

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y BIOACTIVIDAD DE ACEITES
ESENCIALES CONTRA PATÓGENOS DE LOS CÍTRICOS**

por

Pamela Gisel LOMBARDO FERREIRA

TESIS presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de
Magíster en Ciencias Agrarias
opción Ciencias Vegetales

MOTEVIDEO
URUGUAY
Abril 2015

Tesis aprobada por el tribunal integrado por Dr. Ing. Agr. Pedro Mondino, MSc. Ing. Agr. Vivienne Gepp y Dra. Susana Zacchino, el 24 de abril de 2015.

Autora: Ing. Agr. Pamela Lombardo.

Directora MSc. Ing. Agr. Elena Pérez Faggiani.

Co-director Dr. QF Eduardo Dellacassa.

“Duda siempre de ti mismo, hasta que los datos no dejen lugar a dudas”

Louis Pasteur

"Para el investigador no existe alegría comparable a la de un descubrimiento, por pequeño que sea".

Alexander Fleming

DEDICATORIA

*A Eduardo, mi querido esposo,
por su apoyo incondicional y comprensión en todo momento.*

A mis dos grandes amores, mis hijos, Julieta y Eduardo.

*A mis padres, Héctor y Amelia,
quienes inculcaron en mi la voluntad de superación.*

*A mis tutores Ing. Agr. MSc. Elena Pérez y Dr. QF. Eduardo Dellacassa,
por todo lo aprendido bajo su orientación en la realización del trabajo, y por
su paciencia y apoyo en los momentos difíciles.*

AGRADECIMIENTOS

A la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), a la Universidad de la República (Udelar) y el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) por el financiamiento.

A los integrantes del tribunal Dr. Ing. Agr. Pedro Mondino e Ing. Agr. MSc. Vivienne Gepp por sus consejos y apoyo incondicional desde de la Unidad de Fitopatología en el transcurso de toda la tesis.

A la Lic. MSc. Silvia González de la Cátedra de Botánica, Facultad de Agronomía, Regional Norte Salto, Udelar, por el tiempo dedicado a la identificación de las especies vegetales.

Al QF Manuel Minteguiaga y a la Lic. Noelia Umpiérrez, Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales, Facultad de Química, Udelar, por enseñarme a usar el hidrodestilador y por los análisis químicos de los aceites esenciales.

Al Ing. Agr. MSc. Álvaro Otero, INIA SG, por su disponibilidad continua para todas mis consultas.

A los integrantes del Laboratorio de Fitopatología del INIA, Oribe, Andrea y Pablo, por sus ayudas y animada compañía.

A la Lic. MSc. Gabriela Ferragut, del Laboratorio de Inmunología de Regional Norte-Salto, Udelar, por su disposición y aportes al trabajo.

A al Sra. Carmen Estelda, ayudante del Laboratorio de Protección Vegetal, de la Estación Experimental de la Facultad de Agronomía en Salto (EEFAS), por sus conocimientos sobre las hierbas medicinales y disponibilidad en todo momento.

Y por último, a mis amigas y colegas, Beatriz Vignale y Águeda Scattolini, por sus consejos y apoyo.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	IV
RESUMEN.....	VIII
SUMMARY.....	IX
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1. ANTECEDENTES	3
1.1.1. <u>La citricultura uruguaya como rubro exportador</u>	3
1.1.2. <u>Problemas fitosanitarios en postcosecha</u>	6
1.1.2.1. <i>Penicillium digitatum</i>	7
1.1.2.2. <i>Guignardia citricarpa</i>	9
1.1.3. <u>Compuestos bioactivos derivados de las plantas</u>	13
1.1.3.1. Aceites Esenciales (AEs).....	15
1.1.3.2. AEs bioactivos de plantas nativas.....	17
1.2. OBJETIVOS	20
1.2.1. <u>Objetivo general</u>	20
1.2.2. <u>Objetivos específicos</u>	20
2. <u>CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIFUNGAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS AGAINST CITRUS BLACK SPOT <i>Guignardia citricarpa</i> Kiely</u>	21
2.1. INTRODUCTION	24
2.2. MATERIALS AND METHODS	26
2.2.1. <u>Plant material</u>	26
2.2.2. <u>Essential oil extraction</u>	29
2.2.3. <u>GC-MS analysis</u>	30
2.2.4. <u>Plant pathogen</u>	31
2.2.5. <u>Bioassays</u>	31
2.2.5.1. Volatile Phase Test.....	32
2.2.5.2. Agar Dilution Test.....	33

2.2.6. <u>Statistical analyses</u>	33
2.3. RESULTS	34
2.3.1. <u>Essential oil yields</u>	34
2.3.2. <u>Chemical composition of essential oils</u>	35
2.3.3. <u>Bioassays</u>	39
2.3.3.1. Volatile Phase Test.....	39
2.3.3.2. Agar Dilution Test.....	42
2.4. DISCUSION	44
2.5. CONCLUSIONS	49
2.6. REFERENCES	49
3. <u>CONTROL DE CEPAS RESISTENTES DE <i>Penicillium digitatum</i> A</u> <u>IMAZALIL CON ACEITES ESENCIALES</u>	59
3.1. INTRODUCCIÓN	62
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	64
3.2.1. <u>AEs y composición química</u>	64
3.2.2. <u>Microorganismo fitopatógeno</u>	65
3.2.3. <u>Bioensayos</u>	66
3.2.3.1. Test de Fase Volátil.....	66
3.2.3.2. Tamizado de los AEs.....	67
3.2.3.3. Bioautografía sobre cromatografía de capa fina.....	68
3.2.3.4. Test de Microdilución en caldo.....	69
3.2.4. <u>Análisis estadísticos</u>	71
3.3. RESULTADOS	72
3.3.1. <u>Composición de los aceites esenciales</u>	72
3.3.2. <u>Bioensayos</u>	75
3.3.2.1. Test de Fase Volátil.....	75
3.3.2.2. Tamizado de los AEs.....	77
3.3.2.3. Bioautografía sobre TLC.....	78
3.3.2.4. Test de Microdilución en caldo.....	78
3.4. DISCUSIÓN	79
3.5. BIBLIOGRAFÍA	85

4. <u>CONCLUSIONES GENERALES</u>	93
5. <u>CONSIDERACIONES FINALES</u>	94
6. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	96
7. <u>ANEXOS</u>	112
7.1. INTRODUCCIÓN	113
7.2. MATERIALES Y MÉTODOS	114
7.2.1. <u>Material vegetal</u>	114
7.2.2. <u>Bioensayos</u>	122
7.2.2.1. Test de Fase Volátil.....	122
7.2.2.2. Test de Dilución en Agar.....	123
7.2.2.3. Test de Microdilución en caldo.....	124
7.3. RESULTADOS	126
7.3.1. <u>Bioensayos con <i>Guignardia citricarpa</i></u>	126
7.3.1.1. Test de Fase Volátil.....	126
7.3.1.2. Test de Dilución en Agar.....	127
7.3.2. <u>Bioensayos con <i>Penicillium digitatum</i></u>	128
7.3.2.1. Test de Fase Volátil.....	128
7.3.2.2. Tamizado de los AEs – Bioautografía/TLC.....	129

RESUMEN

En este trabajo se estudió la posibilidad de utilizar aceites esenciales (AEs) con actividad antimicrobiana como alternativa al uso de agroquímicos de síntesis. El criterio fue seleccionar plantas nativas productoras de AEs, identificar sus componentes y evaluar *in vitro* la capacidad inhibitoria contra los hongos *Guignardia citricarpa* (mancha negra de los cítricos) y *Penicillium digitatum* (moho verde de los frutos postcosecha). Los AEs fueron obtenidos por hidrodestilación de *Schinus molle*, *Achyrocline flaccida*, *Baccharis dracunculifolia*, *Baccharis trimera*, *Conyza bonariensis*, *Pluchea sagittalis*, *Chenopodium ambrosioides*, *Ocimum selloi*, *Blepharocalyx salicifolia*, *Acca sellowiana*, *Eugenia uniflora*, *Psidium cattleianum*, *Aloysia gratissima* y *Lippia alba*. La composición química se analizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Paralelamente se evaluó la inhibición de los AEs sobre *G. citricarpa* usando los tests de fase volátil (TFV) y dilución en agar (TDA). Para *P. digitatum*, además se utilizó la técnica de bioautografía sobre cromatografía en capa fina (B/TLC) y el test de microdilución en caldo para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM). Todos los AEs presentaron mayoría de compuestos mono y sesquiterpénicos, excepto *C. bonariensis*. Los compuestos de los AEs de *Ch. ambrosioides*, *C. bonariensis*, *P. sagittalis*, *B. salicifolia*, *A. sellowiana*, *E. uniflora* y *L. alba* fueron activos sobre *P. digitatum*, pero sólo el primero de los aceites produjo igual efecto sobre *G. citricarpa*. *C. bonariensis* y *B. trimera* presentaron capacidad anti-esporulante sobre *G. citricarpa* y *P. digitatum*, respectivamente. La CIM determinada para el moho verde fue de 30, 60 y 500 ppm para los AEs de *Ch. ambrosioides*, *C. bonariensis* y *O. selloi*, respectivamente. Estas especies podrían ser usadas para el biocontrol de patógenos de los cítricos.

Palabras clave: cítricos, antifúngicos, aceites esenciales, *Guignardia citricarpa*, *Penicillium digitatum*.

Chemistry characterization and bioactivity of essential oils against citrus pathogens

SUMMARY

The ability of essential oils (EOs) presenting antimicrobial activity was evaluated in this work as an alternative to the use of synthetic agrochemicals. The criterion was to select native plants producers of EOs, to identify their chemical components and to assess the *in vitro* inhibitory capacity against the fungi *Guignardia citricarpa* (black spot on citrus) and *Penicillium digitatum* (green mold of postharvest fruits). The AEs were obtained by hydrodistillation from *Schinus molle*, *Achyrocline flaccida*, *Baccharis dracunculifolia*, *Baccharis trimera*, *Conyza bonariensis*, *Pluchea sagittalis*, *Chenopodium ambrosioides*, *Ocimum selloi*, *Blepharocalyx salicifolia*, *Acca sellowiana*, *Eugenia uniflora*, *Psidium cattleianum*, *Aloysia gratissima* and *Lippia alba*. The chemical composition of EOs was studied by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). In parallel, the inhibition of EOs on *G. citricarpa* was evaluated through the tests of volatile phase (TFV) and agar dilution (TDA). For *P. digitatum*, in addition to TFV test, the bioautography technique on thin layer chromatography (B/TLC) was used; while the broth microdilution test was applied for determining the minimum inhibitory concentration (MIC). All EOs compositions, except that for *C. bonariensis*, showed mono- and sesquiterpenes as the main components. The EOs of *Ch. ambrosioides*, *C. bonariensis*, *P. sagittalis*, *B. salicifolia*, *A. sellowiana*, *E. uniflora* and *L. alba* showed fungicidal action on *P. digitatum*, but only the first presented effect on *G. citricarpa*. *C. bonariensis* and *B. trimeria* EOs showed anti-sporulating activity on *G. citricarpa* and *P. digitatum*, respectively. The MIC values obtained for the green mold were 30, 60 and 500 ppm for *Ch. ambrosioides*, *C. bonariensis* and *O. selloi* oils respectively. These species could be used for biocontrol of pathogens of citrus.

Keywords: citrus fruits, antifungal, essential oils, *Guignardia citricarpa*, *Penicillium digitatum*.

1. INTRODUCCIÓN

Uruguay es un país que presenta condiciones de clima y suelo para producir fruta cítrica de calidad y cuenta con una amplia trayectoria exportadora de estos productos a mercados exigentes (Montes, 2012). Sin embargo, la sustentabilidad de la citricultura uruguaya depende del volumen y la calidad que se destine de la producción a la exportación, por lo cual es fundamental que sea apoyado por un manejo fitosanitario acorde a las reglamentaciones establecidas por los países compradores (Caputi y Montes, 2010). En este sentido, *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc., está presente en todos los países productores de cítricos y es la principal causa del decaimiento en postcosecha (Franco y Bettiol, 2002). Por otro lado, la importancia de *Guignardia citricarpa* Kiely radica en que está incluido en la lista de cuarentena de la Comunidad Europea (EPPO, 2013) y debido a su largo período de latencia sus síntomas pueden aparecer en postcosecha (Kotzé, 2000), pudiendo causar problemas en la exportación de fruta cítrica.

A nivel mundial, por muchos años el control de enfermedades postcosecha se ha basado en la aplicación de fungicidas de síntesis. Sin embargo, el uso prolongado y excesivo de estos fungicidas de ha provocado la proliferación de biotipos resistentes en las poblaciones de los patógenos, comprometiendo seriamente la eficacia de estos tratamientos (Palou *et al.*, 2008). Conjuntamente, la contaminación ambiental y los riesgos para la salud humana asociados a los residuos de los pesticidas han llevado a regulaciones, restricciones o cancelaciones de estos productos. Los mercados demandan cada vez más, productos con niveles más bajos de residuos con el fin de satisfacer las exigencias de seguridad del consumidor (Palou *et al.*, 2008).

Por lo tanto, la búsqueda de soluciones está dirigida a métodos alternativos no contaminantes, que no generen residuos peligrosos en las frutas y respeten el medio ambiente. La naturaleza es un reservorio de fungicidas naturales, siendo ejemplo las plantas medicinales y aromáticas,

cuyos compuestos activos podrían ser utilizados como una opción más segura para la salud humana y el ambiente, que los agroquímicos de síntesis (Talibi *et al.* 2014, Bakkali *et al.* 2008). En este trabajo se plantea como hipótesis que existen compuestos químicos en las plantas nativas capaces de ser utilizados para el control de patógenos de cítricos.

1.1. ANTECEDENTES

1.1.1. La citricultura uruguaya como rubro exportador

La citricultura uruguaya es conocida y respetada a nivel mundial por los buenos estándares de calidad y de cumplimiento comercial. Ha conseguido mantener su fuerte inserción en los mercados internacionales en forma sostenida, produciendo en contra-estación al Hemisferio Norte (Caputi y Montes, 2010). Actualmente, el sector citrícola uruguayo se encuentra estancado no sólo en su capacidad de producción sino también en las cantidades exportadas (Figura 1.1). La disminución de su potencial productivo se puede explicar por la falta de aumento significativo en la superficie total y superficie bajo riego, edad de las plantaciones, renovación del material genético, calidad y sanidad de plantas y manejo agronómico de las plantaciones. El envejecimiento de los montes implica una baja productividad comparada con la internacional (Caputi y Montes, 2010). Estas condiciones determinan que el porcentaje de fruta exportable no supera el 50 % de la producción total (MGAP/DIEA, 2013). Por lo tanto, el crecimiento futuro de la citricultura dependerá de la introducción de mejoras en la producción y sus posibilidades de inserción en nuevos mercados, respetando sus exigencias, ya que el consumo interno ha alcanzado su máximo, a causa del bajo crecimiento demográfico y del nivel de renta de los uruguayos (Montes, 2012).

Como rubro exportador es imprescindible lograr una buena sanidad para ser competitivo frente a los principales países productores del mundo y mantener un estatus fitosanitario libre de plagas cuarentenarias, controlando potenciales amenazas sanitarias. Plantas de óptima calidad y con garantías sanitarias son una “*carta de presentación*” en los mercados, señalando la madurez y confiabilidad del país. La citricultura nacional debe resolver estos problemas a corto plazo para mantener abierto los mercados tradicionales (Unión Europea) y los nuevos, como el de Estados Unidos, principalmente en lo que se refiere a enfermedades cuarentenarias. El ingreso y

permanencia en estos mercados implica muchos años de trabajo y puede perderse el estatus en breve plazo (Caputi y Montes, 2010).

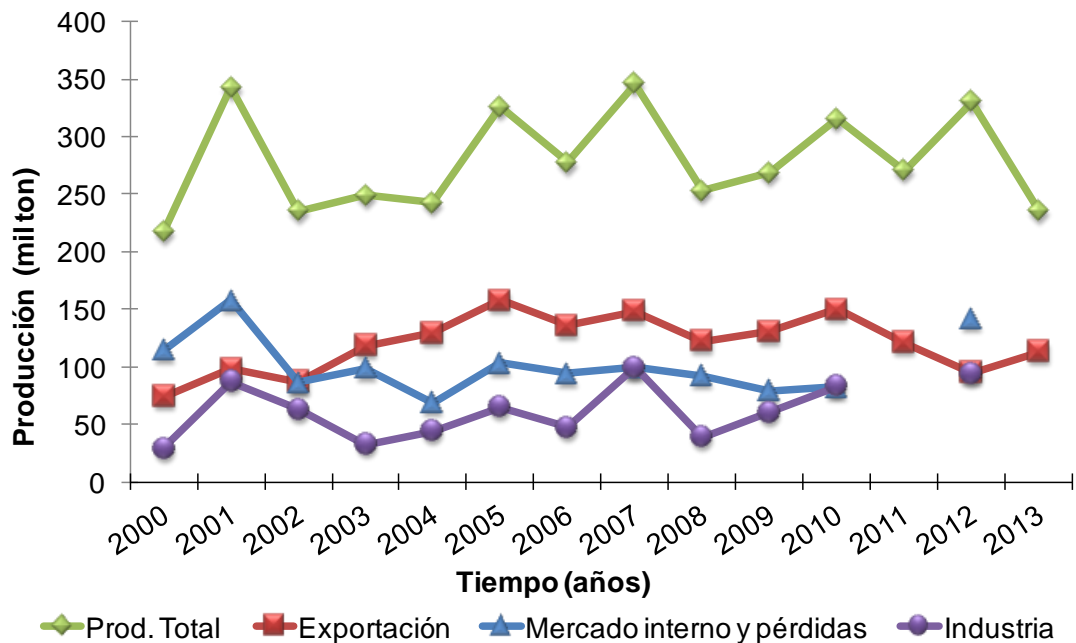


Figura 1.1: Destino de la producción de fruta cítrica de Uruguay por año (MGAP/DIEA, 2013).

El principal destino de la producción nacional de fruta fresca es la Unión Europea (Figura 1.2), en particular Holanda, España e Inglaterra (Bruno, 2011), quienes demandan altas exigentes en calidad cosmética, sanitaria e inocuidad.

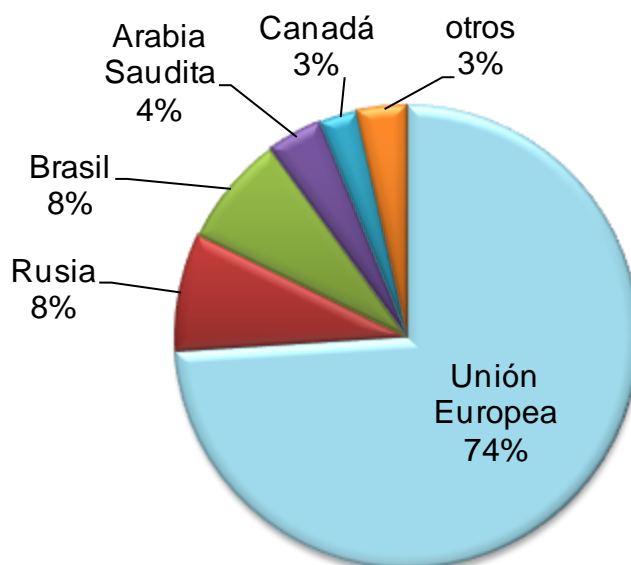


Figura 1.2: Principales mercados de exportación de fruta fresca cítrica uruguaya en el 2011 (Bruno, 2011).

El concepto de calidad actual que exige el mercado mundial, significa lograr los requisitos estándar de cada variedad y la ausencia de residuos tóxicos, y además, que la tecnología aplicada en la producción proteja el medio ambiente y al trabajador (Mondino *et al.*, 2014). El reducido número de principios activos que puede utilizarse como fitosanitarios y con umbrales cada vez más bajos de los Límites Máximos de Residuos (LMR) indica que en poco tiempo se ofrecerá a los consumidores productos prácticamente libres de residuos. Ésta es una de las razones por lo cual la citricultura nacional deberá buscar manejos alternativos a los tradicionales, asegurando la calidad, inocuidad y evitando riesgos de resistencia de los principales hongos que afectan la fruta (Caputi y Montes, 2010). En esta área se han desarrollado líneas de investigación, cuyo principal objetivo fue dar una rápida respuesta al control de las plagas y enfermedades que limitan el ingreso a mercados, por ser cuarentenarias o que impacten negativamente en la productividad del cultivo (Montes, 2012).

1.1.2. Problemas fitosanitarios en postcosecha

La principal causa de pérdidas económicas en la postcosecha es producida por un número reducido de hongos. Los ascomicetes y hongos imperfectos causan las pudriciones postcosecha más comunes e importantes. Algunas enfermedades que se desarrollan en postcosecha comienzan en el campo, permaneciendo latentes hasta la ocurrencia de condiciones ambientales favorables al desarrollo del patógeno (Agrios, 2005). El control de estas enfermedades es clave para mantener la calidad, especialmente cuando involucra extensos períodos de tiempo entre cosecha y consumo final. Las enfermedades postcosecha de los cítricos pueden dividirse en las que producen las pudriciones clásicas y las que producen manchas sobre la piel, afectando la estética del fruto y perjudicando su comercialización (Ferraz Laranjeira *et al.*, 2005a).

En Uruguay, la fruta cítrica para exportación es sometida a distintos manejos para minimizar el ataque de patógenos y mantener la calidad comercial en la postcosecha. En los montes citrícolas, los productores uruguayos, para evitar las enfermedades sobre la fruta realizan un manejo integrado, siendo una de las herramientas utilizadas la aplicación de fungicidas (Pérez Faggiani y Alves 2011, Lado *et al.* 2010). En postcosecha, el manejo de las enfermedades se basa principalmente en la utilización de fungicidas químicos de síntesis (Lado *et al.*, 2011). Sin embargo, ciertas enfermedades por las características del patógeno y de su ciclo, hacen difícil su control pudiendo afectar la sustentabilidad de la citricultura como rubro exportador. Los hongos, *P. digitatum* y *G. citricarpa*, son un ejemplo de esta situación. El primero, por su alta tasa de multiplicación facilitando la ocurrencia de biotipos resistentes a fungicidas (Brown y Eckert, 2000) y el segundo, por el largo período de latencia que sufren los frutos asintomáticos (Kotzé, 2000) y por estar en la lista de enfermedades cuarentenarias de la European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO, 2013).

1.1.2.1. *Penicillium digitatum*

A nivel mundial, el moho verde causado por *P. digitatum*, es una de las principales enfermedades de postcosecha en la industria de los cítricos (Tao *et al.* 2014, Sayago *et al.* 2012, Lado *et al.* 2011, Palou *et al.* 2008, Franco y Bettioli 2002), pudiendo infectar la fruta en las plantaciones, durante el transporte, empaque, almacenamiento y en la comercialización (Palou *et al.* 2008, Brown y Eckert 2000). Junto al moho azul (*Penicillium italicum* Wehmer) pueden ocasionar más del 90 % del total de las pérdidas en postcosecha si las condiciones climáticas son favorables para el desarrollo de las enfermedades (Eckert y Eaks, 1989).

P. digitatum produce millones de esporas que son dispersadas por el aire, contaminando los frutos en los árboles, en las plantas de empaques, en las cámaras de almacenamiento, contenedores e incluso en el mercado. Las esporas infectan a los frutos que sufren heridas durante la cosecha y postcosecha (Palou *et al.*, 2008). Inicialmente los síntomas aparecen como una mancha suavemente decolorada, blanda, acuosa, de hasta 1,2 cm de diámetro, que rápidamente aumenta hasta unos 2-4 cm de diámetro en 24-36 h a 24 °C, afectando las vesículas del zumo. Inmediatamente un micelio blanco cubre la superficie del fruto y comienza a producir esporas de color verde oliva; posteriormente la pudrición avanza afectando todo el fruto (Figura 1.3) (Brown y Eckert, 2000). El ciclo de producción de esporas y la infección puede repetirse muchas veces durante un prolongado almacenamiento. Esta capacidad prolífica de *P. digitatum* permite desarrollar eventualmente cepas con resistencia a los fungicidas químicos (Brown, 2003).



Figura 1.3: Síntomas del moho verde producida por *P. digitatum* y sus estructuras reproductivas observado al microscopio óptico (40 x).

Los factores de mayor incidencia para el desarrollo de la infección son la ocurrencia de heridas en la piel del fruto y las temperaturas cálidas (25-30 °C) siendo el hongo inactivo a temperaturas por debajo de 5 °C (Ferraz Laranjeira *et al.*, 2005a).

Para prevenir enfermedades postcosecha se debe realizar un manejo cuidadoso, evitando heridas, contusiones y otras lesiones que podrían servir de entrada al patógeno (Pérez Faggiani *et al.* 2009, Agrios 2005). Las medidas de control se basan en reducir la fuente de inóculo inicial, procurar un ambiente desfavorable al patógeno o al desarrollo de los síntomas y proteger los frutos. Estas medidas normalmente son realizadas en las plantas de empaque, en las cámaras de frío de almacenamiento y contenedores refrigerados de los frutos (Ferraz Laranjeira *et al.*, 2005b). Los tratamientos químicos previenen la infección y suprimen el desarrollo de los patógenos, pero la generación de cepas fúngicas resistentes a fungicidas sistémicos es frecuente (Agrios, 2005).

El mercado internacional ha restringido el número de productos químicos permitidos para el control de fitopatógenos y bajado sus límites de residuos, como consecuencia de sus efectos potenciales sobre la salud, el

medio ambiente y el riesgo de provocar un incremento de las poblaciones de patógenos resistentes (Palou *et al.* 2008, Tripathi *et al.* 2004). A su vez, el uso prolongado de algunos compuestos químicos ha provocado la aparición de cepas resistentes, cuyo aumento es consecuencia de la intensa presión de selección de los residuos de fungicidas en la fruta tratada (Holmes y Eckert, 1995). Por ejemplo, en Uruguay, desde hace algunos años en la citricultura, se comenzó a detectar biotipos de *P. digitatum* resistentes a diferentes fungicidas (Pérez Faggiani *et al.* 2009, Monteiro *et al.* 1997). Este problema es frecuente en otros países productores de citrus, como Brasil, donde está restringido el uso de los benzimidazoles por selección de cepas resistentes de *P. digitatum* (Franco y Bettioli, 2002). En Marruecos, los investigadores Boubaker *et al.* (2009) reportaron reducida eficacia de imazalil y thiabendazol contra *P. italicum* y *P. digitatum*. Kinay *et al.* (2007) caracterizaron aislamientos de *P. digitatum*, colectados en California (USA), por su resistencia a los fungicidas imazalil, thiabendazol y pyrimethanil. En la Estación Experimental Mid-Columbia (Estado de Oregon, USA) se encontró que el nivel de propágulos de *Penicillium* spp. resistentes a benomil aumentaba en los *packing* a lo largo del período de cosecha (Spotts y Cervantes, 1986). Por todos estos problemas, es necesario desarrollar una alternativa natural, segura y biodegradable, a los fungicidas (Tao *et al.*, 2014).

1.1.2.2. *Guignardia citricarpa*

La mancha negra de los cítricos es una enfermedad causada por el ascomicete *G. citricarpa*, anamorfo *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Van der Aa (Código EPPO: GUIGCI) (EPPO, 2009). El rango de hospederos de la mancha negra abarca todas las especies de citrus comerciales y sus híbridos, excepto al naranjo agrio (*Citrus aurantium*) y sus híbridos (Kotzé, 1981). El patógeno infecta los frutos y al follaje, pero su importancia radica en el impacto económico que ocasionan las manchas en los frutos, haciéndolos inadecuados para el mercado en fresco e imposibilitando su

comercialización por estar incluido en la lista de cuarentena de Estados Unidos y de la CEE (EPPO 2013, Ferraz Larangeira *et al.* 2005a).

Esta enfermedad ocurre en regiones subtropicales con veranos lluviosos, encontrándose en varios países, tales como Sudáfrica, Kenia, Nigeria, Mozambique, Zimbabwe, Australia, Filipinas, Indonesia, Taiwán, China, Japón, Uruguay Argentina, Brasil, Perú, Venezuela, Cuba, y en el estado de Florida (USA), entre otros (EPPO 2013, Kotzé 2000). Sin embargo, la Comisión de las Comunidades Europeas reconoce determinadas países o regiones exentas de la enfermedad, habilitándolos para la exportación de cítricos a la Unión Europea (Kyprianou, 2006). En Uruguay este patógeno es de escasa importancia, pero debe mantenerse a niveles epidemiológicos extremadamente bajos evitando su ingreso en montes comerciales de exportación, para no afectar la comercialización de fruta fresca (Pérez Faggiani y Alvez, 2011).

Los principales tipos de síntomas en la fruta son mancha dura o negra (*hard spot*), mancha pecosa (sardenta, *freckle*), mancha virulenta (*virulent spot*), falsa melanosis (*speckled blotch*) y mancha agrietada (mancha trincada, *cracked spot*) (Figura 1.4) (EPPO, 2009; Ferraz Larangeira *et al.*, 2005a). Los síntomas son muy variados, pudiendo provocar confusión, por sus características y descripción, con otras enfermedades (Kotzé, 2000). Además, *Guignardia mangiferae* A.J. Roy, especie endofítica no patógena de cítricos, es a veces aislada de frutas cítrica y frecuentemente se confunde con *G. citricarpa* debido a su apariencia similar en las primeras fases de su desarrollo (Baayen *et al.*, 2002), pero pueden distinguirse por características morfológicas en determinados medios de cultivo o a través de identificación molecular (Hidalgo Góngora y Pérez Vicente 2010, EPPO 2009, Baldassari *et al.* 2008, Baayen *et al.* 2002).

G. citricarpa se reproduce formando picnidiosporas en hojas y frutos, y ascosporas exclusivamente en las hojarasca en descomposición (Figura 1.5). Los conidios no se consideran una fuente importante de inóculo, sólo pudiendo llegar a los frutos susceptibles por salpicaduras de gotas de lluvia.

Las ascosporas se forman en pseudotecios después de un período de latencia (40 a 180 días) y son la principal fuente de inóculo de hojas y frutos (CABI 2014, Kotzé 2000). Ambos tipos de esporas causan infección en frutos, hojas y ramitas jóvenes, pero requieren condiciones de calor (21-32 °C) y humedad para infectar al hospedero. El período crítico de infección comienza en el cuajado de los frutos y dura de 4 a 5 meses. Cuando la espora germina y penetra en la cutícula, forma una masa micelial subcuticular, que puede permanecer en estado de latencia hasta por 12 meses (Ferraz Laranjeira *et al.*, 2005a). Los síntomas pueden aparecer cuando el fruto termina de desarrollarse y madura, en pre o postcosecha. No se han encontrado ascocarpos en frutos, y los picnidiosporas no son transportados por el aire, resultando poco probable de diseminarse la enfermedad por transporte de fruta infectada (Kotzé, 2000).

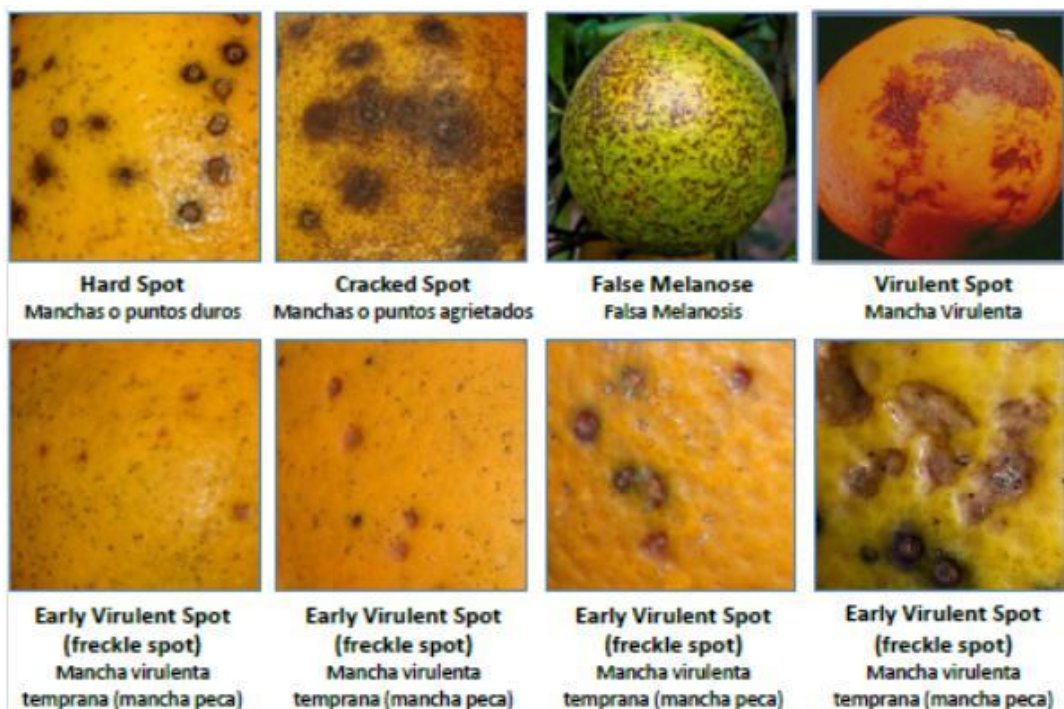


Figura 1.4: Síntomas de mancha negra (Dewdney y Peres, 2010).

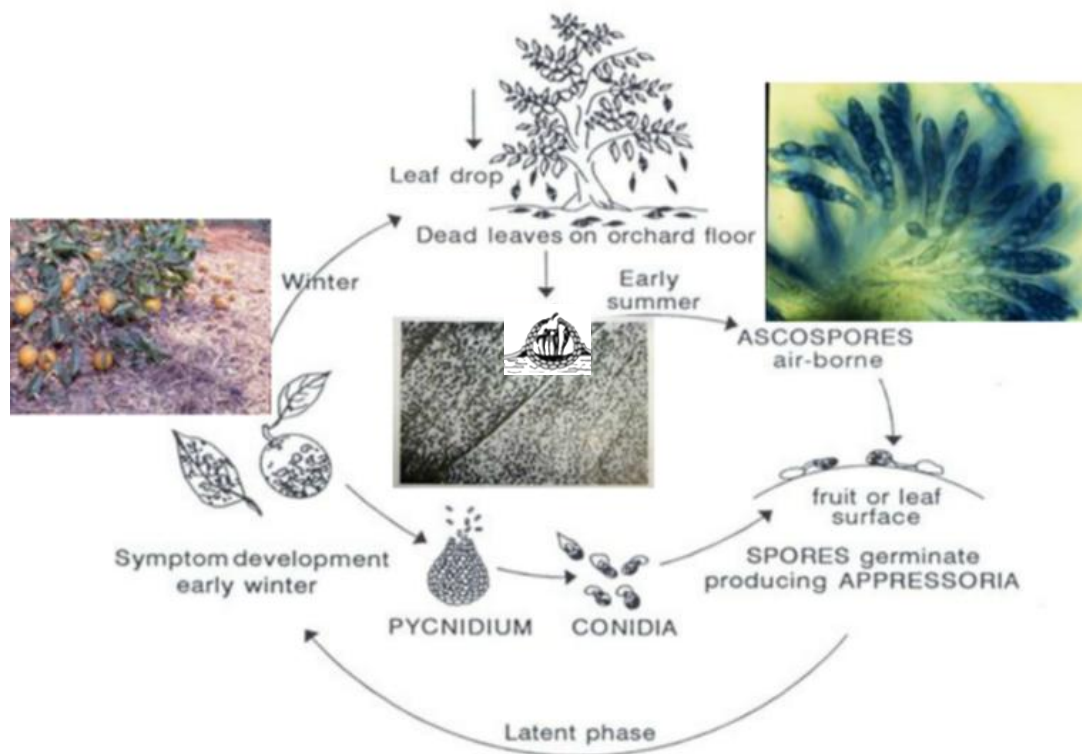


Figura 1.5: Ciclo de la enfermedad mancha negra (Dewdney y Peres, 2010).

El manejo fitosanitario para controlar este patógeno se basa principalmente en productos químicos de síntesis (Pérez Faggiani y Alves 2011, Kupper 2009, Kotzé 2000). El número de aplicaciones puede variar en función de la cantidad de inóculo, condiciones ambientales, susceptibilidad del cultivar, destino de la producción y producto utilizado (Ferraz Larangeira *et al.*, 2005b). En precosecha los fungicidas para el control de la mancha negra de los cítricos deben ser elegidos cuidadosamente para minimizar posible desarrollo de resistencia, pudiendo usarse productos cúpricos, ditiocarbamatos, benzimidazoles y estrobilurinas. Estas aplicaciones pueden prevenir o dilatar la expresión de los síntomas en frutos con infección en estado de quiescencia. Sin embargo, en postcosecha los productos fúngicos son generalmente menos efectivos previniendo la aparición de síntomas (CABI, 2014). Las infecciones latentes son especialmente difíciles de controlar en frutos postcosecha, porque el patógeno reside en un estado de quiescencia en los tejidos del hospedero (Wilson *et al.*, 1997).

Por otro lado, existen reportes de cepas de *G. citricarpa* resistentes a diferentes agroquímicos, como lo informaron Herbert y Grech (1985) en Sudáfrica, al reportar cepas resistentes a benomil. Rodrigues *et al.* (2007), en Brasil, evaluaron la resistencia a los fungicidas carbendazim y piraclostrobin extrayendo cepas de *G. citricarpa* en frutos sintomáticos de naranja dulce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) colectados en montes cítricos en el Estado de San Pablo, y hallaron aislamientos resistentes al primer fungicida. También en Brasil (Curitiba) se encontró variación en la sensibilidad a azoxystrobin de los aislamientos y lo relacionaron con la variabilidad genética de *G. citricarpa* (Possiede *et al.*, 2009).

1.1.3. Compuestos bioactivos derivados de las plantas

En el desarrollo de estrategias para el control de enfermedades de las plantas, más seguras para la salud humana y respetuosas del medio ambiente, se han propuesto varias alternativas potenciales (Talibi *et al.*, 2014).

De acuerdo a su naturaleza estas alternativas pueden dividirse en (Palou *et al.*, 2008):

- métodos de control físicos
- métodos de control químicos
- métodos de control biológicos.

El control biológico incluye tres estrategias (Talibi *et al.*, 2014):

- uso de microorganismos antagonistas
- aplicación de compuestos bioactivos derivados de las plantas
- inducción de resistencia natural.

Las plantas en su estado silvestre evolucionaron generando productos naturales biológicamente activos, siendo ejemplo de ello las plantas aromáticas y medicinales (Dixon, 2001). Estas plantas están ampliamente distribuidas en el mundo y en especial en las familias de las Alliaceas (Liliaceae), Anacardiaceas, Apiaceas (Umbeliferae), Asteraceas (Compuesitae), Chenopodiaceas, Euphorbiaceas, Fabaceas (Leguminosas),

Lamiaceas (Labiadas), Malvaceas, Mirtáceas, Poaceas (Gramineas), Rutáceas y Verbenáceas. Actualmente, existen múltiples estudios sobre los productos del metabolismo secundario de las plantas, extractos y aceites esenciales (AEs) o sus compuestos, con resultados que abarcan propiedades como antioxidante, anticancerígena, antimutagénico, antiinflamatoria, bioreguladora, alelopática, antimicrobiana e insecticida (Tabassum y Vidyasagar 2013, Retta *et al.* 2012, Shaaban *et al.* 2012, Soković *et al.* 2012, Voon *et al.* 2012, Gatto *et al.* 2011, Manzano Satana *et al.* 2011, Sánchez-González *et al.* 2011, Stefanello *et al.* 2011, Antunes y Cavaco 2010, Silva y Fernandes Junior 2010, Weston 2010, Alzate *et al.* 2009, Bakkali *et al.* 2008, Barrera Necha y García Barrera 2008, Jardim *et al.* 2008, Marin *et al.* 2008, Abad *et al.* 2007, Kumar *et al.* 2007, Coelho de Souza *et al.* 2004, Mesa Arango *et al.* 2004, Tripathi *et al.* 2004, Stashenko *et al.* 2003, Daferera *et al.* 2000, Isman 2000, Cowan 1999, Pattnaik *et al.* 1997, Wilson *et al.* 1997, Caccioni y Guizzardi 1994, Dikshit *et al.* 1986).

Por otra parte, la aparición de cepas de hongos resistentes a varios fungicidas reduce el número disponible de productos químicos y hace necesario descubrir nuevas clases de compuestos que inhiban esos mecanismos de resistencia. Los metabolitos secundarios producidos por las plantas medicinales y aromáticas, generalmente son conocidos por ser biodegradables, presentan selectividad natural y baja toxicidad, afectando sólo a sus agresores y preservando los organismos útiles (Morais 2009a, Tripathi *et al.* 2004). De todos los metabolitos, el grupo de los alcaloides y aceites esenciales (AEs) contienen el mayor número de sustancias biológicamente activas (Atti dos Santos *et al.*, 2010). Los resultados favorables sobre la actividad antimicrobiana de los AEs, han mostrando un alto potencial como alternativas de los antibióticos y antifúngicos de síntesis para el control de enfermedades (Antunes y Cavaco 2010, Abad *et al.* 2007).

1.1.3.1. Aceites esenciales (AEs)

Los AEs son producto del metabolismo secundario de las plantas, constituidos por mezclas complejas de sustancias orgánicas aromáticas volátiles mayormente hidrofóbicas, obtenidas de diferentes órganos de las plantas (De Souza Prestes *et al.* 2011, Antunes y Cavaco 2010, Bakkali *et al.* 2008). Tradicionalmente, los aceites se utilizan para la elaboración de una amplia gama de productos, como jabones, cosméticos, perfumes, elaboración de comidas y bebidas (Handa, 2008). Además de sus usos convencionales están siendo incorporados a la farmacéutica y a la agricultura, por sus propiedades medicinales, antioxidantes, antimicrobianas, insecticidas, acaricidas y nematocidas (Bakkali *et al.* 2008, Abad *et al.* 2007, Mesa Arango *et al.* 2004, Isman 2000).

La obtención del AE depende de factores como la parte de la planta (hojas, raíces, tallos), ubicación (pelos, cavidades, canales, etc), manejo postcosecha (en fresco o grado de secado, tamaño), del equipo (dimensiones, materiales), factores operacionales (tiempo de extracción, temperatura, presión) y finalidad de lo obtenido (Dellacassa *et al.*, 2004a). El método más utilizado es la destilación. Cuando el proceso de destilación se realiza mediante la transferencia de calor y de presión del vapor del agua, el proceso se denomina hidrodestilación.

Existen tres tipos de hidrodestilación:

- destilación con el material sumergido en agua, vapor generado in situ
- destilación con el material separado del agua, vapor generado in situ
- destilación con vapor generado en forma exógena (desde un generador de vapor o caldera)

Los tres métodos siguen las mismas consideraciones teóricas, las diferencias radican en los métodos de manipulación del material y la generación del vapor de agua (Handa, 2008). En la destilación con agua, o simplemente llamado hidrodestilación, el material vegetal está directamente en contacto con el agua, encontrándose inmerso en ella. Las ventajas de este método de extracción son baja inversión inicial, proceso simple, versátil

y flexible (Dellacassa *et al.* 2004a, Handa 2008). Para realizar pruebas preliminares o a nivel de laboratorio, el equipo recomendado es el sistema Clevenger modificado (Figura 1.6). Para fines analíticos este tipo de destilación es muy adecuado, debido a que permite la caracterización de los AEs de las plantas aromáticas, especialmente tiempo de destilación y rendimiento. El tiempo total de destilación es función de los componentes presentes en cada aceite esencial, compuestos con alto punto de ebullición llevan mayor tiempo (Dellacassa *et al.*, 2004a).

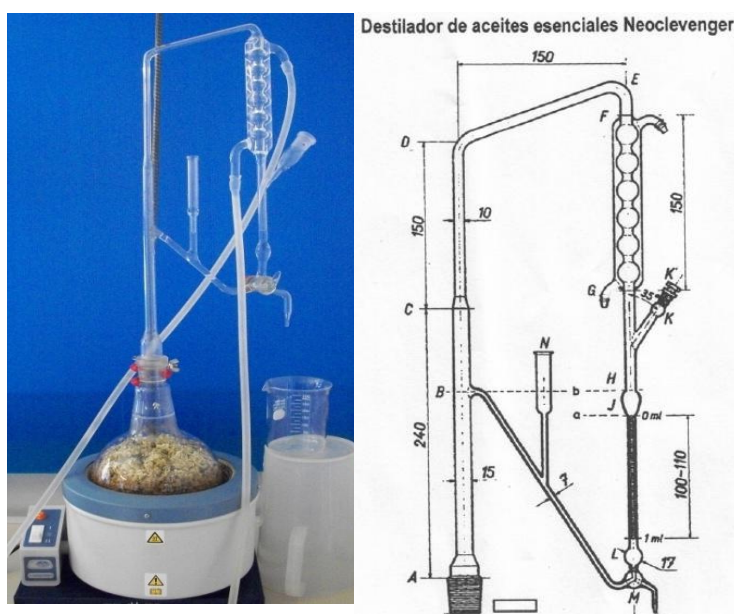


Figura 1.6: Equipo utilizado para la hidrodestilación de aceites esenciales, con trampa Clevenger, detalle del colector del destilador según Farmacopea Europea (medidas en mm) (Dellacassa *et al.*, 2004a).

El valor económico de los AEs está relacionado con su composición química y su actividad biológica, por lo cual es importante realizar un análisis químico (Stashenko *et al.*, 2003). La Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC - MS) es una técnica que representa una herramienta potente para separar, identificar y cuantificar componentes volátiles y semivolátiles de mezclas complejas, ofrecen resoluciones excelentes con alta sensibilidad y en un tiempo relativamente corto (Gutiérrez y Droguet, 2002). Los AEs están formados por compuestos cuya estructura base es el isopreno (C_5), conocidos como terpenos (Cowan, 1999)

y otros constituyentes aromáticos y alifáticos, todos caracterizados por bajo peso molecular (Bakkali *et al.*, 2008). Entre sus principales compuestos se encuentran los monoterpenos (C₁₀) y sesquiterpenos (C₁₅) (Tabassum y Vidyasagar, 2013). Los aceites se caracterizan por presentar una gran variedad de componentes en concentraciones muy diversas, algunos presentes en cantidades de trazas. En general, los componentes mayoritarios determinan las propiedades biológicas de los aceites (Bakkali *et al.*, 2008), pudiendo ser activos contra bacterias, hongos, virus y protozoarios (Cowan, 1999). En consecuencia, los compuestos volátiles con acción fungicida podrían tener éxito controlando infecciones latentes bajo formulaciones y aplicaciones apropiadas (Wilson *et al.*, 1997).

Los AEs responsables de la acción antimicrobiana y sus compuestos químicos actúan sobre las proteínas de la membrana citoplasmática (Silva y Fernandes, 2010). Actualmente, se conoce que el grupo de terpenos (mono y sesquiterpenos) actúa interrumpiendo la membrana celular y algunos sesquiterpenos destruyen la mitocondria de los hongos. La membrana celular de los hongos contiene principalmente ergosterol, a diferencia de la de los mamíferos que contienen colesterol. Los fitoesteroles son esenciales para la membrana celular de los hongos y los fármacos antifúngicos que inhiben la biosíntesis del ergosterol, interrumpen la integridad de dicha membrana (Holm Freiesleben y Jäger, 2014). Los AEs son mayoritariamente lipofílicos, pudiendo pasar a través de la pared celular y de la membrana citoplasmática de los hongos e interrumpir la composición estructural de ésta, haciéndola más permeable (Bakkali *et al.*, 2008).

1.1.3.2. AEs bioactivos de plantas nativas

Las especies vegetales que se encuentran en estado silvestre, mantienen una fuerte interacción con el ambiente, influenciando la composición de los metabolitos secundarios de las plantas. El rendimiento, la composición química o el tenor del AE de una misma planta pueden variar según la edad de la planta, en las diferentes estaciones del año, por el

horario de cosecha y el manejo postcosecha (Stashenko 2010, Morais 2009b, Ciccío y Ocampo 2006). Estas alteraciones que ocurren en los compuestos de los aceites pueden influenciar directamente la calidad y en consecuencia los resultados de las pruebas biológicas (Morais, 2009a).

Uruguay posee numerosas especies autóctonas, con antecedentes de usos medicinales y con propiedades biológicas. En este sentido, desde hace tiempo, se viene analizando la composición química de los AEs o extractos de varias plantas nativas, con diferentes objetivos (Chalannavar *et al.*, 2013, Weston 2012, Díaz Dellavalle *et al.*, 2011, Manzano Santana *et al.*, 2011, Morais y Casthana 2011, Stefanello *et al.*, 2011, Barneche *et al.*, 2010, Stashenko 2010, Viturro *et al.*, 2010, Agostini *et al.*, 2009, Retta *et al.*, 2009, Alonso *et al.*, 2008, Bertucci *et al.*, 2008, Marin *et al.*, 2008, Castañeda *et al.*, 2007, Ciccío y Ocampo 2006, Juliani *et al.*, 2004, Dellacassa *et al.*, 2004b, Stashenko *et al.*, 2003, Torres *et al.*, 2002, Ricciardi *et al.*, 1999, Soler *et al.*, 1986).

En los últimos años se ha intensificado a nivel regional la evaluación de su actividad antimicrobiana. Encontrándose reportes con actividad antifúngica de AEs de *Chenopodium ambrosioides* (Jaramillo *et al.* 2012, Jardim *et al.* 2008), *Schinus molle* (Dickshit *et al.*, 1986), *Baccharis dracunculifolia*, *Blepharocalyx salicifolia*, *Conyza bonariensis*, *Baccharis trimera* (Picoli *et al.*, 2007) entre otros (Atti dos Santos *et al.* 2010, Zapata *et al.* 2010, Kumar *et al.* 2007). También se ha evaluado el efecto antibacteriano de AEs de algunas plantas nativas, entre las cuales se encuentran *Eugenia uniflora*, *Ocimum selloi*, *Pluchea sagitalis*, *Psidium cattleianum*, *Conyza bonariensis*, *Lippia alba*, *Baccharis dracunculifoila* (De Souza Prestes *et al.*, 2011, Nascimento *et al.*, 2011, Antunes y Cavaco 2010, Barneche *et al.*, 2010, Brun y Mossi 2010, Silva y Fernandes Junior 2010).

Aunque, se ha ampliado el conocimiento sobre las propiedades de los metabolitos secundarios de las plantas, aún hoy existen escasos o ningún reporte sobre la bioactividad de los AEs de plantas autóctonas sobre *P. digitatum* o *G. citricarpa*. Entre los pocos trabajos que involucran a uno u otro

de estos patógenos con especies vegetales nativas de Uruguay, se encuentran De Souza *et al.* (2005) y Montes Belmont *et al.* (2000). Los primeros autores reportaron que los AEs de *E. uniflora* y de *L. alba* probados contra *P. digitatum*, utilizando la metodología de discos de difusión, sólo *L. alba* presentó resultados positivos. Mientras, Montes Belmont *et al.* (2000), que evaluaron 206 especies vegetales contra 26 especies de hongos, entre ellos *Penicillium* spp, encontraron que este hongo presentaba dependencia de factores exógenos para la germinación de sus esporas resultando que los extractos vegetales de las plantas *S. molle* y *Baccharis salicifolia* estimulaban su crecimiento.

Desde hace dos décadas, en Uruguay, se vienen desarrollando diferentes líneas de investigación en el control biológico de enfermedades de las plantas (Mondino *et al.*, 2014). La utilización de control biológico en la postcosecha sería posible debido a determinadas características que facilitan su aplicación, como ser ambiente confinado y controlado, y la adaptación de los equipos existentes a bajos costos (Mondino y Vero, 2006).

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo general

Contribuir al conocimiento sobre la composición química y actividad biológica de AEs de plantas autóctonas.

1.2.2. Objetivos específicos

Se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Seleccionar plantas nativas por su capacidad de producir AEs.
- Identificar los principales compuestos químicos de cada aceite.
- Evaluar la actividad antifúngica *in vitro* de cada AE frente a *Guignardia citicarpa* y *Penicillium digitatum*.
- Determinar si los aceites presentan compuestos biológicamente activos utilizando la metodología que mejor se adecue a cada patógeno.

2. CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIFUNGAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS AGAINST CITRUS BLACK SPOT *Guignardia citricarpa*

KIELY¹

Pamela Lombardo^a, Jorge Franco^b, Eduardo Dellacassa^c, Elena Pérez Faggiani^d

^aCátedra de Fitopatología, Departamento de Protección Vegetal, Estación Experimental de la Facultad de Agronomía en Salto (EEFAS), Universidad de la República. Ruta 31, Km 21.5 Salto. CP: 50000. Uruguay.

E-mail address: palomba@fagro.edu.uy. Corresponding autor.

^bDepartamento de Biometría, Estadística y Computación, Estación Experimental Dr. Mario A. Cassinoni (EEMAC), Universidad de la República. Ruta 3, Km 363. Paysandú. CP: 60000 Uruguay.

E-mail address: jfranco@fagro.edu.uy

^cCátedra de Farmacognosia y Productos Naturales, Facultad de Química, Universidad de la República. Avenida General Flores 2124. Montevideo. CP: 11000. Uruguay. *E-mail address: edellac@fq.edu.uy*

^dFitopatología, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Estación Experimental Salto Grande. Camino El Terrible s/n, Salto. Uruguay.

E-mail address: elenaperez@inia.org.uy

¹Artículo escrito bajo el formato de la revista Postharvest Biology and Technology.

Abstract

The aim of this study was to identify the chemical compounds of essential oils extracted from Uruguayan native plants and to evaluate their effect in vitro against *Guignardia citricarpa* (Kiely), a fungal pathogen of citrus. The selected plants were *Schinus molle*, *Achyrocline flaccida*, *Baccharis dracunculifolia*, *Baccharis trimera*, *Conyza bonariensis*, *Pluchea sagitalis*, *Chenopodium ambrosioides*, *Ocimum selloi*, *Blepharocalyx salicifolia*, *Acca sellowiana*, *Eugenia uniflora*, *Psidium cattleianum*, *Aloysia grattisima* and *Lippia alba*. The essential oils were obtained by hydrodistillation and the chemical composition analysis was carried out using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The inhibition percentage of the essential oils against *G. citricarpa* was evaluated using agar dilution and volatile phase tests, with a concentration of 1000 ppm. In the volatile phase test, the essential oil of *Ch. ambrosioides* inhibited fungal growth completely (100 %), thus presenting a fungicidal effect. The essential oils of *L. alba*, *B. salicifolia*, *P. sagitalis*, *B. trimera*, *A. grattisima* and *A. sellowiana* delayed fungal growth, showing high inhibition during 10 to 15 days and hence presenting a fungistatic effect. The effect of *O. selloi*, *A. sellowiana*, *E. uniflora* and *B. trimera* essential oils was evaluated using the direct contact technique, inhibitory percentages higher than 70 % were obtained during the first 10 days. The essential oil of *C. bonariensis* inhibited fungal reproduction completely (100 %). The antifungal activity of *Ch. ambrosioides* and the anti-sporulating activity of *C. bonariensis* show great potential in citrus black spot

management, avoiding the development of the pathogen and preventing disease spread.

Highlights

-Essential oils from Uruguayan native plants resulted useful for citrus black spot biocontrol.

-The inhibition was greater than 70 % for 15 days for *L. alba*, *B. salicifolia*, *P. sagittalis*, *B. trimera* and *A. grattisima* oils in the volatile phase, and for *O. selloi* and *A. sellowiana* oils when in contact with *Guignardia citricarpa*.

-The essential oil of *Ch. ambrosioides* showed a volatile phase fungicidal effect.

Keywords: *Phyllosticta citricarpa*, biofungicides, iso-ascaridol, linalool, 1,8-cineol.

Abbreviations: EO, essential oil; GC-MS, gas chromatography-mass spectrometry.

2.1. INTRODUCTION

Citrus black spot, caused by *Guignardia citricarpa* Kiely, is considered a quarantine disease for the European market in the export of fresh fruit (EPPO, 2013, 2009). In favorable conditions the susceptible organs are infected, but the disease remains latent for a long period of time and symptoms may appear during the latter stages of the fruit's development or in postharvest (Kotzé, 2000). The control of citrus black spot is based on a series of strategies, among which the use of fungicides is the main method for pre and postharvest control (Fialho *et al.*, 2010; Kotzé, 2000). However, fungicides present difficulties in disease control, due to an increase in resistant pathogen strains (Possiede *et al.*, 2009). Consumers are increasingly demanding products free of chemicals, because of their potential effect on health and the environment (Morais, 2009a). Consequently, alternative disease control methods are starting to be considered (Fialho *et al.*, 2010).

Plants synthesize secondary metabolites that they use for self-protection. These substances present natural selectiveness, low toxicity and are biodegradable (Antunes and Cavaco, 2010). Essential oils (EOs) are bioactive secondary metabolites, EOs are complex mixtures of volatile compounds produced in specialized plant organs (Tabassum and Vidyasagar, 2013; Morais, 2009a). There are studies indicating that certain EOs present antimicrobial, anti-inflammatory, anti-carcinogenic, antioxidant activities, stimulate the immune system and are generally recognized as safe

for the environment and human health (Hyldgaard *et al.*, 2012; Adorjan and Buchbauer, 2010; Barbosa *et al.*, 2008; Edris, 2007). EOs may become a good alternative to chemically synthesized fungicides, enabling the development of new selective and natural products for the treatment of pathogens (Tabassum and Vidyasagar 2013, Shaaban *et al.*, 2012; Voon *et al.*, 2012; Sanchez-González *et al.*, 2011; Antunes and Cavaco, 2010; Bakkali *et al.*, 2008; Abad *et al.*, 2007).

Uruguay's native flora has numerous species that contain EOs which already have a history of medicinal use (Alonso *et al.*, 2008; Davies, 2004; Arrillaga de Maffei, 1969). The antifungal activity of EOs has started to be evaluated in the region (Jaramillo *et al.*, 2012; Manzano Santana *et al.*, 2011; Nascimento *et al.*, 2011; Atti dos Santos *et al.*, 2010; Brun and Mossi, 2010; Stachenko, 2010; Viturro *et al.*, 2010; Marin *et al.* 2008; Castañeda *et al.*, 2007), but its composition and quality may vary since it is associated with weather, soil, seasonal, harvest age and phenological state, oil obtention method and other factors (Ciccío and Ocampo, 2010; Viturro *et al.*, 2010; Morais, 2009b).

The bioactivity of the essential oils depends on their complex chemical composition, since some of the compounds do not have antimicrobial effect when applied separately but they do act in synergy with other compounds (De Souza *et al.*, 2005). The biological activity of EOs on a number of important pests and plant fungal pathogens is a consequence of either their fumigant effect or effect by contact (Antunes and Cavaco, 2010).

The objective of the present study was identify the main chemical components and evaluate *in vitro* antifungal activity of each EO towards *Guignardia citicarpa*, either by contact or using the inhibitory action of the volatile compounds.

2.2. MATERIALS AND METHODS

2.2.1. Plant material

The selection criterion for Uruguayan native plants was based on their background as essential oil producers and their history of medicinal use (Table 1). The collection of materials was done in the vicinity of Salto, Uruguay (31°22'S 57°56'O). The species were identified by the Cátedra de Botánica de la Facultad de Agronomía, Regional Norte Salto, Universidad de la República (Udelar). From a total of 28 initial plant species, a selection was carried out according to their EO production yields, availability of plant material and their history of antimicrobial activity. A sample of each species was deposited in the herbarium of the "Prof. Atilio Lombardo" Botanical Gardens museum, Montevideo, identified with the following catalogue numbers: *S. molle* MVJB 29177, *A. flaccida* MVJB 29178, *B. dracunculifolia* MVJB 28912, *B. trimera* MVJB 29179, *C. bonariensis* MVJB 29762, *P. sagittalis* MVJB 29176, *Ch. ambrosioides* MVJB 29161, *O. selloi* MVJB 29175, *B. salicifolia* MVJB 29159, *A. sellowiana* MVJB 29160 *E. uniflora* MVJB 29158, *P. cattleianum* MVJB 29157, *A. gratissima* MVJB 28914, *L. alba* MVJB 29180.

Table 1. Background of medicinal use and/or biological activity of the selected plant species.

Botanical family	Plant species	Common name	Medicinal use and biological activity	Citation *
Anacardiaceae	<i>Schinus molle</i> L.	anacahuita	antirheumatic, healing, antiseptic, antifungal, anti-inflammatory	1, 2, 3, 4, 5
	<i>Achyrocline flaccida</i> (Weinm) DC	marcela	digestive, analgesic, antispasmodic, sedative, cholagogic, antiasthmatic, antimicrobial	2, 3
	<i>Baccharis dracunculifolia</i> DC	chilca blanca	antibiotic, antifungal, malaria inhibitor	2
Astereaceae	<i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC	carqueja	antispasmodic, digestive, anthelmintic, antibiotic, antifungal	1, 2, 5, 7
	<i>Conyza bonariensis</i> (L.) Cronquist	yerba carnicera	hepatoprotective, diuretic, antiseptic, antimycotic, antiulcer, antiinflammatory	1, 3, 8
	<i>Pluchea sagittalis</i> (Lam.) Cabrera	yerba lucera	stomachic, antioxidant sedative, anti-inflammatory febrifuge, antimicrobial	1, 3, 9
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	paico	anthelmintic, anti-pyretic, antiasthmatic, antisnake venom, antifungal	1, 2, 3, 10
Lamiaceae	<i>Ocimum selloi</i> Benth.	albahara de campo	anti-inflammatory, healing, emmenagogue, antiseptic, anthelmintic, antibacterial	1, 2, 9, 11
	<i>Blepharocalyx salicifolia</i> Berg	arrayán	astringent, dysentery, antidiarrheal, antifungal	1, 2, 7, 12
	<i>Acca sellowiana</i> (Berg) Burret	guayabo del país	medicinal, antibacterial antioxidant, antifungal	1, 12, 13
Mirtaceae	<i>Eugenia uniflora</i> L.	pitanga	astringent, digestive, depurative, antidiarrheal emollient, antioxidant antimicrobial	1, 3, 9, 12, 14, 15
	<i>Psidium cattleianum</i> Sab. var. <i>cattleianum</i>	arazá	urinary diseases, antibacterial, antioxidant	9, 12, 15
Verbenaceae	<i>Aloysia gratissima</i> (Gillies/Hook) Tronc	cedrón del monte	anti-cold, stomachic, antinervous	1, 2
	<i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E.Br.	salvia trepadora	digestive, antispasmodic expectorant, antifungal	2, 3, 5, 16

*1: Arrillaga de Maffei, 1997, 1969; 2: Davies, 2004; 3: Alonso *et al.*, 2008; 4: Atti dos Santos *et al.*, 2010, Viturro *et al.*, 2010; 5: Díaz Dellavalle *et al.*, 2011; 6: Vivot Lupi *et al.*, 2009; 7: Manzano Santana *et al.*, 2011; 8: Zapata *et al.*, 2010; 9: Coelho de Souza *et al.*, 2004; 10: Jaramillo *et al.*, 2012, Jardim *et al.*, 2008; 11: Nascimento *et al.*, 2011; 12: Stefanello *et al.*, 2011; 13: Saj *et al.*, 2008, Weston, 2010; 14: Brun and Mossi, 2010; 15: De Souza Prestes *et al.*, 2011, Marin *et al.* 2008; 16: Stashenko, 2010, Stashenko *et al.*, 2003.

Table 2. Species selected for essential oil extraction, sample location and phenological stage at the moment of harvest of plant material.

Plant species	Common name	Location of samples ^a	Phenol. stage ^b
<i>Schinus molle</i> L.	Anacahuita	ex-route 3, Cno. El Terrible (31°16' S 57°54' O)	fruit.
<i>Achyrocline flaccida</i> (Weinm) DC	Marcela amarilla	Route 31 km 19 (31°22' S 57°44' O)	flower.
<i>Baccharis dracunculifolia</i> DC	Chilca blanca	Arenitas blancas (31°25' S 57°59' O)	flower.
<i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC	Carqueja	EEFAS – potrero 42 (31°23' S 57°43' O)	flower.
<i>Conyza bonariensis</i> (L.) Cronquist	Yerba carniceira	EEFAS – Citricultura (31°23' S 57°43' O)	flower.
<i>Pluchea sagittalis</i> (Lam.) Cabrera	Yerba lucera	Cost. N Pq. José Luis (31°19' S 57°58' O)	flower.
<i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	Paico macho	Ruta 31 km12, Bo.Albizu (31°23' S 57°48' O)	flower.
<i>Ocimum selloi</i> Benth.	Albahaca de campo	EEFAS – potrero 9 (31°23' S 57°42' O)	flower.
<i>Blepharocalyx salicifolia</i> Berg	Arrayán	EEFAS – Park (31°23' S 57°42' O)	flower.
<i>Acca sellowiana</i> (Berg) Burret	Guayabo del país	EEFAS – Native plants (31°22' S 57°42' O)	fruit.
<i>Eugenia uniflora</i> L.	Pitanga negra	EEFAS – Native plants (31°23' S 57°42' O)	veg.
<i>Psidium cattleianum</i> Sab	Arazá rojo	EEFAS – Native plants (31°23' S 57°42' O)	fruit.
<i>Aloysia gratissima</i> (Gillies & Hook) Tronc	Cedrón del monte	Ex-routr 3 Cno El Terrible (31°16' S 57°53' O)	flower.
<i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E.Br.	Salvia trepadora	City of Salto (31°23' S 57°57' O)	flower.

^a Cno.= camino; EEFAS: Estación Experimental de la Facultad de Agronomía en Salto, route 31 km 21,5; Cost. N Pq.= costanera Norte Park; Bo.= Neighborhood; (coordinates) = georeference of the plants used.

^b Phenological stages: flower.= flowering, fruit.= fruiting, veg.= vegetative.

Plant material was aerated under shaded conditions. Drying times varied according to plant tissue or organ where the essential oil is produced or stored (Handa, 2008).

2.2.2. Essential oil extraction

The organs of the plants used for essential oil extraction were: separated leaves (L) and whole fruits (Fr) of *S. molle*; the flowers of *Achyrocline flaccida*; the leaves and flowers of *B. dracunculifolia*, *B. trimera*, *C. bonariensis* and *P. sagitalis*, *Ch. ambrosioides*, *O. selloi*, *A. grattisima* and *L. alba*; and the leaves of *B. salicifolia*, *A. sellowiana*, *E. uniflora* and *P. cattleianum*. The extraction system used was a Clevenger like hydrodistillation (Dellacassa *et al.*, 2004). Plant material was ground, except for the fruits, and weighed before distillation. The extraction time was measured for each sample as the period from when the first drops of oil were extracted until the accumulated volume of essential oil ceased to vary. The samples were representative of the species and its geographical area of distribution, and were chosen in order to be representative of the same pedoclimatic and collection conditions; the extraction conditions were also identical for all samples. Therefore, the influence of environmental and technical parameters on the chemical composition of the essential oil was avoided. The yield of the distilled sample is expressed in percent (v/w), calculated according to the formula $R (\%) = (V / M) * 100$, where V: EO volume (ml), M: mass of the plant material (g). The EOs were stored in

amber colored glass bottles until they were used in the chemical analyses and bioassays.

2.2.3. GC-MS analysis

GC-MS analyses were carried out using a Shimadzu QP 5050 apparatus which was equipped with MS reference libraries (Adams, 2001; McLafferty and Stauffer, 1991). Analyses were carried out a Mega SE-52 cross-linked fused-silica capillary column (25 m × 0.25 mm i.d.) coated with 5% phenyl-polymethylsiloxane (0.25 μm phase thickness). The oven temperature programme was 60 °C for 8 min, rising to 180 °C at 3 °C/min, then to 230 °C at 20 °C/min; the injector temperature was 250 °C; the carrier gas was helium at 122.2 kPa (51.6 cm/s); the injection mode was split with a split ratio of 1:40; the sample volume injected was 0.2 μL; the interface temperature 250 °C; and the acquisition mass range was 40–400 m/z. The oil components were identified by comparison of their linear retention indices (LRIs) on the two columns (determined in relation to a homologous series of nalkanes) with those of pure standards or as reported in the literature (Kováts, 1958). Comparison of fragmentation patterns in the MS with those stored on the GC-MS databases (Adams, 2001; McLafferty and Stauffer, 1991) was also performed. The percentages of each component were reported as raw percentages without standardization. Repeatability of the measuring system showed variation coefficients under 5 % for all the components reported.

2.2.4. Plant pathogen

G. citricarpa isolated from Valencia orange (*Citrus sinensis*) fruits was used. The fruits presented a hard spot with pycnidia, a typical symptom of the disease. Its identity was confirmed through morphological, cultural and biological characterization of *G. citricarpa*, in Oatmeal Agar (OA) medium and Potato Dextrose Agar (PDA) commercial medium (Difco®, France) (Hidalgo Góngora and Pérez Vicente, 2010; EPPO, 2009; Baayen *et al.*, 2002). A yellow pigment was produced by *G. citricarpa* on OA and diameter growth of the colony on PDA was less than 25 mm in seven days. The fungus was kept in Petri dishes with PDA culture medium in an incubator at 25 °C in darkness. Subcultures were made 15 days before the assays.

2.2.5. Bioassays

Of all the assays used to identify antimicrobial substances, the tests that best adapted to *G. citricarpa* were selected. Since the pathogen has slow mycelial growth, volatile phase tests were carried out, evaluating the volatile compounds of EOs, and the dilution agar method, measuring the effects by contact. Since only one concentration was used (1000 ppm, corresponding to 1000 mg/mL air volume), the oils were characterized qualitatively.

Each Petri dish (85 mm diameter) was divided en four equal quadrants by drawing two perpendicular lines through the center of the base of the dish. The antifungal activity of the oils was evaluated as an inhibition percentage of the mycelial growth, using the following formula:

Inhibición (%) = $[(dC - dT)/dC] \times 100$; where dC is the average diameter of the control colony and dT is the diameter of the treated colony.

Once the tests were finished, if total (100 %) fungal growth inhibition was observed, then viability of the pathogen was tested. To do this, discs from the treatment dishes were transferred to Petri dishes with PDA culture medium with no growth inhibitors and were incubated at 25 °C in darkness during 72 h. When fungal sporulation inhibitory effect was observed, the effect was evaluated by counting the spores produced in presence and absence of the essential oil in the following manner: 6 mm discs of the mycelium were removed from the four quadrants of the Petri dishes and put into Eppendorf tubes with a suspension of 500 µL sterile distilled water with Triton (0.02 %) and were shaken for two minutes (Thermolyne, Iowa, USA). The spores were counted using a Neubauer chamber, this observation was repeated four times for every disc the mycelium.

2.2.5.1. Volatile Phase Test

The bioactivity of essential oil volatile compounds was evaluated using the volatile phase test (VFT) (Pauli and Schilcher, 2007). A 6 mm diameter disc of *G. citricarpa* mycelium from 15 day old colonies was placed in the center of each Petri dish containing 15 mL of sterile PDA culture medium. A sterile microscope slide was placed on the internal side of the dish cover and 85 µL of pure essential oil were pipetted on to it, corresponding to a concentration of 1000 ppm (0.1 %). The same procedure was carried out for the control treatment, without pipetting the essential oil.

The Petri dishes were immediately sealed with Parafilm and incubated upside down at 25 °C in darkness. The assay was done in triplicate and repeated twice. The colony growth diameters were measured every 5 days during a total of 40 days.

2.2.5.2. Agar Dilution Test

The essential oil's direct contact inhibitory effect on *G. citricarpa* growth was evaluated using the agar dilution test (Poisoned Food Technique, PFT, Rahman *et al.*, 2011; adapted from Grover and Moore (1962)). For this assay, a 15 mL mixture of PDA culture medium and EO mixed with dimethyl sulfoxide (DMSO) (9:1, v/v) at a 1000 ppm concentration was put into each Petri dish. The same procedure was carried out for the control treatment, without mixing EO into the culture medium. Once the medium solidified, a 6 mm disc of the fungus was put into the dish; 15 day old colonies were used. The Petri dishes were immediately sealed with Parafilm and incubated at 25 °C in darkness. The diameters of the colonies were measured every 5 days until no more growth was observed in the control treatment. The bioassays were done in triplicate and repeated twice.

2.2.6. Statistical analyses

The experimental design for the volatile phase test and the agar dilution method was a Randomized Complete Block (RCB), a block was considered as the moment in which the assay was repeated. Two analyses of variance (ANOVA) were done for each test, one analysis for the results obtained from

mycelial growth and the other from the inhibition percentage. The Tukey's range test was used ($p < 0.05$) to separate the mean diameters of mycelial growth and for the inhibition percentage of the treatments in each measurement, in cases where the value was negative (mycelial growth diameter larger than the control treatment) the value was considered to be zero. The analyses were carried out using the GLM procedure of SAS program (Stat Analysis System Institute Inc., 2008).

2.3. RESULTS

2.3.1. Essential oil yields

Essential oils extracted by hydrodistillation presented a broad range of yields (Table 3), only 0.05 % (v/w) was obtained using *A. sellowiana* leaves and 1 % (v/w) was obtained using *S. molle*, *Ch. Ambrosioides*, *O. selloi* and *L. alba* leaves. EO extraction times varied from 0:30 to 4:00 h, *S. molle* and *L. alba* were the ones that presented the lowest extraction times and the highest extraction time was with *S. molle* whole fruits.

Table 3. Species and organs used, amount of material and distillation time, yield of EOs and N ° of total distillations (HD).

Plant species	Organ ^a used	Amount of material (g)	Time (h)	EO yield (%)	N° HD
<i>Schinus molle</i>	Leaf	180	0:30 – 0:45	1,0 – 1,3	4
	Fruit	400 – 500	3:00 – 4:00	0,2 – 0,5	4
<i>Achyrocline flaccida</i>	Flower	150	1:00	0,5	8
<i>Baccharis dracunculifolia</i>	L and f	150	2:00 – 2:30	0,7	6
<i>Baccharis trimera</i>	L and f	150 – 180	1:00	1,6	4
<i>Conyza bonariensis</i>	L and f	150	1:30 – 1:45	0,5	6
<i>Pluchea sagittalis</i>	L and f	120 – 150	0:45	0,2 - 0,6	12
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	L and f	150 – 200	0:45 – 1:00	0,9 – 1,6	5
<i>Ocimum selloi</i>	L and f	100 – 120	1:00 – 1:30	1,0 – 1,5	8
<i>Blepharocalyx salicifolia</i>	Leaf	75 – 120	1:00 – 1:30	0,7 – 0,9	13
<i>Acca sellowiana</i>	Leaf	150 – 250	1:30	0,05 – 0,09	34
<i>Eugenia uniflora</i>	Leaf	150 – 200	1:30	0,5	10
<i>Psidium cattleianum</i>	Leaf	200 – 250	1:30	0,18	12
<i>Aloysia gratissima</i>	L and f	150 – 200	1:00 – 1:30	0,5 – 0,7	8
<i>Lippia alba</i>	L and f	100	0:40 – 1:00	2,1 - 2,6	3

^a L and f: leaf and flowers used together.

2.3.2. Chemical composition of essential oils

The chemical analysis of EOs using the GC-MS technique resulted in the identification of the compounds presented on Table 4. This table shows compound family distribution, using the 15 main constituents, expressed as a percentage of the total. All essential oils presented a high proportion of terpenic compounds, except for *C. bonariensis*.

Table 4. Classification of essential oils of the plants studied according to their distribution by compound family.

Plant species ^a	Distribution (%) of compounds per family ^b							Total identified
	MH	MO	MT	SH	SO	ST	O	
<i>Schinus molle</i> L	52	0	52	35	2	37	0	90
<i>Schinus molle</i> Fr	61	25	86	6	0	6	0	92
<i>Achyrocline flaccida</i>	68	1	69	20	0	20	1	90
<i>Baccharis dracunculifolia</i>	32	1	33	19	19	38	0	71
<i>Baccharis trimera</i>	14	48	62	16	10	26	1	89
<i>Conyza bonariensis</i>	17	0	17	5	4	10	60	87
<i>Pluchea sagittalis</i>	16	38	54	2	9	11	3	69
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	27	49	76	0	0	0	0	76
<i>Ocimum selloi</i>	28	12	39	39	0	39	18	97
<i>Blepharocalyx salicifolia</i>	34	53	87	3	1	3	0	90
<i>Acca sellowiana</i>	1	18	19	18	14	32	20	70
<i>Eugenia uniflora</i>	1	0	1	18	55	73	0	74
<i>Psidium cattleianum</i>	29	5	35	22	14	35	4	74
<i>Aloysia gratissima</i>	14	6	20	23	3	27	8	54
<i>Lippia alba</i>	1	84	84	9	0	9	0	93

^aL: essential oil extracted from leaves, Fr: essential oils extracted from fruits.

^b MH: Monoterpene hydrocarbons, MO: Oxygenated monoterpenes, MT: Total monoterpenes, SH: Sesquiterpenes hydrocarbons, SO: Oxygenated sesquiterpenes, ST: Total sesquiterpenes, O: other compounds, Total: total percentage of the 15 compounds with the most relative abundance in each essential oil.

Essential oils from *S. molle* (L and Fr), *A. flaccida*, *B. trimera*, *P. sagittalis*, *Ch. ambrosioides*, *B. salicifolia* and *L. alba* were composed mainly of monoterpenes. However, the first three essential oils had a large percentage of monoterpene hydrocarbons (limonene and α -pinene) and the rest presented mostly oxygenated monoterpenes (carquejyl acetate, linalool, ascaridol, 1.8-cineole). On the other hand, *E. uniflora* essential oil presented a high concentration of sesquiterpenes, especially oxygenated sesquiterpenes (germacrone, curzerene, espatulenol). The essential oils of *B. dracunculifolia*, *O. selloi*, *P. cattleianum* and *A. gratissima* presented a balanced distribution of mono and sesquiterpenes, but they can be grouped as having a majority of terpenic hydrocarbons.

Table 5 details the six main compounds of every EO. High levels of linalool (66.8 %, *L. alba*), of methyl (*Z*)-dec-2-en-4,6-dioate (59.5 %, *C. bonariensis*), of carquejyl acetate (47.8 % *B. trimera*) and of α -pinene (53.7 %, *A. flaccida*) stood out. Limonene, mircene, α - and β -pinene and (*E*)-caryophyllene were found in most of the studied species (11 out of 15). These compounds were considered majority compounds in most of the EOs such as *S. molle* H, *S. molle* Fr, *A. flaccida*, *B. dracunculifolia* and *P. cattleianum*.

Table 5. Six main chemical compounds from each essential oil analysed presenting the highest percentages.

Plant material	main compounds percentage					
<i>S. molle</i> H	α -pinene (19.2)	limonene (16.6)	β -pinene (15.5)	α -murolol (12.0)	γ -cadinene (8.1)	allo-aromadendrene (8.0)
<i>S. molle</i> Fr	limonene (24.8)	terpinen-4-ol (20.7)	sabinene (10.8)	α -pinene (7.4)	γ -terpinene (5.6)	α -terpinene (4.0)
<i>A. flaccida</i>	α -pinene (53.7)	(E)-caryophyllene (13.5)	limonene (6.1)	α -humulene (4.4)	(Z)- β -ocimene (4.1)	β -pinene (2.4)
<i>B. dracunculifolia</i>	β -pinene (11.8)	limonene (11.5)	(E)-nerolidol (9.9)	espatulenol (9.8)	α -pinene (7.5)	viridiflorol (7.1)
<i>B. trimera</i>	Carquejyl acetate (47.8)	β -pinene (9.1)	palustrol (7.3)	β -felandrene (6.2)	(E)- β -ocimene (4.0)	viridiflorol (3.9)
<i>C. bonariensis</i>	methyl (Z)-dec-2-en-4,6-dinoate (59.5)	limonene (12.6)	(Z)- β -farnesene (2.3)	espatulenol (2.1)	β -caryophyllene oxide (1.9)	β -pinene (1.7)
<i>P. sagittalis</i>	1,8-cineole (27.4)	β -pinene (7.8)	espatulenol (6.4)	α -terpineol (4.6)	terpinen-4-ol (3.8)	sabinene (3.8)
<i>Ch. ambrosioides</i>	ascaridol (24.8)	α -terpinene (10.7)	limonene (10.0)	(E)-p-menta-2,8-dien-1-ol (7.7)	(Z)-p-menta-1(7),8-dien-2-ol (5.0)	(E)-p-menta-1(7),8-dien-2-ol (4.9)
<i>O. selloi</i>	(Z)- β -ocimene (23.1)	metil eugenol (18.2)	elemecine (17.2)	1,8-cineol (10.8)	biciclogermacrene (6.8)	(E)-caryophyllene (6.1)
<i>B. salicifolia</i>	linalool (26.1)	1,8-cineol (22.0)	α -pinene (14.0)	β -pinene (6.6)	γ -terpinene (3.9)	terpinen-4-ol (3.8)
<i>A. sellowiana</i>	linalool (14.7)	3-octanone (14.5)	espatulenol (13.3)	(Z)- γ -bisabolene (8.5)	α -cadinene (3.6)	β -elemene (3.5)
<i>E. uniflora</i>	germacrone (27.5)	curzerene (12.9)	espatulenol (7.8)	germacrene B (7.2)	germacrene D (4.5)	δ -cadinene (2.6)
<i>P. cattleianum</i>	(E)-cariofilene (16.4)	α -pinene (10.1)	(Z)- β -ocimene (6.4)	β -caryophyllene (6.1)	linalool (5.4)	mircene (4.6)
<i>A. gratissima</i>	sabinene (8.4)	α -chamingrene (7.5)	acetate (Z)-crisantenilo (5.6)	germacrene D (5.1)	(Z)-crisantenol (5.0)	espatulenol (3.4)
<i>L. alba</i>	linalool (66.8)	(E)-dihydrocarvone (8.6)	(Z)-dihydrocarvone (5.2)	germacrene B (3.5)	1,8-cineol (3.3)	germacrene D (2.1)

2.3.3. Bioassays

2.3.3.1. Volatile Phase Test

In order to simplify the interpretation of the results obtained from essential oil effect on *G. citricarpa*, they were separated arbitrarily into three groups according to the statistical analysis: EOs with high inhibition were grouped together, the ones with low inhibition were grouped in a second group and finally the rest were put in a third group. Five days after evaluation, the group with high inhibitory effect (equivalent to 100 %) included the EOs of *Ch. ambrosioides*, *L. alba*, *B. salicifolia*, *P. sagittalis*, *B. trimera*, *A. gratissima* and *A. sellowiana*. The group with low inhibitory effect was comprised by EOs of *O. selloi*, *P. cattleianum*, *A. flaccida* and *E. uniflora*, and the rest of the EOs were grouped together in an intermediate inhibition group (Table 6).

The inhibitory effect of the oils of four of the superior group (*A. sellowiana*, *B. salicifolia*, *L. alba* and *A. gratissima*) declined significantly during 15 days (Figure 1). The EOs of *P. sagittalis* and *B. trimera* kept their inhibitory effect for 20 days, together with *Ch. ambrosioides* which maintained its complete inhibitory effect (100 %) for 40 days. Pathogen viability loss was confirmed in this last case.

Table 6. Essential oil (1000 ppm) inhibition percentage on *Guignardia citricarpa* mycelial growth at different times of evaluation.

Treatment	Inhibition (%) on <i>Guignardia citricarpa</i> growth ^{*a}							
	Volatile Phase Test – Times of evaluation (days)							
	5	10	15	20	25	30	35	40
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
<i>Lippia alba</i>	100 a	100 a	88 a	44 bcde	29 cdef	17 cd	8 d	3 c
<i>Blepharocalyx salicifolia</i>	100 a	97 ab	79 ab	43 bcde	16 ef	2 d	0 d	0 c
<i>Pluchea sagittalis</i>	99 ab	94 ab	85 ab	74 ab	65 b	51 b	41 b	37 b
<i>Baccharis trimera</i>	99 ab	92 ab	83 ab	68 abc	56 bc	38 bc	17 bcd	6 c
<i>Aloysia gratissima</i>	95 abc	86 ab	74 abc	60 bcd	48 bcd	37 bc	26 bcd	18 bc
<i>Acca sellowiana</i>	97 ab	76 bc	58 bcd	35 cdef	26 cdef	19 cd	12 cd	11 c
<i>Conyza bonariensis</i>	72 cde	57 cd	47 cde	35 cdef	32 cdef	28 cd	26 bcd	23 bc
<i>Schinus molle</i> Fr	75 bcd	57 cd	41 de	34 def	27 cdef	19 cd	13 cd	10 c
<i>Baccharis dracunculifolia</i>	51 ef	38 de	29 ef	20 ef	20 def	17 cd	12 cd	10 c
<i>Schinus molle</i> H	54 def	34 de	23 ef	16 ef	11 ef	6 d	3 d	0 c
<i>Achyrocline flaccida</i>	44 fg	25 ef	20 ef	18 ef	14 ef	8 d	4 d	3 c
<i>Ocimum selloi</i>	38 fg	31 e	32 de	31 def	37 bcd	38 bc	37 bc	36 b
<i>Psidium cattleianum</i>	26 g	29 e	32 de	28 def	29 cdef	27 bcd	23 bcd	21 bc
<i>Eugenia uniflora</i>	0 g	0 f	0 f	0 f	0 f	0 d	0 d	0 c
CV (%)	18.4	22.1	30.0	46.2	52.6	57.3	71.8	76.4

* LS-means: The same letter in each column does not differ significantly. Tukey test, P<0.05.
^a compared against the Control = 0 % inhibition.

In the low inhibitory effect group, EO of *E. uniflora* had a stimulating effect of fungal growth, maintaining statistical difference during 10 days (Figure 1). EO of *O. selloi* behavior also stood out, it maintained its inhibition level during the entire evaluation, reducing mycelial growth, and remaining significantly below the control treatment together with *P. sagittalis* and *C. bonariensis*. The behavior of *O. selloi* essential oil may be easily visualized in the mycelial growth curve.

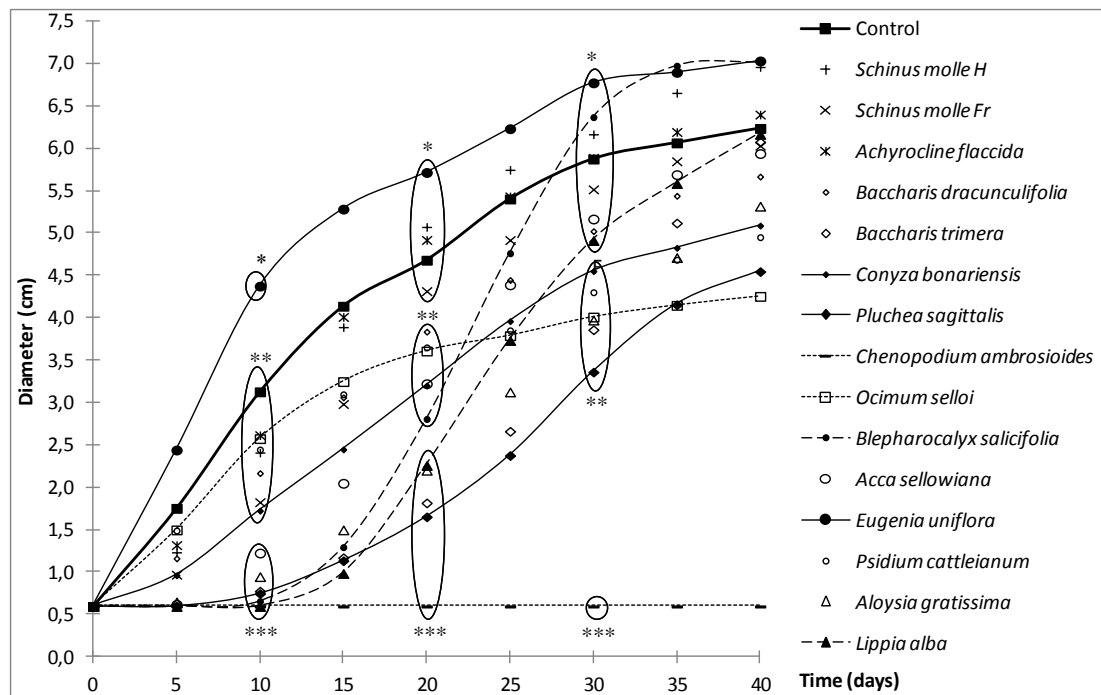


Figure 1. Effect of essential oils on *Guignardia citricarpa* mycelial growth, Volatile Phase Test.

LS-means: the same amount of * in the same date does not differ significantly (grouped in ovals), Tukey Test, $P < 0,05$.

2.3.3.2. Agar Dilution Test

A statistical separation was also possible with the results obtained from EO inhibitory effects on *G. citricarpa* using this assay. As with the previous test, three different groups were formed. However, EO groups changed significantly with respect to the Volatile Phase Test. In the 5 initial days, *O. selloi* and *E. uniflora* integrated the high inhibition group together with *A. sellowiana*, *B. trimera*, *P. sagittalis*, *A. grattisima* and *B. dracunculifolia* (Table 7).

In the 10 initial days, only the first four essential oils remained in this group and from day 15 to the end of the evaluation (30 days) only two essential oils remained with statistically high inhibition levels, *O. selloi* and *A. sellowiana* (Figure 2). *Ch. ambrosioides*, *L. alba* and *B. salicifolia* essential oils did not present significant inhibition levels (40-50 %) during the assay and losing their inhibitory effect completely after 10 days, *G. citricarpa* growth was the same as or had increased compared to the control,.

Comparing both tests, the essential oils that were diluted in agar showed a rapid loss of inhibitory activity. *C. bonariensis* essential oil had an inhibitory effect on *G. citricarpa* reproduction, presenting 100 % inhibition on sporulation in the Volatile Phase Test and 96 % inhibition in the Agar Dilution Method.

Table 7. Essential oil (1000 ppm) inhibition percentage on *Guignardia citricarpa* mycelial growth in different times of evaluation.

Treatment	Inhibition (%) on <i>G. citricarpa</i> growth ^{* a}					
	Agar Dilution Test – Times of evaluation (days)					
	5	10	15	20	25	30
<i>Ocimum selloi</i>	96 a	88 a	76 a	65 a	61 a	56 a
<i>Acca sellowiana</i>	94 ab	78 ab	71 ab	62 a	54 ab	46 a
<i>Eugenia uniflora</i>	91 ab	75 abc	50 c	29 bc	18 cd	8 bc
<i>Baccharis trimera</i>	92 ab	70 abcd	45 c	15 cd	1 e	1 c
<i>Pluchea sagittalis</i>	83 ab	65 bcd	49 c	15 cd	2 e	0 c
<i>Aloysia gratissima</i>	81 ab	37 e	7 d	0 d	0 e	0 c
<i>Baccharis dracunculifolia</i>	76 ab	60 cd	48 c	37 bc	24 cd	10 bc
<i>Conyza bonariensis</i>	74 b	55 de	54 bc	47 ab	37 bc	26 b
<i>Lippia alba</i>	40 c	14 f	5 d	6 d	5 de	4 c
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	53 c	12 f	4 d	1 d	0 e	0 c
<i>Blepharocalyx salicifolia</i>	43 c	12 f	5 d	3 d	1 e	0 c
<i>Psidium cattleianum</i>	39 c	6 f	1 d	0 d	0 e	0 c
<i>Schinus molle</i> Fr	10 d	0 f	0 d	0 d	0 e	0 c
<i>Schinus molle</i> H	5 d	0 f	0 d	0 d	0 e	0 c
<i>Achyrocline flaccida</i>	0 d	0 f	0 d	0 d	0 e	0 c
CV (%)	17.0	24.0	36.1	61.1	74.4	93.8

*LS-means: The same letter in each column does not differ significantly. Tukey test. P<0,05.
^a compared against the Control = 0 % inhibition.

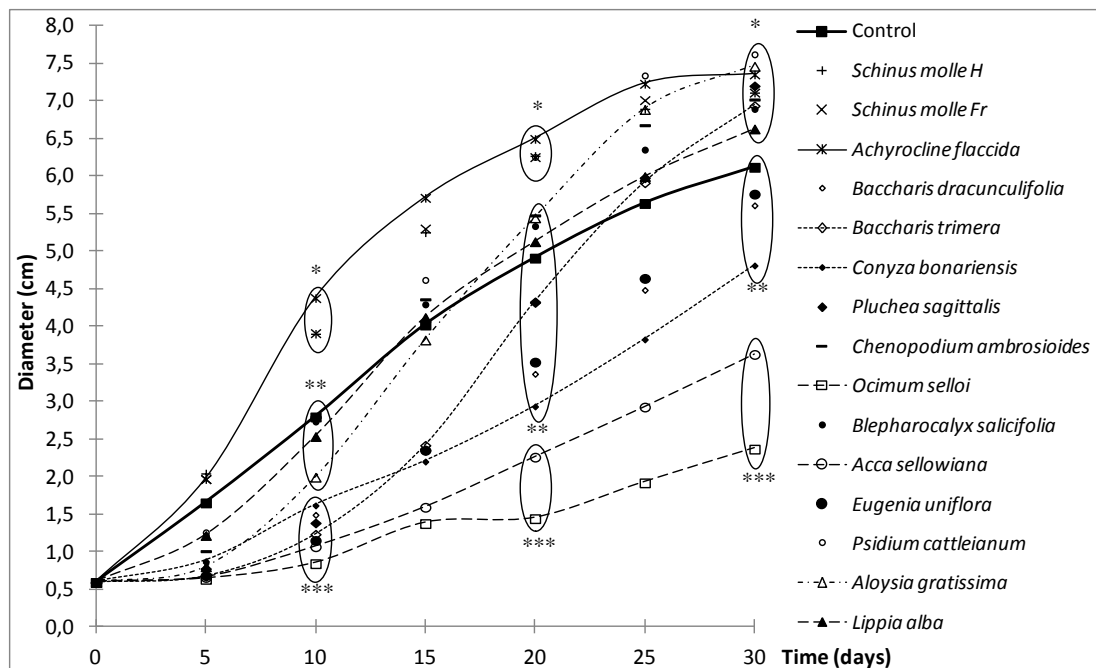


Figure 2. Effect of the essential oils on *Guignardia citricarpa* mycelial growth by Agar Dilution Method.

LS-means: same amount of * in the same date does not differ significantly (grouped in ovals), Tukey test, $P < 0,05$.

2.4. DISCUSSION

The EOs studied showed different degrees of inhibition. The analysis of the chemical composition shows that those that produced a greater inhibition showed a high proportion of one or a few other compounds, which may be responsible for the inhibition. For example, *C. ambrosioides* essential oil volatile compounds presented fungicidal action and were able to eliminate the pathogen, and ascaridol was found among its major compounds. Jardim *et al.* (2008) identified ascaridol as a major fungicidal component of *C. ambrosioides* EO. Nonetheless, a synergistic effect, involving α -terpinene,

limonene and/or (E)/(Z)-p-menta-1(7),8-dien-2-ol and (E)/(Z)-p-menta-2,8-dien-1-ol could also explain the results.

The essential oils of *L. alba*, *B. salicifolia*, *P. sagittalis*, *B. trimera*, *A. gratissima* and *A. sellowiana* presented high inhibitory levels, but for a limited period of time only, thus resulting in a fugistatic effect. With the exception of *B. trimera* and *A. gratissima*, these essential oils contained high percentages of linalool and/or 1,8-cineole, possibly the agents responsible for the oil's bioactivity. Barrera Necha and García Barrera (2008), studied different concentrations of linalool on *Fusarium* sp. and obtained no mycelial growth with doses of 200 µl/ml and higher. In addition, it is known that 1,8-cineole reduces cell division, inhibits mitochondrial respiration, oxidative phosphorylation and DNA synthesis (Montes Belmont, 2009). In fact, the synergistic effect of terpinen-4-ol present in the EOs of *P. sagittalis* and *B. salicifolia* cannot be ruled out. Terpinen-4-ol and 1,8-cineole, were identified as active components of *Melaleuca alternifolia* essential oil, from which a phytopharmaceutical substance with antimycotic and antibacterial properties is obtained (Mesa Arango *et al.*, 2004).

On the other hand, carquejyl acetate was found to be a chemical marker of *B. trimera* essential oil, this component has antibacterial and antifungal activity (Simões Pires *et al.*, 2005). It has also been reported that the biological properties of essential oils are determined by their major compound (Bakkali *et al.*, 2008). However, attributing this to only one isolated

compound can be inaccurate since there are possible interactions between the compounds (Atti dos Santos *et al.*, 2010).

According to Antunes and Cavaco (2010), EOs or their individual components may have fungistatic or fungicidal effects, depending on the concentration used. This could be the case of *A. sellowiana* essential oil which had antifungal activity in both methods but did not have high percentages of any of the main compounds, this could be explained because it has a mixture of compounds. Saj *et al.* (2008) reported that *A. sellowiana* essential oil had a broad spectrum of antibacterial and antifungal activity. However, the major compounds found by these researchers were limonene (29 %), β -caryophyllene (27 %), α -pinene (8.7 %), β -pinene (3 %), none of which were found in the present work.

The essential oils of *A. flaccida*, *O. selloi* and *P. cattleianum* did not produce statistically significant inhibition on *G. citricarpa* in the initial stage of the evaluation. The major compound groups that these EOs have in common are α -pinene, (*E*)-caryophyllene and (*Z*)- β -ocimene. *S. molle* (L and Fr) and *B. dracunculifolia* essential oils did not have a significant inhibitory effect either, as expected from their high levels of limonene. Atti dos Santos *et al.* (2010) found that *S. molle* had fungicidal effect on *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Collethotricum* spp. and *Botrytis* spp, and the major compounds were α -pinene and sabinene. In spite of this, when these compounds were found in lower proportion and mixed with other major compounds such as carquejyl acetate, 1,8-cineole, linalool and ascaridol, results obtained from this study

showed high inhibitory effects on *G. citricarpa*. It must also be noted that EOs are complex mixtures of numerous molecules and their biological effects may be a result of synergy among these molecules or among major compounds or possibly the action of the main molecules modulated by lesser significant molecules (Bakkali *et al.* 2008).

Volatile compounds (VFT) of *E. uniflora* essential oils and diffusing compounds (PFT) of *S. molle* (H and Fr) and *A. flaccida* essential oils revealed a stimulating effect of *G. citricarpa* mycelial growth compared with the control treatment. Montes Belmont *et al.* (2000) mention that some fungi may be inhibited or stimulated by exogenous factors, such as some plant extracts. Also, one essential oil may produce two kinds of response on *G. citricarpa*, such as the essential oils of *E. uniflora* and *O. selloi*.

A possible explanation could be given by the fact that the responses obtained from each essential oil depends on the behavior of the chemical components that better volatilize or diffuse. Brun and Mossi (2010) highlight *E. uniflora* essential oil antimicrobial activity when using the paper disc diffusion method. Antimicrobial activity has also been reported for *O. selloi* essential oil using the agar diffusion method (Nascimento *et al.* 2011) and the major compounds reported were eugenol, 1,8 cineole, (*E*)-caryophyllene and linalool, coinciding with the compounds found in the present study, although they were found in different proportions. Silva and Fernandes Júnior (2010) and Montes Belmont (2009) mention that eugenol is a strong inhibitor of

enzymatic processes, due to its lipophilic character and free phenolic groups, which produce cell wall degradation and cell lysis.

The inhibitory action of *Ch. ambrosioides*, *L. alba* and *B. salicifolia* essential oils diluted in agar was low, demonstrating that the volatile compounds are the ones that have fungicidal or fungistatic effect. Fialho *et al.* (2010) confirm that the susceptibility of the pathogen may vary according to the chemical nature and mode of action of the antimicrobial component, hence volatile components may have antifungal action and diffusing components may not. Also, the insoluble nature of oils poses a constraint to using liquid media to study antimicrobial activity (Rios *et al.*, 1988).

C. bonariensis essential oil presented a strong negative effect on fungal sporulation. The mechanism by which essential oils interrupt the fungal vegetative and reproductive phase is still unknown (Antunes and Cavaco, 2010). Furthermore, certain EOs may produce fungal morphological changes or prevent different processes within fungal disease cycles (Montes Belmont *et al.*, 2000). *C. bonariensis* EO analysis revealed a non terpenic main compound (methyl (*Z*)-dec-2-en-4.6-dienoate), which represented almost 60 % of the oil's total composition, this suggests that this compound may be the main agent responsible for the anti-sporulating activity. Variations in major groups and their proportions have been observed when comparing the composition of oils from different origins (Manzano Santana *et al.*, 2011; Castañeda *et al.*, 2007).

The present study demonstrates that EOs from native plants have potential for citrus black spot biocontrol. The high *in vitro* antifungal action on *G. citricarpa* of *L. alba*, *B. salicifolia*, *P. sagittalis*, *B. trimera* and *A. gratissima* EO volatile compounds and contact action of *O. selloi*, *A. sellowiana*, *P. sagittalis* and *B. trimera* EO compounds stand out. In addition to this, volatile compounds of *Ch. ambrosioides* essential oil present fungicidal activity and *C. bonariensis* essential oil inhibited fungal reproduction.

The differences existing in composition and/or compound percentages of the essential oils studied in this work raises the question of which molecules are responsible for the inhibitory activity of essential oils. However, the results obtained in the present study represent a significant progress since fungicidal, fungistatic and/or anti-sporulating effects on *G. citricarpa* have been demonstrated.

2.5. CONCLUSIONS

The EOs of the species studied in this work, or their active components should be considered as an alternative to postharvest chemical control. It is essential to continue research, performing *in vivo* tests on fruits and assess doses and formulations of the most promising EOs in order to develop effective and safe disease control alternatives.

2.6. REFERENCES

Abad, M.J., Ansuategui, M., Bermejo, P., 2007. Active antifungal substances from natural sources. ARKIVOC. 7, 116-145.

- Adams, R.P., 2001. Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy, 4th ed. Allured, IL.
- Adorjan, B., Buchbauer, G., 2010. Biological properties of essential oils: an updated review. *Flav. Fragr. J.* 25, 407-426
- Alonso, E., Bassagoda, M.J., Ferreira, F., 2008. Yuyos. Uso racional de las plantas medicinales. 2^a Edición. Editorial Fin de Siglo, Montevideo.
- Antunes, M.D.C., Cavaco, A.M., 2010. The use of essential oils for postharvest decay control. A review. *Flav. Fragr. J.* 25, 351-366.
- Arrillaga de Maffei, B., 1997. Plantas usadas en la medicina natural. Hemisferio Sur. Montevideo.
- Arrillaga de Maffei, B., 1969. Plantas Medicinales. Nuestra Tierra, Montevideo.
- Atti dos Santos, A.C., Rossato, M., Atti Serafini, L., Bueno, M., Crippa, L.B., Sartori, V.C., Dellacassa, E., Moyna, P., 2010. Efeito fungicida dos óleos essenciais de *Schinus molle* L. e *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, do Rio Grande do Sul. *Rev. Bras. Farmacogn.* 20, 154-159.
- Baayen, R.P., Bonants, P.J.M., Verkley, G., Carrol, G.C., van Der Aa, H.A., de Weerd, M., van Brouwershaven, I.R., Schutte, G.C., Maccheroni, W., Glienke de Blanco, C., Azevedo, J.L., 2002. Nonpathogenic isolates of Citrus Black Spot Fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). *Phytopathology.* 92, 464-477.

- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol.* 46, 446-475.
- Barbosa, L.C.A., Teixeira, R.R., Montanari, R.M., 2008. Phytotoxic natural products as models for the development of crop protection agents. In: Epifano, F. (Ed.). *Current trends in phytochemistry*, Research Signpost, Kerala, pp. 21-59.
- Barrera Necha, L.L., García Barrera, L.J., 2008. Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium* sp. aislado de papaya (*Carica papaya*). *Rev. UDO Agr.* 8, 33-41.
- Brun, G.R., Mossi, A.J., 2010. Caracterização química e atividade antimicrobiana do óleo volátil de pitanga (*Eugenia uniflora*). *Perspectiva Erechim* 34, 135-142.
- Castañeda, M.L., Muñoz, A., Martínez, J.R., Stashenko, E., 2007. Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas colombianas. *Sci. Tec.* 13, 165-166.
- Ciccio, J.F., Ocampo, R., 2010. Distribución biogeográfica de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. Ex Britton & Wilson y quimiotipos en América y el Caribe. In: Dellacassa, E. (Ed.), *Normalización de Productos Naturales Obtenidos de Especies de la Flora Aromática Latinoamericana*, EdiPucrs, Porto Alegre, pp. 107-130.

- Coelho de Souza, G., Haas, A.P.S., von Poser, G.L., Schapoval, E.E.S., Elisabetsky, E., 2004. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 90, 135-143.
- Davies, P., 2004. Fichas técnicas de cultivo. In: Davies, P. (Ed.), *Estudios de domesticación y cultivo de especies medicinales y aromáticas nativas*. INIA Serie FPTA-INIA, Montevideo. pp. 37-120.
- Dellacassa, E., Lorenzo, D., Paz, D., 2004. Procesos de extracción aplicados a la obtención de productos aromáticos de origen vegetal. In: Davies, P. (Ed.), *Estudio en domesticación y cultivo de especies medicinales y aromáticas nativas*. INIA Serie FPTA-INIA, Montevideo. pp. 155-160.
- De Souza, E.L., Lima, E.O., Freire, K.R.L., de Souza, C.P., 2005. Inhibitory acción of some essential oils and phytochemicals on the growth of various moulds isolated from foods. *Brazilian Archives of Biology and Technology.* 48, 245 - 250.
- De Souza Prestes, C.L., Damé Schuch, L.F., Hörnke Alves, G., Ziemann dos Santos, M.A., Alves Rodrigues, M.R., Araújo Meireles, M.C., 2011. Evaluación de la actividad bactericida de aceites esenciales de hojas de guayabo, pitango y arazá. *Rev. Med. Cub.* 16, 324-330.
- Díaz Dellavalle, P., Cabrera, A., Alem, D., Larrañaga, P., Ferreira, F., Della Rizza, M., 2011. Antifungal activity of medicinal plant extracts against phytopathogenic fungus *Alternaria* spp. *Chilean Journal of Agricultural Research.* 71, 231-239.

- Edris, E.A., 2007. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytother. Res.* 21, 308-323.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2013. EPPO Standards. EPPO A1 and A2 lists of pest recommended for regulation as quarantine pests. PM 1/2 (22). <http://archives.eppo.int/>, read junio 2014.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2009. PM 7/17 (2): *Guignardia citricarpa*. OEPP/EPPO Bulletin 39, 318-327.
- Fialho, M.B., Toffano, L., Pozzobon Pedroso, M., Augusto, F., Pascholati, S.F., 2010. Volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* inhibit the in vitro development of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. *World J. Microb. Biotech.* 26, 925-932.
- Grover, R.K., Moore, D., 1962. Toximetric studies of fungicides against the brown rot organisms *Sclerotinia fruticola* and *S. laxa*. *Phytopathol.* 52, 876-880.
- Handa, S.S., 2008. An overview of extraction techniques for medicinal and aromatic plant. In: Handa, S.S., Singh Khanuja, S.P., Longo, G., Rakesh, D.D. (Eds.), *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants*. ICS-UNIDO, Trieste, pp. 21 - 54.
- Hidalgo Góngora, E.I., Pérez Vicente. L., 2010. Diferenciación morfológica, cultural y biológica de *Guignardia citricarpa* y *G. mangiferae* en frutos cítricos de Cuba. *Fitosanidad.* 14, 141-152.

- Hyltdgaard, M., Mygind, T., Meyer, R.L., 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front. Microbiol.* 3, 1-24.
- Jaramillo, B.E., Duarte, E., Delgado, W., 2012., Bioactividad del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* colombiano. *Rev. Cub. Plant. Med.* 17: 54-64.
- Jardim, C.M., Jham G.N., Dhingra O.D., Freire M.M., 2008. Composition and antifungal activity of the essential oil of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. *J. Chem. Ecol.* 34, 1213-1218.
- Kováts, E., 1958. Gas chromatographic characterization of organic compounds. Part 1: retention indices aliphatic halides, alcohols, aldehydes and ketones. *Helv. Chim. Acta* 41, 1915-1932.
- Kotzé, J.M., 2000. Black Spot. In: Garnsey, S.M., Graham J.H., Timmer, L.W. (Eds), *Compendium of citrus diseases*. The American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN, USA, pp. 23-25.
- Manzano Santana, P., Miranda, M., Gutiérrez, Y., García, G., Orellana, Y., Orellana-Manzano, A., 2011. Efecto antiinflamatorio y antimicótico del extracto alcohólico y composición química del aceite de hojas de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (canilla de venado). *Rev. Cub. Plant. Med.* 16, 13-23.
- Marin, R., Apel, M.A., Limberger, R.P., Raseira, M.C.B., Pereira, J.F.M., Zuanazzi, J.Â.S., Henriques, A.T., 2008. Volatile components and

- antioxidant activity from some myrtaceous fruits cultivated in Southern Brazil. *Latin Am. J. Pharm.* 27, 172-177.
- McLafferty, F.W., Stauffer, D.B., 1991. *The Wiley/NBS registry of mass spectral data*. 5th ed. Wiley and Sons, New York.
- Mesa Arango, A.C., Bueno Sánchez, J.G., Betancur Galvis, L.A., 2004. Revisión. Productos naturales con actividad antimicótica. *Rev. Esp. Quimioterap.* 17, 325-331.
- Montes Belmont, R., 2009. Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. *Rev. Mex. Micol.* 29, 73-82.
- Montes Belmont, R., Cruz Cruz, V., Martínez Martínez, G., Sandoval García, G., García Licona, R., Zilch Domínguez, S., Bravo Luna, L., Bermúdez Torres, K., Flores Moctezuma, H.E., Carvajal Moreno, M., 2000. Propiedades antifúngicas en plantas superiores. Análisis retrospectivo de investigaciones. *Rev. Mex. Fitopatol.* 18, 125-131.
- Morais, L.A.S., 2009a. Óleos essenciais no controle fitossanitário. In: Bettiol, W., Morandi, M.A.B. (Eds.), *Biocontrol de doenças de plantas: uso e perspectivas*, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP, pp. 139-152.
- Morais, L.A.S., 2009b. Influência dos factores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *Hort. Bras.* 27, S4050-S4063.
- Nascimento, J.C., Barbosa, L.C.A., Vanderlucia, F.P., David, J.M., Fontana, R., Silva, L.A.M., França, R.S., 2011. Chemical composition and

- antimicrobial activity of essential oils *Ocimum canum* Sims. and *Ocimum selloi* Benth. An. Acad. Bras. Cienc. 83, 1 - 7.
- Pauli, A., Schilcher H., 2007. *In vitro* antimicrobial activities of essential oils monographed in the European Pharmacopoeia 6th Edition. In: Schwalber, R., Steele-Moore, L., Goodwin, A.C., (Eds.), Antimicrobial susceptibility testing protocols. CRC Press, Florida, pp. 353 - 547.
- Possiede, Y.M., Garbardo, J., Kava-Cordeiro, V., Galli-Terasawa, L.V., Azevedo, J.L., Glienke, C., 2009. Fungicide resistance and genetic variability in plant pathogenic strains of *Guignardia citricarpa*. Braz. J. Microbiol. 40, 308 - 313.
- Rahman, A., Al-Reza, S.M., Kang, S.C., 2011. Antifungal activity of essential oil and extracts of *Piper chaba* Hunter against phytopathogenic fungi. J. Am. Oil Chem. Soc. 88, 573 - 579.
- Rios, J.L., Recio, M.C., Villar, A., 1988. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. J. Ethnopharmacol. 23, 127 - 149.
- Saj, O.P., Roy, R.K., Savitha, S.V., 2008. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oil of *Feijoa sellowiana* O. Berg. (pineapple guava). J. Pure Appl. Microbiol. 2, 227-230
- Shaaban, H.A.E., El-Ghorab, A.H., Shibamoto, T., 2012. Bioactivity of essential oils and their volatile aroma componenets: Review. J. Essent. Oil Res. 24, 203-212.

- Silva, N.C.C., Fernandes Júnior, A., 2010. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. Review Article. *J. Venom. Anim. Toxins* 16, 402-413.
- Simões-Pires, C.A., Debenedetti, S., Spegazzini, E., Mentz, L.A., Matzenbacher, N.I., Limberger, R.P., Henrique, A.T., 2005. Investigation of the essential oil from eight species of *Baccharis* belonging to sect. *Caulopterae* (Asteraceae, Astereae): a taxonomic approach. *Plant Syst. Evol.* 253, 23-32.
- Souza, E.L., Lima, E.O., Freire, K.R.L., Sousa, C.P., 2005. Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of various moulds isolated from foods. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 48, 245-250.
- Stashenko, E., 2010. Estudio comparativo de la composición y la actividad biológica de aceites esenciales de *Lippia alba*, de diferentes regiones de Colombia. In: Dellacassa, E. (Ed.), *Normalización de Productos Naturales Obtenidos de Especies de la Flora Aromática Latinoamericana*, EdiPucrs (Proyecto CYTED IV.20), Porto Alegre, pp. 173-193.
- Stashenko, E.E., Jaramillo, B.E., Martínez, J.R., 2003. Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la Familia Verbenaceae. *Rev. Acad. Col. Cien.* 27, 579-598.
- Stat Analysis System Institute Inc., 2008. *SAS/STAT 9.2 Users Guide*. SAS Institute Inc., Cary, North Caroline, USA.

- Stefanello, M.E.A., Pascoal, A.C.R.F., Salvador, M.J., 2011. Essential oils from neotropical Myrtaceae: chemical diversity and biological properties. Review. Chem. Biodiv. 8, 73-94.
- Tabassum, N., Vidyasagar, G.M., 2013. Antifungal investigations on plant essential oils. A review. International J. Pharm. Pharmaceut. Sci. 5, 19-28.
- Vituro C, Bandoni A, Dellacassa E, Atti Serafini L, Elder H. 2010. Problemática *Schinus* en Latinoamérica. En: Dellacassa, E. [Ed.] Normalización de productos naturales obtenidos de especies de la flora aromática Latinoamericana. Porto Alegre: EdiPucrs. pp. 205-280.
- Vivot Lupi, E.P., Sánchez Brizuela, C.I., Cacik Jeifetz, F., Sequin Acosta, C.J., 2009. Tamizaje de la actividad antifúngica de extractos de especies de la flora de Entre Ríos. Rev. Cubana Farm. 43, 74-84.
- Voon, H.C., Bhat, R., Rusul, G., 2012. Flower extracts and their essential oils as potential antimicrobial agents for food uses and pharmaceutical applications. Comprehensive Rev. Food Sci. Food F. 11, 34-55.
- Weston, R.J., 2010. Bioactive products from fruit of the feijoa (*Feijoa sellowiana*, Myrtaceae): A review. Food Chem. 121, 923-926.
- Zapata, B., Durán, C., Stashenko, E., Betancur-Galvis, L., Mesa-Arango, A.C., 2010. Actividad antimicótica y citotóxica de aceites esenciales de plantas de la familia *Asteraceae*. Rev. Iberoam. Micol. 27, 101-103.

**3. CONTROL DE CEPAS DE *Penicillium digitatum* RESISTENTES A
IMAZALIL UTILIZANDO ACEITES ESENCIALES ***

Pamela Lombardo¹, Eduardo Dellacassa², Elena Pérez Faggiani^{3*}

¹*Departamento de Protección Vegetal, Facultad de Agronomía, Regional Norte Salto, Udelar.* ²*Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales, Facultad de Química, Udelar.* ³*Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Estación Experimental Salto Grande. Camino El Terrible s/n, Salto, Uruguay. E-mail: elenaperez@inia.org.uy*

*Artículo escrito bajo el formato de la revista Agrociencia Uruguay.

Resumen

En este trabajo se evaluó la capacidad inhibitoria *in vitro* de los aceites esenciales (AEs) provenientes de plantas autóctonas del Uruguay contra *Penicillium digitatum*, cepa 20 resistente a Imazalil. El análisis de la composición química se realizó mediante Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas. Se evaluó el porcentaje de inhibición de los aceites sobre *P. digitatum* usando el test Fase Volátil a una concentración de 1000 ppm. Se realizó un tamizaje de los aceites por su capacidad inhibitoria por difusión de sus compuestos y se aplicó el método de microdilución en caldo para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria. Los compuestos volátiles de los AEs de *C. bonariensis*, *P. sagitalis*, *Ch. ambrosioides*, *B. salicifolia*, *A. sellowiana*, *E. uniflora* y *L. alba* inhibieron completamente al hongo produciendo un efecto fungicida. Los AEs de *Ch. ambrosioides* y *C. bonariensis* demostraron ser potentes inhibidores de *P. digitatum*, tanto en sus fases volátiles como en dilución, presentando ambos potencial como biofungicidas.

Palabras clave: biofungicidas, fase volátil, *Chenopodium ambrosioides*.

Summary

Control strains of *Penicillium digitatum* resistant to using essential oils Imazalil

The objective of this research was the *in vitro* evaluation of the inhibitory capacity of essential oils from Uruguayan native plants of against *Penicillium digitatum*, imazalil-resistant strain 20. The essential oils used were obtained by hydrodistillation and their chemical compositions were determined by gas chromatography-mass spectrometry. The inhibition of oils at 1000 ppm on *P. digitatum* was evaluated in the Volatile Phase Test . Oils were also screened for inhibition by diffusion in culture media. The broth microdilution method was used to determine the Minimum Inhibitory Concentration. The essential oils of *C. bonariensis*, *P. sagitalis*, *Ch. ambrosioides*, *B. salicifolia*, *A. sellowiana*, *E. uniflora* and *L. alba* completely inhibited the fungus, producing a fungicidal effect. Oils of *Ch. ambrosioides* and *C. bonariensis*, in their volatile and dilution phases, demonstrated potent inhibition of *P. digitatum* both having potential as biofungicides.

Keywords: natural fungicides, volatile phase, *Chenopodium ambrosioides*.

3.1. INTRODUCCIÓN

Una de las causas principales de pérdida de calidad de la fruta cítrica en postcosecha, en todo el mundo, es el moho verde causado por *Penicillium digitatum* (Palou, 2013; Sayago *et al.*, 2012; Franco y Bettioli, 2002). Este patógeno produce esporas que al dispersarse pueden ingresar a la fruta en el campo, en plantas de empaque, en el transporte y en el mercadeo (Palou *et al.*, 2008; Brown y Eckert, 2000).

El control de las enfermedades en postcosecha engloba diferentes prácticas de manejo: evitar heridas durante la cosecha y embalaje, reducir la fuente de inóculo, procurar un ambiente desfavorable al patógeno y proteger los frutos aplicando fungicidas (Brown y Eckert, 2000). Durante muchos años, las enfermedades de postcosecha se han controlado mediante la aplicación de fungicidas de síntesis, tales como imazalil (IMZ), orto-fenil fenato de sodio (SOPP), tiabendazol (TBZ), pirimetanil (PYR), azoxistrobin o fludioxonil (FLUD) (Palou, 2013; Smilanick *et al.*, 2008). Su uso prolongado y continuo ha generado la proliferación de biotipos resistentes comprometiendo la eficacia de los tratamientos (Palou *et al.*, 2008; Kinay *et al.*, 2007).

En Uruguay, entre los años 1970 y 1980, el fungicida TBZ fue sustituido por IMZ, por la alta incidencia de aislamientos resistentes (Lado *et al.*, 2011). Actualmente, el uso continuo del IMZ para el control al *P. digitatum*, en todas las plantas de empaque, ha determinado la generación de cepas resistentes. Las dosis de IMZ han aumentado, hasta llegar al máximo permitido, sin

poder controlar los aislamientos resistentes al mismo (Lado *et al.*, 2013). En la búsqueda de alternativas de control de las cepas resistentes, los mejores resultados se obtuvieron con la combinación de IMZ con PYR o con bicarbonato de sodio (BCS) (Lado *et al.*, 2011). Sin embargo, cuando se evaluó la aplicación de IMZ a alta temperatura (50° C) en combinación, o no, con BCS (3 %), no se logró controlar la cepa resistente (R20), independiente del nivel de residuos en los frutos (Lado *et al.*, 2013).

La preocupación del consumidor sobre la contaminación ambiental y los riesgos para su salud han restringido o cancelado el uso de productos químicos para el control de enfermedades postcosecha (Palou, 2013). A su vez, el uso frecuente de un número reducido de ingredientes activos ha generado resistencia en los patógenos (Lado *et al.*, 2013; Ferraz Laranjeira *et al.*, 2005). Lo que implica la necesidad de encontrar, y aplicar, métodos alternativos a los fungicidas convencionales en los programas de manejo integrado de enfermedades (IDM) para el control del moho verde (Palou, 2013).

Las plantas biosintetizan metabolitos secundarios, que en muchos casos tienen la función de defensa contra microorganismos, insectos y herbívoros predadores (Cowan, 1999). Estos metabolitos son biodegradables, presentan selectividad natural y baja toxicidad, afectando sólo a sus agresores y preservando los organismos útiles (Morais, 2009a; Tripathi *et al.*, 2004). Los aceites esenciales (AEs) son mezclas orgánicas complejas volátiles, producidos en diferentes órganos de las plantas (De

Souza Prestes *et al.*, 2011; Antunes y Cavaco, 2010). La especies vegetales utilizadas para la extracción de aceites mantienen una fuerte interacción con el ambiente el que influencia su composición química y, en consecuencia, los resultados de pruebas biológicas (Morais, 2009a). Los estudios sobre la actividad antimicrobiana de los AEs han mostrado que podrían ser utilizados como alternativas seguras y efectivas a los fungicidas de síntesis para el control de enfermedades (Abad *et al.*, 2007; Antunes y Cavaco, 2010). Sin embargo, la información sobre la actividad de los AEs contra *P. digitatum* es limitada (Rodov *et al.*, 2011).

Considerando estos antecedentes, el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antifúngica *in vitro* de aceites esenciales de plantas nativas uruguayas contra la cepa R20 de *Penicillium digitatum* resistente al Imazalil.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. AEs y composición química

Los AEs se extrajeron por hidrodestilación con trampa tipo Clevenger. Los órganos utilizados fueron hojas (H) y frutos (Fr) por separado de *Schinus molle* (Anacardiaceae); flores de *Achyrocline flaccida*, hojas y flores de *Baccharis dracunculifolia*, *Baccharis trimera*, *Conyza bonariensis* y *Pluchea sagittalis* (Asteraceas), *Chenopodium ambrosioides* (Chenopodiaceae), *Ocimum selloi* (Lamiaceae); hojas de *Blepharocalyx salicifolia*, *Acca sellowiana*, *Eugenia uniflora* y *Psidium cattleianum* (Mirtaceas); hojas y flores

de *Aloysia gratissima* y *Lippia alba* (Verbenaceas). Las muestras fueron colectadas en el Departamento de Salto (31°22' S 57°56' O), Uruguay.

La identificación de los componentes de los AEs se realizó utilizando un cromatógrafo de gases acoplado a GC-MS modelo QP 5050 (Shimadzu Corp., Tokio, Japón) equipado con bases de datos de referencia (Adams, 2001; McLafferty y Stauffer, 1991). Los componentes de los aceites se identificaron por comparación de sus índices de retención lineal (Kováts, 1958) obtenidos en dos columnas, y fueron determinados en relación a una serie homóloga de n-alcanos (C₉-C₂₆), con los correspondientes valores de estándares o reportados en la literatura. También se realizó la comparación de los patrones de fragmentación del espectro de masa con los almacenados en bases propias y comerciales (Adams, 2001; McLafferty y Stauffer, 1991).

3.2.2. Microorganismo fitopatógeno

Se utilizó una cepa local de *Penicillium digitatum* resistente al Imazalil (cepa R20), perteneciente a la colección de hongos de la Micoteca del Laboratorio de Fitopatología de INIA Salto Grande. El patógeno se mantuvo en placas de Petri con medio nutritivo PDA (Difco® Laboratories, France) y se incubó a 25° C, repicándose siete días previos a los bioensayos para disponer de colonias nuevas.

3.2.3. Bioensayos

Se seleccionaron tres pruebas para identificar aquellos componentes de los aceites que probaron actividad antimicrobiana por difusión y por dilución frente a *P. digitatum*. Las metodologías seleccionadas fueron dos cualitativas (test de fase volátil y bioautografía sobre cromatografía de capa fina) y una cuantitativa (microdilución en caldo).

Para evitar que las esporas del patógeno contaminaran las placas a evaluar, se realizó un día antes del test de fase volátil una suspensión de esporas del hongo (10^4 ufc/mL) en PDA esterilizado en estado líquido ($\leq 40^\circ$ C). Se dispensaron 10 mL de la mezcla en placas de Petri, se dejó solidificar y se incubó por 24 h a 25° C. Posteriormente se extrajeron discos de 4 mm con sacabocado esterilizado, para usarse como inóculo.

3.2.3.1. Test de Fase Volátil

Se evaluó la bioactividad de los compuestos volátiles de los AEs mediante el test de fase volátil (VFT, Pauli y Schilcher, 2007). En placas de Petri de 90 mm de diámetro conteniendo 15 mL de medio PDA estéril, se sembró en el centro un disco de *P. digitatum* de 4 mm de diámetro de PDA inoculado 24 h antes con una suspensión del hongo (10^4 ufc/mL). En la cara interna de la tapa de la placa se adhirió un portaobjeto de vidrio estéril donde se pipeteó 85 μ L de AE puro (0,1 % concentración de 1000 ppm). Se procedió de igual forma pero sin colocar AE en el tratamiento control. Inmediatamente, las placas se sellaron con parafilm y se incubaron a 25° C

en la oscuridad en forma invertida. El ensayo se realizó por triplicado y se repitió en dos momentos.

Se efectuaron lecturas de los diámetros de crecimiento de las colonias a los 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 y 18 días, momento en que la placa control no se observó incremento en el crecimiento del hongo. La actividad antifúngica fue evaluada como porcentaje de inhibición del crecimiento micelial mediante la fórmula: $\text{Inhibición (\%)} = [(dC - dT)/dC] * 100$; donde, dC es el diámetro de la colonia control y dT es el diámetro de la colonia tratada.

Cuando se observó inhibición total del crecimiento del hongo se verificó la viabilidad del patógeno. Se extrajo discos de las placas con tratamiento y se los colocó en placas con medio PDA, se incubó a 25 °C por 72 h. Cuando se observó efecto inhibitorio de la esporulación del hongo por acción de algún AE, se evaluó dicho efecto mediante conteo del número de esporas producidas en presencia y ausencia del mismo. Se extrajo discos de 6 mm de micelio de los cuatros cuadrantes de las placas, se colocó en Ependorff con una suspensión de 500 µL de agua destilada estéril con tritón (0.02 %) y se agitó por dos minutos (agitador Thermolyne, Iowa, USA). Se contó mediante cámara de Neubauer el número de esporas, repitiendo la observación cuatro veces por cada disco.

3.2.3.2. Tamizado de los AEs

Se realizó una selección preliminar de los AEs por su bioactividad sobre *P. digitatum*, evaluando la capacidad de difundir sus compuestos inhibidores. Como reservorio de los aceites se utilizaron placas de sílica gel

(Poligram Sil G/UV 254, Germany), que se cortaron en un tamaño de 10 x 10 cm, se marcaron 15 puntos equidistantes y se aplicó 2 μ L de cada AE puro a probar. A cada aceite se lo identificó con un número, en el siguiente orden 1- *S. molle* H, 2- *S. molle* Fr, 3- *A. flaccida*, 4- *B. dracunculifolia*, 5- *B. trimera*, 6- *C. bonariensis*, 7- *P. sagitalis*, 8- *Ch. ambrosioides*, 9- *O. selloi*, 10- *B. salicifolia*, 11- *A. sellowiana*, 12- *E. uniflora*, 13- *P. cattleianum*, 14- *A. grattisima* y 15- *L. alba*. Se colocó cada lámina de sílica gel en una placa de Petri de 15 cm de diámetro y se la cubrió con 10 mL de medio de cultivo PDA estéril inoculado con una suspensión de *P. digitatum* (10^4 ufc/mL). Se sellaron las placas e incubaron a 25 °C, se realizaron las observaciones de los resultados a los 2, 4 y 6 días. Se hicieron tres replicas y se repitió el experimento en dos momentos.

3.2.3.3. Bioautografía sobre cromatografía de capa fina (TLC)

Se aplicó la técnica de bioautografía en capa de agar (Furlán y López, 2007) a los AEs que mostraron inhibición sobre el crecimiento micelial del hongo. Para la cromatografía de capa fina (TLC), se utilizaron tres placas de sílica gel por cada aceite seleccionado y se sembraron 2 μ L del aceite. Se colocaron las tres réplicas de cada aceite en la cámara de corrida utilizando como solventes para la fase móvil hexano-acetato de etilo (9-1). Se reveló una de las placas de cada aceite utilizando sulfato de cobre-ácido fosfórico-agua destilada (10:10:80) y se secó a 400 °C con pistola (GHG 360 DCE, Bosch, Rumania).

Se utilizaron las dos placas restantes por aceite para la bioautografía sobre TLC. En placas de Petri de 15 cm de diámetro se colocaron las placas, junto a un control positivo (C+) y uno negativo (C-). Para el C+ se utilizó AE de ajo y para el C- la mezcla de solvente utilizado en la corrida. Se cubrió todo con 10 mL de medio de cultivo PDA estéril mezclado con una suspensión de esporas de *P. digitatum* (10^4 ufc/mL). Se incubó a 25 °C y se observaron los resultados a las 72 h. Cada ensayo se repitió en dos momentos.

3.2.3.4. Test de Microdilución en caldo.

La metodología de microdilución en caldo para la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (MIC) se basó en el protocolo del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para hongos filamentosos (Espinell-Ingroff y Cantón, 2007; Hadacek y Greger, 2000). Se utilizaron placas de 96 micropocillos estériles de fondo plano a los cuales se les agregó un volumen total de 200 μ L/pocillo. Cada pocillo contenía 100 μ L de medio PDB estéril (Difco® Laboratories, France) con las respectivas concentraciones del AEs a testar y 100 μ L de suspensión de inóculo de la cepa fúngica de *P. digitatum* (10^4 ufc/mL en agua estéril tritonada 0,02 %). En las primeras 10 columnas se colocaron las diferentes concentraciones del aceite utilizado (2000, 1500, 1000, 500, 250, 125, 60, 30, 15 y 7 ppm, μ L/mL). Las primeras cuatro filas (A-D) de cada columna se usaron como replicas del ensayo y las cuatro filas restantes (E-H) no se les agregaron inóculo con el fin de usarlas para restar el efecto de la turbidez ocasionado

por los aceites en mezcla con el medio de cultivo. Se dejaron las últimas dos columnas como controles, conteniendo las primeras cuatro filas PDB inoculado pero sin aceite (control del crecimiento del hongo: C) y las últimas cuatro filas PDB sin inocular y sin aceite (control negativo: C-). La disposición final de las diferentes concentraciones y controles se pueden ver en la Figura 1. Las placas se sellaron con papel parafilm para evitar la evaporación del aceite y el medio de cultivo, se incubó por 10 días a una temperatura de 25° C.

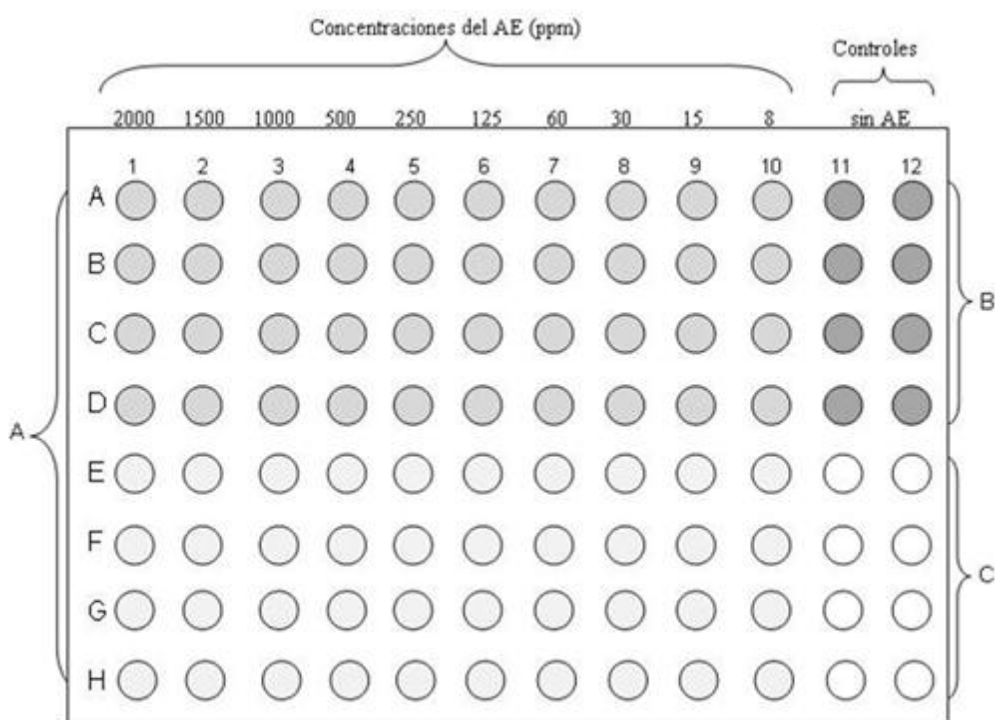


Figura 1: Disposición de las diferentes concentraciones del aceite esencial (AE) y los controles utilizados para realizar la metodología de microdilución en caldo.

A: 96 pocillos con medio de cultivo PDB (100 μ L). **B:** 4 filas superiores (A-D), columnas 1-10: mezcla de 100 μ L de suspensión de *Penicillium digitatum* (10^4 ufc/mL) en agua tritonada (0.01 %) estéril y la concentración del AE testado; columnas 11 y 12: Controles del crecimiento del hongo, sin aceite. **C:** 4 filas inferiores (E-H) con 100 μ L agua tritonada (0.01 %) estéril, sin inóculo, y columnas 11 y 12 Controles negativos (-), sin inóculo y sin aceite.

Las lecturas espectrofotométricas (620 nm, Thermo Scientific, Multiskan FC, China) se hicieron a los 0, 1, 2, 7 y 10 días. El experimento se realizó por triplicado. Las lecturas realizadas el decimo día se utilizaron para determinar la MIC que, según el criterio de Holetz *et al.* (2002), sería la concentración que reduce el 80 % del crecimiento del hongo frente al control.

En las concentraciones donde no hubo crecimiento micelial del hongo se verificó la viabilidad de las esporas. Se reagrupó el contenido de todos los posillos inoculados de cada concentración en un Eppendorf, se centrifugó (Fisher Scientific, Micro-Centrifuge, Model 59V, USA) por 30 minutos a 2500 rpm para concentrar y separar las esporas del sobrenadante (AE+PDB). A la concentración de esporas se le agregó 300 μ l de agua con triton, se homogenizó la mezcla con agitador y se tomó dos muestras de 100 μ L, para la realización de subcultivos en placas de Petri con medio PDA que se incubaron por 48 h a 25° C. Los 100 μ l restantes se usaron para observar al microscopio el estado de las esporas. La concentración más baja sin crecimiento, se definió como la Concentración Mínima Fungicida (MFC) indicando 100 % de muerte del inóculo inicial.

3.3.4. Análisis estadísticos

El diseño experimental utilizado para el test de fase volátil fue de bloques completamente al azar, tomando como bloque las repeticiones de los ensayos. Se realizó análisis de varianza (ANOVA) para los resultados obtenidos del crecimiento micelial y del porcentaje de inhibición. Se utilizó la

prueba de Comparación Múltiple de Tukey ($p < 0.05$) para la separación de las medias de los diámetros de crecimiento y del porcentaje de inhibición de los tratamientos en cada fecha. Los análisis se hicieron con el Procedimiento GLM del programa SAS (Stat Analysis System Institute Inc., 2008).

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Composición de los aceites esenciales

Los compuestos químicos de los AEs se muestran en la Cuadro 1, donde se detallan los 15 principales y su distribución por grupo de familia química. Entre los constituyentes de cada aceite hubo dominancia de mono y sesquiterpenos, excepto el aceite de *Conyza bonariensis* que presentó alto porcentaje del compuesto poliacetileno, el metil (*Z*)-dec-2-en-4,6-dienoato (59,5 %) (Figura 2).

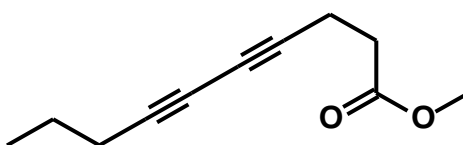


Figura 2. Metil (*Z*)-dec-2-en-4,6-dienoato (Albuquerque *et al.*, 2004)

Los hidrocarburos monoterpénicos limoneno, α - y β - pineno, (*Z*)- β -ocimeno, sabineno, y los hidrocarburos sesquiterpénicos (*E*)-cariofileno, elemecina y (*E*)-nerolidol, constituyeron los compuestos mayoritarios de los aceites de *S. molle* de hoja (*S. molle* H) y de frutos (*S. molle* Fr), *A. flaccida*, *B. dracunculifolia*, *O. selloi*, *P. cattleianum* y *A. gratissima*.

Cuadro 1: Composición químicas de los AEs analizados, distribución por grupo de familias.

Compuestos mayoritarios	% área														
	SmH	SmFr	Af	Bd	Bt	Cb	Ps	Cha	Os	Bs	As	Eu	Pc	Ag	La
Hidrocarburos monoterpénicos															
Canfeno	0,2														
Limoneno	16,6	24,8	6,1	11,5	0,3	12,6		10,0		2,8		0,6	2,3	1,1	
Mirceno	0,5	3,4	1,0	1,3	0,8	0,8	1,2	1,6		1,3		0,5	4,6		0,2
Sabineno		10,8				1,2	3,8		0,3					8,4	0,5
Terpinoleno		1,6								1,0			3,7		
p-Cimeno								4,0							
α-Felandreno													2,4		
α-Pineno	19,2	7,4	53,7	7,5		0,6	3,6	0,5	0,2	14,0			10,1	2,5	
β-Pineno	15,5	3,2	2,4	11,8	9,1	1,7	7,8	0,3	0,9	6,6				1,9	
α-Terpineno		4,0						10,7		2,2					
γ-Terpineno		5,6								3,9					
α-Tujeno										0,6					
allo-Ocimeno									0,1						
(E)-β-Ocimeno		0,2	0,5	0,3	4,0				3,1	1,7					
(Z)-β-Ocimeno			4,1			0,0			23,1		1,0		6,4		
	52,0	60,9	67,7	32,4	14,2	17,0	16,3	27,0	27,9	34,0	1,0	1,1	29,5	13,9	0,7
Monoterpenos oxigenados															
Acetato de carquejilo					47,8										
Carvona								1,6							
Geraniol										0,9					
Linalol		0,4		0,3			1,4		0,8	26,1	14,7		5,4	66,8	
iso-Ascaridol								24,8							
Mirtenol	0,4			0,2											
Oxido de Limoneno								0,6							
1,8-Cineol			0,4				27,4		10,8	22,0				3,3	
3-Decanona											0,5				
3-Octanol acetato											1,5				
(E)-Carveol								1,2							
(Z)-Carveol								0,5							
(E)-Dihidrocarvona														8,6	
(Z)-Dihidrocarvona														5,2	
(Z)-Crisantenol													5,0		
(E)-Pinocanfona														1,2	
(E)-p-Menta-1(7),8-dien-2-ol								4,9							
(E)-p-Menta-2,8-dien-1-ol								7,7							
(Z)-p-Menta-1(7),8-dien-2-ol								5,0							
(Z)-p-Menta-2,8-dien-1-ol								3,0							
(Z)-p-Menta-2-en-1-ol		1,0													
α-Terpineol		2,7		0,5			4,6			1,5					
δ-Terpineol							1,0								
Terpinen- 4- ol		20,7	0,6				3,8			3,8					
	0,4	24,8	1,0	1,1	47,8	0,0	38,1	49,4	11,6	53,3	17,5	0,0	5,4	6,2	83,8
Hidrocarburos sesquiterpénicos															
Aromandreno								0,9							
allo Aromadendreno	8,0														
Biciclogermacreno									6,8						
Elemecina									17,2						
Germacreno A					0,7										
Germacreno B												7,2	2,8	3,5	
Germacreno D	2,3			2,8	1,0							4,5	5,1	2,1	
Palustrol					7,3										
(E)-α-Bergamoteno						0,6									
(E)-Cariofileno	1,4		13,5	3,3		1,5	1,4		6,1	2,5		0,7	16,4	3,1	1,6
(E)-β-Farneseno						2,3									
(E)-Nerolidol				9,9		1,0									
β-Bisaboleno														2,2	
(Z)-γ-Bisaboleno										8,5					

Cuadro 1. Continuación.

Compuestos mayoritarios	% área														
	SmH	SmFr	Af	Bd	Bt	Cb	Ps	Cha	Os	Bs	As	Eu	Pc	Ag	La
Hidrocarburos sesquiterpénicos															
(Z)- β -Guaieno									3,8						
α -Cadineno											3,6				
δ -Cadineno	2,8		1,6	2,8								2,6	1,7		
γ -Cadineno	8,1														
α -Cariofileno	0,4														0,3
α -Chamingreno														7,5	
α -Copaeno			0,9												0,2
α -Cubebeno											0,8				
β -Cubebeno		3,7													0,2
β -Cubebeno		2,6													
β -Elemeno					0,8						3,5	0,8		2,6	0,3
β -Felandreno					6,2										
α -Gurjuneno	0,2														
α -Humuleno			4,4									0,4	3,5		
β -Humuleno											1,9				
α -Murolol	12,0											2,0			
α -Selineno															0,3
β -Selineno									1,5						
7-epi- α -Selineno									3,9						
	35,0	6,3	20,4	18,7	16,1	5,4	2,3	0,0	39,4	2,5	18,3	18,2	21,5	23,3	8,5
Sesquiterpenos oxigenados															
Cariofila-4(12),8(13)-dien-5- α -ol														1,4	
Carotol						0,3									
Cubebol															0,4
Curzerene												12,9			
Elemol					0,5										
Espatulenol	2,4			9,8		2,1	6,4				13,3	7,8		3,4	
Germacron												27,5			
Globulol			0,3									2,4			
Ledol					2,3										
Oxido de Cariofileno						1,9	2,8							6,1	
Viridiflorol				7,1	3,9						0,6	1,6			
1-epi-Cubenol														2,6	
α -Cadinol				1,9								2,6	3,8		
α -Eudesmol										0,6					
β -Eudesmol					2,9										
	2,4	0,0	0,3	18,8	9,6	4,4	9,1	0,0	0,0	0,6	13,9	54,8	13,9	3,4	0,4
Otros															
Acetato de bornilo							1,2								
Geranil acetona						0,6									
Salicilato de metilo														3,8	
Acetato de mirtenilo							2,3								
1-Octeno			0,1												
2-Octeno			0,5												
2-Undecanona											3,0				
3-Octanol											2,2				
3-Octanona											14,5				
β -Isoforona					0,9										
Acetato de (E)-pinocarvilo														2,0	
Acetato de (Z)-crisantenilo														5,6	
Metil (Z)-dec-2-en-4,6-dinoato						59,5									
Metil eugenol									18,2						
	0,0	0,0	0,6	0,0	0,9	60,0	3,5	0,0	18,2	0,0	19,7	0,0	3,8	7,6	0,0
Total (%)	90	92	90	71	89	87	69	76	97	90	70	74	74	54	93

AEs de: SmH: *S. molle* Hoja, SmFr: *S. molle* Fruto, Af: *A. flaccida*, Bd: *B. dracunculifolia*, Bt: *B. trimera*, Cb: *C. bonariensis*, Ps: *P. sagittalis* Cha: *Ch. ambrosioides* Os: *O. selloi*, Bs: *B. salicifolia*, As: *A. sellowiana*, Eu: *E. uniflora*, Pc: *P. cattleianum*, Ag: *A. gratissima*, La: *L. alba*.

Por otro lado, los monoterpenos y sesquiterpenos oxigenados, como acetato de carquejilo, 1,8 cineol, iso-ascaridol, linalol, germacrona y curzereno constituyen los de mayor proporción en los aceites de *B. trimera*, *P. sagittalis*, *Ch. ambrosioides*, *B. salicifolia*, *A. sellowiana*, *L. alba* y *E. uniflora*. El AE de *S. molle* Fr presentó también, alto porcentaje del monoterpeno oxigenado terpinen-4-ol (20,7 %).

3.3.2. Bioensayos

3.3.2.1. Test de Fase Volátil

Los AEs de *C. bonariensis*, *P. sagittalis*, *Ch. ambrosioides*, *B. salicifolia*, *A. sellowiana*, *E. uniflora* y *L. alba* inhibieron totalmente el crecimiento de *P. digitatum* (Cuadro 2), durante los 18 días que duró la evaluación. Los resultados de la verificación de la viabilidad del hongo realizados al finalizar el test demostraron el efecto fungicida. No mostraron efectos inhibitorios los AEs de *S. molle* H, *O. selloi* y *P. cattleianum*, comportándose estadísticamente igual al control. Sin embargo, el aceite de *O. selloi* luego de una semana produjo cambios al patógeno reduciendo su crecimiento significativamente (Figura 3). Por último, los AEs de *B. dracunculifolia*, *S. molle* Fr y *A. gratissima* mostraron una acción inhibitoria intermedia entre el grupo de aceites de mayor y menor efecto, pero gradualmente fueron perdiendo su actividad.

Cuadro 2: Inhibición *in vitro* de los aceites esenciales (1000 ppm) sobre la cepa R20 de *Penicillium digitatum*, utilizando el método fase volátil.

Tratamientos	Inhibición (%) del crecimiento de <i>P. digitatum</i> ^a							
	Test Fase Volátil – Momentos de evaluación (días)							
	3	5	7	9	11	13	15	18
<i>Conyza bonariensis</i> †	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
<i>Pluchea sagittalis</i> †	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
<i>Chenopodium ambrosioides</i> †	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
<i>Blepharocalyx salicifolia</i> †	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
<i>Acca sellowiana</i> †	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
<i>Eugenia uniflora</i> †	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
<i>Lippia alba</i> †	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
<i>Baccharis dracunculifolia</i>	70 b	43 b	38 bc	34 b	31 b	32 bc	31 bcd	30 bc
<i>Schinus molle</i> Fr	62 bc	45 b	34 bc	32 b	31 b	27 bc	26 cde	25 cd
<i>Aloysia gratissima</i>	58 bc	46 b	43 b	34 b	27 bc	26 bc	22 cde	21 cd
<i>Baccharis trimera</i> ‡	41 bc	46 b	45 b	41 b	41 b	44 b	46 b	45 b
<i>Achyrocline flaccida</i>	32 cd	25 bc	27 cd	28 b	29 b	31 bc	30 bcd	30 bc
<i>Psidium cattleianum</i>	8 d	7 c	10 e	12 cd	13 cd	17 cd	19 de	20 cd
<i>Ocimum selloi</i>	5 d	5 c	12 de	25 bc	29 b	34 b	39 bc	39 bc
<i>Schinus molle</i> H	5 d	4 c	6 e	8 d	7 d	8 d	8 e	10 d
CV (%)	29.8	20.4	14.4	13.4	13.6	15.9	17.2	17.8

*LS-means: letras iguales en cada columna no difiere significativamente. T. Tucky, P<0,05.

^a Control = 0 % de inhibición. ^b momentos de la evaluación, expresado en días.

† Efecto fungicida. ‡ Efecto antiesporulante.

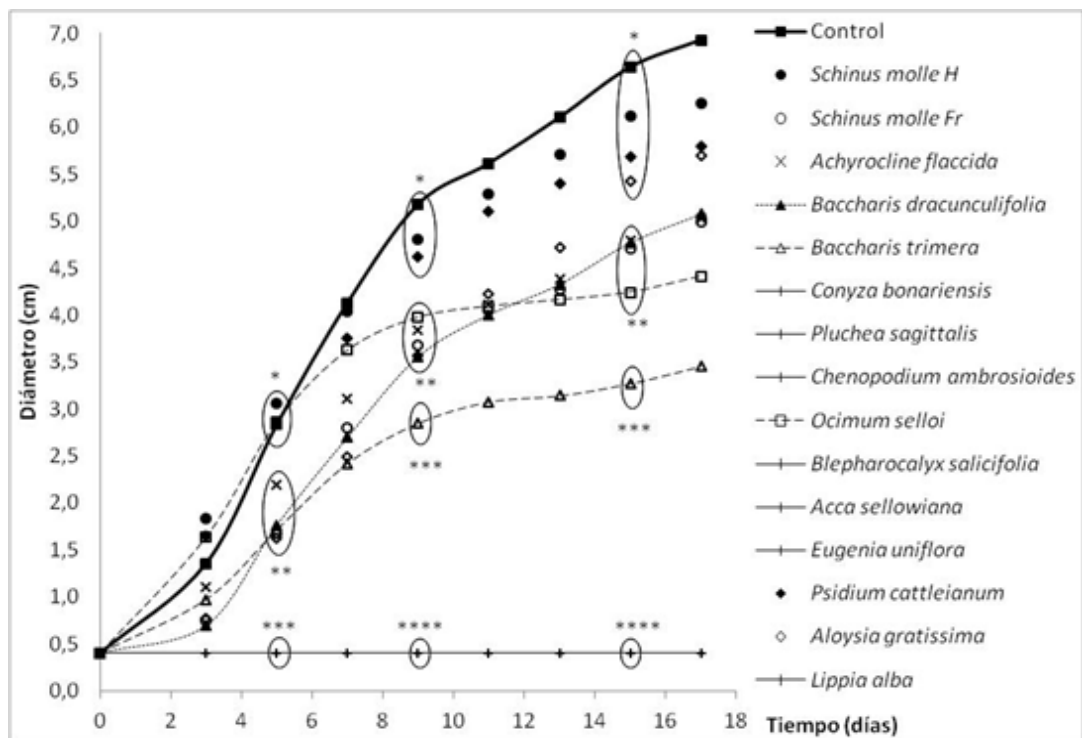


Figura 3: Efecto de los aceites esenciales sobre el crecimiento micelial de *Penicillium digitatum*, *in vitro* con el test de fase volátil.

LS-means: igual cantidad de * (asteriscos) en la misma fecha no difiere significativamente (agrupados en los óvalos), Test de Tucky, $P < 0,05$.

Por otro lado, el aceite de *B. trimera* redujo significativamente el crecimiento micelial e impidió totalmente la esporulación de *P. digitatum*, ambos efectos los mantuvo hasta el final de la evaluación.

3.3.2.2. Tamizado de los AEs

Los resultados de la selección basados en la metodología de difusión, reveló a las 48 h que, únicamente tres AEs de los 15 probados formaron un halo de inhibición, impidiendo el crecimiento micelial de *P. digitatum*. El tamaño del halo de inhibición producido por los aceites fue, de mayor a menor, *C. bonariensis*, *Ch. ambrosioides* y *O. selloi*. Estos efectos se

mantuvieron hasta el sexto día, sobresaliendo claramente el aceite de *C. bonariensis* con un halo de inhibición mayor.

3.3.2.3. Bioautografía sobre TLC

Los aceites de *C. bonariensis* y *Ch. ambrosioides* mostraron halos de inhibición que ocupaban casi todo el largo del cromatograma. Esto impidió identificar las fracciones de compuestos en ambos aceites.

3.3.2.4. Test de Microdilución en caldo

Las MIC halladas correspondieron a 30, 60 y 500 ppm de los AEs de *Ch. ambrosioides*, *C. bonariensis* y *O. selloi*, respectivamente (Figura 4). Las MFC correspondieron a 125 ppm para los dos primeros aceites y 1500 ppm para el tercero.

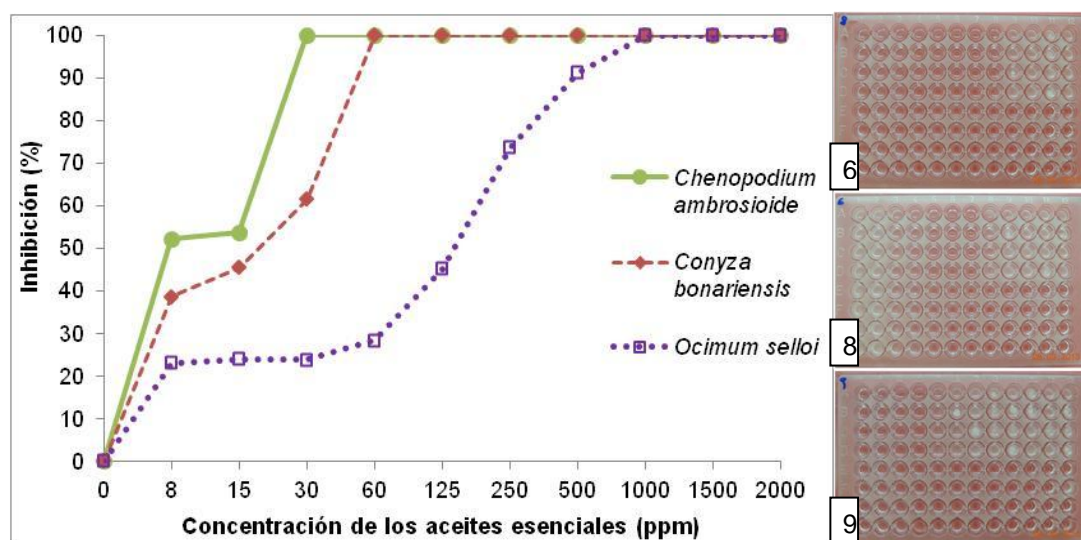


Figura 4: Concentración Inhibitoria Mínima (MIC) de los aceites esenciales de *C. bonariensis* (6), *Ch. ambrosioides* (8) y *O. selloi* (9) sobre *P. digitatum* (10^4 ufc/mL).

3.4. DISCUSIÓN

Las variaciones en la composición química del AE de una misma especie vegetal, en general se debe a factores genéticos, bióticos y abióticos (luminosidad, temperatura, precipitaciones, nutrición, época y hora de colecta, técnicas de extracción). Estas alteraciones en los compuestos mayoritarios podrían influenciar los resultados de pruebas biológicas (Morais, 2009b). Sin embargo, en este trabajo los aceites reconocidos por presentar compuestos marcadores de la especie, lo contenían. Fue el caso, del nerolidol en *B. dracunculifolia*, del acetato de carquejilo en *B. trimera* (Morais y Castanha, 2011; Abad y Bermejo, 2007), del ascaridol en *Ch. ambrosioides* (Jardim *et al.*, 2008; Torres *et al.*, 2002) y del linalol en Uruguay para *L. alba* (Stashenko, 2010).

Los AEs presentaron diferentes grado de inhibición y del análisis de la composición química se puede inferir que los que tuvieron mayor o total inhibición presentaron alta proporción de uno o unos pocos compuestos que de otros, pudiendo ser esta la posible explicación a los resultados obtenidos. Resultando que los aceites con acción fungicida sobre *P. digitatum* presentaron como constituyentes mayoritarios al linalol (*B. salicifolia*, *A. sellowiana*, *L. alba*), iso-ascaridol (*Ch. ambrosioides*), 1,8-cineol (*P. sagittalis*, *B. salicifolia*), germacrona (*E. uniflora*) y metil (Z)-dec-2-en-4,6-dienoato (*C. bonariensis*). Los cuatro primeros compuestos, pertenecen a la familia de los mono y sesquiterpenos oxigenados, esto podría mostrar una relación entre la actividad biológica de los aceites probados y el contenido de

terpenoides oxigenados. Los AEs con menor efecto sobre *P. digitatum*, como el de *S. molle* H, *O. selloi*, *P. cattleianum* y *A. flaccida*, presentaron altos contenidos de hidrocarburos terpénicos. Lis-Balchin *et al.* (1998) implicaron que aceites con altos niveles de hidrocarburos monoterpénicos, especialmente α - y β -pineno, α -terpineno, δ -terpineno, mirceno, limoneno, fueron muy activos contra bacterias pero no contra hongos, con alguna excepción.

Existe gran variedad de reportes sobre la bioactividad de varios de los compuestos mayoritarios encontrados en las plantas utilizadas. Son ejemplo, los compuestos activos 1,8-cineol (mayoritario del AE de varias especies del género *Eucalyptus*), limoneno y linalol (*Citrus sinensis*), han sido ampliamente reconocidos por mostrar efectos antimicóticos (Alzate *et al.*, 2009; Mesa Arango *et al.*, 2004). Soković *et al.* (2012) encontraron actividad inhibitoria del linalol y 1,8-cineol a muy bajas concentraciones (2.0-3.0 μ L/mL) frente a tres dermatomicetes. Dichos autores, establecieron un posible orden de los compuestos estudiados según su potencial antifúngico y formaron la siguiente escala: mentol > 1,8-cineol > linalol > alcanfor > limoneno. Vaillant Flores *et al.*, (2009) probaron el 1,8-cineol frente a *Rhizoctonia solani*, concluyendo que este compuesto presenta un comportamiento inhibitorio menor que el timol y el mentol, a pesar de ser un potente alelopático contra malezas y repelentes de insectos. Caccioni y Guizzardi (1994), que también estudiaron el comportamiento inhibitorio del 1,8-cineol a una concentración de 1000 ppm sobre *P. digitatum*, no

encontraron efectos importantes (< 33 %) sobre el crecimiento micelial y moderados (33 – 66 %) sobre la germinación de sus esporas.

El compuesto mayoritario identificado en el aceite de *C. bonariensis* no se encontró reportado anteriormente para esta especie por otros autores, siendo este compuesto posiblemente el responsable principal del efecto obtenido. Es de destacar que Albuquerque *et al.* (2004) encontraron al compuesto metil (Z)-dec-2en-4,6-dinoato dentro de los constituyentes volátiles mayoritarios del aceite de *Baccharis trinervis*. Utilizando el método de difusión en agar dichos autores reportaron bioactividad del aceite contra las bacterias y hongos testeados (*S. aureus*, *E. coli*, *S. choleraesuis*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*), resultando un antecedente de la posible actividad de esta sustancia, pero para esos microorganismos. Por otro lado, Zapata *et al.* (2010) investigaron la actividad antimicótica de AEs de plantas de la familia Asteraceae y clasificaron el efecto de *C. bonariensis* como débil por presentar una MIC superior a 500 µg/ml. Manzano Santana *et al.* (2011) luego de determinar la composición química de este aceite y el efecto antiinflamatorio e inhibitorio del extracto alcohólico de las hojas, recomendaron continuar con los estudios clínicos y desarrollar productos antimicóticos utilizando *C. bonariensis*. Con respecto a la composición química y a los resultados obtenidos por el AE de *Ch. ambrosioides*, se pudo encontrar coincidencias con otros investigadores. Se atribuye el amplio espectro de la actividad insecticida y antifúngica de este

aceite a compuestos como el α -terpineno (Jaramillo *et al.*, 2012) o a los ascaridoles y p-cimeno (Jardim *et al.*, 2008).

La composición química del AE de *E. uniflora* es conocida por ser variable, pero en general muestra predominancia de sesquiterpenos (Stefanello *et al.*, 2011), confirmándose con lo identificado en este estudio. Incluso se pudo observar que varios compuestos coincidieron, aunque en diferente proporción, con los identificados por Brun y Mossi (2010), quienes reportaron actividad antimicrobiana del aceite frente a bacterias gram positivas y negativas. Por otro lado, el contenido de oxido de cariofileno encontrado en el AE de *P. cattleianum*, fue bajo (6,1 %) comparado con lo reportado por Chalannavar *et al.* (2013), quienes encuentran un 29,5 % de esta sustancia en las plantas que crecen en Sud África. Este compuesto es reconocido por estar asociado a actividad antifúngica y antimicrobial, y por ser preservativo de comidas, drogas y comestibles. En general, es difícil relacionar la actividad biológica con una sustancia aislada, pudiendo ser inexacta, debido a la complejidad de la composición química de los AEs y a sus posibles interacciones entre los compuestos (Atti dos Santos *et al.*, 2010).

Por último, en el test de fase volátil, el comportamiento inhibitorio superior del aceite de *S. molle* Fr frente al de H, ambos con altos contenidos de monoterpenos hidrocarbonados, podría estar explicado por las diferencias en los tipos y porcentajes de los compuestos de cada uno. Posiblemente debido a esas variaciones y a otros factores, fue que Atti dos

Santos *et al.* (2010) encontraron actividad antimicótica del AE de hoja de *S. molle*, cuyos compuestos mayoritarios eran α -pineno, sabineno y limoneno, sobre *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Collethotricum* spp. y *Botrytis* spp. Otro aceite que presentó moderada acción inhibitoria (70 %) sobre *P. digitatum* fue el de *B. dracunculifolia*, principal productor del propóleo verde (*green propolis*) de origen botánico y con antecedentes de efectos anticariogénica y bacteriostático de sus extractos (Abad y Bermejo, 2007). En evaluaciones sobre las propiedades de su AE demostraron que esta planta presenta compuestos fungitóxicos sobre el crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*. Además, Abad y Bermejo (2007) mencionan que el principal compuesto del aceite de *B. dracunculifolia*, es el sesquiterpeno nerolidol, con efecto inhibitor del crecimiento de *Plasmodium falciparum*, agente causante de la malaria, compuesto aprobado en los Estados Unidos por la agencia reguladora Food and Drug Administration (FDA).

Zapata *et al.* (2010) mencionan que no hay criterios estándares para definir la actividad antimicótica de productos naturales, pero utilizaron la clasificación propuesta por Holetz *et al.* (2002). Según estos últimos autores, la actividad antimicrobial de extractos hidroalcohólicos con una MIC menor a 100 $\mu\text{g/ml}$ era buena, entre 100 - 500 $\mu\text{g/mL}$ era moderada, entre 500 - 1000 $\mu\text{g/mL}$ era débil, y mayor a 1000 $\mu\text{g/mL}$ era inactiva. Utilizando este criterio para clasificar los AEs, se puede decir que de *Ch. ambrosioides* y *C. bonariensis* presentaron buena actividad antifúngica frente a *P. digitatum*, y fue débil la acción del aceite de *O. selloi*. Lo que significa, que los

compuestos químicos de los aceites de *Ch. ambrosioides* y *C. bonariensis* resultaron con mayor eficiencia sobre *P. digitatum* que los de *O. selloi*, el cual depende de la concentración.

Existen diferencias en los resultados encontrados con respecto a los de otros autores, pero diversos factores podrían explicar la variabilidad en la actividad antimicótica de los productos naturales. Las técnicas utilizadas, la composición de los AEs, que varía según la procedencia geográfica y los hongos evaluados serían algunos de estos factores (Zapata *et al.*, 2010). Sin embargo, se evidencia que fue la acción combinada de la mezcla de los compuestos de cada aceite la responsable de la actividad inhibitoria sobre *P. digitatum*. Según Bakkali *et al.* (2008), los componentes mayoritarios de los aceites determinan su propiedades biológicas, sin embargo es posible que la actividad sea resultado de un efecto sinérgico con otras moléculas de menor porcentaje.

En conclusión, los AEs extraídos de las siete especies siguientes *Ch. ambrosioides*, *C. bonariensis*, *P. sagittalis*, *B. salicifolia*, *A. sellowiana*, *E. uniflora* y *L. alba*, que crecen en forma espontanea en Uruguay, presentaron compuestos volátiles con capacidad fungicida sobre *P. digitatum* . Además, los dos primeros aceites mostraron MIC y MFC muy bajas. Estos AEs podrían considerarse como potenciales alternativas para el control de enfermedades postcosecha de los cítricos, debido a que son naturales y seguros comparados con los productos químicos de síntesis. Sin embargo, existe una gran diversidad química entre las especies estudiadas y con las

que crecen en otras áreas reflejando su capacidad de respuesta a las condiciones del medio ecológico, lo que implica que se deba encarar una sistematización en el estudio de las poblaciones para las especies estudiadas y su respuesta química y fungicida.

3.5. BIBLIOGRAFÍA

Abad MJ, Ansuategui M, Bermejo P. 2007. Active antifungal substances from natural sources. *ARKIVOC*, 7: 116-145.

Abad MJ, Bermejo P. 2007. Baccharis (Compositae): a review update. *ARKIVOC*, 7: 76-96.

Adams RP. 2001. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. 4th ed. Allured, IL, USA. 456p.

Albuquerque MRJR, Souza EB, Lins MUDS, Nogueira NAP, Lemos TLG, Silveira ER, Pessoa ODL. 2004. Composition and antimicrobial activity of the essential oil from aerial parts of *Baccharis trinervis* (Lam.) Pers. *ARKIVOC*, 6: 59-65.

Alzate NA, López VK, Marín HA, Murillo AW. 2009. Evaluación preliminar de la actividad fungicida de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus tereticornis*, *Myrtaceae*) y cáscara de naranja (*Citrus sinensis*, *Rutaceae*) sobre algunos hongos filamentosos. *Revista Tumbaga*, 4: 59-71.

Antunes MDC, Cavaco AM 2010. The use of essential oils for postharvest decay control. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25: 351-366.

- Atti dos Santos AC, Rossato M, Atti Serafini L, Bueno M, Crippa LB, Sartori VC, Dellacassa E, Moyna P. 2010. Efeito fungicida dos óleos essenciais de *Schinus molle* L. e *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20: 154-159.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils-A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446-475.
- Brown GE, Eckert JW. 2000. Green Mold. En: Garnsey, S.M., Graham J.H., Timmer, L.W. [Eds.]. Compendium of citrus diseases. St. Paul, Minnesota: APS (American Phytopathological Society) Press. pp. 41-42.
- Brun GR, Mossi AJ. 2010. Caracterização química e atividade antimicrobiana do óleo volátil de pitanga (*Eugenia uniflora*). *Perspectiva Erechim*, 34(127): 135-142.
- Caccioni DRL, Guizzardi M. 1994. Inhibition of germination and growth of fruit and vegetable postharvest pathogenic fungi by essential oil components. *Journal of Essential Oil Research*, 6(2): 173-179.
- Chalannavar RK, Narayanaswamy VK, Baijnath H, Odhav B. 2013. Chemical constituents of the essential oil from leaves of *Psidium cattleianum* var. *cattleianum*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(13): 783-789.
- Cowan MM. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4): 564-582.
- De Souza Prestes CL, Damé Schuch LF, Hörnke Alves G, Ziemann dos Santos MA, Alves Rodrigues MR, Araújo Meireles MC. 2011.

Evaluación de la actividad bactericida de aceites esenciales de hojas de guayabo, pitango y arazá. *Revista Medicina Cubana*, 16(4): 324-330.

Espinel-Ingroff A, Cantón E. 2007. Antifungal susceptibility. Testing of filamentous fungi. En: Schwalbe R, Steele-Moore L, Goodwin AC. [Eds.]. Antimicrobial susceptibility testing protocols. CRC Press: Boca Raton. pp. 209-241.

Ferraz Laranjeira F, Feichtenberger E, Beozzo Bassanesi R, Bellato Spósito M. 2005. Manejo integrado de doenças de citros. En: de Mattos Junior D, De Negri JD, Pio RM, Pompeu Junior J. [Eds.]. Citros. Campinas, SP: Instituto Agronômico e Fundag, Centro APTA. pp. 629-654.

Franco DAS, Bettiol W. 2002. Efeito de productos alternativos para o controle do bolor verde (*Penicillium digitatum*) em pós-colheita de citros. *Revista Brasileira Fruticultura*, 24(2): 569-572.

Furlán RLE, López SN. 2007. Métodos bioautográficos. En: Zacchino SA, Gupta MP. [Eds.]. Manual de técnicas *in vitro* para la detección de compuestos antifúngicos. 1ª. Edición. Rosario: Cospus Editorial y Distribuidora. pp. 57-73.

Hadacek F, Greger H. 2000. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analysis*, 11: 137-147.

Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Garcia Cortez DA, Nakamura CV, Dias Filho BP. 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk

- medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(7): 1027-1031.
- Jaramillo BE, Duarte E, Delgado W. 2012. Bioactividad del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* colombiano. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17(1): 54-64.
- Jardim CM, Jham GN, Dhingra OD, Freire MM. 2008. Composition and antifungal activity of the essential oil of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Chemical Ecology*, 34: 1213-1218.
- Kinay P, Mansour MF, Gabler FM, Margosan DA, Smilanick JL. 2007. Characterization of fungicide-resistant isolates of *Penicillium digitatum* collected in California. *Crop Protection*, 26: 647–656.
- Kováts E. 1958. Gas chromatographic characterization of organic compounds. Part 1: retention indices aliphatic halides, alcohols, aldehydes and ketones. *Helvetica Chimica Acta*, 41(7): 1915-1932.
- Lado J, Pérez Faggiani E, De Nigris A, Dol I, Knochen M. 2013. Residuos en frutos de naranja del fungicida imazalil aplicado en postcosecha y su efecto en el control de moho verde. *Agrociencia Uruguay*, 17(2): 83-90.
- Lado J, Luque E, Blanco O, Pérez Faggiani E. 2011. Evaluación de alternativas para el control poscosecha de aislamientos de *Penicillium digitatum* resistentes a imazalil. *Agrociencia Uruguay*, 15(1): 55-63.
- Lis-Balchin M, Deans SG, Eaglesham E. 1998. Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 13: 98-104.

- Manzano Santana P, Miranda M, Gutiérrez Y, García G, Orellana Y, Orellana-Manzano A. 2011. Efecto antiinflamatorio y antimicótico del extracto alcohólico y composición química del aceite de hojas de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (canilla de venado). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 16(1): 13-23.
- McLafferty FW, Stauffer DB. 1991. The Wiley/NBS registry of mass spectral data, 5th ed. New York: Wiley and Sons.
- Mesa Arango AC, Bueno Sánchez JG, Betancur Galvis LA. 2004. Revisión. productos naturales con actividad antimicótica. *Revista Española de Quimioterapia*, 17(4): 325-331.
- Morais LAS, Castanha RF. 2011. Composição química do óleo essencial de duas amostras de carqueja coletadas em Paty do Alferes. *Horticultura Brasileira*, 29(2): S4874-S4879.
- Morais LAS. 2009a. Óleos essenciais no controle fitossanitário. En: Bettiol W, Morandi MAB. [Eds.]. Biocontrol de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente. pp. 139-152.
- Morais LAS. 2009b. Influência dos factores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *Horticultura Brasileira*, 27(2): S4050-S4063.
- Palou L. 2013. Mini-review: Heat treatments for the control of citrus postharvest green mold caused by *Penicillium digitatum*. En: Méndez-Vilas, A. [Ed.]. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education, Vol. 1. Badajoz, Spain: Formatex Research Center. pp. 508-514.

- Palou L, Smilanick JL, Droby S. 2008. Alternatives to conventional fungicides for the control of citrus postharvest green and blue moulds. *Stewart Postharvest Review*, 2(2): 1-16.
- Pauli A, Schilcher H. 2007. In vitro antimicrobial activities of essential oils monographed in the European Pharmacopoeia 6th Edition. En: Schwalber R, Steele-Moore L, Goodwin AC. [Eds.], Antimicrobial susceptibility testing protocols. CRC Press, Florida: CRC Press, Taylor & Francis Group. pp. 353-547.
- Rodov V, Nafussi B, Ben-Yehoshua S. 2011. Essential oil components as potential means to control *Penicillium digitatum* Pers. (Sacc.) and other postharvest pathogens of citrus fruit. *Fresh Produce*, 5(1): 43-50.
- Sayago JE, Ordoñez RM, Negrillo Kovacevich L, Torres S, Isla MI. 2012. Antifungal activity of extracts of extremophile plants from the Argentine Puna to control citrus postharvest pathogens and green mold. *Postharvest Biology and Technology*, 67: 19-24.
- Smilanick JL, Mansour MF, Gabler FM, Sorenson D. 2008. Control of citrus postharvest green mold and sour rot by potassium sorbate combined with heat and fungicides. *Postharvest Biology and Technology*, 47: 226-238.
- Soković M, Galmočlija J, Ćirić A, Kataranovski D, Marin PD, Vukojević J, Brkić D. 2012. Antifungal activity of the essential oils and components *in vitro* and *in vivo* on experimentally induced dermatomycoses at rats. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 7(3): 959-966.

- Stashenko E. 2010. Estudio comparativo de la composición y la actividad biológica de aceites esenciales de *Lippia alba*, de diferentes regiones de Colombia. En: Dellacassa E. [Ed.]. Normalización de productos naturales obtenidos de especies de la flora aromática Latinoamericana. Porto Alegre: EdiPucrs. pp. 173-193.
- Stat Analysis System Institute Inc. 2008. SAS/STAT 9.2 Users guide. Cary, North Caroline: SAS Institute Inc. USA.
- Stefanello MEA, Pascoal ACRF, Salvador MJ. 2011. Essential oils from neotropical Myrtaceae: chemical diversity and biological properties. Review. *Chemistry & Biodiversity*, 8(1): 73-94.
- Torres AM, Ricciardi GAL, Agrelo de Nassiff AE, Ricciardi AIA, Bandoni AL. 2003. Aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L., (paico macho). *Facena*, 19: 27-32.
- Tripathi P, Dubey NK, Banerji R, Chansouria JPN. 2004. Evaluation of some essential oils as botanical fungitoxicants in management of post-harvest rotting of citrus fruits. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 20: 317-321.
- Vaillant Flores D, Romeu Carballo C, Ramos Ramos E, González García M, Ramírez Ochoa R, González Pentón J. 2009. Efecto inhibitorio *in vitro* de cinco monoterpenos de aceites esenciales sobre un aislado de *Rhizoctonia solani* en papa (*Solanum tuberosum* L.). *Fitosanidad*, 13(3): 197-200.

Zapata B, Durán C, Stashenko E, Betancur-Galvis L, Mesa-Arango AC.
2010. Actividad antimicótica y citotóxica de aceites esenciales de
plantas de la familia Asteraceae. *Revista Iberoamericana de Micología*,
27(2): 101-103.

4. CONCLUSIONES GENERALES

- Fue posible demostrar, para las condiciones experimentales establecidas en este trabajo, que existen AEs provenientes de plantas autóctonas con potencial para el biocontrol de patógenos de los cítricos.
- Se encontró AEs con acción fungicida o fungistática para cada uno de los patógenos utilizados, según la metodología empleada.
- La actividad antifúngica de los AEs es consecuencia de la mezcla compleja de sus compuestos, pero esta afirmación debe ser demostrada en un trabajo futuro.
- Se observó que los AEs estudiados presentaron mayor capacidad de ejercer efectos antifúngicos mediante la volatilización de sus compuestos que por difusión.
- Se comprobó que un mismo AE puede provocar comportamientos diferentes a un mismo patógeno, dependiendo de la metodología que se aplique, lo que determina que su forma de uso a futuro debe ser validado *in vivo*.

5. CONSIDERACIONES FINALES

Los resultados obtenidos, muestran que es indiscutible la importancia de continuar investigando y realizando ajustes en metodología y dosis acorde a las características de cada aceite esencial. La naturaleza esencialmente lipofílica de sus componentes determina que, aun siendo fuertes inhibidores del crecimiento fúngico, mostrarían pobre o ningún resultado en pruebas de difusión al tener baja miscibilidad con el agua (Pauli y Schilcher, 2007).

Al mismo tiempo, se deberían hacer ensayos *in vivo* sobre fruta con los aceites esenciales más promisorios. En este sentido, es importante recordar que una elevada actividad *in vitro* no es garantía de eficiencia en el control de enfermedades *in vivo*, debido a la posible fitotoxicidad de los compuestos del aceite al hospedero o por no afectar al patógeno (Rodov *et al.*, 2011; Tripathi *et al.*, 2004).

La posibilidad de usar los aceites como alternativa a los agroquímicos tradicionales, no implicaría necesariamente eliminar éstos últimos. Con el fin de disminuir dosis, y en consecuencia reducir niveles de residuos en fruta y de controlar cepas resistentes, sería necesario evaluar posibles mezclas con algunos fungicidas sintéticos seleccionados.

Una vez ajustada *in vivo* la dosis efectiva del o de los aceites seleccionados por la efectividad de sus compuestos volátiles y la compatibilidad con agroquímicos, se podrían plantear ensayos a nivel industrial. En esta etapa se deberá plantear la posibilidad de utilizarlos en dos momentos:

- uno sería en el momento en que la fruta que ingresa a las cámara de desverdizado, luego de la cosecha, período éste en el que ocurre importantes pérdidas, con el propósito de bajar el nivel de incidencia de la enfermedad.

- el otro momento correspondería al almacenamiento de la fruta transportada en contenedores a su destino final, donde el objetivo sería la conservación de la calidad de la fruta, evitando ingreso o avance del patógeno.

En ambos casos, la cámara o contenedor de fruta deberá contar con un mecanismo de liberación del aceite esencial, ya existiendo esta posibilidad en aquellos contenedores que presentan el sistema de liberación de ozono incorporado manteniéndose los demás parámetros, temperatura, humedad relativa y renovación del aire.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abad MJ, Ansuategui M, Bermejo P. 2007. Active antifungal substances from natural sources. *ARKIVOC*, 7: 116 - 145.
- Abad MJ, Bermejo P. 2007. Baccharis (Compositae): a review update. *ARKIVOC*, 7: 76 - 96.
- Adams RP. 2001. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. 4th ed. Allured, IL, USA. 456p.
- Adorjan B, Buchbauer G, 2010. Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour Fragrance Journal*, 25: 407 - 426.
- Agostini F, Atti dos Santos AC, Rossato M, Pansera MR, dos Santos PL, Atti Serafini L, Molon R, Moyna P. 2009. Essential oil yield and composition of Lamiaceae species growing in southern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(2): 473 - 478.
- Agrios GN. 2005. Plant Pathology. Fifth Edition. New York, USA: Elsevier Academic Press. 922 p.
- Albuquerque MRJR, Souza EB, Lins MUDS, Nogueira NAP, Lemos TLG, Silveira ER, Pessoa ODL. 2004. Composition and antimicrobial activity of the essential oil from aerial parts of *Baccharis trinervis* (Lam.) Pers. *ARKIVOC*, 6: 59 - 65.
- Alonso E, Bassagoda MJ, Ferreira F. 2008. Yuyos. Uso racional de la plantas medicinales. 2^a Ed. Montevideo: Editorial Fin de Siglo. 222p.
- Alzate NA, López VK, Marín HA, Murillo AW. 2009. Evaluación preliminar de la actividad fungicida de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus tereticornis*, *Myrtaceae*) y cáscara de naranja (*Citrus sinensis*, *Rutaceae*) sobre algunos hongos filamentosos. *Revista Tumbaga*, 4: 59 - 71.
- Antunes MDC, Cavaco AM 2010. The use of essential oils for postharvest decay control. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25: 351 - 366.

- Arrillaga de Maffei B. 1997. Plantas usadas en la medicina natural. Montevideo: Hemisferio Sur. 152p.
- Arrillaga de Maffei B. 1969. Plantas Medicinales. Montevideo: Nuestra Tierra. 61p.
- Atti dos Santos AC, Rossato M, Atti Serafini L, Bueno M, Crippa LB, Sartori VC, Dellacassa E, Moyna P. 2010. Efeito fungicida dos óleos essenciais de *Schinus molle* L. e *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20: 154 - 159.
- Baayen RP, Bonants, P.J.M., Verkley, G., Carrol, G.C., van Der Aa, H.A., de Weerd M., van Brouwershaven I.R., Schutte G.C., Maccheroni Jr. W., Glienke de Blanco C., Azevedo J.L. 2002. Nonpathogenic isolates of Citrus Black Spot Fungus, *Guignardia citricarpa*, Identified as a Cosmopolitan Endophyte of Woody Plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). Ecology and Population Biology. *Phytopathology*, 92 (5): 464 - 477.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils-A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446 - 475.
- Baldassari RB, Wickert E, de Goes A. 2008. Pathogenicity, colony morphology and diversity of isolates of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae* isolated from *Citrus* spp. *European Journal of Plant Pathology*, 120: 103 - 110.
- Barbosa LCA, Teixeira RR, Montanari RM. 2008. Phytotoxic natural products as models for the development of crop protection agents. En: Epifano F. [Ed.]. Current trends in phytochemistry. Kerala: Research Signpost. pp. 21 - 59.
- Barneche S, Bertucci A, Haretche F, Olivaro C, Cerdeiras AP, Vázquez A. 2010. Prospección química y microbiológica del bosque de galería del río Uruguay. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(6): 878 - 885.
- Barrera Necha LL, García Barrera LJ. 2008. Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium* sp.

- aislado de papaya (*Carica papaya*). *Revista UDO Agrícola*, 8(1): 33 - 41.
- Bertucci A, Haretche F, Olivaro C, Vázquez A. 2008. Prospección química del bosque de galería del río Uruguay. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(1): 21 - 25.
- Boubaker H, Saadi B, Boudyach EH, Benaoumar AA. 2009. Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to Imazalil and Thiabendazole in Morocco. *Plant Pathology Journal*, 1 - 7.
- Brown GE. 2003. Green Mold. [En línea]. University of Florida, IFAS Extension. PP130. Consultado: 11 junio 2014. Disponible en: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/CH/CH10600.pdf>
- Brown GE, Eckert JW. 2000. Green Mold. En: Garnsey, S.M., Graham J.H., Timmer, L.W. [Eds.]. Compendium of citrus diseases. St. Paul, Minesota: APS (American Phytopathological Society) Press. pp. 41- 42.
- Brun GR, Mossi AJ. 2010. Caracterização química e atividade antimicrobiana do óleo volátil de pitanga (*Eugenia uniflora*). *Perspectiva Erechim*, 34(127): 135 - 142.
- Bruno Y. 2011. Cítricos: situación y perspectivas. [En línea]. En: MGAP [Ed.]. Montevideo: Anuario 2011 – OPYPA. pp. 173-184. Consultado: 14 junio 2012. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/opypa/ANUARIOS/Anuario2010/material/pdf/13.pdf>
- CABI (Centre for Agricultural Bioscience International). 2014. Guignardia citricarpa. [En línea]. En: Invasive Species Compendium (ISC). Wallingford, UK: CAB International. Consultado: 17 junio 2014. Disponible en: <http://www.cabi.org/isc/datasheet/26154>
- Caccioni DRL, Guizzardi M. 1994. Inhibition of germination and growth of fruit and vegetable postharvest pathogenic fungi by essential oil components. *Journal of Essential Oil Research*, 6(2): 173 - 179.
- Caputi P, Montes F. 2010. Plan estratégico y diseño institucional para el sector cítrico en Uruguay. [En línea]. Proyecto TCP/URU/3301- FAO. Comunicación Institucional, MGAP (Ministerio de Ganadería,

- Agricultura y Pesca). Montevideo, 108p. Consultado: 5 de julio 2013.
Disponible en: www.mgap.gub.uy/portal/agxppdwn.aspx?7,1,77,O,S,0..
- Castañeda ML, Muñoz A, Martínez JR, Stashenko E. 2007. Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas colombianas. *Scientia et Technica*, 13(33): 165 - 166.
- Chalannavar RK, Narayanaswamy VK, Baijnath H, Odhav B. 2013. Chemical constituents of the essential oil from leaves of *Psidium cattleianum* var. *cattleianum*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(13): 783 - 789.
- Ciccio JF, Ocampo R. 2010. Distribución biogeográfica de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. Ex Britton & Wilson y quimiotipos en América y el Caribe. En: Dellacassa, E. [Ed.]. Normalización de productos naturales obtenidos de especies de la flora aromática latinoamericana. Porto Alegre: EdiPucrs. pp. 107 - 130.
- Ciccio JF, Ocampo R. 2006. Valoración anual de la composición química del aceite esencial de *Lippia alba* (Verbenaceae) cultivada en Costa Rica. *Lankesteriana*, 6: 149 - 154.
- Coelho de Souza G, Haas APS, von Poser GL, Schapoval EES, Elisabetsky E. 2004. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 90: 135 - 143.
- Cowan MM. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4): 564 - 582.
- Daferera DJ, Ziogas BN, Polissiou MG. 2000. GC-MS analysis of essential oils from some greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 48: 2576 - 2581.
- Davies, P., 2004. Fichas técnicas de cultivo. En: Davies, P. [Ed.]. Estudios de domesticación y cultivo de especies medicinales y aromáticas nativas. Montevideo: INIA. (Serie FPTA-INIA). pp. 37 - 120.
- Dellacassa E, Lorenzo D, Paz D. 2004a. Procesos de extracción aplicados a la obtención de productos aromáticos de origen vegetal. En: Davies P.

- [Ed.]. Estudio en domesticación y cultivo de especies medicinales y aromáticas nativas. Montevideo: INIA. (Serie FPTA-INIA). pp. 155-160.
- Dellacassa E, Lorenzo D, Paz D. 2004b. Caracterización fisicoquímica de los aceites esenciales. En: Davies P. [Ed.]. Estudio en domesticación y cultivo de especies medicinales y aromáticas nativas. Montevideo: INIA. (Serie FPTA-INIA). pp. 161 - 169.
- De Souza EL, Lima EO, Freire KRL, de Souza CP. 2005. Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of various moulds isolated from foods. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(2): 245 - 250.
- De Souza Prestes CL, Damé Schuch LF, Hörnke Alves G, Ziemann dos Santos MA, Alves Rodrigues MR, Araújo Meireles MC. 2011. Evaluación de la actividad bactericida de aceites esenciales de hojas de guayabo, pitango y arazá. *Revista Medicina Cubana*, 16(4): 324 - 330.
- Dewdney M, Peres N. 2010. Citrus Black Spot (*Guignardia citricarpa*): Identification, Biology and Control. Presentations. [En línea]. University of Florida. Citrus Research and Education Center. IFAS (Institute of Food and Agricultural Sciences). Consultado: 1 abril 2014. Disponible en: http://www.crec.ifas.ufl.edu/extension/black_spot/citrus_black_spot.shtml
- Díaz Dellavalle P, Cabrera A, Alem D, Larrañaga P, Ferreira F, Della Rizza M. 2011. Antifungal activity of medicinal plant extracts against phytopathogenic fungus *Alternaria* spp. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 71(2): 231 - 239.
- Dikshit A, Naqvi AA, Husain A. 1986. Schinus molle: a new source of natural fungitoxicant. *Applied and Environment Microbiology*, 51(5): 1085-1088.
- Dixon RA. 2001. Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411: 843 - 847.
- Eckert JW, Eaks IL. 1989. Postharvest disorders and diseases of citrus fruits. En: Reuther W, Calavan EC, Carman GE. [Eds.]. The Citrus Industry

- Vol. 5. Crop protection, postharvest technology and early history of citrus research in California. Oakland: Division of Agriculture and Natural Resources, University of California. pp.179 – 260.
- Edris EA, 2007. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytotherapy Research*, 21: 308 - 323.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2013. EPPO Standards. EPPO A1 and A2 lists of pest recommended for regulation as quarantine pests. PM ½ (22) English. [En línea]. Consultado 05 junio 2014. Disponible en: [http://archives.eppo.int/EPPOStandards/PM1_GENERAL/pm1-02\(22\)_A1A2_2013.pdf](http://archives.eppo.int/EPPOStandards/PM1_GENERAL/pm1-02(22)_A1A2_2013.pdf)
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2009. PM 7/17 (2): *Guignardia citricarpa*. OEPP/EPPO *Bulletin* 39(3): 318 - 327.
- Espinel-Ingroff A, Cantón E. 2007. Antifungal susceptibility. Testing of filamentous fungi. En: Schwalbe R, Steele-Moore L, Goodwin AC. [Eds.]. Antimicrobial susceptibility testing protocols. Boca Raton: CRC Press. pp. 209 - 241.
- Ferraz Laranjeira F, Amorim L, Bergamin Filho A, Aguilar-Vildoso CI, Della Coletta Filho H. 2005a. Fungos, procariotos e doenças abióticas. En: de Mattos Junior D, De Negri JD, Pio RM, Pompeu Junior J. [Eds.]. Citros. Centro APTA Citros. Campinas, SP: Instituto Agronômico e Fundag, Centro APTA. pp. 509 - 566.
- Ferraz Laranjeira F, Feichtenberger E, Beozzo Bassanesi R, Bellato Spósito M. 2005b. Manejo integrado de doenças de citros. En: de Mattos Junior D, De Negri JD, Pio RM, Pompeu Junior J. [Eds.]. Citros. Campinas, SP: Instituto Agronômico e Fundag, Centro APTA. pp. 629 - 654.
- Fialho MB, Toffano L, Pozzobon Pedroso M, Augusto F, Pascholati SF, 2010. Volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* inhibit the in vitro development of *Guignardia citricarpa*, the

- causal agent of citrus black spot. *World Journal Microbiol Biotechnol*, 26: 925 - 932.
- Franco DAS, Bettiol W. 2002. Efeito de productos alternativos para o controle do bolor verde (*Penicillium digitatum*) em pós-colheita de citros. *Revista Brasileira Fruticultura*, 24(2): 569 - 572.
- Furlán RLE, López SN. 2007. Métodos bioautográficos. En: Zacchino SA, Gupta MP. [Eds.]. Manual de técnicas *in vitro* para la detección de compuestos antifúngicos. 1ª. Edición. Rosario: Cospus Editorial y Distribuidora. pp. 57 - 73.
- Gatto MA, Ippolito A, Linsalata V, Cascarano N, Nigro F, Vanadia S, Di Venere D. 2011. Activity of extracts from wild edible herbs against postharvest fungal diseases of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 61:72 - 82.
- Grover RK, Moore D. 1962. Toximetric studies of fungicides against the brown rot organisms *Sclerotinia fruticola* and *S. laxa*. *Phytopathology*, 52: 876 - 880.
- Gutiérrez MC, Droguet M. 2002. La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín Intexter (U.P.C.)*, 122: 35 - 41.
- Hadacek F, Greger H. 2000. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analysis*, 11: 137 - 147.
- Handa SS. 2008. An overview of extraction techniques for medicinal and aromatic plant. En: Handa SS, Singh Khanuja SP, Longo G, Rakesh DD. [Eds.]. *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. Trieste: ICS-UNIDO (International Centre for Science and High Technology). pp. 21 - 54.
- Herbert JA, Grech NM. 1985. A strain of *Guignardia citricarpa*, the citrus black spot pathogen, resistant to benomyl in South Africa. *Plant Disease*, 69: 1007.

- Hidalgo Góngora EI, Pérez Vicente L. 2010. Diferenciación morfológica, cultural y biológica de *Guignardia citricarpa* y *G. mangiferae* en frutos cítricos de Cuba. *Fitosanidad*, 14(3): 141 - 152.
- Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Garcia Cortez DA, Nakamura CV, Dias Filho BP. 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(7): 1027 - 1031.
- Holm Freiesleben S, Jäger AK. 2014. Correlation between plant secondary metabolites and their antifungal mechanisms – A Review. *Medicinal & Aromatic Plants*, 3(2): 1 - 6.
- Holmes GJ, Eckert JW. 1995. Relative fitness of Imazalil-resistant and – sensitive biotypes of *Penicillium digitatum*. *Plant Disease*, 79(10): 1068 - 1073.
- Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL. 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3(12): 1 - 24.
- Isman MB. 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, 19: 603 - 608.
- Jaramillo BE, Duarte E, Delgado W. 2012. Bioactividad del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* colombiano. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17(1): 54 - 64.
- Jardim CM, Jham GN, Dhingra OD, Freire MM. 2008. Composition and antifungal activity of the essential oil of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Chemical Ecology*, 34: 1213 - 1218.
- Juliani HR, Koroch A, Simon JE, Biurrun FN, Castellano V, Zygadlo JA. 2004. Essential oils from argentinean aromatic plants. En: XXVI International Horticultural Congress (IHC): Future for Medicinal and Aromatic Plants, Acta Horticulturae 629; 3 January 2004; Toronto, Canada. Toronto: International Society for Horticultural Science (ISHS). pp. 491 – 498.

- Kinay P, Mansour MF, Gabler FM, Margosan DA, Smilanick JL. 2007. Characterization of fungicide-resistant isolates of *Penicillium digitatum* collected in California. *Crop Protection*, 26: 647 – 656.
- Kotzé JM. 2000. Black spot. En: Garnsey, S.M., Graham J.H., Timmer, L.W. [Eds.]. Compendium of citrus diseases. St. Paul, Minesota, USA: The American Phytopathological Society Press. pp. 23 - 25.
- Kotzé JM. 1981. Epidemiology and Control of Citrus Black Spot in South Africa. *Plant Disease*, 65(12): 945 - 950.
- Kováts E. 1958. Gas chromatographic characterization of organic compounds. Part 1. Retention indices aliphatic halides, alcohols, aldehydes and ketones. *Helvetica Chimica Acta*, 41(7): 1915 - 1932.
- Kumar R, Dubey NK, Tiwari OP, Tripathi YB, Sinha KK. 2007. Evaluation of some essential oils as botanical fungitoxicants for the protection of stored food commodities from fungal infestation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87: 1737 - 1742.
- Kupper KC. 2009. Controle biológico de doenças de flores e frutos jovens de Citros. En: Bettiol W, Morandi MAB. [Eds.]. Biocontrole de Doenças de Plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente. pp. 289 - 297.
- Kyprianou M. 2006. Decisión de la Comisión de la Comunidad Europea 2006/473/CE. Diario Oficial de la Unión Europea. 8.7.2006. L 187/35-36. [En línea]. Consultado: 20 junio 2014. Disponible en: [http://www.agrodigital.com/upload/l_18720060708es00350036\[1\].pdf](http://www.agrodigital.com/upload/l_18720060708es00350036[1].pdf)
- Lado J, Pérez Faggiani E, De Nigris A, Dol I, Knochen M. 2013. Residuos en frutos de naranja del fungicida imazalil aplicado en postcosecha y su efecto en el control de moho verde. *Agrociencia Uruguay*, 17(2): 83- 90.
- Lado J, Luque E, Blanco O, Pérez Faggiani E. 2011. Evaluación de alternativas para el control poscosecha de aislamientos de *Penicillium digitatum* resistentes a imazalil. *Agrociencia Uruguay*, 15(1): 55 - 63.

- Lado J, Luque E, Silva G. 2010. Manejo de la poscosecha en cítricos: desafíos para la innovación en un mercado dinámico. *Revista INIA*, 22: 32 - 33.
- Lis-Balchin M, Deans SG, Eaglesham E. 1998. Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 13: 98 - 104.
- Manzano Santana P, Miranda M, Gutiérrez Y, García G, Orellana Y, Orellana-Manzano A. 2011. Efecto antiinflamatorio y antimicótico del extracto alcohólico y composición química del aceite de hojas de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (canilla de venado). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 16(1): 13 - 23.
- Marin R, Apel MA, Limberger RP, Raseira MCB, Pereira JFM, Zuanazzi JÂS, Henriques AT. 2008. Volatile components and antioxidant activity from some myrtaceous fruits cultivated in Southern Brazil. *Latin American Journal of Pharmacy*, 27(2): 172 - 177.
- McLafferty FW, Stauffer DB. 1991. The Wiley/NBS registry of mass spectral data, 5th ed. New York: Wiley and Sons.
- Mesa Arango AC, Bueno Sánchez JG, Betancur Galvis LA. 2004. Revisión de productos naturales con actividad antimicótica. *Revista Española de Quimioterapia*, 17(4): 325 - 331.
- MGAP/DIEA (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca - Dirección de Estadísticas Agropecuarias). 2013. Encuesta Citrícola "Primavera 2012" [En línea]. Montevideo, Uruguay. Consultado 05 junio 2014. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,754,O,S,0,MNU;E;27;9;MNU>
- Mondino P, Altier N, Vero S, Pereyra S, Folch C. 2014. Control biológico de enfermedades de plantas en Uruguay. Capítulo 17. En: Bettiol W, Rivera MC, Mondino P, Montealegre JR, Colmenárez YC. [Eds.]. Control Biológico de Enfermedades de Plantas en América Latina y el Caribe. Montevideo: Facultad de Agronomía, Udelar (CDU 632.937). ISBN: 978-9974-0-1091-8. pp. 339 - 369.

- Mondino P, Vero S. 2006. Control biológico de patógenos de plantas. Montevideo, Uruguay: Facultad de Agronomía (Unidad de Educación Permanente). 158p.
- Monteiro C, Rebellato L, Diaz L. 1997. Servicio de detección de resistencia a fungicidas de *Penicillium* spp. en plantas de empaque de citrus en Uruguay. En: Congreso Latinoamericano de Fitopatología (9º, 1997, Montevideo, Uruguay). Resúmenes. Montevideo, Uruguay: MGAP, Dirección General de Servicios Agrícolas. pp. 25 - 26.
- Montes Belmont R. 2009. Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Micología*, 29: 73 - 82.
- Montes Belmont R, Cruz Cruz V, Martínez Martínez G, Sandoval García G, García Licon R, Zilch Domínguez S, Bravo Luna L, Bermúdez Torres K, Flores Moctezuma HE, Carvajal Moreno M. 2000. Propiedades antifúngicas en plantas superiores. Análisis retrospectivo de investigaciones. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 18: 125-131.
- Montes F. 2012. Citricultura: plan estratégico y fase de ejecución. [En línea]. En: Anuario 2012 – OPYPA (Oficina de Programación y Política Agropecuaria), Montevideo, Uruguay: MGAP (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca). pp. 237-251. Consultado: 16 junio 2014. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/opypa/ANUARIOS/Anuario2012/material/pdf/21.pdf>
- Morais LAS, Castanha RF. 2011. Composição química do óleo essencial de duas amostras de carqueja coletadas em Paty do Alferes. *Horticultura Brasileira*, 29(2): S4874-S4879.
- Morais LAS. 2009a. Óleos essenciais no controle fitossanitário. En: Bettiol W, Morandi MAB. [Eds.]. Biocontrol de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente. pp. 139-152.
- Morais LAS. 2009b. Influência dos factores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *Horticultura Brasileira*, 27(2): S4050-S4063.

- Nascimento JC, Barbosa LCA, Vanderlucia FP, David JM, Fontana R, Silva LAM, França RS. 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils *Ocimum canum* Sims. and *Ocimum selloi* Benth. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 83(3): 1 - 7.
- Palou L. 2013. Mini-review: Heat treatments for the control of citrus postharvest green mold caused by *Penicillium digitatum*. En: Méndez-Vilas, A. [Ed.]. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education, Vol. 1. Badajoz, Spain: Formatex Research Center. pp. 508 - 514.
- Palou L, Smilanick JL, Droby S. 2008. Alternatives to conventional fungicides for the control of citrus postharvest green and blue moulds. *Stewart Postharvest Review*, 2(2): 1 - 16.
- Pauli A, Schilcher H. 2007. In vitro antimicrobial activities of essential oils monographed in the European Pharmacopoeia 6th Edition. En: Schwalber R, Steele-Moore L, Goodwin AC. [Eds.]. Antimicrobial susceptibility testing protocols. Florida: CRC Press, Taylor & Francis Group. pp. 353 - 547.
- Pattnaik S, Subramanyam VR, Bapaji M, Kole CR. 1997. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios*, 89: 39 - 46.
- Pérez Faggiani E, Alves P. 2011. Estudios para elaborar una propuesta de manejo integrado para la mancha negra de los cítricos. Resultados de Avances, período 2006-2010. Montevideo: INIA (Serie de Actividades de Difusión N° 648). 30p.
- Pérez Faggiani E, Lado J, Luque E, Blanco O, Alves P, Silva G. 2009. Hacia un manejo integrado y sustentable de *Penicillium* en poscosecha de cítricos. Montevideo: INIA (Serie Actividades de Difusión N° 597). 25 p.
- Picoli T, Dourado MT, Dourado AS, Nascente PS, Nascimento SLS. 2007. Efeito do óleo esencial de *Baccharis trimera* (carqueja) frente a levaduras. [En línea]. Consultado: 13 febrero 2014. Disponible en: http://www2.ufpel.edu.br/cic/2007/cd/pdf/CB/CB_01199.pdf.

- Possiede YM, Garbardo J, Kava-Cordeiro V, Galli-Terasawa LV, Azevedo JL, Glienke C. 2009. Fungicide resistance and genetic variability in plant pathogenic strains of *Guignardia citricarpa*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40: 308 - 313.
- Rahman A, Al-Reza SM, Kang SC, 2011. Antifungal activity of essential oil and extracts of *Piper chaba* Hunter against phytopathogenic fungi. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88: 573 – 579.
- Retta D, Dellacassa E, Villamil J, Suárez SA, Bandoni AL. 2012. Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: a review. *Industrial Crops and Products*. 38: 27 - 38.
- Retta D, Gattuso M, Gattuso S, Di Leo Lira P, van Baren C, Ferraro G, Bandoni A. 2009. Essential oil composition of *Achyrocline flaccida* (Weinm) DC. (*Asteraceae*) from different locations of Argentina. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36: 877 - 881.
- Ricciardi GAL, Veglia JF, Ricciardi AIA, Bandoni AL. 1999. Examen comparado de la composición de los aceites esenciales de especies autóctonas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. Sección de comunicaciones científicas y tecnológicas de la U.N.N.E. Consultado: julio 2014. Disponible en: <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/exactas/e-029.pdf>
- Rios JL, Recio MC, Villar A. 1988. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*, 23: 127 - 149.
- Rodov V, Nafussi B, Ben-Yehoshua S. 2011. Essential oil components as potential means to control *Penicillium digitatum* Pers. (Sacc.) and other postharvest pathogens of citrus fruit. *Fresh Produce*, 5(1): 43 - 50.
- Rodrigues MBC, Andreote FD, Bellato Spósito MB, Aguillar-Vildoso CI, Araújo WL, Pizzirani-Kleiner AA. 2007. Resistência a benzimidazóis por *Guignardia citricarpa*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42(3): 323 - 327.

- Saj OP, Roy RK, Savitha SV. 2008. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oil of *Feijoa sellowiana* O. Berg. (pineapple guava). *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 2(1): 227 - 230.
- Sánchez-González L, Vargas M, González-Martínez C, Chiralt A, Cháfer M. 2011. Use of essential oils in bioactive edible coatings. *Food Engineering Reviews*, 3: 1 - 16.
- Sayago JE, Ordoñez RM, Negrillo Kovacevich L, Torres S, Isla MI. 2012. Antifungal activity of extracts of extremophile plants from the Argentine Puna to control citrus postharvest pathogens and green mold. *Postharvest Biology and Technology*, 67: 19 - 24.
- Shaaban HAE, El-Ghorab AH, Shibamoto T. 2012. Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components: Review. *The Journal of Essential Oil Research*, 24(2): 203 - 212
- Silva NCC, Fernandes Júnior A. 2010. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. Review Article. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 16(3): 402 - 413.
- Simões-Pires CA, Debenedetti S, Spegazzini E, Mentz LA, Matzenbacher NI, Limberger RP, Henrique AT. 2005. Investigation of the essential oil from eight species of *Baccharis* belonging to sect. *Caulopterae* (Asteraceae, Astereae): a taxonomic approach. *Plant Systematics and Evolution*, 253: 23 - 32.
- Smilanick JL, Mansour MF, Gabler FM, Sorenson D. 2008. Control of citrus postharvest green mold and sour rot by potassium sorbate combined with heat and fungicides. *Postharvest Biology and Technology*, 47: 226 - 238.
- Soković M, Galmočlija J, Ćirić A, Kataranovski D, Marin PD, Vukojević J, Brkić D. 2012. Antifungal activity of the essential oils and components *in vitro* and *in vivo* on experimentally induced dermatomycoses at rats. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 7(3): 959 - 966.

- Soler E, Dellacassa E, Moyna P. 1986. Composition of *Aloysia gratissima* leaf essential oil. *Phytochemistry*, 25(6): 1343 - 1345.
- Spotts RA, Cervantes LA. 1986. Populations, pathogenicity, and benomyl resistance of *Botrytis* spp., *Penicillium* spp., and *Mucor piriformis* in packinghouses. *Plant Disease*, 70:106 - 108.
- Stashenko E. 2010. Estudio comparativo de la composición y la actividad biológica de aceites esenciales de *Lippia alba*, de diferentes regiones de Colombia. En: Dellacassa E. [Ed.]. Normalización de productos naturales obtenidos de especies de la flora aromática Latinoamericana. Porto Alegre: EdiPucrs. pp. 173 - 193.
- Stashenko EE, Jaramillo BE, Martínez JR. 2003. Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. *Revista Academica Colombiana de Ciencia*, 27(105): 579 - 598.
- Stat Analysis System Institute Inc. 2008. SAS/STAT 9.2 Users guide. Cary, North Caroline: SAS Institute Inc. USA.
- Stefanello MEA, Pascoal ACRF, Salvador MJ. 2011. Essential oils from neotropical Myrtaceae: chemical diversity and biological properties. Review. *Chemistry & Biodiversity*, 8(1): 73 - 94.
- Tabassum N, Vidyasagar GM. 2013. Antifungal investigations on plant essential oils. A review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5: 19 - 28.
- Talibi I, Boubaker H, Boudyach EH, Aoumar AAB. 2014. Alternative methods for the control of postharvest citrus diseases - Review article. *Journal of Applied Microbiology*, 117: 1 - 17.
- Tao N, Jia L, Zhou H. 2014. Antifungal activity of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Food Chemistry*, 153: 265 - 271.
- Torres AM, Ricciardi GAL, Agrelo de Nassiff AE, Ricciardi AIA, Bandoni AL. 2003. Aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L., (paico macho). *Facena*, 19: 27 - 32.

- Tripathi P, Dubey NK, Banerji R, Chansouria JPN. 2004. Evaluation of some essential oils as botanical fungitoxicants in management of post-harvest rotting of citrus fruits. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20: 317 - 321.
- Vaillant Flores D, Romeu Carballo C, Ramos Ramos E, González García M, Ramírez Ochoa R, González Pentón J. 2009. Efecto inhibitorio *in vitro* de cinco monoterpenos de aceites esenciales sobre un aislado de *Rhizoctonia solani* en papa (*Solanum tuberosum* L.). *Fitosanidad*, 13(3): 197 - 200.
- Vituro C, Bandoni A, Dellacassa E, Atti Serafini L, Elder H. 2010. Problemática *Schinus* en Latinoamérica. En: Dellacassa, E. [Ed.]. Normalización de productos naturales obtenidos de especies de la flora aromática Latinoamericana. Porto Alegre: EdiPucrs. pp. 205 - 280.
- Vivot Lupi, E.P., Sánchez Brizuela, C.I., Cacik Jeifetz, F., Sequin Acosta, C.J., 2009. Tamizaje de la actividad antifúngica de extractos de especies de la flora de Entre Ríos. *Rev. Cubana Farm.* 43, 74 - 84.
- Voon HC, Bhat R, Rusul G. 2012. Flower extracts and their essential oils as potential antimicrobial agents fo food uses and pharmaceutical applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11: 34 - 55.
- Weston RJ. 2010. Bioactive products from fruit of the feijoa (*Feijoa sellowiana*, Myrtaceae): A review. *Food Chemistry*, 121: 923 - 926.
- Wilson CL, Solar JM, El Ghaouth A, Wisniewski ME. 1997. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*, 81: 204 - 210.
- Zapata B, Durán C, Stashenko E, Betancur-Galvis L, Mesa-Arango AC. 2010. Actividad antimicótica y citotóxica de aceites esenciales de plantas de la familia Asteraceae. *Revista Iberoamericana de Micología*, 27(2): 101 - 103.

7. ANEXOS

7.1. INTRODUCCIÓN

Cuadro 1. Principales enfermedades que afectan a los cítricos en Uruguay, manejo sanitario y problemas vinculados al patógeno en la postcosecha.

Patógeno	Agente causal	Enfermedad	Manejo ^a sanitario	Problemas en postcosecha
Hongos	<i>Phytophthora citriophora</i>	Gomosis	Portainjerto R	
	<i>Diaporthe citri</i> (<i>Phomopsis citri</i>)	Melanosis	MI	
	<i>Alternaria citri</i>	Alternaria	MI	
	<i>Elsinoe fawcetti</i> <i>Elsinoe australis</i>	Sarna	MI	Cuarentenaria
	<i>Guignardia citricarpa</i> (<i>Phyllosticta citricarpa</i>)	Mancha negra	MI	Largo período de incubación Cuarentenaria
	<i>Penicillium digitatum</i>	Moho verde	MI (CQ)	Nº fungicidas Residuos Resistencia
	<i>Penicillium italicum</i>	Moho azul	MI (CQ)	Nº fungicidas Residuos
Bacterias	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	Cancro cítrico	MI	Cuarentenaria
Virus	Citrus Tristeza Virus	Tristeza	Portainjerto R	
	Citrus Psorosis Virus	Psorosis	Material sano	
Viroides	Citrus Exocortis Viroid	Exocortis	Material sano	

^a R: portainjertos resistentes; MI: manejo integrado, (CQ): con énfasis en control químico.

7.2. MATERIALES Y MÉTODOS

7.2.1. Material vegetal

Cuadro 2. Especies vegetales descartadas y sus motivos.

Família	Especie vegetal	Nombre vulgar	Órg. ^a Utilizado	Motivo del descarte ^b
Anacardiaceae	<i>Schinus molle</i>	Anacahuita	Raquis	Laboriosa y escasa obtención del material para destilar, pero altos rendimientos (1%)
Apiaceae	<i>Apium sellowianum</i>	Apio cimarrón	Semilla	Disponibilidad de material
	<i>Eryngium horridum</i>	Caraguatá	Hojas	Muy bajo rendimiento (0.01%), material de difícil manipulación
Asteraceae	<i>Ambrosia tenuifolia</i>	Altamisa	p.a.	Bajo rend. (0.1%) e insegura identificación de la variedad
	<i>Senecio grisenbachii</i>	Senecio	Hojas	Producción de gas tóxico y rendimiento bajo (0.09)
Fabaceae	<i>Acacia caven</i>	Espinillo	Flores	Muy bajo rend., resinoso y de laboriosa manipulación
	<i>Bauhinia candicans</i>	Pata de vaca	Hojas	Muy bajo rend. y extenso tiempo para extracción (4 h)
Laminaceae	<i>Hyptis floribunda</i>	Verbena negra	p.a.	Bajo rendimiento (0.16 %) e insegura identificación
	<i>Salvia guaranitica</i>	Salvia azul	p.a.	Rendimiento despreciable
Myrtaceae	<i>Acca sellowiana</i>	Guayabo del país	Hojas	Las primeras experiencias en extraer el AE se hizo con muestras procedentes de INIA SG
	<i>Eugenia uniflora</i>	Pitanga	h y f	De primavera: AE verde, descartado por ser diferente al de verano: AE rojo.
	<i>Hexachlamy edulis</i>	Ubajay	Flores	Se pasó la fecha de la florac.
			Hojas	Sin rendimiento (0%)
<i>Mrrcianthes pungens</i>	Guaviyú	Hojas	Bajo rendimiento (0.07 %)	
Sapindaceae	<i>Allophyllus edulis</i>	Chal chal	Hojas	Bajo rend. (0.2 %) y falta de antecedentes antifúngicos
Verbenaceae	<i>Lantana cámara</i>	Lantana	h y f	Bajo rendimiento (0.08 %)
	<i>Lantana montevidensis</i>	Lantana lila	h y f	Bajo rendimiento (0.15 %)
	<i>Lippia alba</i>	Lipia	h y f	Diferente origen (silvestre), podría variar composición, altos rendimientos (> 2 %)

^a Org.: órgano utilizado, p.a.: parte aérea, h y f: hojas y flores. ^b rend.: rendimiento en AEs.



Figura 1. *Schinus molle*: hojas, frutos e hidrodestilación de hojas.



Figura 2. *Achyrocline flaccida*: planta, secado y AE de flores.



Figura 3. *Baccharis dracunculifolia*: planta y rama florecida.



Figura 4. *B. trimera*.



Figura 5. *Conyza bonariensis*: plantas, material secado y AE.



Figura 6. *Pluchea sagittalis*: plantas y AE.



Figura 7. *Chenopodium ambrosioides*: planta, inflorescencias y AE.

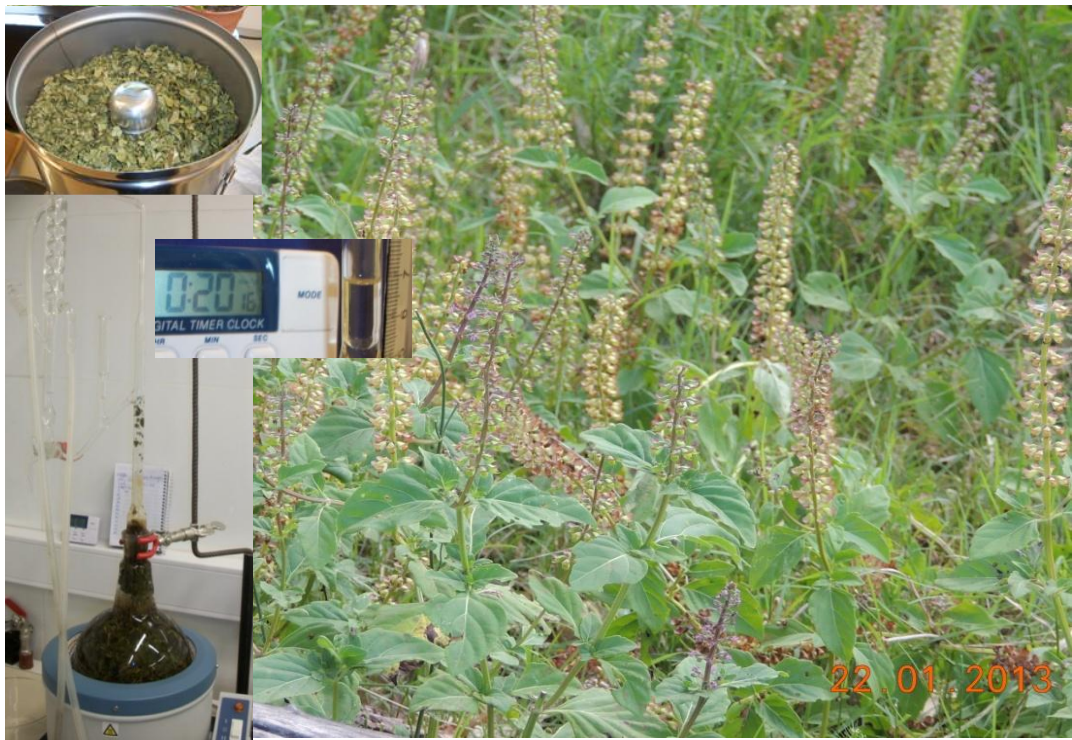


Figura 8. *Ocimum selloi*: plantas florecidas, molienda y AE.



Figura 9. *Blepharocalyx salicifolia*: árbol, hojas y AE.



Figura 10. *Acca sellowiana*: árbol, flores y secado del material.



Figura 11. *Eugenia uniflora*: planta y AE de la brotación de verano.



Figura 12. *Psidium cattleianum*: árbol, de hojas y frutos, secado del material.



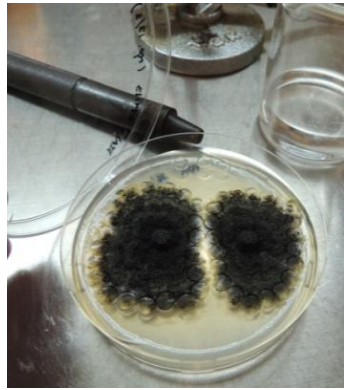
Figura 13. *Aloysia gratissima*: planta, detalle de la inflorescencia y AE.



Figura 14. *Lippia alba*: rama, detalle de hojas y flores, AE.

7.2.2. Bioensayos

7.2.2.1. Test de Fase Volátil



G. citricarpa o *P. digitatum*

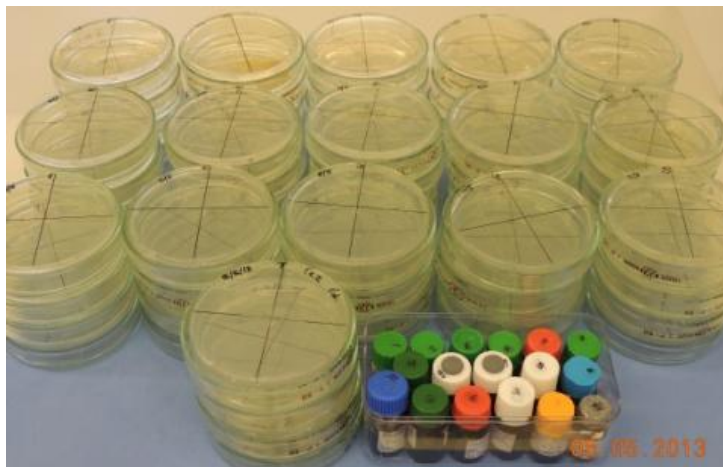
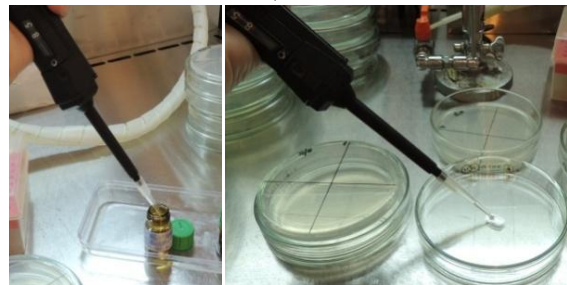
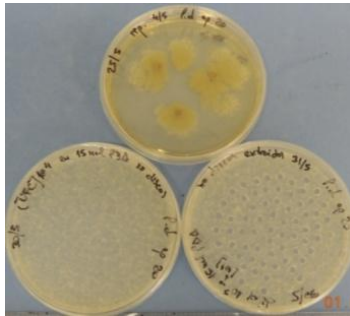
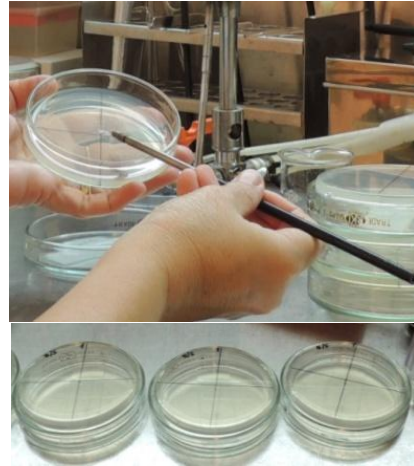


Figura 15. Pasos para la preparación del TFV con *P. digitatum*.

7.2.2.2. Test de Dilución en Agar



Figura 16. Protocolo de preparación para el TDA con *G. citricarpa*.

7.2.2.3. Test de Microdilución en caldo

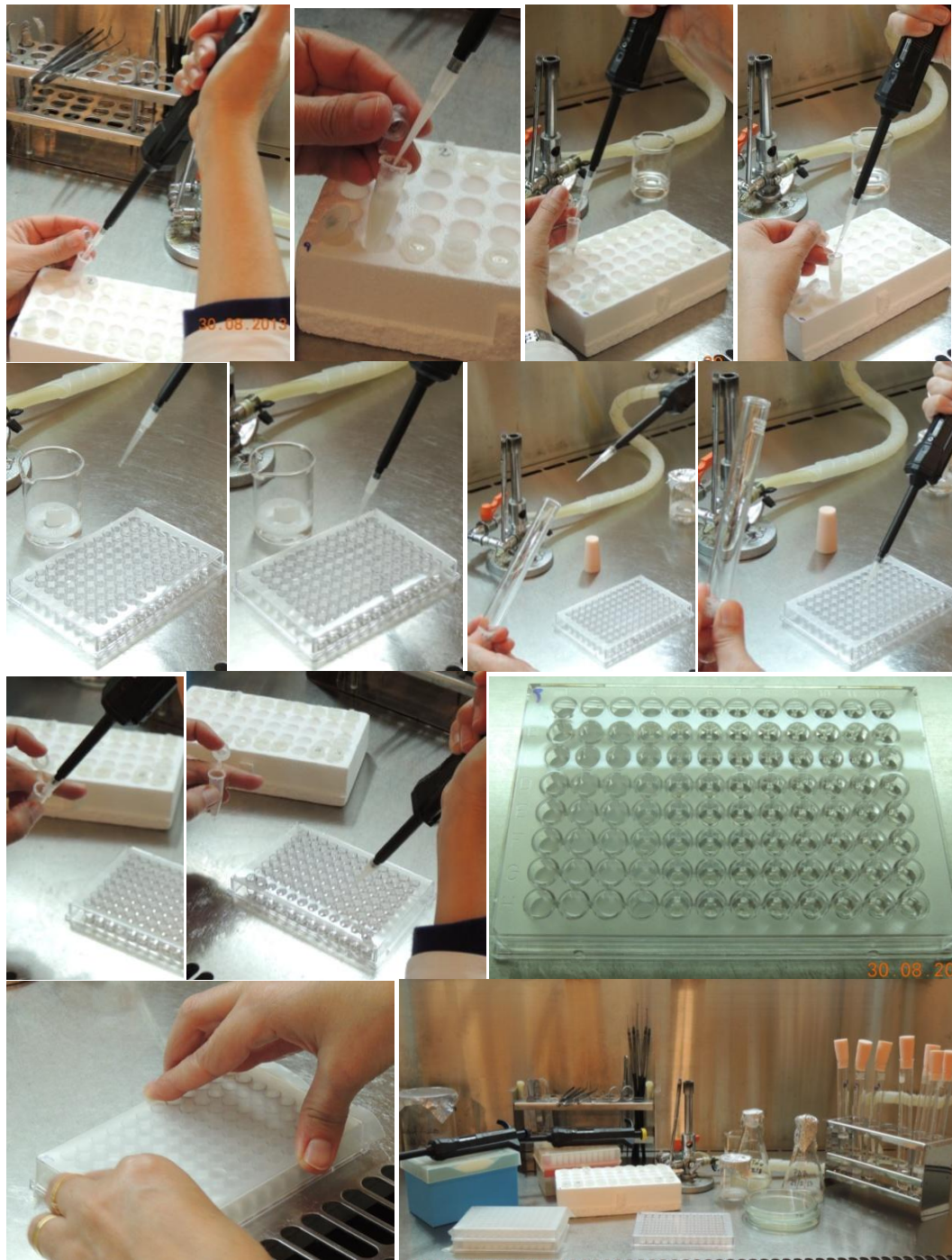


Figura 17. Protocolo del armado de las placas para realizar el Test de Microdilución en caldo para *P. digitatum*.

Protocolo Microdilución para evaluar sustancias naturales (MIC)

1) *Materiales por aceite esencial y cepa del patógeno a testar:*

1 placa de ELISA (96 pocillos) estéril de fondo plano, 24 Eppendorf de 1,5 mL estériles, 10 mL de DMSO estéril, 12 mL de PDB estéril, suspensión de esporas del hongo (10^4 ufc/mL), cantidad necesaria de tips estériles de 1000, 200 y 2 μ L, cámara de Neubauer, microscopio, soporte para Eppendorf, agua tritonada (0,01 %), 4 placas con PDA para recuento del hongo.

2) *Procedimiento:*

Colocar en el soporte para Eppendorf 2 filas (A y B) con 12 tubos de 1,5 mL. En la fila A colocar en el tubo 1= 925 μ L de DMSO y 500 μ L en los tubos del 2 al 12. En el tubo 1 completar (1000 μ L) con 75 μ L del AEs a testar, mezclar bien y transferir 500 μ L de la suspensión del tubo 2 al 3, cambiando de tips en cada transferencia repetir el procedimiento desde el tubo 3 al 10. En la fila B colocar 900 μ L de PDB en los tubos del 1 al 12. Transferir 100 μ L de la suspensión de los tubos de la fila A a sus homónimos de la B, cambiando el tips para cada transferencia, tapar todos los Eppendorf.

Realizar una suspensión de esporas (no menos de 5 mL) y ajustar al orden de 10^4 ufc/mL, mediante recuento en cámara de Neubauer o lectura de absorbancia (*P. digitatum*: abs. 625, blanco 0,000, concentración $10^6 = 0,100$). Posteriormente realizar una dilución al décimo y sembrar en placas con PDA 10 y 100 mL de esta suspensión (2 placas por cada dilución).

En la placa de ELISA sembrar 100 μ L de la suspensión de cada tubo de la fila B de los Eppendorf en la columna homónima de la placa (completar los 8 pocillos por tubo). En los pocillos de las 4 filas superiores (A-D) completar con 100 μ L de la suspensión del hongo y en las 4 filas inferiores (E-H) con 100 μ L de agua tritonada. Sellar la placa e incubar en las condiciones ideales para el crecimiento del patógeno a testar.

7.3. RESULTADOS

7.3.1. Bioensayos con *Guignardia citricarpa*

7.3.1.1. Test de Fase Volátil

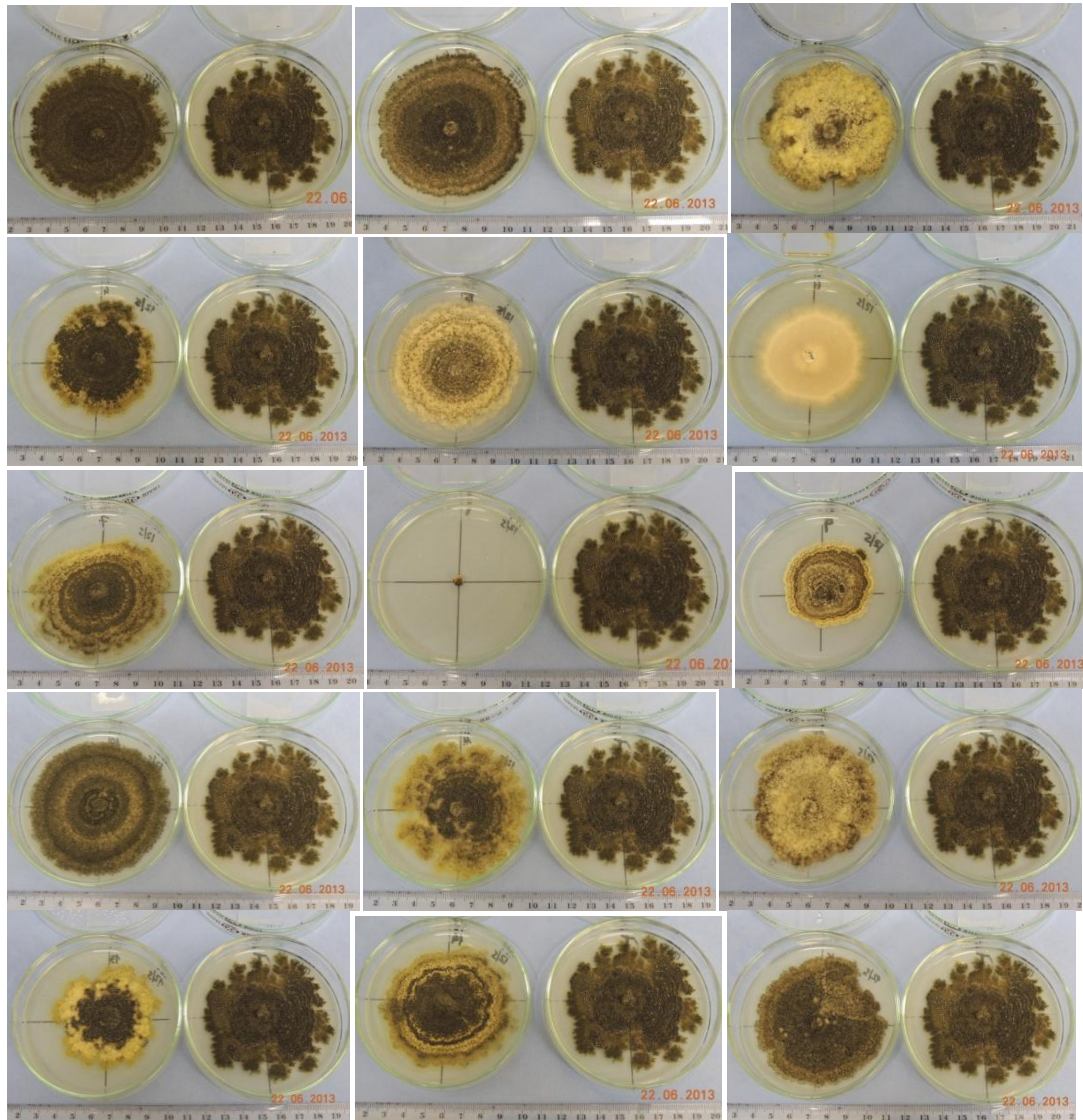


Figura 18. TFV, resultados a los 40 días, AE vs. Control (derecha de c/placa), orden: *S. molle* H, *S. molle* Fr, *A. flaccida*, *B. dracunculifolia*, *B. trimera*, *C. bonariensis*, *P. sagittalis*, *Ch. ambrosioides*, *O. selloi*, *B. salicifolia*, *A. sellowiana*, *P. cattleianum*, *A. gratissima* y *L. alba*.

7.3.1.2. Test de Dilución en Agar

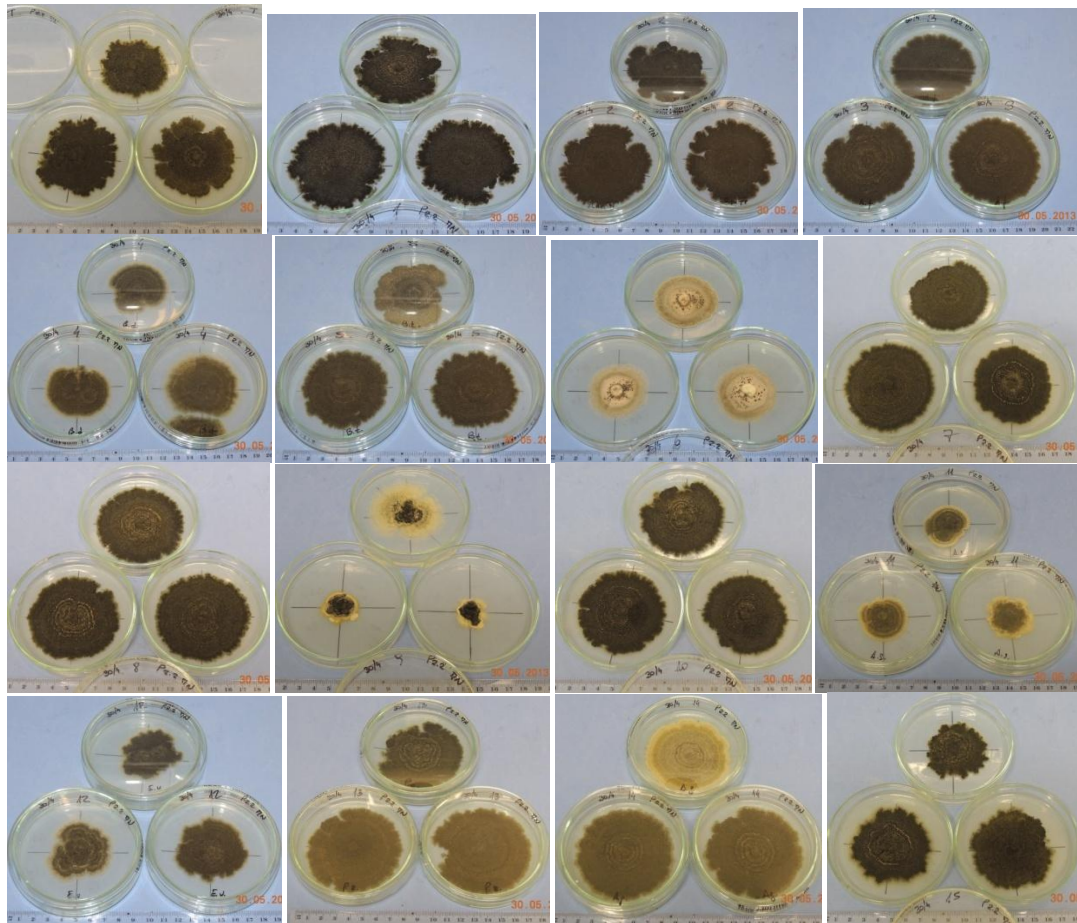


Figura 20. TDA crecimiento de *G. citricarpa* a los 30 días (segunda fecha), de derecha a izquierda: Control, *S. molle* H, *S. molle* Fr, *A. flaccida*, *B. dracunculifolia*, *B. trimera*, *C. bonariensis*, *P. sagittalis*, *Ch. ambrosioides*, *O. selloi*, *B. salicifolia*, *A. sellowiana*, *P. cattleianum*, *A. gratissima* y *L. alba*.

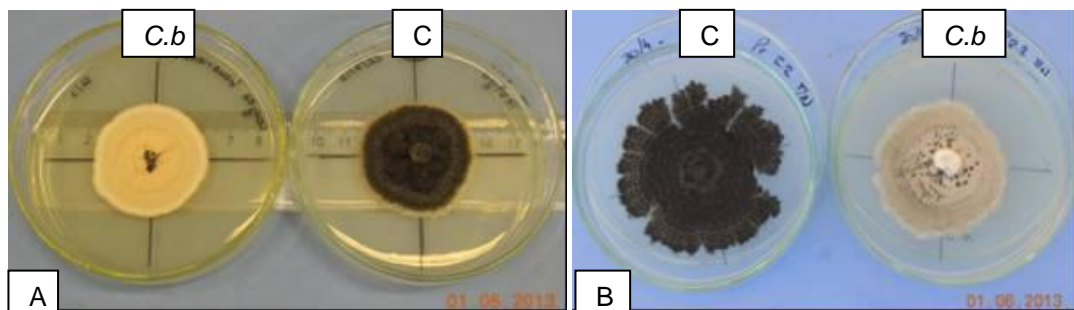


Figura 21. Inhibición de la esporulación de *Guignardia citricarpa* por el AE de *Conyza bonariensis* (C.b) en comparación con el tratamiento Control (C). Test de Fase Volatil (A), Test de Dilution en Agar (B).

7.3.2. Bioensayos con *Penisillium digitatum*

7.3.2.1. Test de Fase Volátil

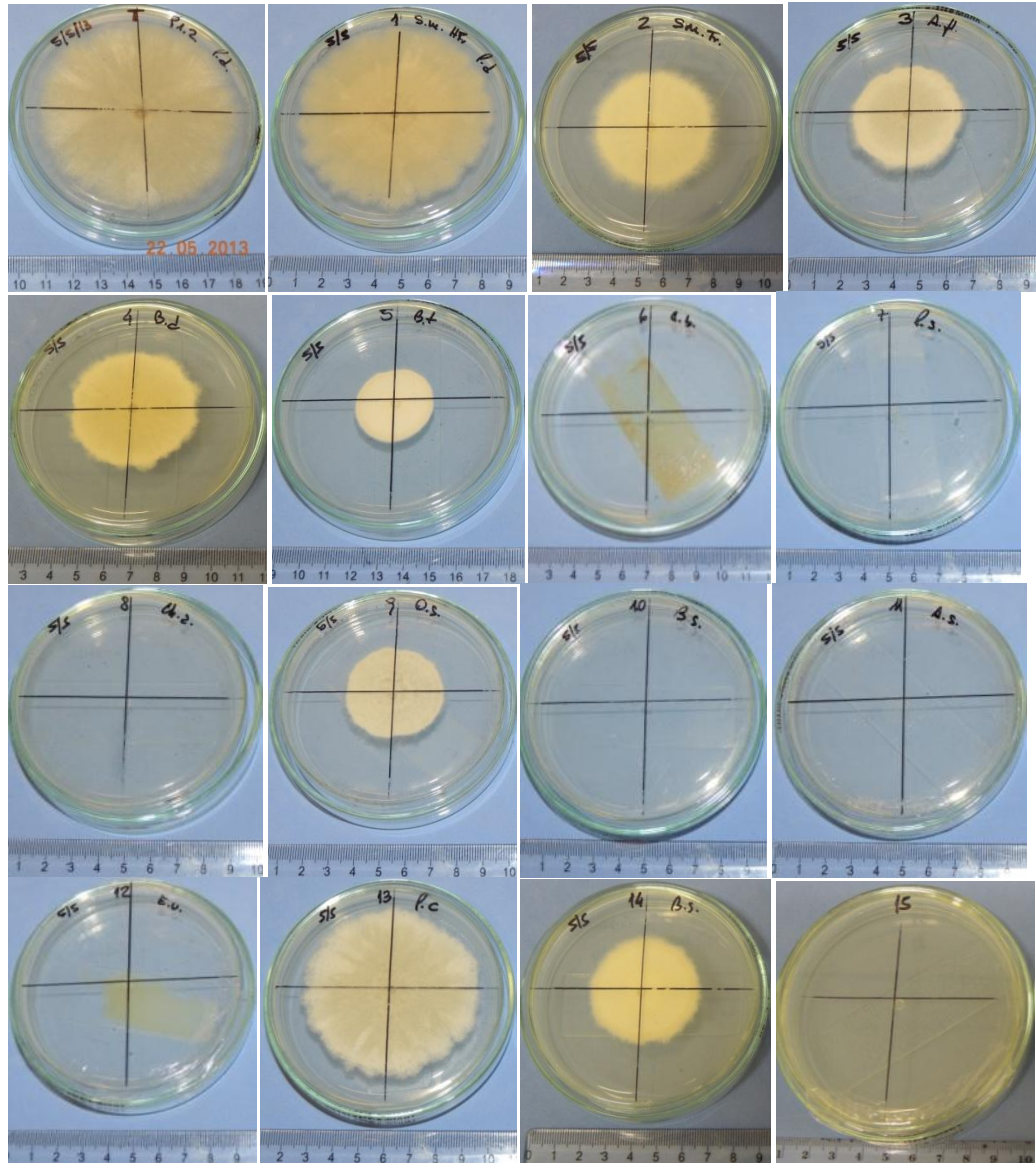


Figura 24. TFV con *P. digitatum* al final de la evaluación.

T: Control, 1: *S. molle* H, 2: *S. molle* Fr, 3: *A. flaccida*, 4: *B. dracunculifolia*, 5: *B. trimera*, 6: *C. bonariensis*, 7: *P. sagittalis*, 8: *Ch. ambrosioides*, 9: *O. selloi*, 10: *B. salicifolia*, 11: *A. sellowiana* 13: *P. cattleianum* y 14: *A. gratissima* y 15: *L. alba*.

7.3.2.2. Tamizado de los AEs - Bioautografía/TLC

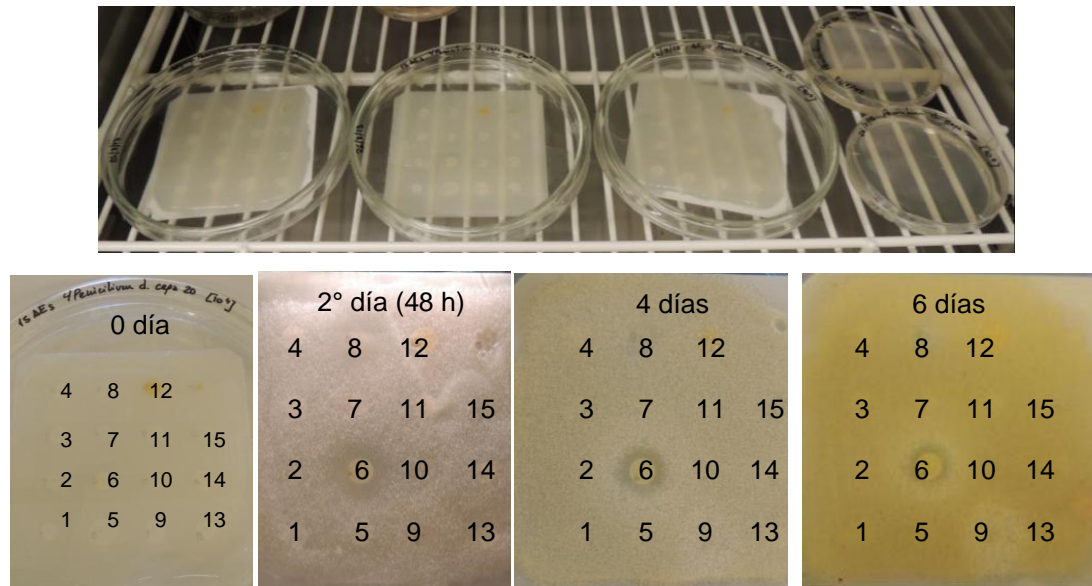


Figura 25. Tamizado de los 15 AEs con *P. digitatum* (10^4 ufc/mL) y halos inhibitorios de *C. bonariensis* (6), *Ch. ambrosioides* (8) y *O. selloi* (9).

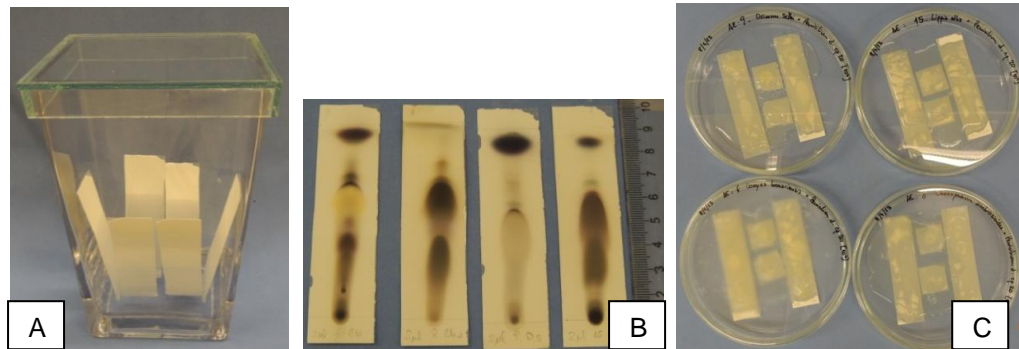


Figura 26. Cámara de corrida de las TLC (A), cromatogramas revelados (B) y placas de Petri conteniendo la Bioautografía sobre TLC (C).

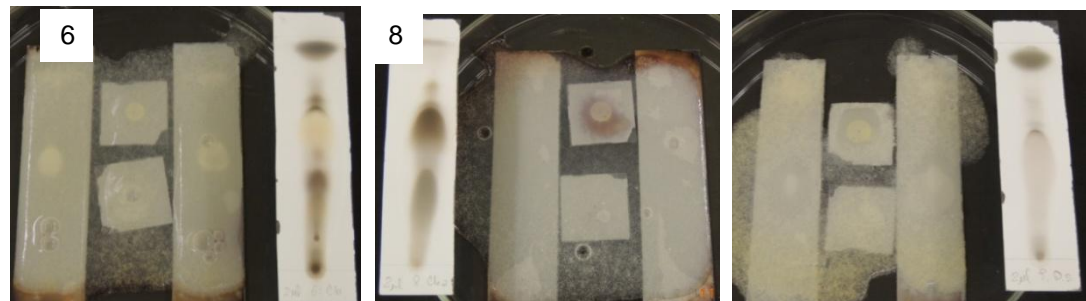


Figura 27. Bioautografías/TLC, AEs de *C. bonariensis* (6), *Ch. ambrosioides* (8) y *O. selloi* (9) mostrando inhibición sobre *P. digitatum* (48 h).