

Especialización en

Biotecnología Vegetal



***Bioactividad de Plantas y Microorganismos de
Ecosistemas de los Andes Ecuatorianos***

María Elena Cazar

Editora

Indice General

	Página
Prefacio	ii
Evaluación de la actividad antifúngica de los aceites esenciales de <i>Cymbopogon citratus</i> y <i>Eucaliptus globulus</i> ante <i>Colletotrichum sp.</i>	1
Estudio preliminar de los hongos del suelo en bosques de <i>Polylepis</i> y pastizales de zonas aledañas al PNC, Ecuador.	15
Evaluación de mezclas de aceites esenciales de romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>), arrayán (<i>Myrceugenella apiculata</i>) y menta (<i>Mentha pulegium</i>), como biocontroladores de <i>Fusarium sp.</i>	26
Caracterización Nutricional y Actividad Antioxidante de <i>Macleania rupestris</i> (Joyapa) y <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth (Mortiño).	38
Actividad antimicrobiana de aceites esenciales de Menta (<i>Mentha pulegium</i>) y Cedrón (<i>Alloysia tryphylla</i>) en la germinación in vitro de la Orquídea <i>Cattleya máxima</i> .	49
Actividad antibacteriana de extractos orgánicos y aceite esencial de <i>Jungia rugosa</i> Less	62

Prefacio

La biotecnología, en un sentido amplio, estudia las aplicaciones de sustratos biológicos en beneficio de las actividades humanas. En este sentido, la biotecnología ha sido estudiada y utilizada por el hombre desde tiempos ancestrales, obteniéndose desde alimentos y vestido hasta la cura de enfermedades.

En los tiempos actuales hemos sido testigos de importantes progresos en el campo de la biotecnología, mediados por el desarrollo tecnológico y la interacción entre varios campos del conocimiento. Las experiencias más exitosas, hoy por hoy, constituyen la posibilidad de llegar a descifrar los genes involucrados en la codificación de caracteres y llegar al diagnóstico y tratamiento de enfermedades.

Los desafíos actuales de la biotecnología como ciencia constituyen generar más y mejores fuentes de alimentación, mejorar las condiciones de salud de la población y optimizar la calidad de la materia prima en procesos industriales, minimizando el impacto ambiental. Para abordar estos importantes campos de investigación y desarrollo, es necesario poner a prueba la creatividad de un científico y su aptitud para reconocer oportunidades de generación de conocimiento a partir de nuestra realidad.

La biodiversidad de la Sierra Sur Ecuatoriana constituye un maravilloso laboratorio natural, donde se observan interacciones únicas entre especies, y alberga recursos naturales intactos, promisorios como soluciones a problemas agrícolas, ambientales y de salud.

En este contexto, se presentan los resultados de las investigaciones desarrolladas por los estudiantes de la Especialización en Biotecnología Vegetal, cohorte 2012 – 2013. La fase experimental fue desarrollada en el Laboratorio de Biotecnología de Productos Naturales de la Universidad del Azuay, y la elaboración de los informes finales ha sido cuidadosamente revisada para generar trabajos en formato de artículo científico, cumpliendo con las exigencias actuales de publicación en revistas de corriente principal.

El trabajo resultado presenta nuevos hallazgos sobre el potencial antioxidante de plantas nativas de nuestra región, como joyapa y mortiño. Se destaca el potencial de los aceites esenciales como biocontroladores de fitopatógenos que afectan cultivos de importancia en la zona. Se abordó la problemática del tomate de árbol, fuertemente afectado en nuestra zona por hongos del género *Colletotrichum*. Se evaluó la efectividad de mezclas de aceites esenciales ante *Fusarium*, como alternativa a los controles químicos tradicionales, donde se han observado problemas de resistencia.

Adicionalmente, se investigaron las aplicaciones de aceites esenciales en cultivos “in vitro”. Se encontraron promisorias aplicaciones de estas sustancias en el control de contaminantes microbianos en medios de cultivo para propagación de orquídeas. Además, se evaluó la diversidad de poblaciones fungales en bosques de *Polylepis*, con el fin de investigar asociaciones planta-microorganismo. Finalmente, se presentan nuevos hallazgos sobre la bioactividad del aceite esencial de *Jungia rugosa* Less, utilizada en el conocimiento tradicional como cicatrizante y antiinflamatoria.

Esta publicación constituye un aporte al conocimiento generado desde un programa de posgrado desarrollado en la Universidad del Azuay. Es necesario agradecer a los docentes que compartieron sus conocimientos y experiencia en el área de la biotecnología y a las instituciones que aportaron al desarrollo del trabajo experimental en el marco de cooperaciones con redes de investigación como RedBio y la Red de Bioproductos adscrita a REDU. Además, expreso mi agradecimiento a los estudiantes de la Especialidad en Biotecnología, por la dedicación, esfuerzo y compromiso demostrado para lograr la culminación exitosa de este programa.

María Elena Cazar, Ph.D

Directora Especialización en Biotecnología Vegetal



Especialización en Biotecnología Vegetal

Evaluación de la actividad antifúngica de los aceites esenciales de *Cymbopogon citratus* y *Eucaliptus globulus* ante *Colletotrichum sp.*

Alvarado, J¹., Brito, J.P¹., Sarmiento, J¹, Cazar-Ramírez, A^{1*}

¹Universidad del Azuay. Laboratorio de Biotecnología de Productos Naturales.

Avda. 24 de Mayo 777 y Hernán Malo. Cuenca, Ecuador.

*acazar@uazuay.edu.ec

RESUMEN

El tomate de árbol, *Solanum betacea*, es un fruto no climatérico que constituye un importante cultivo en la Sierra Sur Ecuatoriana. Una de los patógenos más importantes de este cultivo es *Colletotrichum sp.*, agente causal de la enfermedad conocida como antracnosis. El objetivo planteado en este trabajo fue probar la actividad antifúngica de aceites esenciales de yerba luisa (*Cymbopogon citratus*) y eucalipto (*Eucaliptus globulus*) ante *Colletotrichum sp.* Se desarrolló un ensayo de microdilución para establecer la actividad antifúngica de los aceites en estudio. El aceite esencial de *Eucaliptus globulus* demuestra actividad antifúngica ante el patógeno objetivo (CIM: 62,5 µl/ml). El aceite de *Cymbopogon citratus* no demostró actividad antifúngica. Los resultados obtenidos permiten recomendar el uso del aceite esencial de eucalipto para controlar el desarrollo de *Colletotrichum sp.* en el cultivo de tomate de árbol.

PALABRAS CLAVE: tomate de árbol, *Colletotrichum*, *Eucaliptus globulus*, aceites esenciales

ABSTRACT

Tree tomato (*Solanum betacea*) is a non-climacteric fruit that constitutes an important crop in the Ecuadorian Highlands. *Colletotrichum* sp. is one of the main pathogens that attack this crop, causing lesions known as antracnosis. The aim of the present work is to assess the antifungic activity of the essential oils of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and eucalyptus (*Eucaliptus globulus*) towards *Colletotrichum* sp. A microdilution assay was developed to establish the antifungal activity of the essential oils studied. *Eucaliptus globulus* essential oils display antifungic activity towards the target pathogen (CIM: 62,5 µl/ml). *Cymbopogon citratus* was not bioactive in this assay.

The results obtained allow us to recommend the use of eucalyptus essential oil to control the development of *Colletotrichum* sp. in tree tomato cultivars.

KEYWORDS: Tree tomato, *Colletotrichum*, *Eucaliptus globulus*, essential oils.

1. Introducción:

Colletotrichum es uno de los géneros más importantes de hongos patógenos de plantas en el mundo, atacando con mayor agresividad a cultivos en zonas tropicales y subtropicales donde los niveles de precipitación y temperatura son altos (Rojas-Martínez *et al.*, 2008). Este género es uno de los que ocasiona la enfermedad conocida como antracnosis (Agrios, 2005).

La antracnosis del fruto de tomate de árbol (*Solanum betaceae*) es una enfermedad conocida en la Sierra Sur Ecuatoriana como “ojo de pollo”, por sus lesiones necróticas de forma circular en el fruto, que pueden extenderse hacia flores y hojas. La antracnosis es considerada la enfermedad más importante en el cultivo de tomate de árbol y es ocasionada por especies del hongo fitopatógeno *Colletotrichum* (Maita, 2011, Afanador-Kafuri *et al.*, 2003).

En la Provincia del Azuay, la producción de tomate de árbol ha sufrido un decremento. Hasta el año 2005 se cultivaban unas 1800 has, esta superficie ha disminuido a 591 en el año 2007 (Maita, 2011). Este fenómeno se debe principalmente a su amplia distribución territorial, potencial daño del fruto y difícil control relacionado con el uso indiscriminado y excesivo de pesticidas; acción que, de igual manera se asocia con el aumento de la resistencia de microorganismos, deterioro ambiental y de la salud humana. Pese al potencial peligro de los agroquímicos, estos continúan siendo los más utilizados en la actualidad (Alzate *et al.* 2009).

Ecuador es un país megadiverso en el cual existe gran potencial fitogenético. Por consiguiente es necesario plantear alternativas de control biológico seguras y amigables con el medio ambiente y el ser humano (Aswini *et al.*, 2010). Muchas especies vegetales poseen gran actividad biológica, y se han probado como biocontroladores de insectos, y otras plagas vegetales, entre ellos hongos. La aplicación de aceites esenciales dentro de este contexto resulta un método atractivo para el control de enfermedades, su mezcla de compuestos han demostrado entregar resistencia a plagas y enfermedades (Alzate *et al.*, 2009).

La resistencia de las plagas (cruzada y no cruzada), contaminación ambiental (cuerpos de agua, suelos y entornos urbanos) y problemas toxicológicos asociados con los insecticidas sintéticos señalan la necesidad de encontrar alternativas más efectivas y amigables con la salud de los seres humanos y el ambiente. Por

consiguiente los aceites esenciales son una alternativa para el desarrollo de estrategias de control biológico para control de plagas y enfermedades es en cultivos de importancia económica (Gullino *et al.*, 2000).

Los aceites esenciales son mezclas de monoterpenos (aproximadamente el 90% de las mezclas), sesquiterpenos y una variedad de fenoles aromáticos, óxidos, éteres, alcoholes, ésteres, aldehídos y cetonas que determinan el aroma y bioactividad característicos de la planta de la cual provienen (Batish *et al.*, 2008). La composición química de un determinado aceite esencial puede variar en diferentes ejemplares de la misma especie vegetal, e inclusive en los diferentes órganos de la misma planta, como resultado de su propia fisiología, o debido al clima y a las condiciones del suelo (Shaaya y Rafaeli, 2007).

La presencia de aceites esenciales volátiles en las plantas les proporciona una importante defensa estratégica, particularmente contra insectos herbívoros y hongos patógenos (Langenheim, 1994). Esta característica es precisamente aprovechada para el desarrollo de productos de utilidad agrícola y alimentaria, con el objeto de controlar el significativo número de plagas que afectan tanto cosechas como semillas ya almacenadas.

Las propiedades beneficiosas de los aceites esenciales permiten su uso en áreas especialmente sensibles, como escuelas, restaurantes, hospitales y hogares. Aunque el beneficio real que poseen sería mejor aprovechado por los agricultores de los países en vías de desarrollo, para quienes el costo de insecticidas químicos es alto y podrían aplicar con ventaja la agricultura orgánica y sistemas de producción en invernaderos (Batish *et al.*, 2008).

Con relación a los estudios de los aceites esenciales en el control de plagas, se han abarcado ácaros (Choi *et al.*, 2004) e insectos, principalmente coleópteros (Papachristos y Stamopoulos, 2002), isópteros (Peterson y Ems-Wilson, 2003), himenópteros (Appel *et al.*, 2004), dípteros (McQuate *et al.*, 2004) y homópteros (Choi *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004; Barajas *et al.*, 2005).

Cymbopogon citratus es una planta herbácea, pertenece a la familia Graminae. El aceite esencial de esta especie tiene entre sus componentes mayoritarios identificados a los monoterpenos geranial (41,8%) y neral (34,9%), que constituyen una mezcla de esteroisómeros conocida como citral (70 - 80%). Otros componentes minoritarios son terpenos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y compuestos aromáticos. El componente mayoritario del aceite esencial obtenido de hojas de *Eucaliptus globulus* es Eucaliptol (1,8-Cineol) encontrado en elevada proporción (70% como mínimo) aunque también existen compuestos polifenólicos, como terpenoides (euglobales) y antioxidantes. (Mendoza y Tobarda, 2010).

2. Metodología:

2.1 Recolección del material vegetal.

La recolección de las hojas de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) y de eucalipto (*Eucaliptus globulus*) se realizó en la parroquia Bulán, Cantón Paute, Provincia del Azuay. Los frutos de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*) infectados por *Colletotrichum* fueron recolectados del sector Dug Dug del mismo cantón.

2.2 Obtención de aceites esenciales.

Las partes aéreas de las especies incluidas en el presente estudio fueron limpiadas y seleccionadas, eliminando hojas y tallos con síntomas de enfermedades, previo su procesamiento. El material vegetal se sometió a un proceso de hidrodestilación en un equipo de extracción por arrastre de vapor (Albrigi Luigi). Los aceites esenciales fueron recolectados en viales cónicos y centrifugados a 5000 rpm para eliminar residuos acuosos. Posteriormente, los aceites fueron almacenados en frascos ámbar y protegidos de la luz hasta su evaluación en el ensayo de actividad antifúngica ante *Colletotrichum* sp.

2.3 Aislamiento de *Colletotrichum* sp..

Los frutos de *C. betacea* con síntomas visibles de la enfermedad fueron trasladados desde su lugar de colección hasta el Laboratorio de Biotecnología de Productos Naturales de la Universidad del Azuay. Para el aislamiento del microorganismo objetivo, se seccionaron tejidos afectados, desinfectándose previamente por

inmersión en etanol al 70%. Posteriormente se sembraron porciones de tejido en medio de cultivo PDA (Puré de papas 2%; Glucosa 2%; Agar 1.5%). Los aislados fueron repicados hasta obtener ejemplares puros, los cuales fueron identificados por claves morfológicas.

Se recolectaron esporas del microorganismo objetivo, en condiciones de esterilidad, para el desarrollo del bioensayo. Ejemplares puros y esporas son mantenidos en el cepario del Laboratorio de Biotecnología de Productos Naturales de la Universidad del Azuay

2.4 Actividad antifúngica de aceites esenciales ante *Colletotrichum* sp.

La evaluación de la actividad inhibitoria del crecimiento de *Colletotrichum* sp. de aceites esenciales fue desarrollada de acuerdo a la metodología descrita por Cazar *et al.*, (2005). Los aceites esenciales fueron diluidos (1:1) en el medio mínimo Czapeck y homogeneizados mediante agitación. La solución de aceites fue colocada en la primera columna de una placa de microdilución de 96 pocillos. Una microdilución se desarrolló en la placa, en la cual se incluyeron controles de esterilidad y de crecimiento del microorganismo de prueba. Posteriormente, se inocularon todos los pocillos, a excepción de los controles de esterilidad, con una solución acuosa de concentración 1×10^6 esporas / mL. Las placas preparadas según el esquema descrito fueron incubadas por un período de 96 horas. Posteriormente, la concentración inhibitoria mínima CIM fue determinada como la concentración que inhibe visiblemente el crecimiento micelial de *Colletotrichum* sp. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Eucalipto	A												
	B												
	C												
Hierba luisa	D												
	E												
	F												
Mezcla 1:1 AE	G												
	H												

Fig. 1. Organización de la placa de microdilución de 96 pocillos:

Columna 1 Solución 1:1 Aceite esencial con medio Czapeck

Columna 2 -10 Microdilución

Columna 11 Control de esterilidad

Columna 12 Control de crecimiento

Filas A,B,C: Aceite de eucalipto

Filas D,E,F: Aceite de hierba luisa

Filas G y H: Mezcla de aceite de eucalipto y hierba luisa 1:1

2.5 Composición química de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Cymbopogon citratus*

Se realizó un análisis gascromatográfico para determinar la composición de los aceites en estudio. Este análisis fue desarrollado en el Instituto de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja. Se utilizó un gascromatógrafo Hewlett-Packard, Modelo 6890, equipado con una FID. El análisis se realizó en un gradiente de temperatura de 50°C a 270°C. Los constituyentes fueron identificados por comparación de sus espectros de masas con los de la base de datos Wiley /n.1. Los resultados obtenidos fueron correlacionados con los índices de retención. El área de las señales, en porcentaje, fue obtenida electrónicamente de la respuesta del detector GC-FID.

4. Resultados

4.1 Rendimiento de extracción de aceites esenciales

El rendimiento de obtención de aceites esenciales fue estimado en función del volumen de aceite esencial obtenido por kilogramo de material vegetal de partida. Los resultados obtenidos se presentan en el siguiente cuadro:

	Peso de material vegetal (Kg)	Volumen aceite esencial (mL)	Rendimiento (%)
Hierba luisa	2.2	10	4.5
Eucalipto	2.2	12	5.4

Cuadro 1: Rendimiento de obtención de los aceites esenciales incluidos en el presente estudio.

Los resultados obtenidos señalan al eucalipto como la especie con mayor rendimiento de producción de aceite esencial.

4.2 Actividad antifúngica de aceites esenciales ante *Colletotrichum* sp.

El aceite esencial de eucalipto inhibió el crecimiento del hongo objetivo en el ensayo de microdilución. Se registró una CIM de 62,5 ul/ml. El aceite de hierba luisa no presentó actividad antifúngica en las condiciones del bioensayo.

4.3 Composición química de los aceites esenciales de *Eucaliptus globulus* y *Cymbopogon citratus*

Los componentes mayoritarios de los aceites incluidos en esta investigación se presentan a continuación:

Componente	<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>Cymbopogon citratus</i>
Azulene	0.52	-
1-Limonene	0.93	-
1,8-Cineol	4.70	-
α -pinene	36.28	-
β -pinene	42.58	-
γ -terpinene	9.36	-
α -terpineol	0.99	-
Cis-ocymene	-	0.82
Trans- β -ocymene	-	0.45
(-)-Globulol	0.48	-
6-methyl-5-hepten-2-one	-	0.98
Linalool	-	0.97
Undecanone	-	0.58
Neral	-	32.09
Geranial	-	41.22
Geraniol	0.56	2.40
Myrcene	3.21	18.01
β -myrcene	0.65	-

Cuadro 2. Composición de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Cymbopogon citratus* en porcentaje. -: no detectado

5. Discusión

Los aceites esenciales son mezclas complejas de metabolitos secundarios volátiles. En la naturaleza, los aceites esenciales juegan un rol importante en la protección de plantas como sustancias antibacterianas, antifúngicas, insecticidas y repelentes de herbívoros. Además, estos compuestos se involucran en los mecanismos de atracción de polinizadores, favoreciendo la dispersión del polen y semillas (Bakkali *et al.*, 2008).

En el presente trabajo se evaluó el potencial de dos aceites esenciales, como posibles biocontroladores en el manejo de la antracnosis en tomate de árbol. Dada la importancia económica de este cultivo y los problemas de resistencia asociados, es

necesario evaluar nuevas opciones para el control de este patógeno vegetal. En literatura se encuentran algunas referencias sobre control de *Colletotrichum* con aceites esenciales. Fernandes-Aquino *et al* (2012) evaluaron la patogenicidad y fitotoxicidad de los aceites de *Lippia sidoides* (Cham.), *Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf. y *Ocimum gratissimum* (L.) en el control de antracosis en maracuyá. Los resultados presentados en esta investigación muestran que el aceite de *C. citratus* inhibe el crecimiento de aislados de *Colletotrichum*. Este resultado se contrapone con nuestra investigación, probablemente debido a las diferencias de patogenicidad de los aislados obtenidos.

Los componentes mayoritarios de *Eucalyptus globulus*, determinados por el análisis GC-MS, reportan como compuestos mayoritarios a α -pineno y β -pineno. Estos resultados concuerdan con publicaciones previas (Cheng *et al.*, 2009). El quemotipo de la especie puede ser atribuido a la presencia minoritaria de (-)globulol. Se aprecia la diferencia en composición química de los aceites esenciales incluidos en este estudio, lo cual puede justificar la específica bioactividad de *E. globulus* ante el patógeno de prueba.

El pineno, en sus formas alfa y beta, ha sido reportado como antiséptico, bactericida, expectorante, fungicida, espasmogénico y espasmolítico (Duke y Beckstrim-Sternberg, 2001).

El aceite esencial de eucalipto ha sido caracterizado por su potencial como antifúngico ante diferentes especies fungales. Rajmane y Korekar (2012) presentan la bioactividad ante un grupo de hongos post-cosecha, incluyendo a *Colletotrichum gloesporioides*, de aceites y extractos acuosos de *Eucalyptus*. Los resultados presentados muestran que la capacidad inhibitoria depende en la concentración del aceite esencial. En nuestro ensayo se establece la concentración inhibitoria mínima a la cual el aceite esencial de eucalipto inhibe el crecimiento de *Colletotrichum sp.* Este resultado puede aplicarse en el desarrollo de biopesticidas para aplicación en campo del aceite esencial en el control de este fitopatógeno. A nuestro entender, el reporte presentado es pionero en el control de antracosis con aceites esenciales en la zona sur de Ecuador.

6. Agradecimientos

Los autores agradecen la asesoría científica de la Dra. María Elena Cazar en el desarrollo de bioensayos e interpretación de espectros de masas. Las facilidades del Laboratorio de Biotecnología de Productos Naturales de la Universidad del Azuay son reconocidas. Además, expresamos nuestro agradecimiento a la Universidad Técnica Particular de Loja y a la asesoría del Dr. Omar Malagón, en el establecimiento de la composición química de los aceites esenciales por GC-MS.

7. Referencias Bibliográficas

Afanador-Kafuri, L., Minz, D., ; Maymon, M., Freeman, S. (2003). Characterization of *Colletotrichum* isolates from Tamarillo, Passiflora, and Mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. *Phytopathology*, **93**, 579 – 587

Agrios G (2005). Plant Pathology. Quinta Edición. Academic Press Inc.,pp. 487.

Alzate, D., Mier, G., Afanador, L., Durango, D. (2009). Evaluación de la fitotoxicidad y la actividad antifúngica contra *Colletotrichum acutatum* de los aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*), limoncillo (*Cymbopogon citratus*) y sus componentes mayoritarios. *Vitae* **16** (1):116-125.

Anaruma, N., Schmidt, F., Texeira, M., Mara, G., Delarmelina, C., Benato, E., Sartoratto, A. (2010). Control of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. in yellow passion fruit using *Cymbopogon citratus* essential oil. *Brazilian Journal of Microbiology*. **41**(1): 66-73.

Appel, A., Gehret, M., Tanley, M. (2004). Repellency and Toxicity of Mint Oil Granules to Red Imported Fire Ants (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Economical Entomology*. **97** (2):575-80.

Arango, O., Hurtado, A., Castillo, P., Santacruz, M. (2009). Estudio de las condiciones de extracción por arrastre con vapor del aceite esencial de laurel de cera (*Morella pubescens*). *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, **7** (2):40-48

Aswini, D., Prabakar, K., Rajendran, L., Karthikeyan, G., Raguchander, T (2010). Efficacy of new EC formulation derived from garlic creeper (*Adenocalym maalliaceum* Miers.) against anthracnose and stem end rot diseases of mango". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26 (6):1107-1116.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, **46** (2): 446-475

Barajas, J. S., Pérez, J., Serrato, M. A. (2005). Evaluación del aceite esencial de *Tagetes filifolia* Lag. contra plagas en calabaza en Metztlán, Hidalgo. Memoria en disco compacto del VIII Congreso Nacional Agronómico, Universidad Autónoma Chapingo, México.

Batish D., Singh H., Kohli R., Kaur S. (2008). Eucalyptus essential as natural pesticide. *Forest Ecology and Management*, **256**(12): 2166-2174.

Cazar, M. E., Schmeda-Hirschmann, G., Astudillo, L. (2005). Antimicrobial butyrolactone I derivatives from the Ecuadorian soil fungus *Aspergillus terreus* Thorn. var *terreus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **21**(6-7):1067-1075.

Cheng, S., Hunag, C., Chen, Y., Yu, J., Chen, W., Chang, S. (2008). Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species. *Bioresource Technology*, **100** (1):452-456

Choi, W., Lee, E., Choi, B., Park, P., Ahn, Y. (2003). Toxicity of Plant Essential Oils to *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). *Horticultural Entomology*. **96** (5):1479-84

Duke, J., Beckstrom-Sternberg, S. (2001). Handbook of Medicinal Mints (Aromathematics). Phytochemicals and Biological Activities. CRC Press. EEUU; pp. 411

Fernandes-Aquino, C., De Lima Pereira, N., Silva-Soares, E., Martins, E. (2012). Acção e caracterização química de oleos essenciais no manejo da Antractose do Maracujá. *Revista Brasileira de Fruticultura*. **34**(4):1059-1067

Gullino, M., Leroux, P., Smith, C. (2000). Uses and challenges of novel compounds for plant disease control. *Crop Protection*, **19**: 1 – 11

Kasuan, N, Yusuf, Z, Taib, M, Rahiman, M, Tajuddin, N, & Aziz, M (2010), Robust Steam Temperature Regulation for Distillation of Essential Oil Extraction Process using Hybrid Fuzzy-PD plus PID Controller. *World Academy Of Science, Engineering and Technology*, **71**; 932-937

Langenheim, J. (1994). Higher plant terpenoids: A phyto-centric overview of their ecological roles. *Journal of Chemical Ecology*. **20** (6) :1223-1280

Maita S. (2011). Manejo del "ojo de pollo" o antracnosis (*Colletotrichum acutatum* Simmonds) en el cultivo del tomate de árbol (*Solanum betaceum* cav). Editorial Universitaria Católica. Cuenca. Ecuador, 62 pp.

McQuate, G., Keum, Y., Sylva, C., Li, Q., Jang, E. (2004). Active Ingredients in Cade Oil that Synergize Attractiveness of α -Ionol to Male *Bactrocera latifrons* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economical Entomology*. **97** (3):862-70

Mendoza, D., Tobarda, D. (2010) Composición química y actividad acaricida del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* Stapf contra el ácaro intradomiciliario *Dermatophagoides farinae* (Acari:Pyroglyphidae). *Biosalud*. **9**(2):21 – 31

Papachristos, D., Stamopoulos, D. (2002). Repellent, toxic and reproduction inhibitory effects of essential oil vapours on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Product Research*. **38**(2):117-128

Pérez, A., Rojas-Sierra, J., Chamorro, L., Perez-Palencia, K. (2011). Evaluación in vitro de la actividad inhibitoria de extractos vegetales sobre aislados de *Colletotrichum* spp". *Acta Agronómica*. **60**(2):158-164.

Peterson, C., Ems-Wilson, J. (2003). Catnip essential oil as a barrier to subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae) in the laboratory. *Journal of Economic Entomology*. **96** (4):1275-1282.

Rajmane, S., & Korekar, S. (2012). Antifungal properties of plant parts and plant products against post-harvest fungi. *World Journal of Science and Technology*, **2**(8).

Rojas-Martínez, R, Zavaleta-Mejía, E, Nieto-Ángel, D. (2008). Virulence and Genetic Variation of Isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc. on Mango (*Mangifera indica* L.) cv. Haden. *Revista Mexicana De Fitopatología*. **26** (1):21-26

Shaaya, E., Rafaeli, A. (2007). Essential Oils as Biorational Insecticides-Potency and Mode of Action. En: *Insecticides Design using Advanced Technologies*, Ishaaya, A., R. Neuen and A.R. Horowitz (Eds.). Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp: 249-261

Travisi, C., Nijkamp, P. (2008). Valuing environmental and health risk in agriculture: A choice experiment approach to pesticides in Italy. *Ecological Economics*, **67**(4): 598-607.

Yañez-Rueda X, Pérez O, Meza H. (2010). Actividad larvica del aceite esencial foliar de *Eucalyptus globulus* contra *Aedes aegypti* Linnaeus. *Bistua: Revista De La Facultad De Ciencias Básicas*. **8**(1):71-77.

Zhang, W., McAuslane, H., Schuster, D. (2004). Repellence of Ginger Oil to *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) on Tomato». *Journal of Economic Entomology*. **97** (4):1310-1318



Especialización en Biotecnología Vegetal

Estudio preliminar de los hongos del suelo en bosques de *Polylepis* y pastizales de zonas aledañas al PNC, Ecuador.

Ansaloni, R^{1*}, Segovia, E¹.

¹Universidad del Azuay. Laboratorio de Biotecnología de Productos Naturales.
Avda. 24 de Mayo 777 y Hernán Malo. Cuenca, Ecuador.

*ransaloni@uazuay.edu.ec

RESUMEN

Debido a que los bosquetes de *Polylepis* son los únicos remanentes de vegetación leñosa en el páramo y que cumplen un papel ecológico importantísimo como refugio para muchas especies y como reservorio de agua, su conservación es indispensable. Se estudió la *Mycota* presente en suelos de zonas aledañas al Parque Nacional Cajas, Azuay, provenientes de bosquetes de *Polylepis* y de los pastizales aledaños al bosque; se generó información de base sobre la presencia de microorganismos saprófitos, parásitos, potenciales micorrizas etc. que puedan afectar o beneficiar a las plantas atacadas por la plaga. Los hongos encontrados fueron muy variados, identificándose tres géneros prevalentemente saprófitos y potencialmente útiles, como son *Trichoderma*, *Cephalosporium* y *Rhizopus*. Los resultados preliminares permitieron establecer que los ataques de fitófagos sobre *Polylepis* no son relacionados a la presencia hongos fitopatógenos.

PALABRAS CLAVE: *Polylepis*, hongos saprófitos, *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Rhizopus*

ABSTRACT

Because *Polylepis* are the only remnants of woody vegetation in the paramo ecosystems and play an important ecological role as a refuge for many species and as a reservoir of water, its conservation is essential. Mycota of the soils near to the Parque Nacional Cajas, Azuay, were studied, both in *Polylepis* and pastures bordering the forest. Baseline information was generated about the presence of saprophytic microorganisms, parasites, and mycorrhizae, which may affect or benefit the plants attacked by the plague. The fungi found were very varied, identifying three genera predominantly saprophytic and potentially useful, such as *Trichoderma*, *Cephalosporium* and *Rhizopus*. Preliminary results allowed establishing that phytophagous attacks on *Polylepis* are not related to the presence of pathogenic fungi.

KEYWORDS: *Polylepis*, saprophytic fungi, *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Rhizopus*

1. Introducción:

El género *Polylepis* representa la vegetación leñosa dominante de los ecosistemas de páramo. Su distribución actual es reducida a pequeños bosquetes, fruto de las quemadas, pastoreo y de particulares condiciones edáficas, que han permitido su conservación sólo en áreas pequeñas, escarpadas y poco accesibles. Los bosquetes de *Polylepis* albergan a muchas especies, tanto vegetales como animales, y cumplen un papel fundamental para la retención hídrica y el microclima, siendo ecosistemas únicos e importantísimos, y altamente amenazados, tanto por la actividad humana como por el cambio climático (1).

Durante los últimos años se ha registrado la presencia de una plaga particularmente agresiva, en los bosquetes de *Polylepis incana* y *Polylepis weberbaueri*, ubicados en la zona de Soldados, límite sur-este del PNC. El insecto es una forma larvaria y pertenece al orden Lepidoptera y familia Geometridae. Segovia (Com. Pers. 2013) lo ha identificado como *Eois* sp. Subfamilia Sterrhinae probablemente ha sido introducido a los pastizales aledaños de la zona, por el hombre. En las colectas realizadas durante el presente estudio se observó además un crisomélido, Subfamilia Halticinae, en los puntos de colección 3 y 4.

Este primer estudio de los hongos presentes en el suelo de los bosquetes de *Polylepis* así como de los pastizales aledaños, pretende producir información de base sobre la presencia de microorganismos saprófitos, parásitos, potenciales micorrizas etc. que puedan afectar o beneficiar a las plantas atacadas por la plaga. A partir de esta primera descripción de la Mycota presente, se podrá investigar sobre: 1. Hongos fitopatógenos, que puedan debilitar las plantas y favorecer el ataque de insectos, 2. Hongos entomopatógenos, que ayuden a eliminar la plaga y 3. Micorrizas que favorezcan la nutrición de la planta y su establecimiento en los suelos de páramo.

2. Metodología:

2.1 Fase de Campo

Para realizar este primer screening se diseñó un muestreo estratificado, con 5 muestras dentro del bosque de *Polylepis* y 5 muestras en el pastizal aledaño. Las muestras se tomaron a 500 m de distancia en el sentido de máxima longitud del parche, en los puntos 0, 500, 1000, 1500 y 2000 metros. En la parte externa al bosque, que tiene una vegetación herbácea introducida con dominancia de *Pennisetum clandestinum* y es empleado como pastizal, se tomaron las muestras a las mismas distancias.

Identificación	Distancia	Formación vegetal	Coordenadas	Altitud
POL1	0	Bosque Polylepis	17696887 9674848	3297 m 3297 m
PA1	0	Pastizal	17696887 9674848	3297 m 3297 m
POL2	500	Bosque Polylepis	17696151 9673585	3345 m
PA2	500	Pastizal	17696151 9673585	3345 m
POL3	1000	Bosque Polylepis	17695648 9672666	3407 m
PA3	1000	Pastizal	17695648 9672666	3407 m
POL4	1500	Bosque Polylepis	17695753 9672369	3439 m
PA4	1500	Pastizal	17695753 9672369	3439 m
POL5	2000	Bosque Polylepis	17695648 9672759	3392 m
PA5	2000	Pastizal	17695648 9672759	3392 m

Cuadro 1: Ubicación de puntos de muestreo de suelos en bosques de *Polylepis* y pastizales del PNC.

1.1 Fase de laboratorio

Las muestras del suelo fueron disueltas en agua destilada y se procedió a realizar diluciones seriales, para su siembra en el medio de cultivo agar-papa, cuya formulación es la siguiente: 20 g de agar-agar, 20 g de puré de papa y 15 g de

glucosa. Las pruebas se realizaron en concentraciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} e incubadas a 27°C por una semana.

Los micelios que crecieron y se consideraron de interés, se repicaron por duplicado en medio con Nistatina, para evitar el crecimiento de levaduras, y nuevamente se incubaron. Todos estos procesos se llevaron a cabo en condiciones de asepsia en cámara de flujo laminar. Los hongos se describieron e identificaron mediante crecimiento en cámara húmeda y uso del microscopio óptico.

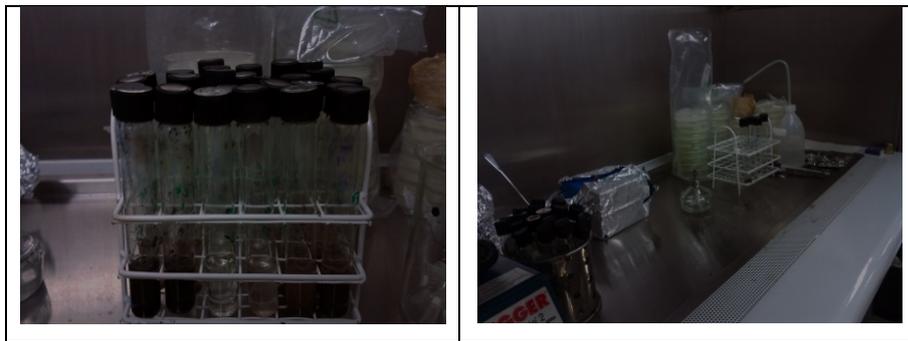


Fig. 1: Condiciones experimentales para el repique de muestras y obtención de aislados fungales.

4. Resultados

En todas las muestras crecieron micelios, sin embargo las diluciones 10^{-4} mostraron un escaso crecimiento. Las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} fueron las de mejor abundancia de hongos.

Las muestras repicadas a medio agar-papa más Nistatina se presentan a continuación:

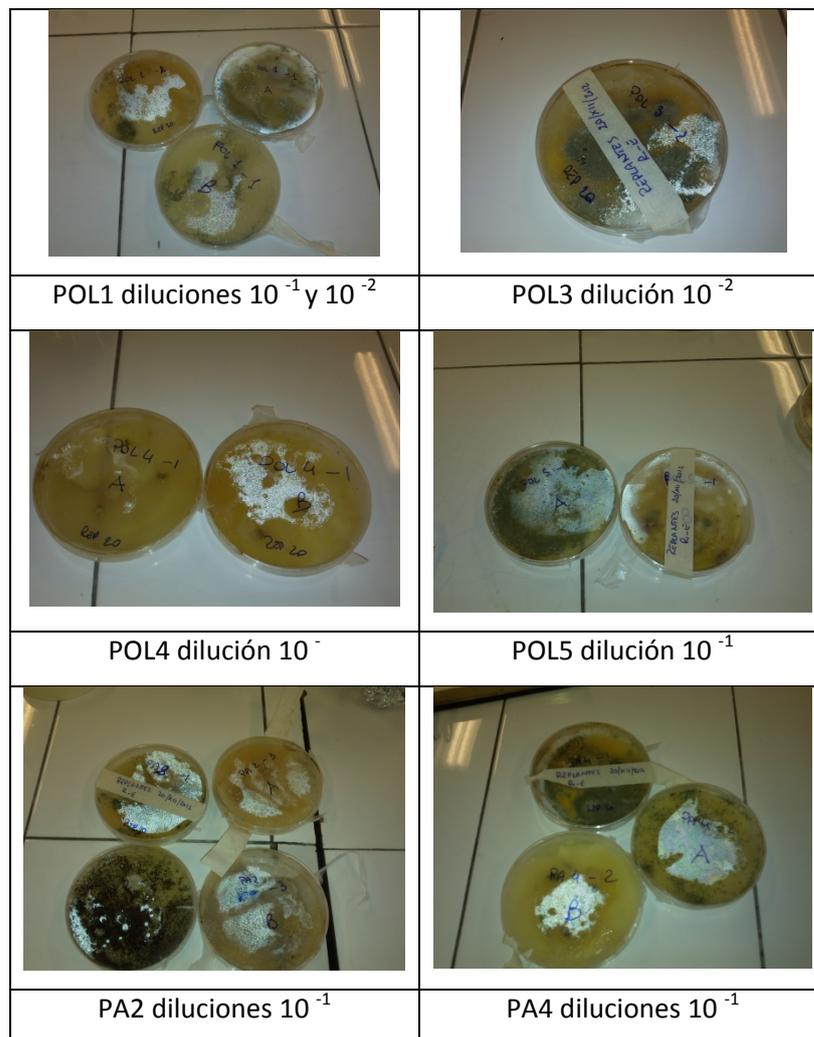


Fig. 2. Obtención de aislados fungales a partir de muestras de suelo.

Se seleccionaron 8 hongos para su identificación mediante cámara húmeda, pero sólo 4 se consideraron importantes y se identificaron hasta género, mediante claves.



Fig. 3: Crecimiento de aislados fungales en cámara de humedad

Los hongos identificados fueron (2) (3) (8).

Trichoderma spp. Provenientes de las muestras POL1 y POL3

Cephalosporium sp. Proveniente de la muestra POL5

Rhizopus spp. Proveniente de la muestra PA2 (ver Fig. 2)

5. Discusión

La Mycota de los suelos alto andinos ha sido escasamente estudiada, las pocas investigaciones sobre hongos asociados a *Polylepis* se han realizado en el sur del continente y se han enfocado casi exclusivamente a *Basidiomycota*. Por esta razón resulta complejo comparar y discutir los resultados preliminares obtenidos en este estudio básico. (7).

A lo largo de los 2 km de bosques no cambia el tipo de suelo, que es negro, suave, limoso, con profundidad entre los 45 y 80 cm, húmedo pero no saturado de agua en la época de muestreo. En el pastizal observamos suelos con las mismas características pero compactados y, esporádicamente, erosionados. Esto se evidencia no sólo por la observación de campo, estudios anteriores confirman que los suelos de las zonas altas de la cuenca del río Paute tienen niveles muy altos de materia orgánica, alta porosidad, pH ácido o muy ácido, poco fósforo disponible, poca resistencia al pisoteo y a la labranza. Su profundidad depende de la topografía y vegetación, siendo mayor en valles bajo vegetación leñosa y menor en las cimas, bajo vegetación herbácea. Las características de porosidad y por lo tanto de

capacidad de retención hídrica, asociadas a la velocidad de infiltración que poseen, hacen de estos suelos verdaderos reservorios de agua. Contemporáneamente, el contenido en materia orgánica de estos suelos supera con frecuencia el 20%, determinando además de la alta capacidad de retención hídrica, también una alta retención de carbono orgánico. (6).

Los hongos encontrados en los suelos de pastizal y de *Polylepis* no presentan sustanciales diferencias, ni según su ubicación, ni según el tipo de vegetación. Sin embargo se observa una mayor diversidad de micelios en *Polylepis*, comparado con el pastizal, que confirma lo encontrado en estudios efectuados en los páramos de Colombia con respecto a *Basidiomycota* y *Ascomycota*. No existen anteriores estudios sobre hongos imperfectos.

Debido a la naturaleza de este estudio preliminar, se cultivaron en cámara húmeda solo los micelios potencialmente interesantes, tanto fitopatógenos como benéficos. Para ninguno de ellos se pudo determinar con certeza su naturaleza, debido a que se identificaron sólo hasta género. Los tres taxa determinados contienen prevalentemente especies saprófitas. (2) (7).

Trichoderma Pers.: Es un género que contiene especies casi exclusivamente saprófitas, tanto del suelo como de la madera, muy comunes en todo tipo de suelo; la especie más conocida es *T. viride*, que parece ser la presente en las muestras analizadas. (2) (3). Estudios efectuados en Venezuela demuestran el potencial que tienen algunas especies de este género para el control de hongos fitopatógenos (4) (10).

El género *Cephalosporium* Corda.: Presenta en el suelo tanto especies saprófitas como parásitas, causantes del marchitamiento o muerte descendiente de algunas especies leñosas. No se pudo determinar la naturaleza de la especie encontrada, sin embargo los árboles no presentan síntomas que lleven a suponer la presencia de especies fitopatógenas, que debiliten la planta y la hagan más propensa a sufrir el ataque de insectos.



Fig. 4: *Polylepis weberbaueri* de la zona estudiada, no evidencia síntomas de ataque fungal.

Rhizopus Ehrenberg: Es un género de moho común que incluye muchas especies filamentosas del suelo, donde viven saprofiticamente sobre restos vegetales y animales. Son importantes agentes de daño a los alimentos, en otros casos se usan en fermentaciones para las preparaciones alimentarias, sin embargo no existen especies reportadas como fitopatógenas, En cambio, algunas especies de este género manifiesta una marcada actividad antibacteriana, importante por sus efectos contra *Staphylococcus aureum*. (5) (8) (9) (11).

Estos datos no permite concluir que los ataques de fitófagos sobre *Polylepis* sean favorecidos por hongos fitopatógenos, No se han observado hongos patógenos en el suelo, ni síntomas de ataques en la parte aérea de los árboles. Por lo contrario, la presencia de una equilibrada microflora favorece el buen crecimiento de estas plantas. La Mycota encontrada en el suelo de *Polylepis* es diversa, prevalentemente saprófita y no se observan hongos peligrosos que puedan haber migrado desde el pastizal, en el cual, de la misma manera, prevalecen hongos no fitopatógenos.

Estudios posteriores deberán enfocarse a la búsqueda de hongos entomopatógenos, que ayuden a eliminar las plagas que atacan prevalentemente *Polylepis*, y de micorrizas, que favorezcan la nutrición de la planta y su establecimiento en los suelos de páramo.

6. Agradecimientos

Los autores agradecen la asesoría científica de la Dra. María Elena Cazar en la puesta a punto de técnicas de aislamiento de hongos. Las facilidades del Laboratorio de Biotecnología de Productos Naturales de la Universidad del Azuay son reconocidas.

7. Referencias Bibliográficas

- 1) Baquero, F., Sierra, R., L. Ordóñez, M. Tipán, L. Espinosa, M. B. V. Rivera y P. Soria. (2004) La vegetación de los Andes del Ecuador. Memoria explicativa de las mapas de vegetación: potencial y remanente a escala 1:250.000 y del modelamiento predictivo con especies indicadoras. Eco-Ciencia/CESLA/Corporación EcoPar/MAG SIGAGRO/CDC-Jatunsacha/División Geográfica- IGM. Quito.
- 2) Barnett, H., Hunter, B. (1972) Illustrated genera of imperfect fungi. Third ed., Burgess publishing company, USA.
- 3) Samuels, G.J., Chaverri, P., Farr, D.F., & McCray, E.B. *Trichoderma* Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved June 2, 2013, from /taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm.
- 4) Stefanova, M., Leiva, A., Larrinaga, L., & Coronado, M. F. (1999). Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. *Revista Facultad de Agronomía*, 16, 509-516.
- 5) Moratto, C., Martínez, L. J., Valencia, H., & Sánchez, J. (2005). Efecto del uso del suelo sobre hongos solubilizadores de fosfato y bacterias diazotróficas en el páramo de Guerrero (Cundinamarca). *Agronomía Colombiana*, 23(2), 299-309.
- 6) Buytaert W., S. J. (2005). Clay mineralogy of the soils in the south Ecuadorian páramo region. *Geoderma* , 114– 129.
- 7) Forest, H., Toro, J. D. S., González, J. A. A., & Sáenz, M. S. (2011). Registro Preliminar de Macrohongos (Ascomycetes y Basidiomycetes) en el Bosque Húmedo Montano del Alto El Romeral (Municipio de Angelópolis, Departamento de Antioquia-Colombia). *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*, 64(2), 6159-6174.
- 8) Foody E., Tong C. (2012) [Organism Research and Creative Story Telling](#). Ashbury College School, Ottawa, Canada.

- 9) <http://zygomycetes.org/index.php?id=70>
- 10) <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>
- 11) <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/667/cap8.pdf>



Especialización en Biotecnología Vegetal

Evaluación de mezclas de aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis*), arrayán (*Myrceugenella apiculata*) y menta (*Mentha pulegium*), como biocontroladores de *Fusarium sp.*

Criollo, F¹., Vásquez, P¹., Vallejo, Y¹, Cazar-Ramírez, A^{1*}.

¹Universidad del Azuay. Laboratorio de Biotecnología de Productos Naturales.

Avda. 24 de Mayo 777 y Hernán Malo. Cuenca, Ecuador.

*acazar@uazuay.edu.ec

RESUMEN

El género *Fusarium* agrupa a especies de hongos fitopatógenos de alta agresividad y especificidad. El proceso de infección sistémica generado en los hospederos produce grandes pérdidas en los cultivos atacados debido a la limitada eficiencia de los controles químicos.

En el presente trabajo se evaluó la bioactividad de mezclas de aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis*), arrayán (*Myrceugenella apiculata*) y menta (*Mentha pulegium*). Las mezclas fueron desarrolladas mediante un diseño experimental Simplex-Lattice y evaluadas como inhibidores del crecimiento de *Fusarium*. La mejor bioactividad fue presentada por la mezcla de aceites esenciales de romero y menta en proporción 1:1 (CIM: 62,5 µL/mL).

El desarrollo de bioensayos “in vitro” asociado al diseño de experimentos permite explorar el potencial de mezclas bioactivas de aceites esenciales, generando un efecto sinérgico, que incrementa su efectividad biocontroladora de patógenos vegetales.

PALABRAS CLAVE: *Fusarium*, biocontrol, aceites esenciales

ABSTRACT

The gender *Fusarium* comprises several species of phytopathogenic fungi, highly aggressive and target specific. The systemic infection process developed in the hostess generates important economic losses due to the limited efficiency of chemical controls.

This research evaluated the bioactivity of essential oils mixtures from romero (*Rosmarinus officinalis*), arrayan (*Myrceugenella apiculata*) and mint (*Mentha pulegium*). The mixtures were formulated according to a Simplex-Lattice experimental design and evaluated as inhibitors of *Fusarium* growth. The mixture which displayed the highest bioactivity was formulated with rosemary and mint essential oils in a proportion 1:1 (CIM: 62,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$).

The development of “in vitro” bioassays, hyphenated with experimental design allowed us to explore the formulation of bioactive mixtures from essential oils. A synergistic effect displayed enhances the biocontrol effect towards plant pathogens.

KEYWORDS: *Fusarium*, biocontrol, essential oils,

1. Introducción

Los hongos del género *Fusarium* causan grandes pérdidas a nivel agrícola pudiendo disminuir la productividad si no son controlados a tiempo. Estos saprofitos se encuentran principalmente en el suelo, no obstante pueden convertirse en patógenos especializados, según las plantas hospederos que afecten. El género *Fusarium* fue descrito por primera vez en el año 1895. Este habitante natural del suelo es capaz de entrar por los vasos del xilema, produciendo esporas que son transportadas por el flujo de savia. La planta genera, en respuesta a la infestación, gel de tilosa, el cual aísla a las esporas en las paredes de los vasos perforados del tejido vegetal. Pero las esporas germinan y las hifas crecen a través de las perforaciones para producir nuevas esporas. El xilema es rápidamente colonizado, generando los síntomas característicos de la enfermedad. Las hojas antiguas se tornan amarillentas en los márgenes y mueren progresivamente, el tejido vegetal decae y la planta muere debido a esta infección fúngal (Ingle e Ingle, 2013).

La obtención de aislados de *Fusarium* puede realizarse con estrategias microbiológicas. La morfología de las colonias de *Fusarium* es muy variable y se caracteriza por la producción de abundante micelio aéreo, algodonoso, con una coloración variable, de blanco a rosado durazno, pero usualmente con un tinte púrpura o violeta más intenso en la superficie del agar. (Garcés *et al*, 2001). La resistencia varietal a *Fusarium*, puede variar en función de las condiciones ambientales, existiendo una correlación entre la tolerancia del hongo y el nivel de contaminación del suelo y el ambiente. (García, 2008).

Actualmente la agricultura orgánica se presenta como una alternativa válida al manejo tradicional de los cultivos, debido a que el uso indiscriminado de agroquímicos genera problemas como intoxicaciones en el ser humano, contaminación ambiental y degradación de los ecosistemas. En este trabajo se presentan alternativas para el control de *Fusarium* con mezclas de aceites esenciales. Los aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos volátiles, caracterizadas por un aroma característico y formadas por mezclas de metabolitos secundarios vegetales (Bakkali *et al.*, 2008). Los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales son cadenas carbonadas de entre 7 y 20 átomos de carbón. Los más comunes son los monoterpenos; las moléculas más volátiles son aquellas que tienen menor número de carbonos pero no hidrosolubles, por el contrario un elevado

número de carbonos se hacen un poco más volátiles forman resinas. (Romero-Márquez, 2004).

Existen varias técnicas que permiten extraer aceites esenciales de diferentes partes de las especies aromáticas, incluyendo hidrodestilación, arrastre de vapor, extracción con solventes, expresión y extracciones con fluidos supercríticos (Edris, 2007). Los aceites esenciales forman parte de una serie de productos fitoquímicos que tienen propiedades preventivas o protectoras de enfermedades de cultivos. Los fitofungicidas constituyen una alternativa al uso de productos de síntesis química y constituyen una prioridad de investigación en ciencias agrícolas. Por consiguiente, es importante encontrar estrategias prácticas, no tóxicas y efectivas para prevenir la contaminación fúngica en cultivos y la proliferación de micotoxinas en fase de post-cosecha. Además, las regulaciones del uso de pesticidas químicos se vuelven cada vez más estrictas, dada la preocupación generada por los efectos adversos en el ambiente y poblaciones no objetivo (Anjorin *et al.*, 2013).

2. Metodología

2.1 Obtención de aislados de *Fusarium sp.* y preparación de inóculos

Los ejemplares de *Fusarium sp.* utilizados en este estudio fueron obtenidos del cepario de hongos del Laboratorio de Biotecnología de Productos Naturales de la Universidad del Azuay. El género de los aislados fue verificado en la Estación “Santa Catalina” del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, INIAP.

Los aislados de *Fusarium* fueron repicados en medio PDA (Puré de papas 2%; Glucosa 2%; Agar 1.5%). Las placas colonizadas completamente por micelio fueron utilizadas para recolección de esporas. Este proceso se realizó bajo cámara de flujo laminar. Las esporas fueron recolectadas transfiriendo los conidios en agua destilada con la ayuda de un asa. La solución de esporas se transfirió asépticamente a tubos eppendorf estériles, los cuales fueron almacenados a -8°C.

2.2 Recolección de material vegetal y obtención de aceites esenciales.

Para estudiar el potencial de mezclas de aceites esenciales en el control de *Fusarium* se escogieron las siguientes especies vegetales: romero (*Rosmarinus officinalis*), arrayán (*Myrceugenella apiculata*) y menta (*Mentha pulegium*). Las partes aéreas de

las especies incluidas en el presente estudio fueron recolectadas en zonas rurales del Cantón Cuenca, Azuay, Ecuador. En el laboratorio, el material vegetal fue limpiado y seleccionado, eliminando hojas y tallos con síntomas de enfermedades. El material vegetal se sometió a un proceso de hidrodestilación en un equipo de extracción por arrastre de vapor (Albrigi Luigi). Los aceites esenciales fueron recolectados en viales cónicos y centrifugados a 5000 rpm para eliminar residuos acuosos. Posteriormente, los aceites fueron almacenados en frascos ámbar y protegidos de la luz hasta el desarrollo del bioensayo.

2.3 Diseño de mezclas de aceites esenciales.

Para probar la efectividad de mezclas de aceites esenciales ante aislados de *Fusarium* se aplicó un diseño de mezclas Simplex-Lattice. Se desarrollaron tres mezclas binarias y una mezcla terciaria de los aceites incluidos en el estudio. A continuación se presentan las proporciones aplicadas para el desarrollo de las mezclas

Mezclas	Aceites esenciales		
	<i>R. officinalis</i>	<i>M. apiculata</i>	<i>M. pulegium</i>
1	50%	50%	-
2	-	50%	50%
3	50%	-	50%
4	33.3%	33.3%	33.3%

Cuadro 1: Diseño de mezclas de aceites esenciales

2.4 Actividad antifúngica de aceites esenciales ante *Fusarium* sp.

La evaluación de la actividad inhibitoria del crecimiento de *Fusarium* sp. de aceites esenciales fue desarrollada de acuerdo a la metodología descrita por Cazar *et al.*, (2005). Las mezclas de aceites esenciales fueron diluidas (1:1) en el medio mínimo Czapeck y homogeneizados mediante agitación. La solución de aceites fue colocada en la primera columna de una placa de microdilución de 96 pocillos. Una microdilución se desarrolló en la placa, en la cual se incluyeron controles de esterilidad y de crecimiento del microorganismo de prueba. Posteriormente, se inocularon todos los pocillos, a excepción de los controles de esterilidad, con una solución acuosa de concentración 1×10^6 esporas / mL. Las placas preparadas según el

esquema descrito fueron incubadas por un período de 96 horas. Posteriormente, la concentración inhibitoria mínima CIM fue determinada como la concentración que inhibe visiblemente el crecimiento micelial de *Fusarium* sp. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

2.5 Composición química de aceites esenciales

Se realizó un análisis gascromatográfico para determinar la composición de los aceites en estudio. Este análisis fue desarrollado en el Instituto de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja. Se utilizó un gascromatógrafo Hewlett-Packard, Modelo 6890, equipado con una FID. El análisis se realizó en un gradiente de temperatura de 50°C a 270°C. Los constituyentes fueron identificados por comparación de sus espectros de masas con los de la base de datos Wiley /n.1. Los resultados obtenidos fueron correlacionados con los índices de retención. El área de las señales, en porcentaje, fue obtenida electrónicamente de la respuesta del detector GC-FID.

4. Resultados

4.1 Rendimiento de extracción de aceites esenciales

El rendimiento de obtención de aceites esenciales fue estimado en función del volumen de aceite esencial obtenido por kilogramo de material vegetal de partida. Los resultados obtenidos se presentan en el siguiente cuadro:

	Peso de material vegetal (Kg)	Volumen aceite esencial (mL)	Rendimiento (%)
<i>R. officinalis</i>	2,8	10	3.57
<i>M. apiculata</i>	1,9	5	2.63
<i>M. pulegium</i>	1,5	3	2.00

Cuadro 2: Rendimiento de obtención de los aceites esenciales incluidos en el presente estudio.

Los resultados obtenidos señalan a *R. officinalis* como la especie con mayor rendimiento de producción de aceite esencial.

4.2 Actividad biocontroladora de mezclas de aceites esenciales ante *Fusarium* sp.

La revisión del bioensayo permitió determinar las concentraciones inhibitorias (CIM) del crecimiento de *Fusarium* de las mezclas bioactivas. Las mezclas en estudio presentaron valores de CIM entre 125 y 62.5 uL/mL. Los resultados se presentan a continuación:

Mezcla bioactiva	1	2	3	4
CIM (uL/mL)	125	125	62.5	125

Cuadro 3: Concentración inhibitoria mínima de mezclas bioactivas de aceites esenciales.

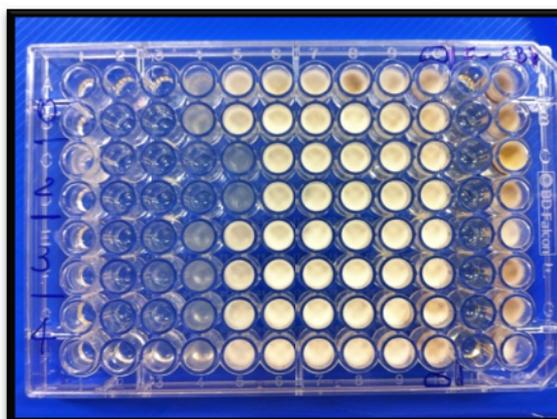


Figura 1: Bioensayo de inhibición del crecimiento de *Fusarium* sp. por mezclas de aceites esenciales

4.3 Composición química de aceites esenciales de romero, arrayán y menta.

Los componentes mayoritarios de los aceites incluidos en esta investigación se presentan a continuación:

Componente	<i>R. officinalis</i>	<i>M. apiculata</i>	<i>M. pulegium</i>
α -pinene	4.20	10.17	0.37
α -thujene	1.35	15.83	2.75
Camphene	3.70	-	-
β -pinene	1.60	5.31	0.32
Sabinene	0.36	-	0.49
Myrcene	17.87	1.16	1.74
1-phellandrene	-	0.16	-
α -terpinene	0.75	1.40	1.02
Limonene	2.08	3.25	0.91
1-8 cineole	-	18.32	-
Eucalyptol	10.21	-	-
Cis-ocymene	2.01	-	0.57
δ -terpinene	1.56	-	3.59
trans- β -ocymene	-	-	1.65
m-cymene	-	-	8.61
menthone	-	-	0.24
trans-sabinene-hydrate	-	-	0.42
α -terpinenolene	0.75	-	-
α -copaene	0.30	-	0.29
Camphor	25.42	-	-
Linalool	1.29	10.31	0.38
Bornyl acetate	4.41	-	-
β -cariophyllen	10.71	-	7.25
Terpinene-4-ol	0.93	-	0.35
α -humulene	3.13	-	0.48
Germacren D	-	-	0.71
cis-carvone-oxide	-	-	0.98
Piperitone	-	-	3.42
δ -cadinene	0.66	-	-
Borneol	1.51	-	-
α -terpineol	1.71	5.26	-
cis-myrtanol	-	-	-
byciclogermacren	-	1.32	8.19
Nerolidol B	-	0.96	-

γ -cadinene	1.03	-	0.31
Thymol acetate	-	-	0.72
Carvacryl acetate	-	-	23.52
Caryophyllene oxide	1.46	2.14	0.18
Piperitenone oxide	-	-	3.22
(+)spatulanol	-	-	0.18
Thymol	-	-	1.82
Carvacrol	-	-	20.79

Cuadro 4. Composición de los aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis*), arrayán (*Myrceugenia apiculata*) y menta (*Mentha pulegium*) en porcentaje. -: no detectado

5. Discusión

Los organismos fitopatógenos incluyen hongos, nematodos, bacterias y virus, los cuales pueden causar enfermedades o daños en especies vegetales. Entre estos patógenos, los hongos son el grupo principal que causa enfermedades en plantas, siendo éstos los responsables de pérdidas en el rendimiento de numerosos cultivos de importancia económica (Chang *et al.*, 2008).

El género *Fusarium* es un habitante del suelo ampliamente distribuido en los ecosistemas. Algunas especies de este género son económicamente relevantes, ya que, además de su habilidad de infectar u causar destrucción de tejidos de cultivos importantes como el maíz, trigo y otros granos en campo, son capaces de producir micotoxinas en cultivos y en granos almacenados (Hashem *et al.*, 2010).

Las plantas aromáticas son utilizadas en medicina tradicional como agentes antimicrobianos y sus aceites esenciales son conocidos por sus actividades antibacterianas y antifúngicas. Estos agentes antimicrobianos son mezclas de diferentes sustancias lipofílicas y volátiles, como monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanoides, con un agradable olor. Además, son considerados parte del sistema de defensa preformado de las plantas superiores (Reichling *et al.*, 2009).

La aplicación de aceites esenciales como estrategias de control biológico constituye una alternativa biológicamente segura para reducir la contaminación ambiental

debida a la aplicación indiscriminada de pesticidas de síntesis química. Existen reportes previos de la actividad de aceites esenciales ante aislados de *Fusarium*. Las investigaciones realizadas por Hashem *et al.*, (2010) presentan los efectos inhibitorios del crecimiento de cepas de *Fusarium* de los aceites esenciales de geranio y albahaca. Se trata de una interesante evidencia para respaldar el fundamento de este trabajo, en el cual se plantea que los aceites esenciales en mezclas pueden controlar eficientemente el crecimiento del patógeno objetivo, *Fusarium* sp.

En la presente investigación se identifican 24 compuestos en el aceite de romero. El resultado del análisis GC-MS señala como mayoritarios al alcanfor (25.42%), mirceno (17.87%) y eucaliptol (10.21%). Nuestros resultados difieren con reportes previos de composición de aceite esencial de romero. Gachkar *et al.*, (2007), reportan la composición de aceite de romero proveniente de Irán; el cual tiene como compuestos mayoritarios a α -pineno, borneol, canfeno, alcanfor, verbenona y bornil acetato. No obstante, los autores reportan una fuerte actividad antibacteriana de este aceite ante bacterias contaminantes de alimentos. La composición de los aceites esenciales suele estar influenciada por las condiciones ambientales, la altitud y la estación del año a la cual se recolecta el material vegetal.

El aceite de menta tiene como compuestos mayoritarios al acetato de carvacrilo (23.52%), carvacrol (20.79%) y biciclogermacreno (8.19%). Nuestros resultados difieren de lo reportado por Stoyanova *et al.*, (2005). En este trabajo, el análisis por GC-MS del aceite de *M. pulegium* revela como mayoritarios a pulegona, piperitenona e isomentona. En la revisión bibliográfica realizada no se encontraron reportes de composición de aceite de arrayán. A nuestro mejor conocimiento, se reporta por primera vez la composición de aceite esencial de *Myrceugenella apiculata*, proveniente de la Sierra Sur Ecuatoriana.

La mezcla bioactiva **3** (50% *R. officinalis*, 50% *M. pulegium*) presenta la CIM más baja (62,5 uL/mL). Se trata de un resultado promisorio que valida la estrategia de formulación de mezclas en el desarrollo de biocontroladores de fitopatógenos. No obstante, es necesario realizar experimentos en el campo con el fin de probar la efectividad de la mezcla bioactiva y su persistencia ante agentes ambientales como luz, humedad y temperatura. El uso de aceites esenciales puede formar parte de una estrategia de control integrado de plagas, con el fin de conservar y proteger el ecosistema agrícola de la agresión de los pesticidas químicos.

6. Agradecimientos

Los autores agradecen la asesoría científica de la Dra. María Elena Cazar en el desarrollo de bioensayos e interpretación de espectros de masas. Las facilidades del Laboratorio de Biotecnología de Productos Naturales de la Universidad del Azuay son reconocidas. Además, expresamos nuestro agradecimiento a la Universidad Técnica Particular de Loja y a la asesoría del Dr. Omar Malagón, en el establecimiento de la composición química de los aceites esenciales por GC-MS.

7. Referencias Bibliográficas

- Anjorin, T., Adebayo, E., Makun, H. (2013). Control of toxigenic fungi and mycotoxins with phytochemicals: potential and challenges, en: *Mycotoxin and Food Safety in Developing Countries*. Dr. Hussaini Makun (Ed.), ISBN: 978-953-51-1096-5, InTech, DOI: 10.5772/53477. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/mycotoxin-and-food-safety-in-developing-countries/control-of-toxigenic-fungi-and-mycotoxins-with-phytochemicals-potentials-and-challenges> (Visitado en Mayo de 2013)
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, **46** (2): 446-475
- Cazar, M. E., Schmeda-Hirschmann, G., Astudillo, L. (2005). Antimicrobial butyrolactone I derivatives from the Ecuadorian soil fungus *Aspergillus terreus* Thorn. var *terreus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **21**(6-7):1067-1075.
- Chang, H., Cheng, Y., Wu, C., Chang, S., Chang, T., Su, Y. (2008). Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Calocendrus macrolepis* var. *formosana* Florin leaf against plant pathogenic fungi. *Bioresource Technology*, **99**: 6266 – 6270
- Edris, A. (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Research*. **21**: 308-323

Gachkar, L., Yadegani, D., Bagher, M., Taghizadeh, M., Alipoor, S., Rasooli, I. (2007). Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinum officinalis* essential oils. *Food Chemistry*. **102**(3): 898 – 904

Garcés, E., Orozco, M., Bautista, G., Valencia, H. (2001). *Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta conocer. *Acta Biológica Colombiana*. **6**(1): 7-25

García, A. (2008). Etiología, epidemiología y control no químico de las enfermedades edáficas del cultivo de clavel en invernadero de la costa noroeste de Cádiz. Tesis para optar al grado de Doctor en Agricultura Protegida. Universidad de Almería, España.

Hashem, M., Moharam, A., Zaied, A., Saleh, F. (2010). Efficacy of essential oils in the control of cumin root rot disease caused by *Fusarium* spp. *Crop Protection* **29**: 1111-1117

Ingle, A., Ingle, R. (2013). Isolation and identification of *Fusarium oxysporum*. Infecting Musa plants in Maharashtra region and their molecular characterization. *Asian Journal of Biotechnology Resources*. **4**(1):28-34

Reichling, J., Schnitzler, P., Suschke, U., Saller, R. (2009). Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties—an overview. *Forschende Komplementärmedizin/Research in Complementary Medicine*, **16**(2):79-90.

Romero-Márquez, D. (2004). Plantas Aromáticas. Tratado de Aromaterapia Científica. Kier Editorial. Argentina. 222 pp.

Stoyanova, A., Georgiev, E., Kula, J., Madja, T. (2005). Chemical Composition of the Essential Oil of *Mentha pulegium* L. from Bulgaria. *Journal of Essential Oil Research*, **17** (5):475 - 476



Especialización en Biotecnología Vegetal

Caracterización Nutricional y Actividad Antioxidante de *Macleania rupestris* (Joyapa) y *Vaccinium floribundum* Kunth (Mortiño).

Jara, A¹, Quiroz, T¹, Cazar, M.E^{1*}.

¹Universidad del Azuay. Laboratorio de Biotecnología de Productos Naturales.

Avda. 24 de Mayo 777 y Hernán Malo. Cuenca, Ecuador.

mcazar@uazuay.edu.ec

Resumen

En la Sierra Sur Ecuatoriana se desarrollan especies frutales endémicas, que crecen de manera silvestre y que han sido utilizadas ancestralmente con fines alimenticios y ceremoniales. Existe interés en caracterizar el potencial nutricional y actividad biológica de especies con escasos estudios científicos, como joyapa (*Macleania rupestris*) y mortiño (*Vaccinium floribundum*). El presente estudio propuso evaluar la actividad antioxidante y caracterizar nutricionalmente a las especies mencionadas mediante la cuantificación de su contenido fenólico, y concentración de ácido ascórbico. Los parámetros obtenidos, asociados con la actividad antioxidante de los frutos en estudio, permiten establecer el potencial de estos frutos nativos. En este trabajo se reporta por primera vez, parámetros nutricionales y de actividad biológica de *Macleania rupestris*.

Palabras clave: *Macleania rupestris*, *Vaccinium floribundum*, actividad antioxidante, compuestos fenólicos, vitamina C

Abstract

Several endemic fruits grow in wild state, and have been used since our ancestors for food and ceremonials. The nutritional potential and biological activity of this species is a main field of study, due to scarce studies of plants as joyapa (*Macleania rupestris*) and mortiño (*Vaccinium floribundum*). The present work aimed to evaluate the antioxidant activity and present the nutritional characterization of the included species, by means of the phenolic content and ascorbic acid concentration. These parameters were related with the antioxidant activity of the studied fruits. To our best knowledge, this is the first report of nutritional parameters and biological activity of *Macleania rupestris*.

Keywords: *Macleania rupestris*, *Vaccinium floribundum*, antioxidant activity, phenolic compounds, vitamin C

1. Introducción

La importancia de la oxidación como mecanismo agresor a los sistemas biológicos es ampliamente reconocida. Los cambios oxidativos incluyen la acción de radicales libres, la cual tiene efectos celulares destructivos *in vivo*, mientras los procesos oxidativos en alimentos resultan en el deterioro del sabor y la calidad nutricional, afectando la seguridad alimentaria. Los antioxidantes protegen a las células y alimentos contra el estrés oxidativo (Shahidi y Zhong, 2007).

Las especies vegetales producen una amplia diversidad de compuestos con propiedades antioxidantes. Los compuestos fenólicos agrupan un amplio rango de metabolitos vegetales, los cuales poseen un anillo aromático, con uno o varios sustituyentes hidroxílicos. En este grupo se encuentran importantes familias de compuestos como los flavonoides, con estructuras que involucran arreglos de fenoles monocíclicos; fenilpropanoides y quinonas fenólicas (Harborne, 1998).

La función de algunos compuestos fenólicos en el metabolismo vegetal está bien establecida. Las antocianinas y polifenoles contribuyen a la calidad alimenticia en la apariencia de los frutos, sabor y beneficios a la salud. En los frutos, los componentes involucrados en la prevención de enfermedades degenerativas incluyen fibra soluble e insoluble, vitamina C, E, folato, carotenoides, selenio y compuestos fenólicos (Vasco, 2009). Investigaciones desarrolladas en blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) han generado el interés en otras especies nativas de *Vaccinium*, con el fin de caracterizar sus propiedades nutricionales y antioxidantes (Lee *et al.*, 2004).

Vaccinium floribundum (mortiño) y *Macleania rupestris* (joyapa), son dos plantas de la familia *Ericaceae*, cuyos frutos comestibles han sido utilizados ancestralmente en Ecuador para la preparación de comidas tradicionales y consumidos en fresco. *V. floribundum* es un arbusto erecto de 30 cm., hojas pequeñas con bordes aserrados, flor rosada en forma de campana de 5 a 8 mm de largo; fruto azul morado de 6 mm de diámetro. Se encuentra en matorrales, páramos y en el talud de senderos entre los 2900 y 3500 msnm. Sus frutos son comestibles y se utilizan en la elaboración de mermeladas y en la preparación de la “colada morada” (Van der Eynden *et al.*, 1999).

Macleania rupestris es una especie endémica de los Andes Ecuatorianos. Se distingue por tener flores con sépalos cortos y frutos morados-negros o rosados de 10 a 12 mm de diámetro. Se encuentra en el lado occidental de la Cordillera Oriental y a ambos lados de la Cordillera Occidental de los Andes, entre los 1500 y 2700 msnm en matorral y páramo. Sus frutos son comestibles. (Van der Eynden *et al.*, 1999).

El presente estudio tiene como objetivo evaluar la actividad antioxidante y caracterizar nutricionalmente a *Macleania rupestris* y *Vaccinium floribundum* Kunth mediante la cuantificación de su contenido fenólico, y concentración de ácido ascórbico. Los parámetros obtenidos, asociados con la actividad antioxidante de los frutos en estudio, permiten establecer el potencial de los frutos nativos de la Sierra Ecuatoriana por sus características nutricionales y por su valor como alimentos funcionales.

2. Metodología

2.1 Reactivos y Equipos

El reactivo de Folin-Ciocalteu, DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracil), y ácido gálico fueron adquiridos en Sigma (SIGMA-ALDRICH Inc, St. Louis, USA). Las determinaciones espectrofotométricas fueron realizadas en un equipo Thermo modelo Genesis 10. Para la cuantificación de vitamina C se utilizó un polarógrafo Amel Modelo 433.

2.1.1 Recolección de frutos de *V. floribundum* y *M. rupestris* y preparación de extractos acuosos

Se recolectaron frutos de joyapa (*V. floribundum*) en poblaciones silvestres ubicadas en el cantón Sigsig (2700 a 2842 msnm). El mortiño (*V. floribundum*) fue adquirido en el centro de acopio de vegetales COOPERA de la ciudad de Cuenca, Ecuador.

Los extractos fueron preparados en el Laboratorio de Biotecnología de Productos Naturales de la Universidad del Azuay. Se prepararon soluciones acuosas en proporción 1:1, las cuales fueron centrifugadas previo su análisis en los diferentes ensayos de actividad antioxidante y caracterización nutricional.

2.2 Caracterización nutricional de los frutos en estudio

2.2.1 Determinación de humedad y cenizas.

La humedad de los frutos en estudio se cuantificó por diferencia de peso de una muestra desecada en estufa a 100°C por 24 horas. La determinación de cenizas se realizó por calcinación en mufla a 650°C por 4 horas.

2.2.2 Determinación polarográfica de ácido ascórbico

Las soluciones acuosas fueron centrifugadas previa la cuantificación polarográfica de ácido ascórbico. 1 mL de sobrenadante fue diluido en 10 mL de solución tampón (0.05 M AcOEt y NaNO₃ 0.01M, pH = 3). Se preparó una solución estándar de ácido ascórbico de 10 ppm para la calibración. Las muestras fueron transferidas a la celda polarográfica y la lectura se realizó con las siguientes condiciones instrumentales: DPV automático, modo DME, tamaño de gota: 60, velocidad de scan: 20 mV/seg. (Zulueta *et al.*, 2007).

2.3 Cuantificación de fenoles totales

La cuantificación de fenoles totales se desarrolló mediante el método de Folin-Ciocalteu. Este método se fundamenta en que el conjunto de compuestos polifenólicos de las muestras de análisis se oxidan por el reactivo Folin-Ciocalteu (mezcla de ácido fosfotungstácico y fosfomolibdico) produciendo una coloración directamente proporcional al contenido de polifenoles, que es medible a una longitud de onda de 765 nm (Wojdylo *et al.*, 2007).

Para la determinación de fenoles totales, las muestras fueron preparadas por triplicado. Se realizó una curva de calibración de ácido gálico en un rango de concentraciones de 50 a 500 mg/L. Se desarrolló una reacción con 1 mL de Na₂CO₃ (7.5%), al cual se adicionó 0.5 mL de la muestra, 0.5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 8 mL de agua destilada. Las soluciones estándar de ácido gálico y las muestras se mantuvieron durante 30 minutos en oscuridad. Posteriormente se realizaron lecturas de absorbancia en un espectrofotómetro Thermo modelo Genesis 10 a una longitud de onda de 765 nm.

2.4 Actividad atrapadora de radicales libres

Las soluciones acuosas de los frutos en estudio fueron evaluadas como atrapadores del radical libre estable DPPH. A partir de las soluciones acuosas patrón (1.1) se realizó una serie de diluciones en un rango de 500 a 25 µl/mL. 0.5 mL de las diluciones se sometieron a reacción con 1,5 mL de solución metanólica de DPPH (20 mg/L). Los tubos fueron mantenidos en oscuridad por 20 minutos. Finalmente, se realizó la lectura de absorbancia en un espectrofotómetro Thermo modelo Genesis 10 a una longitud de onda de 517 nm. El porcentaje de decoloración de DPPH de las muestras fue calculado de acuerdo a la ecuación:

$$\% \text{ Decoloración} = 1 - \frac{ABS_{muestra}}{ABS_{control}} * 100$$

El porcentaje de decoloración fue contrastado con la concentración del extracto para calcular la IC₅₀ (concentración inhibitoria 50, uL/mL) la cual es la cantidad de muestra necesaria para disminuir en un 50% la absorbancia del DPPH (Parejo *et al.*, 2003)

4. Resultados

4.1 Caracterización nutricional de los frutos en estudio

A continuación se presentan los resultados de los ensayos de caracterización nutricional de los frutos incluidos en este estudio.

Fruto	Humedad (%)	Cenizas (%)	Acido ascórbico (mg/100g de fruto)
<i>M. rupestris</i>	79.05	0.33	61.6
<i>V. floribundum</i>	93.80	0.33	38.2

Cuadro 1: Resultados de caracterización nutricional para los frutos *M. rupestris* y *V. floribundum*

4.2 Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante

La determinación de fenoles totales por el método de Folin Ciocalteau y la actividad atrapadora de radicales libres de los frutos estudiados se realizó según metodología descrita previamente. Los resultados obtenidos se presentan a continuación.

Fruto	Fenoles Totales (UAG)	Actividad atrapadora de radicales libres (IC₅₀)
<i>M. rupestris</i>	364	29.24 mg/mL
<i>V. floribundum</i>	199	67.37 mg/mL

Cuadro 2. Fenoles totales y Actividad atrapadora de radicales libres de *M. rupestris* y *V. floribundum*. UAG: Unidades de ácido gálico (mg de ácido gálico por 100 g de fruto). IC₅₀: concentración inhibitoria 50, mg/mL)

5. Discusión

Las frutas son componentes importantes de la dieta humana, y proveen niveles esenciales de micronutrientes. Estudios epidemiológicos demuestran que el consumo de frutas y verduras es un factor protector contra el riesgo enfermedades relacionadas con el envejecimiento, como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, cataratas, degeneración macular y diabetes (Cortés *et al.*, 2005).

Las propiedades coligativas, reológicas y de textura de un alimento dependen de su contenido de agua, aún cuando éste también influye definitivamente en las reacciones físicas, químicas, enzimáticas y microbiológicas de los alimentos (Badui-Dergal, 2006). Se reporta en esta investigación el contenido de humedad para *Vaccinium floribundum* y *Macleania rupestris*. La proporción de humedad oscila entre el 79 y 93%, Este contenido estaría asociado a una elevada actividad acuosa, evidenciando una elevada humedad disponible en estos frutos.

El análisis de cenizas obtenidas luego de calcinar la materia orgánica revela la presencia de nutrimentos inorgánicos. A diferencia de las vitaminas que se sintetizan *in situ*, todos los elementos químicos inorgánicos encontrados en los alimentos provienen de los productos del campo, que a su vez dependen de las prácticas agrícolas, la genética, el suelo, los fertilizantes, plaguicidas, el agua, etc.

(Badui-Dergal, 2006). Las dos frutas incluidas en la presente investigación contienen cenizas en un porcentaje de 0.33%. El contenido de minerales debería establecerse en investigaciones posteriores, con el fin de caracterizar el contenido de minerales de estos alimentos nativos.

La vitamina C se encuentra mayoritariamente en frutas y verduras. Al ser hidrosoluble, no es almacenada por el organismo, por lo cual es indispensable una ingesta diaria de 60 mg diarios en adultos. Esta vitamina es necesaria para la síntesis de colágeno, formación de huesos, dentina, cartílagos y paredes de los capilares sanguíneos, interviene en reacciones de oxidación – reducción y de hidroxilación de hormonas esteroidales y de aminoácidos aromáticos (Badui-Dergal 2006).

En la presente investigación se cuantificó el contenido de vitamina C de las frutas estudiadas mediante polarografía diferencial. El método polarográfico posee algunas ventajas sobre otros métodos publicados para análisis de vitamina C. El pretratamiento de muestras no es requerido y los extractos coloreados no necesariamente interfieren en la cuantificación. El material suspendido puede afectar la absorción de luz, interfiriendo con el análisis (Gillam, 2001). Por este motivo, las muestras fueron centrifugadas previo el análisis. Los contenidos de ácido ascórbico para los frutos en estudio son significativos. *Macleania rupestris* presenta una concentración más elevada de vitamina C en relación a *Vaccinium floribundium* (61.6 y 38.2 mg/100 g de fruto, respectivamente). Dados los importantes aportes a la salud asociados con la ingesta de vitamina C, las especies en estudio se señalarían como promisorias para ser desarrolladas en cultivos que permitan incluirlas en la dieta diaria.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) están implicadas en el desarrollo de muchos desordenes crónicos, como cáncer, arterioesclerosis, nefritis, diabetes mellitus, reumatismo y enfermedades cardiovasculares, así como desórdenes del tracto gastrointestinal y procesos inflamatorios (Vrchovska *et al.*, 2007).

Los antioxidantes de origen natural han generado considerable interés en la medicina preventiva y la industria de alimentos, En consecuencia, varios esfuerzos científicos han sido direccionados hacia la caracterización de las propiedades antioxidantes de extractos vegetales y en el aislamiento e identificación de los constituyentes responsables de esta bioactividad. Entre estos compuestos, los ácidos fenólicos han sido el objeto de un gran número de estudios relacionados con su capacidad

antioxidante, la cual es mayoritariamente debida a su habilidad para actuar como atrapadores de radicales libres y/o quelantes de metales (Valentao *et al.*, 2002).

El contenido total de compuestos fenólicos de los frutos estudiados varía de 364 a 199 UAG. Es conocido que los compuestos fenólicos contribuyen mayoritariamente a la actividad atrapadora de radicales libres (Dastmach *et al.*, 2011). De acuerdo a nuestros resultados, *M. rupestris* exhibe un elevado contenido de fenólicos y una baja IC₅₀ en el ensayo de captura del radical libre DPPH, siendo entonces la especie con actividad antioxidante más promisorio. A nuestro mejor conocimiento, este es el primer reporte de actividad antioxidante para *Macleania rupestris*, fruto nativo de los andes Ecuatorianos, cuyas poblaciones silvestres no son abundantes y requieren estudios posteriores en cuanto a manejo y posible adaptación a cultivos agrícolas. Los resultados de actividad antioxidante reportados para *V. floribundium* concuerdan con los datos publicados por Vasco (2007). Las especies incluidas en esta investigación presentan un gran potencial como alimentos funcionales por su elevada actividad antioxidante. Se deben realizar esfuerzos adicionales para potenciar su valor agregado y aplicar estrategias biotecnológicas orientadas a la conservación del recurso genético y aprovechamiento racional en nutrición o formulación de bioproductos farmacéuticos.

6. Agradecimientos

Expresamos nuestro reconocimiento al Dr. Piercósimo Tripaldi, por su asesoría y las facilidades prestadas en la cuantificación polarográfica de ácido ascórbico. Las facilidades del Laboratorio de Biotecnología de Productos Naturales de la Universidad del Azuay son reconocidas.

7. Referencias Bibliográficas:

Badui-Dergal, S. (2006). Química de los Alimentos. 4ta. Edición. Pearson Educación, México. pp: 14-15; 388 – 389; 395-396

Cortés, C., Esteves, M., Frígola, A., Torregrosa, F. (2005). Changes in carotenoids including geometrical isomers and ascorbic acid content in orange – carrot juice

during frozen storage. *European Food Research and Technology*, **221** (1 -2), 125-131

Dastmalch, K., Flores, G., Petrovna, V., Pedraza-Peñalosa, P., Kennelly, E. (2011). Edible Neotropical Blueberries: Antioxidant and Compositional Fingerprint Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**(7): 3020 - 3026

Gillam, W. (2001). Polarographic Determination of Vitamin C in Fruits and Vegetables. *Industrial and Engineering Chemistry. Analytical Edition*. **17**(4): 217 - 221

Harborne, J. (1998). *Phytochemical Methods*. Tercera Edición. Chapman and Hall. Londres, Reino Unido. 302 pp.

Lee, J., Finn, C., Wrolstad, E. (2004). Comparison of anthocyanin and other phenolic compounds of *Vaccinium membranaceum* and *Vaccinium ovatum* native to the Pacific Northwest and North America. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**: 7039 – 7044

Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Saavedra, G., Murcia, M., Jiménez, A., Codina, C. (2003). Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. *Life Sciences* **73**:1667 - 1681

Shahidi, F., Zhong, Y. (2007). Measurements of Antioxidant Activity in Food and Biological Systems, en: *Antioxidants Measurements and Applications*. Fereidoon Shahidi y Chi-Tang Ho, Editores. ACS Symposium Series 956. American Chemical Society, Washington DC. 456 pp.

Valentao, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Branquinho-Andrade, P., Seabra, R., Bastos, M. (2002). Studies on the antioxidant activity of *Lippia citrodiora* infusión: Scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, **10**: 1324 - 1327

Van den Eyden, V., Cueva, E., Cabrera, O. (1999). Plantas Silvestres comestibles del Sur del Ecuador. Ediciones Abya-Yala, Quito, Ecuador. 221 pp.

Vasco, C. (2009). Phenolic Compounds in Ecuadorian Fruits. Tesis para optar al Grado de Doctor en Ciencias. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala, Suecia.

Vrchovska, V., Spilkova, J., Valentao, P., Sousa, C., Andrade, P., Seabra, R. (2007). Antioxidative properties and phytochemical composition of *Ballota nigra* infusion. *Food Chemistry*, **105**: 1396 - 1403

Wojdylo, A., Osmianski, J., Czmerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, **105**: 940 – 949

Zulueta, A., Esteve, M., Frasquet, I., Frígola, A. (2007). Vitamin C, vitamin A, phenolic compounds and total antioxidant capacity of new fruit juice and skim milk mixture beverages marketed in Spain. *Food Chemistry*, **103**: 1365 - 1374



Especialización en Biotecnología Vegetal

Actividad antimicrobiana de aceites esenciales de Menta (*Mentha pulegium*) y Cedrón (*Alloysia tryphylla*) en la germinación in vitro de la Orquídea *Cattleya máxima*.

Serrano-Rogel, P¹., Tello-Urgilés, M¹., Portilla-Farfán, W¹., Cazar-Ramírez, A^{1*}

¹Universidad del Azuay. Laboratorio de Biotecnología de Productos Naturales.

Avda. 24 de Mayo 777 y Hernán Malo. Cuenca, Ecuador.

acazar@uazuay.edu.ec

RESUMEN

La producción de plántulas de orquídea in vitro debe enfrentar la contaminación del medio por microorganismos como hongos, bacterias y levaduras. Este factor ocasiona grandes pérdidas de material vegetal. En este trabajo se ha establecido la actividad microbiana de aceites esenciales de menta (*Mentha pulegium*) y cedrón (*Alloysia tryphylla*) en la germinación in vitro de la orquídea *Cattleya máxima*. El trabajo planteó como objetivos disminuir los niveles de contaminación en los medios de cultivo en la inoculación de semillas de *C. máxima* utilizando aceites esenciales de *Mentha pulegium* y *Alloysia tryphylla*. Los resultados obtenidos evidencian una inhibición completa de crecimiento de microorganismos en los cultivos enriquecidos con aceite de cedrón (0,03%) y una inhibición moderada el medio suplementado con aceite de menta. Se evidenciaron diferencias asociadas a la composición de los medios de cultivo, observándose la mayor eficiencia de los aceites en el medio de Knudson el cual tiene menor contenido de micronutrientes en su formulación.

PALABRAS CLAVE: aceites esenciales, *Mentha pulegium*, *Alloysia tryphylla*, *Cattleya máxima*, antimicrobianos.

ABSTRACT

“In vitro” orchid plant production must challenge contamination by microorganisms such as fungi, bacteria and yeast. This problem produces important losses of plant material. In the present work the antimicrobial activity of essential oils from mint (*Mentha pulegium*) and cedron (*Alloysia tryphylla*) was tested in the germination “in vitro” of *Cattleya máxima* capsules. We aimed to diminish the contamination levels in culture media inoculated with *C. maxima* seeds using enriched media with *Mentha pulegium* and *Alloysia tryphylla* essential oils. Our results show a complete inhibition of microorganisms growth in the cultures enriched with cedron essential oil (0.03%) and a moderated inhibition in media supplemented with mint essential oil. Significant differences were associated to the culture media composition. The best efficiency of the essential oils were observed in Knudson medium, which is formulated with less micronutrients content.

Keywords: Essential oils, *Mentha pulegium*, *Alloysia tryphylla*, *Cattleya máxima*, antimicrobials

1. Introducción

Uno de los problemas comunes en los laboratorios comerciales y de investigación de cultivos *in vitro* de plántulas, es la contaminación del medio con microorganismos. Esto no solo afecta el crecimiento y la sanidad de las plántulas sino que ocasiona grandes pérdidas de plántulas y repercute en el elevado costo de producción de estos laboratorios. Los contaminantes más frecuentes *in vitro* son los hongos, bacterias y levaduras, que en muchos casos no son patógenos en condiciones de campo. (Suarez, 2011).

Se han establecido numerosos procedimientos tecnológicos para controlar o disminuir la presencia de contaminantes y el empleo de productos químicos, (fungicidas y antibióticos); esto ha constituido una vía rápida tanto para atenuar como para eliminar estos microorganismos. Con el fin de disminuir el uso de estos compuestos y sus consecuentes efectos negativos, se buscan nuevas alternativas sobre la base de productos naturales. “Los aceites esenciales desarrollados por especies aromáticas de plantas actúan como un mecanismo de defensa de la planta frente al ataque de patógenos. Esta condición permite establecer ensayos para valorar su actividad como inhibidores del desarrollo de patógenos en medios de cultivo *in vitro*”. (Sánchez *et al.*, 2007).

El presente trabajo propone el uso de aceites esenciales de menta y cedrón en la germinación *in vitro* de orquídeas, usando cápsulas abiertas, que frecuentemente son desechadas porque están expuestas al medio ambiente y no se halla la semilla estéril o, en su defecto, se usa esta semilla para la micropropagación, obteniendo un elevado índice de contaminación en el medio de cultivo. Además se plantea un método alternativo para disminuir la contaminación del medio basal y elevar la producción de material vegetal de calidad. Con ello, incentivamos al productor ecuatoriano a incursionar en la extracción y comercialización de aceites esenciales, puesto que no se le ha dado la suficiente importancia a este método para una explotación masiva.

Para el desarrollo de esta investigación se estableció como objetivo general evaluar la actividad antimicrobiana de aceites esenciales de *Mentha pulegium* y *Alloysia triphylla* en la germinación *in vitro* de la orquídea *Cattleya máxima*.

Los objetivos de la presente investigación se presentan a continuación:

- Disminuir los niveles de contaminación en los medios de cultivo en la inoculación de semillas de *C. máxima* en germinación “*in vitro*”.
- Establecer el nivel de contaminación de medio basal enriquecido con aceites esenciales de *Mentha pulegium* y *Alloysia triphyla*, inoculado con semillas provenientes de cápsulas no estériles de orquídea.

A continuación se presentan los métodos utilizados para el desarrollo de la investigación, los principales hallazgos y la relevancia del uso de aceites esenciales como inhibidores del crecimiento de microorganismos en cultivos “*in vitro*”.

2. Metodología

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de Productos Naturales de la Universidad del Azuay. La identificación taxonómica de las muestras botánicas se efectuó en el Herbario Azuay, adscrito a la Universidad del Azuay, Cuenca, Ecuador.

2.1 Recolección del material vegetal.

Se utilizaron cápsulas abiertas (en un 70%, no estériles) de la orquídea *Cattleya máxima*, procedentes del cantón El Guabo, provincia de El Oro, Ecuador. Los aceites esenciales utilizados en este estudio fueron obtenidos a partir de material vegetal obtenido en mercados locales de la ciudad de Cuenca, provincia del Azuay, Ecuador.

2.2 Extracción de aceites esenciales por arrastre de vapor

Los aceites esenciales obtenidos en la presente investigación fueron obtenidos según metodología descrita por Cazar y Cazar (2011). Las partes aéreas de las especies incluidas en el presente estudio fueron limpiadas y seleccionadas, eliminando hojas y tallos con síntomas de enfermedades, previo su procesamiento. El material vegetal se sometió a un proceso de hidrodestilación en un equipo de extracción por arrastre de vapor (Albrigi Luigi). Los productos de la destilación fueron separados por densidad

en el decantador. El proceso inició cuando el sistema alcanzó la temperatura de ebullición del agua (92°C a 2500 msnm) y duró aproximadamente 30 minutos. Los aceites esenciales fueron recolectados en viales cónicos y centrifugados a 5000 rpm para eliminar residuos acuosos. Posteriormente, los aceites fueron almacenados en frascos ámbar y protegidos de la luz hasta su evaluación

2.3 Preparación de medios de cultivo

Los medios de cultivo empleados en la germinación fueron el de Murashige & Skoog, modificado con el 50% de macronutrientes, y Knudson C al 100%. Las formulaciones fueron suplementadas con agar bacteriológico -medio basal-, sacarosa y carbón activado. El pH fue ajustado a 4.8. Los medios se esterilizaron en autoclave a 120 °C durante 20 minutos. La composición de los medios de cultivo incluidos en el presente estudio se presenta en el Cuadro 1.

CONSTITUYENTES	MURASHIGE Y SKOOG	KNUDSON
MACROELEMENTOS (g/l)		
Nitrato de amonio NH_4NO_3	1.650	-
Nitrato de potasio KNO_3	1.900	-
Nitrato de calcio CaNO_3	-	1
Sulfato de amonio NH_4SO_4	-	0.5
Cloruro de calcio $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.440	-
Sulfato de magnesio $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.370	0.25
Fosfato de potasio KH_3PO_4	0.170	0.25
MICROELEMENTOS (g/l)		
Sulfato de manganeso $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.0169	0.0075
Sulfato de zinc $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0086	-
Ácido bórico H_3BO_3	0.0062	-
Ioduro de potasio KI	0.00083	-
Sulfato de cobre $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.000025	-
Cloruro de cobalto $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.000025	-
HIERRO (g/l)		
Sulfato ferroso $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0278	0.025
Agente quelante Na_2 - EDTA	0.0372	-
VITAMINAS (g/l)		
Tiamina - HCL	0.0001	-
Mio-inositol	0.100	-

Piridoxina	0.0005	-
Glicina	0.002	-
Ácido nicotínico	0.0005	-
OTROS		
Sacarosa	20 g/l	20 g/l
Agar	7 g/l	7 g/l

Cuadro 1. Composición de los medios de cultivo utilizados para la germinación in vitro de orquídeas.

2.4 Ensayo de inhibición de crecimiento microbiano por aceites esenciales en germinación de semillas.

Para establecer el potencial de los aceites esenciales incluidos en este estudio como aditivos antimicrobianos en medios de germinación de semillas de orquídeas, se diseñaron tres tratamientos a diferentes dosis de aceite esencial. Se adicionaron a los medios de cultivo autoclavados y a temperatura de 35 a 40°C, un rango de dosis de 3, 6 y 9 $\mu\text{L/mL}$. Todos los ensayos se desarrollaron con cinco repeticiones. Además, se incluyó un testigo que consistió en medio basal sin la adición de aceite esencial.

Los medios preparados según lo descrito previamente, fueron dispensados en placas petri estériles. La siembra de cápsulas de *C. máxima* se realizó en condiciones de asepsia, bajo cámara de flujo laminar. Las cápsulas fueron seccionadas longitudinalmente con el fin de exponer las semillas. Los medios fueron inoculados con las semillas e incubados por 15 días. Durante este período se monitoreó el desarrollo del embrión (Serrano, 2011). La eficiencia de los aceites esenciales fue evaluada en función a la evidencia de contaminación a los 7 y 15 días de realizada la siembra.

2.5 Composición química de los aceites esenciales de *Aloysia triphylla* y *Mentha pulegium*

Se realizó un análisis gascromatográfico para determinar la composición de los aceites en estudio. Este análisis fue desarrollado en el Instituto de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja. Se utilizó un gascromatógrafo Hewlett-Packard, Modelo 6890, equipado con una FID. El análisis se realizó en un gradiente

de temperatura de 50°C a 270°C. Los constituyentes fueron identificados por comparación de sus espectros de masas con los de la base de datos Wiley /n.1. Los resultados obtenidos fueron correlacionados con los índices de retención. El área de las señales, en porcentaje, fue obtenida electrónicamente de la respuesta del detector GC-FID.

3. Resultados

3.1 Rendimiento obtención de aceites esenciales

El rendimiento de obtención de aceites esenciales fue estimado en función del volumen de aceite esencial obtenido por kilogramo de material vegetal de partida. Los resultados obtenidos se presentan en el siguiente cuadro:

Especie vegetal	Peso de material vegetal (Kg)	Volumen aceite esencial (mL)	Rendimiento (%)
Menta	3.6	2.3	0.64
Cedrón	2.8	3	0.10

Cuadro 2: Rendimiento de extracción de aceites esenciales

3.2 Actividad antimicrobiana de aceites esenciales en germinación de semillas

A continuación se presentan los resultados en relación a la efectividad de los aceites esenciales como inhibidores del crecimiento de microorganismos en los medios de germinación de semillas de *C. máxima*. El aceite esencial de *Mentha pulegium* no demostró actividad inhibitoria del crecimiento de microorganismos, por lo que se reporta la bioactividad de *Aloysia triphylla* en el Cuadro 3.

Medio	Aceite esencial	Dosis (v/v)	% Inhibición 7 días	% Inhibición 15 días	Testigo
Murashige & Skoog	<i>Aloysia triphylla</i>	0.01	60%	40%	NA
		0.02	60%	60%	NA
		0.03	80%	80%	NA
Knudson	<i>Mentha pulegium</i>	0.01	NA	NA	NA
		0.02	25%	NA	NA
		0.03	50%	NA	NA
	<i>Aloysia triphylla</i>	0.01	100%	60%	NA
		0.02	100%	60%	NA
		0.03	100%	80%	NA

Cuadro 3: Inhibición del desarrollo de microorganismos por aceites esenciales en ensayo de germinación de semillas de *C. máxima*. (NA: No activo, 0% inhibición).

3.3 Composición de los aceites esenciales de *Aloysia triphylla* y *Mentha pulegium*.

Los componentes mayoritarios de los aceites incluidos en esta investigación se presentan a continuación:

Componente	<i>Aloysia triphylla</i>	<i>Mentha pulegium</i> .
α -pinene	0.30	0.37
α -thujene	-	2.75
β -pinene	0.22	0.32
Sabinene	0.60	0.49
Myrcene	-	1.74
Limonene	6.53	0.91
Eucaliptol	1.98	
α -terpinene	-	1.02
δ -terpinene	-	3.59
Cis-ocymene	0.20	0.57
Trans- β -ocymene	3.55	1.65
m-cymene	-	8.61

menthone	-	0.24
Trans-sabinene-hydrate	-	0.42
α -copaene	-	0.29
6-methyl-5-hepten-2-one	2.89	-
δ -1-octen-3-ol	0.46	-
α -cubebene	1.06	-
β -borbonene	0.89	-
α -cedrene	0.89	-
Linalool	0.50	0.38
β -cariophyllene	3.98	7.25
Terpinene-4-ol	-	0.35
α -humulene	-	0.48
Alloaromadendrene	0.59	-
Neral	17.30	-
Germacrene D	5.23	0.71
cis-carvone-oxide	-	0.98
piperitone	-	3.42
α -terpineol	0.54	
Bycyclo germacrene	8.74	8.19
Geranial	21.77	-
δ -cadinene	0.40	-
γ -cadinene	-	0.31
Thymol acetate	-	0.72
Carvacryl acetate	-	23.52
Geranyl acetate	2.15	-
α -curcumene	3.59	-
Nerol	1.08	-
Geranyl propionate	0.25	-

Geraniol	0.90	-
Cariophyllene oxide	1.02	0.18
Nerolidol	2.57	
Spatulenol	2.84	-
α -cadinol	0.70	-
Isospatulenol	0.55	-
Phytol	0.27	-
Piperitone oxide	-	3.22

Cuadro 2. Composición de los aceites esenciales de *Aloysia triphylla* y *Mentha pulegium* en porcentaje. -: no detectado

4. Discusión

En las últimas dos décadas, las aplicaciones de la biotecnología vegetal han sido ampliamente desarrolladas e incorporadas en los sistemas agrícolas de varios países. Las herramientas de cultivos de tejidos han sido un factor clave para la extensión de estas aplicaciones. La propagación masiva de plantas se ha desarrollado mayoritariamente en medios sólidos. Esta estrategia presenta desafíos asociados a la manipulación y contaminación por microorganismos, que eventualmente se reflejan en pérdidas y baja de productividad (García-González *et al.*, 2010)

Aloysia triphylla, conocida en nuestro medio como hierba luisa, crece espontáneamente en Sudamérica y es cultivada en África del Norte y Europa del Sur. Las hojas son ampliamente utilizadas para infusiones por su aroma y debido a sus propiedades digestivas y antiespasmódicas. Los compuestos volátiles del aceite de hierba luisa han reportado actividad antibacteriana ante *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori* y *Candida albicans* (Pereira y Meireles, 2006).

En nuestro estudio, el aceite esencial de *A. triphylla* inhibió la presencia de hongos y bacterias en la germinación “in vitro” de orquídeas, a una concentración de 0.03%. Se trata de un resultado promisorio que puede ser aplicado en las estrategias de

cultivo *in vitro* de plantas. Los microorganismos presentes en semillas provenientes de cápsulas abiertas fueron inhibidos en su crecimiento por el efecto del aceite bioactivo. Por consiguiente, es recomendable enriquecer los medios de cultivo de germinación de plantas con el aceite de *A. triphylla*, para aplicar las semillas sin tratamientos previos de desinfección.

El aceite de *Mentha pulegium* presentó una inhibición moderada de la contaminación de cultivos a una concentración de 0.03% en el medio basal de Knudson. Además, el aceite bioactivo de *A. triphylla* presentó mejores resultados en este medio, a diferencia de Murashige & Skoog. Los resultados obtenidos pueden deberse a la diferencia en contenido de nutrientes de los dos medios evaluados. El medio de Knudson presenta un menor suplemento de nutrientes, que eventualmente pueden elicitar el crecimiento de microorganismos.

El análisis de gascromatografía acoplada a espectrometría de masas permite establecer la composición porcentual de los aceites esenciales incluidos en este estudio. El aceite de cedrón tiene como compuestos mayoritarios a geranial (21.77%), neral (17.30%) y limoneno (6,53%). Nuestros datos tienen total concordancia con el reporte realizado por Sartoratto *et al.*, (2004).

El aceite de menta tiene como compuestos mayoritarios al acetato de carvacrilo (23.52%), carvacrol (20.79%) y biciclogermacreno (8.19%). Nuestros resultados difieren de lo reportado por Stoyanova *et al.*,(2005). En este trabajo, el análisis por GC-MS del aceite de *M. pulegium* revela como mayoritarios a pulegona, piperitenona e isomentona. La composición de los aceites esenciales está fuertemente influenciada por factores ambientales, climáticos y de altitud. Por este motivo el análisis de la composición de los aceites esenciales de plantas aromáticas de la Sierra Sur Ecuatoriana es un campo promisorio de investigación, en el cual se pueden caracterizar interesantes diferencias con reportes de aceites esenciales de diversas latitudes.

Los resultados obtenidos permiten recomendar la estrategia de enriquecimiento de medios de cultivo con aceites esenciales para el desarrollo inicial de orquídeas en cultivos “*in vitro*”. Es necesario desarrollar nuevas investigaciones que aporten a la evidencia presentada sobre el uso de aceites esenciales antimicrobianos como aditivos en cultivos “*in vitro*”.

5. Agradecimiento

Los autores agradecen la asesoría científica de la Dra. María Elena Cazar en el desarrollo de bioensayos e interpretación de espectros de masas. Las facilidades del Laboratorio de Biotecnología de Productos Naturales de la Universidad del Azuay son reconocidas. Además, expresamos nuestro agradecimiento a la Universidad Técnica Particular de Loja y a la asesoría del Dr. Omar Malagón, en el establecimiento de la composición química de los aceites esenciales por GC-MS.

6. Referencias Bibliográficas

Cazar, M. y Cazar, A. (2011). Curso de técnicas en laboratorios biotecnológicos. Especialización en Biotecnología Vegetal. Cuenca, Ecuador. p. 12.

García-González, R., Quiroz, K., Carrasco, B., Caligari, P. (2010). Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges. *Ciencia e Investigación Agraria*. **37**(3): 5-30.

Murashige T and Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3): 473-497.

Pereira, C., Meireles, A. (2006). Evaluation of global yield, composition, antioxidant activity and cost of manufacturing of extracts from lemon verbena (*Aloysia triphylla* Britton) and mango (*Mangifera indica* L.) leaves. *Journal of Food Process Engineering* **30**:150-173

Sartoratto, A., Machado, A., Delarmelina, C., Figueira, G., Duarte, M., Rehder, V. (2004). Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, **35**(4): 275-280.

Sánchez, C. *et al.* (2007). Evaluación del efecto del aceite esencial de *Cymbopogon nardus* para el control de microorganismos contaminantes del cultivo *in vitro* de plantas. *Biotecnología Vegetal* Vol. 7, No. 3. Villaclara Cuba. p 187.

Serrano, P. (2011). Germinación de semillas de orquídea (*Cattleya máxima*) mediante técnicas de laboratorio. Tesis de grado de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Machala. Machala – Ecuador. p. 15, 16.

Stoyanova, A., Georgiev, E., Kula, J., Madja, T. (2005). Chemical Composition of the Essential Oil of *Mentha pulegium* L. from Bulgaria. *Journal of Essential Oil Research*, **17** (5):475 – 476

Suárez, F. (2011). Micropropagación *in vitro* de piña (*Ananas comosus* l. merril) híbrido md-2, a partir de cortes de yemas laterales y apicales. Tesis para optar al grado de Ingeniero Agrónomo. Escuela Politécnica del Ejército. Sangolquí – Ecuador. p. 20.



Especialización en Biotecnología Vegetal

Actividad antibacteriana de extractos orgánicos y aceite esencial de *Jungia rugosa* Less

Valdés, A¹, Cazar, M.E^{1*}

¹Universidad del Azuay. Laboratorio de Biotecnología de Productos Naturales.

Avda. 24 de Mayo 777 y Hernán Malo. Cuenca, Ecuador.

mcazar@uazuay.edu.ec

RESUMEN

La familia *Asteraceae* se caracteriza por su amplia distribución y por la diversidad de especies vegetales presentes en la Sierra Sur Ecuatoriana. *Jungia rugosa* Less ha sido utilizada ancestralmente para tratar lesiones de la piel, con efecto antiinflamatorio y cicatrizante. A pesar del relevante uso tradicional, no se reportan trabajos relacionados con la actividad biológica de esta especie. En el presente trabajo se evalúan dos extractos orgánicos y el aceite esencial de *Jungia rugosa* Less como agentes antibacterianos ante *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. El aceite esencial de la especie en estudio inhibe el crecimiento de *S. aureus* en condiciones “in vitro” (CIM: 21.93 uL/mL). La elevada bioactividad y selectividad de este aceite lo señalan como promisorio en el control de infecciones causadas por *S.aureus*. A nuestro entender, este es el primer reporte de bioactividad del aceite esencial de *Jungia rugosa* Less.

PALABRAS CLAVE: *Jungia rugosa* Less, *Staphylococcus aureus*, antibacteriano

ABSTRACT

The *Asteraceae* is characterized by its wide distribution and the diversity of plant species presented in the Ecuadorian Southern Highlands. *Jungia rugosa* Less has been used since ancient times to treat skin wounds, with anti-inflammatory and cicatrizing effects. In spite of its relevant traditional uses, there are not scientific works related to the biological activity of this specie. In the present research, two organic extracts and the essential oil of *Jungia rugosa* Less are evaluated as antibacterial agents towards *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The essential oil selectively inhibits *S. aureus* growth at “in vitro” conditions (CIM: 21.93 uL/mL). The high bioactivity and selectivity of this essential oil are promising in the treatment of infections caused by *S. aureus*. To our best knowledge, this is the first report of the bioactivity of *Jungia rugosas* Less essential oil.

KEYWORDS: *Jungia rugosa* Less, *Staphylococcus aureus*, antibacterial

1. Introducción

Cerca del 80% de la población mundial depende mayoritariamente en la medicina tradicional para el cuidado primario de salud. Al menos el 25% de las medicinas de la farmacopea moderna son derivadas de plantas, e importantes derivados sintéticos se desarrollan como compuestos basados en principios aislados de plantas. La aspirina, atropina, artemisina, colchicina, digoxina, efedrina, morfina, fisostigmina, filocarpina, quinina, reserpina, taxol, tubocurarina, vincristina y vinblastina son algunos ejemplos importantes de fármacos derivados de plantas. El interés en las plantas medicinales como una ayuda emergente en la salud se visualiza como un promisorio campo de investigación, dados los elevados costos de las prescripciones médicas para bienestar y salud personal (Thatoi y Kumar-Patra, 2011).

A través de los años, la humanidad ha dependido de la naturaleza para sus necesidades básicas de producción de alimento, vestido, vivienda y medicinas. Las plantas han constituido las bases de sofisticados sistemas de medicina tradicional, que datan de miles de años. Los primeros registros datan del 2600 AC, en Mesopotamia, donde se describe el uso de preparados de especies de *Cedrus* y *Cupressus sempervirens*, *Glycyrrhiza glabra*, *Commiphora* y *Papaver somniferum*. Estas especies se usan actualmente para el tratamiento de varias enfermedades, desde resfríos a parasitemias e inflamaciones (Newman *et. al.*, 1999).

El metabolismo secundario vegetal es la fuente principal de compuestos bioactivos. Los caracteres taxonómicos de las familias de plantas pueden estar guiados por la naturaleza y biosíntesis de metabolitos secundarios. El conocimiento ancestral asociado a los usos medicinales de plantas sigue siendo una base fundamental para estudios químicos y de bioactividad de especies vegetales.

El género Asteraceae está caracterizado por lactonas sesquiterpénicas y furanosesquiterpenos. La tribu Mutisiae comprende varios géneros, que incluyen a especies de *Jungia*, cuyos metabolitos secundarios incluyen a derivados isocedrenos lactónicos (Seaman, 1982). *Jungia rugosa* Less es una especie distribuida en las zonas altoandinas de Bolivia, Perú y Ecuador, en un rango de altitud de 2700 a 3000 msnm. Esta especie se distingue de otras de su género por su flor, de corola rosa o malva y aurículas enteras o ligeramente lobadas (Hind, 2004).

Jungia rugosa Less es conocida en nuestro medio como “carne humana”, y ha sido utilizada ancestralmente para tratar lesiones de la piel, con efecto antiinflamatorio y

cicatrizante (Enciso y Arroyo, 2011). Debido a la falta de estudios etnofarmacológicos y al potencial de esta especie como sustrato para el desarrollo de bioproductos farmacéuticos, se realizó el presente estudio con el fin de evaluar la actividad antibacteriana de extractos orgánicos y aceite esencial de *J. rugosa* en un modelo “*in vitro*”. A continuación se describe la metodología empleada y las implicaciones de los principales hallazgos de esta investigación.

2. Metodología

2.1 Material vegetal y microorganismos de prueba

Se recolectaron partes aéreas de *Jungia rugosa* Less en la Provincia de Cañar, Cantón Cañar, Parroquia Ingapirca. Un ejemplar voucher fue depositado en el Herbario “Azuay” de la Universidad del Azuay.

Aislados de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* fueron utilizados como bacterias objetivo en el desarrollo de bioensayos “*in vitro*”. Estas bacterias pertenecen al cepario del Laboratorio de Biotecnología de Productos Naturales de la Universidad del Azuay, y fueron obtenidas de muestras médicas de moderada patogenicidad. Las bacterias fueron mantenidas y repicadas en medio NB (peptona de caseína 0.8%, extracto de levadura 0.3%, NaCl 0,1%, agar 2%; ph: 7,5)

2.2 Obtención de extractos y aceite esencial de *Jungia rugosa* Less.

Las partes aéreas de *J. rugosa* fueron limpiadas y seleccionadas, eliminando hojas y tallos con síntomas de enfermedades. Para la preparación de extractos orgánicos se seleccionó un solvente de polaridad media (Acetato de Etilo) y uno de elevada polaridad (Metanol). 100 g de hojas, previamente secadas al ambiente por siete días, fueron maceradas en oscuridad por 72 horas. Posteriormente el extracto fue filtrado en papel Whatman No 5 y concentrado “*in vacuo*”.

El aceite esencial de la planta en estudio se obtuvo mediante hidrodestilación en un equipo de extracción por arrastre de vapor (Albrigi Luigi). El aceite esencial fue recolectado en viales cónicos y centrifugado a 5000 rpm para eliminar residuos acuosos. Posteriormente, fue almacenado en frasco ámbar y protegido de la luz hasta el desarrollo del bioensayo.

2.3 Bioensayo de actividad antibacteriana por microdilución

La actividad antibacteriana del extracto y aceite esencial de *J. rugosa* se evaluó mediante el ensayo de microdilución en placas, técnica adaptada de la metodología descrita por Eloff (1998). El inóculo bacteriano se obtuvo mediante incubación de los microorganismos en medio NB durante 24 horas, ajustándose a una concentración final de 10^4 - 10^5 UFC/ml.

El extracto fue disuelto en metanol (MEOH) y diluidos en medio LB, a partir de la solución stock en un rango de 125 a 0.98 μ g/ml. Para el aceite esencial se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO). Dentro de cada placa se incluyeron controles de crecimiento bacteriano y control del medio de cultivo. La concentración final de MEOH y DMSO en cada ensayo no excedió el 2%. Las placas fueron incubadas durante la noche a 25 °C. La viabilidad de los microorganismos se determinó a través de la adición de 20 μ l de solución acuosa (0,5 mg/ml) del colorante MTT (Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium) a cada pocillo y posterior incubación durante 30 min a 25 °C. La absorbancia fue leída a $\lambda = 515$ nm, OD = 630 nm.

La cadena respiratoria y otros sistemas transportadores de electrones, reducen el MTT y otras sales de tetrazolium, por acción de la enzima succinato deshidrogenasa, formando, en el interior de la célula, cristales azules de formazan, insolubles en agua. La cantidad de estos cristales puede ser determinada espectrofotométricamente y sirve como un estimador del número de células viables. La formación de este producto azul se relaciona directamente con la viabilidad celular (Freimoser *et al.* 1999). Los resultados para los compuestos puros se reporta la concentración que inhibe el 50% del crecimiento del microorganismo (IC_{50}). Los datos se obtuvieron del análisis de las curvas dosis-respuesta. Penicilina G y Streptomycin fueron usados como referencias. Los volúmenes empleados se resumen en el cuadro 2.2. El volumen final en cada pocillo fue de 120 μ l.

4. Resultados

4.1 Rendimiento de obtención de extractos y aceite esencial de *J. rugosa*.

El rendimiento de obtención de extractos y aceite esencial fue estimado en función de la cantidad de extracto/aceite obtenido por kilogramo de material vegetal de partida. Los resultados obtenidos se presentan en el siguiente cuadro:

	Peso de material vegetal (Kg)	Cantidad de extracto/aceite esencial	Rendimiento (%)
Extracto AcOEt	500 g	2.53 g	0.506
Extracto MeOH	500 g	5.28 g	1.056
Aceite esencial	1200 g	1.30 mL	0.108

Cuadro 1: Rendimiento de obtención de extractos orgánicos y aceite esencial de *Jungia rugosa*

4.2 Actividad antibacteriana de extractos orgánicos y aceite esencial de *J. rugosa*

A continuación se presentan los resultados obtenidos del ensayo de actividad antibacteriana por microdilución “in vitro” ante *E. aureus* y *E. coli*.

	Concentración Inhibitoria Mínima	
	<i>E. coli</i>	<i>E.aureus</i>
Extracto AcOEt	NA	NA
Extracto MeOH	NA	NA
Aceite esencial	NA	21,93 μ L/mL

Cuadro 2. Actividad antimicrobiana de extractos y aceites esenciales de *J. rugosa* ante bacterias objetivo. NA: no activo

5. Discusión

Los aceites esenciales y extractos vegetales han sido usados desde tiempos ancestrales en la preservación de alimentos, como fármacos en medicina alternativa y terapias naturales. La investigación científica del potencial de plantas utilizadas en medicina tradicional es un campo necesario para mejorar la calidad de la atención primaria de salud. Los aceites esenciales son fuentes potenciales de nuevos compuestos antimicrobianos, especialmente contra bacterias patógenas (Prabuseenivasan *et al.*, 2006)

El presente trabajo reporta por primera vez la actividad biológica del aceite esencial de *Jungia rugosa* Less. Se trata de un aceite bioactivo y selectivo ante *Staphylococcus aureus* (CIM: 21,93 $\mu\text{L}/\text{mL}$).

Staphylococcus aureus es un habitante normal en las mucosas y en la piel. A partir de la introducción de las cefalosporinas y penicilinas semisintéticas, se evidenciaron cepas resistentes a meticilina. Desde entonces se ha reportado que la proporción de enfermedades debidas a infecciones por estafilococos se ha incrementado desde 2% en 1974 a 22% en 1995, llegando a 63% en 2004, en Estados Unidos. Desde 1998, apenas diez nuevos antibióticos han sido lanzados al mercado, y actualmente existen muy pocos prospectos de nuevos agentes antibacterianos (Chao *et al.*, 2008). Este panorama exige el desarrollo de investigaciones rigurosas, las cuales determinen el potencial antibacteriano de derivados de plantas, como extractos y aceites esenciales. En el presente trabajo, se utilizaron diversas estrategias para la extracción de los metabolitos secundarios de *Jungia rugosa* Less. Los extractos orgánicos no presentan bioactividad en las condiciones del ensayo. No obstante, el aceite esencial tiene una concentración inhibitoria promisorio y selectiva ante esta bacteria. Este resultado muestra la dependencia de la actividad biológica observada a la naturaleza de los compuestos obtenidos en la extracción. Los compuestos hidrosolubles de *Jungia rugosa* Less son los responsables de la actividad antimicrobiana observada en el ensayo “in vitro” desarrollado en esta investigación.

6. Agradecimientos

Las facilidades del Laboratorio de Biotecnología de Productos Naturales de la Universidad del Azuay son reconocidas.

7. Referencias Bibliográficas:

Chao, S., Young, G., Oberg, C., & Nakaoka, K. (2008). Inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, **23**(6): 444-449.

Eloff, J. (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica* **64**, 711 – 713.

Freimoser, F. M., Jakob, C. A., Aebi, M. y Tuor, U., 1999. The MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 3727-3729.

Hind, D. (2004). A new species of *Jungia* (Compositae: Mutisiae; Nassauviinae) from Bolivia. *Kew Bulletin*, **59**(2): 311 – 314

Newman, D., Cragg, G., Snader, K. (2000). The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Products Reports*. **17**: 215 – 234

Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., Ignacimuthu, S. (2006). In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **6**(1): 39.

Seaman, F (1982). Sesquiterpene Lactones as Taxonomic Characters in the Asteraceae. *Botanical Review*, **48** (2): 121-595

Thatoi, H., Kumar-Patra, J. (2011). Biotechnology and Pharmacological Evaluation of Medicinal Plants: An Overview. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, **17**: 214 – 248

Especialistas en Biotecnología Vegetal

Cohorte 2012 – 2013

Juan Marcelo Alvarado Arízaga

Raffaella Ansaloni

Juan Pablo Brito Abad

Manuel Fernando Luna Criollo

Adriana Paola Jara Bermeo

Wilmer Honorio Portilla Farfán

Tamira de Fátima Quiroz Durazno

Julio César Sarmiento Crespo

Edgar Gerardo Segovia Amador

Pamela Yamileth Serrano Rogel

María de Lourdes Tello Urgilés

Adrián Vinicio Valdés Tenesaca

Yadira Elizabeth Vallejo Carpio

Andrea Paola Vásquez Alvarez

Docentes de la Especialidad en Biotecnología Vegetal

2012 – 2013

Módulos de Actualización Científica	
Laura Scalvenzi, Ph.D Universidad de Ferrara, Italia	Actualización en Bioquímica Vegetal
Jeffrey Regier, Ph.D Universidad de Taylor, EEUU	Actualización en Biología Molecular
María Elena Cazar, Ph.D Universidad del Azuay Aída Cazar Ramírez, Ms.C Universidad del Azuay	Técnicas en Laboratorios Biotecnológicos
Piercósimo Tripaldi, Ms.C Universidad del Azuay	Bioestadística y Diseño Experimental
María Elena Cazar, Ph.D Universidad del Azuay	Comunicación en Ciencia y Tecnología
María del Lourdes Torres, Ph.D Universidad San Francisco de Quito	Bioseguridad, Bioética y Percepción Pública de la Biotecnología

Módulos de Formación Específica	
Raúl Herrera Faúndez, Ph.D Universidad de Talca, Chile	Biotecnología Vegetal
María Alejandra Moya-León, Ph.D Universidad de Talca, Chile	Metabolismo y Fisiología Vegetal
Lien González, Ph.D Pontificia Universidad Católica del Ecuador	Diagnóstico y Saneamiento Vegetal
María Elena Cazar, Ph.D Universidad del Azuay	Microbiología Agrícola
Rafael Morales Astudillo, Ph.D Universidad Nacional de Loja	Recursos Fitogenéticos
Lien González, Ph.D Pontificia Universidad Católica del Ecuador	Genética y Mejoramiento “in vitro”
Yasel Guerra-Borrego, Ms.C Pontificia Universidad Católica del Ecuador	Bioinformática



“No existe nada más poderoso que una idea cuyo tiempo ha llegado”

Victor Hugo



“En el campo de la observación, el azar favorece a la mente más preparada”

Louis Pasteur