

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Efecto inhibitorio de extractos vegetales y aceites esenciales sobre microorganismos
fitopatógenos o deterioradores de alimentos**

Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en Microbiología

MARIA ANTONELLA AMORES PROAÑO

Quito, 2024

CERTIFICACIÓN

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Microbiología de la señorita María Antonella Amores Proaño ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.



Martín Marcial-Coba, PhD

Director de la Disertación

Quito, 28 de junio del 2024

DEDICATORIA

A Dios, a mi madre a mi tía y a mis hermanas.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi gratitud a Dios por permitirme cursar y culminar mis estudios de grado; también quiero agradecer a mi hermosa madre, cuyo dedicado esfuerzo ha sido fundamental para mi éxito, su inmenso apoyo ha sido crucial en mi crecimiento personal y profesional.

A mi tutor de tesis al PhD. Martin Marcial Coba, por brindarme la oportunidad de trabajar en este gran proyecto de investigación y formar parte de su equipo, compartirme sus conocimientos, todos sus aportes, por la paciencia y, sobre todo, por confiar en mí, mantenerme motivada y perseverar en todo momento.

Agradezco a Bolivar Salas y al personal de sala de preparaciones, por haber contribuido a este proyecto con reactivos, medios, materiales y equipos, la ayuda de todo su equipo fue fundamental para el desarrollo de esta investigación; a Diego Valdospinos, por siempre estar dispuesto a ayudar y compartir siempre todo su conocimiento.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer infinitamente el apoyo de mis amigos de carrera, la familia que forme 4 años atrás y que ahora cada uno tiene un pedazo de mi corazón y mi admiración total.

Emilia, Sofia, Dagmar, Diana y Kevin, agradezco su amistad sincera durante todo este tiempo en la carrera, cada uno de ustedes tienen algo que los hace ser especiales a su manera, he aprendido tanto en estos últimos años, agradezco su perseverancia, su dedicación, su paciencia, su amor incondicional y, sobre todo, su apoyo.

LISTA DE ABREVIATURAS

AE: Aceites esenciales

AG: Aceite de guaviduca

TABLA DE CONTENIDO

CERTIFICACIÓN.....	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
1. RESUMEN.....	IX
2. ABSTRACT.....	X
3. INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	4
OBJETIVO GENERAL:.....	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	4
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
4.1 TIPO DE ESTUDIO.....	5
4.2 CEPAS DE MICROORGANISMOS Y EXTRACTOS VEGETALES.....	5
4.3 EFECTO INHIBITORIO DE EXTRACTOS VEGETALES Y ACEITE ESENCIAL FRENTE A HONGOS FITOPATÓGENOS O DETERIORADORES DE ALIMENTOS	5
4.4 ANTAGONISMO DE EXTRACTOS VEGETALES Y ACEITE ESENCIAL FRENTE A BACTERIAS FITOPATÓGENAS Y DETERIORADORES DE ALIMENTOS.....	6
4.5 EFECTO SINÉRGICO DE EXTRACTOS VEGETALES EN EL DESARROLLO DE CEPAS FÚNGICAS Y BACTERIANAS FITOPATÓGENAS O DETERIORADORES DE ALIMENTOS.....	6
4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	6
5. RESULTADOS.....	7
5.1 EFECTO INHIBITORIO DE EXTRACTOS VEGETALES Y ACEITE ESENCIAL FRENTE A HONGOS FITOPATÓGENOS O DETERIORADORES DE ALIMENTOS	7
5.2 ANTAGONISMO DE EXTRACTOS VEGETALES Y ACEITE ESENCIAL FRENTE A BACTERIAS FITOPATÓGENAS Y DETERIORADORES DE ALIMENTOS.....	8
5.3 COMBINACIONES DE EXTRACTOS VEGETALES EN EL DESARROLLO DE CEPAS BACTERIANAS FITOPATÓGENAS O DETERIORADORES DE ALIMENTOS.....	9
6. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	10
7. CONCLUSIONES.....	13
8.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	14

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Porcentaje de inhibición de extractos vegetales y aceite esencial frente a hongos fitopatógenos y deterioradores de alimentos	7
Figura 2. Efecto inhibitorio del aceite esencial AE de guaviduca frente a las cepas fúngicas evaluadas después de 7 días de incubación.....	8
Figura 3. Diámetro de halos de inhibición de extractos vegetales, aceite esencial y sinergismo de extractos vegetales frente a cepas bacterianas.....	9
Figura 4. Combinación de extractos vegetales Chilca etanol-Laurel frente a <i>Xanthomonas campestris</i>	10

1. RESUMEN

Este estudio aborda los retos que enfrenta la agricultura debido a las pérdidas de cosechas causadas por microorganismos fitopatógenos y deterioradores de alimentos, como bacterias y hongos. Tradicionalmente, se han utilizado fertilizantes y plaguicidas para controlar estos patógenos, pero estos métodos tienen efectos negativos en la salud, la economía y el medio ambiente. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue encontrar alternativas ecológicas y sostenibles mediante el uso de extractos vegetales y aceites esenciales. En este contexto, se evaluaron extractos de laurel (*Laurus nobilis*), chilca (*Baccharis latifolia*) y semilla de aguacate (*Persea americana*), así como el aceite esencial de guaviduca (*Piper carpubya*), frente a hongos fitopatógenos *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium oxysporum* y bacterias deterioradoras de alimentos *Xanthomonas campestris* MB_45 y *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525. Además, se realizaron combinaciones entre los extractos vegetales en búsqueda de un potencial efecto sinérgico. Las cepas fúngicas se reactivaron en agar PDA a 25 °C y las bacterianas en agar nutriente a 35 °C durante 24 horas. Los resultados mostraron que el aceite esencial de guaviduca fue altamente efectivo, inhibiendo casi completamente el crecimiento de *Aspergillus* sp., *Fusarium oxysporum* YC3 y *Penicillium* sp. Los extractos de laurel y semilla de aguacate no mostraron inhibición significativa frente a las cepas fúngicas, mientras que el extracto de chilca tuvo un efecto inhibitor limitado. Las combinaciones de extractos no presentaron un sinergismo significativo. En conclusión, los extractos vegetales mostraron una eficacia variable y limitada, sugiriendo la necesidad de optimizar las condiciones de uso en futuras investigaciones.

Palabras claves: Aceite esencial, extractos vegetales, inhibición, microorganismos fitopatógenos, sinergismo.

2. ABSTRACT

This study addresses the challenges agriculture faces due to crop losses caused by phytopathogenic microorganisms and food deteriorators such as bacteria and fungi. Traditionally, fertilizers and pesticides have been used to control these pathogens, but these methods have negative effects on health, economy and environment. Therefore, the objective of this research is to find ecological and sustainable alternatives using plant extracts and essential oils. In this context, extracts from laurel (*Laurus nobilis*), chilca (*Baccharis latifolia*), and avocado seed (*Persea americana*), as well as the essential oil of guaviduca (*Piper carpubya*), were evaluated against phytopathogenic fungi *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium oxysporum*, food-spoiling bacteria *Xanthomonas campestris* MB_45 and *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525. Additionally, combinations of these plant extracts were tested to observe if their effectiveness was enhanced. Fungal strains were reactivated on PDA agar at 25 °C, while bacterial strains were incubated on nutrient agar at 35 °C for 24 hours. The results showed that the guaviduca essential oil was highly effective, inhibiting almost completely the growth of *Aspergillus* sp., *Fusarium oxysporum* YC3 and *Penicillium* sp. Laurel and avocado seeds extracts did not show significant inhibition against fungal strains, while chilca extract had a limited inhibitory effect. Combinations of extracts did not exhibit significant synergism. In conclusion, plant extracts demonstrated variable and limited efficacy, suggesting the need to optimize conditions for future research.

Keywords: Essential oil, plant extracts, inhibition, phytopathogenic microorganisms, synergism.

3. INTRODUCCIÓN

Desde su establecimiento, la agricultura ha constituido un pilar fundamental en el desarrollo de la sociedad, en términos culturales, económicos y nutricionales (Beros, 2000). Una gran variedad de las frutas y vegetales ya producidas hace miles de años, actualmente son indispensables para una dieta saludable (Leogrande, 2022). En función del crecimiento demográfico mundial, las actividades relacionadas a la agricultura también han experimentado un incremento sostenido (Montgomery, 2008). Con el propósito de satisfacer la demanda mundial de alimentos, este crecimiento productivo se intensificó a partir de la década de 1940, en la que se instauró la denominada “revolución verde”. Esta estrategia se fundamentó en la expansión de la frontera agrícola, la tecnificación de sistemas de riego y la investigación, desarrollo y el uso de agroquímicos (Harlander, 2002). Estos han sido utilizados con el objetivo de aumentar la productividad de cultivos agrícolas (Izquierdo, 2017)

Entre los productos agroquímicos, cobran relevancia los fertilizantes y los plaguicidas. Los últimos tienen como propósito controlar o eliminar organismos perjudiciales para los cultivos vegetales como insectos, nemátodos, hongos y bacterias fitopatógenas (Crawford et al., 2023) como *Botrytis cinerea*, *Fusarium* spp., *Puccinia* spp, y *Xanthomonas* spp. (Sun, 2020). Según la FAO (2015) en las últimas tres décadas se ha registrado un aumento en el uso de plaguicidas a nivel global, con una tasa de crecimiento que oscila entre el 4% y el 5.4%. Aunque estos productos han sido cruciales para aumentar la producción de alimentos, es importante considerar las desventajas en términos sociales, ambientales y sanitarios que implica su uso.

En ese contexto el uso de plaguicidas en la agricultura es un tema de gran preocupación a nivel mundial. Por ejemplo, los residuos de estos agroquímicos pueden permanecer en los alimentos y se han relacionado con trastornos endocrinos, cáncer y daños neurológicos (Toro, 2010). A nivel económico, el uso prolongado de estas sustancias resulta costoso por la dependencia que genera en el suelo, lo que deriva en inversiones constantes para recuperar el suelo (Jaquez et al., 2022). Por último, en el ámbito ambiental, el uso excesivo de plaguicidas ha causado desecación en suelos, pérdida de nutrientes y alteración de ciclos vitales (Pedraza, 2020).

De manera similar, el deterioro mediado por hongos filamentosos, levaduras y bacterias, es responsable del 25% de la pérdida total de alimentos a nivel global, alcanzando un costo de aproximadamente 1000 millones de dólares al año (Karanth, 2023). Con el propósito de limitar el desarrollo de microorganismos patógenos o deterioradores en matrices alimentarias, convencionalmente se utilizan compuestos conservantes como sales de nitrato, benzoato, sulfitos, sorbatos y formaldehído (Pinto, 2023). Sin embargo, la aplicación repetitiva de estos productos se ha vinculado con el desarrollo de mecanismos de resistencia en los microorganismos (Mosfata, 2018). Asimismo, el consumo de estos compuestos se asocia con efectos carcinogénicos y alérgicos en el ser humano (Gonelimali, 2018; Pinto, 2023).

Con base en los antecedentes, arriba mencionados, se plantea la necesidad de reemplazar el uso de agroquímicos y conservantes mediante el desarrollo de alternativas relacionadas con una producción agroindustrial sostenible. Por ejemplo, el empleo de extractos vegetales y aceites esenciales podrían constituir una opción válida para el control de microorganismos fitopatógenos y deterioradores de alimentos. Su aplicación podría fundamentarse en el alto contenido de compuestos bioactivos como los terpenoides, compuestos fenólicos y tioles que exhiben algunas plantas, considerando que muchos de estos cumplen un rol fundamental en los mecanismos de defensa de las plantas que los producen y, por lo tanto, su extracción y aplicación se relaciona con un efecto microbicida (Celis et al., 2008).

El uso de productos vegetales, en lugar de productos químicos, como fuente de pesticidas se presenta como una alternativa más segura tanto para el medio ambiente como para la salud humana (Celis et al. 2008). Adicionalmente, la obtención de extractos implica bajos costos de producción y facilidad de obtención, debido a que la materia prima utilizada, generalmente, proviene de residuos agroindustriales (Leogrande et al., 2021). Sin embargo, la composición, el mecanismo de acción y el efecto de distintos extractos vegetales son poco conocidos y por ende su utilización ha sido muy limitada en el campo agrícola (Guerrero et al., 2020).

En relación a los aceites esenciales (AE), son sustancias líquidas que cuentan con un carácter lipofílico y altamente volátil, los cuales son obtenidos a partir de diferentes partes de la planta como: flores, hojas corteza y raíces (Valero, 2021). Gracias a su compleja mezcla de compuestos químicos, representados principalmente por metabolitos secundarios

asociados con propiedades antibacterianas, antifúngicas y antivirales (Sacalvenzi et al., 2016).

La naturaleza lipofílica de los AE facilita la interacción con membranas biológicas y consecuentemente altera la permeabilidad de la membrana celular de los microorganismos, conduciendo a una fuga de compuestos celulares vitales e indispensables y eventualmente llevando a una muerte celular (Ugalde et al., 2016).

A través de los AE, se ha demostrado que estos son capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos fitopatógenos. Por ejemplo, el aceite de orégano (*Origanum vulgare*) demostró inhibir por completo el desarrollo de bacterias Gram- negativas como: *Salmonella* Typhimurium y *Escherichia coli* y microorganismos fúngicos como: *Aspergillus niger* y *Rhodotorula* (Elgayyar et al., 2001).

Con respecto a los extractos vegetales, estos han demostrado tener capacidad inhibitoria sobre distintos tipos de microorganismos. Por ejemplo, la capacidad antimicrobiana del extracto de laurel (*Laurus nobilis*), especie originaria del Mediterráneo (Mendoza, 2008; Ortiz y Gavin, 2015) ha sido descrita frente a microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Kocuria rhizophila*, *Salmonella enterica* serovares abony y typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Candida* spp, *Aspergillus brasiliensis*, *A. clavatus*, *A. niger*, *Cladosporium cladosporoides*, *Chaetoniim globosum* y *Candida* spp., entre otros (Fidan, 2019; Msillou, 2020; Ramos, 2012 y Peixoto, 2017). Este efecto, podría relacionarse, principalmente, con su elevado contenido de compuestos fenólicos, entre los que se incluyen flavonoides, ácidos fenólicos, taninos y lignanos (Dobroslavic, 2022). Otros compuestos, con actividad antimicrobiana, presentes en este extracto, son los terpenos terpenos 1,8- cineol, α -pineno, β -pineno el sabineno y el linalol (Fidan et al., 2019).

De la misma manera, el efecto antimicrobiano de plantas endémicas de Centro y Sur América como el aguacate que pertenece a la familia Lauraceae (*Persea americana*) y chilca (*Baccharis latifolia*) (Acuña et al., 2012) han exhibido capacidad inhibitoria frente a microorganismos fitopatógenos y agentes deterioradores de alimentos como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y especies del género *Pseudomonas* (Hemeg et al., 2020). La capacidad antagonista de estas plantas se relaciona con los metabolitos que, principalmente, se acumulan en sus hojas (Gonelimali et al., 2018). Entre estos compuestos se incluye a flavonoides, fenoles y terpenos que actúan desnaturalizando las proteínas y lípidos de la membrana del organismo blanco o inhibiendo

su metabolismo, lo que inactiva la liberación de toxinas y otros factores de virulencia (Enríquez et al., 2018).

Cabe destacar que, en el Ecuador no se han realizado investigaciones exhaustivas relacionadas al uso de extractos vegetales y aceites esenciales como biocontroladores de microorganismos fitopatógenos y deterioradores de alimentos. Por lo tanto, la presente investigación evaluó la capacidad inhibitoria de los extractos vegetales de chilca (*Baccharis latifolia*), laurel (*Laurus nobilis*), semilla de aguacate (*Persea americana*) y aceite esencial de Guaviduca (*Piper carpunya*) frente a bacterias y hongos fitopatógenos o deterioradores de alimentos como *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas fluorescens*, *Fusarium oxysporum.*, *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp.

De tal manera, esta investigación pretendió responder las siguientes interrogantes: 1) Si los extractos de plantas y aceites esenciales tienen un efecto inhibitorio sobre microorganismos fitopatógenos y deterioradores de alimentos, 2) si la combinación de diferentes extractos vegetales tiene un efecto sinérgico en términos de inhibición de microorganismos fitopatógenos y deterioradores de alimentos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el potencial inhibitorio de extractos vegetales provenientes de laurel (*Laurus nobilis*), semilla de aguacate (*Persea americana*), chilca (*Baccharis latifolia*) y aceite esencial de guaviduca (*Piper carpunya*) frente a microorganismos fitopatógenos y deterioradores de alimentos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a) Evaluar el efecto individual de extractos de laurel, semilla de aguacate, chilca y aceite esencial de guaviduca sobre el crecimiento de cepas fúngicas y bacterianas caracterizadas como fitopatógenas o deterioradoras de alimentos.
- b) Estudiar el efecto de la aplicación combinada de extractos vegetales de laurel, semilla de aguacate y chilca sobre el crecimiento de cepas fúngicas y bacterianas caracterizadas como fitopatógenas o deterioradoras de alimentos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDIO

El presente estudio es de carácter experimental debido a que consistió en evaluar el efecto inhibitorio de extractos vegetales y aceites esenciales, tanto individual como en combinación. Este estudio se realizará por triplicado con el fin de que los resultados sean representativos.

4.2 CEPAS DE MICROORGANISMOS Y EXTRACTOS VEGETALES

Para esta investigación, el laboratorio de Fitopatología y control biológico de la Facultad De Ciencias Exactas y Naturales – PUCE proporcionó viales, preservados a temperatura ambiente, con discos de cultivo de *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., y *Fusarium oxysporum*, sumergidos en agua destilada estéril. Estos discos fueron reactivados en agar PDA a 25 °C. Asimismo, se utilizaron cepas de bacterias fitopatógenas o deterioradoras de alimentos como *Xanthomonas campestris* MB_45 y *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, respectivamente. Estas últimas fueron reactivadas en agar nutriente a 35 °C por 24 horas.

Adicionalmente, los extractos de viruta de laurel (*Laurus nobilis*), chilca (*Baccharis latifolia*) y semilla de aguacate (*Persea americana*) en formulación alcohólica (en etilenglicol) o acuosa, fueron obtenidos mediante el método de percolación para extractos vegetales de igual forma, el aceite esencial de guaviduca, fueron provistos por el laboratorio de alimentos y bioquímica de la PUCE. Posteriormente, estos fueron liofilizados y reconstituidos en agua (López et al., 2023; Hernández, 2023). Este mismo laboratorio entregó aceite de guaviduca obtenido mediante destilación por arrastre de vapor.

4.3 EFECTO INHIBITORIO DE EXTRACTOS VEGETALES Y ACEITE ESENCIAL FRENTE A HONGOS FITOPATÓGENOS O DETERIORADORES DE ALIMENTOS

Previamente, los extractos vegetales fueron esterilizados, usando filtros de 0.22 µm de diámetro de poro. Posteriormente, las cepas fúngicas fueron inoculadas, de manera individual y mediante punción, en cajas Petri con medio de cultivo PDA. A continuación, de manera aséptica, se perforó un pocillo, de 6 mm de diámetro, equidistante entre el inóculo y

el borde de la caja (Briseño et al., 2011). De forma subsecuente, los extractos, en sus diferentes formulaciones fueron dispensados en los pocillos en un volumen final de 60 μ L. Por otra parte, placas con medio PDA únicamente inoculadas con las cepas fúngicas fueron utilizadas como control negativo que hace referencia al desarrollo óptimo de la colonia del moho. Finalmente, los cultivos fueron incubados a 25 °C por 7 días. Durante este periodo se midió, diariamente, el diámetro de la colonia enfrentada al extracto vegetal y la del control. El índice de inhibición se calculó utilizando la siguiente fórmula.

$$\% \text{ Hongo} = \frac{(\text{Diámetro en PDA control} - \text{Diámetro en PDA con extracto vegetal})}{\text{Diámetro en PDA control}} \times 100$$

4.4 ANTAGONISMO DE EXTRACTOS VEGETALES Y ACEITE ESENCIAL FRENTE A BACTERIAS FITOPATÓGENAS Y DETERIORADORES DE ALIMENTOS

Se realizó el mismo procedimiento detallado en el apartado anterior, con la diferencia de que las cepas bacterianas, en un cultivo líquido en caldo BHI con turbidez equivalente a la de McFarland 0.5, fueron inoculadas de manera uniforme sobre la superficie de agar nutriente e incubadas a 30 °C por 24 horas. Al finalizar la incubación, se midió el diámetro de los halos de inhibición formados.

4.5 EFECTO SINÉRGICO DE EXTRACTOS VEGETALES EN EL DESARROLLO DE CEPAS FÚNGICAS Y BACTERIANAS FITOPATÓGENAS O DETERIORADORES DE ALIMENTOS

Para determinar el efecto sinérgico o combinado de estos extractos y aceites esenciales se seleccionaron aquellos extractos de plantas o aceite esencial que demostraron capacidad inhibitoria *in vitro* frente a los microorganismos evaluados. Para esto, se empleó el procedimiento detallado en la sección 4.4 con una modificación: la combinación de dos extractos o aceite en igual proporción, es decir, 1:1.

4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los ensayos experimentales fueron ejecutados por triplicado. Las medias de los diámetros de los halos y porcentajes de inhibición, resultantes de la actividad de los diferentes extractos y combinaciones, fueron comparadas estadísticamente mediante análisis

de varianza (ANOVA) de una vía. Para la identificación de diferencias estadísticamente significativas, específicamente, entre medias de los tratamientos, se aplicó la prueba *post hoc* de Tukey. El nivel de significancia para todas las dos pruebas fue establecido en 0.05.

5. RESULTADOS

5.1 EFECTO INHIBITORIO DE EXTRACTOS VEGETALES Y ACEITE ESENCIAL FRENTE A HONGOS FITOPATÓGENOS O DETERIORADORES DE ALIMENTOS

Entre los extractos evaluados, aquellos de laurel y semilla de aguacate no presentaron capacidad inhibitoria frente a ninguna cepa fúngica incluida en este estudio. Por otra parte, el desarrollo de *Fusarium oxysporum* YC3 sufrió una inhibición correspondiente al 1,83% y 5,5% cuando el micelio fue enfrentado a extractos de chilca percolados en etanol y etilenglicol, respectivamente (Figura 1).

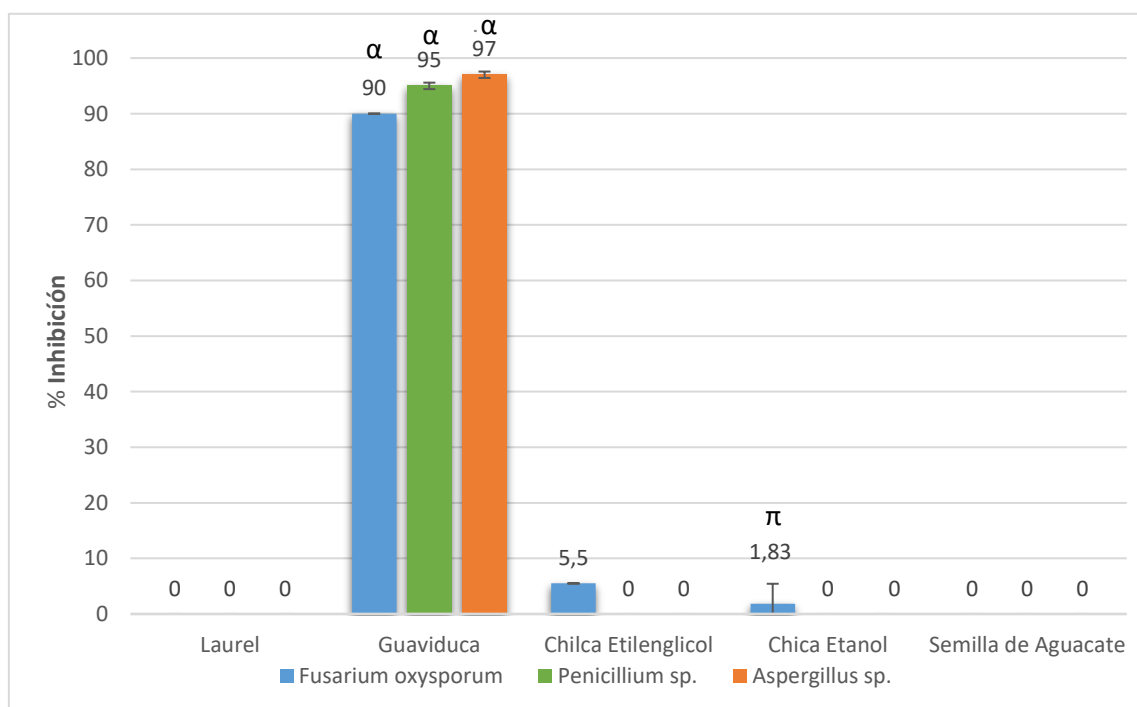


Figura 1. Porcentaje de inhibición de extractos vegetales y aceite esencial frente a hongos fitopatógenos y deterioradores de alimentos. Las columnas representan el promedio de tres réplicas de cada hongo y las barras de error indican la desviación estándar.

α : Porcentaje de inhibición significativamente superior ($p < 0,05$) a la contraparte de cada cepa enfrentada a los demás tratamientos.

π : Porcentaje de inhibición estadísticamente inferior ($p < 0,05$) a la contraparte de *Fusarium oxysporum* frente a AE de guaviduca, mas no presenta diferencias estadísticamente significativas con Chilca etilenglicol.

En contraste, el tratamiento con AE de guaviduca condujo a considerables porcentajes de inhibición dentro de un rango entre 90% para *Fusarium oxysporum* YC3 y 97% para *Aspergillus* sp. Estos valores fueron significativamente superiores ($p < 0.05$) a los observados en todos los otros tratamientos sobre todas las cepas fúngicas incluidas en esta investigación (Figura 2).

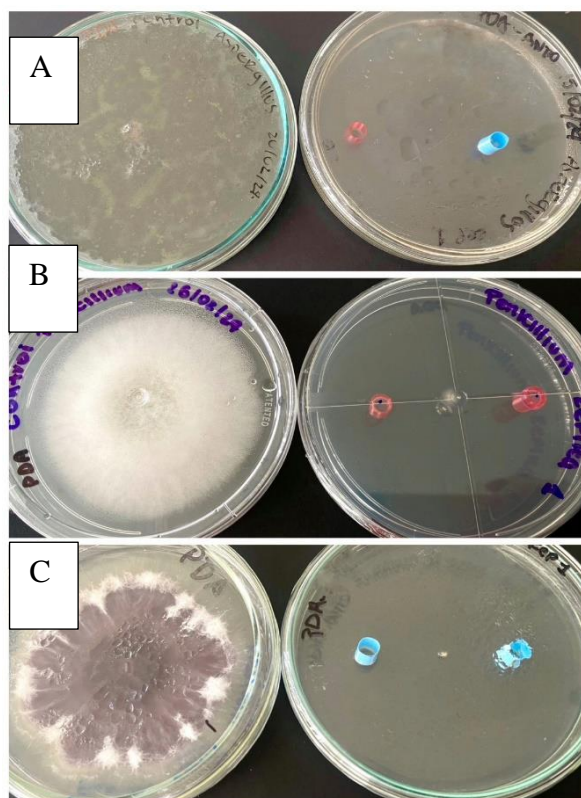


Figura 2. Efecto inhibitorio del aceite esencial AE de guaviduca frente a las cepas fúngicas evaluadas después de 7 días de incubación. **A)** *Aspergillus* sp. **B)** *Penicillium* sp. **C)** *Fusarium oxysporum*. La foto de la izquierda representa el control de la cepa fúngica y la de la derecha indica el crecimiento del hongo después del tratamiento.

5.2 ANTAGONISMO DE EXTRACTOS VEGETALES Y ACEITE ESENCIAL FRENTE A BACTERIAS FITOPATÓGENAS Y DETERIORADORES DE ALIMENTOS

Los extractos vegetales de semilla de aguacate, chilca etanol y el AE de guaviduca no mostraron efecto inhibitorio frente a *Pseudomonas fluorescens*. No obstante, el extracto de Laurel y el de Chilca en etilenglicol interfirieron en el desarrollo de la cepa evaluada mostrando un halo de inhibición promedio de 1,23 cm en cada caso.

Con respecto al enfrentamiento contra *Xanthomonas campestris*, todos los extractos vegetales y el aceite esencial demostraron inhibición de la bacteria evaluada siendo el AE

de guaviduca y el extracto de Chilca etilenglicol significativamente superiores ($p < 0,05$) a la de los otros extractos vegetales, al exhibir un halo de inhibición promedio de 3 cm. El extracto de laurel y el de semilla de aguacate presentaron halos de inhibición promedio de 1,43 cm y 1,47 cm respectivamente, mientras que el extracto de Chilca en etanol mostró el menor efecto inhibitorio, siendo significativamente inferior a comparación con sus homólogos y el AE de guaviduca, con un valor de 0,73 cm (Figura 3).

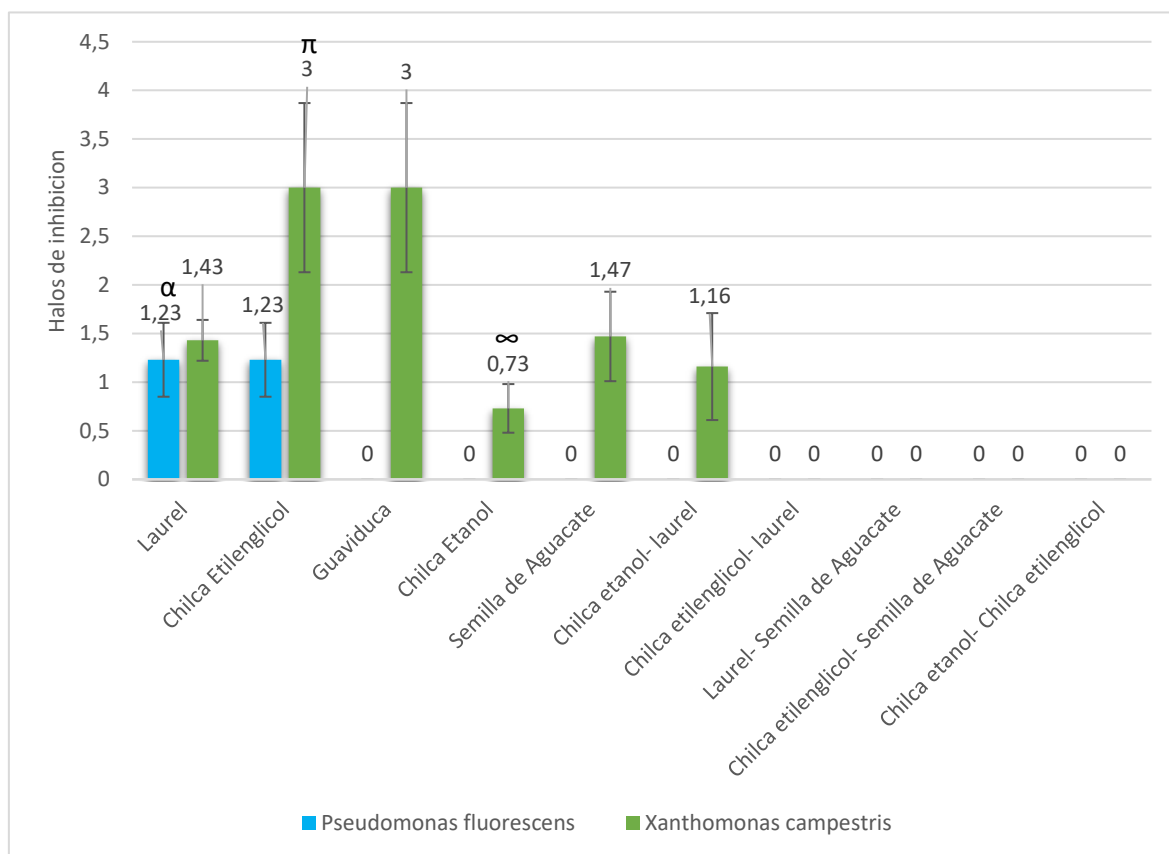


Figura 3. Diámetro de halos de inhibición de extractos vegetales, aceite esencial y sinergismo de extractos vegetales frente a cepas bacterianas. Las columnas representan la media aritmética de tres réplicas de cada bacteria y las barras de error su desviación estándar.

α: Efecto inhibitorio estadísticamente superior ($p < 0,05$) al desarrollo de *Pseudomonas fluorescens* frente a los demás tratamientos, mas no muestra diferencia significativa con Chilca etilenglicol

π: Efecto inhibitorio estadísticamente superior ($p < 0,05$) a contraparte de *Xanthomonas campestris* frente a los demás tratamientos, con excepción de AE de guaviduca.

∞: Efecto significativamente inferior ($p < 0,05$) a contraparte de *Xanthomonas campestris* frente a los demás tratamientos.

5.3 COMBINACIONES DE EXTRACTOS VEGETALES EN EL DESARROLLO DE CEPAS BACTERIANAS FITOPATÓGENAS O DETERIORADORES DE ALIMENTOS

La prueba de combinaciones de extractos vegetales frente al desarrollo de cepas bacterianas, indicó que ninguna de las preparaciones fue capaz de inhibir el desarrollo de las bacterias analizadas. Como excepción a lo observado, la combinación chilca etanol con

laurel formó halos de inhibición con un diámetro promedio de 1,16 cm (Figura 4). Sin embargo, esta inhibición no fue significativamente superior a la de los tratamientos individuales. Consecuentemente, la combinación de extracto no condujo a un efecto inhibitorio sinérgico sobre los microorganismos evaluados.

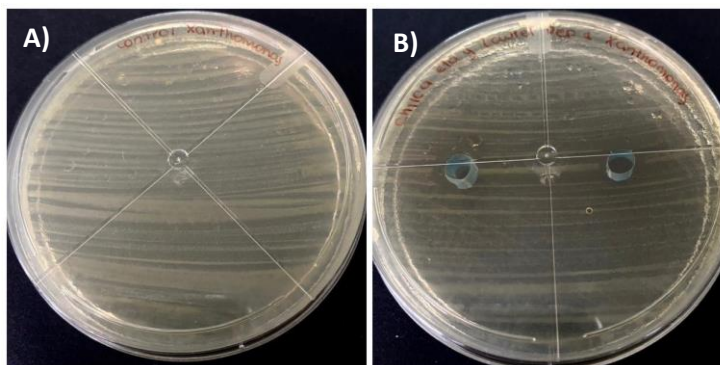


Figura 4. Combinación de extractos vegetales Chilca etanol-Laurel frente a *Xanthomonas campestris*.

A) Control; B) Halos de inhibición resultantes de la combinación de extractos de chilca etanol-laurel.

6. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En este estudio, se investigó el potencial inhibitorio de extractos vegetales y aceite esencial frente a hongos fitopatógenos y bacterias deterioradoras de alimentos, así como la posible sinergia entre algunos de estos extractos. Los resultados revelaron variaciones significativas en la actividad antimicrobiana de los extractos y el aceite esencial evaluados.

Al analizar la respuesta de cepas fúngicas de *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., y *Fusarium oxysporum* al ser enfrentadas a extractos vegetales como viruta de laurel (*Laurus nobilis*), chilca (*Baccharis latifolia*), y semilla de aguacate (*Persea americana*), no se observó un efecto inhibitorio significativo. Específicamente, los extractos de laurel y semilla de aguacate no mostraron capacidad inhibitoria contra ninguna de las cepas fúngicas incluidas en este estudio, mientras que el desarrollo de *Fusarium oxysporum* YC3 fue ligeramente inhibido en un 1,83% y 5,5% cuando se enfrentó a los extractos de chilca percolados en etanol o etilenglicol, respectivamente. En conexión con esto, estudios previos han descrito efectos variables de extractos vegetales similares. Por ejemplo, según Akabassi et al. (2022), se encontró que en extractos vegetales cuya base es etanol puede variar la efectividad en la tasa de inhibición dependiendo de las condiciones de extracción, la composición química específica de los extractos y las cepas fúngicas evaluadas. Además,

como se discutió en el estudio de Rodríguez et al. (2012), las condiciones de extracción, y la metodología de preparación, incluyendo el tipo de solvente utilizado, son factores que pueden influir significativamente en la actividad biológica del extracto, afectando su capacidad para interactuar con los compuestos químicos del hongo y afectar su crecimiento micelial.

Por otra parte, el aceite esencial de guaviduca demostró una notable eficacia contra los hongos fitopatógenos y deterioradores de alimentos, logrando inhibir el desarrollo de las colonias en un porcentaje cercano al 100% con respecto al tratamiento control. Específicamente, logró una inhibición del 97% de frente a *Aspergillus* y del 90% para *Fusarium oxysporum* YC3. Estudios previos realizados por Mesa et al. (2007) y Patiño et al. (2018) han confirmado que más de diez aceites esenciales del género *Piper* poseen actividad inhibitoria *in vitro* contra hongos de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*, gracias a la presencia de metabolitos secundarios. La concentración de metabolitos vegetales, ligada al método de extracción, en los aceites esenciales influye considerablemente sobre el efecto inhibitorio que estos productos podrían tener frente a diferentes microorganismos (Albarracín, Hortúa y Acero, 2023). En ese contexto, los aceites esenciales se obtienen mediante destilación por arrastre de vapor, separando el componente volátil del resto de los componentes de la planta (González, 2004). Este proceso aprovecha el bajo punto de ebullición del aceite en comparación con otros compuestos presentes en la muestra, resultando en la extracción de un aceite puro con alta concentración de compuestos volátiles como terpenos y fenilpropanoides, conocidos por sus propiedades antifúngicas (Noriega et al., 2017). Los terpenos se integran en la membrana celular de los hongos, alterando su permeabilidad y estructura, lo que conduce a la pérdida de moléculas esenciales y, eventualmente, a la muerte del hongo. Investigaciones recientes, como las de Jiménez et al. (2023), han destacado que los fenilpropanoides, derivados de la fenilalanina como el ácido cafeico, también actúan como agentes tóxicos frente a hongos fitopatógenos.

Referente al antagonismo de extractos vegetales y aceite esencial frente a bacterias fitopatógenas y deterioradores de alimentos, se encontró que los extractos vegetales de semilla de aguacate, chilca en etanol y el aceite esencial de guaviduca no exhibieron efecto inhibitorio frente a *Pseudomonas fluorescens*. Esta falta de actividad antimicrobiana podría atribuirse a varias razones. Primero, la composición química específica de estos extractos puede carecer de compuestos efectivos contra esta cepa bacteriana particular. Segundo, la concentración de los metabolitos activos en los extractos podría no ser suficiente para alcanzar una inhibición significativa bajo las condiciones de prueba utilizadas. Además, la

interacción entre los compuestos del extracto y las estructuras celulares de *Pseudomonas fluorescens* puede no ser lo bastante disruptiva para afectar su crecimiento. (Raio, 2024).

En el estudio, el aceite esencial de guaviduca (*Piper carpunya*) y el extracto de chilca en etilenglicol demostraron ser altamente efectivos contra *Xanthomonas campestris*, formando halos de inhibición promedio de 3 cm y 0,73 cm, respectivamente. La eficacia observada se atribuye a los compuestos del aceite, especialmente los fenoles. Estos fenoles afectan la permeabilidad de la membrana celular del fitopatógeno, lo que resulta en una respuesta inhibitoria efectiva contra la bacteria. Además, la caracterización química del aceite esencial de guaviduca mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-MS) identificó 27 compuestos, que representan el 97,52 % del aceite total. Los componentes mayoritarios incluyen la piperitona (40,35 %), metil eugenol (8,98 %) y eucaliptol (6,29 %). Estos compuestos, al interactuar con *X. campestris*, contribuyen significativamente a su inhibición y podrían ser útiles en el manejo de enfermedades fitopatógenas.

En cuanto al intento de explorar el sinergismo mediante la combinación de los cuatro extractos vegetales, los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto a los efectos observados con los extractos individuales. La mezcla de chilca en etanol y laurel exhibió un halo de inhibición de 1,16 cm de diámetro, pero no superó la actividad inhibitoria observada cuando estos extractos se usaron por separado. Según la literatura existente, las combinaciones de extractos vegetales pueden potenciar sus efectos antimicrobianos debido a interacciones sinérgicas entre sus componentes activos. Por ejemplo, György (2010) demostró que las mezclas de extractos vegetales pueden tener efectos sinérgicos significativos. En su estudio, la combinación de *Salvia officinalis* y *Foeniculum vulgare* mostró un efecto sinérgico notable contra *Listeria monocytogenes* (inhibición de $2,64 \pm 0,497$ cm), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ($1,43 \pm 0,142$ cm), *Bacillus subtilis* ($1,56 \pm 0,052$ cm) y *Candida albicans* CBS 562 ($2,46 \pm 0,372$ cm), resultados que fueron significativamente superiores a los obtenidos con los extractos individuales. Sin embargo, en el presente estudio, no se observaron diferencias estadísticamente significativas respecto a los efectos individuales. La discordancia podría atribuirse a las concentraciones de los extractos utilizados, la composición de los componentes activos y las condiciones experimentales. En estudios futuros se puede buscar optimizar estos factores para detectar y aprovechar el sinergismo de manera efectiva.

7. CONCLUSIONES

1. Este estudio indica que los extractos vegetales y el AE de guaviduca poseen propiedades antimicrobianas capaces de inhibir microorganismos fitopatógenos y deterioradores de alimentos.
2. El aceite esencial de guaviduca (*Piper carpunya*) ha demostrado ser altamente eficaz, inhibiendo casi por completo el crecimiento de hongos como *Aspergillus sp.* y *Fusarium oxysporum* YC3, así como de la bacteria *Xanthomonas campestris*. Estos hallazgos sugieren que el aceite esencial de guaviduca tiene un gran potencial como agente antimicrobiano para el control de enfermedades causadas por hongos y bacterias fitopatógenas en plantaciones.
3. Las combinaciones de extractos vegetales de laurel, semilla de aguacate y chilca no mostraron un efecto sinérgico significativo en comparación con los extractos individuales. No obstante, la combinación de chilca en etanol y laurel formó halos de inhibición de 1.16 cm contra *Xanthomonas campestris*, pero esta inhibición no fue significativamente mayor que la de los tratamientos individuales.
4. Es necesario llevar a cabo más estudios para examinar la composición química de todos los extractos y aceites esenciales, así como las condiciones óptimas de extracción que maximicen su eficacia antimicrobiana. Investigaciones futuras deberían centrarse en identificar y aislar los compuestos bioactivos responsables de esta actividad, además de evaluar su potencial sinérgico con otros compuestos naturales o tratamientos químicos.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akabassi, G. C., Padonou, E. A., Yao, E. J. K., Nakpalo, S., Palanga, K. K., Assogbadjo, B. E. J. y Zirihi, N. G. (2022). Extract yield, dilution methods and antifungal potential of fruits of *Picralima nitida* (Stapf.) TA Durand & H. Durand. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 21(7), 425-431. doi: 10.1016/j.jssas.2021.11.006
- Bazzocchi, I., Rodriguez, M., Ticono, J., Gomez, I., Marzaro, E., Jimenez, I., Flores, N., Benjumea, D. y Fernández, J. (2024). Flavonoides como inhibidores del quorum sensing: una estrategia prometedora para luchar contra las bacterias. *Revista PlantaMed*. doi: 10.1055/s-0034-1394740
- Burbano, H. (2018). El carbono orgánico del suelo y su papel frente al cambio climático. *Rev. Cienc. Agr*, vol.35, n.1, pp.82-96. doi: 10.22267/rcia.183501.85.
- Briseño, G., Garcia, J., Maselli A. y Rosales, L., (2011). Efecto de extractos etanólicos de Ruda y Neem sobre el control de bacterias fitopatógenas del género *Erwinia*. *Rev. Agronomía Tropical*. 61 (2), 141-148. Recuperado de https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0002-192X2011000200005
- Crawford, G., Gray, A. y Rasmussen, W. (2023). Origins of Agriculture. *Rev. Britannica*. Recuperado de <https://www.britannica.com/topic/agriculture/Earliest-beginnings>
- Chu, A., Peretto, P. y Wang, X. (2002). Agricultural revolution and industrialization. *Journal of Development Economics*, vol 158. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304387822000529>
- Elshafie, H., Grulova, D., Baranova, B., De Martino, L., Sedlak, V., Camele, I. y De Feo, V. (2019). Actividad antimicrobiana y composición química del aceite esencial extraído de *Solidago canadensis* L. que crece de forma silvestre en Eslovaquia. *Revista MDPI*. 24 (7). doi.org/10.3390/molecules24071206
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). (2015). Plaguicidas Código de Conducta. Recuperado de https://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Cod e/Annotated_Guidelines_SP.pdf
- Gonzalez, A. (2004). Obtención de aceites esenciales y extractos etanolicos de plantas del amazonas. Recuperado de <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/2800/angelaandregonzalezvill a.2004.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Guevara, L. (2022). Aplicación de extractos obtenidos a partir de chilca y pumin para producir microorganismos patógenos. Recuperado de <http://dspace.unach.edu.ec/handle/51000/10150>

- Hernández, A. (2023). Evaluación de actividad antimicrobiana (in vitro) de extractos vegetales de *Artemisa ludoviciana*., *Lepidium virginicum* y *Brickellia veronifolia* sobre bacterias y hongos fitopatógenos. Recuperado de <http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/bitstream/handle/231104/2938/AT26617.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Izquierdo, J. (2017). Contaminación de los suelos agrícolas provocados por el uso de los agroquímicos en la parroquia de San Joaquín. Recuperado de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/14712/1/UPS-CT007228.pdf>
- Jimenez, L.A., Valdez, O., Heredia, J.M., Garcia, R. y Heredia, B.J. (2023). Control de fitopatógenos con extractos de biomasa de chile y de maíz. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 26(1), 1-11. doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2023.576
- López, A., Vélez, M., Sánchez O., MS, Bonilla C., CR, & Gallo, PI (2006). Evaluación de extractos vegetales para manejo de hongos patógenos en plátano y fresa almacenados. *Rev. Agronómica*, 55 (4),39-44. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169920333006>
- Monardez, C. (2014). Uso de extractos vegetales acuosos como estrategia alternativa para el control poscosecha de *Monilinia fructicola*, agente responsable de la podredumbre morena de los frutales de carozo. Recuperado de https://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/6465/tesis-licenciaturabromatologia-monardez-2014.pdf
- Mendoza, L. (2008). Origen del Aguacate. Recuperado de <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/7716/13/proyecto%20%283%29.pdf>
- Mesa, A., Marin, P., Ocampo, O., Calle, J. y Monsalve, Z. (2019). Fungicidas a partir de extractos vegetales: una alternativa en el manejo integrado de hongos fitopatógenos. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*. 45(1), 23-30. Recuperado de <https://www.redalyc.org/journal/864/86458941001/html/>
- Noriega, P., Mosquera, T., Abad, J., Cabezas, D., Piedra, S., Coronel, I., Maldonado, M., Bardiserotto, A., Vertuani, S y Manfredini, S. (2017). Composición química, actividad antioxidante y antimicrobiana del aceite esencial proveniente de las hojas de *piper pubinervulum* c. dc piperaceae. *Revista de Ciencias de la Vida*. 24(2), 111-123. doi <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.17163/lgr.n24.2016.09>
- Ortiz, J. y Gavin, V. (2015). Evaluación de la capacidad antimicrobiana de las hojas frescas y deshidratadas de laurel (*laurus nobilis*) y tomillo (*thymus vulgaris*) para la conservación de queso fresco. Recuperado de <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/446/1/UNACH-EC-IAGRO-2015-0013.pdf>
- Raio, A. (2024). Diverse roles played by “*Pseudomonas fluorescens* complex” volatile compounds in their interaction with phytopathogenic microorganisms, pests and plants. *Revista World J Microbiol Biotechnol*. doi.org/10.1007/s11274-023-03873-0

- Sun, S., Hoy, M. y Heitman, J. (2020). Fungal Pathogens. Rev. ScienceDirect, vol 30, 1163-1169. doi.org/10.1016/j.cub.2020.07.032
- Sisa, M. (2017). “Evaluación de extractos vegetales como alternativa ecológica para accionar el enraizamiento de estacas de rosa (rosa spp.)”. Recuperado de <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/26376/1/Tesis-172%20%20Ingenier%C3%ADa%20Agron%C3%B3mica%20-CD%20518.pdf>
- Sanz, D.G., Meier-Kothoff, J.P., Goker, M., Rafael, M.M. y Nieto, M.R. (2016). Genomic and Genetic Diversity within the *Pseudomonas fluorescens* Complex. doi.org/10.1371/journal.pone.0150183
- Sun, S., Hoy, M. y Heitman, J. (2020). Fungal Pathogens. Rev. ScienceDirect, vol 30, 1163-1169. Recuperado de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33022261/>
- Toro, F. (2010). Riesgo ambiental por el uso de Agroquímicos. *Inventum Rev Científica*. Recuperado de <https://hdl.handle.net/10656/8741>



Firma de la estudiante

María Antonella Amores Proaño
Quito, 28/06/2024



Firma del director/a de disertación

Dr. Martín Sebastián Marcial Coba
Quito, 28/06/2024

Firma de la coordinadora de carrera

Dra. Diana Astorga
Quito, 28-06/2024