

**COMPARACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS  
HIDROALCOHÓLICOS Y ACEITE ESENCIAL DE *Citrus limón* SOBRE  
*Colletotrichum sp.***

**María Fernanda Gámez Cuadrado**

**Lady Milena Jiménez Rodríguez**

**UNIVERSIDAD POPULAR DEL CESAR**

**FACULTAD CIENCIAS BASICAS**

**PROGRAMA DE MICROBIOLOGIA**

**VALLEDUPAR**

**2023**

**COMPARACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS  
HIDROALCOHÓLICOS Y ACEITE ESENCIAL DE *Citrus limón* SOBRE  
*Colletotrichum sp.***

**María Fernanda Gámez Cuadrado**

**Lady Milena Jiménez Rodríguez**

**Trabajo de titulación presentado en conformidad con los requisitos  
establecidos para optar por el título de Microbiólogo**

**DIRECTOR**

**Alejandra Paola Quintero Linero**

**PROFESION**

**Docente del programa de microbiología**

**UNIVERSIDAD POPULAR DEL CESAR**

**FACULTAD CIENCIAS BASICAS**

**PROGRAMA DE MICROBIOLOGIA**

**VALLEDUPAR**

**2023**

**Comparación de actividad antifúngica de extractos hidroalcohólicos y aceite esencial de *Citrus limón* sobre *Colletotrichum* sp.**

**NOTA DE ACEPTACIÓN**

---

---

---

---

---

---

---

**Firma del presidente del jurado**

---

**Firma del jurado**

---

**Firma del jurado**

## **Agradecimientos**

Lady Milena Jiménez Rodríguez

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a las personas que han sido fundamentales en el desarrollo de este proyecto de grado. Sin su apoyo, guía y estímulo, no habría sido posible alcanzar estos resultados.

Es por ese motivo que en primer lugar quiero agradecerle a Dios, ya que sin su bendición jamás hubiera sido posible este gran logro y por esa oportunidad de regalarme una maravillosa familia que por su amor, comprensión y apoyo incondicional me sirvieron de base y lucha a lo largo de esta travesía académica. Sus palabras de aliento y sacrificio han sido mi mayor motivación para perseguir mis sueños.

Un agradecimiento especial a mis adorables hijas, quienes han sido mi mayor inspiración. Sus sonrisas, abrazos y alegría contagiosa han iluminado cada paso de este viaje. Su paciencia y comprensión me han permitido dedicar tiempo y esfuerzo a este proyecto.

Asimismo, quiero agradecer a mis compañeros de la universidad. Su colaboración, intercambio de ideas y trabajo en equipo han sido invaluable. Juntos hemos superado desafíos, compartido conocimientos y hemos crecido personal y académicamente. No puedo expresar lo agradecida que estoy de haber tenido la oportunidad de ser parte de este grupo excepcional.

También quiero reconocer y agradecer a mis profesores, cuya sabiduría, paciencia y dedicación han sido fundamentales en mi formación académica. Su guía y consejo experto han sido cruciales para el éxito de este proyecto. Agradezco sinceramente

su compromiso con la enseñanza y su disposición a responder mis preguntas y brindarme orientación.

Finalmente, deseo expresar mi gratitud a todas las demás personas que, de una forma u otra, me han apoyado en este camino. Sus palabras de aliento, consejos y buenos deseos han sido de gran valor para mí.

Es por eso que deseo desde lo más profundo de mi corazón que este trabajo realizado con esfuerzo y dedicación sirva de ayuda a esas personas que vienen labrando ese duro camino de la lucha constante de alcanzar este sueño.

¡Muchas gracias a todos!

María Fernanda Gámez Cuadrado

Primeramente, agradezco a Dios por permitirme seguir adelante con mi carrera, que me ha guiado en el camino de lo prudente, dado fortaleza para seguir y darme sabiduría día a día en mi vida profesional.

Agradecerle a mi familia por el apoyo brindado a lo largo de este proceso, a mis padres que me han brindado el apoyo incondicional para poder cumplir mis sueños y metas, a mis hermanos que siempre han confiado, depositado su amor y confianza en mí, a mi esposo y mis hijos por brindarme la fuerza y el amor necesario para seguir adelante por y para ellos. Ellos son los que con su cariño me han impulsado a siempre perseguir mis metas y nunca abandonarlas.

Además, agradecerles a esos compañeros que me brindaron su apoyo incondicional a lo largo de mi carrera, esos que se volvieron amigos a lo largo del proceso. A los docentes que me brindaron sus conocimientos, paciencia y dedicación sirvieron a lo largo de este viaje.

Y, por último, agradecer a cada una de las personas que me motivaron para seguir adelante que me brindaron sus consejos, apoyo y buenos deseos.

¡Muchas gracias!

### **Dedicatorias**

A mis padres que me han sabido educar con buenos sentimientos, hábitos y valores lo cual me ha ayudado a salir adelante en los momentos felices.

A mi hija Paula Marcela quien ha sido mi mayor motivación y fuerza para seguir adelante en mis estudios. Porque con su sonrisa y su amor me brindo el impulso para seguir adelante.

A mi hermana por siempre estar para mí y por ser mi mayor ejemplo a seguir.

Y por último a mi esposo que ha caminado de mi mano a lo largo de mi proceso académico me ha apoyado y brindado su amor en mi carrera.

Atentamente,

María Fernanda Gámez Cuadrado

## Tabla de contenido

Resumen.....	10
Abstract.....	11
1 Introducción.....	12
2 Planteamiento del problema.....	13
3 Justificación.....	14
4 Objetivos .....	16
4.1 Objetivo general.....	16
4.2 Objetivos específicos.....	16
5 Marco teórico .....	16
5.1 Importancia de la agricultura .....	16
5.2 Importancia de la biotecnología aplicada al sector agrícola.....	17
5.3 Importancia de la biotecnología aplicada al control de fitopatógenos .....	18
1.1 Antecedentes .....	18
5.4 Marco conceptual.....	21

5.4.1	Fitopatógenos.....	21
5.4.2	<i>Colletotrichum</i> sp.....	22
6	Metodología.....	24
6.1	Tipo de investigación .....	24
6.2	Colecta de plantas .....	24
6.3	Elaboración de extractos .....	24
6.4	Obtención de aceite esencial .....	25
6.5	Rendimiento .....	25
6.6	Obtención y preparación del material Biológico .....	26
6.7	Medición de halo de inhibición .....	26
6.8	Análisis estadístico .....	27
7	Resultados y Discusión.....	27
7.1	Rendimiento .....	27
7.2	Extracto hidroalcohólico de limón.....	28
7.3	Aceite esencial de limoncillo.....	29
8	Conclusión.....	32
9	Recomendaciones .....	32
10	Bibliografía.....	34
11	Anexos.....	49



### **Tabla de Figuras**

Figura 1. Equipo utilizado para la extracción de aceites esenciales por arrastre de vapor .....	25
Figura 2. Actividad antifúngica de los extractos hidroalcohólicos.....	28

### **Tabla de Grafica**

Grafica 1. Determinación de diferencias significativas entre tratamiento según post-hoc de Duncan ( $\alpha=0,05$ ).....	30
--	----

## Resumen

*Colletotrichum* sp es un hongo fitopatógeno de interés agrícola debido a que es la causa de la antracnosis en más de 16 cultivos lo que genera hasta un 40 % de la pérdida de la rentabilidad, por lo cual en este estudio se determinó la actividad antifúngica de extractos hidroalcohólicos y aceite esencial de *Citrus limón* sobre el crecimiento del hongo fitopatógeno *Colletotrichum* sp.

La obtención de los extractos hidroalcohólicos fue a partir de hojas de limón secas sumergido en etanol al 70%, para el aceite esencial se utilizó un equipo diseñado para extracción por arrastre de vapor y el inóculo fue preparado a partir de la reactivación de cepa de *Colletotrichum* sp. proporcionada por el grupo de investigación BIOTECGEN, el inóculo fue de  $1 \times 10^5$  conidios/ml. Para la realización de los tratamientos se realizó la siembra del inóculo por difusión y se colocaron discos impregnados con el extracto y aceite esencial y para los controles se inocularon discos con agua destilada estéril.

Como resultados el extracto hidroalcohólico no presentó actividad antifúngica mientras que el tratamiento con aceite esencial inhibió totalmente el crecimiento micelial por lo cual se procedió a realizar diluciones con las cuales se determinó que el aceite esencial al 80 % es la dosis mínima de inhibición, por lo que se concluyó que la actividad antimicrobiana es dependiente de la composición química de los extractos y que a su vez la composición es dependiente de la metodología de extracción.

## **Abstract**

*Colletotrichum* sp is a phytopathogenic fungus of agricultural interest because it is the cause of anthracnose in more than 16 crops which generates up to 40% of the loss of profitability, so in this study the antifungal activity of hydroalcoholic extracts and essential oil of Citrus lemon on the growth of the phytopathogenic fungus *Colletotrichum* sp was determined.

The hydroalcoholic extracts were obtained from dried lemon leaves submerged in 70% ethanol, the essential oil in an equipment designed for steam extraction and the inoculum was prepared from the reactivation of *Colletotrichum* sp. strain provided by the BIOTECGEN research group, the inoculum was  $1 \times 10^5$  conidia/ml. For the realization of the treatments, the inoculum was sown by diffusion and discs impregnated with the extract and essential oil were placed; for the controls, discs were inoculated with sterile distilled water.

As results the hydroalcoholic extract did not present antifungal activity while the treatment with essential oil totally inhibited the mycelial growth for which we proceeded to make dilutions with which it was determined that the essential oil 80% is the minimum dose of inhibition so it was concluded that the antimicrobial activity is dependent on the chemical composition of the extracts and that in turn the composition is dependent on the extraction methodology.

## 1 Introducción

La mancha foliar o denominada comúnmente como antracnosis, es la enfermedad causada por el hongo del género *Colletotrichum* sp. el cuál es el causante de la destrucción de múltiples cultivos, generándole a las plantas pérdida del vigor y el rendimiento debido a la intervención que tiene este hongo sobre la fotosíntesis; los daños generados varían entre plantas, en el girasol el rendimiento se reduce hasta un 65 %, en la mostaza un 57 % y en Colombia en el mago presenta hasta un 40 % (Hassan et al., 2022; Camargo et al., 2021) el rendimiento y mortalidad generados directamente por el hongo aumentan al generar la susceptibilidad de las plantas ante otras enfermedades y plagas.

En Colombia se han identificado seis especies del género *Colletotrichum* sp. que son las principales causantes de la antracnosis: *C. gloeosporioides*, *C. asianum*, *C. siamense*, *C. fructicola*, *C. scovillei* y *C. tropicale*.

Actualmente la antracnosis es regulada por fungicidas sistemáticos preventivos como: azoxistrobina, captan, mancozeb, carbendazim, tiofanato de metilo y miembros de los inhibidores de la desmetilación de esteroides (DMI), como los triazoles y por microorganismos inoculados en semillas como *Pseudomonas aeruginosa* y *Trichoderma harzianum* cuya efectividad han reducido con el tiempo (Boufleur et al., 2021).

Los aceites esenciales se presentan como una rica fuente de antioxidantes y sustancias antifúngicas y antibacterianas; se considera que el mecanismo de acción antimicrobiano de los aceites esenciales se da por la alteración de la membrada debido a su bajo peso molecular y características lipofilicidad (Namiota y Bonikowski et al., 2021).

Los componentes presentes en plantas del género *Citrus* sp. como terpenos, flavonoides, fenoles etc. y su obtención será dependiente del tipo de material a utilizar y la metodología de extracción (Dosoky y Setzer, 2018).

## 2 Planteamiento del problema

*Colletotrichum* es un género de hongos patógenos que afecta a una amplia variedad de cultivos agrícolas en todo el mundo. Estos hongos pueden causar una disminución significativa en el rendimiento y la calidad de los cultivos; Existen 10 especies de hongos consideradas como los principales fitopatógenos: *C. acutatum*, *C. boninense*, *C. dematium*, *C. gloeosporioides*, *C. gigasporum*, *C. magnum*, *C. orchidearum*, *C. spaethianum*, *C. truncatum* y *C. chlorophyti*; Colombia es uno de los países que presenta mayor diversidad de linajes de estos hongos, los cuales penetran la cutícula de la planta utilizando apresorios melanizados y tras la penetración, diferencian las hifas infecciosas que se propagan de forma intercelular y/o intracelular, y pasan secuencialmente a través de fases de infección biotrófica y necrotrófica (Bouffleur et al., 2021; Kolainis et al., 2020).

La enfermedad causada por este hongo puede alcanzar una incidencia de hasta el 100 %. Se estima que la presencia del hongo en el 1 % de un cultivo puede generar pérdidas de hasta 90 kg/ha en cultivo de soja (Bouffleur et al., 2021); la pudrición amarga de los frutos causada por este patógeno oscila entre 14 al 100 % del cultivo de manzana y puede generar la muerte de hasta el 80 % de las plántulas de fresa (Chung et al., 2020; Khodadadi et al., 2020).

Para el control de estos organismos se emplean agroquímicos, los cuales ocasionan daños al medio ambiente y a la salud pública; Salamanca, 2020 y Toledo et al., 2020 hacen referencia al daño ocasionado por el uso de insumos químicos, los cuales desde sus inicios se han ido acumulando y ocasionando desequilibrio en el ecosistema y a la salud pública, además el mal uso de estos insumos por personas carentes de conocimiento ha aumentado el cambio climático, mutaciones de la flora y la fauna, mutaciones genéticas y enfermedades a las personas que tienen contacto directo e indirecto con estos productos (Moctezuma, 2022; Schmidt et al., 2022). En Colombia el Instituto Nacional de Salud. (2017) informó que el 21,2% de los 39.709 casos reportados de intoxicación son causados por agrotóxicos.

Por lo descrito, se tiene la necesidad de buscar alternativas que permitan el control y eliminación de *Colletotrichum* sp. y lograr la disminución de la implementación de insumos de síntesis químicas en el sector agrícola.

### **3 Justificación**

Los extractos hidroalcohólicos de hojas de *citrus* sp. han sido ampliamente utilizados en la medicina tradicional debido a sus propiedades medicinales. Estos extractos contienen una gran cantidad de compuestos bioactivos como flavonoides, alcaloides, terpenoides, ácidos fenólicos, carotenoides, etc. (Huamán, 2020).

Entre las propiedades atribuidas a estos extractos se encuentran su capacidad antioxidante, antiinflamatoria, antimicrobiana, analgésica, antitumoral, hipoglucemiante, hepatoprotectora, entre otras. Debido a estas propiedades, los extractos hidroalcohólicos de hojas de *citrus* sp. han sido utilizados en el tratamiento

de diversas enfermedades como diabetes, hipertensión, cáncer, enfermedades hepáticas, infecciones bacterianas y fúngicas (Atoche, 2022).

Además de los extractos, los aceites esenciales son una alternativa amigable con el medio ambiente por varias razones como: son biodegradables y menos contaminantes para el medio ambiente debido a que se obtienen de plantas, flores, frutas y otros recursos naturales; a diferencia de los productos químicos sintéticos, no producen efectos nocivos en la salud humana o de los animales; se pueden producir de manera sostenible, mediante el cultivo y cosecha de plantas silvestres o la producción de plantas en cultivos orgánicos. Además de ser una opción natural, esta práctica ayuda a reducir la cantidad de productos químicos en el uso diario, lo que contribuye a proteger el medio ambiente (Alonso et al., 2021; Aguilar et al., 2020; Villar et al., 2022).

En algunos estudios el uso de extractos y aceites esenciales de limón generan la inhibición de hasta un 70 % del crecimiento micelial de fitopatógenos como *Colletotrichum cladosporioides* y *Fusarium solani* (Foglia et al., 2016) mientras que en otras en concentraciones bajas de 2 % ha logrado la inhibición micelial del 82,41 % y de esporas en un 100 % en concentraciones de 8 µg/ml (Camargo et al., 2021). Por lo descrito el uso el estudio de la actividad fungicida de los extractos y aceites esenciales de limón pueden ser una alternativa sostenible para la mitigación del uso e impacto de insumos agroquímicos, por lo cual se genera la incógnita acerca de cuál de las dos alternativas extractos o aceites esenciales será la más eficiente para el control de *Colletotrichum* sp.

## 4 Objetivos

### 4.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antifúngica de extractos hidroalcohólicos y aceite esencial de *Citrus limón* sobre el crecimiento del hongo fitopatógeno *Colletotrichum* sp.

### 4.2 Objetivos específicos

- Analizar el rendimiento de la extracción de extractos hidroalcohólicos y aceite esencial a partir de hojas de *Citrus limón*.
- Comparar la actividad antifúngica de los extractos y aceite esencial de *Citrus limón* sobre el crecimiento de *Colletotrichum* sp.

## 5 Marco teórico

### 5.1 Importancia de la agricultura

El sector agrícola es de gran importancia a nivel mundial, ya que es el sector que se encarga de producir los alimentos que consumimos y de abastecer a la industria alimentaria. La agricultura es una actividad económica clave para el desarrollo de los países, ya que contribuye al crecimiento económico, a la generación de empleo y a la reducción de la pobreza, además el sector agrícola es importante por su impacto en el medio ambiente y en la conservación de los recursos naturales. La agricultura sostenible y responsable puede contribuir a la mitigación del cambio climático y a la preservación de la biodiversidad (Bula, 2020).

Por otro lado, el sector agrícola también es importante desde el punto de vista social y cultural, ya que está estrechamente ligado a la historia y a las tradiciones de las comunidades rurales. La agricultura puede ser una fuente de identidad y de arraigo



para estas comunidades, y puede contribuir a la preservación de sus valores y costumbres (Moran, 2020).

## **5.2 Importancia de la biotecnología aplicada al sector agrícola**

La biotecnología aplicada al sector agrícola es de gran importancia, ya que permite el desarrollo de nuevas variedades de plantas más resistentes a enfermedades, plagas y condiciones climáticas adversas, lo que puede aumentar la productividad y la calidad de los cultivos. Además, la biotecnología puede contribuir a la reducción del uso de pesticidas y fertilizantes químicos, lo que puede tener un impacto positivo en el medio ambiente y en la salud humana (Montenegro y Hernández, 2015; Ballesteros et al., 2019).

Otro aspecto importante de la biotecnología aplicada al sector agrícola es su potencial para el desarrollo de cultivos transgénicos. Los cultivos transgénicos pueden tener características deseables, como la resistencia a plagas o enfermedades, o una mayor tolerancia a condiciones climáticas adversas. Sin embargo, su uso sigue siendo controvertido y debe ser cuidadosamente regulado y monitoreado para garantizar su seguridad y minimizar sus posibles impactos negativos en el medio ambiente y en la salud humana (Ballesteros et al., 2019).

En conclusión, la biotecnología aplicada al sector agrícola puede tener un gran impacto en la producción de alimentos, la protección del medio ambiente y la salud humana. Su uso debe ser cuidadosamente regulado y monitoreado para garantizar su seguridad y maximizar sus beneficios (Páramo et al., 2021).

### **5.3 Importancia de la biotecnología aplicada al control de fitopatógenos**

La biotecnología aplicada al control de fitopatógenos es de gran importancia, ya que los patógenos pueden causar importantes pérdidas económicas y ecológicas en los cultivos. Los métodos de control convencionales, como el uso de pesticidas, pueden ser costosos y dañinos para el medio ambiente y la salud humana, por lo que la búsqueda de alternativas más eficaces y sostenibles es crucial (Díaz, 2019).

La biotecnología puede ofrecer soluciones innovadoras para el control de fitopatógenos. Por ejemplo, se puede utilizar la ingeniería genética para desarrollar plantas resistentes a enfermedades o para producir proteínas y péptidos antimicrobianos que combatan los patógenos. Otra técnica utilizada en la biotecnología para el control de fitopatógenos es la producción de biocontroladores, que son microorganismos que pueden combatir los patógenos de forma natural. Estos biocontroladores pueden ser bacterias, hongos, virus u otros organismos que se aplican en los cultivos para prevenir o tratar las enfermedades de las plantas (Alomar, 2020; Ballesteros et al., 2019).

Además, la biotecnología puede ser utilizada para desarrollar técnicas de diagnóstico más precisas y rápidas de las enfermedades de las plantas, lo que permite un control más eficiente de los patógenos (Restrepo y Vargas, 2007).

#### **1.1 Antecedentes**

Aguilar et al., 2022 desarrolló un estudio titulado "Control in vitro de antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) aislado de *Annona muricata* L. con extractos vegetales, evaluando la dosis mínima inhibitoria de ocho extractos en forma de hidrolato sobre *Colletotrichum gloeosporioides*". Como resultado obtuvieron que

todos los extractos hidroalcohólicos de *P. dioica* L., *D. ambrosioides* L., *M. indica* L. y *Bougainvillea* spp. presentaron una baja inhibición micelial (30 a 40%) pero alta inhibición de la esporulación (83.33 a 99.45%); esto presenta a los extractos en forma de hidrolato como una alternativa no enfocada a la inhibición y muerte del hongo, sino como una alternativa para el control de la propagación de este.

Ramírez et al., 2020, evaluaron la capacidad inhibitoria de los extractos etanólico - acuoso de la corteza y frutos de la planta *Guazuma ulmifolia* contra *Colletotrichum gloeosporioides* y *Botrytis cinérea* siendo *B. Cinérea* más susceptible al tratamiento. Como resultados obtuvo una mayor inhibición con el extracto de frutos, siendo en promedio 85.5% la inhibición del crecimiento micelial de *B. Cinérea* y 45.8 % de *C. gloeosporioides*, además estos ensayos alteraron la morfología microscópica de los micelios y esporas.

Atoche, 2022 Realizó la revisión bibliográfica con el objetivo de recopilar información sobre los extractos de residuos agroindustriales de *Citrus* spp. sobre el control de antracnosis en frutos poscosecha, obteniendo que los extractos etanólicos y crudos de *Citrus* limón siendo una alternativa de control biológico y reemplazo de fungicidas sintéticos.

Camargo et al., 2021 evaluaron la actividad antifúngica del aceite esencial de limón sobre el hongo *Colletotrichum* sp. Se identificaron 41 metabolitos mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas; el aceite inhibió 1.16 %, 52.77 % y 82.41% del crecimiento micelial a concentraciones de 0.3, 1 y 2 % mientras que la inhibición de la germinación de esporas fue de 19,47 % a 100 % a concentraciones de 2, 4 y 8  $\mu\text{L}/\text{mL}$ .

Chávez et al., 2020 evaluaron la actividad antifúngica del quitosano y aceites esenciales de canela y eucalipto, como resultaron obtuvieron una inhibición del crecimiento micelial del 17 a 21% para los tratamientos con quitosano al 1.0% y 18 a 50% para los aceites esenciales por separados; mientras que combinados con quitosano el crecimiento micelial de las cepas evaluadas (*Colletotrichum acutatum* y *Colletotrichum gloeosporioides* aislados de aguacate) reduce la efectividad y se le atribuye a la cepa de *Colletotrichum* sp. la capacidad ser resistente al quitosano.

Scalvenzi et al. (2016) se evaluaron cinco concentraciones de aceite esencial: 10, 50, 100, 200, 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , de *Citrus limón* y *Cymbopogon citratus* para medir su efecto sobre el crecimiento in vitro de los hongos fitopatógenos *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus oryzae*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium solani*, *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora* sp. el aceite de *citrus limón* fue quien mejor efecto inhibitorio mostro al lograr la inhibición de un 95% de los hongos *A. oryzae*, *C. cladosporioides*, *F. solani*, *M. roreri* y *R. stolonifer* conite de su mayor contracción, mientras que el aceite de *C. limón* obtuvo un 70% el hongo *C. cladosporioides* y en un 72% *F. solani*.

Hoyos et al. (2022) evaluaron el potencial antifúngico de los aceites esenciales de tomillo y clavo para el control de *P. cinnamomi* y *Fusarium* sp. aislados de *Cinnamomum verum* en concentraciones de 60, 120 y 300  $\mu\text{L L}^{-1}$ , obteniendo como resultado que para ambos hongos la concentración 300  $\mu\text{L L}^{-1}$  causo la inhibición total del crecimiento radial y la concentración 120  $\mu\text{L L}^{-1}$  genero el crecimiento radial micelial de 0.06 mm por día del hongo *P. cinnamomi* mientras que para *Fusarium* sp. se generó la inhibición total, además en cuanto la producción de esporas el aceite de tomillo logra la reducción de 280 a 75 esporas en concentraciones de 300

$\mu\text{L L}^{-1}$ , presentando el mejor comportamiento antimicrobiano el aceite de tomillo siendo así, una alternativa de control para los fitopatógenos.

## **5.4 Marco conceptual**

### **5.4.1 Fitopatógenos**

Los fitopatógenos son organismos que causan enfermedades en las plantas. Estos organismos pueden ser bacterias, hongos, virus, nematodos u otros organismos patógenos que invaden los tejidos de las plantas y causan daño a su crecimiento y desarrollo. Los fitopatógenos pueden causar importantes pérdidas económicas en la agricultura y en la producción de alimentos, ya que pueden disminuir la calidad y la cantidad de los cultivos. Además, pueden tener un impacto negativo en el medio ambiente, ya que pueden afectar a la biodiversidad y a la calidad del suelo y del agua (Camacho et al., 2022).

El control de los fitopatógenos puede ser realizado mediante métodos de control físico, químico, biológico y cultural. Los métodos de control físico incluyen la eliminación mecánica de las partes afectadas de la planta y el uso de barreras físicas para prevenir la entrada de los patógenos, los métodos químicos incluyen el uso de pesticidas y fungicidas, mientras que los métodos biológicos incluyen el uso de organismos que son enemigos naturales de los patógenos, como ciertas bacterias, hongos y virus y el control cultural incluye prácticas agrícolas que minimizan la exposición de las plantas a los patógenos, como la rotación de cultivos, el uso de variedades resistentes a enfermedades y el mantenimiento de condiciones ambientales óptimas para el crecimiento de las plantas (Ramírez, 2021; Medina et al., 2021; Ttacca y Calderon, 2021).

#### **5.4.2 *Colletotrichum* sp.**

*Colletotrichum* sp. es un género de hongos de la familia *Glomerellaceae*. Este género contiene muchas especies de hongos fitopatógenos que pueden causar enfermedades en una amplia gama de cultivos, incluidas frutas, verduras y plantas ornamentales (Liu et al., 2022).

Las especies de *Colletotrichum* sp. son conocidas por su capacidad para causar antracnosis, un tipo de enfermedad de las plantas que afecta a varios tejidos de las plantas, como hojas, tallos, flores y frutos. Los síntomas de la antracnosis varían según la planta huésped, pero a menudo incluyen lesiones, manchas hundidas y decoloración (Boufleur et al., 2021; Dowling et al., 2020).

Se sabe que los hongos *Colletotrichum* sp. tienen ciclos de vida complejos que involucran tanto la reproducción sexual como la asexual. Pueden sobrevivir en restos de plantas, así como en el suelo y en tejidos de plantas infectadas. Los hongos también pueden transmitirse por distintos medios; Para controlar las enfermedades de *Colletotrichum* sp., se pueden emplear varias estrategias, incluida la rotación de cultivos, el saneamiento y el uso de fungicidas. Además, el mejoramiento de la resistencia a *Colletotrichum* sp. es un enfoque a largo plazo que puede ayudar a reducir el impacto de estos hongos en los cultivos (Bhunjun et al., 2021; Da Silva et al., 2020; Landero et al., 2016).

##### **5.4.2.1 Agroquímicos**

El uso de productos químicos en la agricultura ha sido una práctica común durante décadas. Sin embargo, esta práctica ha generado preocupaciones sobre los

impactos negativos que puede tener en el medio ambiente, la salud humana y la seguridad alimentaria (Cajamarca et al., 2020)

***Contaminación del suelo y del agua:*** Los productos químicos utilizados en la agricultura pueden infiltrarse en el suelo y contaminar las aguas subterráneas. La contaminación del suelo y del agua puede tener efectos negativos en la salud humana y en el medio ambiente (Grandez, 2020).

***Residuos químicos en los alimentos:*** Los productos químicos utilizados en la agricultura pueden dejar residuos en los alimentos que consumimos. Aunque los niveles de residuos químicos en los alimentos suelen estar dentro de los límites legales, algunos estudios sugieren que la exposición a estos residuos puede ser perjudicial para la salud (Polanco et al., 2019).

***Resistencia a los plaguicidas:*** El uso excesivo de plaguicidas puede llevar a la aparición de resistencia en las plagas. Cuando esto ocurre, se necesitan cantidades cada vez mayores de plaguicidas para lograr el mismo efecto, lo que puede llevar a una espiral de uso excesivo (Calle, 2019).

***Pérdida de biodiversidad:*** El uso de productos químicos en la agricultura puede tener un impacto negativo en la biodiversidad. Los productos químicos pueden matar no solo a las plagas, sino también a otros insectos y animales que son importantes para los ecosistemas (Zegarra, 2021).

***Impacto en la salud humana:*** Los productos químicos utilizados en la agricultura pueden tener efectos negativos en la salud de las personas que los manipulan o que viven cerca de las zonas agrícolas. Los trabajadores agrícolas pueden estar expuestos a sustancias químicas peligrosas, lo que puede llevar a problemas de salud a largo plazo (Polanco et al., 2019; Ibarra et al., 2019).

## **6 Metodología**

### **6.1 Tipo de investigación**

Se desarrolló un estudio experimental, enmarcado en la línea de investigación Bioprospección del programa de microbiología.

### **6.2 Colecta de plantas**

Se llevó a cabo la recolección de las hojas de limón en el campus deportivo de la Universidad Popular del Cesar, se realizarán los cortes de las hojas con ayuda de tijeras hasta completar 2 kilos del material vegetal. Las hojas se utilizaron secas para la obtención del extractos hidroalcohólicos y frescas para el aceite esencial, la colecta de las hojas se realizó de 8 a 10 am y se recolectaron de árboles adultos.

### **6.3 Elaboración de extractos**

El material vegetal utilizado para la obtención del extracto hidroalcohólico fue dejado a temperatura ambiente en una superficie limpia y seca hasta que el material estuvo seco para su extracción ya que, el secado natural del tejido vegetal ayuda a preservar la integridad de los compuestos volátiles presentes en las plantas, la composición química original y ayuda a reducir la humedad asegurando así, la calidad del producto. Posteriormente se maceró y procedió con la obtención de los extractos (Suárez y Carrillo, 2013).

Del material vegetal Triturado se tomaron 500 gramos los cuales fueron dispuestos en un frasco ámbar y se le adicionó agua y alcohol al 70% en proporción 1:3 durante 15 días a temperatura ambiente, posteriormente se realizó un proceso de filtración y se llevó a calentamiento en baño de maría para liberación de solvente y



concentración del extracto. Una vez obtenido el extracto se llevó a conservación a 15 °C (Suárez y Carrillo, 2013).

#### **6.4 Obtención de aceite esencial**

Para la obtención de aceite esencial se utilizó la metodología de arrastre de vapor, para lo cual se tomó un kilo de material vegetal triturado y se adiciono en el equipo de extracción al que previamente se le adicionaron 2 litros de agua, posteriormente se llevó a ebullición durante 2 horas (Medrano, 2019).

**Figura 1.** Equipo utilizado para la extracción de aceites esenciales por arrastre de vapor



#### **6.5 Rendimiento**

Este se determinó utilizando la ecuación que consiste en el peso total de aceite esencial extraído y los gramos de material vegetal utilizado para la extracción y este se multiplicó por 100 (Araujo et al., 2020):

$$\% = \left( \frac{\text{peso de aceite}}{\text{peso de muestra}} * 100 \right)$$

## **6.6 Obtención y preparación del material Biológico**

La cepa de *Colletotrichum* sp. fue suministrada por el laboratorio de investigación BIOTECGEN, se sembró en agar PDA durante 5 días. Pasado el tiempo de reactivación del fitopatógeno, se procedió a la preparación del inóculo por el método para la cuantificación de suspensiones de esporas utilizando una Cámara de Neubauer, se tomaron discos del hongo y se depositaron en 5 ml de solución salina estéril, a partir de esta dilución se realizó el ajuste del inóculo de esporas a  $1 \times 10^5$  conidios/ml, el inóculo se conservará en refrigeración hasta su manejo (Flores, 2019).

Para el alistamiento del material con actividad funguicida, se realizó la preparación de las diluciones de aceite esencial de 100 %, 80 %, 60 %, 40 %, 20 % y 10 % y de extractos etanólicos de 100 %; se realizaron disco de papel filtro de 9 mm, los cuales fueron impregnados de aceite esencial y extracto hidroalcohólico de *Citrus limón*.

## **6.7 Medición de halo de inhibición**

En medio de cultivo de PDA se inocularon 20  $\mu$ L de la suspensión de esporas, el método de siembra en placa por difusión utilizando un asa de Drigalsky y posteriormente se dejó reposar durante 5 minutos y se procedió a colocar los discos impregnados con los tratamientos, se depositaron cuatro discos por caja (Flores, 2019).

Se llevarán a incubación las cajas con los tratamientos a 29 °C y se realizó la medición de cada halo de inhibición después de cinco días de incubación (Flores, 2019). Para cada uno de los tratamientos se realizó un control.

## **6.8 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos de la medición de halos de inhibición fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA, alfa = 0,05) Para la determinación de diferencias estadísticas, seguido de la prueba post-hoc de Duncan (alfa = 0,05), para lo cual se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 27.

# **7 Resultados y Discusión**

## **7.1 Rendimiento**

$$\% \text{ rendimiento} = \frac{0.6704g}{1000g} * 100 = 0.067\%$$

El rendimiento del aceite esencial de limón extraído según los cálculos fue de 0.067%, este resultado es bajo en comparación a los rendimientos encontrados en la literatura; Scalvenzi et al. (2016) mediante el método de arrastre por vapor obtuvo un rendimiento de 0,44 %.

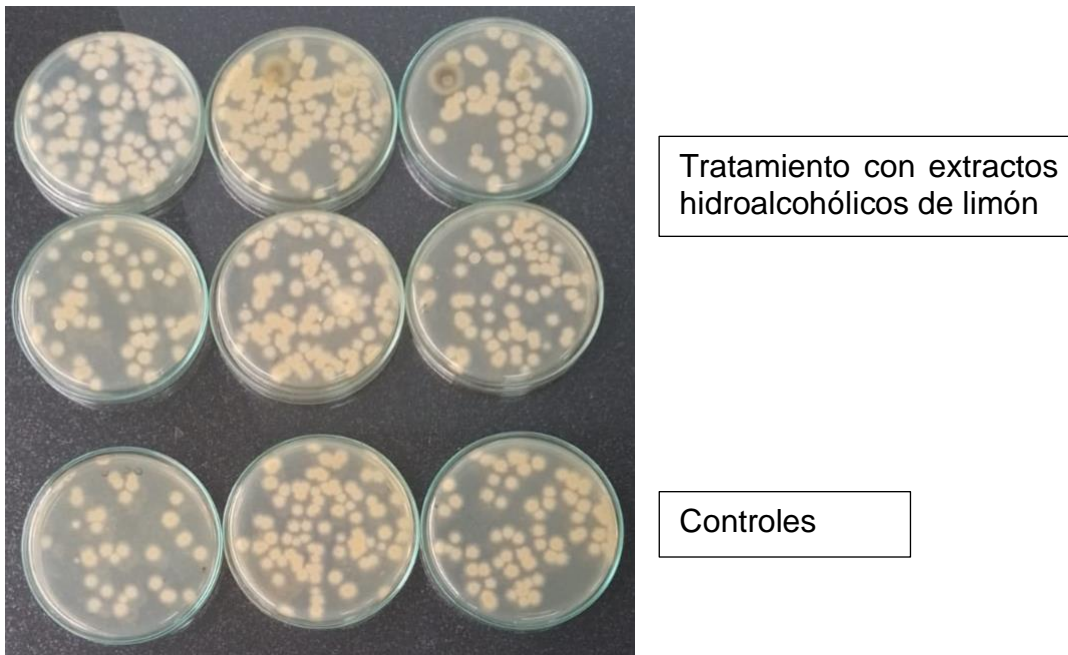
Las condiciones de los factores ambientales durante la cosecha, las condiciones de secado, la humedad relativa, etc. son factores que determinan el rendimiento durante su extracción, Delgado et al. (2016) hace referencia a la influencia de los factores ambientales y estado del material vegetal en el rendimiento del aceite esencial y su composición química, la presencia de un 75 % humedad en el tejido vegetal favorece el rendimiento y la humedad menores al 15 % disminuyen el

rendimiento y es importante conocer que la composición química se ve afectada debido a que menor índice de humedad se detectó mayor concentración de Citral.

## 7.2 Extracto hidroalcohólico de limón

Se realizó la prueba de actividad antifúngica del extracto etanólico de limón el cual se utilizó de forma concentrada, como resultado de su actividad se logró evidenciar el crecimiento libre del fitopatógeno *Colletotrichum* sp. por lo cual los extractos etanólicos obtenidos no tienen actividad antifúngica, por ende, el crecimiento del hongo no presentó diferencias frente al control (Figura 1).

**Figura 2.** Actividad antifúngica de los extractos hidroalcohólicos



Se tiene conocimiento acerca de la importancia de la composición química que deben tener los extractos de plantas para poder realizar su actividad antimicrobiana, de acuerdo con esto se entiende que para poder extraer todos los componentes presentes en la planta se debe contar con una metodología de extracción eficaz, esto está soportado por ojito et al. (2012) el cual describió en su investigación la

metodología que utilizo en la extracción por ultrasonido obteniendo  $33,91 \pm 3,07$  mg/ml de fenoles totales y como  $8,54 \pm 1,02$  mg/ml de flavonoides y una toxicidad de CL50 de 170,53  $\mu$ g/ml para los extractos etanólicos de limón asimismo, Taborda et al. (2015) además de realizar la obtención y concentración los extractos en un rotoevaporador, determinó que junto con la volatilización del etanol se pueden volatilizar fitocompuestos presente en los extractos por lo cual podemos inferir que durante el calentamiento realizado en baño de maría para concentración de extractos obtenidos en este estudio se pudo ocasionar la volatilización de compuestos presentes juntos con el solvente y ser la causa de la reducción de la efectividad antimicrobiana.

Además, se presenta qué el número de compuestos presentes en los extractos es dependiente de la concentración analítica del solvente utilizado; en el estudio realizado por Espinoza y Hiuñac. (2021) en su estudio hizo uso de etanol al 96 % lo cual le proporcione obtener compuestos como flavonoides, taninos, alcaloides, saponinas, etc. pese a esto se logra evidenciar inhibición de 21,91% y del 47,96% a concentraciones de 75 % y 100 %, respectivamente.

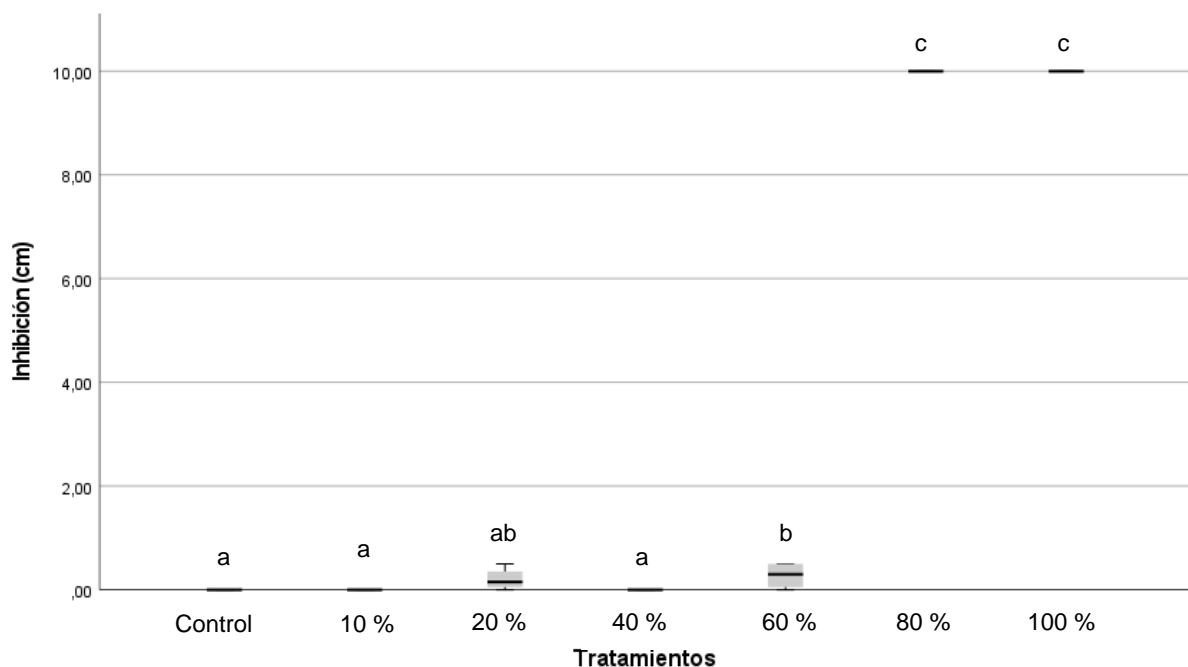
### **7.3 Aceite esencial de limoncillo**

Debido que el interés de este estudio es el control de fitopatógenos, el efecto del aceite esencial de limón sobre el crecimiento de *Colletotrichum* sp. fue positivo, para este estudio se dio inicio con una concentración de 100 % y la inhibición del hongo fue total mientras que el crecimiento del control fue total, por lo cual se realizaron diluciones con el fin de disminuir la concentración del aceite, las concentraciones fueron 80 %, 60 %, 40 %, 20 % y 10 %.

En la evaluación realizada la concentración de 80 % al igual que la de 100 % lograron la inhibición total del hongo, en la concentración 60 % la inhibición en promedio fue de 0,27 cm, en la concentración al 40 % no presentó inhibición, la concentración 20 % la inhibición promedio es de 0,2 cm y en la concentración del 10 % no se presenta inhibición.

En base a observación de los resultados obtenidos se puede inferir que la concentración del 80 % es la mínima en la que se presenta la acción inhibitoria y que existe diferencias significativas según Duncan alfa 0,05 solo del tratamiento 4 correspondiente a la concentración de 60 % (Tabla 1).

**Grafica 1.** Determinación de diferencias significativas entre tratamiento según post-hoc de Duncan (alfa=0,05).



Existen diferencias entre la composición química de los extractos y los aceites esenciales Valenzuela et al. (2023) logró a través de la cuantificación de los

compuestos de los aceites y los extractos identificar qué hay compuestos en los cuales difieren el aceite y el extracto además que las concentraciones en las que cierto compuesto se presentan en los extractos son menores en comparación a las presentes en los aceites esenciales y son las encargadas de la actividad antimicrobiana.

Según Camargo et al. (2021) menciona que esta acción antifúngica se debe a los componentes como los enantiómeros de los monoterpenos  $\beta$ -pineno y  $\alpha$ -pineno del aceite del limón y la toxicidad de este sobre las células microbianas. Que debido por la acción lipofílica ingresa en la célula y causa daño a la membrana.

Asimismo, se presenta la volatilización de los compuestos presentes en el aceite esencial como la causa de que la inhibición sea total, esto se debe a que estos compuestos al volatilizarse quedan atrapados en la caja Petri generando una atmosfera estéril aumentando su capacidad inhibitoria; acorde a lo descrito por Mendoza et al. (2019) los aceites esenciales contienen en promedio un entre un 85 % y 99 % de compuestos volátiles que pertenecen a terpenos, fenilpropanoide, ácidos grasos, lactonas como el Citral y 3-Thujeno los cuales generan la ruptura de la membrana celular fúngica y la inhibición de la síntesis de ergosterol ( Pérez et al., 2021; Tubay, 2018).

Por lo tanto, al comparar los resultados con mayor actividad antifúngica del aceite esencial y el extracto etanólico, se encontró que la inhibición contra el fitopatógeno es más eficiente con el aceite esencial, siendo este una alternativa agroecológica para emplear en vez de plaguicidas y fungicidas sintéticos en el mercado, esto debido a las propiedades antifúngicas que le confiere los compuestos como el Citral

el cual ha demostrado ser la mejor alternativa de control frente *Colletotrichum* sp. (Pérez et al., 2017).

La actividad de inhibición presentada en concentraciones altas de 80 % a 100 % son similares a la inhibición presentada en los estudios realizados Messgo et al. (2015) donde obtuvieron la inhibición de un 36% del crecimiento micelial de *P. infestans* realizando el tratamiento con aceite de limón puro, pese a que se habla de inhibición de distintos hongos se tiene en común el aceite de limón cuya actividad antifúngica se ve afectada para la composición química siendo la presencia de los monoterpenos oxigenados en concentraciones de 0,8 % y citral en concentraciones menores al 50 % en el aceite la causa de la disminución de la actividad antimicrobiana (Messgo et al., 2015; Floglia et al., 2016).

## **8 Conclusión**

El aceite esencial de limón es una alternativa para el control de *Colletotrichum* sp. en concentraciones mayores o iguales al 80 % debido a sus compuestos químicos y la concentración en que se encuentran.

De acuerdo con la literatura revisada y a los resultados obtenidos el método de concentración en baño de maría de los extractos etanolitos, no es la ideal debido a la pérdida de más de un 80 % de los compuestos volátiles.

## **9 Recomendaciones**

Evaluar las metodologías para la obtención de extractos y solventes que permitan la extracción de todos los componentes químicos de las plantas.

Realizar la extracción de aceites y extractos a partir de distintas partes vegetales como hojas y cascara del limón.



Para aumentar la veracidad de los resultados los investigadores que den continuidad al estudio deben realizar el estudio de la actividad antifúngica de los aceites esenciales y extractos etanólicos en condiciones de invernadero.

## 10 Bibliografía

Alonso-Gato, M., Astray, G., Mejuto, J. C., & Simal-Gandara, J. (2021). Essential Oils as Antimicrobials in Crop Protection. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 10(1), 34.

<https://doi.org/10.3390/antibiotics10010034>

Aguilar Pérez, D. A., Ramírez González, S. I., López Báez, O., & Prieto Méndez, J. (2023). Control in vitro de antracnosis (*colletotrichum gloeosporioides*) aislado de *annona muricata* L. con extractos vegetales. *Espacio I+D, Innovación más Desarrollo*, 11(31). <https://doi.org/10.31644/IMASD.31.2022.a02>. Disponible en:

<https://www.espacioimasd.unach.mx/index.php/Inicio/article/view/319>

Atoche Paico, C. J. (2022). Extractos de residuos agroindustriales de *Citrus* spp. Sobre el control de antracnosis en frutos poscosecha. Disponible en:

<http://repositorio.unf.edu.pe/handle/UNF/127>

Aguilar-Veloz, L. M., Calderón-Santoyo, M., Vázquez González, Y., & Ragazzo-Sánchez, J. A. (2020). Application of essential oils and polyphenols as natural antimicrobial agents in postharvest treatments: Advances and challenges. *Food science & nutrition*, 8(6), 2555–2568. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1437>

Alomar Messineo, D. (2020). Fenómeno técnico, normativas y sus impactos en la producción del territorio: Derechos de propiedad intelectual y biotecnología aplicada

a la agricultura industrial en la Argentina reciente (1996-2019). *Revista Universitaria de Geografía*, 29(1), 129-152. [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S1852-42652020000100006&script=sci\\_abstract&tlng=en](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S1852-42652020000100006&script=sci_abstract&tlng=en)

Araujo, C., Altamirano, C., Barreto, V., & Sarapura, J. (2020). Evaluación del rendimiento y características fisicoquímicas del aceite esencial de *Satureja sericea*. *Revista Ciencia Norandina*, 3(2), 117-122. <https://doi.org/10.37518/2663-6360X2020v3n2p117>

Atoche Paico, C. J. (2022). Extractos de residuos agroindustriales de *Citrus* spp. Sobre el control de antracnosis en frutos poscosecha. Disponible en: <http://repositorio.unf.edu.pe/handle/UNF/127>

Ballesteros, E. D., Correa, K. M. H., del Carmen Gomezcaeres Pérez, L., Ortega, H., Herrera, J. D., Padrón, I. E. & Pérez, M. P. (2019). *Biología Aplicada al Sector Agropecuario en el departamento de Sucre*. Disponible en: <https://www.cecar.edu.co/documentos/editorial/e-book/biologia-aplicada-al-sector-agropecuario-en-el-departamento-de-sucre.pdf>

Bouffleur, T. R., Ciampi-Guillardi, M., Tikami, Í., Rogério, F., Thon, M. R., Sukno, S. A., Massola Júnior, N. S., & Baroncelli, R. (2021). Soybean anthracnose caused by *Colletotrichum* species: Current status and future prospects. *Molecular plant pathology*, 22(4), 393–409. <https://doi.org/10.1111/mpp.13036>

Bula, A. O. (2020). Importancia de la agricultura en el desarrollo socio-económico.

Disponible en:

<http://biblioteca.puntoedu.edu.ar/bitstream/handle/2133/18616/Importancia%20de%20la%20agricultura%20en%20el%20desarrollo%20socio-econ%3%b3mico.pdf?sequence=3&isAllowed=y>

Bouffleur, T. R., Ciampi-Guillardi, M., Tikami, Í., Rogério, F., Thon, M. R., Sukno, S.

A y Baroncelli, R. (2021). Soybean anthracnose caused by *Colletotrichum* species: Current status and future prospects. *Molecular Plant Pathology*, 22(4), 393-409.

Disponible: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/mpp.13036>

Bhunjun, C. S., Phukhamsakda, C., Jayawardena, R. S., Jeewon, R., Promputtha, I., & Hyde, K. D. (2021). Investigating species boundaries in *Colletotrichum*. *Fungal Diversity*,

107, 107-127. Disponible:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s13225-021-00471-z>

Bouffleur, T. R., Ciampi-Guillardi, M., Tikami, Í., Rogério, F., Thon, M. R., Sukno, S.

A., Massola Júnior, N. S., & Baroncelli, R. (2021). Soybean anthracnose caused by *Colletotrichum* species: Current status and future prospects. *Molecular plant pathology*, 22(4), 393–409.

<https://doi.org/10.1111/mpp.13036>

Camargo Piñeres, Yessica, Zambrano Montenegro, Gisela, Ortega-Cuadros,

Mailen, Gutierrez Montero, Devis J., & Yepes, Jayr A.. (2021). Actividad antifúngica

in vitro del aceite esencial de *Swinglea glutinosa* Merr sobre *Colletotrichum* sp.

patógeno de mango (*Mangifera indica* L.). Revista Colombiana de Biotecnología, 23(1), 62-71. DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v23n1.88025>

Chung, P. C., Wu, H. Y., Wang, Y. W., Ariyawansa, H. A., Hu, H. P., Hung, T. H., Tzean, S. S., & Chung, C. L. (2020). Diversity and pathogenicity of *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose in Taiwan and description of a new species, *Colletotrichum miaoliense* sp. nov. Scientific reports, 10(1), 14664. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70878-2>

Calle Salvador, C. (2019). Impactos generados por la fumigación con agroquímicos en el cultivo de maíz (*zea mays*), caserío pueblo viejo, distrito de pacora–Lambayeque, 2019. Disponible en: <https://repositorio.udl.edu.pe/handle/UDL/258>

Cajamarca, D. I., Godoy, M. M. P., Escobar, C. P. C., Matveev, L. A. V., & Cárdenas, M. L. V. (2020). Agroquímicos: enemigos latentes para los polinizadores y la producción de alimentos primarios que agonizan. Contribuciones a las Ciencias Sociales, (65), 31. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7760495>

Camargo Piñeres, Yessica, Zambrano Montenegro, Gisela, Ortega-Cuadros, Mailen, Gutierrez Montero, Deivis J., & Yepes, Jayr A.. (2021). Actividad antifúngica in vitro del aceite esencial de *Swinglea glutinosa* Merr sobre *Colletotrichum* sp. patógeno de mango (*Mangifera indica* L.). Revista Colombiana de Biotecnología,

23(1), 62-71. Epub August 11,  
2021. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v23n1.88025>

Chávez-Magdaleno, Mireya Esbeiddy, Gutiérrez-Martínez, Porfirio, Montaña-Leyva, Beatriz, & González-Estrada, Ramsés Ramón. (2019). Evaluación in vitro del quitosano y aceites esenciales para el control de dos especies patógenas de *Colletotrichum* aisladas de aguacate (*Persea americana Mill*). TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas, 22, e189. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2019.0.189>

Camacho-Luna, V., Rodríguez-Hernández, A. A., Rodríguez-Monroy, M., Norma, R., & Sepúlveda-Jiménez, G. (2022). Identificación de hongos endófitos de *Ageratina pichinchensis* con actividad antagónica contra fitopatógenos de importancia agrícola. Revista mexicana de ciencias agrícolas, 13(6), 1027-1040.

Da Silva, L. L., Moreno, H. L. A., Correia, H. L. N., Santana, M. F., & de Queiroz, M. V. (2020). *Colletotrichum*: species complexes, lifestyle, and peculiarities of some sources of genetic variability. Applied microbiology and biotechnology, 104, 1891-1904. Disponible en: [//link.springer.com/article/10.1007/s00253-020-10363-y](https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-020-10363-y)

Delgado Ospina, J., Sánchez Orozco, M. S., & Bonilla Correa, C. R. (2016). Efecto del secado y la edad de las plantas en la composición de los aceites esenciales de *Lippia alba* (Mill.) NE Br. ex Britton & P. Wilson y *Lippia organoides* Kunth. Acta Agronómica, 65(2), 170-175. Disponible en:

[https://www.researchgate.net/publication/291287695\\_Effects\\_of\\_drying\\_and\\_age\\_plants\\_on\\_the\\_composition\\_of\\_the\\_essential\\_oils\\_of\\_Lippia\\_alba\\_Mill\\_NEBr\\_ex\\_Britton\\_P\\_Wilson\\_and\\_Lippia\\_organoides\\_Kunth\\_accessions](https://www.researchgate.net/publication/291287695_Effects_of_drying_and_age_plants_on_the_composition_of_the_essential_oils_of_Lippia_alba_Mill_NEBr_ex_Britton_P_Wilson_and_Lippia_organoides_Kunth_accessions)

Dosoky, N. S., & Setzer, W. N. (2018). Biological Activities and Safety of Citrus spp. Essential Oils. International journal of molecular sciences, 19(7), 1966. <https://doi.org/10.3390/ijms19071966>

Dowling, M., Peres, N., Villani, S., & Schnabel, G. (2020). Managing Colletotrichum on fruit crops: A “complex” challenge. Plant Disease, 104(9), 2301-2316. Disponible: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-11-19-2378-FE>

Díaz, A. (2019). Biotecnología en todos lados: En los alimentos, la medicina, la agricultura, la química y esto recién empieza!. Siglo XXI Editores. Disponible en: <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=XN-DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT5&dq=importancia+de+la+biotecnologia+en+la+agricultura&ots=426gWPhwKr&sig=ab7TUIXxLrkBvEaaGfoARInXSsE#v=onepage&q=importancia%20de%20la%20biotecnologia%20en%20la%20agricultura&f=false>

Espinoza Ramos, A. K., & Huiñac Saavedra, M. D. (2022). Actividad antibacteriana del extracto etanólico de la cáscara de citrus x limon (limón) frente a cutibacterium acnes ATCC 6919 In vitro. Disponible en: <https://repositorio.uma.edu.pe/handle/20.500.12970/1160>

Foglia, L. S., Camacho, B. D. Y., Guerrini, A., Radice, M., & Chiurato, M. (2016). Efectos de los aceites esenciales amazónicos de *Citrus limon* y *Cymbopogon citratus* sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos. *Revista Amazónica. Ciencia y Tecnología*, 5(3), 206-217.

Flores Zhunio, L. A. (2019). Comparación in vitro de la actividad antifúngica de aceite esencial de albahaca (*Ocimum basilicum*) e hinojo (*Foeniculum vulgare*) frente a *Colletotrichum gloesporioides*, agente causal de la antracnosis (Bachelor's thesis). Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/16809/1/UPS-CT008103.pdf>

Guédez, Clemencia, Cañizalez, Luis, Castillo, Carmen, & Olivar, Rafael. (2012). Evaluación in vitro de aislamientos de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 32(1), 44-49. Disponible en: [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562012000100009&lng=es&tlng=](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562012000100009&lng=es&tlng=).

Grandez Gonzales, G. (2020). Revisión Sistemática: Efectos de los agroquímicos en la calidad de los suelos agrícolas usando Bioindicadores, 2020. Disponible en: <https://repositorio.ucv.edu.pe/handle/20.500.12692/59147>

Hassan, O., Kim, J. S., Romain, B. B. N. D., & Chang, T. (2022). An account of *Colletotrichum* species associated with anthracnose of *Atractylodes ovata* in South



Korea based on morphology and molecular data. *PloS one*, 17(1), e0263084.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0263084>

Ibarra, J. A., López, C. A. V., Moreno, M. R. C., Reyes, P. D. L., Servin, J. A. B., Apodaca, M. E. M., & Sandoval, N. C. R. (2019). Agroquímicos organofosforados y su potencial daño en la salud de trabajadores agrícolas del campo sonorense. *CIENCIA Ergo-sum*, 26(1), 8. Disponible en:  
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7069704>

Instituto Nacional de Salud. (2017). Informe de evento intoxicaciones por sustancias químicas, Colombia, 2017. Disponible en: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/INTOXICACIONES%202017.pdf>

Khodadadi, F., González, J. B., Martin, P. L., Giroux, E., Bilodeau, G. J., Peter, K. A., Doyle, V. P., & Acímović, S. G. (2020). Identification and characterization of *Colletotrichum* species causing apple bitter rot in New York and description of *C. noveboracense* sp. nov. *Scientific reports*, 10(1), 11043.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-66761-9>

Kolainis, S., Koletti, A., Lykogianni, M., Karamanou, D., Gkizi, D., Tjamos, S. E., Paraskeuopoulos, A., & Aliferis, K. A. (2020). An integrated approach to improve plant protection against olive anthracnose caused by the *Colletotrichum acutatum* species complex. *PloS one*, 15(5), e0233916.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233916>

Landero-Valenzuela, Nadia, Lara-Viveros, Francisco Marcelo, Andrade-Hoyos, Petra, Aguilar-Pérez, Luis Alfonso, & Aguado Rodríguez, Graciano Javier. (2016). Alternativas para el control de *Colletotrichum* spp.. Revista mexicana de ciencias agrícolas, 7(5), 1189-1198. Disponible: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-09342016000501189&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342016000501189&lng=es&tlng=es).

López, Virginia Toledo, Schmidt, Mariana, Lamben, Carlos Lorenzo, Pereyra, Horacio, Battán, Jimena García, & Ceirano, Valeria. (2020). Riesgos e impactos socio-sanitarios del uso de agroquímicos: un estudio de caso en Selva, Santiago del Estero, 1990-2019. Revista Argentina de Salud Pública, 12, 15. Epub 20 de octubre de 2020. Recuperado en 29 de marzo de 2023, de [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1853-810X2020000200015&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1853-810X2020000200015&lng=es&tlng=es).

Liu, F., Ma, Z. Y., Hou, L. W., Diao, Y. Z., Wu, W. P., Damm, U., Song, S., & Cai, L. (2022). Updating species diversity of *Colletotrichum*, with a phylogenomic overview. *Studies in mycology*, 101, 1–56. <https://doi.org/10.3114/sim.2022.101.01>

Messgo-Moumene, S., Li, Y., Bachir, K., Houmani, Z., Bouznad, Z., & Chemat, F. (2015). Antifungal power of citrus essential oils against potato late blight causative

agent. Journal of Essential Oil Research, 27(2), 169-176. DOI:  
<https://doi.org/10.1080/10412905.2014.982877>

Moran Herrera, M. M. (2020). Importancia de la Agricultura Limpia para la producción de alimentos inocuos” (Bachelor's thesis, BABAHOYO: UTB, 2020).

Disponible en: <http://dspace.utb.edu.ec/bitstream/handle/49000/8510/E-UTB-FACIAG-ING%20AGROP-000107.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Montenegro Gómez, S. P., & Hernández Ossa, Y. K. (2015). Biotecnología aplicada al desarrollo agropecuario colombiano. Revista De Investigación Agraria Y Ambiental, 6(2), 97–108. <https://doi.org/10.22490/21456453.1408>. Disponible en:

<https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/riaa/article/view/1408>

Medrano Gastañuadi, M. D. J. (2019). Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de hojas de Citrus aurantifolia (limón peruano) frente a Staphylococcus aureus.

Disponible en:

[http://repositorio.uladech.edu.pe/bitstream/handle/20.500.13032/16386/EFFECTO\\_AUREUS\\_MEDRANO\\_GASTANUADI\\_MILAGROS\\_DE\\_JESUS.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.uladech.edu.pe/bitstream/handle/20.500.13032/16386/EFFECTO_AUREUS_MEDRANO_GASTANUADI_MILAGROS_DE_JESUS.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Mendoza, B. S. V., Meza, M. N. P., Mendoza, K. E. M., Pin-Mera, D. E., Vargas, A. M. O., & Riera, M. A. (2019). Obtención de aceite esencial de romero con fines cosméticos. Prisma Tecnológico, 10(1), 28-32.

<https://doi.org/10.33412/pri.v10.1.2170>.

Disponible en:

[http://portal.amelica.org/ameli/journal/324/3241314005/html/#redalyc\\_3241314005\\_ref3](http://portal.amelica.org/ameli/journal/324/3241314005/html/#redalyc_3241314005_ref3)

Moctezuma, O. O. (2022). Desarrollo de enfermedad renal crónica de causa no tradicional en agricultores latinoamericanos por exposición laboral y uso de agroquímicos: una revisión integral. Disponible en: [http://catarina.udlap.mx/u\\_dl\\_a/tales/documentos/lef/ortega\\_moctezuma\\_o/](http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lef/ortega_moctezuma_o/)

Medina, C. V. M., Morales, J. M. L., Morales, S. G., Morales, J. M. L., & Beltrán, K. E. P. (2021). Agentes antifúngicos provenientes de especies arbóreas para el control de hongos fitopatógenos. Disponible: [https://ciatej.mx/files/divulgacion/divulgacion\\_60777af339e95.pdf](https://ciatej.mx/files/divulgacion/divulgacion_60777af339e95.pdf)

Namiota, M., & Bonikowski, R. (2021). The Current State of Knowledge about Essential Oil Fumigation for Quality of Crops during Postharvest. *International journal of molecular sciences*, 22(24), 13351. <https://doi.org/10.3390/ijms222413351>

Ojito Ramos, Katia, Herrera Sánchez, Yamila, Vega Pérez, Nadine, & Portal Villafaña, Orelvis. (2012). Actividad antioxidante in vitro y toxicidad de extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* spp. (Rutaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17(4), 368-379. Recuperado en 04 de septiembre de 2023, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962012000400008&lng=es&tlng=pt](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962012000400008&lng=es&tlng=pt).

Páramo Aguilera, L. A., Delgado Silva, H. D., & Ríos Guevara, C. K. (2021). Potencial del laboratorio de biotecnología del PIESA-UNI para desarrollar bioprocesos ambientales, agrícolas e industriales. *Nexo Revista Científica*, 34(02), 534–546. <https://doi.org/10.5377/nexo.v34i02.11540>. Disponible en: <https://camjol.info/index.php/NEXO/article/view/11540>

Pérez Cordero, A, Chamorro Anaya, L, & Gomez, J M. (2021). Inhibición de *Colletotrichum gloeosporioides* en cultivos de ñañe en el Caribe colombiano usando aceites esenciales de *Curcuma longa* y *Zingiber officinale*. *Ciencia en Desarrollo*, 12(1), 1–12. <https://doi.org/10.19053/01217488.v12.n1.2021.10510>. Disponible en: [https://revistas.uptc.edu.co/index.php/ciencia\\_en\\_desarrollo/article/view/10510](https://revistas.uptc.edu.co/index.php/ciencia_en_desarrollo/article/view/10510)

Pérez-Cordero, Alexander, Chamorro-Anaya, Leonardo, Vitola-Romero, Deimer, & Hernández-Gómez, Jesús. (2017). Actividad antifúngica de *Cymbopogon citratus* contra *Colletotrichum gloeosporioides*. *Agronomía Mesoamericana*, 28 (2), 465-475. <https://dx.doi.org/10.15517/ma.v28i2.23647>

Polanco Rodríguez, Angel Gabriel, Magaña Castro, Teresa Virginia, Cetz Luit, Jorge, & Quintal López, Rocío. (2019). Uso de agroquímicos cancerígenos en la región agrícola de Yucatán, México. *Centro Agrícola*, 46(2), 72-83. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-57852019000200072&lng=es&tlng=pt](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-57852019000200072&lng=es&tlng=pt).

Restrepo, S., & Vargas, Ángela. (2007). Biotecnología: herramienta de diagnóstico de enfermedades en plantas. Palmas, 28(especial), 366–372. Recuperado a partir de <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/1272>

Ramirez Quispe, N. F. (2021). Formulación de extractos vegetales para el control de enfermedades agrícolas. Disponible en: <https://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/20.500.12996/5091>

Ramírez-Salcedo, Hilda Elisa, Barrientos-Ramírez, Lucía, Vargas-Radillo, J. Jesús, Rodríguez-Macías, Ramón, Ruíz-López, Mario Alberto, & Virgen-Calleros, Gil. (2019). Inhibición de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Botrytis cinerea* con extractos de *Guazuma ulmifolia* Lam. Revista mexicana de fitopatología, 37(2), 330-344. Epub 30 de septiembre de 2020. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1812-1>. Disponible en: [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-33092019000200009&script=sci\\_arttext](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-33092019000200009&script=sci_arttext)

Salamanca Castillo, G. F. (2020). Efecto de los agroquímicos en salud pública y medio ambiente. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/344703632.pdf>

Huamán Aliaga, N. R. (2020). Efecto antibacteriano in vitro del extracto hidroalcohólico de las semillas de Citrus limon (L.) Osbeck (limón) en cepas *Staphylococcus aureus*. Disponible en: <http://repositorio.uigv.edu.pe/handle/20.500.11818/4988>

Scalvenzi Foglia, L., Yaguache Camacho, B. D., Guerrini, A., Radice, M., & Chiurato, M. (2016). Efectos de los aceites esenciales amazónicos de *Citrus limón* y *Cymbopogon citratus* sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos. UEA | Revista Amazónica Ciencia Y Tecnología (RACYT)|, 5(3), 206–217. Disponible en: <https://revistas.uea.edu.ec/index.php/racyt/article/view/70>

Schmidt, M., López, V. T., Tobías, M., Grinberg, E., & Merlinsky, G. (2022). Conflictividad socio-ambiental por uso de agroquímicos en Salta, Santiago del Estero y Santa Fe, Argentina. *Ciência & Saúde Coletiva*, 27, 1061-1072. Doi: <https://doi.org/10.1590/1413-81232022273.04852021>. Disponibl en: <https://www.scielosp.org/article/csc/2022.v27n3/1061-1072/es/>

Suárez, N. J. P., & Carrillo, A. C. (2013). Eficacia de los extractos hidroalcohólicos de dos plantas sobre garrapatas adultas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 14(1), 91-97. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/ccta/v14n1/v14n1a10.pdf>

Taborda Andrade, Luis Alejandro, Sánchez Orozco, Manuel Salvador, Bonilla Correa, Carmen Rosa, & Huertas Davey, Carlos. (2015). Efecto fungistático de extractos y aceites esenciales de *Lippia organoides* HBK y *Thymus vulgaris* L. como alternativas de manejo de *Botrytis cinerea* en fresa. *Acta Agronómica*, 64(1), 93-99. <https://doi.org/10.15446/acag.v64n1.35773>

Ttacca, B. L., & Calderon, L. L. M. (2021). Control de hongos fitopatógenos asociados a semillas de palto *Persea americana* Mill.(Lauraceae) in vitro. *Ciencia*

Latina Revista Científica Multidisciplinar, 5(3), 2690-2701. Disponible:  
<https://ciencialatina.org/index.php/cienciala/article/view/483>

Tubay Bermudes, C. J. (2018). Composición química (volátiles), caracterización fisicoquímica y actividades biológicas del aceite esencial de *Lippia alba* de Ecuador (Doctoral dissertation). Disponible en:  
<https://iconline.ipleiria.pt/bitstream/10400.8/3474/1/TESIS%20LIPPIA%20ALBA%20ODEL%20ECUADOR%2c%20MANABI%2c%20CHARAPOTO%201.pdf>

Valenzuela-Quintero, Genesis, Ortega-Nieblas, María Magdalena, Burboa-Zazueta, María Guadalupe, Gutiérrez-Millán, Luis Enrique, López-Córdova, Juan Pedro, Rentería-Martínez, María Eugenia, Jiménez-León, José, Curlango-Rivera, Gilberto, & Guerrero-Ruíz, José Cosme. (2023). Actividad antifúngica del aceite esencial y extracto acuoso del orégano *Lippia palmeri* W. sobre *Fusarium oxysporum* y *Thanatephorus* sp.. *Biotecnia*, 25(2), 153-158. Epub 25 de agosto de 2023. DOI:<https://doi.org/10.18633/biotecnia.v25i2.1903>

Villar Rodríguez, J., Pérez-Pico, A. M., Mingorance-Álvarez, E., & Mayordomo Acevedo, R. (2022). Meta-analysis of the antifungal activities of three essential oils as alternative therapies in dermatophytosis infections. *Journal of applied microbiology*, 133(2), 241–253. <https://doi.org/10.1111/jam.15539>



Zegarra Salamona, G. N. (2021). El impacto en el medio ambiente del uso de agroquímicos: el riesgo a la vida y salud humana (Bachelor's thesis). Disponible en:

<https://repositorio.uesiglo21.edu.ar/handle/ues21/22422>

## 11 Anexos

### ANOVA

Inhibicion

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	560,905	6	93,484	5649,403	<,001
Dentro de grupos	,348	21	,017		
Total	561,252	27			

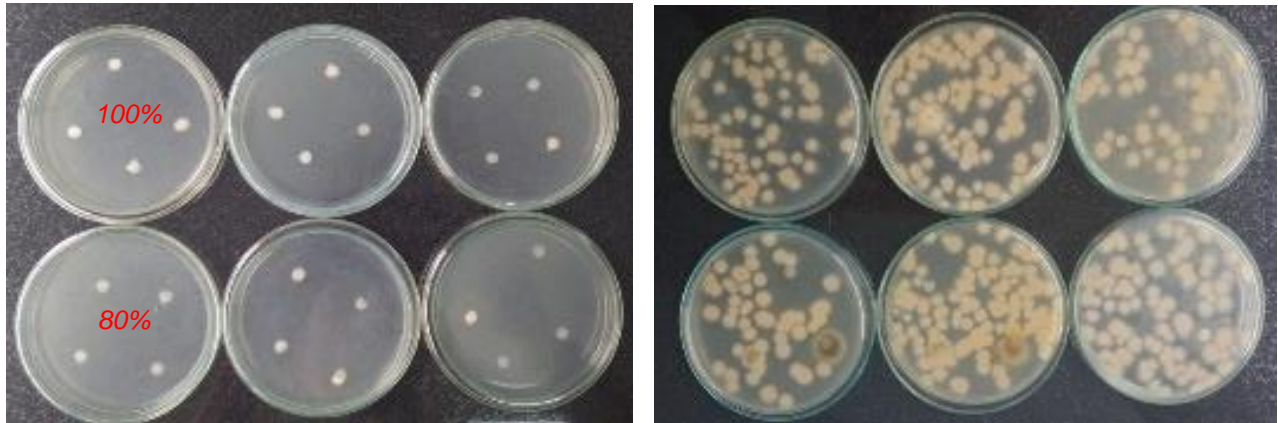
### Recolección y procesamiento de material vegetal.



### Peso del aceite extraído.



## Resultados de las pruebas realizadas contra *Colletotrichum* sp.



Concentraciones con resultados positivo del  
aceite esencial (Inhibición total del crecimiento  
del hongo).



E  
n  
d  
o  
s  
d  
é  
C  
e  
t  
r  
i  
c  
e  
o  
h  
ó  
d  
e  
b  
b  
a  
g  
b  
ø  
l  
i  
c  
o  
(  
C  
r  
e  
c  
i  
m  
i  
e  
n  
t  
o  
l  
i  
b

