 | 26,468 | 1196 | Metil chavicol                | MO |             |              |             |              |      |             |              |      |              |              |      |
| 33 | 27,735 | 1238 | Neral o Citral                | MO | 1240        | 6,65         |             |              |      |             |              |      |              |              |      |
| 34 | 28,200 | 1252 | Geraniol                      | MO | 1248        | 9,50         | 1254        | <b>28,13</b> |      |             |              |      |              |              |      |
| 35 | 28,225 | 1252 | Anetol Z                      | MO |             |              |             |              |      | 1251        | 1,28         |      |              |              |      |
| 36 | 28,390 | 1237 | Pulegona                      | MO |             |              |             |              |      |             |              |      |              |              |      |
| 37 | 28,417 | 1250 | Chavicol                      | MO |             |              |             |              |      |             |              |      | 1256         | <b>16,90</b> |      |
| 38 | 28,599 | 1242 | Carvona                       | MO |             |              |             |              |      |             |              | 1261 | <b>21,19</b> |              |      |
| 39 | 29,199 | 1276 | <i>Trans</i> -Carvona Oxido   | MO |             |              |             |              |      |             |              | 1271 | 0,52         | 1280         | 1,0  |
| 40 | 29,648 | 1267 | Geranial                      | MO | <b>1280</b> | <b>45,27</b> | <b>1286</b> | <b>41,88</b> | 1260 | 2,00        |              |      |              |              |      |
| 41 | 30,118 | 1284 | Anetol E                      | MO |             |              |             |              |      | <b>1297</b> | <b>65,78</b> |      |              |              |      |
| 42 | 30,500 | 1290 | Timol                         | MO |             |              | 1296        | 1,56         |      |             |              | 1295 | 0,72         | 1295         | 4,36 |
| 43 | 30,500 | 1299 | Carvacrol                     | MO |             |              |             |              |      |             |              | 1307 | 0,65         |              |      |
| 44 | 31,042 | 1334 | <i>Cis</i> -Piperitol acetato | MO |             |              |             |              |      |             |              |      |              | 1321         | 3,35 |
| 45 | 32,077 | 1338 | $\delta$ -Elemeno             | SH | 1347        | 0,70         |             |              |      |             |              | 1347 | 2,53         | 1335         | 0,55 |
| 46 | 32,565 | 1359 | Eugenol                       | MO |             |              |             |              |      |             |              |      |              |              |      |
| 47 | 33,437 | 1372 | Acetato de Carvacrol          | MO |             |              |             |              |      |             |              |      |              |              |      |
| 48 | 33,636 | 1381 | Acetato de Geranil            | MO | 1391        | 3,16         | 1386        | 0,75         |      |             |              |      |              |              |      |
| 49 | 35,493 | 1418 | Cariofileno E                 | SH |             |              | 1434        | 0,80         |      |             |              |      |              |              |      |
| 50 | 35,322 | 1432 | $\beta$ -Copaene              | SH | 1434        | 1,29         |             |              |      |             |              | 1442 | 1,90         | 1431         | 1,0  |
| 51 | 35,523 | 1441 | Aromadendreno                 | SH |             |              |             |              |      |             |              |      |              |              |      |
| 52 | 35,528 | 1439 | $\beta$ -Humeleno             | SH |             |              |             |              |      |             |              |      |              |              |      |
| 53 | 36,276 | 1460 | Allo-Aromadendreno            | SH |             |              |             |              |      |             |              |      |              |              |      |
| 54 | 37,559 | 1486 | Germacreno D                  | SH |             |              |             |              |      |             |              |      |              |              |      |
| 55 | 38,020 | 1509 | Germacreno A                  | SH | 1502        | 0,70         | 1500        | 0,80         |      |             |              | 1508 | 12,81        | 1509         | 0,54 |
| 56 | 38,788 | 1503 | Biciclogermacreno             | SH |             |              |             |              |      |             |              | 1504 | 0,53         |              |      |

| 57                               | 38,796 | 1512    | $\delta$ -Amorfenol     | SH   |                          |              |                     |      |                               |              |                       |             |                        |              |
|----------------------------------|--------|---------|-------------------------|------|--------------------------|--------------|---------------------|------|-------------------------------|--------------|-----------------------|-------------|------------------------|--------------|
| 58                               | 40,500 | 1576    | Germacren D-4-ol        | SO   | 1590                     | 1,10         |                     |      |                               |              | 1590                  | 0,96        |                        |              |
| 59                               | 42,346 | 1590    | Cis- $\beta$ -Elemenona | SO   | 1593                     | 1,57         |                     |      |                               |              |                       |             |                        |              |
| Otros compuestos                 |        |         |                         |      | 3,97                     |              | 3,13                |      | 2,96                          |              | 3,15                  |             | 1,7                    |              |
| MH: Monoterpenos Hidrocarburos   |        |         |                         |      | 5,02%                    |              | 16,84%              |      | 23,52%                        |              | 52,06%                |             | 19,91%                 |              |
| MO: Monoterpenos Oxigenados      |        |         |                         |      | 84,98%                   |              | 78,43%              |      | 72,32%                        |              | 23,37%                |             | 73,26%                 |              |
| SO: Sesquiterpenos Oxigenados    |        |         |                         |      | 2,47%                    |              | 0,00%               |      | 0,00%                         |              | 0,78%                 |             | 0,00%                  |              |
| SH: Sesquiterpenos Hidrocarburos |        |         |                         |      | 2,91%                    |              | 1,60%               |      | 0,00%                         |              | 18,69%                |             | 3,03%                  |              |
| Compuestos por planta            |        |         |                         |      | 18                       |              | 14                  |      | 12                            |              | 17                    |             | 25                     |              |
| N.                               | T.R.   | I.R LIT | COMP                    | CLAS | <i>Origanum majorana</i> |              | <i>Origanum sp.</i> |      | <i>Rosmarinus officinalis</i> |              | <i>Tagetes lucida</i> |             | <i>Thymus vulgaris</i> |              |
|                                  |        |         |                         |      | IK                       | %A           | IK                  | %A   | IK                            | %A           | IK                    | %A          | IK                     | %A           |
| 1                                | 12,062 | 809     | Octeno 2Z               | ALC  |                          |              |                     |      |                               |              |                       |             | 810                    | 4,45         |
| 2                                | 15,052 | 926     | Triciclo                | MH   |                          |              |                     |      | 932                           | 0,71         |                       |             | 930                    | 2,12         |
| 3                                | 15,260 | 931     | $\alpha$ -Tujeno        | MH   | 925                      | 0,99         | 931                 | 1,40 | 929                           | 0,60         |                       |             |                        |              |
| 4                                | 15,526 | 939     | $\alpha$ -Pino          | MH   | 937                      | 0,92         | 937                 | 0,77 | <b>938</b>                    | <b>22,47</b> |                       |             | 939                    | 1,14         |
| 5                                | 16,157 | 953     | Canfeno                 | MH   |                          |              |                     |      | 955                           | 9,55         |                       |             | 948                    | 0,43         |
| 6                                | 17,188 | 976     | Sabineno                | MH   | 979                      | 4,98         | 977                 | 0,58 |                               |              |                       |             |                        |              |
| 7                                | 17,192 | 980     | $\beta$ -Pino           | MH   | 974                      | 0,86         | 981                 | 0,91 | 980                           | 6,38         |                       |             | 979                    | 1,25         |
| 8                                | 17,772 | 991     | $\beta$ -Mirceno        | MH   | 993                      | 2,36         |                     |      | 993                           | 1,91         | 993                   | <b>1,51</b> | 981                    | 1,37         |
| 9                                | 17,498 | 1002    | $\alpha$ -Felandreno    | MH   |                          |              | 1006                | 0,78 |                               |              |                       |             | 1009                   | 1,75         |
| 10                               | 18,383 | 1017    | $\alpha$ -Terpineno     | MH   | 1008                     | 0,53         | 1008                | 0,68 | 1010                          | 2,25         |                       |             |                        |              |
| 11                               | 19,132 | 1024    | p-Cimeno                | MH   | 1023                     | 4,85         |                     |      | 1018                          | 0,62         |                       |             | 1024                   | 2,94         |
| 12                               | 19,277 | 1026    | o-Cimeno                | MH   | 1029                     | 4,47         | 1021                | 3,50 | 1025                          | 0,77         |                       |             | 1023                   | 17,20        |
| 13                               | 19,429 | 1029    | Limoneno                | MH   | 1035                     | 1,97         | 1036                | 0,85 | 1032                          | 6,50         |                       |             | 1036                   | 0,93         |
| 14                               | 19,434 | 1031    | Eucaliptol              | MO   |                          |              |                     |      | 1038                          | <b>16,80</b> |                       |             | 1037                   | 0,86         |
| 15                               | 20,000 | 1050    | B-Ocimeno E             | MH   | 1044                     | 2,81         |                     |      |                               |              | 1050                  | 0,80        |                        |              |
| 16                               | 20,610 | 1059    | $\gamma$ -Terpineno     | MH   | <b>1054</b>              | <b>17,32</b> | 1063                | 0,83 | 1059                          | 1,60         |                       |             | <b>1058</b>            | <b>33,47</b> |
| 17                               | 20,990 | 1070    | Cis-Sabineno hidrato    | MO   | 1070                     | 1,68         | 1073                | 0,88 | 1073                          | 0,79         |                       |             | 1073                   | 0,95         |
| 18                               | 21,760 | 1088    | $\alpha$ -terpinoleno   | MH   | 1076                     | 1,55         |                     |      | 1101                          | 0,84         |                       |             |                        |              |
| 19                               | 22,049 | 1096    | Linalol                 | MO   | 1095                     | 1,59         | 1101                | 0,93 | 1107                          | 0,83         |                       |             | 1087                   | 2,36         |

|    |        |      |                                 |     |      |      |      |       |      |       |  |      |       |       |
|----|--------|------|---------------------------------|-----|------|------|------|-------|------|-------|--|------|-------|-------|
| 20 | 22,319 | 1097 | <i>Trans</i> -Sabineno hidrato  | MO  | 1108 | 9,36 |      |       |      |       |  |      | 1094  | 0,65  |
| 21 | 22,373 | 1123 | 3-Octanol acetato               | ALC |      |      | 1124 | 1,29  |      |       |  |      |       |       |
| 22 | 24,302 | 1153 | Citronelal                      | MO  |      |      |      |       |      |       |  |      |       |       |
| 23 | 24,390 | 1146 | Canfor                          | MO  |      |      |      |       | 1156 | 12,38 |  |      |       |       |
| 24 | 24,448 | 1163 | <i>Trans</i> $\beta$ -Terpineol | MO  | 1159 | 0,90 | 1158 | 1,52  |      |       |  |      |       |       |
| 25 | 24,570 | 1152 | Mentona                         | MO  |      |      | 1156 | 26,37 |      |       |  |      |       |       |
| 26 | 24,729 | 1164 | Isocitral Z                     | MO  |      |      |      |       |      |       |  |      |       |       |
| 27 | 25,130 | 1169 | Borneol                         | MO  |      |      | 1173 | 2,21  | 1170 | 2,39  |  |      | 1173  | 0,76  |
| 28 | 25,081 | 1171 | Mentol                          | MO  |      |      |      |       |      |       |  |      |       |       |
| 29 | 25,400 | 1177 | Terpinen 4-ol                   | MO  | 1189 | 5,60 | 1186 | 0,82  | 1176 | 0,78  |  |      |       |       |
| 30 | 26,035 | 1188 | $\alpha$ -Terpineol             | MO  | 1195 | 0,85 |      |       | 1199 | 0,75  |  |      |       |       |
| 31 | 26,500 | 1208 | <i>Trans</i> -Piperitol         | MO  |      |      |      |       | 1206 | 1,27  |  |      |       |       |
| 32 | 26,468 | 1196 | Metil chavicol                  | MO  |      |      |      |       |      |       |  | 1209 | 94,21 |       |
| 33 | 27,735 | 1238 | Neral o Citral                  | MO  |      |      |      |       |      |       |  |      |       |       |
| 34 | 28,200 | 1252 | Geraniol                        | MO  |      |      |      |       |      |       |  |      | 1255  | 1,20  |
| 35 | 28,225 | 1252 | Anetol Z                        | MO  | 1254 | 8,34 |      |       |      |       |  |      |       |       |
| 36 | 28,390 | 1237 | Pulegona                        | MO  | 1258 | 1,25 |      |       | 1249 | 0,63  |  |      |       |       |
| 37 | 28,417 | 1250 | Chavicol                        | MO  |      |      | 1255 | 23,76 |      |       |  | 1257 | 0,72  |       |
| 38 | 28,599 | 1242 | Carvona                         | MO  |      |      |      |       |      |       |  |      |       |       |
| 39 | 29,199 | 1276 | <i>Trans</i> -Carvona Oxido     | MO  |      |      | 1275 | 6,05  |      |       |  |      |       |       |
| 40 | 29,648 | 1267 | Geranial                        | MO  |      |      |      |       |      |       |  |      |       |       |
| 41 | 30,118 | 1284 | Anetol E                        | MO  |      |      |      |       |      |       |  |      |       |       |
| 42 | 30,500 | 1290 | Timol                           | MO  | 1302 | 5,33 | 1299 | 3,18  | 1296 | 2,30  |  |      | 1290  | 15,97 |
| 43 | 30,500 | 1299 | Carvacrol                       | MO  | 1311 | 4,04 | 1315 | 4,47  |      |       |  |      | 1303  | 1,60  |
| 44 | 31,042 | 1334 | <i>Cis</i> -Piperitol acetato   | MO  |      |      |      |       |      |       |  |      |       |       |
| 45 | 32,077 | 1338 | $\delta$ -Elemeno               | SH  |      |      |      |       |      |       |  |      |       |       |
| 46 | 32,565 | 1359 | Eugenol                         | MO  |      |      | 1362 | 0,79  |      |       |  |      |       |       |
| 47 | 33,437 | 1372 | Acetato de Carvacrol            | MO  |      |      | 1374 | 7,68  |      |       |  |      |       |       |

|                                  |        |      |                                 |    |      |        |        |        |        |        |      |      |      |      |
|----------------------------------|--------|------|---------------------------------|----|------|--------|--------|--------|--------|--------|------|------|------|------|
| 48                               | 33,636 | 1381 | Acetato de Geranil              | MO |      |        |        |        |        |        |      |      |      |      |
| 49                               | 35,493 | 1418 | Cariofileno E                   | SH |      |        |        |        | 1435   | 4,36   |      |      | 1434 | 0,60 |
| 50                               | 35,322 | 1432 | $\beta$ -Copaene                | SH |      |        |        |        |        |        | 1432 | 0,66 |      |      |
| 51                               | 35,523 | 1441 | Aromadendreno                   | SH | 1439 | 5,20   |        |        |        |        |      |      | 1440 | 2,83 |
| 52                               | 35,528 | 1439 | $\beta$ -Humeleno               | SH |      |        | 1436   | 4,10   |        |        |      |      |      |      |
| 53                               | 36,276 | 1460 | Allo-Aromadendreno              | SH | 1454 | 0,69   |        |        |        |        |      |      |      |      |
| 54                               | 37,559 | 1486 | Germacreno D                    | SH | 1476 | 0,90   | 1487   | 0,60   | 1486   | 0,70   |      |      |      |      |
| 55                               | 38,020 | 1509 | Germacreno A                    | SH | 1507 | 2,78   | 1506   | 1,62   |        |        | 1510 | 1,33 |      |      |
| 56                               | 38,788 | 1503 | Biciclogermacreno               | SH | 1515 | 0,35   | 1512   | 2,04   |        |        |      |      | 1511 | 0,88 |
| 57                               | 38,796 | 1512 | $\delta$ -Amorfeno              | SH | 1514 | 3,05   |        |        |        |        |      |      |      |      |
| 58                               | 40,500 | 1576 | Germacren D-4-ol                | SO |      |        |        |        |        |        |      |      |      |      |
| 59                               | 42,346 | 1590 | <i>Cis</i> - $\beta$ -Elemenona | SO |      |        |        |        |        |        |      |      |      |      |
| Otros compuestos                 |        |      |                                 |    |      | 4,24   | 1,44   | 1,82   | 0,77   | 4,29   |      |      |      |      |
| MH: Monoterpenos Hidrocarburos   |        |      |                                 |    |      | 42,71% | 8,60%  | 53,20% | 2,31%  | 62,30% |      |      |      |      |
| MO: Monoterpenos Oxigenados      |        |      |                                 |    |      | 38,90% | 76,86% | 37,42% | 94,93% | 22,65% |      |      |      |      |
| SO: Sesquiterpenos Oxigenados    |        |      |                                 |    |      | 0,00%  | 0,00%  | 0,00%  | 0,00%  | 0,60%  |      |      |      |      |
| SH: Sesquiterpenos Hidrocarburos |        |      |                                 |    |      | 13,12% | 8,36%  | 4,96%  | 1,99%  | 3,89%  |      |      |      |      |
| Compuestos por planta            |        |      |                                 |    |      | 28     | 26     | 24     | 6      | 22     |      |      |      |      |

\*T.R: tiempo de retención del compuesto \*I.R.Lit: índice de retención reportado en la literatura. Los números resaltados en rojo son los compuestos mayoritarios por planta, los resaltados en negrilla son el compuesto secundario de la planta.

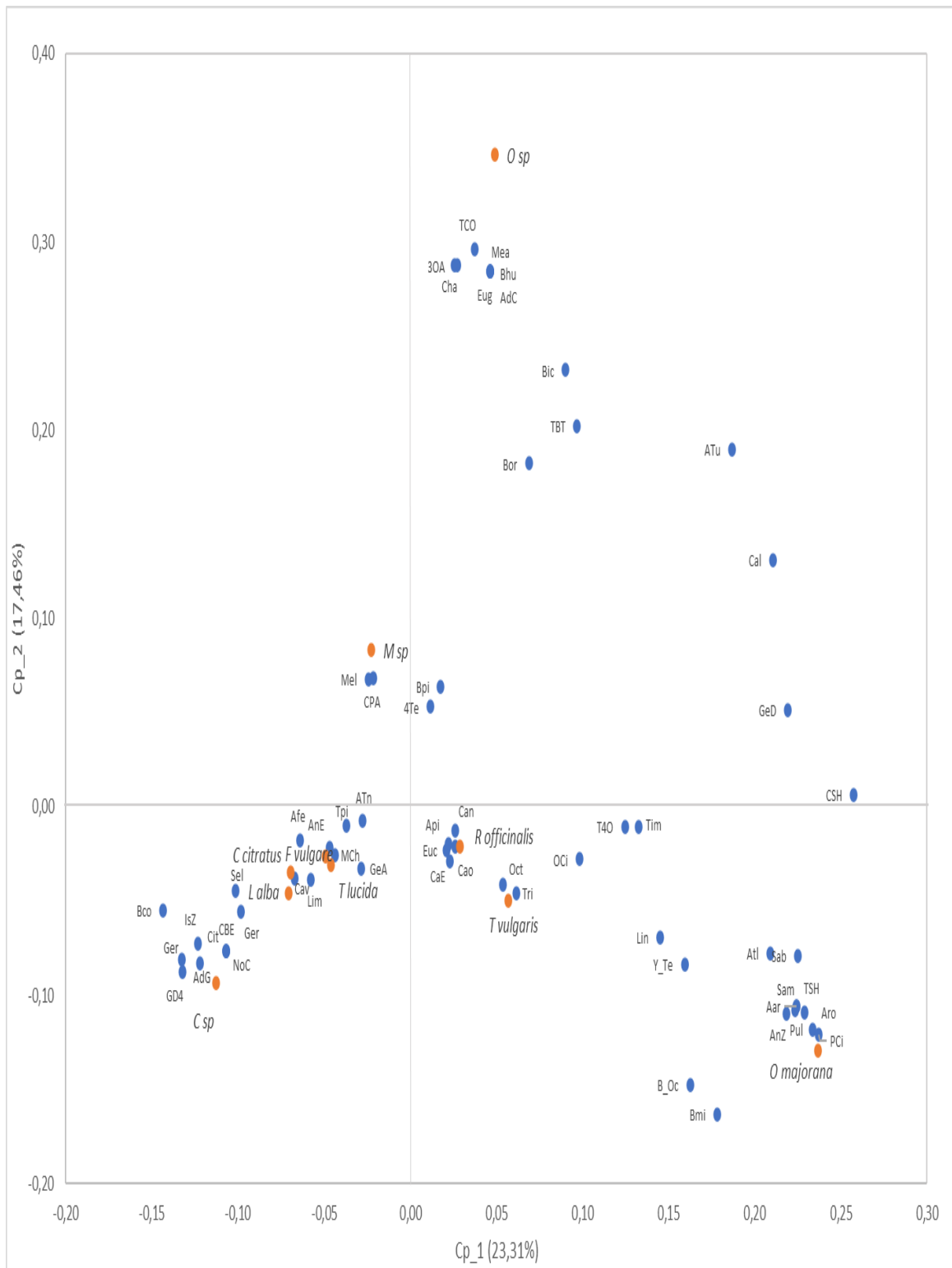


Figura 4. Análisis por componentes de los aceites esenciales.

Como se observa en la figura 4, *Origanum* sp. fue la única planta en la que el aceite esencial presentó contenidos de mentona, acetato de carvacrol,  $\beta$ -humeleno y eugenol, así como los

valores más altos de contenido de chavicol, *trans*-carvona oxido y 3-octanol acetato. En su momento, *Mentha* sp., fue la única planta en presentar el compuesto cis piperitol acetato y contenía los mayores valores de mentol,  $\beta$ -pineno y  $\alpha$ -terpineol. Así mismo, *Origanum majorana* fue la única especie en contener los compuestos allo aromadendreno y  $\delta$  amorfeno, así como los contenidos más altos de los compuestos p-cimeno,  $\alpha$ -terpinoleno, *trans*-sabineno hidrato, anetol Z, pulegona, aromadendreno y sabineno, en comparación con las otras especies que contenían estos compuestos. *Thymus vulgaris* fue la única planta que presentó el compuesto octeno 2Z y mayores contenidos de triciclo, mientras que *Rosmarinus officinalis* presentó los valores más altos de contenido de los compuestos canfor, canfeno, eucaliptol, cariofileno E y  $\alpha$ -pineno.

*Tagetes lucida* fue la única especie en contener metil chavicol y posee valores bajos de los compuestos  $\beta$ -mirceno,  $\beta$ -ocimeno Z,  $\beta$ -copaene y germacreno A, en comparación a otras especies que también los contienen; *Cymbopogon citratus* presentó valores altos de contenido de  $\alpha$ -felandreno, geraniol, isocitral Z y geranial, así como valores bajos de germacreno A en comparación a otras especies. *Cymbopogon* sp., fue la única especie en presentar citronelal, citral y cis B-elemenona, posee, además, valores altos de germacren D-4-ol, intermedios de geranial y acetato de geranil y isocitral Z y valores bajos de los compuestos  $\beta$ -copaene, geraniol,  $\beta$ -ocimeno Z,  $\beta$ -mirceno, germacreno A (de mayor a menor contenido).

*Foeniculum vulgare* fue la única especie en presentar contenidos de anetol-E, con contenidos altos de  $\alpha$ -terpineno y *trans*-piperitol y valores bajos de  $\beta$ -mirceno y  $\alpha$ -felandreno en comparación de otras especies. *Lippia alba* fue la única especie en presentar el compuesto carvona, valores altos de limoneno,  $\delta$ -elemeno, germacreno-A y  $\beta$ -Copaene, así como valores bajos en sus contenidos de  $\beta$ -Mirceno y  $\beta$ -ocimeno Z. De igual forma de los 59 compuestos caracterizados y cuantificados para el presente estudio,  $\beta$ -mirceno (exceptuando *Cymbopogon citratus* y *Origanum* sp.) y linalol (exceptuando *Mentha* sp., y *Tagetes lucida*) se encontraron en ocho de las diez plantas; los compuesto limoneno, y terpineno, timol y germacreno A en siete plantas,  $\alpha$ - pineno,  $\beta$ -pineno, p-cimeno, eucaliptol en seis plantas;  $\alpha$ -felandreno,  $\alpha$ -terpineno,  $\beta$ -ocimeno Z y por último en 4 plantas se encuentran los compuestos  $\alpha$ -tujeno,  $\alpha$ -terpinoleno, *trans*  $\beta$ -terpineol, carvacrol,  $\beta$  copaene, biciclogermacreno este último en concentraciones que no superaba el 3,0%.

Tanto *Cymbopogon* sp., y *Cymbopogon citratus* pertenecen a la familia Poaceae que comprende una amplia variedad de pastos que crecen en regiones tropicales y subtropicales fáciles de cultivar. Estas plantas pueden alcanzar hasta los dos metros de crecimiento, lo que permite obtener una mayor densidad de siembra. De acuerdo con los datos obtenidos para *Cymbopogon* sp., el compuesto de mayor concentración fue el mismo que se obtuvo para el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (geranial 45,27%). En este sentido, la aparición de metabolitos secundarios con actividades biológicas similares en plantas relacionadas filogenéticamente puede contribuir a la implementación de enfoques más racionales para la búsqueda de nuevas sustancias con potencial económico (Pérez Zamora et al., 2018).

Los resultados presentados en el apartado previo se pueden comparar con los de otros autores tales como Ursulino en Brasil, quien determinó como mayor compuesto geraniol con 33,88%. Por su parte De Toledo (Brasil), Kamari (Marruecos) y Muñoz (Colombia) cuantificaron citronelal como mayor compuesto con 27,87%, 16,90% y 23% respectivamente (Kamari et al., 2018; Muñoz et al., 2014; Toledo et al., 2016; Ursulino et al., 2019). Con respecto al aceite esencial de *Cymbopogon citratus*, en el presente estudio se obtuvo principalmente geranial (41,88%), cuya concentración también fue determinada por Tofiño y Olivero (Colombia) y Dègnon (Benin). Tal investigación, arrojó porcentajes de 31,10%, 34,40% y 41,30%, respectivamente. Sin embargo, Kamsu, en Camerún, determinó una mayor concentración de acetato de linalool con 41,19%. Lo anterior podría indicar que el geranial es un compuesto que se encuentra frecuentemente con una mayor abundancia relativa en esta planta (Dègnon et al., 2019; Kamsu et al., 2019; Olivero-Verbel et al., 2010; Spriha & Rattandeeep, 2021; Tofiño Rivera, 2017).

*Foeniculum vulgare* es la única planta del presente estudio que pertenece a la familia Apiaceae; el mayor compuesto cuantificado en el aceite esencial fue Anetol-E 65,78%. Anteriormente, datos también hallados por Gashemian en tres regiones de Irán e Iraq establecieron porcentajes que oscilaron entre 78 y 79%. En otro punto, Kalelli y colaboradores en 2019, realizaron la extracción del aceite esencial de *Foeniculum vulgare* en tres regiones de Túnez. Allí los porcentajes de Anetol-E oscilaron entre 63 y 78%. Este mismo autor trabajó también en dos regiones de Francia. En contraste, en aquella medición el compuesto mayormente cuantificado fue chavicol con 88 y 44%, dependiendo de la región investigada. Así mismo, Nardoni (Italia) y Muñoz (Colombia) determinaron Anetol-Z como compuesto mayor con porcentajes de 46,90% y 73,30%, respectivamente. La información anterior permite suponer que el *Foeniculum vulgare* es

una planta que, a pesar de las condiciones genéticas, climáticas y edafológicas, posee un aceite esencial químicamente estable (Ghasemian et al., 2020; Kalleli et al., 2019; Muñoz et al., 2014; Nardoni et al., 2019).

*Lippia alba* es la única planta de la familia Verbenaceae que aborda este estudio. Es una planta ampliamente distribuida en América del Sur. Para el presente trabajo, el compuesto que se encontró en mayor concentración del aceite esencial fue limoneno con un 49,9%. Souza (Brasil), cuantificó linalol en un 81,64%. Por otra parte, Muñoz y colaboradores (Colombia) realizaron la extracción del aceite esencial por medio de varias técnicas, entre ellas dos metodologías de fase sólida; con una utilizaron polidimetilsiloxano. De esa forma obtuvieron Germacreno-D (28%). En el segundo experimento utilizaron poliácido y obtuvieron como mayor compuesto *cis*-piperitona óxido (34,10%). Además, realizaron extractos con técnicas convencionales (extracción simultánea, maceración e hidrodestilación asistida por microondas) y el mayor compuesto cuantificado fue *cis*-piperitona óxido, con 17%, 20%, 56% y 44%, respectivamente. A su vez, otro trabajo, que se desarrolló en Colombia por Stashenko en 2014, caracterizó 4 quimiotipos diferentes del aceite esencial de *Lippia alba*. Para ello se tuvo en cuenta la composición porcentual mayoritaria con la que cobraría nombre el compuesto. De esa manera se determinaron: carvona 50,30%, quimiotipo citral con geranial al 27%, quimiotipo carvona-citral con geranial al 25% y limoneno al 22%; por último, quimiotipo mircenona al 63%. La composición química del aceite esencial de *Lippia alba* es un ejemplo de la variación en los componentes de los aceites esenciales lo que determina la existencia de un gran número de quimiotipos (Acero-Godoy et al., 2019, 2019; Pérez Zamora et al., 2018; Souza et al., 2017; Stashenko et al., 2014). Para la planta *Tagetes lucida* perteneciente a la familia Asteraceae, el grupo de Zarate en México realizó el extracto del aceite esencial de 5 regiones diferentes y determinó para las regiones 1 y 3 que el mayor compuesto encontrado fue metil eugenol con 56,89% y 64,59%. A su tiempo, en la región 2 se determinó estragol 46,92%. Y en las regiones 4 y 5 de México se cuantificó acetato de geranilo con 33,11% y 25,92%, respectivamente. Es en este marco que en una revisión realizada por Salehi en 2018 se encontró una caracterización de 4 quimiotipos existentes: (a) niveles altos de E-anetol y bajos de metil chavicol, (b) niveles altos de metil chavicol, (c) niveles altos de metil eugenol, (d) abundantes cantidades de nerolidol. De los 4 quimiotipos, el identificado en el presente estudio corresponde a la clasificación b (niveles altos de metil chavicol) (Salehi et al., 2018; Zarate-Escobedo et al., 2018).



La familia Lamiaceae contiene una amplia variedad de plantas aromáticas catalogadas como medicinales y que han sido utilizadas por el ser humano. Por otra parte, produce grandes cantidades de metabolitos secundarios incluidos los compuestos presentes en los aceites esenciales. A esta familia pertenecen los aceites esenciales de las plantas *Mentha* sp., *Origanum* sp., *Origanum majorana*, *Rosmarinus officinalis* y *Thymus vulgaris* utilizados en el presente estudio (Ramos da Silva et al., 2021). En el aceite esencial extraído de *Mentha* sp. se cuantificó el compuesto mentol (31,55%) que da su nombre a la planta con resultados menores a los obtenidos por Cruz Almeida (Brasil) y Rosato (Italia) quienes encontraron un 45,28% y un 67,28%, respectivamente. Sin embargo, fueron Passos y su equipo (Brasil) quienes determinaron como mayor compuesto mentona (52,91%). Finalmente, Roldan y Colaboradores (Colombia), identificaron como mayor compuesto, pulegona (44,54%). Los datos anteriores corroboran lo que menciona la literatura a nivel de aceite esencial. A saber, que el nombre de la planta es la que le da el nombre al compuesto más relevante, siendo en nuestro caso mentol (Cruz Almeida et al., 2019; Passos Braga et al., 2019; Roldán et al., 2010; Rosato et al., 2018).

Para la planta *Origanum majorana* se obtuvo como mayor compuesto  $\gamma$ -terpineno (17,32%). Verma y colaboradores (India) cuantificaron como mayor compuesto el *cis*-sabineno hidrato (37,05%). Muñoz (Colombia) y Della Pepa (Italia), además de Arruda da Cunha (Brasil), identificaron como compuesto mayoritario a terpinen-4-ol con 26%, 29% y 20%, respectivamente. Valores superiores si los comparamos con los obtenidos en el presente estudio, 5,50% (Arruda da Cunha et al., 2018; Della Pepa et al., 2019; Muñoz Acevedo et al., 2007; Verma et al., 2016).

Del mismo género que la planta precedente se encuentra *Origanum* sp. En la misma, conocida como orégano común, se cuantificó como compuesto mayoritario mentona (26,37%). Fikry y colaboradores (Egipto) y Rodrigues (Brasil) determinaron que el mayor compuesto presente en el aceite esencial era terpinen-4-ol, 38,35% y 22,94%, respectivamente. Wu (China) y Betancourt (Colombia) cuantificaron timol como el compuesto principal del aceite esencial (41,92% y 21,5% respectivamente). En el presente estudio el valor de timol fue de 3,18%. Para concluir, Roldán y colaboradores (Colombia) determinaron una concentración de carvacrol de (85,25%) (Betancourt et al., 2012; Fikry et al., 2019; Rodrigues Fernandes et al., 2019; Roldán et al., 2010; Wu et al., 2019).

Finalmente, *Rosmarinus officinalis* y *Thymus vulgaris* son plantas que han sido ampliamente estudiadas a nivel de aceite esencial. Para *Rosmarinus officinalis* el mayor compuesto

cuantificado en el presente estudio fue  $\alpha$ -pineno (22,47%). Sin embargo, otros autores reportan datos diferentes. Acorde con tal hecho, Elyemni (Marruecos), quien utilizó el método de hidrodestilación asistida por microondas e hidrodestilación convencional, obtuvo como compuesto mayoritario eucaliptol (32,18% y 31,20 respectivamente). En cambio, en el presente estudio, dicho compuesto fue el segundo en concentración con un 16,60%. Bajo el mismo esquema que Elyemni, Moradi y colaboradores (Iraq) determinaron que el mayor compuesto cuantificado era  $\alpha$ -pineno (24% y 20% respectivamente). Evidentemente, dicho dato también concuerda con la presente investigación. Por el contrario, Silva y colaboradores (México), determinaron que el canfor (39,46%), era el principal compuesto del aceite esencial. Así mismo, dos trabajos realizados en Colombia por Coy y Roldán determinaron diferentes compuestos como mayoritarios, los cuales fueron piperitona (23,7%) y eucaliptol (28%). Este último dato es consecuente con el estudio de Elyemni (Coy Barrera & Acosta, 2013; Elyemni et al., 2019; Moradi et al., 2018; Roldán et al., 2010; Silva-Flores et al., 2019).

Para *Thymus vulgaris*, el compuesto más abundante en la presente investigación se identificó como  $\gamma$ -terpineno (33,47%). Así también se presentó en el estudio de Alexa y colaboradores (Rumania), en el que fue 68,41%. Lo previo es distinto a lo identificado por Reyes y su grupo (México), en el que se halló mayormente o-cimol (19,8%). A su vez, Gedikoğlu y col (Turquía) utilizaron dos métodos de destilación: hidrodestilación convencional y destilación asistida por microondas. Así lograron determinar que el compuesto mayoritario para dicho aceite era timol (55,3% y 50,5%, respectivamente). En Colombia, Coy y Roldán trabajaron con la misma planta por el método de destilación utilizado en el presente estudio y establecieron como mayor compuesto timol (30,6%) y  $\alpha$ -pineno (29%). Para nosotros, timol fue el tercer compuesto identificado con un valor de 15,95%; el segundo es o-cimeno (17,2%) (Alexa et al., 2018; Coy Barrera & Acosta, 2013; Gedikoğlu et al., 2019; Reyes-Jurado, 2014; Roldán et al., 2010). Los anteriores resultados obtenidos para los aceites esenciales demuestran que en su mayoría están compuestos por monoterpenos oxigenados, además, son una excelente fuente de metabolitos y con una amplia gama de compuestos bioactivos seguros para el medio ambiente. Los usos de los aceites esenciales pueden variar debido a sus componentes, desde la culinaria hasta los antimicrobianos en virtud de su potencial biológico y terapéutico (Dhifi et al., 2016; León-Méndez et al., 2019).

#### 5.4. Prueba de difusión en agar para *R. solanacearum*:

La cepa de *R. solanacearum* se activó en medio TZC a 28°C y se observó crecimiento a las 48 horas con la producción de colonias cremosas y con centro rojizo. Paso seguido, se realizó una coloración de Gram y se observaron bacilos Gram negativos. A su vez, se desarrollaron las pruebas de difusión en agar y se determinó que todos los aceites esenciales utilizados en la presente investigación inhiben el patógeno vascular *R. solanacearum* en concentraciones desde 200 mg/mL hasta 0,1 mg/mL. En la tabla únicamente se consignan las concentraciones cuyos resultados fueron reproducibles tanto en cada repetición como en el tiempo (tabla 6) (Anexo 6).

Como se observa en la tabla 6, gracias a la amplia variedad de compuestos presentes en los diez aceites esenciales, todos generan actividad antimicrobiana al ser probados por el método de difusión en agar contra *R. solanacearum*. Sin embargo, el halo (el cual se midió como el diámetro en mm que generaba cada zona donde no se observó crecimiento), porcentaje de inhibición y las concentraciones a las que actúa cada aceite son diferentes, como lo mencionan diversos autores que han trabajado con las mismas especies, pero diferentes patógenos (Anexo 7).

Por otra parte, al realizar las pruebas de análisis de varianza y análisis múltiple de Tukey, se encontró que para el porcentaje de inhibición existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados: el mayor porcentaje de inhibición se presentó con el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (180 mg/mL), 184,94%, seguido de *Tagetes lucida* (180 mg/mL), 172,25%. Un tercer grupo lo conforman los aceites esenciales de *Cymbopogon* sp., (160 mg/mL), *Foeniculum vulgare* (280 mg/mL) y *Cymbopogon citratus* (140 mg/mL). Para estos 3 últimos extractos hubo un comportamiento similar estadístico con valores entre 108,87% y 112,37 % de inhibición. En contraposición, el menor desempeño se presentó cuando se empleó el aceite de *Rosmarinus officinalis* en la dosis de 180 mg/mL, el cual alcanzó solo un 37,12% de inhibición (figura 5). Para finalizar, no existen diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las concentraciones utilizadas para los aceites esenciales de *Cymbopogon* sp., (p valor=0,0563), *Foeniculum vulgare* (p valor=0,6797), *Origanum majorana* (p valor=0,6315), *Mentha* sp., (p valor=0,3395), *Origanum* sp., (p valor=0,1472), y *Thymus vulgaris* (p valor=0,0924). Para los aceites de *Tagetes lucida* (p valor=0,0003), *Cymbopogon citratus* (p valor=0,0442), *Lippia alba* (p valor=0,0300) y *Rosmarinus officinalis* (p valor=0,0070) se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 6 Porcentaje de efecto inhibidor de los aceite esencial contra *Ralstonia solanacearum*.

| Aceite esencial               | Concentración del tratamiento mg/mL | Media del halo de inhibición (mm) | % inhibición  |
|-------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|---------------|
| <i>Cymbopogon</i> sp.         | <b>160*</b>                         | <b>20,22</b>                      | <b>113,48</b> |
|                               | 140                                 | 16,40                             | 92,03         |
|                               | 120                                 | 14,56                             | 81,68         |
|                               | 80                                  | 15,11                             | 84,79         |
| <i>Cymbopogon citratus</i>    | <b>180*</b>                         | <b>32,15</b>                      | <b>184,94</b> |
|                               | 160                                 | 17,56                             | 98,51         |
|                               | 140                                 | 19,55                             | 109,68        |
| <i>Foeniculum vulgare</i>     | 280                                 | 19,89                             | 111,60        |
|                               | 240                                 | 19,33                             | 108,49        |
|                               | 180                                 | 16,33                             | 91,65         |
| <i>Lippia alba</i>            | 160                                 | 9,11                              | 51,12         |
| <i>Mentha</i> sp.             | 200                                 | 14,11                             | 79,18         |
|                               | 140                                 | 14,22                             | 79,81         |
| <i>Origanum</i> sp.           | 240                                 | 15,22                             | 85,42         |
|                               | 160                                 | 13,00                             | 72,85         |
|                               | 140                                 | 15,90                             | 89,22         |
| <i>Origanum majorana</i>      | 160                                 | 17,56                             | 98,51         |
|                               | 140                                 | 14,33                             | 80,43         |
|                               | 80                                  | 15,00                             | 84,17         |
| <i>Rosmarinus officinalis</i> | 200                                 | 10,13                             | 56,81         |
|                               | 180                                 | 6,43                              | 37,12         |
|                               | 160                                 | 12,86                             | 72,15         |
|                               | 140                                 | 12,33                             | 69,21         |
| <i>Tagetes lucida</i>         | 180                                 | 31,78                             | 172,25        |
|                               | 160                                 | 16,30                             | 91,47         |
|                               | 140                                 | 9,20                              | 51,62         |
|                               | 100                                 | 10,00                             | 56,11         |
| <i>Thymus vulgaris</i>        | 80                                  | 18,89                             | 105,99        |
|                               | 20                                  | 9,22                              | 51,75         |
| Acetona                       | 100%                                | 0,0                               | 0,0           |
| Rifampicina                   | 5,0 (ug/mL)                         | 17,82                             | 100,03        |

\*Negrilla: valores de aceite esencial que generaron mayor porcentaje de inhibición.

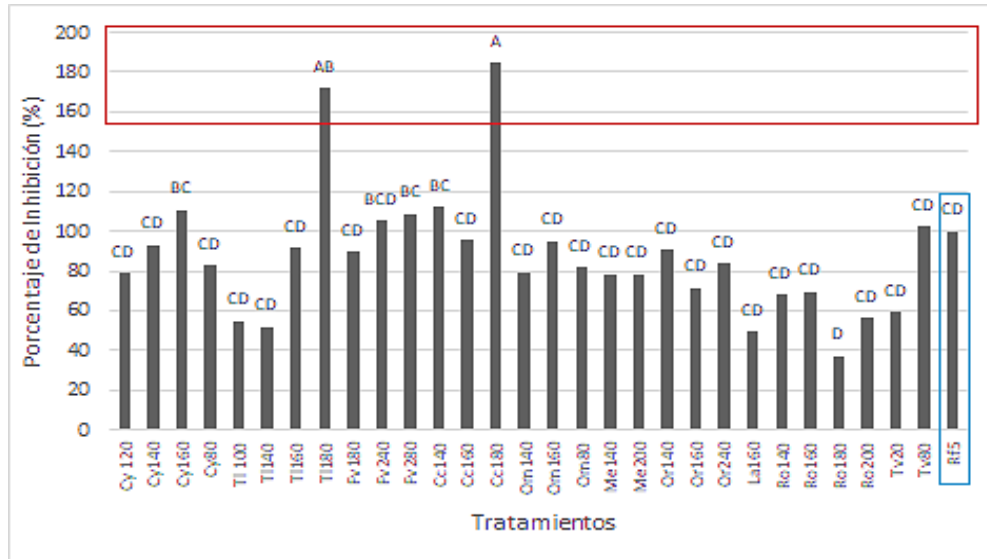


Figura 5. Evaluación del porcentaje de inhibición de los aceites esenciales por prueba de ANOVA y Tukey. \*Cy: *Cymbopogon* sp., TI: *Tagetes lucida*, Fv: *Foeniculum vulgare*, Cc: *Cymbopogon citratus*, Om: *Origanum majorana*, Me: *Mentha* sp., Or: *Origanum* sp., La: *Lippia alba*, R: *Rosmarinus officinalis*, Tv: *Thymus vulgaris*, Rf: rifampicina; los números corresponden a las concentraciones de los aceites esenciales. \*Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. Recuadro rojo tratamientos sobresalientes, recuadro azul testigo.

Evaluando de manera particular cada aceite esencial, se comprueba que *Cymbopogon citratus*, en la concentración de 180 mg/mL presentó los valores más altos de porcentaje de inhibición, seguido de la concentración 140 mg/mL. Tal como lo presenta la gráfica, a 160 mg/mL se comportó igual que la rifampicina, con los valores más bajos de inhibición (figura 6).

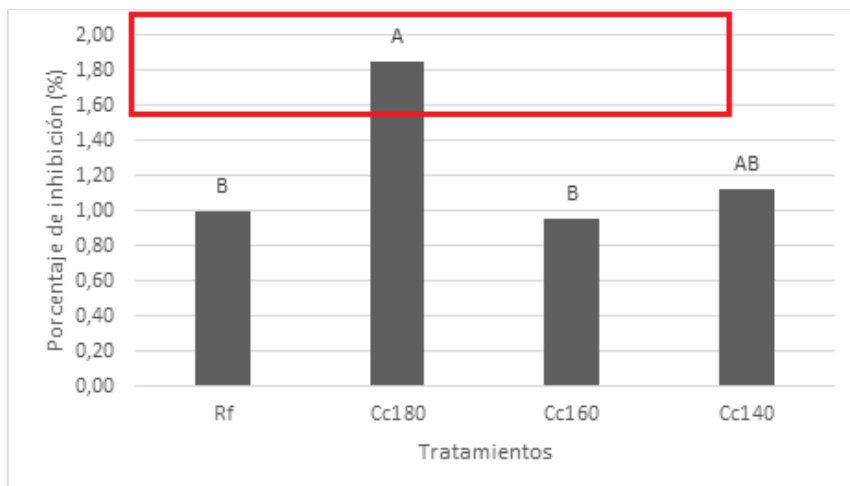


Figura 6 Comparación del aceite esencial de Cc: *Cymbopogon citratus* en sus diferentes concentraciones contra Rf: rifampicina. \*Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

*Lippia alba* a la única concentración que inhibió el microorganismo (160 mg/mL) presentó un desempeño inferior a la rifampicina, sin embargo, la literatura refiere el aceite esencial como antimicrobiano que a diferentes concentraciones inhibe la mayoría de los microorganismos a los que ha sido probado el mismo. En el caso de *Rosmarinus officinalis*, rifampicina presentó un valor más alto en comparación a sus aceites esenciales en sus diferentes dosis. Un aspecto llamativo tiene que ver con que los valores más bajos de inhibición se presentaron cuando se emplearon las dosis más altas de *Rosmarinus officinalis* (figura 7 y 8).

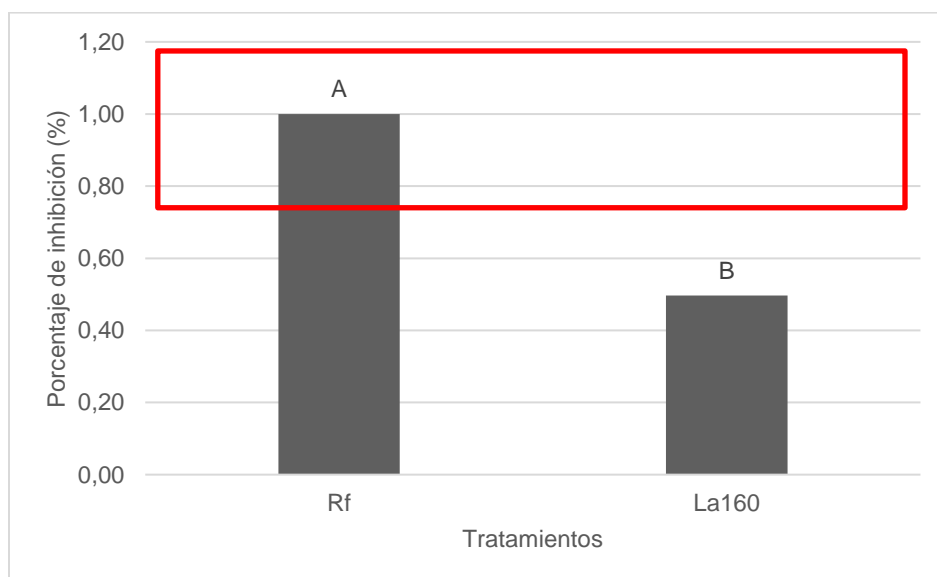


Figura 7. Porcentaje de inhibición entre La: *Lippia alba* y Rf: rifampicina. \*Letras diferentes presentan diferencias estadísticamente significativas.

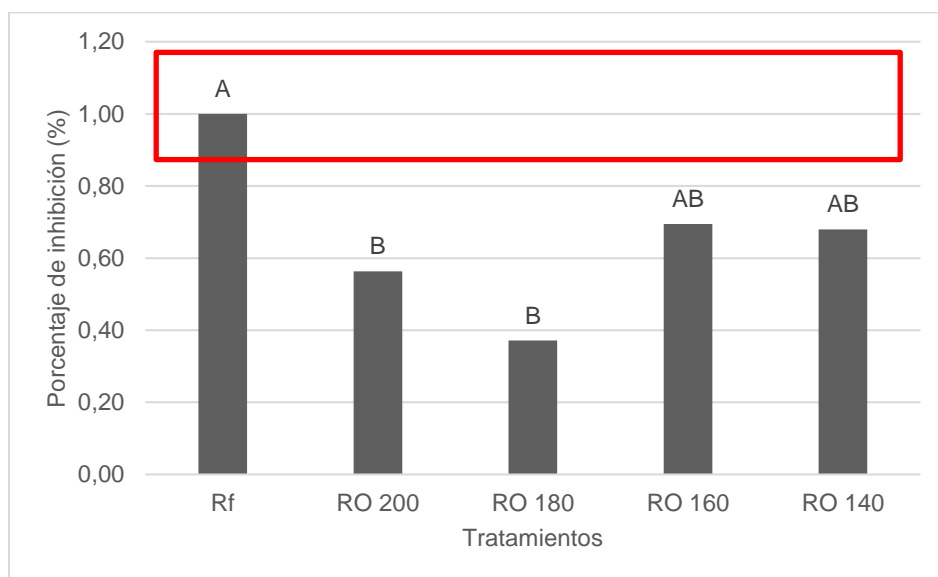


Figura 8. Diferencias estadísticas entre RO: *Rosmarinus officinalis* y Rf: rifampicina. \*Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

El aceite esencial de *Tagetes lucida* a concentración de 180 mg/mL presentó los valores más altos de porcentaje de inhibición, en su caso, mientras que las restantes concentraciones se comportaron igual que el testigo rifampicina (figura 9).

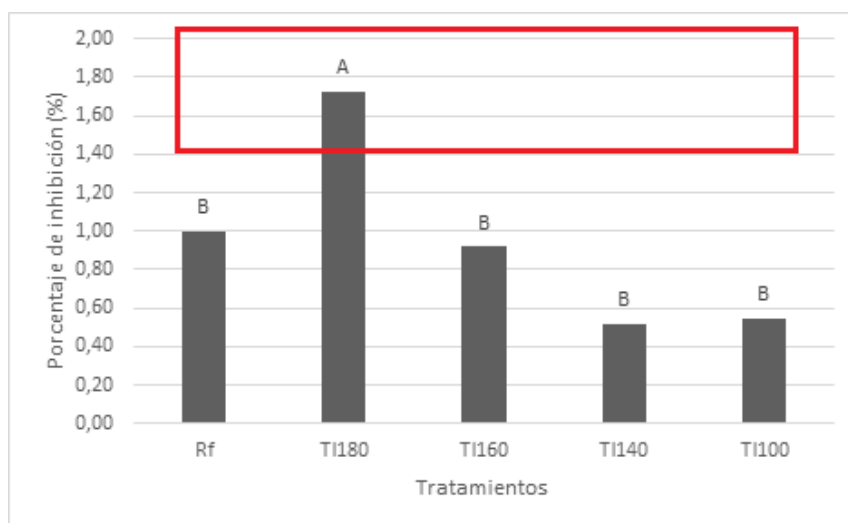


Figura 9. Comparación del aceite esencial de TI: *Tagetes lucida* en sus diferentes concentraciones contra rifampicina. \*Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

Los anteriores datos de porcentaje de inhibición permiten establecer que el aceite de *Cymbopogon citratus* (184,94%) produce la mayor inhibición del patógeno seguido por *Tagetes lucida* (172,25%) ambos aceites a una concentración de 180 mg/mL. También se resalta que, *Thymus vulgaris* a una concentración de 80 mg/mL ejerce un efecto inhibitor similar al control químico (105,99% de inhibición). Cabe subrayar que de los tres aceites mencionados el que mayor rendimiento (%p/p) produjo es *T. vulgaris* (0,31%) lo que lo hace un aceite ideal por rendimiento e inhibición del patógeno.

Los anteriores datos de inhibición del patógeno por diferentes aceites son corroborados por diferentes autores. En 2012 se trabajó con *Ralstonia solanacearum* y seis aceites esenciales canela (*Cinnammomum verum*), citral, clavo (*Syzygium aromaticum*), eugenol, geraniol y limoneno. La mayoría de los aceites inhibieron la bacteria, exceptuando el limoneno (0 mm de halo de inhibición). Este compuesto, limoneno, está presente en el aceite esencial de *Lippia alba* (160 mg / mL) que comparado con los demás aceites esenciales presentó el menor halo de inhibición, corroborando que posee una disminuida actividad antimicrobiana.

Por otro lado, con el resto de los aceites se obtuvieron diversos diámetros de inhibición así: canela a un volumen de 2,0  $\mu$ l (41,74 mm), y a 5,0  $\mu$ l y 10  $\mu$ l de aceite esencial incrementaron dicho halo de inhibición (53 y 56 mm respectivamente). Entretanto, citral, clavo, eugenol y geraniol produjeron halos de 14,50 mm, 34 mm, 28 y 22,25 mm, respectivamente, con 10  $\mu$ l de cada aceite esencial. Los anteriores datos permiten evidenciar primero que *Ralstonia solanacearum* sí puede ser inhibida por diversos aceites esenciales y que las concentraciones a las que trabaja cada investigación son diversas (Lee et al., 2012).

En otra investigación con *R. solanacearum* y los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* y *Origanum* sp., la metodología de inhibición se hizo por medio de la técnica de difusión en disco. En esta se prepararon discos de papel filtro y se impregnaron con aceites esenciales diluidos. Para ello se usó alcohol etílico al 70% en diluciones 1:1, 1:5 y 1:10. Luego, se colocaron de 7,5 a 10  $\mu$ l del aceite esencial sobre cada disco. Como control negativo se utilizó alcohol al 70% y como control positivo estreptomycin y ampicilina (10  $\mu$ g/mL). En esta caso se observó que la mayor inhibición se produjo a la relación 1:1 con un 70,4% de inhibición para *Origanum* sp., datos muy similares a los nuestros; y 70,2% para *Thymus vulgaris*, que en promedio sería igual que en la presente investigación. El alcohol no produjo halo de inhibición al igual que la acetona que fue



nuestro diluyente y los antibióticos demostraron 67,8% (estreptomina) y 66,2% (ampicilina) de porcentaje de inhibición (Rueda-Puente et al., 2018).

En 2020, se aislaron diversas *R. solanacearum* obtenidas de papa (Egipto, 5), Francia (1), Escocia (1) y los países bajos (1) y se determinó el efecto contra tres aceites esenciales (*Lantana camara*, *Corymbia citriodora* y *Cupressus sempervirens*). Aunque estos no se encuentran en el presente estudio, sí comparten compuestos mayoritarios con los nuestros y, además, son una alternativa en el control de microorganismos patógenos. Los resultados obtenidos mostraron que el aceite esencial de *L. camara* produjo diferentes halos de inhibición a diferentes concentraciones. Para la *R. solanacearum* aislada en Escocia, a 500  $\mu\text{g/mL}$  (11,33 mm), 1000  $\mu\text{g/mL}$  (15,33 mm) y 2500  $\mu\text{g/mL}$  (16,66 mm), y la concentración de 5000  $\mu\text{g/mL}$ , generó un halo de inhibición de 17,33 mm, para la *Ralstonia solanacearum* aislada en Egipto. Los anteriores datos muestran nuevamente cómo las concentraciones a las que trabaja cada autor son variables y que a medida que se aumentó la concentración del aceite se produjo mayor halo de inhibición. Cabe señalar que ese hecho no ocurrió en todos los casos en nuestra investigación. La explicación para dicho fenómeno puede ser sustentada a razón de que al ser los aceites esenciales una mezcla de compuestos, en cada concentración a la que se trabaja, es posible que se potencie más un compuesto que otro (Mohammed et al., 2020).

El efecto de los aceites esenciales ha sido ampliamente estudiado con un gran número de bacterias, como alternativa de la inhibición en el crecimiento y a futuro evitar el uso indiscriminado de sustancias de síntesis química sintética. De esta forma se determinó el efecto del aceite esencial de *Tagetes patula* (piperitona 42,95%), utilizado en pruebas de difusión en agar, demostrando que sí ejercía efecto inhibitorio contra *R. solanacearum*. En ese sentido, se produjeron halos de 15,7 mm de diámetro a una concentración de 500  $\mu\text{g/mL}$  (diluyente DMSO) y determinando un porcentaje de inhibición del 91,7% (con respecto al control). Aunque el aceite esencial del trabajo de Villada no corresponde a la misma especie de la presente investigación, se puede determinar que los aceites esenciales de diversas plantas tienen efecto inhibitorio del microorganismo, sin embargo, cabe resaltar que para Villada las concentraciones a las que se inhibió el microorganismo estuvieron en el orden de los microgramos mientras que en esta se evaluaron miligramos/mililitro. Aunado a lo anterior, el compuesto mayoritario al que se le puede atribuir la capacidad de inhibición era diferente (Villada-Ramos et al., 2021).

Otras investigaciones con *R. solanacearum* aislada de tubérculos de papa y probadas contra 7 aceites esenciales (*Pimpinella anisum*, *Syzygium aromaticum*, *Triticum vulgare*, *Eruca sativa*, *Cymbopogon flexuosus*, *Foeniculum vulgare* y *Thymus vulgaris*), los cuales no fueron caracterizados químicamente y fueron diluidos con Tween 20 a tres concentraciones (0,04%, 0,07% y 0,14%), demostraron ejercer efecto antimicrobiano. Esto, con excepción del aceite esencial de *Triticum vulgare* (0 mm de inhibición). Particularmente para el caso de *F. vulgare*, a las 3 concentraciones trabajadas presentó halos de 9,6 mm, 10,7 mm y 14 mm. Estos halos son inferiores a los del presente estudio. A su vez, para *T. vulgaris* los halos de inhibición producidos fueron 38,7 mm, 45,3 mm y 47 mm para cada concentración, datos que triplican el diámetro de nuestro aceite (tabla 6) (Abd-Elrahim et al., 2021).

En 2022, un grupo de investigación probó el compuesto citral y dos aceites esenciales (*Elionurus latiflorus* y *Cymbopogon flexuosus*) contra *Ralstonia solanacearum* y otros microorganismos de interés agronómico. El aceite de *E. latiflorus* contenía como compuestos mayoritarios geranial 33,66% y neral 28,72%, y *C. flexuosus*. Junto a estos, contenía cariofileno al 28,31% y geranil acetato al 26,66%. En este caso, el control químico utilizado fue gentamicina (20 µg / mL), el cual produjo un halo de inhibición de 11,30 mm, mientras que con rifampicina en la presente investigación se obtuvo un halo de 17,82 mm. Con respecto a los aceites esenciales, se trabajaron en concentraciones ascendentes de 5 µl hasta 40 µl. Para ambos aceites esenciales el diámetro de inhibición superó los 60 mm. Con el compuesto citral, solamente a la concentración de 15 µl, se produjo un halo de inhibición de 85,72 mm (Oliveira et al., 2022). Cabe resaltar que geranial es el compuesto mayoritario encontrado en dos de los aceites esenciales nuestros *Cymbopogon citratus* (41,88%) y *Cymbopogon* sp. (45,27%) (tabla 5) inhibieron a *Rs* en concentraciones de 180 mg / mL con un halo de 32,15 mm y 160 mg / mL con 20,22 mm respectivamente (tabla 6), lo cual indicaría que geranial podría ser considerado un compuesto con un alto potencial como bioplaguicida. Para finalizar con respecto al método difusión en agar, este ofrece múltiples ventajas sobre otros métodos ya que es simple, económico, permite probar una gran cantidad de concentraciones y de microorganismos, la interpretación de los resultados es sencilla y es un método ideal para probar extractos vegetales y aceites esenciales (Balouiri et al., 2016).

## 5.5. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida para *R. solanacearum*.

Para evaluar la capacidad del efecto bacteriostático y bactericida de los diez aceites esenciales contra el microorganismo *R. solanacearum* se realizó el método de microdilución en pozo y siembra en agar para corroborar el crecimiento en soporte sólido. Se hicieron diluciones seriadas en base logarítmica 2 que iban desde una concentración inicial correspondiente al aceite esencial sin dilución, hasta concentraciones de 0,001 mg/mL. Se recuerda en este punto que el agente diluyente fue la acetona y que los análisis se hicieron por triplicado (tabla 7).

La tabla 7 muestra, para cada uno de los aceites esenciales, las concentraciones en las cuales el recuento de unidades formadoras de colonias era igual a cero y la siguiente dilución serial en la que los aceites generaban un efecto bacteriostático porque se observaban unidades formadoras de colonias (UFC) sobre el medio de cultivo. Este dato también se corroboró con la absorbancia a las 0 horas y a las 24 horas. Con estos resultados se puede determinar cuál es la CMB y la CMI de cada uno de los aceites.

Las concentraciones mínimas bactericidas (CMB) de los aceites esenciales para *R. solanacearum* oscilaron entre el valor más alto para el aceite esencial de *Foeniculum vulgare* (60 mg/mL) y la menor concentración que fue para *Cymbopogon* sp., (0,625 mg/mL). Además de la concentración mínima inhibitoria más alta que fue de 30 mg/mL para *Foeniculum vulgare* y la menor de 0,315 mg/mL para *Cymbopogon* sp. Lo anterior indica que efectivamente los aceites esenciales de diversas plantas tienen efectos antimicrobianos contra *R. solanacearum* (tabla 8).

Tabla 7. Determinación de la densidad óptica y UFC para cada uno de los aceites esenciales

| Aceite esencial                | mg/mL                      | Abs. 0 h     | Abs. 24 h    | UFC/mL      | Aceite esencial               | mg/mL        | Abs. 0 h     | Abs. 24 h    | UFC/mL      |
|--------------------------------|----------------------------|--------------|--------------|-------------|-------------------------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| <i>Cymbopogon citratus</i>     | 2,5                        | 0,078        | 0,066        | 0           | <i>Cymbopogon sp.</i>         | 1,25         | 0,082        | 0,077        | 0           |
|                                | <b>1,25</b>                | <b>0,068</b> | <b>0,061</b> | <b>0</b>    |                               | <b>0,625</b> | <b>0,074</b> | <b>0,064</b> | <b>0</b>    |
|                                | <b>0,62</b>                | <b>0,062</b> | <b>0,06</b>  | <b>8,7</b>  |                               | <b>0,315</b> | <b>0,071</b> | <b>0,065</b> | <b>10,6</b> |
|                                | 0,315                      | 0,06         | 0,116        | 19,11       |                               | 0,157        | 0,056        | 0,8          | Inc         |
|                                | 0,157                      | 0,058        | 0,8          | >100        |                               | 0,078        | 0,074        | 0,172        | Inc         |
| <i>Foeniculum vulgare</i>      | 120                        | 0,056        | 0,045        | 0           | <i>Lippia alba</i>            | 5            | 0,09         | 0,066        | 0           |
|                                | <b>60</b>                  | <b>0,054</b> | <b>0,049</b> | <b>0</b>    |                               | <b>2,5</b>   | <b>0,111</b> | <b>0,061</b> | <b>0</b>    |
|                                | <b>30</b>                  | <b>0,052</b> | <b>0,046</b> | <b>7,4</b>  |                               | <b>1,25</b>  | <b>0,075</b> | <b>0,063</b> | <b>1,1</b>  |
|                                | 15                         | 0,056        | 0,046        | 16,11       |                               | 0,625        | 0,064        | 0,06         | 10,6        |
|                                | 7,5                        | 0,056        | 0,065        | Inc         |                               | 0,312        | 0,065        | 0,07         | 22,3        |
| <i>Mentha sp.</i>              | 2,18                       | 0,1          | 0,06         | 0           | <i>Origanum majorana</i>      | 2,18         | 0,108        | 0,063        | 0           |
|                                | <b>1,09</b>                | <b>0,07</b>  | <b>0,06</b>  | <b>0</b>    |                               | <b>1,09</b>  | <b>0,101</b> | <b>0,061</b> | <b>0</b>    |
|                                | <b>0,545</b>               | <b>0,062</b> | <b>0,061</b> | <b>2,6</b>  |                               | <b>0,545</b> | <b>0,087</b> | <b>0,057</b> | <b>1,6</b>  |
|                                | 0,272                      | 0,062        | 0,072        | 17,2        |                               | 0,272        | 0,055        | 0,057        | 12,11       |
| <i>Tagetes lucida</i>          | 70                         | 0,052        | 0,051        | 0           | <i>Rosmarinus officinalis</i> | 8,75         | 0,078        | 0,531        | 0           |
|                                | <b>35</b>                  | <b>0,053</b> | <b>0,047</b> | <b>0</b>    |                               | 4,37         | 0,175        | 0,064        | 0           |
|                                | <b>17,5</b>                | <b>0,054</b> | <b>0,052</b> | <b>7,32</b> |                               | <b>2,18</b>  | <b>0,178</b> | <b>0,063</b> | <b>0</b>    |
|                                | 8,75                       | 0,052        | 0,056        | 11,5        |                               | <b>1,09</b>  | <b>0,127</b> | <b>0,059</b> | <b>2,33</b> |
|                                | 4,37                       | 0,052        | 0,052        | 17,16       |                               | 0,545        | 0,105        | 0,072        | 5,75        |
| <i>Origanum sp.</i>            | 4,37                       | 0,153        | 0,067        | 0           | <i>Thymus vulgaris</i>        | 2,5          | 0,12         | 0,071        | 0           |
|                                | <b>2,18</b>                | <b>0,118</b> | <b>0,058</b> | <b>0</b>    |                               | <b>1,25</b>  | <b>0,074</b> | <b>0,062</b> | <b>0</b>    |
|                                | <b>0,109</b>               | <b>0,097</b> | <b>0,06</b>  | <b>0,5</b>  |                               | <b>0,625</b> | <b>0,068</b> | <b>0,063</b> | <b>4</b>    |
|                                | 0,545                      | 0,107        | 0,063        | 12,11       |                               | 0,315        | 0,071        | 0,094        | 12,3        |
| Control positivo <i>R.s</i>    | 5,0*10 <sup>6</sup> ufc/mL | 0,059        | 0,176        | Inc         |                               | 0,157        | 0,065        | 0,063        | 9           |
| Control negativo (rifampicina) | <b>5 µg/mL</b>             | <b>0,084</b> | <b>0,08</b>  | <b>0,8</b>  | Acetona                       | <b>100%</b>  | <b>0,066</b> | <b>0,17</b>  | <b>Inc</b>  |
|                                |                            |              |              |             |                               | 50%          | 0,055        | 0,111        | Inc         |
|                                |                            |              |              |             |                               | 25%          | 0,06         | 0,21         | Inc         |

Concentración en mg/mL, Abs: absorbancia, Rs: *Ralstonia solanacearum*. Inc: UFC incontables.

Tabla 8. CMI y CMB para *Ralstonia solanacearum*

| Aceite Esencial               | CMI (mg/mL)        | CMB (mg/mL)        | UFC          |
|-------------------------------|--------------------|--------------------|--------------|
| <i>Cymbopogon citratus</i>    | 0,625 mg/mL        | 1,25 mg/mL         | 8,7          |
| <b><i>Cymbopogon sp.</i></b>  | <b>0,315 mg/mL</b> | <b>0,625 mg/mL</b> | <b>10,73</b> |
| <i>Foeniculum vulgare</i>     | 30 mg/mL           | 60 mg/mL           | 7,33         |
| <i>Lippia alba</i>            | 1,25 mg/mL         | 2,5 mg/mL          | 1,11         |
| <i>Mentha sp.</i>             | 0,545 mg/mL        | 1,09 mg/mL         | 2,5          |
| <i>Origanum majorana</i>      | 0,545 mg/mL        | 1,09 mg/mL         | 1,58         |
| <i>Origanum sp.</i>           | 1,09 mg/mL         | 2,18 mg/mL         | 0,58         |
| <i>Rosmarinus officinalis</i> | 1,09 mg/mL         | 2,18 mg/mL         | 2,33         |
| <i>Tagetes lucida</i>         | 17,5 mg/mL         | 35 mg/mL           | 7,32         |
| <i>Thymus vulgaris</i>        | 0,625 mg/mL        | 1,25 mg/mL         | 12,3         |
| Acetona                       | N.I.C              | N.I.C              | Incontables  |
| <i>Ralstonia solanacearum</i> | N.I.C              | N.I.C              | Incontables  |

\*N.I.C: No presentó inhibición de crecimiento a ninguna concentración. Negrilla, menor concentración (CMI, CMB) del aceite de *Cymbopogon sp.*

Una vez realizado el análisis estadístico para la variable absorbancia, los valores más altos después de 24 h de incubación, se presentaron en los tratamientos de *Lippia alba* (5 mg/mL) y *Rosmarinus officinalis* (2,18 mg/mL y 4,37 mg/mL) con valores entre 0,1117 y 0,1168; seguidos por los tratamientos de *Rosmarinus officinalis* (1,09 mg/mL), *Mentha sp.*, *Origanum sp.*, *Origanum majorana* (4,37 mg/mL), *Origanum sp.*, (2,18 mg/mL) y *Lippia alba* (2,5 mg/mL), los cuales presentaron valores de absorbancia entre 0,05 y 0,1 (Tabla 7). Los menores valores de absorbancia se presentaron con *Cymbopogon sp.*, (0,078 mg/mL) (-0,981), y *Cymbopogon citratus* (0,315 mg/mL) (-0,056).

Con respecto a las unidades formadoras de colonia (UFC) (tabla 7), los valores más bajos se presentaron en los tratamientos de *Lippia alba* (5,0 mg/mL y 2,5 mg/mL), *Rosmarinus officinalis* (2,18 mg/mL y 4,37 mg/mL), *Origanum sp.*, *Mentha sp.*, y *Origanum majorana* (4,37 mg/mL), *Origanum sp.*, (2,18 mg/mL), *Thymus vulgaris* (2,5 mg/mL), *Origanum majorana* (2,18 mg/mL, 1,09 mg/mL), *Mentha sp.*, (2,18 mg/mL), *Rosmarinus officinalis* (8,75 mg/mL), *Cymbopogon sp.*, 2,5 mg/mL, *Thymus vulgaris* (1,25 mg/mL), *Cymbopogon citratus* (2,5 mg/mL), *Foeniculum vulgare* 120 mg/mL, *Cymbopogon sp.*, 0,625 mg/mL, *Mentha sp.*, 1,09 mg/mL, *Cymbopogon citratus* 1,25 mg/mL, *Tagetes lucida* 35 mg/mL, *Cymbopogon sp.*, 1,25 mg/mL, *Foeniculum vulgare* 60 mg/mL, *Tagetes lucida* (70 mg/mL), en los cuales no se presentó crecimiento bacteriano. Los valores más altos de UFC se manifestaron en los tratamientos *Cymbopogon citratus* y *Cymbopogon sp.*, (0,157 mg/mL) y *Cymbopogon sp.*, 0,078 mg/mL (>100 UFC), seguido del tratamiento *Foeniculum vulgare* 7,5 mg/mL (UFC incontables).

Para cada aceite, se realizó análisis de varianza y prueba de comparación múltiple para evaluar el efecto de la concentración sobre la absorbancia y el número de UFC, en todos los análisis fue incluido el testigo rifampicina. Para el tratamiento *Cymbopogon citratus*, se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los valores de absorbancia y UFC. Los valores más altos para la absorbancia se presentaron en los tratamientos 2,5, 1,25, 0,157 y 0,625 mg/mL, así como en el testigo rifampicina (entre -0,0145 y 0,0118). En contraparte, los valores más bajos se presentaron en la dosis de 0,315 mg/mL (-0,0560). La variable UFC presentó valores más altos en el tratamiento donde se empleó la concentración 0,157 mg/mL, con valores mayores a 100 UFC, mientras que los tratamientos de *Cymbopogon citratus* en dosis de 1,25 y 2,5 mg/mL no favorecieron el crecimiento del microorganismo. Ahora bien, con el tratamiento *Cymbopogon* sp., se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los valores de absorbancia y UFC. Todos los tratamientos a excepción de *Cymbopogon* sp., 0,078 mg/mL, tuvieron valores de absorbancia iguales al testigo rifampicina. Respecto al número de UFC, los tratamientos *Cymbopogon* sp., 0,078 y 0,0157 mg/mL presentaron los valores más altos para esta variable, seguidos del tratamiento *Cymbopogon* sp., 0,315 mg/mL (10,2832 UFC en promedio) y rifampicina con 0,6588 UFC. Los restantes tratamientos no presentaron crecimiento de la bacteria.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el aceite esencial de *Foeniculum vulgare* para la variable UFC, pero no para la absorbancia. *Foeniculum vulgare* 15 mg/mL presentó el valor más alto de UFC (15,74), seguido de 30 mg/mL con 7,1328 UFC. La concentración de aceite de *Foeniculum vulgare* 120 mg/mL no permitió el crecimiento del microorganismo. Con el aceite esencial de *Lippia alba* se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los valores de absorbancia y UFC. Los valores más altos para la absorbancia se presentaron en el tratamiento de *Lippia alba* en la dosis 5 mg/mL (0,1168); los demás tratamientos se comportaron igual que el testigo rifampicina con valores entre -0,0011 y 0,0503. Por su parte, la variable UFC presentó valores más altos en el tratamiento *Lippia alba* 0,625 mg/mL (9,9106), seguido del resultado de *Lippia alba* 1,25 mg/mL y el testigo rifampicina (0,8761 y 0,6558 respectivamente). Los demás tratamientos no favorecieron el desarrollo de la bacteria.

Para *Mentha* sp., se encontraron diferencias estadísticamente significativas en lo que tiene que ver con los valores de absorbancia y UFC. El valor más alto para la absorbancia se presentó en el tratamiento de *Mentha* sp., con las dosis 2,18 mg/mL (0,0317). Los demás tratamientos se

comportaron igual que el testigo rifampicina con valores entre 0,0007 y 0,0100 y, en su momento, la variable UFC presentó valores más altos en el tratamiento *Mentha sp.*, 0,545 mg/mL, seguido del testigo rifampicina (0,6558). Los demás tratamientos no favorecieron el desarrollo de la bacteria. También es importante subrayar que encontraron diferencias estadísticamente significativas para el aceite esencial de *Origanum majorana* en los valores de absorbancia y UFC. Los valores más altos para la absorbancia se presentaron en el tratamiento de *Origanum majorana* en la dosis de 1,09 y 0,545 mg/mL con valores de absorbancia entre 0,0323 y 0,421. Los demás tratamientos se comportaron igual que el testigo rifampicina y la variable UFC presentó valores más altos en el tratamiento *Origanum majorana* 0,545 mg/mL, seguido del testigo rifampicina (0,6558). Los demás tratamientos no favorecieron el desarrollo de la bacteria.

Para *Origanum sp.*, se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los valores de absorbancia y UFC. Los valores más altos para la absorbancia se presentaron en el tratamiento de *Origanum sp.*, 4,37 mg/mL (0,0788), seguido de las dosis 2,18, 0,545 y 1,09 mg/mL (valores entre 0,0364 y 0,0529). Los demás tratamientos se comportaron igual que el testigo rifampicina con valores entre -0,0008 y 0,0167; la variable UFC presentó valores más altos en el tratamiento *Origanum sp.*, 0,545 mg/mL, seguido del testigo rifampicina (0,6558) y *Origanum sp.*, 1,09 mg/mL (0,4628 UFC en promedio). En cuanto a los demás tratamientos no favorecieron el desarrollo de la bacteria. Para resaltar, se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* en los valores de absorbancia y UFC; los valores más altos para la absorbancia se presentaron en el tratamiento de *Rosmarinus officinalis* 2,18 mg/mL (0,1152) y 4,37 mg/mL (0,1117), seguido de 1,09 mg/mL (0,0678); los demás tratamientos se comportaron igual que el testigo rifampicina con valores entre -0,0011 y 0,0503. La variable UFC presentó valores más altos en el tratamiento *Rosmarinus officinalis* 0,545 mg/mL (5,0469), seguido de 1,09 mg/mL y el testigo rifampicina (1,4363y 0,6558 respectivamente); los demás tratamientos no favorecieron el desarrollo de la bacteria.

En el caso del *Tagetes lucida*, se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los valores de absorbancia y UFC. Para la absorbancia se presentaron valores altos en el tratamiento *Tagetes lucida* 4,37 mg/mL (0,0236), mientras que el valor más bajo se presentó en el tratamiento *Tagetes lucida* 0,136 mg/mL (-0,0941), seguido de *Tagetes lucida* 0,27 mg/mL (-0,0492) (datos no mostrados). La variable UFC para *Tagetes lucida* en dosis de 35, 70, 140 y 280 mg/mL no favoreció el crecimiento del microorganismo. Por último, para *Thymus vulgaris* se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los valores de absorbancia y UFC. Los valores

más altos para la absorbancia se presentaron en el tratamiento de *Thymus vulgaris* 2,5 mg/mL (0,0487) seguido de *Thymus vulgaris* 1,25 mg/mL (0,0125); luego, *Thymus vulgaris* 0,625, 0,157, se comportaron igual que el testigo rifampicina, con valores de absorbancia entre -0,0062 y 0,0053. La variable UFC presentó valores más altos en el tratamiento *Thymus vulgaris* 0,315 mg/mL (11,7784), *Thymus vulgaris* 0,157 mg/mL (8,7279 UFC), *Thymus vulgaris* 0,625 mg/mL (3,5913) y el testigo rifampicina (0,6558); los demás tratamientos no favorecieron el desarrollo de la bacteria.

Todos los tratamientos fueron agrupados en tres conglomerados los cuales explican el 78,4% de la variabilidad de los datos de la siguiente manera: El Conglomerado 1 estuvo formado por 32 tratamientos con valores intermedios para las variables UFC (2,38 UFC en promedio) y Absorbancia (0,003277 en promedio). En el conglomerado número 2, conformado por 10 tratamientos, se ubican aquellos aceites cuyas dosis disminuyeron el número promedio de UFC (0,1026 en promedio) y su valor de absorbancia fue mayor en comparación a los otros dos grupos (0,06730). Finalmente, en el grupo 3 quedaron aquellos aceites en cuyas concentraciones favorecieron el desarrollo del microorganismo (90,8383 UFC en promedio) y se presentó el menor para la absorbancia (promedio de -0,0043) (Tabla 9 y Figura 10).

Tabla 9. Análisis de conglomerados para la variable UFC de todos los tratamientos

| Grupo 1                        |                             |                                | Grupo 2                       | Grupo 3                        |
|--------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| <i>Cymbopogon</i> sp.<br>0,315 | <i>F. vulgare</i><br>15     | <i>O. majorana</i><br>0,272    | <i>O. majorana</i> 1,09       | <i>Cymbopogon</i> sp.<br>0,078 |
| <i>Cymbopogon</i> sp.<br>0,625 | <i>F. vulgare</i><br>30     | Rifampicina                    | <i>O. majorana</i> 2,18       | <i>Cymbopogon</i> sp<br>0,157  |
| <i>Cymbopogon</i> sp.<br>1,25  | <i>F. vulgare</i><br>60     | <i>R. officinalis</i><br>0,545 | <i>Origanum</i> sp.<br>2,18   | <i>C. citratus</i><br>0,157    |
| <i>T. lucida</i><br>35         | <i>C. citratus</i><br>0,625 | <i>R. officinalis</i><br>8,75  | <i>Origanum</i> sp. 4,37      | <i>C. citratus</i><br>0,315    |
| <i>T. lucida</i><br>4,37       | <i>C. citratus</i> 1,25     | <i>L. alba</i><br>0,625        | <i>L. alba</i><br>2,5         | <i>F. vulgare</i><br>7,5       |
| <i>T. lucida</i><br>70         | <i>C. citratus</i><br>2,5   | <i>L. alba</i><br>1,25         | <i>L. alba</i><br>5           |                                |
| <i>T. lucida</i><br>8,75       | <i>O. majorana</i><br>0,545 | <i>T. vulgaris</i><br>0,157    | <i>R. officinalis</i><br>1,09 |                                |
| <i>F. vulgare</i><br>120       | <i>Mentha</i> sp.<br>0,545  | <i>T. vulgaris</i> 0,315       | <i>R. officinalis</i><br>2,18 |                                |
| <i>Mentha</i> sp.<br>1,09      | <i>Mentha</i> sp.<br>2,18   | <i>T. vulgaris</i><br>0,625    | <i>R. officinalis</i><br>4,37 |                                |
| <i>Origanum</i> sp.<br>0,545   | <i>Origanum</i> sp. 1,09    | <i>T. vulgaris</i><br>1,25     | <i>T. vulgaris</i><br>2,5     |                                |
| <i>L. alba</i><br>0,312        | <i>Mentha</i> sp.<br>0,272  |                                |                               |                                |

Tres agrupaciones resultantes del análisis de conglomerados (UFC contra los tratamientos).



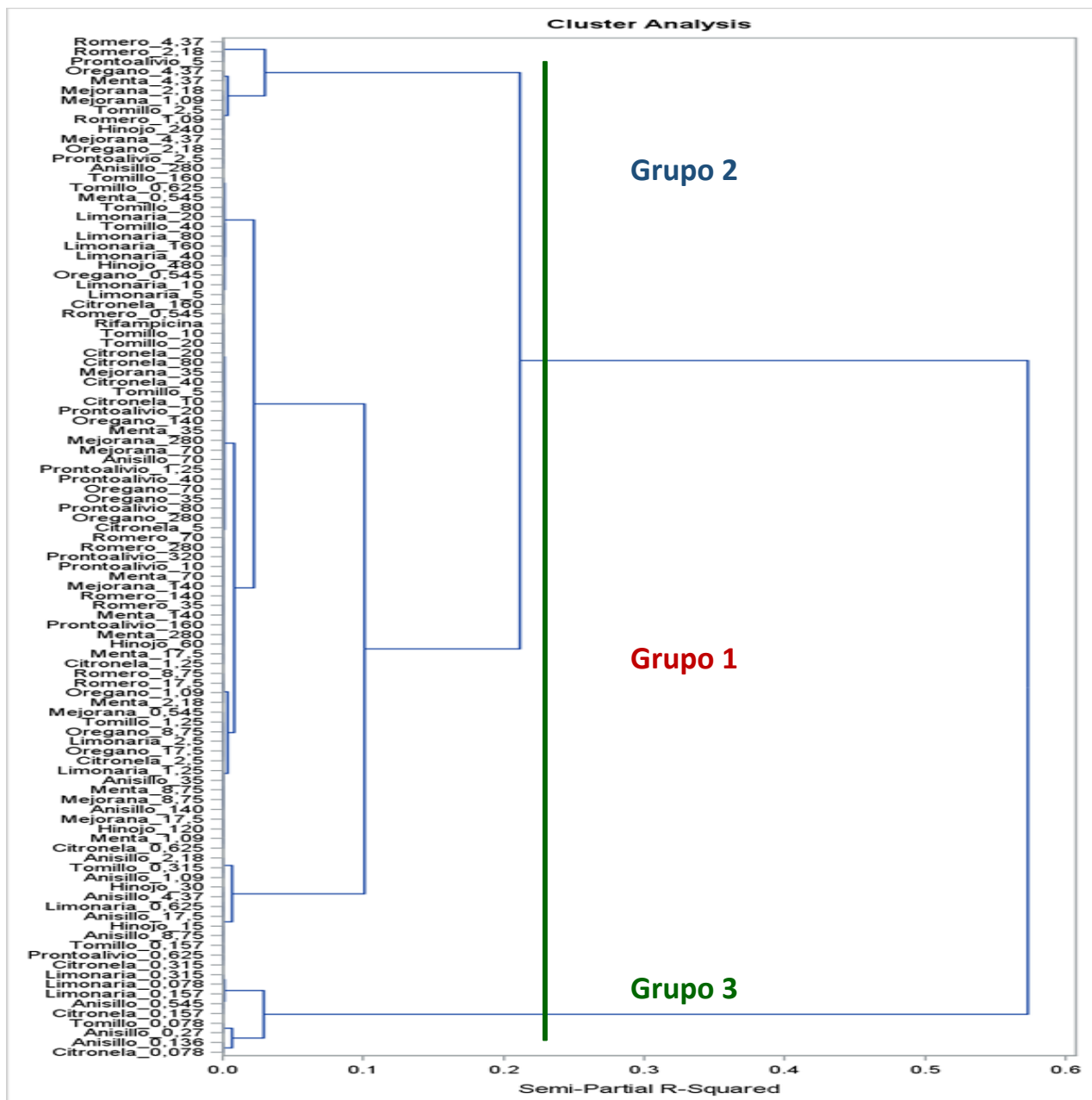


Figura 10. Análisis de conglomerados con respecto a las UFC contra los diferentes aceites esenciales.

Lo que se busca al determinar la CMI y CMB es que los metabolitos que se está probando, en este caso aceites esenciales inhiban el microorganismo a una concentración lo más baja posible. Para esta prueba se demostró que todos los aceites esenciales generaban tanto CMI como CMB, sin embargo, los rangos de concentración eran diferentes para cada uno y la relación con el rendimiento de cada aceite cobra importancia si lo que se quiere es escalar el proceso teniendo

en cuenta la relación rendimiento contra las CMI y CMB obtenidas. El aceite de *Cymbopogon* sp., cumple con dicha relación ya que las concentraciones a las que se determinó la CMI (0,315 mg/mL) y CMB (0,625 mg/mL) son las más bajas con respecto a los otros aceites probados. Además, el rendimiento (%p/p) es de 0,30%; le siguen los aceites esenciales de *Mentha* sp., y *Origanum majorana* (CMI 0,545 mg/mL y CMB 1,09 mg/mL) cuyas concentraciones de inhibición y bactericida son bajas pero los rendimientos (%p/p) también lo son (0,11% y 0,16%, respectivamente), lo cual no permite proponerlos como un aceite esencial para escalar el proceso. Continuamos con los aceites esenciales de *Cymbopogon citratus* y *Thymus vulgaris* (CMI 0,625 mg/mL y CMB 1,25 mg/mL) que para el caso de *C. citratus* obtuvo un rendimiento solamente del (0,13%) pero para *T. vulgaris* este fue de (0,31%). Los aceites esenciales de *Foeniculum vulgare* y *Tagetes lucida* tienen actividad antimicrobiana, sin embargo, las concentraciones CMI como CMB son las mayores de los 10 aceites trabajados y el rendimiento de producción (%p/p) para *Foeniculum vulgare* (0,11%) es bajo y para *Tagetes lucida* (0,28%), a pesar de ser superior, hace que no sea rentable el costo de producción contra el beneficio a las CMI y CMB que ejerce acción antimicrobiana.

En diversas investigaciones se han determinado la CMI y CMB de diferentes aceites esenciales en una amplia variedad de microorganismos. En esa vía, los datos obtenidos en la presente investigación permiten evidenciar que todos los aceites esenciales utilizados inhiben el crecimiento de *R. solanacearum* a diferentes concentraciones, de manera tanto bactericida como bacteriostática. Este hecho puede ser atribuido a la mezcla de compuestos presente en los aceites esenciales; los datos son corroborados por investigaciones como la realizada en 2013 en la que se utilizó el aceite esencial de *Thymus vulgaris*, obtenido de forma comercial. En ese momento, el compuesto principal era timol, con una abundancia de 64,45% (en la presente investigación era el compuesto secundario del aceite, 15,97%) y  $\gamma$ -terpineno fue el compuesto secundario 9,22% (33,47% de la presente investigación) (tabla 2). Dicha evidencia indica que no es el compuesto únicamente el que realiza la acción antibacteriana sino la sinergia lo que potencia dicha acción. Además, se determinó una CMB de 1,15 ppm del aceite esencial contra *R. solanacearum* raza III, patógena para tomate, lo cual proyecta el aceite esencial de *Thymus vulgaris* como una alternativa a plaguicidas convencionales. Este dato fue corroborado en el mismo trabajo por medio de la observación de la formación de una biopelícula por parte de *R.s.*, la cual no se formó completamente al aplicar el aceite esencial de *Thymus vulgaris* y disminuyó además la motilidad del microorganismo con respecto al control. Los anteriores resultados varían

con respecto al presente estudio donde se determinó CMI y CMB 0,625 mg/mL y 1,25 mg/mL para el aceite esencial de *Thymus vulgaris* (tabla 6) (Hosseinzadeh et al., 2013).

En 2015, se trabajó con el aceite esencial de *Teucrium polium*, la cuantificación del aceite arrojó como compuesto mayoritario  $\alpha$ -pineno (25,76%), el cual también fue el compuesto principal del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* utilizado en la presente investigación y cuya concentración fue 22,47%. Se determinó una CMI y CMB contra *Ralstonia solanacearum* de 12,5 y 25  $\mu$ l respectivamente. Diferentes investigaciones determinan que el  $\alpha$ -pineno tiene la capacidad de inhibir fosfolipasas y esterases, lo que podría explicar la capacidad antimicrobiana del mismo. Para finalizar ambas plantas pertenecen a la familia Lamiaceae y esta es una familia que tiene una gran cantidad de plantas aromáticas probadas en laboratorio por su efecto antimicrobiano (Purnavab et al., 2015).

En 2016 se determinó la CMI de resveratrol (2  $\mu$ l) (fitoalexina natural) y cumarina (8 $\mu$ l) (benzopirona encontrada en una amplia variedad de plantas) contra la bacteria *Ralstonia solanacearum* (biovar 3 filotipo I). La CMB determinada fue de 230  $\mu$ l /mL y 110  $\mu$ l /mL para cada compuesto, respectivamente. Con el fin de complementar el estudio se realizó observación por microscopía electrónica de las bacterias sometidas a los compuestos y se determinó que la morfología celular era incompleta, parcialmente rota, con límites poco claros y daño en la membrana celular. Los compuestos utilizados en la investigación corroboran las dos vías por medio de las cuales los aceites esenciales inhiben los microorganismos: una es el daño a la pared del patógeno alternando su morfología y permeabilidad y la segunda es el aumento de la resistencia por parte del huésped por la excreción de diversas proteínas, glicoproteínas y polisacáridos que pueden activar mecanismos inmunitarios de la planta (J. Chen et al., 2016).

Los estudios desarrollados con aceites esenciales no solamente se restringen al patógeno vascular *Ralstonia solanacearum*. Es así como en 2017 utilizaron los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* (timol 44,34% y p-cimeno 17,88) y *Origanum* sp., (carvacrol 67,14% y p-cimeno 10,32%) adquiridos de forma comercial contra cuatro bacterias fitopatógenas del género *Pectobacterium* y siete del género *Pseudomonas*, las cuales pertenecían a la colección de bacterias fitopatógenas de la república Checa. Los resultados determinaron CMI desde 128 mg/L hasta rangos mayores a 10244 mg/L, lo cual indicaría que los aceites esenciales tienen un amplio rango de bacterias fitopatógenas contra las que pueden actuar y concluye que las cepas de

laboratorio pueden ser más sensibles a los aceites esenciales que las silvestres (Božović et al., 2017).

En 2018, se realizó una investigación en Irán con el aceite esencial de *Origanum vulgare* cultivado en dos regiones diferentes (Facultad de Agricultura de la Universidad de Ferdowsi y en el campo de la aldea Darberaz ciudad de Sadugh). El aceite esencial se extrajo por hidrodestilación con un rendimiento de 1,56% para las dos regiones, resultado superior al de la presente investigación (0,45%) (tabla 5). El compuesto mayoritario en promedio fue timol (21,28%) y 4-terpineol (16,06%) (en la presente investigación fue mentona 26,37% y chavicol 23,76%). En lo relacionado con la determinación de CMI y CMB contra *Ralstonia solanacearum* se determinaron valores de 11 y 16 µg/mL respectivamente, contra 1,09 mg/mL y 2,18 mg/mL de la presente investigación. De lo anterior se afirma que la acción del aceite esencial es dada por la sinergia de los compuestos y su rendimiento se ve afectado por condiciones genéticas y ambientales (Mehdizadeh et al., 2018).

En 2019 se desarrolló una investigación con 8 aislamientos de *Ralstonia solanacearum* obtenidos de papa filotipo II de Egipto contra tres aceites esenciales y cinco monoterpenos entre los que se encuentra limoneno (componente mayoritario del aceite esencial de *Lippia alba* de la presente investigación). Estos fueron obtenidos por hidrodestilación de las hojas de *Cupressus sempervirens*, *Lantana camara* y *Corymbia citriodora*. Los rendimientos de cada aceite fueron superiores a los del presente estudio (2,5%, 1,5% y 5,5% respectivamente). Se determinó el componente mayoritario de cada uno de los aceites esenciales; *C. sempervirens* cedrol (22,17%), *L. camara trans*-cariofileno (16,24%) y *C. citriodora* α-citronelal (56,55%). A su vez, las CMI para los diferentes aislamientos presentaron rangos desde los 16 a 5000 µg/mL para *L. cámara*, y de 8 a 1000 µg/ml para *C. citriodora* y *C. sempervirens*. Con respecto al compuesto limoneno, generó efecto CMI a una concentración de 6000 µg/mL. De esta forma se considera que los aceites esenciales pueden inducir la resistencia en plantas de manera natural por la producción de fitoalexinas, síntesis de compuestos estructurales y de defensa bioquímica (Mohamed et al., 2019).

En 2020 se trabajó *Ralstonia solanacearum* obtenida de la colección nacional (Roma-Italia) de bacterias patógenas en plantas filotipo I, aislada de tomate y con diversos aceites esenciales tales como *Origanum* sp., y *Thymus vulgaris* (obtenidos de manera comercial). Con ellos se obtuvo una CMI de 290 y 360 ppm y una CMB de 800 y 450 ppm, respectivamente. Comparados

con los resultados obtenidos en el presente estudio, las concentraciones a las que el aceite esencial ejerce un efecto bactericida y bacteriostático son menores que las mencionadas en estos estudios (Orzali et al., 2020).

En 2022 se utilizó el aceite esencial de *Elionurus latiflorus* (geranial 36,66%) y *Cymbopogon flexuosus* (geranial 39,79%) determinado la CMI como 200  $\mu$ l para ambos aceites esenciales y CMB de 400  $\mu$ l contra *Rs*. Cabe resaltar que, en nuestro estudio, el compuesto geranial estuvo presente tanto en *Cymbopogon* sp. como en *Cymbopogon citratus* y varios autores han realizado investigaciones con dicho compuesto. Así se ha determinado la efectividad de su acción antimicrobiana contra una amplia gama de patógenos. Uno de los elementos que se deriva del análisis de estos datos es que existe una dificultad a nivel metodológico para comparar los resultados obtenidos en diferentes investigaciones, ya que cada autor diluye los aceites esenciales para su trabajo con diferentes diluyentes y en diferentes concentraciones. De esa manera no están estandarizadas variables tales como el porcentaje, el volumen/volumen, la relación uno a uno, y la dilución partiendo de la densidad, que fue la utilizada en la presente investigación. El punto mencionado dificulta la comparación en la efectividad de dosis aplicada para el microorganismo (Oliveira et al., 2022).

### **5.6. Curvas de letalidad de *Ralstonia solanacearum* contra los aceites esenciales:**

La curva de letalidad es la forma más efectiva a nivel metodológico para determinar el efecto bactericida de los aceites esenciales sobre un microorganismo. Se midió la absorbancia cada 6 horas hasta completar 72 horas. Como dosis para realizar las curvas se tomaron las CMI y CMB de cada uno de los aceites esenciales, previamente se realizó una curva patrón para relacionar la absorbancia con las UFC/mL de *Ralstonia solanacearum* (Anexo 8).

Para las curvas realizadas con los aceites esenciales de *Cymbopogon citratus*, *Foeniculum vulgare*, *Origanum* sp., y *Tagetes lucida*, se observó una inhibición del crecimiento tanto con la CMI, como con la CMB a las 72 horas. El control positivo se realizó con *Ralstonia solanacearum* y medio de cultivo, y el control negativo con *Ralstonia solanacearum*, medio de cultivo y rifampicina 5,0  $\mu$ g/mL. También se probó acetona ya que es el agente diluyente para los aceites esenciales (absorbancia de 0,3 nm). Se determinó que la acetona podría disminuir la velocidad de crecimiento, mas no inhibirla. En el caso de *Lippia alba* las dos concentraciones también inhiben el crecimiento de *Ralstonia solanacearum*, sin embargo, la CMI a la hora 30 hace que el microorganismo ingrese en fase de adaptación para crecer nuevamente. No obstante, a las 72

horas no supera los 0,25 de absorbancia, mientras que *Ralstonia solanacearum* sin ningún inhibidor crecía a las 72 horas hasta 0,6 de absorbancia, lo cual es equivalente a  $4 \times 10^7$  ufc/mL (figuras 11-15).

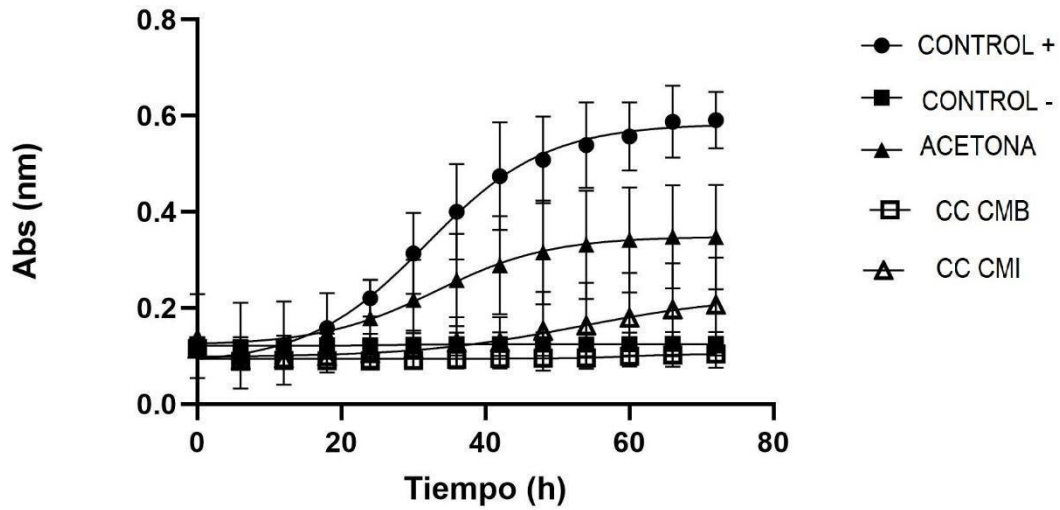


Figura 11. Curva de letalidad de CC: *Cymbopogon citratus*. CMB: concentración mínima inhibitoria, CMI: concentración mínima bactericida.

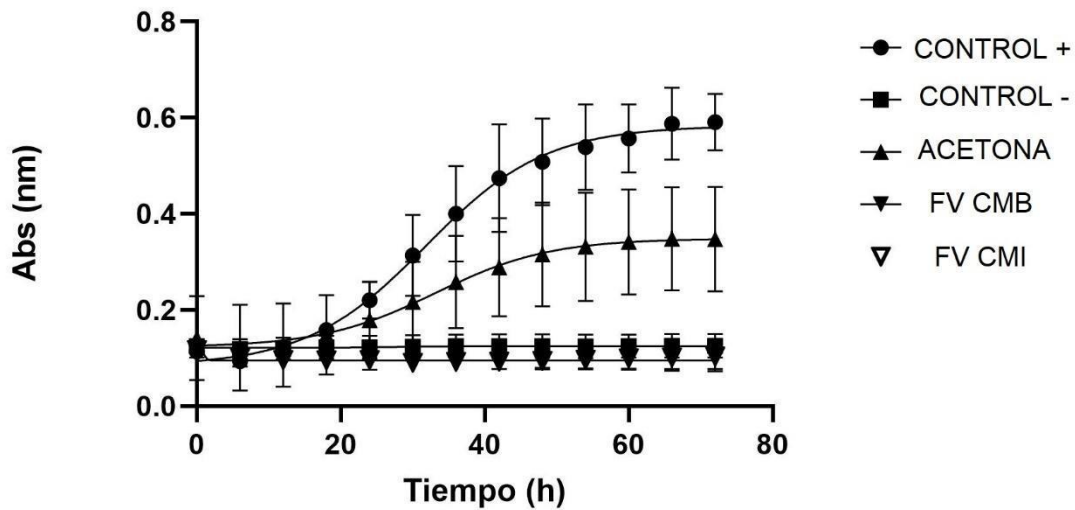


Figura 12. Curva de letalidad de FV: *Foeniculum vulgare*. CMB: concentración mínima inhibitoria, CMI: concentración mínima bactericida.

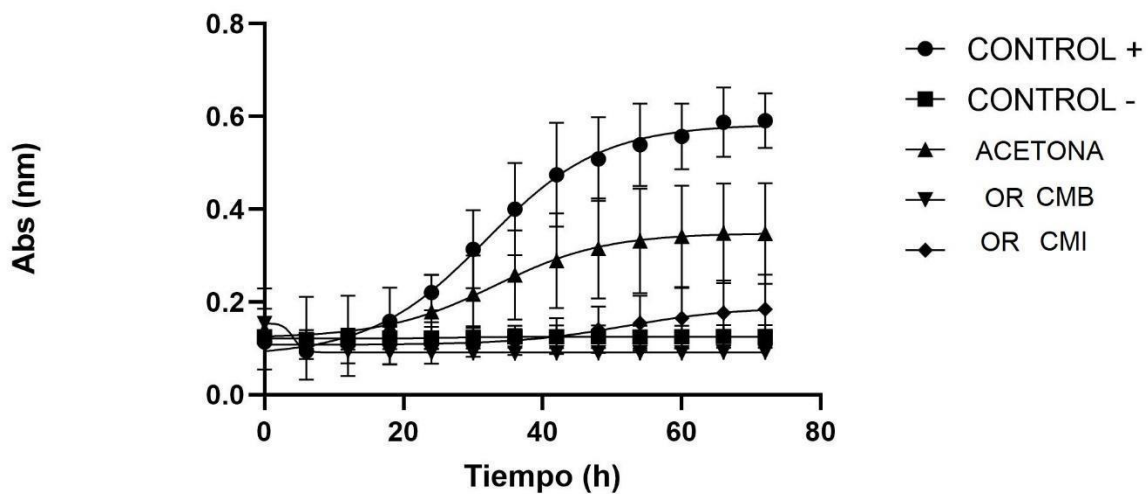


Figura 13. Curva de letalidad de OR: *Origanum* sp., CMB: concentración mínima inhibitoria, CMI: concentración mínima bactericida.

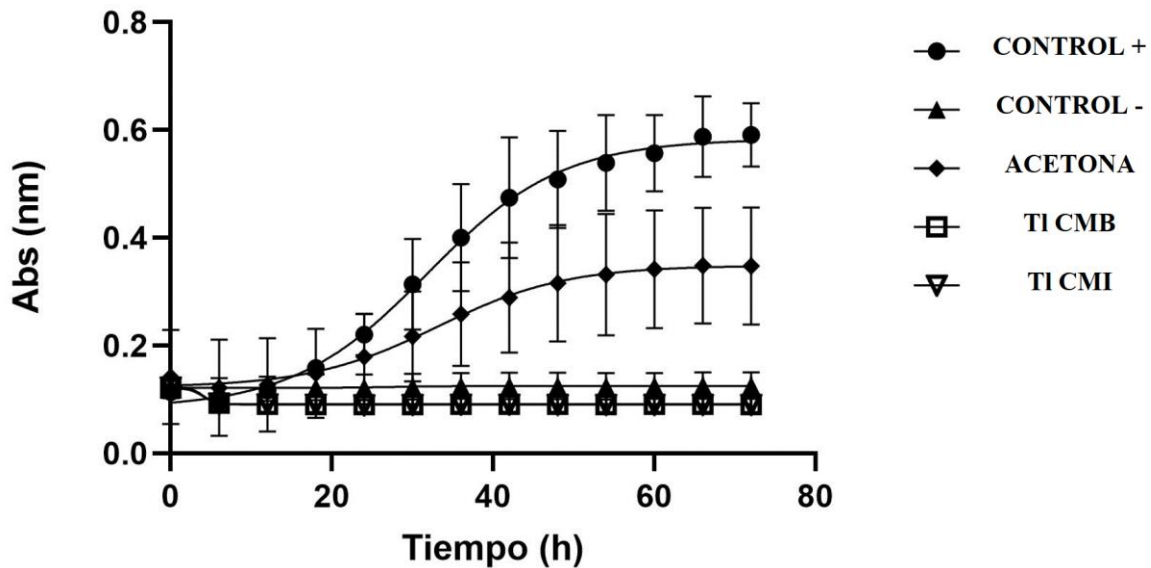


Figura 14. Curva de letalidad TI: *Tagetes lucida*. CMB: concentración mínima inhibitoria, CMI: concentración mínima bactericida.

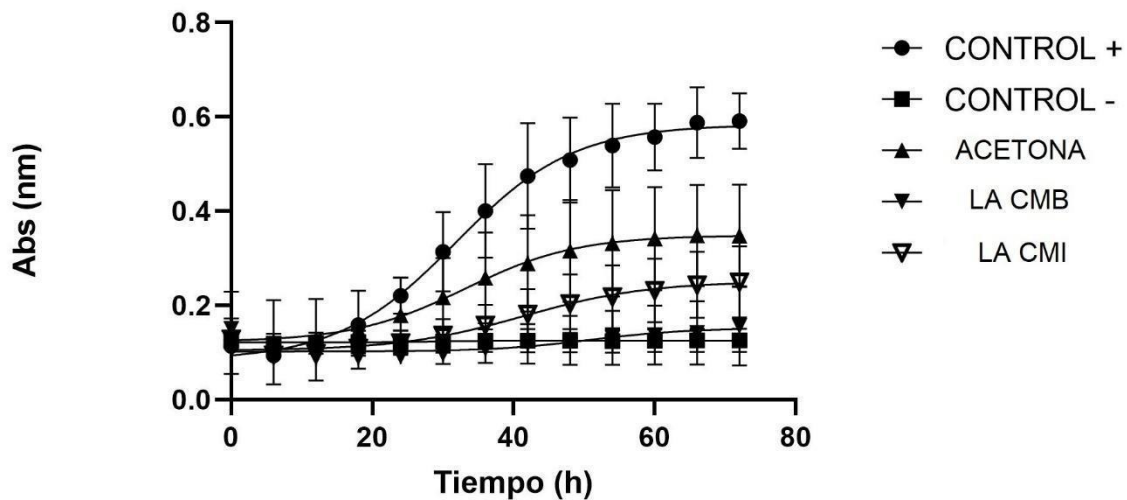


Figura 15. Curva de letalidad LA: *Lippia alba*. CMB: concentración mínima inhibitoria, CMI: concentración mínima bactericida.



Para los aceites esenciales de *Cymbopogon* sp., *Origanum majorana*, *Rosmarinus officinalis* y *Thymus vulgaris*, la CMB en todos los casos inhibió el crecimiento de *Ralstonia solanacearum*, pero la CMI no. De tal manera que a las 72 horas con *Cymbopogon* sp., y *Thymus vulgaris* se presentó una absorbancia de 0,4 ( $3,5 \times 10^5$  UFC/mL). Y en el caso de *Origanum majorana* y *Rosmarinus officinalis* una de 0,3 ( $4,5 \times 10^4$  UFC/mL), lo cual indica que a esas concentraciones el aceite esencial pierde efectividad en el tiempo entre la hora 20 y 30 (figuras 16-19).

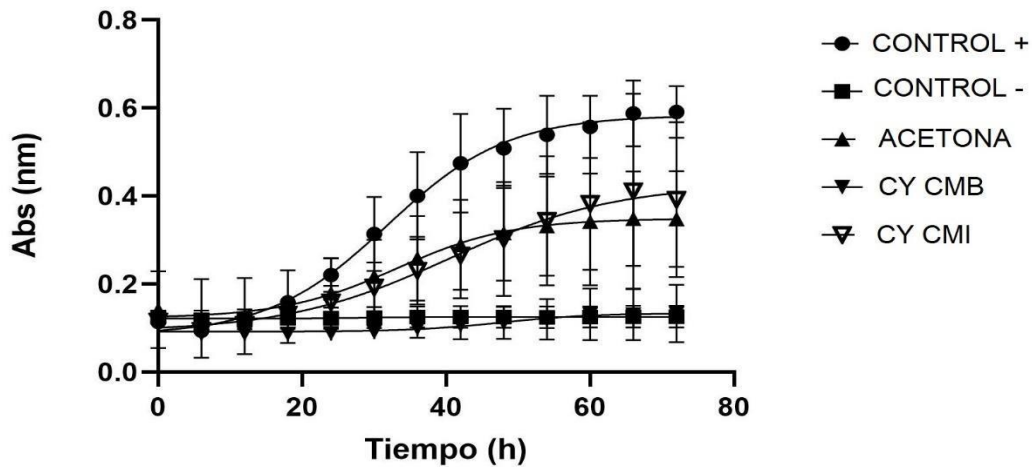


Figura 16. Curva de letalidad CY: *Cymbopogon* sp. CMB: concentración mínima inhibitoria, CMI: concentración mínima bactericida.

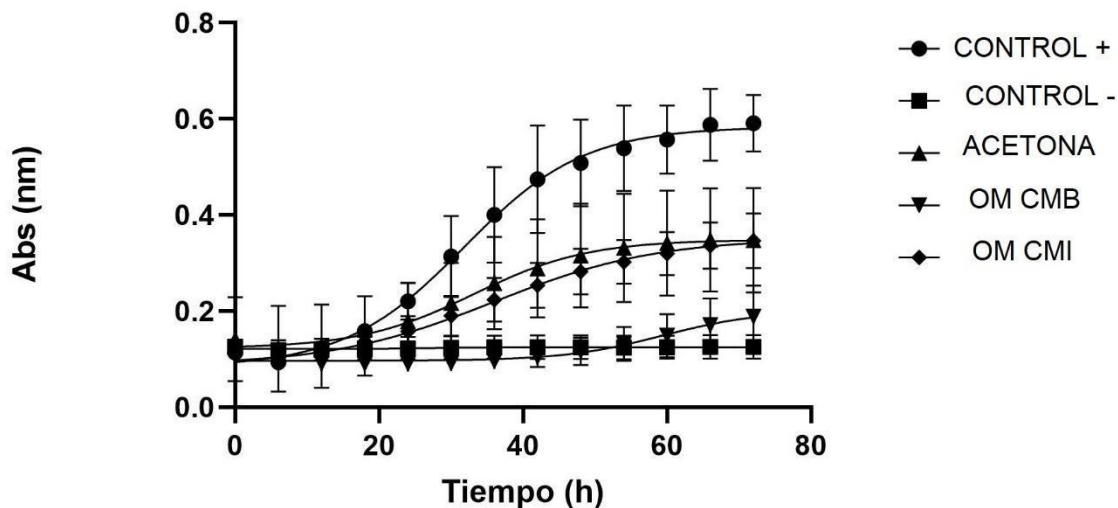


Figura 17. Curva de letalidad OM: *Origanum majorana*. CMB: concentración mínima inhibitoria, CMI: concentración mínima bactericida.

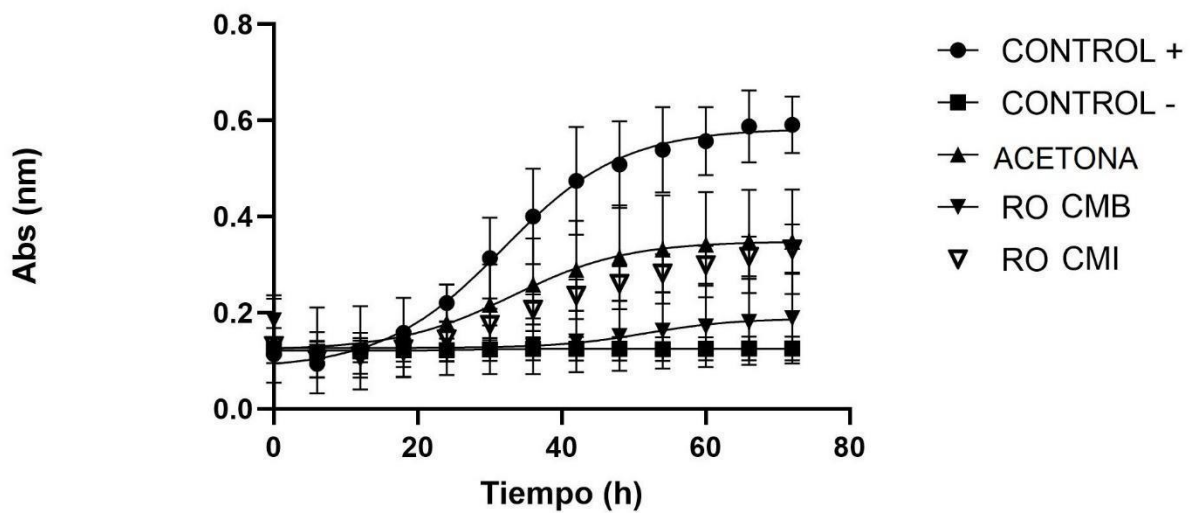


Figura 18. Curva de letalidad RO: *Rosmarinus officinalis*. CMB: concentración mínima inhibitoria, CMI: concentración mínima bactericida.

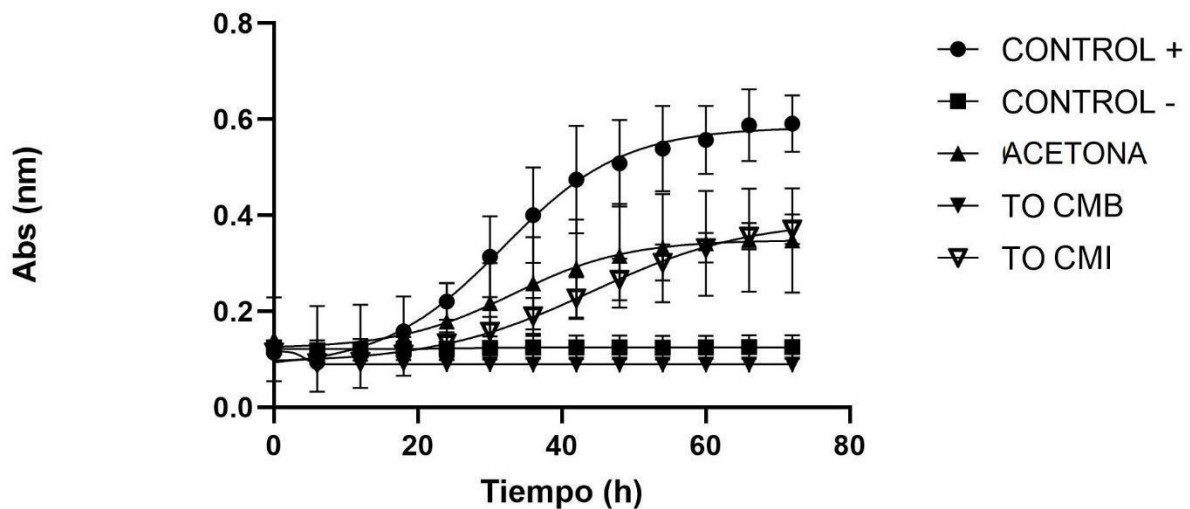


Figura 19. Curva de crecimiento de TO: *Thymus vulgaris*. CMB: concentración mínima inhibitoria, CMI: concentración mínima bactericida.

Para finalizar, con respecto a *Ralstonia solanacearum* y el aceite esencial de *Mentha* sp., tanto en la CMI, como la CMB a las 24 horas de crecimiento el microorganismo entra en etapa de

adaptación llegando a una absorbancia de 0,2 nm para la CMI y 0,3 CMB, lo cual indica una inhibición del crecimiento, pero no total como ocurría en otros aceites esenciales (figura 20).

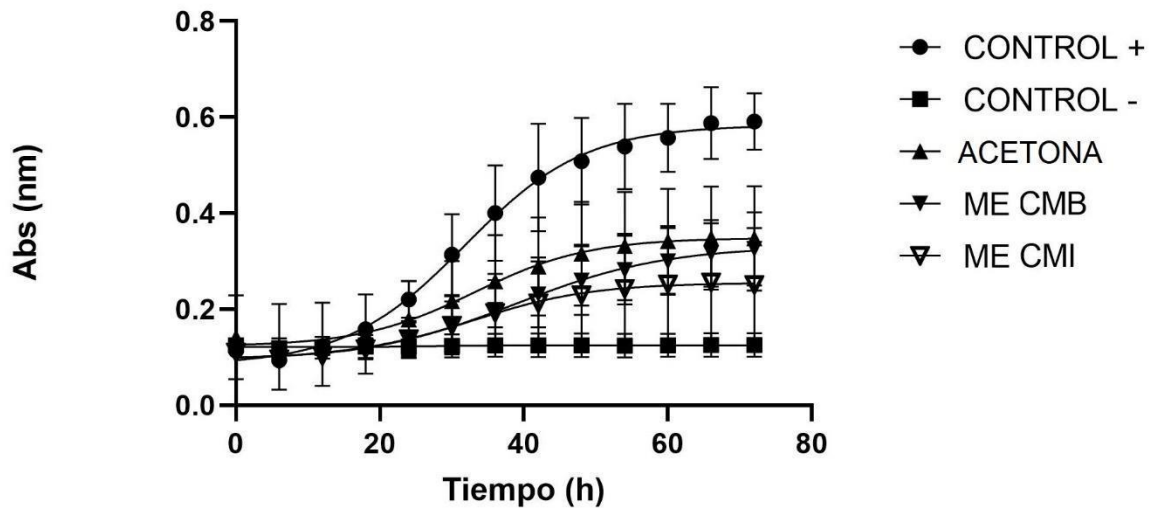


Figura 20. Curva de crecimiento de ME: *Mentha* sp. CMB: concentración mínima inhibitoria, CMI: concentración mínima bactericida.

Se realizó un análisis de varianza con medidas repetida en el tiempo empleando la corrección de simetría compuesta, para determinar el efecto de los aceites esenciales sobre el crecimiento de la bacteria a los tiempos 24, 48 y 72 horas. Se realizó después, prueba de comparación múltiple de Tukey y Dunnett y en total se probaron 21 tratamientos. Para la hora 72 los valores más altos de crecimiento se presentaron en los tratamientos de *Cymbopogon* sp., 0,315 mg/mL (0,3918), *Thymus vulgaris* 0,625 mg/mL (0,3710) y *Origanum majorana* 0,545 mg/mL (0,3461) y *Rosmarinus officinalis* 1,09 mg/mL (0,3321) (las anteriores concentraciones correspondían a la CMI) y *Mentha* sp., 1,09 mg/mL (CMB) (0,3259). Estos datos presentados indican que el aceite esencial no ya no tiene efecto antimicrobiano a la hora 72.

Los valores más bajos de absorbancia se presentaron en la hora 24 para los tratamientos *Foeniculum vulgare* (60 mg/mL), *Lippia alba* (2,5 mg/mL), *Origanum* sp., (2,18 mg/mL), *Tagetes lucida* 35 mg/mL, *Origanum majorana* (1,09 mg/mL), *Cymbopogon citratus* (1,25 mg/mL), *Thymus vulgaris* 1,25 mg/mL, y *Cymbopogon* sp., 0,625 mg/mL. Dichas concentraciones corresponden a la CMB de los aceites esenciales. Por último, queda por mencionar a *Tagetes lucida* 17,5 mg/mL (CMI del aceite esencial). A las 48 horas de la curva, hubo disminución de absorbancia para los tratamientos *Tagetes lucida* (35 y 17,5 mg/mL), *Origanum* sp., (2,18 mg/mL), mientras que a la

hora 72 se presentó el mismo efecto en los tratamientos *Origanum sp.*, (2,18 mg/mL), *Tagetes lucida* (35 y 17,5 mg/mL) y *Thymus vulgaris* (1,25 mg/mL) (tabla 10).

Los tratamientos *Tagetes lucida* (35 y 17,5 mg/mL), *Origanum sp.*, (2,18 mg/mL), *Thymus vulgaris* (1,25 mg/mL) y rifampicina no favorecieron el crecimiento de la bacteria, ya que en los tres tiempos de medición (24, 48 y 72 horas) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Es decir que el valor de la variable de respuesta no cambió en el tiempo. En el caso de *Foeniculum vulgare* 30 mg/mL, este aceite esencial favoreció el crecimiento de la bacteria. En las lecturas de los tiempos 24 h y 48 h no se encontraron diferencias y el valor aumentó en la lectura de las 72 horas. Para la concentración 60 mg/mL, el tiempo 24 es menor en comparación con las lecturas de los tiempos 48 y 72; y para estas dos últimas no se encontraron diferencias. En lo que tiene que ver con *Cymbopogon sp.*, (0,325 y 0,625 mg/mL), *Cymbopogon citratus* (0,625 mg/mL y 1,25 mg/mL), *Origanum majorana*, *Mentha sp.*, (0,545 mg/mL y 1,09 mg/mL) y *Origanum sp.*, (1,09 mg/mL), *Lippia alba* (1,25 y 2,5 mg/mL), *Rosmarinus officinalis* (1,09 y 2,18 mg/mL) y *Thymus vulgaris* (0,625 y 1,25mg/mL). Según se evidencia, los aceites esenciales favorecieron el crecimiento de la bacteria, ya que en los tres tiempos de medición se observó el incremento en la variable de respuesta y estos valores no son estadísticamente iguales.

Como particularidades de crecimiento para el aceite esencial *Tagetes lucida* en la concentración 17,5 mg/mL, después de la hora 16 el valor de crecimiento tiende a estabilizarse. En el tiempo 26 alcanza el valor más bajo y después de este tiempo nuevamente se estabiliza. Para la concentración 35 mg/mL, en cambio, después de la hora 12 el valor de crecimiento no varía. En su lugar, *Foeniculum vulgare* (30 y 60 mg/mL) y *Cymbopogon citratus* (1,25 mg/mL) no presentan cambios en el valor durante las 72 horas de evaluación. Para *Origanum sp.*, en la concentración 2,18 mg/mL, después de la hora 12, el valor de crecimiento decrece hasta estabilizarse. Por su parte, *Thymus vulgaris* en la concentración 1,25 mg/mL hace disminuir el valor de crecimiento después de la hora 12, hasta alcanzar el valor mínimo después del tiempo 42. Este se mantiene estable hasta el tiempo 72. En su lugar, rifampicina presenta un ligero crecimiento después del tiempo 20 y permanece estable hasta el final de las lecturas (tabla 10).

Tabla 10. Tratamientos con mayor efecto de inhibición contra *Ralstonia solanacearum*.

| T  | Tl 17,5 |     | Tl 35  |     | Fv 30  |   | Fv 60  |   | Cc 1,25 |   | OR 2,18 |     | Tv 1,25 |        | Rif.   |    |
|----|---------|-----|--------|-----|--------|---|--------|---|---------|---|---------|-----|---------|--------|--------|----|
| 2  | 0,0952  | A   | 0,0962 | A   | 0,1003 | A | 0,0950 | A | 0,0904  | A | 0,1066  | A   | 0,0921  | AB     | 0,1092 | B  |
| 6  | 0,0930  | ABC | 0,0933 | ABC | 0,1012 | A | 0,0936 | A | 0,0891  | A | 0,0959  | BC  | 0,0914  | ABC    | 0,1190 | BA |
| 12 | 0,0918  | ABC | 0,0912 | C   | 0,0972 | A | 0,0928 | A | 0,0913  | A | 0,0942  | BCD | 0,0910  | BCDE   | 0,1197 | BA |
| 18 | 0,0911  | ABC | 0,0907 | C   | 0,0967 | A | 0,0924 | A | 0,0907  | A | 0,0920  | CD  | 0,0901  | DEFGHI | 0,1221 | BA |
| 24 | 0,0898  | BC  | 0,0904 | C   | 0,0971 | A | 0,0920 | A | 0,0900  | A | 0,0913  | CD  | 0,0899  | EFGHIJ | 0,1226 | A  |
| 30 | 0,0902  | BC  | 0,0906 | C   | 0,0911 | A | 0,0922 | A | 0,0911  | A | 0,0901  | D   | 0,0898  | FGHIJ  | 0,1238 | A  |
| 36 | 0,0908  | BC  | 0,0909 | C   | 0,0928 | A | 0,0929 | A | 0,0933  | A | 0,0899  | D   | 0,0892  | GHIJ   | 0,1248 | A  |
| 42 | 0,0909  | BC  | 0,0909 | C   | 0,0934 | A | 0,0947 | A | 0,0949  | A | 0,0901  | D   | 0,0889  | J      | 0,1249 | A  |
| 48 | 0,0902  | BC  | 0,0910 | C   | 0,0950 | A | 0,0960 | A | 0,0956  | A | 0,0901  | D   | 0,0890  | IJ     | 0,1247 | A  |
| 54 | 0,0902  | BC  | 0,0904 | C   | 0,0976 | A | 0,0963 | A | 0,0961  | A | 0,0902  | CD  | 0,0888  | J      | 0,1243 | A  |
| 60 | 0,0906  | BC  | 0,0908 | C   | 0,1002 | A | 0,0977 | A | 0,0994  | A | 0,0902  | CD  | 0,0890  | IJ     | 0,1252 | A  |
| 66 | 0,0907  | BC  | 0,0908 | C   | 0,1021 | A | 0,0984 | A | 0,1024  | A | 0,0918  | CD  | 0,0888  | J      | 0,1256 | A  |
| 72 | 0,0903  | BC  | 0,0904 | C   | 0,1043 | A | 0,0996 | A | 0,1041  | A | 0,0919  | CD  | 0,0888  | J      | 0,1257 | A  |

\*Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. Tl: *Tagetes lucida*, Fv: *Foeniculum vulgare*, Cc: *Cymbopogon citratus*, OR: *Origanum ps*, Tv: *Thymus vulgaris*. T: tiempo

Para el tiempo 72 horas, se realizó un análisis de varianza para determinar el efecto de los aceites esenciales sobre el crecimiento de la bacteria. Se realizó prueba de comparación múltiple de Tukey y Dunnett, en total se probaron 21 tratamientos (10 aceites esenciales CMB, CMI y control). Los valores más bajos del crecimiento de *Rs* a las 72 horas se presentaron en los tratamientos *Tagetes lucida* 17,5 y 35 mg/mL, *Foeniculum vulgare* 30 y 60 mg/mL, *Cymbopogon citratus* 1,25 mg/mL, *Origanum sp.*, 2,18 mg/mL y *Thymus vulgaris* 1,25 mg/mL. Con la particularidad que estos son iguales estadísticamente al testigo rifampicina con valores entre 0,08878 y 0,133. Los valores más altos se presentaron en los tratamientos de *Cymbopogon sp.*, 0,325 mg/mL (0,3918), *Thymus vulgaris* a la concentración de 0,625 mg/mL (0,371), *Origanum majorana* 0,545 mg/mL y *Rosmarinus officinalis* 1,09 mg/mL (0,3461 y 0,3321 respectivamente) (figura 21).

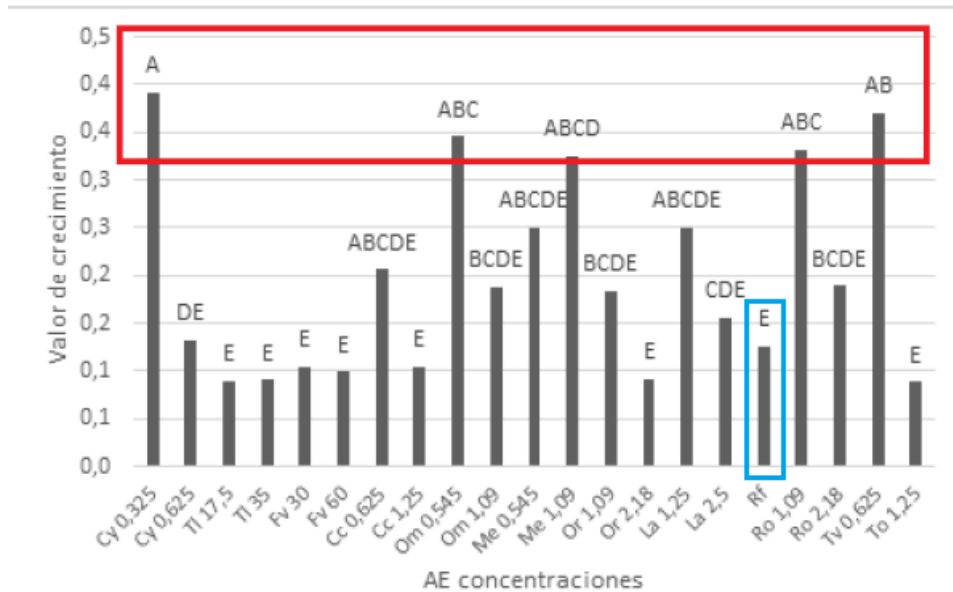


Figura 21. Tratamientos cuyos resultados en las curvas de letalidad son similares al control negativo. \*Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. Cy: *Cymbopogon* sp., Tl: *Tagetes lucida*, Fv: *Foeniculum vulgare*, Cc: *Cymbopogon citratus*, Om: *Origanum majorana*, Me: *Mentha* sp., Or: *Origanum* sp., La: *Lippia alba*, R: *Rosmarinus officinalis*, Tv: *Thymus vulgaris*, Rf: rifampicina. Recuadro azul control químico, recuadro rojo tratamientos sobresalientes.

Se reafirma que, para poder proponer un aceite esencial como bioplaguicida, tres parámetros son importantes: (a) tener un alto rendimiento biomasa aceite esencial (%p/p), (b) una baja concentración CMI y CMB y (c) que perdure en el tiempo; de los diez aceites esenciales cuatro demostraron seguir inhibiendo el microorganismo a las 72 horas de crecimiento tanto en la CMI como en la CMB, los cuales son *Cymbopogon citratus* (CMI 0,625 mg/mL, CMB 1,25 mg/mL, rendimiento 0,13%), *Origanum* sp. (CMI 1,04 mg/mL, CMB 2,18 mg/mL, rendimiento 0,45%), *Foeniculum vulgare* (CMI 30 mg/mL, CMB 60 mg/mL, rendimiento 0,11%), y *Tagetes lucida* (CMI 17,5 mg/mL, CMB 35 mg/mL, rendimiento 0,28%). Con respecto a los dos últimos (tabla 8) se determina que las concentraciones CMI y CMB de trabajo son muy altas para realizar estudios a escala como bioplaguicidas, además, los rendimientos (%p/p) no son los mayores del presente estudio; *Cymbopogon citratus* por su parte, tiene bajas concentraciones de CMI y CMB para trabajar, pero el rendimiento (% p/p) no es el ideal con respecto a los otros aceites evaluados. Por último, *Origanum* sp., presenta el tercer rendimientos más alto de los diez aceites evaluados y tanto las CMI como CMB permiten pensar en este aceite como plaguicida ya que perdura en el tiempo a una baja concentración de trabajo.

Los anteriores datos son soportados por una investigación realizada en 2015, en la cual los autores trabajaron con el aceite esencial de las hojas de *Macleaya cordata* R. Br., con un rendimiento del 0,129% y cuyo compuesto mayoritario era hexadecanal (20,63%) y fitol (13,51%). El aceite esencial fue probado contra *Ralstonia solanacearum*, con lo que se demostró la actividad antimicrobiana. En los ensayos determinaron que la CMI era 125 µg/mL y realizaron recuento de viabilidad celular durante 24 horas. En las primeras 12 horas se mostró una disminución lenta del número de células y en las posteriores 12, un retraso en el crecimiento celular, dado que los aceites esenciales son hidrofóbicos. Esto les permite acumularse en las membranas celulares alterando determinadas estructuras al interior de la célula y aumentando la permeabilidad (C.-M. Li & Yu, 2015).

En 2016, se trabajó con dos moléculas específicas, resveratrol y cumarina contra la bacteria *Ralstonia solanacearum* biovar 3 filotipo I y se realizaron ensayos de curvas de crecimiento (38h) para determinar el efecto de dichos compuestos en el desarrollo de la bacteria en el tiempo. El agente diluyente de los compuestos fue DMSO (dimetilsulfóxido) y las concentraciones probadas para cada compuesto fueron 8 µg/mL, 16 µg/mL, 32 µg/mL, 64 µg/mL y 128 µg/mL. La densidad óptica (600 nm) obtenida para la bacteria a las 38 h fue de 2,3 absorbancia. Valor similar al del final del experimento cuando se puso a crecer con DMSO. El microorganismo decreció a medida que la concentración del compuesto aumentaba hasta alcanzar 128 µg/mL. Las densidades ópticas de crecimiento fueron de 0,53 nm de absorbancia para resveratrol y de 0,3 nm de absorbancia para cumarina. Estos datos confirman que ambos compuestos producen un retraso en el crecimiento de *Ralstonia solanacearum* dependiendo la concentración de la incubación. Dicho retraso disminuyó significativamente a medida que aumentaba la concentración del compuesto. Al realizar la observación, con microscopía electrónica a las células sometidas a resveratrol, se evidenció que la morfología celular parecía incompleta, con límites poco claros y con la presencia de proyecciones distorsionadas y parcialmente rotas (J. Chen et al., 2016).

El protocatechualdehído (PCA) es un compuesto polifenol natural obtenido de la raíz china *Salviae miltiorrhizae* y se ha demostrado por estudios anteriores que tiene propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. Sin embargo, la actividad antimicrobiana no había sido demostrada hasta 2016, año en el que se disolvió en DMSO y se enfrentó a *Ralstonia solanacearum* filotipo I, raza I, biovar 3. El experimento se desarrolló a concentraciones de 10, 20, 30 y 40 µg/mL. Así, se demostró que la bacteria sin ningún tratamiento alcanzaba densidades

ópticas de 2,5 absorbancia a las 38 horas de crecimiento. A medida que se probaban tratamientos dicha densidad disminuía hasta 0,6 absorbancia con 40  $\mu\text{g/mL}$ ; además, se realizó microscopia electrónica de barrido y se encontró que las células tratadas con (PCA) presentaban destrucción celular y se disminuye tanto la capacidad de formar biopelículas como la motilidad del microorganismo (S. Li et al., 2016).

Villada y colaboradores (2021) determinaron el efecto del aceite esencial de *Tagetes patula*, extraído de las hojas de la planta y al cual se les identificaron 16 compuestos (piperitona (42,95%). Se determinó el efecto del aceite esencial en el crecimiento *Ralstonia solanacearum* biovar 2 durante 14 horas tanto en tubo como en placa ( $3,1 \times 10^9$  UFC/mL concentración final de la bacteria sin tratamiento). Las concentraciones probadas fueron 50, 100, 200 y 500  $\mu\text{g/mL}$  del aceite esencial, el cual fue diluido en DMSO al 5,0 %. Este también fue probado en la bacteria, los resultados arrojaron que a la concentración de 50  $\mu\text{g/mL}$  se obtenía el valor mínimo inhibitorio y a medida que iba aumentando la concentración del aceite esencial disminuía el crecimiento de la bacteria  $1,3 \times 10^9$  UFC/mL a los 500  $\mu\text{g/mL}$ . Tal resultado indica que los aceites esenciales tiene un potencial antimicrobiano (Villada-Ramos et al., 2021).

Otras de las sustancias que se caracterizan por su acción antimicrobiana son las cumarinas. Estos son metabolitos secundarios naturales compuestos de anillos fusionados de benceno, producidos a través de la ruta de los fenilpropanoides, los cuales se acumulan en respuesta a la infección por patógenos vegetales. Por tal razón son una opción como antimicrobiano natural contra ciertos microorganismos ya que inducen la lisis celular. Así cuando el oxígeno de la molécula es sustituido con el grupo hidroxilo como, por ejemplo, en las umbeliferonas y esculetinas se obtiene una amplia actividad antibacteriana contra *R. solanacearum* (Yang et al., 2018). Debido a lo anterior Han y colaboradores (2021) decidieron probar el efecto de la 7-metoxicumarina diluida en DMSO en concentraciones de 10, 25, 50, 75 y 100  $\mu\text{g/mL}$  contra una *Ralstonia solanacearum* aislada de tabaco durante 24 horas de crecimiento. El desarrollo del microorganismo sin el metabolito a las 24 h fue de 1,7 de absorbancia y su lectura disminuyó a medida que la concentración del compuesto aumentaba para cada tratamiento, de esta manera a los 100  $\mu\text{g/mL}$  la absorbancia fue de 0,4. Se observó además el microorganismo por microscopia de barrido y se determinó que las células expuestas al metabolito presentaban alteración morfológica y daño de su pared. Esto puede inducir a la fuga lisosomal y eventualmente producir la muerte celular. Por último, se realizó la evaluación de la expresión



transcripcional para genes patógenos de *Ralstonia solanacearum* y se demostró que el compuesto inhibe la expresión de genes asociados al sistema de secreción tipo III (popA y hrpG). Adicionalmente inhibe la síntesis del polisacárido extracelular epsE, este resultado explicaría el efecto preventivo de ciertos metabolitos como los aceites esenciales, entre otros, contra la infección de *Ralstonia solanacearum* (Han et al., 2021).

Tradicionalmente, durante su uso, los pesticidas químicos producen un gran daño tanto al ambiente como al ser humano. Por este motivo es necesario pensar en un nuevo tipo de pesticida ecológico, en esa medida se proponen los aceites esenciales teniendo en cuenta que sus compuestos terpenoides pueden dañar las membranas biológicas de los fitopatógenos debido a sus propiedades lipofílicas. Muchos de los antimicrobianos van dirigidos a la membrana celular como órgano blanco para ejercer su acción antimicrobiana, causando una disrupción que provoca la pérdida de enzimas y nutrientes. Según diferentes investigaciones, éste sería uno de los mecanismos de acción de los aceites esenciales, aunque no el único, considerando la gran variedad de compuestos que estos poseen. Las curvas de letalidad que se desarrollan en los experimentos con la mayoría de los microorganismos generalmente se extienden hasta 30 horas y para nuestro caso, es la primera vez que se documenta hasta la hora 72, con el fin de determinar la presencia del aceite en el tiempo y proponer como bioplaguicida cuya perdurabilidad no esté comprometida por la evaporación del aceite. Por último, se evitó además la evaporación del diluyente que era acetona ya que todos la placa donde se desarrollaron las curvas de letalidad están selladas por una tapa que sin llegar a generar anaerobiosis para el microorganismo evita la evaporación del aceite esencial y el diluyente (Han et al., 2021; Oliveira et al., 2022).

### **5.7. Porcentaje de crecimiento de semillas:**

Las semillas son fundamentales para la producción de cultivos viables, muchos de los patógenos que afectan los cultivos pueden ser transportados por éstas, de tal manera que el proceso de desinfección es un paso importante con el que se puede evitar la presentación de enfermedades en plantas. De este modo, es posible evitar pérdidas económicas para los productores, aumentar el rendimiento de los cultivos y la producción de alimentos. Como lo informan varios estudios los aceites esenciales podrían ser utilizados como desinfectantes dado el alto uso de químicos que a largo plazo pueden generar resistencia (Moumni et al., 2021). En el presente estudio se realizó

la inmersión en 4 tiempos (1,0, 5,0, 30 y 60 minutos) para determinar si esto influía en la germinación del material vegetal (tabla 11).

Tabla 11. Porcentaje de germinación de las semillas de tomate en 4 tiempos para los aceites esenciales (CMI).

| PLANTA                        | 1,0 min       | 5,0 Min | 30 min | 60 min |
|-------------------------------|---------------|---------|--------|--------|
| <i>Cymbopogon citratus</i>    | 76,02         | 52,78   | 83,38  | 64,28  |
| <i>Cymbopogon sp.</i>         | 74,96         | 55,00   | 58,63  | 54,83  |
| <i>Foeniculum vulgare</i>     | 80,59         | 67,78   | 3,45   | 0,00   |
| <i>Lippia alba</i>            | 76,58         | 50,00   | 30,37  | 4,07   |
| <i>Mentha sp.</i>             | 83,50         | 54,44   | 82,55  | 71,35  |
| <i>Origanum majorana</i>      | 82,70         | 63,89   | 65,37  | 78,35  |
| <i>Origanum sp.</i>           | 87,56         | 48,89   | 60,76  | 28,78  |
| <i>Rosmarinus officinalis</i> | 84,93         | 62,22   | 76,34  | 66,84  |
| <i>Tagetes lucida</i>         | 79,79         | 43,89   | 7,97   | 2,22   |
| <i>Thymus vulgaris</i>        | 82,39         | 63,89   | 48,41  | 86,60  |
| Sin tratamiento               | 93,33         | 77,78   | 79,87  | 73,16  |
| Acetona                       | 80,41         | 56,67   | 11,92  | 4,44   |
| Agua                          | 77,13         | 73,33   | 75,11  | 96,66  |
| PROMEDIO                      | <b>76,62%</b> | 59,27%  | 52,63% | 48,58% |

Como se observa en la tabla 11 y figura 22, se estableció que en los tratamientos donde se presentó mayor valor de germinación al tiempo 60 de inmersión fueron agua (96,67%) y *Thymus vulgaris* (86,61%). A su vez, el tiempo 1,0 sin tratamiento (96,67%) y *Origanum sp.*, (86,13%). Seguidos de estos, en el tiempo de inmersión 30, los mayores porcentajes de germinación se presentaron para *Cymbopogon citratus* (83,39%) y los valores más bajos se presentaron en el tiempo 60 para los aceites *Foeniculum vulgare* (0% de germinación), seguido de *Tagetes lucida* (2,22%).

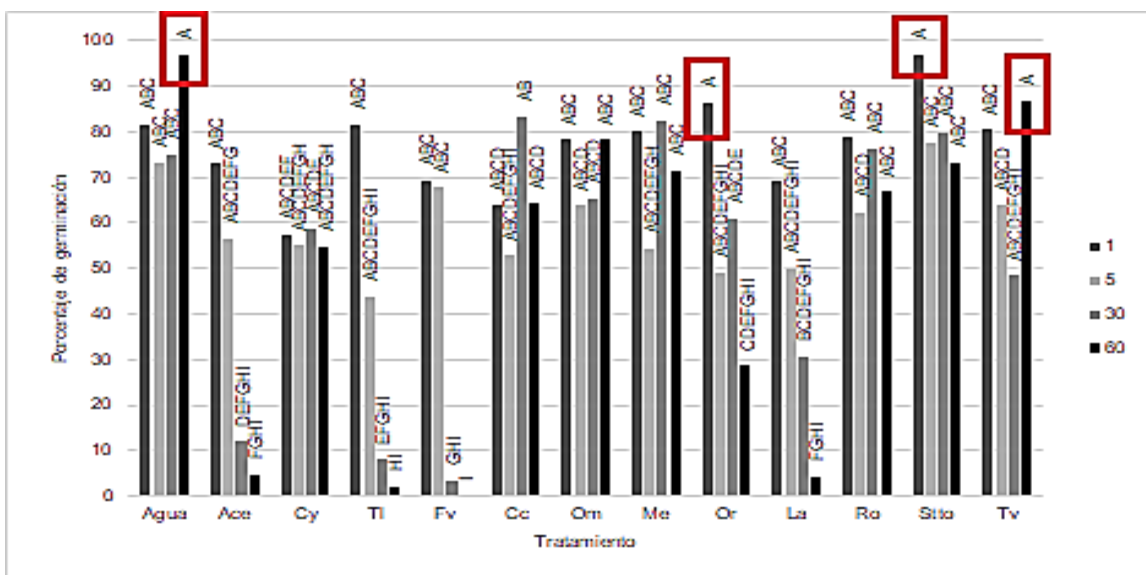


Figura 22. Porcentajes de germinación de semilla de tomate en 4 tiempos. \*Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. Cy: *Cymbopogon* sp., Tl: *Tagetes lucida*, Fv: *Foeniculum vulgare*, Cc: *Cymbopogon citratus*, Om: *Origanum majorana*, Me: *Mentha* sp., Or: *Origanum* sp., La: *Lippia alba*, Ro: *Rosmarinus officinalis*, Tv: *Thymus vulgaris*, Ace: acetona.

Los resultados que se muestran en la tabla 11 determinan que el tiempo óptimo de inmersión de semilla en los aceites esenciales es un minuto y que, entre los 10 aceites estudiados, el *Origanum* sp., presenta el mayor porcentaje de germinación (76,62%). Este dato sumado al rendimiento biomasa/aceite esencial (0,45%) y las CMI (1,04 mg/mL), CMB (2,18 mg/m), además de inhibir el crecimiento de *Ralstonia solanacearum* a las 72 horas de crecimiento, permite proponer estudios posteriores con el mismo compuesto a mayor escala.

En 2018, se utilizó el aceite esencial de *Origanum dubium* extraído por hidrodestilación que contenía una concentración de 85,9% de carvacrol para determinar la CMI en seis patógenos que afectan cultivos de tomate (254, 303, 318, 309 y 901  $\mu$ l). Estas concentraciones fueron probadas en semillas en dos tiempos: una hora y 24 horas. Se incubaron a 28° C y 85% de humedad relativa (HR) Los datos se evaluaron a los 10 días y sus resultados mostraron que en una hora el porcentaje de germinación de semilla para todas las concentraciones fue de 100% y en 24 horas 0%. Estos resultados corroboran que el tiempo en el que se aplica el tratamiento es importante para no dañar la semilla (Basim et al., 2019). El uso de aceite esencial en semillas puede inhibir la germinación, como se demostró en 2019, utilizando el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* a una concentración de 5,0 mM contra tres semillas de malezas (*T. incarnatum*, *S. marianum* y *P. minor*), tras lo cual se consiguió un porcentaje de germinación de

semillas del 0%. Además, a concentración de 1,25 mM y 2,5 mM se evidenció retraso significativo de raíces comparada con el control (Ben Kaab et al., 2019).

En 2020, se evalúa el porcentaje de germinación de semillas de maíz en ocho aceites esenciales caracterizados químicamente (*O. vulgare*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon Martini*, *Citrus aurantium dulcis*, *Thymus hiemalis*, *Mentha viridis*, *Aniba rosaeodora*, *Foeniculum vulgare dulce*), diluidos agua y Tween 80, en una proporción (20/70/10). Los resultados mostraron que la mayoría de los aceites esenciales probados no tuvieron efecto en la germinación de las semillas de maíz ya sea después de cuatro días (germinación > 95%) o siete días (germinación > 96%) de incubación. Sin embargo, para el aceite esencial de palmarosa, el porcentaje de semillas germinadas fue significativamente menor que en las muestras control y alcanzó el 75% y el 84% en el cuarto y séptimo día de incubación, respectivamente. Por su parte, los porcentajes de semillas germinadas en tratamientos con la canela y *Mentha* sp. fueron similares (88% y 89%, respectivamente) en el cuarto día y excedieron el 90% en el séptimo día (Perczak et al., 2020). Al revisar la metodología del anterior estudio, no evidencia los tiempos en los cuales estuvieron sometidas las semillas a los aceites esenciales, lo cual es punto importante para determinar si puede ejercer fitotoxicidad y las mezclas realizadas para diluir los aceites esenciales son imprecisas. Esto dado que cada aceite esencial posee una densidad diferente. Con todo, los autores resaltan el hecho de que efectivamente los aceites esenciales pueden ser fitotóxicos en el proceso de germinación de la semilla.

En 2020, un grupo de investigación probó la fitotoxicidad de seis aceites esenciales (*Cinnamomum zeylanicum*, *Syzygium aromaticum*, *Allium sativum*, *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare*, *Ocimum basilicum*) obtenidos de manera comercial, probados en concentraciones desde 0,1% a 0,4% (diluidas con DMSO). El experimento se hizo en semillas de tomate, con diez minutos de inmersión en cada aceite esencial y su posterior secado. La germinación fue evaluada a los 5 y 14 días. Los resultados mostraron que, en la mayoría de los aceites esenciales y concentraciones, los porcentajes de germinación se encontraron entre 94,3% y 97,8%, exceptuando el aceite esencial de clavo al 0,4% (4200 ppm) que provocó una disminución de la germinación al 86% (Orzali et al., 2020). Dos de los aceites esenciales utilizados en el anterior estudio, se probaron en la presente investigación (*Thymus vulgaris* y *Origanum* sp.), con la misma semilla (tomate), sin embargo, siendo un minuto nuestro mejor tiempo de inmersión el porcentaje de germinación no superó el 90% de germinación, lo cual podría ser explicado por la

variedad de semilla utilizada o las concentraciones de los aceites esenciales que son inferiores a las probadas en el presente estudio.

Moumni y colaboradores en 2021 realizaron un trabajo para determinar cómo la inmersión en siete aceites esenciales comerciales, (*C. citratus*, *L. dentata*, *L. hybrida*, *M. alternifolia*, *L. nobilis*, *O. majorana*, y *O. majorana*) a tres concentraciones (0,25, 0,5 y 1,0 mg/mL) diluidos con tween 20%, prevenían la aparición de enfermedades fúngicas en semillas de *Curcubita máxima*. Se evaluó además el porcentaje de germinación de semilla a la concentración de 0,5 mg/mL con inmersión en cada aceite esencial durante 6 horas, al mezclarlo cada 30 minutos y secarlo después del tratamiento. En este caso se obtuvieron entre los 85% y 87% de germinación. Lo anterior indica que no existían diferencias significativas entre el control y la inmersión en los aceites esenciales. También mostró como semillas tratadas con una combinación de fungicidas disminuye a 75% el porcentaje de germinación (Moumni et al., 2021). Si bien el anterior trabajo no fue realizado con semillas de tomate muestra como un tiempo de inmersión de 6 horas en aceite esencial no resulta fitotóxico para el caso de las semillas de calabaza, sin embargo, sí puede serlo para las de tomate. Dada la gran variedad de métodos de extracción de los aceites esenciales, compuestos que los constituyen, concentraciones tiempos y materiales vegetales en los que se prueban se han dado avances prometedores en la vía de poder sustituir o disminuir el uso de productos químicos como controladores de plagas. Si bien el panorama es complejo y se dificulta estandarizar metodologías, las perspectivas están abiertas para continuar con la investigación, prueba y comercialización de productos alternativos a los tradicionales de síntesis química.

### **5.8. Severidad de la enfermedad en *Solanum lycopersicum* L.**

El marchitamiento bacteriano por *Ralstonia solanacearum* es una de las principales enfermedades terrestres que produce daños considerables en muchos cultivos de importancia económica mundial como el tomate llegando a producir pérdidas entre el 0-90% en un cultivo. Además, los productos utilizados para su erradicación traen efectos negativos para el medio ambiente, los ecosistemas, y la salud humana, por lo anterior los aceites esenciales son una alternativa viable con el medio ambiente probada como antimicrobiano, nematicida, antioxidante y repelente de insectos (Alonso-Gato et al., 2021; Rkhaila et al., 2021). En el presente proyecto una vez se estableció como tiempo de desinfección un minuto, las semillas de tomate se sumergieron en los diferentes aceites esenciales, se sembraron en turba y a los 21 días se

trasplantaron a suelo estéril en el cuarto de bioensayos, allí fueron infectados tomando cada 3 días los datos de presentación de la enfermedad e inoculando 1,0 mL de los aceites esenciales en suelo cada semana.

Los valores más altos de índice de severidad se presentaron en el tratamiento acetona (0,5583), seguido de *Cymbopogon citratus* y Agua (0,5139 y 0,5111 respectivamente) pero estos no difieren de los restantes tratamientos. El valor más bajo se presentó en el control (0.0083). Empleando la prueba de Dunnett, se encontró que existen diferencias para el índice de severidad (IS) entre el uso de la acetona (0,5583) y los tratamientos *Origanum majorana*, *Lippia alba* y *Thymus vulgaris* (0,3611, 0,3472 y 0,3417 respectivamente) (figura 23).



Figura 23. Índice de severidad presentado por *Ralstonia solanacearum* en plantas de tomate con 10 aceites esenciales. \*Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. Cy: *Cymbopogon* sp., Tl: *Tagetes lucida*, Fv: *Foeniculum vulgare*, Cc: *Cymbopogon citratus*, Om: *Origanum majorana*, Me: *Mentha* sp., Or: *Origanum* sp., La: *Lippia alba*, Ro: *Rosmarinus officinalis*, Tv: *Thymus vulgaris*, Ace: acetona.

Los valores más altos del área bajo la curva se presentaron en los tratamientos acetona, *Cymbopogon citratus*, agua con valores entre 7,4 y 7,96, pero estos no se diferenciaron de los otros tratamientos. Los valores más bajos se presentaron en el control con un valor de 0,0875. Empleando la prueba de Dunnett, se encontró que existen diferencias para el IS entre el uso de la acetona (0,5583) y los tratamientos *Origanum majorana*, *Lippia alba* y *Thymus vulgaris* (5,0458, 4,4625 y 4,6958 respectivamente), además existen diferencias entre el agua (7,4375) y *Lippia alba* (4,4625) (figura 24).

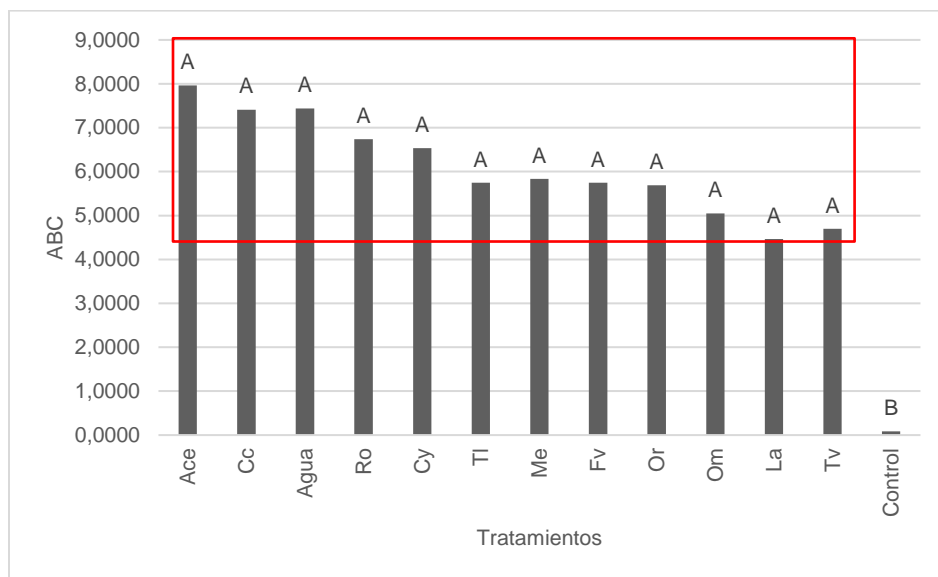


Figura 24. Área bajo la curva de plantas de tomate infectadas con *Ralstonia solanacearum* y tratadas con aceites esenciales. \*Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. Cy: *Cymbopogon* sp., Tl: *Tagetes lucida*, Fv: *Foeniculum vulgare*, Cc: *Cymbopogon citratus*, Om: *Origanum majorana*, Me: *Mentha* sp., Or: *Origanum* sp., La: *Lippia alba*, Ro: *Rosmarinus officinalis*, Tv: *Thymus vulgaris*, Ace: acetona.

Respecto al número promedio de hojas en las plantas que sobrevivieron a la enfermedad, los valores más altos se presentaron en el tratamiento con el aceite esencial de *Lippia alba* (8,2717), seguido de los tratamientos *Cymbopogon* sp., *Tagetes lucida*, *Thymus vulgaris*, *Origanum majorana* y el control (valores entre 5,66 y 6,73). Los valores más bajos se presentaron en los tratamientos acetona, *Cymbopogon citratus*, agua, *Rosmarinus officinalis*, *Mentha* sp., *Foeniculum vulgare* y *Origanum* sp., con valores entre 3,69 y 5,15 (figura 25).

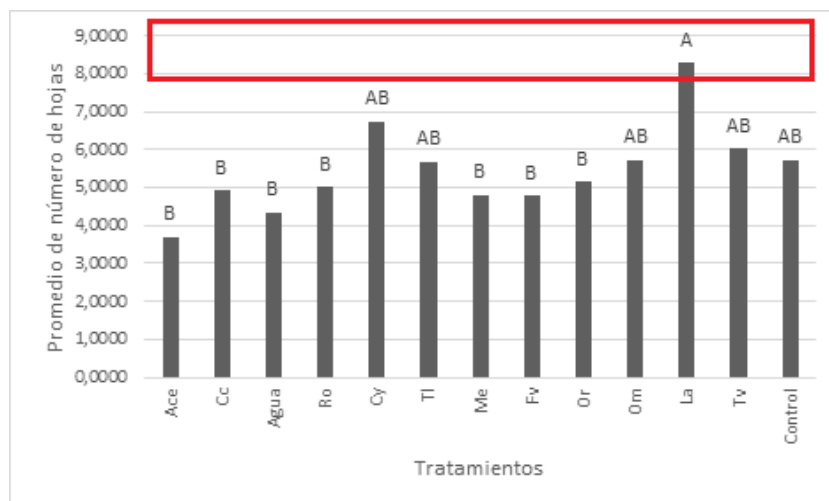


Figura 25. Número de hojas por planta promedio, sobrevivientes a la enfermedad. \*Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. Cy: *Cymbopogon* sp., Tl: *Tagetes lucida*, Fv: *Foeniculum vulgare*, Cc: *Cymbopogon citratus*, Om: *Origanum majorana*, Me: *Mentha* sp., Or: *Origanum* sp., La: *Lippia alba*, Ro: *Rosmarinus officinalis*, Tv: *Thymus vulgaris*, Ace: acetona.

Para finalizar el presente ensayo, se midió el porcentaje de plantas vivas al final de la prueba, determinando que no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los aceites evaluados con valores entre 10% hasta 47%. *Foeniculum vulgare*, *Origanum* sp., *Origanum majorana* y *Thymus vulgaris* presentaron valores de supervivencia superiores al 40%. El control negativo no afectó el número de plantas vivas alcanzando valores de supervivencia del 100% (figura 26).

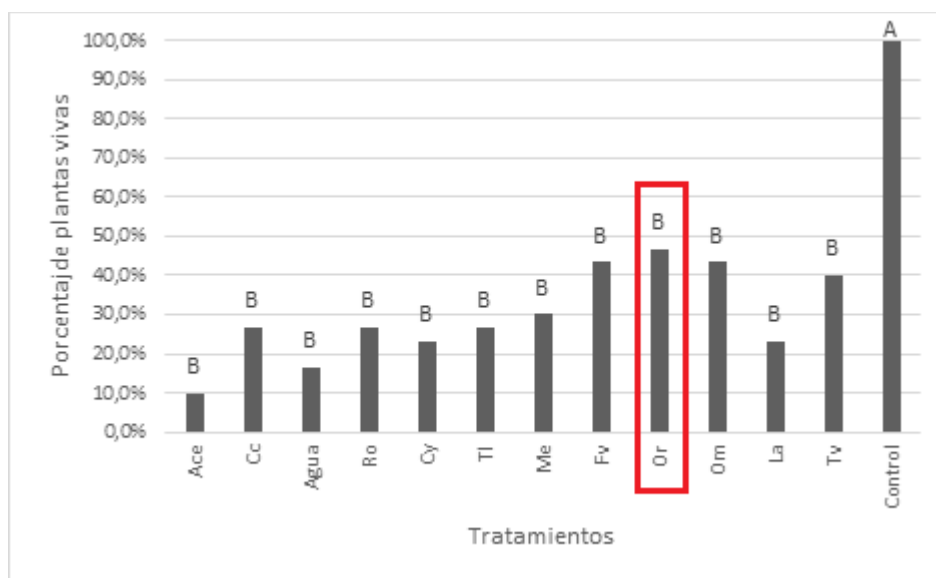




Figura 26. Determinación de plantas vivas post-enfermedad. \*Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. Cy: *Cymbopogon* sp., Tl: *Tagetes lucida*, Fv: *Foeniculum vulgare*, Cc: *Cymbopogon citratus*, Om: *Origanum majorana*, Me: *Mentha* sp., Or: *Origanum* sp., La: *Lippia alba*, Ro: *Rosmarinus officinalis*, Tv: *Thymus vulgaris*, Ace: acetona.

Aunque no existen diferencias significativas entre los 10 aceites esenciales con respecto al parámetro porcentaje de plantas vivas (figura 26), es evidente que tienen capacidad de inhibir la presentación de la enfermedad con respecto al control (ninguna planta control infectada con *Ralstonia solanacearum* sobrevivió al experimento). En plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y para el aceite esencial de *Origanum* sp. se presentó el mayor porcentaje de plantas sanas vivas lo que sumado a su rendimiento, baja concentración de CMI (1,09 mg/mL) con la que se trabajó en las plantas y perdurabilidad en el tiempo determinan este aceite como ideal para ser utilizado en campo como bioplaguicida contra el fitopatógeno *Ralstonia solanacearum*.

Numerosos autores han probado los aceites esenciales en diferentes plántulas. En 2021 un grupo de investigación trabajó con dos variedades de papa y realizó la infestación del suelo con las *Ralstonia solanacearum* ( $10^8$  UFC/mL) obtenidas en el mismo estudio. Se utilizaron aceites esenciales de *Foeniculum vulgare*, limoncillo y *Thymus vulgaris*, y se determinó la incidencia y severidad de la enfermedad a los 45 días. En ese entonces, los resultados arrojaron que para las tres concentraciones utilizadas de los aceites esenciales (0,04%, 0,07%, 0,14%) *Thymus vulgaris* generó un porcentaje de reducción de la incidencia de 69% a 73% para una variedad y 53% al 58% para la segunda variedad, además de un porcentaje de reducción de la severidad de 75% a 77 % y de 54% a 60%, respectivamente. Para limoncillo la reducción de la incidencia fue de 61% a 66%, 43% a 49% y 63% a 69% para una variedad; y de 46% a 51% para la otra. Para *Foeniculum vulgare*, en cambio, se produjo la reducción de la incidencia de la enfermedad del 44% al 49% y del 23% al 31%, además de del 50% a 55%. En cuanto a la reducción de la severidad, se da del 27% al 34% (Abd-Elrahim et al., 2021).

En 2018, trabajaron con el aceite esencial de *Pimenta racemosa* var *racemosa* quimiotipo 3 con olor a clavo, a una concentración de 0,14%, contra *Ralstonia solanacearum* en plantas de tomate. En dicho ensayo se determinó que las plantas mostraron una resistencia completa ya que no se presentaron síntomas. Esto en comparación con la concentración 0,07%, en la cual las plantas mostraron la incidencia de marchitez bacteriana entre el día 7 y 12 de ser infectadas con el microorganismo. También en contraste con el 62% de presentación de la enfermedad en el

tratamiento control, lo que corrobora que los aceites esenciales en general pueden ser utilizados como bioplaguicidas ya que pueden inhibir el crecimiento del microorganismo patógeno (Deberdt et al., 2018).

En 2012 trabajaron con plantas de tomate (5 semanas de crecimiento), *Ralstonia solanacearum* (20 mL a  $10^6$  UFC / mL) y aceites esenciales como canela, citral, clavo, eugenol, geraniol y limoneno (20 mL). El progreso de la enfermedad se controló diariamente con una escala de severidad por el marchitamiento de hojas desprendidas, con el método propuesto por Roberts en 1988 y se calculó el área bajo la curva. Los aceites esenciales de canela, clavo y eugenol (0,01%) disminuyeron drásticamente el desarrollo de la enfermedad a los 3 y 5 días post inoculación de la bacteria y el aceite esencial de canela a una concentración de 0,02% mostró efectos fitotóxicos en los peciolo de las hojas. Este mismo aceite esencial a los 0,05%, produjo daño tisular grave, sin inoculación de *Ralstonia solanacearum* al igual que ocurrió en la presente investigación (Lee et al., 2012).

### **5.9. Bioestimulación de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.):**

La promoción del crecimiento de las plantas se conoce con el nombre de bioestimulación y una gran variedad de compuestos pueden actuar en dicho proceso o en un rasgo determinado de la misma, como longitud radicular o materia seca. Entre los diversos bioestimulantes están los ácidos orgánicos, aminoácidos, poliaminas y los aceites esenciales ya que estos últimos han demostrado una amplia actividad biológica en los sistemas vivos (Souri & Bakhtiarizade, 2019). Se realizó análisis de varianza para determinar el efecto de los aceites sobre el peso seco y número de las hojas de las plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para las variables peso seco (p valor=0,1373) y número promedio de hojas (p valor=0,155) (figura 27, 28).

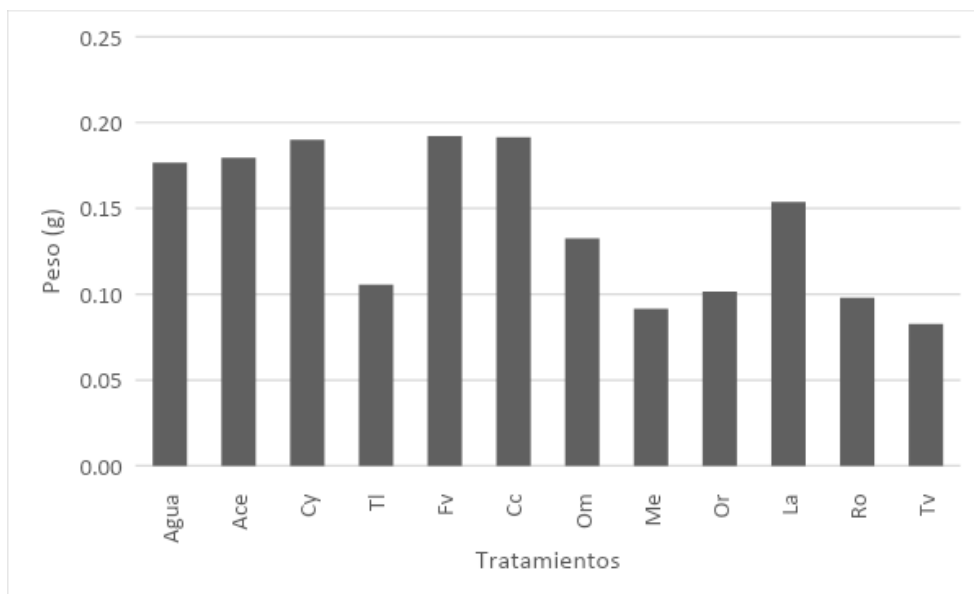


Figura 27. Peso seco de plántulas de tomate postratamiento con aceites esenciales. No se presentan diferencias estadísticamente significativas. Cy: *Cymbopogon* sp., TI: *Tagetes lucida*, Fv: *Foeniculum vulgare*, Cc: *Cymbopogon citratus*, Om: *Origanum majorana*, Me: *Mentha* sp., Or: *Origanum* sp., La: *Lippia alba*, Ro: *Rosmarinus officinalis*, Tv: *Thymus vulgaris*, Ace: acetona.

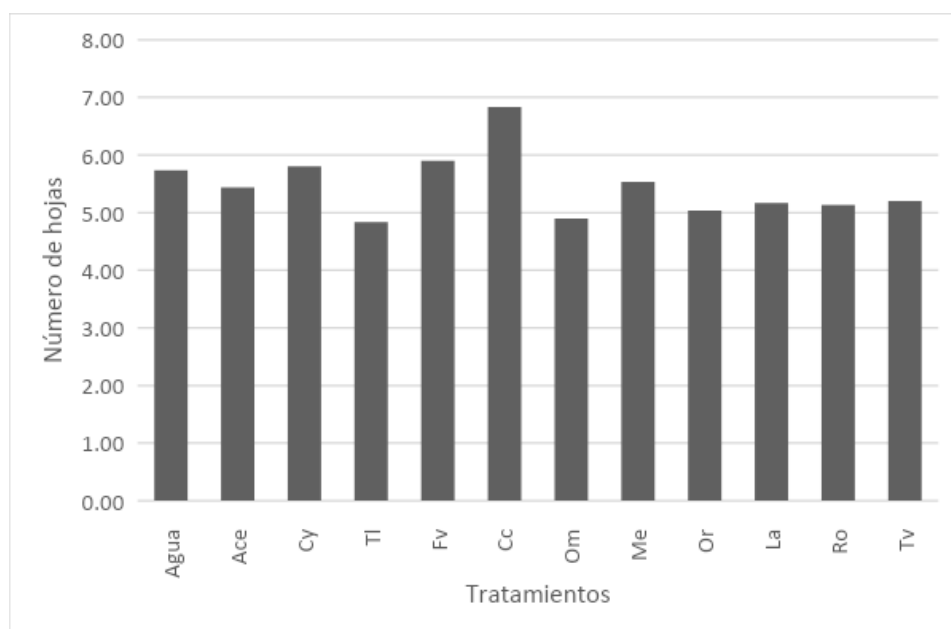


Figura 28. Número de hojas en plántulas de tomate tratadas con aceites esenciales. No se presentan diferencias estadísticamente significativas. Cy: *Cymbopogon* sp., TI: *Tagetes lucida*, Fv: *Foeniculum vulgare*, Cc: *Cymbopogon citratus*, Om: *Origanum majorana*, Me: *Mentha* sp., Or: *Origanum* sp., La: *Lippia alba*, Ro: *Rosmarinus officinalis*, Tv: *Thymus vulgaris*, Ace: acetona.

A nivel estadístico, tanto el peso seco como el número de hojas por planta no presentan diferencias significativa, lo que determina que los aceites esenciales no estimulan el crecimiento y desarrollo de las plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) pero tampoco lo inhiben y su aplicación sí puede ser utilizada para prevenir enfermedades que se presentan en campo como marchitez vascular ocasionada por el fitopatógeno *Ralstonia solanacearum*. La afirmación anterior combinada con el análisis previo permite proponer finalmente al aceite esencial de *Origanum* sp. como el aceite ideal según los datos reportados en la presente investigación para ser considerado como bioplaguicida.

Las sustancias bioestimulantes del crecimiento de plantas están tomando más fuerza cada día, entre estas se encuentran fitohormonas, ácidos húmicos, ácidos fúlvicos y aceites esenciales, teniendo repercusiones tanto en la planta como en la calidad de los productos finales. De esta forma Chrysargyris y colaboradores en 2020 probaron un compuesto que contenía aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* con una concentración de 1,8 cineol (32,94%) y alcanfor (28,86%). Cuando se hizo la aplicación foliar en plantas y semillas de tomate del producto con aceite esencial se afectaron los atributos relacionados con el crecimiento con un aumento del 19% del crecimiento de la planta con respecto al control. Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas en los parámetros biomasa vegetal y número de hojas (Chrysargyris et al., 2020).

En otra investigación realizada en 2018 se utilizaron suelos pretratados con aceite esencial de *Pimenta racemosa* var *racemosa* quimiotipo 3 con olor a clavo a una concentración de 0,14%. Allí se sembraron plantas de tomate *S. lycopersicum* L. Dichas plantas fueron significativamente más altas que el control (88,8%) y produjeron mayor biomasa de raíces y brotes que las plantas tratadas con aceite esencial al 0,07% y 0,04% y los controles. Además, no se observaron efectos fitotóxicos en las plantas de tomate. Diversos estudios han demostrado que *Ralstonia solanacearum* se protege con bombas de eflujo y degrada enzimáticamente los compuestos que produce la planta para su defensa, sin embargo, la inhibición de la marchitez bacteriana por parte de los aceites esenciales tanto de la investigación de Deberdt como la presente, sugeriría que los compuestos bioactivos de los aceites esenciales son inhibidores o tóxicos para la bacteria y *Ralstonia solanacearum* no podría infectar o diseminarse en el huésped y causar enfermedad debido a la ausencia de una estrategia para evadir dichos compuestos. Diversos estudios demuestran que el modo de acción por el cual los aceites esenciales son bactericidas y bacteriostáticos es que rompen la membrana celular bacteriana aumentando la permeabilidad no

específica, lo que produce una fuga de iones y pérdida extensiva de otros contenidos del microorganismos incluidas las proteínas (Deberdt et al., 2018).

Finalmente, es evidente que los aceites esenciales son de fácil obtención, poseen actividad antimicrobiana contra patógenos como *Ralstonia solanacearum* que afectan cultivos de importancia económica como el tomate, y que tienen la capacidad de inhibir la enfermedad. Además, que su aplicación de manera edáfica puede llevarlos a constituirse en una alternativa promisorio como fitoestimulantes y bioprotectores.

## 6. Conclusiones y recomendaciones.

### 6.1. Conclusiones.

- Inicialmente se resalta que el método de extracción de los aceites esenciales permitió el manejo de grandes volúmenes de material y la determinación de diferentes rendimientos por planta y, determinar cuál componente puede ejercer la función antimicrobiana.
- Por otra parte, se realizó la identificación de los compuestos en cada uno de los aceites esenciales, obteniéndose una gran cantidad de monoterpenos y en menor concentración sesquiterpenos, se identificaron en total en las 10 plantas 59 compuestos. En el caso de *Tagetes lucida* se obtuvieron solamente 6 compuestos (menor cantidad de compuestos identificados para un aceite esencial) y para *Origanum majorana* 28 (mayor cantidad de compuestos para un aceite esencial). Al comparar con diversos autores se evidencia que el compuesto de mayor concentración en la mayoría de las investigaciones no es el mismo que en otras regiones del mundo. Tal evidencia corrobora la importancia de las condiciones edafoclimáticas en las que crece el material vegetal además de las características genéticas que expresa cada una de las plantas y, por lo tanto, la variedad de los compuestos presentes.
- Los diez aceites esenciales presentaban acción antimicrobiana. No obstante, tanto la CMI como la CMB para cada aceites esenciales es diferente contra *Ralstonia solanacearum*. Aún en el aceite siendo el de menor concentración *Cymbopogon* sp.
- Se demuestra que para los aceites esenciales de *Cymbopogon citratus*, *Foeniculum vulgare*, *Lippia alba*, *Origanum* sp., y *Tagetes lucida* la acción antimicrobiana es ejercida hasta 72 horas de crecimiento, lo que permite asegurar que el aceite no se volatiliza.
- Se demostró que el tiempo en el que se sumergen las semillas de tomate en los aceites esenciales influye en la germinación de estas. El tiempo óptimo para evitar daño en las semillas es de un minuto, ya que algunos componentes de los aceites esenciales son alcoholes y fenoles y pueden evitar el desarrollo de las plantas.
- Los diez aceites esenciales aparte de tener acción bactericida y bacteriostática inhiben la presentación de la enfermedad en las plantas (*Solanum lycopersicum* L.) por parte de *Ralstonia solanacearum* en diferentes porcentajes. Para el aceite esencial de *Origanum* sp., el valor fue de 40%.

- Finalmente, se debe tener en cuenta que los aceites esenciales en las concentraciones adecuadas pueden ser utilizados de manera regular como bioestimulantes de plantas, por el tipo de componentes que poseen. Sin embargo, se debe estandarizar su aplicación, en vista de que el exceso de estos puede provocar clorosis en las plantas.
- Con base a los resultados obtenidos, se sugiere que el aceite esencial de *Origanum* sp. destaca como el bioplaguicida más efectivo contra *Ralstonia solanacearum* en comparación con los otros nueve aceites esenciales utilizados. Este AE tiene bajas concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y Concentraciones Mínimas bactericidas (CMB), logrando inhibir el crecimiento del patógeno durante un periodo hasta de 72 horas. Además, se demostró que la aplicación de este aceite esencial resultó en el mayor porcentaje de plantas vivas de *Solanum lycopersicum* después de la infección con el patógeno. Estos resultados respaldan la prometedora capacidad del aceite esencial de *Origanum* sp. como una herramienta efectiva en el control de *Ralstonia solanacearum*

## 6.2. Recomendaciones:

- Realizar la extracción de los aceites esenciales por diferentes métodos para comparar los rendimientos obtenidos.
- Ampliar los espectros de dilución tanto con otro diluyente como con otros microorganismos para determinar si tienen la misma efectividad los aceites esenciales o dependen del metabolismo del patógeno.
- Involucrar en este tipo de estudios técnicas de proteómica y metabolómica para analizar cómo es el modo de acción del aceite esencial al interior del microorganismo que se está estudiando y de esta manera discutir de manera más sólida los resultados de porque los aceites esenciales funcionan como antimicrobianos.
- Realizar estudios con microorganismos no patógenos del suelo para determinar cómo son afectados por los aceites esenciales.

## 7. Referencias

- Abd-Elrahim, R., Tohamy, M. R. A., Atia, M. M., Elashtokhy, M. M. A., & Ali, M. A. S. (2021). Bactericidal activity of some plant essential oils against *Ralstonia solanacearum* infection. *Saudi Journal of Biological Sciences*, S1319562X21010111. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.11.045>
- Abuhlega, T. A., Mohamed, A., & Tawfik, A. (2018). Yield and chemical composition of the essential oils extracted from marjoram (*Majorana hortensis*), peppermint (*Mentha piperita*) and Thyme (*Thymus capitatus*). *The Libyan Journal of Agriculture*, 23(1-2), 16.
- Acero Godoy, J., Guzmán-Hernández, T. de J., Sánchez Leal, L. C., Sánchez Mora, R. M., Cruz Blanco, G. N., Delgado Ávila, W. A., & Gil Archila, E. (2020). Efecto de los aceites esenciales de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (limonaria) y *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. Ex Britton & P. Wilson (pronto alivio) sobre *Xanthomonas axonopodis* y *Ralstonia* sp. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 25(4), 1-14.
- Acero-Godoy, J., Guzmán-Hernández, T., & Muñoz-Ruíz, C. (2019). Revisión documental de uso de los aceites esenciales obtenidos de *Lippia alba* (Verbenaceae), como alternativa antibacteriana y antifúngica. *Revista tecnología en marcha*, g 3-11. <https://doi.org/10.18845/tm.v32i1.4114>
- Adams, R. (2007). *Identification of essential oils components by Gas Chromatography/mass spectrometry* (4th edition, Vol. 1). Allured Pub Corp.
- Al-Asmari, A. K., Athar, M. T., Al-Faraidy, A. A., & Almuhaiza, M. S. (2017). Chemical composition of essential oil of *Thymus vulgaris* collected from Saudi Arabian market. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(2), Article 2. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.11.023>
- Alexa, E., Sumalan, R., Danciu, C., Obistioiu, D., Negrea, M., Poiana, M.-A., Rus, C., Radulov, I., Pop, G., & Dehelean, C. (2018). Synergistic antifungal, allelopathic and anti-proliferative



- potential of *Salvia officinalis* L., and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Molecules*, 23(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/molecules23010185>
- Alonso-Gato, M., Astray, G., Mejuto, J. C., & Simal-Gandara, J. (2021). Essential oils as antimicrobials in crop protection. *Antibiotics*, 10(1), 34. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10010034>
- Ambrosio, C. M. S., de Alencar, S. M., de Sousa, R. L. M., Moreno, A. M., & Da Gloria, E. M. (2017). Antimicrobial activity of several essential oils on pathogenic and beneficial bacteria. *Industrial Crops and Products*, 97, 128-136. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.11.045>
- Anaya-Gutiérrez, E. J., Gutiérrez, J., Serrato-Cruz, M. A., & Vázquez-Sánchez, M. (2022). Anatomía foliar de nueve especies de *Tagetes* L. (Tageteae: Asteraceae). *Botanical sciences*, 100(3), 667-684.
- AOAC. (1995). *Official methods of analysis* (15.<sup>a</sup> ed., Vol. 1). AOAC Inc. <https://law.resource.org/pub/us/cfr/ibr/002/aoac.methods.1.1990.pdf>
- Arruda da Cunha, J., de Ávila Scheeren, C., Pedroso Fausto, V., Willrich de Melo, L. D., Henneman, B., Piccinin Frizzo, C., de Almeida Vaucher, R., Castagna de Vargas, A., & Baldisserotto, B. (2018). The antibacterial and physiological effects of pure and nanoencapsulated *Origanum majorana* essential oil on fish infected with *Aeromonas hydrophila*. *Microbial Pathogenesis*, 124, 116-121. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.040>
- Aslam, M. N., Mukhtar, T., Hussain, M. A., & Raheel, M. (2017). Assessment of resistance to bacterial wilt incited by *Ralstonia solanacearum* in tomato germplasm. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 124(6), 585-590. <https://doi.org/10.1007/s41348-017-0100-1>

- Aular, Y., Villamizar, M., Pérez, Y., & Pérez, V. (2016). Composición química y toxicidad aguda oral del aceite esencial de *Lippia alba* en ratones. *Salus*, 20(1), Article 1.
- Aziz, Z. A. A., Ahmad, A., Setapar, S. H. M., Karakucuk, A., Azim, M. M., Lokhat, D., Rafatullah, Mohd., Ganash, M., Kamal, M. A., & Ashraf, G. M. (2018). Essential oils: Extraction techniques, pharmaceutical and therapeutic potential - A review. *Current Drug Metabolism*, 19(13), Article 13. <https://doi.org/10.2174/1389200219666180723144850>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibensouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Baroukh, C., Zemouri, M., & Genin, S. (2022). Trophic preferences of the pathogen *Ralstonia solanacearum* and consequences on its growth in xylem sap. *Microbiology Open*, 11(1), 14. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1240>
- Basim, H., Turgut, K., Kaplan, B., Basim, E., & Turgut, A. (2019). The potential application of *Origanum dubium* boiss. Essential oil as a seed protectant against bean and tomato seed-borne bacterial pathogens. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus*, 18(3), 79-86.
- Ben Kaab, S., Rebey, I. B., Hanafi, M., Berhal, C., Fauconnier, M. L., De Clerck, C., Ksouri, R., & Jijakli, H. (2019). *Rosmarinus officinalis* essential oil as an effective antifungal and herbicidal agent. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 17(2), Article 2. <https://doi.org/10.5424/sjar/2019172-14043>
- Benedec, D., Oniga, I., Cuibus, F., Sevastre, B., Stiufiuc, G., Duma, M., Hanganu, D., Iacovita, C., Stiufiuc, R., & Lucaciu, C. M. (2018). *Origanum vulgare* mediated green synthesis of biocompatible gold nanoparticles simultaneously possessing plasmonic, antioxidant and antimicrobial properties. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 13, 1041-1058. <https://doi.org/10.2147/IJN.S149819>

- Betancourt, L., Phandanavong Lozano, V., Patiño, R., Ariza Nieto, C., & German, A. T. (2012). Composition and bacterial activity against beneficial and pathogenic bacteria of oregano essential oils from four chemotypes *Origanum* and *Lippia* genus. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 59(12), Article 12.
- Borges, R. S., Ortiz, B. L. S., Pereira, A. C. M., Keita, H., & Carvalho, J. C. T. (2019). *Rosmarinus officinalis* essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. *Journal of Ethnopharmacology*, 229, 29-45. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.09.038>
- Božović, M., Navarra, A., Garzoli, S., Pepi, F., & Ragno, R. (2017). Essential oils extraction: A 24-hour steam distillation systematic methodology. *Natural Product Research*, 31(20), Article 20. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1309534>
- Burbano E., E., & Vallejo Cabrera, F. A. (2017). Producción de líneas de tomate “chonto,” *Solanum lycopersicum* Mill., con expresión del gen *sp* responsable del crecimiento determinado. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.17584/rcch.2017v11i1.5786>
- Caballero-Gallardo, K., Quintero-Rincón, P., Stashenko, E. E., & Olivero-Verbel, J. (2022). Photoprotective agents obtained from aromatic plants grown in Colombia: Total phenolic content, antioxidant activity, and assessment of cytotoxic potential in cancer cell lines of *Cymbopogon flexuosus* L. and *Tagetes lucida* Cav. essential oils. *Plants*, 11(13), 1693. <https://doi.org/10.3390/plants11131693>
- Cámara de comercio Bogotá. (2015). *Manual de Tomate* (Manual N.º 1; Número 1, p. 56). <https://bibliotecadigital.ccb.org.co/handle/11520/14307>
- Ceballos, G., Álvarez, E., & Bolaños, M. M. (2014). Reducción de poblaciones de *Ralstonia solanacearum* raza 2 (Smith) en plátano (Musa AAB Simmonds) con aplicación de

- extractos de *Trichoderma* sp. (Alexopoulos y Mims) y bacterias antagonistas. *Acta Agronómica*, 63(1), Article 1. <https://doi.org/10.15446/acag.v63n1.43121>
- Chang, Y., Harmon, P. F., Treadwell, D. D., Carrillo, D., Sarkhosh, A., & Brecht, J. K. (2022). Biocontrol potential of essential oils in organic horticulture systems: From farm to fork. *Frontiers in Nutrition*, 8, 805138. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.805138>
- Chen, J., Yu, Y., Li, S., & Ding, W. (2016). Resveratrol and coumarin: Novel agricultural antibacterial agent against *Ralstonia solanacearum* *In vitro* and *in vivo*. *Molecules*, 21(1501), Article 1501.
- Chen, N., Shao, Q., & Xiong, Z. (2023). Isolation and characterization of a pathogenesis-related protein 1 (SIPR1) gene with induced expression in tomato (*Solanum lycopersicum*) during *Ralstonia solanacearum* infection. *Gene*, 855, 147105. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.147105>
- Chrysargyris, A., Charalambous, S., Xylia, P., Litskas, V., Stavrinides, M., & Tzortzakis, N. (2020). Assessing the biostimulant effects of a novel plant-based formulation on tomato crop. *Sustainability*, 12(20), Article 20. <https://doi.org/10.3390/su12208432>
- Corral, J., Sebastià, P., Coll, N. S., Barbé, J., Aranda, J., & Valls, M. (2020). Twitching and Swimming Motility Play a Role in *Ralstonia solanacearum* Pathogenicity. *mSphere*, 5(2), Article 2. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00740-19>
- Coy Barrera, C. A., & Acosta, G. E. (2013). Actividad antibacteriana y determinación de la composición química de los aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y cúrcuma (*Curcuma longa*) de Colombia. *Revista Cubana de plantas medicinales*, 18(2), Article 2.
- Cruz Almeida, E. T., Souza, G. T., Sousa Guedes, J. P., Medeiros Barbosa, I., de Sousa, C., Cançado Castellano, L. R., Magnani, M., & Leite de Souza, E. (2019). *Mentha piperita* L.

- essential oil inactivates spoilage yeasts in fruit juices through the perturbation of different physiological functions in yeast cells. *Food Microbiology*, 82, 20-29.  
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.01.023>
- DANE. (2022). *Sistema de información de precios y abastecimiento del sector agropecuario (SIPSA)* [Gubernamental]. DANE, Información para todos.  
<https://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/agropecuario/sistema-de-informacion-de-precios-sipsa>
- Deberdt, P., Davezies, I., Coranson-Beaudu, R., & Jestin, A. (2018). Efficacy of leaf oil from *Pimenta racemosa* var. *Racemosa* in controlling bacterial wilt of tomato. *Plant Disease*, 102(1), Article 1. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-17-0593-RE>
- Dègnon, R. G., Allagbé, A. C., Adjou, E. S., & Dahouenon-Ahoussi, E. (2019). Antifungal activities of *Cymbopogon citratus* essential oil against *Aspergillus* species isolated from fermented fish products of Southern Benin. *Journal of Food Quality and Hazards Control*, 6, 53-57.  
<https://doi.org/10.18502/jfqhc.6.2.955>
- Delgado Ospina, J., Grande Tovar, C. D., Menjivar Flores, J. C., & Sánchez Orozco, M. S. (2016). Relationship between refractive index and Thymol concentration in essential oils of *Lippia origanoides* Kunth. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*, 32(2), Article 2.  
<https://doi.org/10.4067/S0719-38902016000200006>
- Della Pepa, T., Elshafie, H. S., Capasso, R., De Feo, V., Camele, I., Nazzaro, F., Scognamiglio, M. R., & Caputo, L. (2019). Antimicrobial and phytotoxic activity of *Origanum heracleoticum* and *O. majorana* essential oils growing in Cilento (Southern Italy). *Molecules*, 24(14), Article 14. <https://doi.org/10.3390/molecules24142576>

- Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., & Mnif, W. (2016). Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines*, 3(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/medicines3040025>
- El-Hefny, M., Mohamed, A. A., Salem, M. Z. M., Abd El-Kareem, M. S. M., & Ali, H. M. (2018). Chemical composition, antioxidant capacity and antibacterial activity against some potato bacterial pathogens of fruit extracts from *Phytolacca dioica* and *Ziziphus spina-christi* grown in Egypt. *Scientia Horticulturae*, 233, 225-232. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.01.046>
- Elyemni, M., Louaste, B., Nechad, I., Elkamli, T., Bouia, A., Taleb, M., Chaouch, M., & Eloutassi, N. (2019). Extraction of essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. by two different methods: Hydrodistillation and microwave assisted hydrodistillation. *The scientific world journal*, 2019, 3659432. <https://doi.org/10.1155/2019/3659432>
- EPPO. (2018). *Ralstonia solanacearum*; *R. pseudosolanacearum* and *R. syzygii* (*Ralstonia solanacearum* species complex). *European and Mediterranean Plant Protection Organization*, 48(1), Article 1. <https://doi.org/10.1111/epp.12454>
- FAO. (2022). FAOSTAT. FAOSTAT. <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL>
- Fikry, S., Khalil, N., & Salama, O. (2019). Chemical profiling, biostatic and biocidal dynamics of *Origanum vulgare* L. essential oil. *AMB Express*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0764-y>
- García, R. O., Kerns, J. P., & Thiessen, L. (2019). *Ralstonia solanacearum* Species complex: A quick diagnostic guide. *Plant Health Progress*, 20(1), 7-13. <https://doi.org/10.1094/PHP-04-18-0015-DG>
- García-Cuellar, Y. P., Díaz-Núñez, A., Lineth, L., Brango, J., Castaño, J. C., & Maldonado, J. I. (2014). Artículo de estudio fitoquímico preliminar y de actividad antimicrobiana de

- Investigación la especie *Lippia alba* originaria del Piedemonte Amazónico. *Momentos de ciencia*, 11(2), Article 2.
- García-Torcoroma, L., Leal, A. F., Moreno, É. M., Stashenko, E. E., & Arteaga, H. J. (2017). Differential anti-proliferative effect on K562 leukemia cells of *Lippia alba* (Verbenaceae) essential oils produced under diverse growing, collection and extraction conditions. *Industrial Crops and Products*, 96, 140-148. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.11.057>
- Gedikoğlu, A., Sökmen, M., & Çivit, A. (2019). Evaluation of *Thymus vulgaris* and *Thymbra spicata* essential oils and plant extracts for chemical composition, antioxidant, and antimicrobial properties. *Food Science & Nutrition*, 7(5), Article 5. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1007>
- Gerszberg, A., Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T., & Kononowicz, A. K. (2015). Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 120(3), 881-902. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0664-4>
- Ghasemian, A., Al-Marzoqi, A.-H., Mostafavi, S. K. S., Alghanimi, Y. K., & Teimouri, M. (2020). Chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of *Foeniculum vulgare* Mill essential oils. *Journal of Gastrointestinal Cancer*, 51(1), Article 1. <https://doi.org/10.1007/s12029-019-00241-w>
- Glamočlija, J., Soković, M., Tesević, V., Linde, G. A., & Colauto, N. B. (2011). Chemical characterization of *Lippia alba* essential oil: An alternative to control green molds. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(4), Article 4. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000400041>
- Granados, C., Yáñez, X., & Acevedo, D. (2014). Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial *Myrcianthes leucoxyla* de Norte de Santander (Colombia). *Información tecnológica*, 25(3), Article 3. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642014000300003>

- Guzmán, A., Antunéz, A., Corradini, F., Riquelme, J., Martínez, J. P., Salinas, L., Allende, M., Olivares, N., Abarca, P., Sepulveda, P., & Felmer, S. (2017). *Manual de cultivo del Tomate al aire libre* (Boletín N.º 376; Número 376, p. 96). INDAP.
- Han, S., Yang, L., Wang, Y., Ran, Y., Li, S., & Ding, W. (2021). Preliminary studies on the antibacterial mechanism of a new plant-derived compound, 7-Methoxycoumarin, against *Ralstonia solanacearum*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 697911. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.697911>
- Hosseinzadeh, S., Shams-Bakhsh, M., & Hosseinzadeh, E. (2013). Effects of sub-bactericidal concentration of plant essential oils on pathogenicity factors of *Ralstonia solanacearum*. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, 46(6), 643-655. <https://doi.org/10.1080/03235408.2012.749698>
- Hussein, J. H., Mohammed, Y. H., & Imad, H. H. (2016). Study of chemical composition of *Foeniculum vulgare* using fourier transform infrared spectrophotometer and gas chromatography—Mass spectrometry. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 8(3), Article 3. <https://doi.org/10.5897/JPP2015.0372>
- Huttner, A., Harbarth, S., Carlet, J., Cosgrove, S., Goossens, H., Holmes, A., Jarlier, V., Voss, A., Pittet, D., & for the World Healthcare-Associated Infections Forum participants. (2013). Antimicrobial resistance: A global view from the 2013 World Healthcare-Associated Infections forum. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 2(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/2047-2994-2-31>
- Jahangeer, M., Fatima, R., Ashiq, M., Basharat, A., Qamar, S. A., Bilal, M., & Iqbal, H. M. N. (2021). Therapeutic and biomedical potentialities of terpenoids – A review. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.22207/JPAM.15.2.04>



- Kachur, K., & Suntres, Z. (2020). The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(18), Article 18. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1675585>
- Kalleli, F., Rebey, I. B., Wannas, W. A., Boughalleb, F., Hammami, M., Tounsi, M. S., & M'hamdi, M. (2019). Chemical composition and antioxidant potential of essential oil and methanol extract from Tunisian and French fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds. *Journal of Food Biochemistry*, 43(8), Article 8. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12935>
- Kamari, F. E., Taroq, A., Atki, Y. E., Aouam, I., Oumokhtar, B., Lyoussi, B., & Abdellaoui, A. (2018). *Cymbopogon Nardus* L. Essential oil: Phytochemical screening and its antibacterial activity against clinical bacteria responsible for nosocomial infections in neonatal intensive care. *International Journal Pharmaceutical Science Review and Research*, 50(03), Article 03.
- Kamsu, N. P., Tchinda, S. E., Tchameni, N. S., Jazet, D. P. M., Madjouko, M. A., Youassi Youassi, O., Sameza, M. L., Tchoumboungang, F., & Menut, C. (2019). Antifungal activities of essential oils of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) and lemongrass (*Cymbopogon citratus*) on crown rot pathogens of banana. *Indian Phytopathology*, 72(1), Article 1. <https://doi.org/10.1007/s42360-018-0104-1>
- Kumar, M., Tomar, M., Bhuyan, D. J., Punia, S., Grasso, S., Sá, A. G. A., Carciofi, B. A. M., Arrutia, F., Changan, S., Radha, Singh, S., Dhumal, S., Senapathy, M., Satankar, V., Anitha, T., Sharma, A., Pandiselvam, R., Amarowicz, R., & Mekhemar, M. (2021). Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seed: A review on bioactives and biomedical activities. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 142, 112018. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112018>

- Lee, Y.-H., Choi, C.-W., Kim, S.-H., Yun, J.-G., Chang, S.-W., Kim, Y.-S., & Hong, J.-K. (2012). Chemical pesticides and plant essential oils for disease control of tomato bacterial wilt. *The Plant Pathology Journal*, 28(1), 32-39. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.10.2011.0200>
- León-Méndez, G., Pájaro-Castro, N., Pájaro-Castro, E., Torrenegra-Alarcón, M., & Herrera-Barros, A. (2019). Essential oils as a source of bioactive molecules. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 48(1), 80-93. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v48n1.80067>
- Li, C.-M., & Yu, J.-P. (2015). Chemical composition, antimicrobial activity and mechanism of action of essential oil from the leaves of *Macleaya Cordata* (Willd.) R. Br: Antibacterial mechanism of *M. Cordata*. *Journal of Food Safety*, 35(2), 227-236. <https://doi.org/10.1111/jfs.12175>
- Li, S., Yu, Y., Chen, J., Guo, B., Yang, L., & Ding, W. (2016). Evaluation of the antibacterial effects and mechanism of action of protocatechualdehyde against *Ralstonia solanacearum*. *Molecules*, 21(6), 754. <https://doi.org/10.3390/molecules21060754>
- Linde, G. A., Colauto, N. B., Albertó, E., & Gazim, Z. C. (2016). Quimiotipos, extracción, composición y aplicaciones del aceite esencial de *Lippia alba*. *Revista Brasileira de plantas medicinais*, 18(1), Article 1. [https://doi.org/10.1590/1983-084X/15\\_037](https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_037)
- López Marín, L. M. (2017). *Manual técnico del cultivo del tomate Solanum lycopersicum* (1.ª ed., Vol. 1). INTA. <https://repositorio.iica.int/bitstream>
- Machiani, M. A., Javanmard, A., Morshedloo, M. R., & Maggi, F. (2018). Evaluation of yield, essential oil content and compositions of peppermint (*Mentha piperita* L.) intercropped with faba bean (*Vicia faba* L.). *Journal of Cleaner Production*, 171, 529-537. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.10.062>

- Macías-Camacho, T., Retana-Ugalde, R., Legorreta-Herrera, M., Ruiz-Ramos, M., & Mendoza-Núñez, V. M. (2021). Mouthwash with *Tagetes lucida* Cav. For control of chronic periodontitis in older adults. *Sustainability*, 13(4), 1650. <https://doi.org/10.3390/su13041650>
- Manickam, R., Chen, J.-R., Sotelo-Cardona, P., Kenyon, L., & Srinivasan, R. (2021). Evaluation of different bacterial wilt resistant eggplant rootstocks for grafting tomato. *Plants*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/plants10010075>
- Mao, G.-F., Mo, X.-C., Fouad, H., Abbas, G., & Mo, J.-C. (2018). Attraction behavior of *Anagrus nilaparvatae* to remote lemongrass (*Cymbopogon distans*) oil and its volatile compounds. *Natural Product Research*, 32(5), Article 5. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1326486>
- Matos, S. P., Teixeira, H. F., de Lima, Á. A. N., Veiga-Junior, V. F., & Koester, L. S. (2019). Essential oils and isolated terpenes in nanosystems designed for topical administration: A review. *Biomolecules*, 9(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/biom9040138>
- Mehdizadeh, L., Najafgholi, H. M., Biouki, R. Y., & Moghaddam, M. (2018). Chemical composition and antimicrobial activity of *Origanum vulgare* subsp. *Viride* essential oils Cultivated in two different regions of Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 21(4), Article 4. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2018.1491329>
- Mirmostafae, S., Azizi, M., & Fujii, Y. (2020). Study of allelopathic interaction of essential oils from medicinal and aromatic plants on seed germination and seedling growth of lettuce. *Agronomy*, 10(2), 163. <https://doi.org/10.3390/agronomy10020163>
- Moghaddam, M., & Mehdizadeh, L. (2017). Chemistry of essential oils and factors influencing their constituents. En *Soft chemistry and food fermentation* (pp. 379-419). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811412-4.00013-8>

- Mohamed, A. A., Behiry, S. I., Younes, H. A., Ashmawy, N. A., Salem, M. Z. M., Márquez-Molina, O., & Barbabosa-Pilego, A. (2019). Antibacterial activity of three essential oils and some monoterpenes against *Ralstonia solanacearum* phylotype II isolated from potato. *Microbial Pathogenesis*, 135, 103604. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103604>
- Mohammed, A. F., Oloyede, A. R., & Odeseye, A. O. (2020). Biological control of bacterial wilt of tomato caused by *Ralstonia solanacearum* using *Pseudomonas* species isolated from the rhizosphere of tomato plants. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 1-16. <https://doi.org/10.1080/03235408.2020.1715756>
- Moradi, S., Fazlali, A., & Hamed, H. (2018). *Microwave-Assisted Hydro-Distillation of Essential Oil from Rosemary: Comparison with Traditional Distillation* (N.º 1). 10(1), Article 1.
- Moumni, M., Allagui, M. B., Mezrioui, K., Ben Amara, H., & Romanazzi, G. (2021). Evaluation of seven essential oils as seed treatments against seedborne fungal pathogens of *Cucurbita maxima*. *Molecules*, 26(8), 2354. <https://doi.org/10.3390/molecules26082354>
- Muñoz Acevedo, A., Castañeda, M., Blanco, K., Cardenas, C., Reyes, J., Kouznetsov, V., & Stashenko, E. (2007). Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol. *Scientia Et Technica*, XIII(33), Article 33.
- Muñoz, J. A., Stashenko, E., & Ocampo, C. B. (2014). Actividad insecticida de aceites esenciales de plantas nativas contra *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista colombiana de entomología*, 40(2), Article 2.
- Murti, R. H., Afifah, E. N., & Nuringtyas, T. R. (2021). Metabolomic response of tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) against bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) using 1H-NMR spectroscopy. *Plants*, 10(6), 1143. <https://doi.org/10.3390/plants10061143>

- Nardoni, S., Najar, B., Fronte, B., Pistelli, L., & Mancianti, F. (2019). *In vitro* activity of essential oils against *Saprolegnia parasitica*. *Molecules*, 24(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/molecules24071270>
- Ngom, S., Perez, R., Mbow, M., Fall, R., Niassy, S., Cosoveanu, A., Diop, S., Ndiaye, E. H., Diop, M., & Lognay, G. (2018). Larvicidal activity of neem oil and three plant essential oils from Senegal against *Chrysodeixis chalcites* (Esper, 1789). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.4103/2221-1691.221140>
- Oliveira, R., Martinazzo, P., & Teodoro, C. E. (2022). Alternative control of phytopathogenic bacteria with essential oils of *Elionurus latiflorus* and *Cymbopogon flexuosus*. *Ciência e Natura*, 44(25), 27. <https://doi.org/10.5902/2179460X67338>
- Olivero-Verbel, J., Nerio, L. S., & Stashenko, E. E. (2010). Bioactivity against *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae) of *Cymbopogon citratus* and *Eucalyptus citriodora* essential oils grown in Colombia. *Pest Management Science*, 66(6), Article 6. <https://doi.org/10.1002/ps.1927>
- Opondo, F., Odhiambo, I., Chepkwony, S., & Kosgei, V. (2022). *In vitro* antibacterial activity of essential oils from *Tithonia diversifolia* Leaves and Flowers Against *Ralstonia Solanacearum*. *European Journal of Applied Sciences*, 10(2), 524-539. <https://doi.org/10.14738/aivp.102.12172>
- Orchard, A., & van Vuuren, S. (2017). Commercial essential oils as potential antimicrobials to treat skin diseases. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 1-92. <https://doi.org/10.1155/2017/4517971>
- Ortiz de Elguea-Culebras, G., Sánchez-Vioque, R., Berruga, M. I., Herraiz-Peñalver, D., González-Coloma, A., Andrés, M. F., & Santana-Méridas, O. (2018). Biocidal Potential and Chemical composition of industrial essential oils from *Hyssopus officinalis*, *Lavandula*

- × *intermedia* var. SUPER , and *Santolina chamaecyparissus*. *Chemistry & Biodiversity*, 15(1), Article 1. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201700313>
- Orzali, L., Valente, M. T., Scala, V., Loreti, S., & Pucci, N. (2020). Antibacterial activity of essential oils and *Trametes versicolor* extract against *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* and *Ralstonia solanacearum* for Seed treatment and development of a rapid in vivo assay. *Antibiotics*, 9(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9090628>
- Passos Braga, S., Alencar Lundgren, G., Alves Macedo, S., Fachine Tavares, J., dos Santos Vieira, W. A., Saraiva Câmara, M. P., & Leite de Souza, E. (2019). Application of coatings formed by chitosan and *Mentha* essential oils to control anthracnose caused by *Colletotrichum gloesporioides* and *C. brevisporum* in papaya (*Carica papaya* L.) fruit. *International Journal of Biological Macromolecules*, 139, 631-639. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.010>
- Perczak, A., Gwiazdowska, D., Gwiazdowski, R., Juś, K., Marchwińska, K., & Waśkiewicz, A. (2020). The inhibitory potential of selected essential oils on *Fusarium* spp. Growth and mycotoxins biosynthesis in maize seeds. *Pathogens*, 9(23), 16. <https://doi.org/doi:10.3390/pathogens9010023>
- Pérez Zamora, C., Torres, C., & Nuñez, M. (2018). Antimicrobial Activity and Chemical Composition of Essential Oils from Verbenaceae Species Growing in South America. *Molecules*, 23(3), 544. <https://doi.org/10.3390/molecules23030544>
- Prasad, M. R., Sagar, B. V., Devi, G. U., Triveni, S., Rao, S. R. K., & Chari, K. D. (2017). Isolation and screening of bacterial and fungal isolates for plant growth-promoting properties from tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(8), Article 8. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.608.096>

- Puigvert, M., Sebastià, P., Macho, A. P., Monteiro, J. S., Coll, N. S., Setúbal, J. C., Valls, M., & Jove, P. (2021). Dynamic expression of *Ralstonia solanacearum* virulence factors and metabolism-controlling genes during plant infection. *BMC Genomics*, 22(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07457-w>
- Purnavab, S., Ketabchi, S., & Rowshan, V. (2015). Chemical composition and antibacterial activity of methanolic extract and essential oil of Iranian *Teucrium polium* against some of phyto-bacteria. *Natural Product Research*, 29(14), 1376-1379. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.1000320>
- Ralambondrainy, M., Belarbi, E., Viranaicken, W., Baranauskienė, R., Venskutonis, P. R., Desprès, P., Roques, P., El Kalamouni, C., & Sélambarom, J. (2018). *In vitro* comparison of three common essential oils mosquito repellents as inhibitors of the Ross River virus. *PLOS ONE*, 13(5), Article 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196757>
- Ramírez, L. E., & Marín Castaño, D. (2009). Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, XV(42), Article 42.
- Ramírez-Mancilla, R., Mora-Vivas, F., Domínguez-Guerrero, I., Fermín, L., Ramírez-Méndez, W., & Peña-Albornoz, J. (2019). Actividad larvívica de los aceites esenciales de *Minthostachys mollis* y *Lepechinia bullata* contra *Tecia solanivora* Povolny. *Revista de la Facultad de farmacia*, 61(1), 19-24.
- Ramos da Silva, L. R., Ferreira, O. O., Cruz, J. N., de Jesus Pereira Franco, C., Oliveira dos Anjos, T., Cascaes, M. M., Almeida da Costa, W., Helena de Aguiar Andrade, E., & Santana de Oliveira, M. (2021). Lamiaceae Essential Oils, Phytochemical Profile, Antioxidant, and Biological Activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, 1-18. <https://doi.org/10.1155/2021/6748052>

- Reyes-Jurado, F. (2014). Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 8(1), 68-78.
- Rkhaila, A., Saga, M., Grohs, S. G., & Ounine, K. (2021). *In vitro* inhibition attempts and bio-elicitation of *Solanum lycopersicum* L. by chitin and chitosan against *Ralstonia solanacearum*, the causal agent of bacterial wilt. *Agronomía Colombiana*, 39(3), 355-363. <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v39n3.97746>
- Rodrigues Fernandes, V., Magalhães Brandão, R., Freitas, M., Aparecida Saczk, A., Silva Felix, F., Silla, J., Teixeira, M. L., & Das Graças Cardoso, M. (2019). Colorimetric, electroanalytical and theoretical evaluation of the antioxidant activity of *Syzygium aromaticum* L., *Origanum vulgare* L., *Mentha spicata* L. and *Eremanthus erythropappus* M. essential oils, and their major constituents. *New Journal of Chemistry*, 43, 7653-7662.
- Roldán, L. P., Díaz, G. J., & Durringer, J. M. (2010). Composition and antibacterial activity of essential oils obtained from plants of the Lamiaceae family against pathogenic and beneficial bacteria. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 23, 451-461.
- Rosato, A., Carocci, A., Catalano, A., Clodoveo, M. L., Franchini, C., Corbo, F., Carbonara, G. G., Carrieri, A., & Fracchiolla, G. (2018). Elucidation of the synergistic action of *Mentha piperita* essential oil with common antimicrobials. *PLOS ONE*, 13(8), Article 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200902>
- Rueda-Puente, E. O., Juvera Bracamontes, J. J., Romo López, I. G., & Holguín Peña, R. J. (2018). Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales de orégano y tomillo contra *Ralstonia solanacearum*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 20, Article 20. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i20.995>



- Ruíz-Rico, M., Pérez-Esteve, É., Bernardos, A., Sancenón, F., Martínez-Máñez, R., Marcos, M. D., & Barat, J. M. (2017). Enhanced antimicrobial activity of essential oil components immobilized on silica particles. *Food Chemistry*, 233, 228-236. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.118>
- Safni, I., Cleenwerck, I., De Vos, P., Fegan, M., Sly, L., & Kappler, U. (2014). Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: Proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *Syzygii* subsp. *Nov.*, *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *Indonesiensis* subsp. *Nov.*, banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *Celebesensis* subsp. *Nov.* And *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. *Nov.* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(Pt\_9), Article Pt\_9. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.066712-0>
- Salehi, B., Valussi, M., Morais-Braga, M., Carneiro, J., Leal, A., Coutinho, H., Vitalini, S., Kręgiel, D., Antolak, H., Sharifi-Rad, M., Silva, N., Yousaf, Z., Martorell, M., Iriti, M., Carradori, S., & Sharifi-Rad, J. (2018). *Tagetes* spp. Essential oils and other extracts: Chemical characterization and biological activity. *Molecules*, 23(11), 2847. <https://doi.org/10.3390/molecules23112847>
- Sánchez-Humala, R., Ruiz-Briceño, A. M., Ruiz-Burneo, C. G., Ruiz-Castro, G. M., Sairitupac-Paredes, D. R., Aguirre, L. G., Salazar-Granara, A., & Loja-Herrera, B. (2017). Actividad antioxidante y marcha fitoquímica de los capítulos de *Tagetes filifolia* Lag. «pacha anís». *Horizonte Médico (Lima)*, 17(1), Article 1. <https://doi.org/10.24265/horizmed.2017.v17n1.04>

- Santos, N., Pascon, R., Vallim, M., Figueiredo, C., Soares, M., Lago, J., & Sartorelli, P. (2016). Cytotoxic and antimicrobial constituents from the essential oil of *Lippia alba* (Verbenaceae). *Medicines*, 3(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/medicines3030022>
- Saroj, A., Chanotiya, C. S., Maurya, R., Pragadheesh, V. S., Yadav, A., & Samad, A. (2019). Antifungal action of *Lippia alba* essential oil in *Rhizoctonia solani* disease management. *SN Applied Sciences*, 1(10), Article 10. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1207-8>
- Shabani, B., Rezaei, R., Charehgani, H., & Salehi, A. (2019). Study on antibacterial effect of essential oils of six plant species against *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* Van Hall 1902 and *Pseudomonas fluorescens* Migula 1894. *Journal of Plant Pathology*, 101(3), Article 3. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00266-x>
- Shankar, S., Prasad, S., Owaiz, M., Yadav, S., Manhas, S., & Yaqoob, M. (2021). Essential oils, components and their applications: A review. *Plant Archives*, 21(Suppliment-1), Article Suppliment-1. <https://doi.org/10.51470/PLANTARCHIVES.2021.v21.S1.331>
- Sharifi-Rad, J., Sureda, A., Tenore, G., Daglia, M., Sharifi-Rad, M., Valussi, M., Tundis, R., Sharifi-Rad, M., Loizzo, M., Ademiluyi, A., Sharifi-Rad, R., Ayatollahi, S., & Iriti, M. (2017). Biological activities of essential oils: From plant chemoecology to traditional healing systems. *Molecules*, 22(1), 70. <https://doi.org/10.3390/molecules22010070>
- Shekhar Solankey, S., & Shamim, M. (2022). *Biotic stress management in tomato biotechnological approaches* (First edition, Vol. 1). Apple Academic Press Inc. [https://www.researchgate.net/profile/Raja-Husain-2/publication/351903184\\_molecular\\_approaches\\_for\\_multiple\\_genes/60b5bcaa92851cd e88470cd](https://www.researchgate.net/profile/Raja-Husain-2/publication/351903184_molecular_approaches_for_multiple_genes/60b5bcaa92851cd e88470cd)

- Silva, A. C. C., Barbosa, F. G., Mafezoli, J., Oliveira, M. da C. F., & de Oliveira, T. F. (2016). HS-SPME as an efficient tool for discriminating chemotypes of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. *Química Nova*. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20160156>
- Silva-Flores, P. G., Pérez-López, L. A., Rivas-Galindo, V. M., Paniagua-Vega, D., Galindo-Rodríguez, S. A., & Álvarez-Román, R. (2019). Simultaneous GC-FID quantification of main components of *Rosmarinus officinalis* L. and *Lavandula dentata* essential oils in polymeric nanocapsules for antioxidant application. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2019, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2019/2837406>
- Singh, P., & Pandey, A. K. (2018). Prospective of essential oils of the genus *Mentha* as Biopesticides: A Review. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1295. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01295>
- Soares, B. V., Neves, L. R., Ferreira, D. O., Oliveira, M. S. B., Chaves, F. C. M., Chagas, E. C., Gonçalves, R. A., & Tavares-Dias, M. (2017). Antiparasitic activity, histopathology and physiology of *Colossoma macropomum* (tambaqui) exposed to the essential oil of *Lippia sidoides* (Verbenaceae). *Veterinary Parasitology*, 234, 49-56. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.12.012>
- Sonam Chouhan, Kanika Sharma, & Sanjay Guleria. (2017). Antimicrobial activity of some essential oils—Present status and future perspectives. *Medicines*, 4(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/medicines4030058>
- Souri, M. K., & Bakhtiarizade, M. (2019). Biostimulation effects of rosemary essential oil on growth and nutrient uptake of tomato seedlings. *Scientia Horticulturae*, 243, 472-476. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.08.056>
- Sousa Barros, A., Morais, S. M., Ferreira, P. A. T., Vieira, Í. G. P., Craveiro, A. A., dos Santos Fontenelle, R. O., de Menezes, J. E. S. A., da Silva, F. W. F., & de Sousa, H. A. (2015).

- Chemical composition and functional properties of essential oils from *Mentha* species. *Industrial Crops and Products*, 76, 557-564. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.004>
- Souza, R. C., Costa, M. M., Baldisserotto, B., Heinzmann, B. M., Schmidt, D., Caron, B. O., & Copatti, C. E. (2017). Antimicrobial and synergistic activity of essential oils of *Aloysia triphylla* and *Lippia alba* against *Aeromonas* spp. *Microbial Pathogenesis*, 113, 29-33. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.10.013>
- Spriha, K., & Rattandeeep, S. (2021). Lemongrass a Wonder Herb of Poaceae Family: An Overview. *Biological Forum—an International Journal*, 13(2), 298-308.
- Sreedevi, S., Nanu Remani, K., & Benjamin, S. (2013). Biotic stress induced biochemical and isozyme variations in ginger and tomato by *Ralstonia solanacearum*. *American Journal of Plant Sciences*, 04(08), Article 08. <https://doi.org/10.4236/ajps.2013.48194>
- Stashenko, E. E., Martínez, J. R., Durán, D. C., Córdoba, Y., & Caballero, D. (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. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 38(supl), 89-105. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.156>
- Sumalan, R.-M., Alexa, E., & Poiana, M.-A. (2013). Assessment of inhibitory potential of essential oils on natural mycoflora and *Fusarium* mycotoxins production in wheat. *Chemistry Central Journal*, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-32>
- Suwitchayanon, P., Ohno, O., Suenaga, K., & Kato-Noguchi, H. (2017). N-Octanoyl tyramine, a phytotoxic compound in the roots of *Cymbopogon nardus*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(6), Article 6. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2419-4>
- Tahat, M. M., & Sijam, K. (2010). *Ralstonia solanacearum*: The bacterial wilt causal agent. *Asian journal of plant sciences*, 9(7), 385-393. <https://doi.org/10.3923/ajps.2010.385.393>

- Thomas, P., & Upreti, R. (2014). Influence of seedling age on the susceptibility of tomato plants to; *Ralstonia solanacearum*; during protray screening and at transplanting. *American Journal of Plant Sciences*, 05(12), Article 12. <https://doi.org/10.4236/ajps.2014.512190>
- Tofiño Rivera, A. P. (2017). Vigilancia tecnológica de plantas aromáticas: De la investigación a la consolidación de la agrocadena colombiana. *Corpoica ciencia y tecnología agropecuaria*, 18(2), Article 2. [https://doi.org/10.21930/rcta.vol18\\_num2\\_art:636](https://doi.org/10.21930/rcta.vol18_num2_art:636)
- Toledo, L., Ramos, M., Spósito, L., Castilho, E., Pavan, F., Lopes, É., Zocolo, G., Silva, F., Soares, T., dos Santos, A., Bauab, T., & De Almeida, M. (2016). Essential oil of *Cymbopogon nardus* (L.) rendle: A strategy to combat fungal infections caused by *Candida* species. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/ijms17081252>
- Ursulino, E. K. U., Melo, H. M., Nogueira, J. W. A., Firmino, N. C. S., de Carvalho, M. G., Catunda Júnior, F. E. A., & Cavalcante, T. T. A. (2019). Antibiofilm activity of the essential oil of citronella (*Cymbopogon nardus*) and its major component, geraniol, on the bacterial biofilms of *Staphylococcus aureus*. *Food Science and Biotechnology*, 28(3), Article 3. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0502-2>
- Vargas Baquero, C. D. (2020). *Bacterias ácido lácticas como biocontroladoras de la marchitez vascular ocasionada por Fusarium oxysporum y Ralstonia solanacearum en tomate* [Tesis Maestría]. Universidad Nacional de Colombia.
- Vasudeva, N., & Prernar, G. (2015). *Origanum majorana* L. -Phyto-pharmacological review. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 6(4), Article 4.
- Verdeguer, M., Sánchez-Moreiras, A. M., & Araniti, F. (2020). Phytotoxic Effects and Mechanism of Action of Essential Oils and Terpenoids. *Plants*, 9(11), 1571. <https://doi.org/10.3390/plants9111571>

- Verma, R. S., Padalia, R. C., Chauhan, A., Verma, R. K., ur Rahman, L., & Singh, A. (2016). Changes in the essential oil composition of *Origanum majorana* L. during post harvest drying. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19(6), Article 6. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.935039>
- Villada-Ramos, J., Aguillón-Osma, J., Soto-Rueda, E., & Loango-Chamorro, N. (2021). Evaluation of antibacterial activity of extract and essential oil of *Tagetes patula* L. in vitro against *Ralstonia solanacearum* biovar 2. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 1-17. <https://doi.org/10.1080/03235408.2021.1916185>
- Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales-Morales, H. A., Basurto-Sotelo, M., Soto-Parra, J. M., & Martínez-Escudero, E. (2014). Situación actual en el control de *Fusarium* spp. Y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta agronómica*, 64(2), Article 2. <https://doi.org/10.15446/acag.v64n2.43358>
- Wu, Z., Xie, L., Li, Y., Wang, Y., Wang, X., Wan, N., Huang, X., Zhang, X., & Yang, M. (2019). A novel application of the vacuum distillation technology in extracting *Origanum vulgare* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*, 139, 111516. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111516>
- Xu, L., Zhan, X., Zeng, Z., Chen, R., Li, H., Xie, T., & Wang, S. (2011). Recent advances on supercritical fluid extraction of essential oils. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5(9), Article 9. <https://doi.org/10.5897/AJPP11.228>
- Xue, H., Lozano-Durán, R., & Macho, A. P. (2020). Insights into the root invasion by the plant pathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum*. *Plants*, 9(4), 516. <https://doi.org/10.3390/plants9040516>
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Yano, I., Hotta, H., & Nishiuchi, Y. (1995). Transfer of Two *Burkholderia* and An *Alcaligenes* Species to *Ralstonia* Gen. Nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii*

- (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) Comb. Nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) Comb. Nov. and *Ralstonia eutro*. *Microbiology and Immunology*, 39(11), 897-904.  
<https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1995.tb03275.x>
- Yang, L., Wu, L., Yao, X., Zhao, S., Wang, J., Li, S., & Ding, W. (2018). Hydroxycoumarins: New, effective plant-derived compounds reduce *Ralstonia pseudosolanacearum* populations and control tobacco bacterial wilt. *Microbiological Research*, 215, 15-21.  
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.05.011>
- Yin, Z., & Dickschat, J. (2022). Engineering fungal terpene biosynthesis. *Natural Product Report*, 40, 28-45.
- Yuliar, Nion, Y. A., & Toyota, K. (2015). Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by *Ralstonia solanacearum*. *Microbes and Environments*, 30(1), 1-11.  
<https://doi.org/10.1264/jsme2.ME14144>
- Zarate-Escobedo, J., Castañeda-González, E. L., Cuevas-Sánchez, J. A., Carrillo-Fonseca, C. L., Ortiz-Torres, C., Ibarra-Estrada, E., & Serrato-Cruz, M. A. (2018). Aceite esencial de algunas poblaciones de *Tagetes lucida* Cav. De las regiones norte y sur del estado de México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 41(2), 199-209.  
<https://doi.org/10.35196/rfm.2018.2.199-209>
- Zheng, X., Zhu, Y., Liu, B., Lin, N., & Zheng, D. (2017). Invasive properties of *Ralstonia solanacearum* virulent and avirulent strains in tomato roots. *Microbial Pathogenesis*, 113, 144-151. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.10.046>

## 8. Anexos

### Anexo 1. Plaza Samper Mendoza. Mercado Nacional de Hierbas.



### Anexo 2. Certificación taxonómica del material vegetal Herbario nacional colombiano





**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA**  
SEDE BOGOTÁ  
FACULTAD DE CIENCIAS  
**INSTITUTO DE CIENCIAS NATURALES**  
HERBARIO NACIONAL COLOMBIANO (COL)

**COL - 48**  
Bogotá D.C., 9 de julio de 2019

Señores  
**MATEO BECERRA PUERTO**  
**DANIELA CASTRO FONSECA**  
Ciudad

Asunto: **Identificación Taxonómica muestras**

Cordial Saludo,


Me permito dar respuesta a su solicitud referente a la identificación taxonómica de la(s) muestra(s) botánica(s):

| Nombre                                 | FAMILIA | No. COL | Colector                       | No de Colecta | Determinó              |
|--|---------|---------|--------------------------------|---------------|------------------------|
| <i>Cymbopogon</i> sp.                  | POACEAE | 612141  | Mateo Becerra & Daniela Castro | 1C            | D. Giraldo-Cañas /2019 |
| <i>Cymbopogon citratus</i> (DC). Stapf | POACEAE | 611953  | Mateo Becerra & Daniela Castro | 1L            | D. Giraldo-Cañas /2019 |

**Permiso de recolecta / Permiso de Investigación:** No aplica.

Esta certificación no es válida para trámites ante el INVIMA o el ICA. El (Los) pliego(s) testigo(s) quedará(n) como muestra permanente en nuestro herbario.

Cordialmente,

  
Prof. **JAIME URIBE MELÉNDEZ**  
Administrador General  
Herbario Nacional Colombiano -COL  
Universidad Nacional de Colombia  
E-mail: [herbacol.fcboog@unal.edu.co](mailto:herbacol.fcboog@unal.edu.co)  
Fecha Impresión: 09/07/2019



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE BOGOTÁ  
FACULTAD DE CIENCIAS  
INSTITUTO DE CIENCIAS NATURALES  
HERBARIO NACIONAL COLOMBIANO (COL)

COL - 73

Bogotá D.C., 30 de septiembre de 2019

Señores

LESLIE DANIELA ORDOÑEZ

Ciudad

Asunto: **Identificación Taxonómica.**


Cordial Saludo,

Me permito dar respuesta a su solicitud referente a la identificación taxonómica de la(s) muestra(s) botánica(s):

☞ Nombre: *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson  
☞ Familia: VERBENACEAE  
☞ No. COL: 612113  
☞ Colector: Edmundo Ordoñez  
No. Colecta: 1  
Determinó: Garzón- Ladino, C. /2019

**Permiso de recolecta / Permiso de Investigación: No aplica.**

Esta certificación no es válida para trámites ante el INVIMA o el ICA. El (Los) pliego(s) testigo(s) quedará(n) como muestra permanente en nuestro herbario.

  
Prof. JAIME URIBE MELÉNDEZ  
Director  
Herbario Nacional Colombiano -COL  
Universidad Nacional de Colombia  
E-mail: herbacol\_fcbog@unal.edu.co

Copia Archivo COL Diego Piz

---

Carrera 30 No. 45-03, INSTITUTO DE CIENCIAS NATURALES,  
"HERBARIO NACIONAL COLOMBIANO (COL)" Edificio 425- 2º piso, Oficina 222  
Conmutador: (57-1) 316 5000 Ext.11538 - 11518 Fax: 11538  
Correo electrónico: herbacol\_fcbog@unal.edu.co  
Bogotá, Colombia, Sur América



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE BOGOTÁ  
FACULTAD DE CIENCIAS

INSTITUTO DE CIENCIAS NATURALES  
HERBARIO NACIONAL COLOMBIANO (COL)

COL - 55

Bogotá D.C., 22 de julio de 2019

Señores

SEBASTIAN MOJICA

Ciudad

Asunto: Identificación Taxonómica muestras

Cordial Saludo,

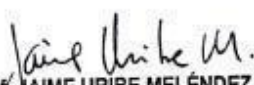
Me permito dar respuesta a su solicitud referente a la identificación taxonómica de la(s) muestra(s) botánica(s):

| Nombre                           | FAMILIA   | No. COL | Colector                            | No de Colecta | Determinó               |
|----------------------------------|-----------|---------|-------------------------------------|---------------|-------------------------|
| <i>Rosmarinus officinalis</i> L. | LAMIACEAE | 612138  | Sebastian Mojica & Valentina Flórez | 1R            | Catalina Garzón L /2019 |
| <i>Thymus vulgaris</i> L.        | LAMIACEAE | 612139  | Sebastian Mojica & Valentina Flórez | 1T            | Catalina Garzón L /2019 |

Permiso de recolecta / Permiso de Investigación: Estas muestras fueron recolectadas mediante la resolución – MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE- N° 0995 del 6 de junio de 2018.

Esta certificación no es válida para trámites ante el INVIMA o el ICA. El (Los) pliego(s) testigo(s) quedará(n) como muestra permanente en nuestro herbario.

Cordialmente,

  
Prof. JAIME URIBE MELÉNDEZ  
Administrador General  
Herbario Nacional Colombiano –COL  
Universidad Nacional de Colombia  
E-mail: [herbacol\\_fcboq@unal.edu.co](mailto:herbacol_fcboq@unal.edu.co)

Copia Archivada COL Diag: F206

Carrera 30 No. 45-03, INSTITUTO DE CIENCIAS NATURALES,  
"HERBARIO NACIONAL COLOMBIANO (COL)" Edificio 425- 2º piso, Oficina 222  
Conmutador: (57-1) 316 5000 Ext.11538 – 11518 Fax: 11538  
Correo electrónico: [herbacol\\_fcboq@unal.edu.co](mailto:herbacol_fcboq@unal.edu.co)  
Bogotá, Colombia, Sur América



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
SEDE BOGOTÁ  
FACULTAD DE CIENCIAS  
INSTITUTO DE CIENCIAS NATURALES  
HERBARIO NACIONAL COLOMBIANO (COL)

B.ICN-183-2022

Bogotá D.C., 24 de junio de 2022

Señora:  
**JOVANNA ACERO GODOY**

Ciudad

Asunto: **Identificación taxonómica de muestras botánicas**

Cordial Saludo. Me permito dar respuesta a su solicitud referente a la identificación taxonómica de la(s) muestra(s) botánica(s):

| Nombre                                  | FAMILIA   | No. de Colecta | No. COL | Colector      | Determinó        |
|---|-----------|----------------|---------|---------------|------------------|
| <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf. | Poaceae   | 1a, 1b, 1c     | 616746  | David Sánchez | A. Fonseca /2022 |
| <i>Foeniculum vulgare</i> MILL          | Apiaceae  | 2              | 616743  | David Sánchez | A. Fonseca /2022 |
| <i>Tagetes lucida</i> Cav.              | Asteracea | 4              | 616744  | David Sánchez | A. Fonseca /2022 |
| <i>Origanum majorana</i> L.             | Lamiaceae | 6              | 616745  | David Sánchez | A. Fonseca /2022 |
| <i>Mentha</i> sp.                       | N/A       | 3              | N/A     | David Sánchez | A. Fonseca /2022 |
| <i>Origanum</i> sp.                     | N/A       | 5              | N/A     | David Sánchez | A. Fonseca /2022 |

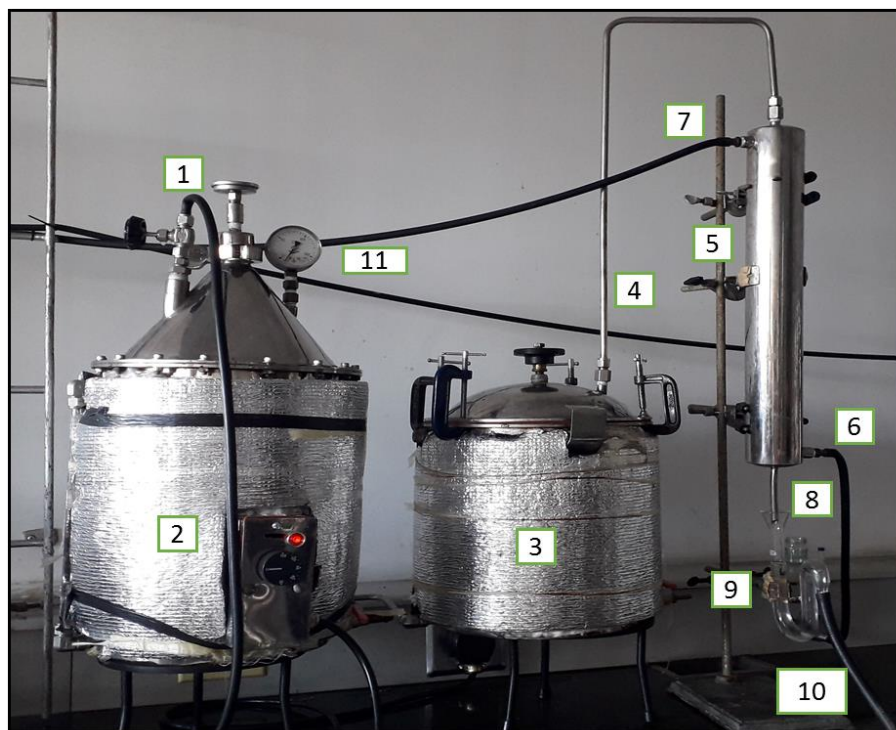
Los ejemplares con número de colecta 3 y 5 no se pueden determinar más allá de género por la calidad de la muestra (sin fruto/sin flor), por consiguiente, no serán ingresados a la colección general del Herbario Nacional Colombiano.

**Permiso de recolecta / Permiso de Investigación:** No aplica. Planta cultivada.

---

Carrera 30 No. 45-03, INSTITUTO DE CIENCIAS NATURALES,  
"HERBARIO NACIONAL COLOMBIANO (COL)" Edificio 425, piso 2º, Oficina 222  
Conmutador: (601) 316 5000 Ext.11538 – 11518  
Correo electrónico: [herbacol\\_fcbog@unal.edu.co](mailto:herbacol_fcbog@unal.edu.co)  
Bogotá, Colombia, Sur América

### Anexo 3. Equipo de destilación por arrastre con vapor.

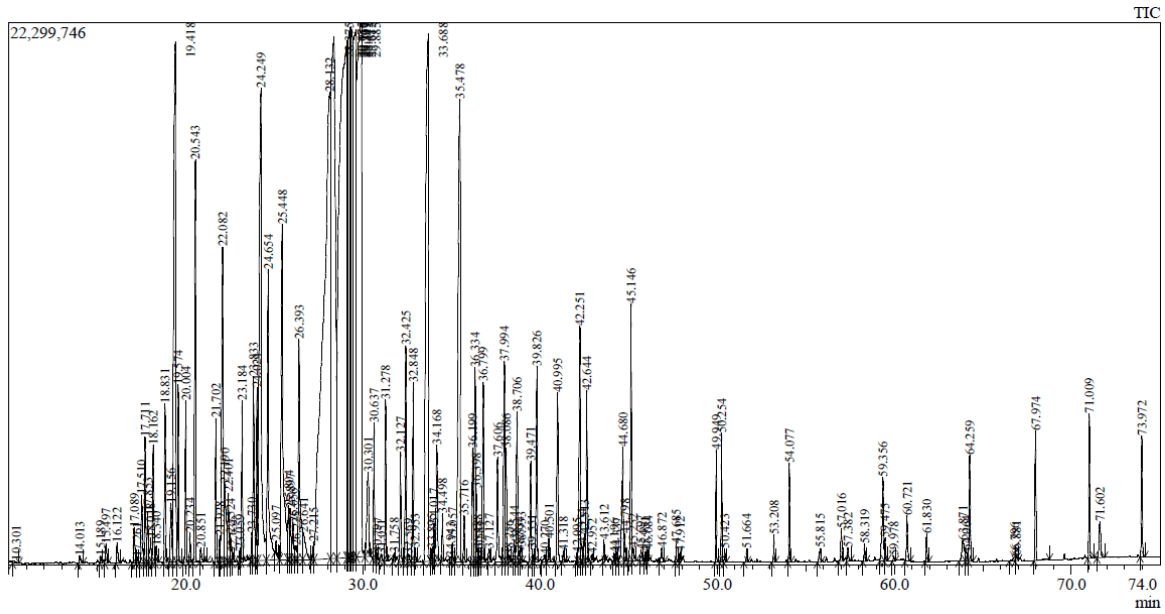


1. Entrada de agua
2. Caldera de calentamiento
3. Alambique
4. Tubo de salida de aceite y vapor
5. Condensador
6. Entrada de agua al condensador
7. Salida de agua del condensador
8. Salida de la mezcla
9. Recipiente para captura de la muestra.
10. Salida de residuos tipo hidrolato
11. Manómetro.

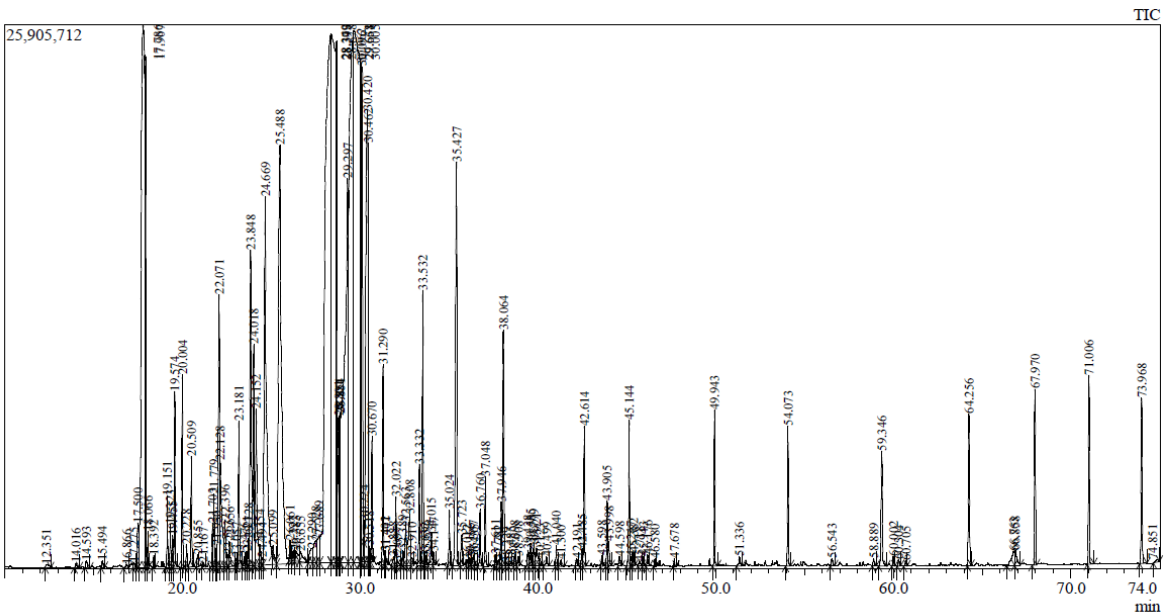
## Anexo 4. Equipo de Cromatografía de Gases Masas. PUJ laboratorio de cromatografía



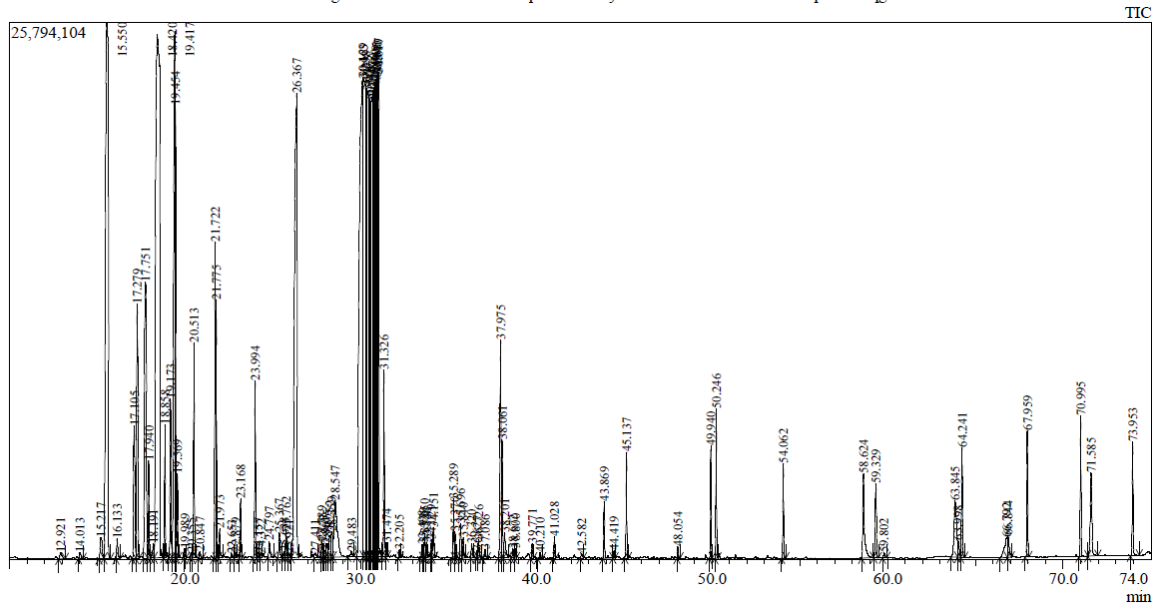
## Anexo 5. Cromatogramas GM



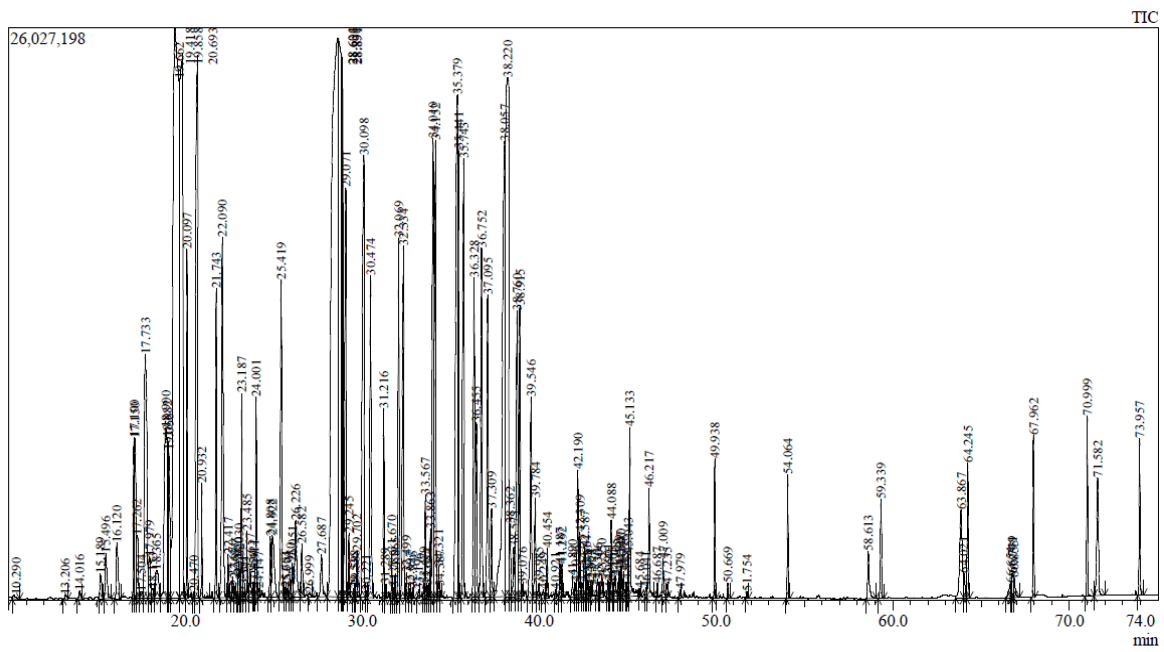
Anexo 5.1. Cromatograma *Cymbopogon* sp.



Anexo 5.2. Cromatograma *Cymbopogon citratus*

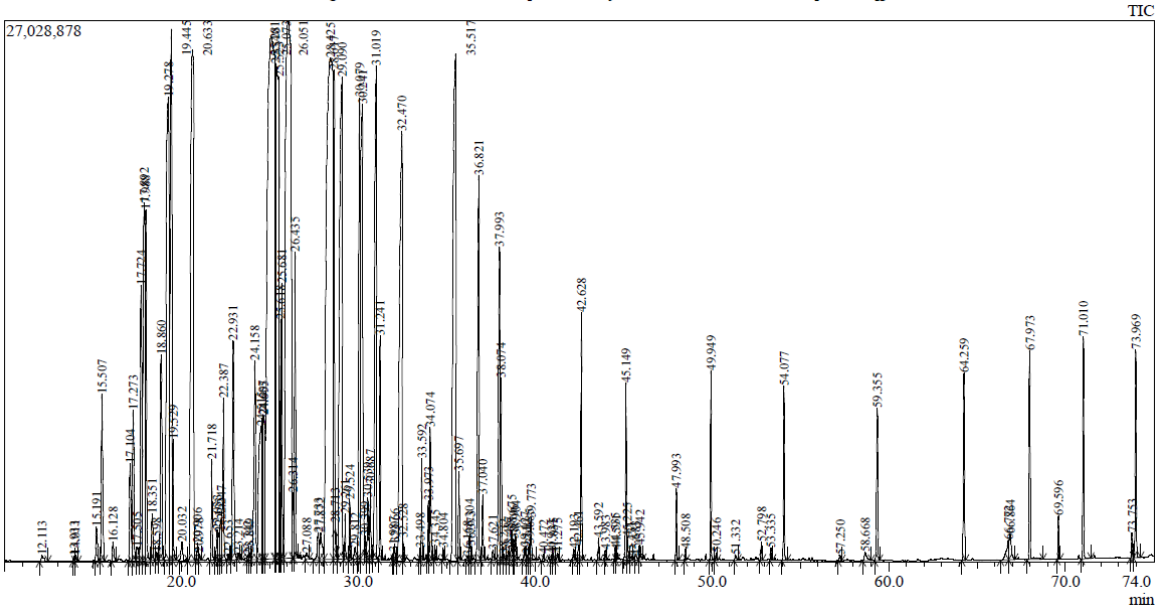


Anexo 5.3. Cromatograma *Foeniculum vulgare*.

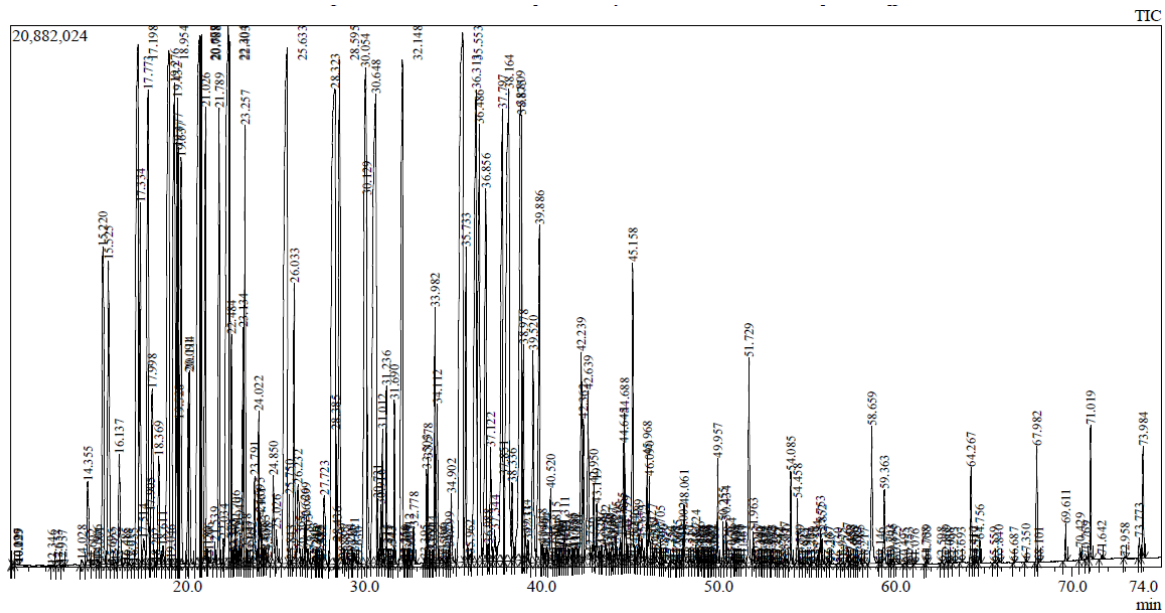


Anexo 5.4. Cromatograma *Lippia alba*

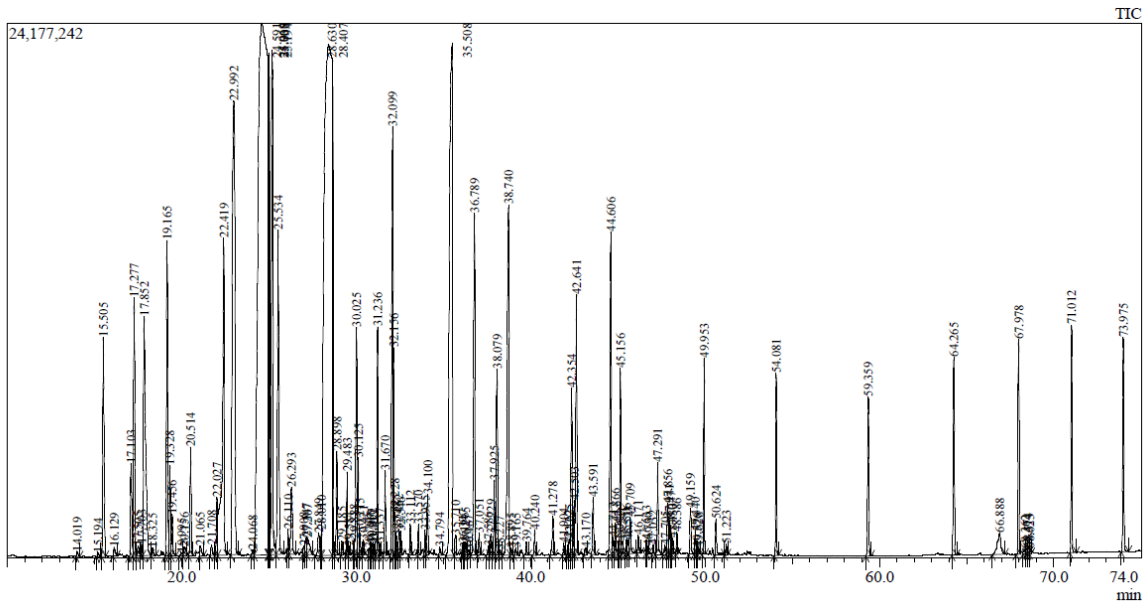




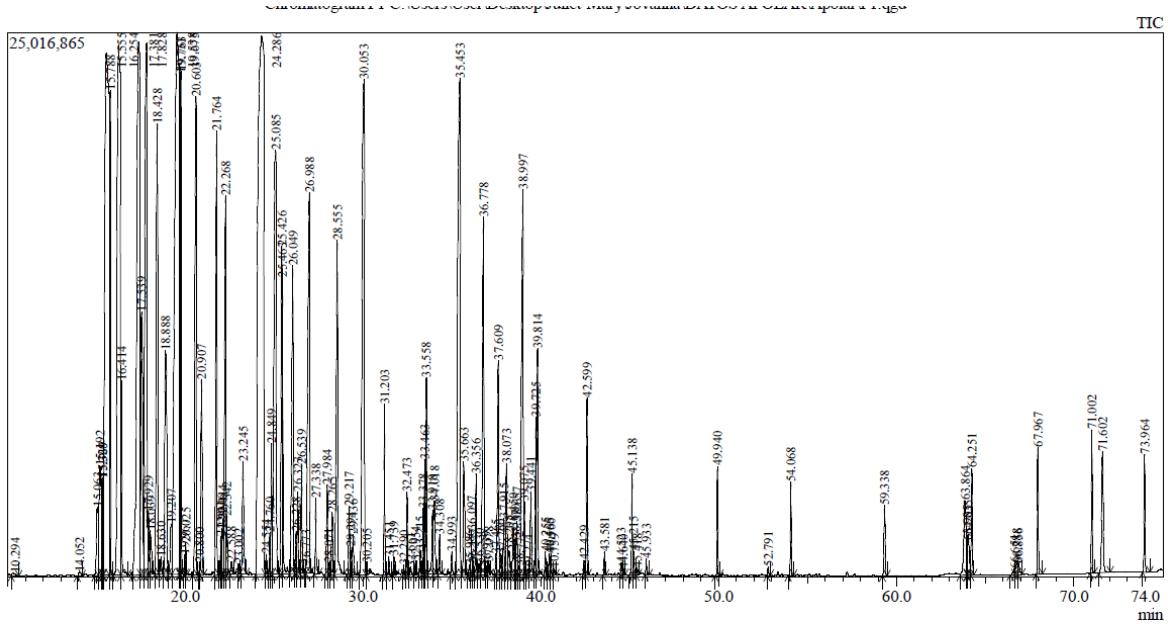
Anexo 5.5. Cromatograma *Mentha sp.*



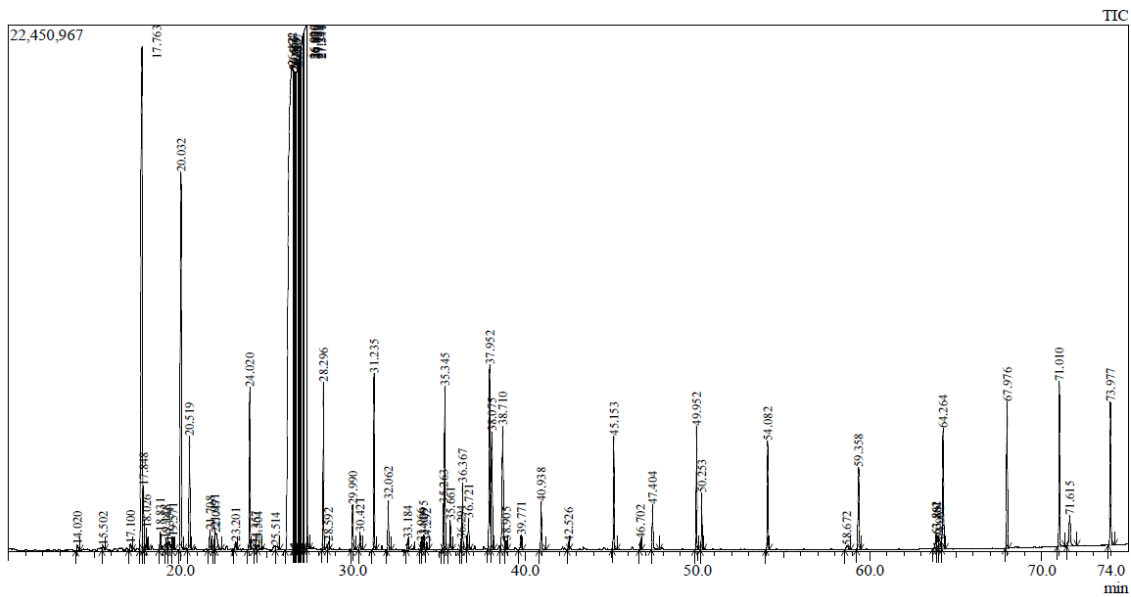
Anexo 5.6. Cromatograma *Origanum majorana*



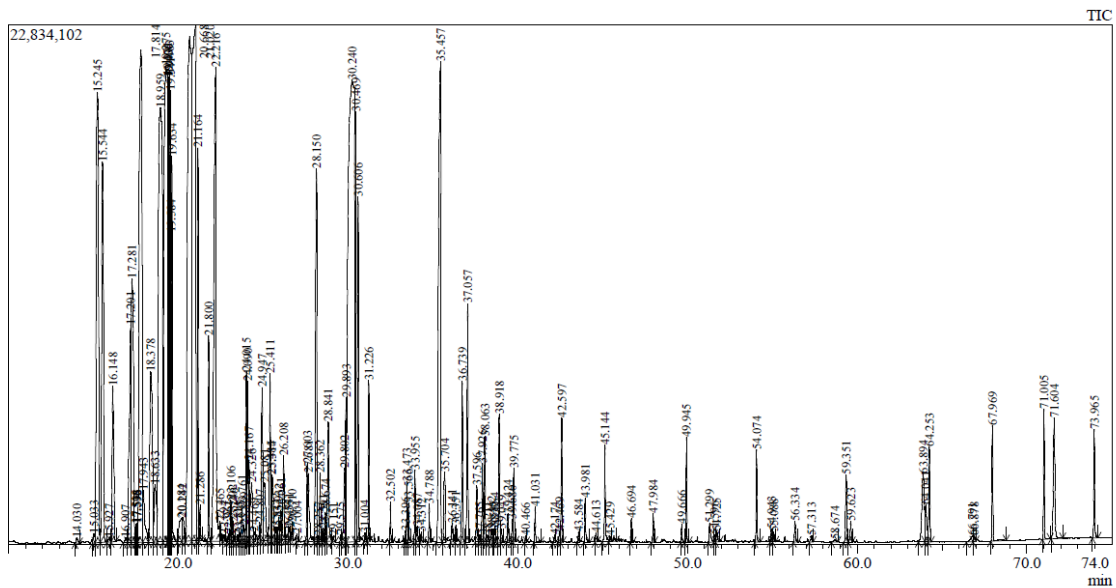
Anexo 5.7. Cromatograma *Origanum* sp.



Anexo 5.8. Cromatograma *Rosmarinus officinalis*

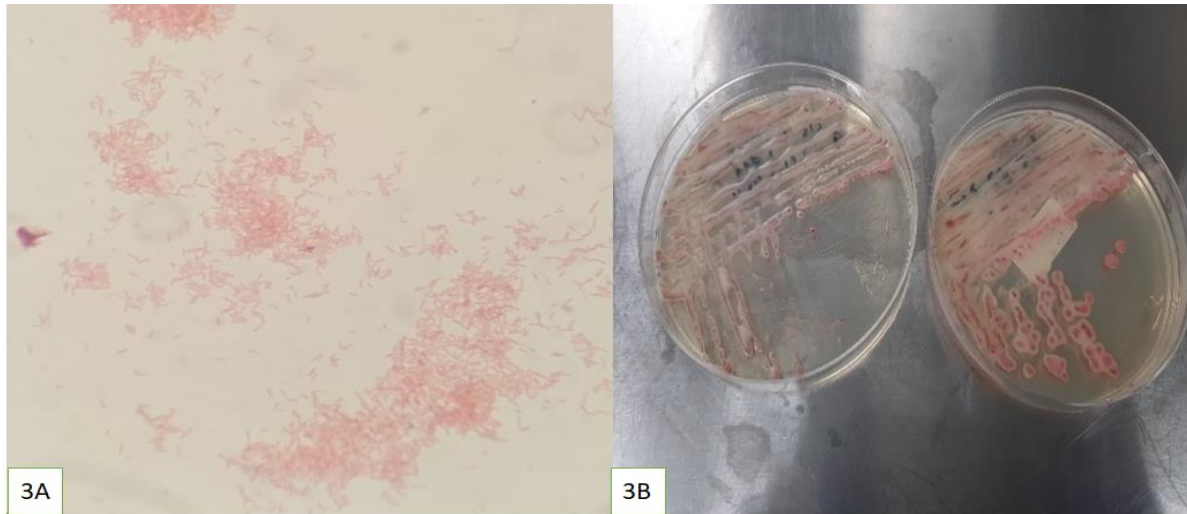


Anexo. 5.9. Cromatograma *Tagetes lucida*

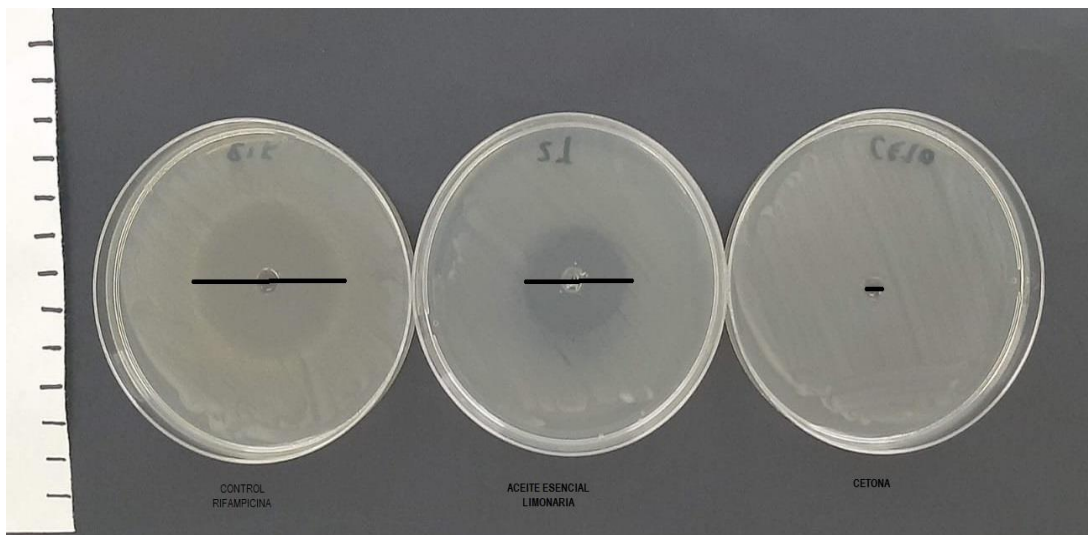


Anexo 5.10. Cromatograma *Thymus vulgaris*

Anexo 6. Observación de *Ralstonia solanacearum*. 3A. Coloración de gram de *R. solanacearum* bacilos gram negativos. 3B. Crecimiento en agar TCZ.

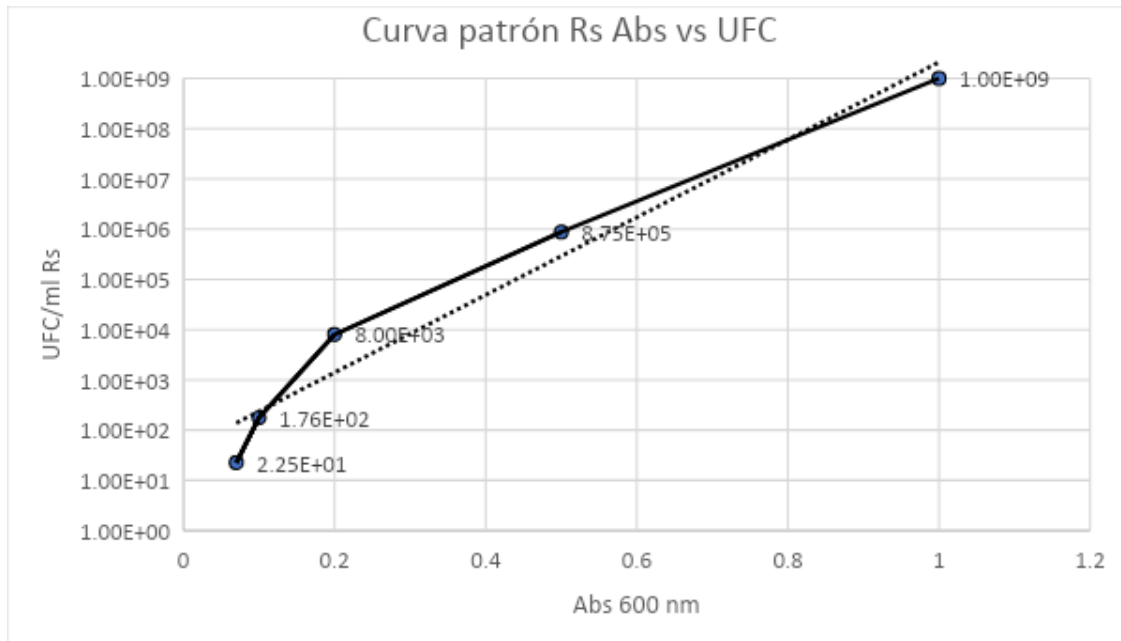


Anexo 7. Halos de inhibición producidos por los aceites esenciales y el control.

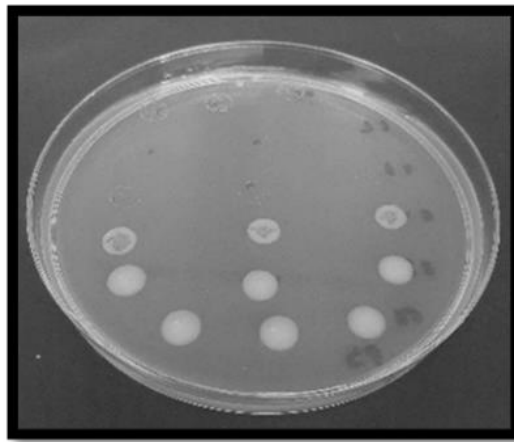


En el lado izquierdo de la imagen se observa el halo producido por el control químico rifampicina, en la figura del medio el producido por *Cymbopogon citratus* y en el derecho la ausencia de halo con la acetona.








**Anexo 8. Curva patrón *Ralstonia solanacearum* vs absorbancia (600nm).**









**Anexo 9. Siembra de diluciones seriadas, 24 horas después de incubación en pozo.**



**Anexo 10. Prueba de infección con los diferentes aceites esenciales**

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| <p><i>Cymbopogon citratus</i></p> |    |
| <p><i>Cymbopogon sp.</i></p>      |    |
| <p><i>Foeniculum vulgare</i></p>  |    |
| <p><i>Pronto Alivio</i></p>       |   |
| <p><i>Mentha sp.</i></p>          |  |
| <p><i>Origanum majorana</i></p>   |  |
| <p><i>Origanum sp.</i></p>        |  |

|                                      |  |
|--------------------------------------|--|
| <p><i>Rosmarinus officinalis</i></p> |    |
| <p><i>Tagetes lucida</i></p>         |    |
| <p><i>Thymus vulgaris</i></p>        |    |
| <p>Acetona</p>                       |   |
| <p><i>Ralstonia solanacearum</i></p> |  |
| <p>Sin Tratamiento</p>               |  |

# Anexo 11. Productos obtenidos tipo artículos científicos



Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2020;25(4):e1005

Artículo original

Efecto de los aceites esenciales de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (limonaria) y *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson (pronto alivio) sobre *Xanthomonas axonopodis* y *Ralstonia* sp.

Effect of essential oils of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (lemon grass) and *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. ex Britton & P. Wilson (bushy matgrass) on *Xanthomonas axonopodis* and *Ralstonia* sp.

Jovanna Acero Godoy\* <https://orcid.org/0000-0003-1656-6888>

Tomás de Jesús Guzmán Hernández\* <https://orcid.org/0000-0002-2719-8550>

Ligia Consuelo Sánchez Leal\* <https://orcid.org/0000-0001-7796-1326>

Ruth Melida Sánchez Mora\* <https://orcid.org/0000-0002-0572-8418>

Ginna Natalia Cruz Catiblanco\* <https://orcid.org/0000-0003-2355-4914>

Wilman Antonio Delgado Ávila\* <https://orcid.org/0000-0001-8415-7950>

Elizabeth Gil Archila\* <https://orcid.org/0000-0002-1774-970X>

Tecnología en Marcha  
Vol. 32, N.º 1, Enero-Marzo 2019

## Revisión documental de uso de los aceites esenciales obtenidos de *Lippia alba* (*Verbenaceae*), como alternativa antibacteriana y antifúngica

Documentary review of essential oils obtained from *Lippia alba* (*Verbenaceae*) as microbial and antifungal therapeutic alternative

Jovanna Acero-Godoy\*, Tomas Guzmán-Hernández\*, Carlos Muñoz-Ruiz\*

Fecha de recepción: 27 de noviembre de 2017  
Fecha de aprobación: 19 de abril de 2019

Acero-Godoy, J. Guzmán-Hernández, T. Muñoz-Ruiz, C. Revisión documental de uso de los aceites esenciales obtenidos de *Lippia alba* (*Verbenaceae*), como alternativa antibacteriana y antifúngica. *Tecnología en Marcha*. Vol. 32-1, Enero-Marzo 2019. Pág 9-11.

Tecnología en Marcha  
Vol. 36, N.º 2, Abril-Junio, 2023

## Comparación de la actividad antifúngica de los aceites esenciales del género *Cinnamomum* spp. contra fitopatógenos

Comparison of antifungal activity against plant pathogens using essential oils of *Cinnamomum* spp. gender

Angie Geraldine Rojas-Amado\*, Jovanna Acero-Godoy\*

Fecha de recepción: 2 de noviembre, 2021  
Fecha de aprobación: 6 de marzo, 2022

Rojas-Amado, A. G. Acero-Godoy, J. Comparación de la actividad antifúngica de los aceites esenciales del género *Cinnamomum* spp. contra fitopatógenos. *Tecnología en Marcha*. Vol. 36, N.º 2, Abril-Junio, 2023. Pág. 9-19.

<https://doi.org/10.18845/tn.v36i2.5854>

57



Environment & Technology: ISSN 2711-4402  
Vol. 2 No. 1 Enero-Junio, 2021. 1-17  
URL: <https://revistas.uncoelmar.gov.br/index.php/et>  
DOI: <https://doi.org/10.18845/et.v2i1.1>

Control alternativo de *Fusarium oxysporum* Schldt y *Pectobacterium carotovorum* (Jones) Walde et al. mediante el uso de aceites esenciales como una alternativa biológica

Alternative control of *Fusarium oxysporum* Schldt and *Pectobacterium carotovorum* (Jones) Walde et al., by the use of essential oils as a biological alternative

Albino Stefany Castro Muroy  
Estudiante de Bacteriología y Laboratorio Clínico  
Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca  
[albino@unicolmayor.edu.co](mailto:albino@unicolmayor.edu.co)  
<https://orcid.org/0000-0002-3036-6028>  
Bogotá D.C. Colombia

Jovanna Acero Godoy  
Candidata Doctora en Ciencias Naturales para el Desarrollo (DOCINADE)  
Universidad Nacional de Costa Rica  
[jacero@unicolmayor.edu.co](mailto:jacero@unicolmayor.edu.co)  
<https://orcid.org/0000-0003-1656-6888>  
Costa Rica

Resumen



Environment & Technology: ISSN 2711-4402  
Vol. 2 No. 1 Enero-Junio, 2021. 1-17  
URL: <https://revistas.uncoelmar.gov.br/index.php/et>  
DOI: <https://doi.org/10.18845/et.v2i1.1>

Efectividad de los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* (Tomillo) y *Origanum vulgare* subsp. *Hirtum* (Orégano griego) probados contra *Ralstonia solanacearum* fitopatógeno del cultivo de *Solanum lycopersicum* (Tomate).

Effectiveness of essential oils of *Thymus vulgaris* (Thyme) and *Origanum vulgare* subsp. *Hirtum* (Greek Oregano) tested against *Ralstonia solanacearum* phytopathogen of the crop *Solanum lycopersicum* (Tomato).

Enika Amaya Rodríguez  
Estudiante de Bacteriología y Laboratorio Clínico  
Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca  
[enika@unicolmayor.edu.co](mailto:enika@unicolmayor.edu.co)  
<https://orcid.org/0000-0002-5534-1756>  
Colombia

Paula Andrea Sartoque Rey  
Estudiante de Bacteriología y Laboratorio Clínico  
Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca  
[psartoque@unicolmayor.edu.co](mailto:psartoque@unicolmayor.edu.co)  
<https://orcid.org/0000-0002-3216-0322>  
Colombia

Jovanna Acero Godoy  
Candidata a Doctora en Ciencias Naturales para el Desarrollo (DOCINADE)  
Universidad Nacional, Costa Rica  
Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca



Molecular aspects of tomato (*Solanum lycopersicum*) vascular wilt by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and antagonism by *Trichoderma* spp.

Aspectos moleculares de la marchitez vascular del jitomate (*Solanum lycopersicum*) por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y del antagonismo por *Trichoderma* spp.

Paula Andrea Castillo-Sanniguel, Laura Rocío Cortés-Sánchez, Jovanna Acero-Godoy\*, Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Bogotá, CP 110911, Colombia. \*Corresponding author: [jacero@unicolmayor.edu.co](mailto:jacero@unicolmayor.edu.co)

Received June 21, 2021. Accepted November 28, 2021.

Tecnología en Marcha  
Vol. 36, N.º 1, Enero-Marzo, 2023

## Efecto inhibitorio del aceite esencial de *Lippia graveolens* sobre *Fusarium oxysporum* en la familia *Solanaceae*. Una revisión

Inhibitory effect of *Lippia graveolens* essential oil on *Fusarium oxysporum* in the *Solanaceae* family. A review

Laura Daniela Albarracín-Gómez\*, Stefany Hortua-Gamboa\*, Jovanna Acero-Godoy\*

Fecha de recepción: 08 de noviembre, 2021  
Fecha de aprobación: 21 de marzo, 2022

Albarracín-Gómez, L. D., Hortua-Gamboa, S., Acero-Godoy, J. Efecto inhibitorio del aceite esencial de *Lippia graveolens* sobre *Fusarium oxysporum* en la familia *Solanaceae*. Una revisión. *Tecnología en Marcha*. Vol. 36, N.º 1, Enero-Marzo, 2023. Pág. 44-60.

<https://doi.org/10.18845/tn.v36i1.5672>