

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE  
METABOLITOS PRESENTES EN PLANTAS AROMÁTICAS  
NATIVAS PARA EL CONTROL DE PATÓGENOS DE  
CÍTRICOS.**

**MARIA NOELIA UMPIERREZ MARICHAL**

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**2016**



**TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE:  
MAGÍSTER EN QUÍMICA**

**Directores:**

**Dr. Eduardo Dellacassa**

**Msc. Elena Pérez**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis directores de tesis el Dr. Eduardo Dellacassa y la Msc. Elena Pérez por su dirección, asesoramiento y oportunidades que me brindaron durante el transcurso de mi tesis, aportando ideas y conocimiento que llevaron a la realización de este trabajo.

A mis compañeros de Laboratorio de Farmacognosia y Biotecnología de Aromas quienes de alguna manera colaboraron en la realización de este trabajo.

A toda la gente de INIA Salto Grande que siempre me recibieron con mucha amabilidad. Y especialmente a los integrantes del Laboratorio de Fitopatología que me ayudaron muchísimo en el desarrollo de las pruebas.

A la Msc. Lic. Bioq. Sylvia Vázquez por su gran ayuda en el análisis estadístico de los datos.

A la ANII y PEDECIBA Química, por la financiación para la realización de esta investigación.

Por último quiero agradecer a Zelmar, a Maguie, a mi familia y amigos que siempre me han dado su amor y apoyo dándome siempre aliento para continuar.

## CONTENIDO TEMÁTICO

1. ANTECEDENTES.....	15
2. MARCO TEÓRICO .....	16
2.1. GENERALIDADES DE LOS ACEITES ESENCIALES .....	16
2.1.1. Definición y composición química .....	16
2.1.2. Clasificación de los aceites esenciales.....	18
2.1.3. Biogénesis de los aceites esenciales .....	19
2.1.4. Extracción de los aceites esenciales.....	21
2.2. ANÁLISIS QUÍMICO DE LOS ACEITES ESENCIALES.....	25
2.3. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES.....	27
2.4. PLANTAS NATIVAS SELECCIONADAS PARA LA EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES .....	29
2.4.1. Descripción botánica de <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown.....	29
2.4.2. Descripción botánica de <i>Aloysia gratissima</i> (Gill. et Hook) Tronc.	30
2.4.3. Descripción botánica de <i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC. ....	32
2.5. GENERALIDADES SOBRE LOS HONGOS FITOPATÓGENOS: <i>Guignardia citricarpa</i> Y <i>Penicillium digitatum</i> .....	33
2.5.1. <i>Guignardia citricarpa</i> .....	33
2.5.2. <i>Penicillium digitatum</i> .....	35
3. OBJETIVOS.....	37
3.1. OBJETIVO GENERAL .....	37
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	37
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38

4.1.	ENTIDADES DONDE SE DESARROLLÓ LA INVESTIGACIÓN .....	38
4.2.	RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.....	38
4.3.	OBTENCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES .....	40
4.4.	ANÁLISIS QUÍMICO DE LOS ACEITES ESENCIALES.....	42
4.5.	CEPAS .....	43
4.6.	BIOENSAYOS REALIZADOS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES. ....	43
4.6.1.	<i>Test de fase volátil</i> .....	44
4.6.2.	<i>Test de dilución en agar</i> .....	45
4.7.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	46
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	47
5.1.	EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES.....	47
5.2.	IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES POR CROMATOGRAFÍA DE GASES .....	49
5.3.	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS AEs CONTRA <i>Penicillium digitatum</i> y <i>Guignardia citricarpa</i> .....	66
5.3.1.	<i>Test de fase volátil</i> .....	66
5.3.2.	<i>Test de dilución en agar</i> .....	79
6.	CONCLUSIONES .....	82
7.	REFERENCIAS .....	84
8.	ANEXOS.....	98
8.1.	ANEXO 1: CROMATOGRAMAS DE LOS ACEITES ESENCIALES. ....	98

8.2.	ANEXO 2: ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	105
8.2.1.	<i>Evaluación de las diferencias en los rendimientos de extracción de los aceites esenciales.....</i>	<i>105</i>
8.2.2.	<i>Evaluación de las diferencias en los tratamientos en cada día de los AEs contra Penicillium digitatum y Guignardia citricarpa.....</i>	<i>106</i>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Algunos de los componentes principales de los aceites esenciales. A. Hidrocarburos monoterpénicos, B. Monoterpenos oxigenados, C. Hidrocarburos sesquiterpénicos, D. Sesquiterpenos oxigenados, E. Fenilpropanos.....	17
Figura 2. Vista simplificada de las principales vías de biosíntesis de los metabolitos secundarios y su interrelación con el metabolismo primario (Taiz & Zeiger, 2002).....	21
Figura 3. Técnicas de extracción de aceites esenciales: a. Destilación por arrastre con vapor; b. Hidrodestilación; c. Hidrodestilación asistida por microondas; d. Extracción con solventes supercríticos y e. Enfleurage. ....	22
Figura 4. Diagrama de bloques de un cromatógrafo de gases típico. Basado en (Skoog, et al., 2005).....	25
Figura 5. Diagrama de bloques de un espectrómetro de masas. Basado en (Skoog, et al., 2005).....	27
Figura 6. <i>Lippia alba</i> (Mill) N. E. Brown hoja y flor.....	30
Figura 7. <i>Aloysia gratissima</i> (Gill. et Hook) Tronc .....	31
Figura 8. <i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC. ....	32
Figura 9. Principales síntomas de la Mancha negra de los cítricos. A: Mancha dura. B: Mancha trincada. C: Mancha recortada. D: Mancha pecosa. E: Mancha virulenta. F: Falsa melanosis (Pérez Faggiani, et al., 2012).....	35
Figura 10. Naranja infectada con <i>Penicillium digitatum</i> , se pueden observar el micelio color blanco y en el centro las esporas color verde (López-Pérez, Ballester, & González-Candelas, 2011) .....	36

Figura 11. Lugares de colecta del material vegetal indicados con una estrella y sus correspondientes coordenadas.....	39
Figura 12. Trampa de destilación tipo Clevenger de acuerdo a la Farmacopea Europea. Las dimensiones expuestas son en milímetros. ....	40
Figura 13. Sistema de hidrodestilación. A: manta eléctrica, B: balón de 2000mL, C: trampa tipo Clevenger y mangueras que conectan el sistema de refrigeración. ....	41
Figura 14. Programa de temperatura utilizado en la identificación de los aceites esenciales por GC-MS. ....	42
Figura 15. Incorporación del disco del hongo sobre el medio de cultivo PDA. ....	45
Figura 16. Porcentaje de rendimiento del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> en estado de floración, vegetación, recolectadas en Norte y Sur del País. ....	48
Figura 17. Porcentaje de rendimiento del aceite esencial de <i>Aloysia gratissima</i> en estado de floración, vegetación, recolectada en Norte y Sur del País. ....	49
Figura 18. Porcentaje de rendimiento del aceite esencial de <i>Baccharis trimera</i> en estado de floración, vegetación, recolectada en Norte y Sur del País. ....	49
Figura 19. Agrupado de los componentes de los aceites esenciales de <i>Lippia alba</i> . MH: Monoterpenos hidrocarbonados. MO: Monoterpenos oxigenados. SH: Sesquiterpenos hidrocarbonados. SO: Sesquiterpenos oxigenados. O: otros. ...	54
Figura 20. Dendograma del Análisis de Cluster de los aceites esenciales de <i>Lippia alba</i> , utilizando el método de Ward basado en distancias euclídeas entre grupos. ....	54
Figura 21. Agrupado de los componentes de los aceites esenciales de <i>Aloysia gratissima</i> . MH: Monoterpenos hidrocarbonados. MO: Monoterpenos oxigenados. SH: Sesquiterpenos hidrocarbonados. SO: Sesquiterpenos oxigenados. O: otros. ....	60

Figura 22. . Dendograma del Análisis de Cluster de los aceites esenciales de <i>Aloysia gratissima</i> , utilizando el método de Ward basado en distancias euclídeas entre grupos. ....	61
Figura 23. Agrupado de los componentes de los aceites esenciales de <i>Baccharis trimera</i> . MH: Monoterpenos hidrocarbonados. MO: Monoterpenos oxigenados. SH: Sesquiterpenos hidrocarbonados. SO: Sesquiterpenos oxigenados. O: otros. ....	65
Figura 24. Dendograma del Análisis de Cluster de los aceites esenciales de <i>Baccharis trimera</i> , utilizando el método de Ward basado en distancias euclídeas entre grupos. ....	65
Figura 25. Efecto de los AEs de <i>Lippia alba</i> sobre el crecimiento micelar de <i>Penicilium digitatum</i> . ....	67
Figura 26. Efecto de los AEs de <i>Lippia alba</i> sobre el crecimiento micelar de <i>Guignardia citricarpa</i> . ....	69
Figura 27. Efecto de los AEs de <i>Aloysia gratissima</i> sobre el crecimiento micelar de <i>Penicilium digitatum</i> . ....	72
Figura 28. Efecto de AEs de <i>Aloysia gratissima</i> sobre el crecimiento micelar de <i>Guignardia citricarpa</i> . ....	73
Figura 29. Efecto de los AEs de <i>Baccharis trimera</i> sobre el crecimiento micelar de <i>Penicilium digitatum</i> . ....	76
Figura 30. Efecto de AEs de <i>Baccharis trimera</i> sobre el crecimiento micelar de <i>Guignardia citricarpa</i> . ....	78
Figura 31. Efecto de los AEs de <i>Lippia alba</i> en dilución sobre el crecimiento micelar de <i>Penicilium digitatum</i> . ....	79
Figura 32. Efecto de los AEs de <i>Aloysia gratissima</i> en dilución sobre el crecimiento micelar de <i>Penicilium digitatum</i> . ....	80

Figura 33. Efecto de los AEs de <i>Baccharis trimera</i> en dilución sobre el crecimiento miceliar de <i>Penicilium digitatum</i> . .....	80
Figura 34. Efecto de AEs de <i>Lippia alba</i> en dilución sobre el crecimiento miceliar de <i>Guignardia citricarpa</i> . .....	81
Figura 35. Efecto de AEs de <i>Aloysia gratissima</i> en dilución sobre el crecimiento miceliar de <i>Guignardia citricarpa</i> . .....	81
Figura 36. Efecto de los AEs de <i>Baccharis trimera</i> en dilución sobre el crecimiento miceliar de <i>Guignardia citricarpa</i> . .....	82
Figura 37. Cromatograma del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> proveniente del Sur de Uruguay en estado de floración. ....	98
Figura 38. Cromatograma del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> proveniente del Sur de Uruguay en estado vegetativo. ....	99
Figura 39. Cromatograma del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> proveniente del Norte de Uruguay en estado de floración. ....	99
Figura 40. Cromatograma del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> proveniente del Norte de Uruguay en estado vegetativo. ....	100
Figura 41. Cromatograma del aceite esencial de <i>Aloysia gratissima</i> proveniente del Sur de Uruguay en estado de floración. ....	100
Figura 42. Cromatograma del aceite esencial de <i>Aloysia gratissima</i> proveniente del Sur de Uruguay en estado de vegetativo. ....	101
Figura 43. Cromatograma del aceite esencial de <i>Aloysia gratissima</i> proveniente del Norte de Uruguay en estado de floración. ....	101
Figura 44. Cromatograma del aceite esencial de <i>Aloysia gratissima</i> proveniente del Norte de Uruguay en estado de vegetación. ....	102

Figura 45. Cromatograma del aceite esencial de <i>Baccharis trimera</i> proveniente del Sur de Uruguay en estado de floración. ....	102
Figura 46. Cromatograma del aceite esencial de <i>Baccharis trimera</i> proveniente del Sur de Uruguay en estado de vegetativo. ....	103
Figura 47. Cromatograma del aceite esencial de <i>Baccharis trimera</i> proveniente del Norte de Uruguay en estado de floración. ....	103
Figura 48. Cromatograma del aceite esencial de <i>Baccharis trimera</i> proveniente del Norte de Uruguay en estado de vegetativo .....	104

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los aceites esenciales (Martinez, 2003).....	19
Tabla 2. Fecha de recolección del material vegetal y número de destilaciones realizadas.....	39
Tabla 3. Rendimiento de extracción de los aceites esenciales .....	47
Tabla 4. Composición química del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> en estado de floración y vegetativo recolectadas en el Norte y Sur del País. IK: Índice de Kovats, tr: trazas. ....	52
Tabla 5. Composición química del aceite esencial de <i>Aloysia gratissima</i> en estado de floración y vegetativo recolectadas en el Norte y Sur del País. IK: Índice de Kovats. ....	57
Tabla 6. Compuestos mayoritarios de aceites esenciales de <i>Aloysia gratissima</i> en distintas regiones. Valores de concentración expresados en porcentajes de área relativos. * Distintas épocas de colecta. ....	61
Tabla 7. Composición química del aceite esencial de <i>Baccharis trimera</i> en estado de floración y vegetativo recolectadas en el Norte y Sur del País. IK: Índice de Kovats. ....	63
Tabla 8. Índice de inhibición del crecimiento radial de <i>Penicillium digitatum</i> en placas tratadas aceites esenciales de <i>Lippia alba</i> .....	68
Tabla 9. Índice de inhibición del crecimiento radial de <i>Guignardia citricarpa</i> en placas tratadas aceites esenciales de <i>Lippia alba</i> .....	70
Tabla 10. Índice de inhibición del crecimiento radial de <i>Penicillium digitatum</i> en placas tratadas aceites esenciales de <i>Aloysia gratissima</i> . ....	72
Tabla 11. Índice de inhibición del crecimiento radial de <i>Guignardia citricarpa</i> en placas tratadas aceites esenciales de <i>Aloysia gratissima</i> . ....	74

Tabla 12. Índice de inhibición del crecimiento radial de <i>Penicillium digitatum</i> en placas tratadas aceites esenciales de <i>Baccharis trimera</i> . .....	76
Tabla 13. Índice de inhibición del crecimiento radial de <i>Guignardia citricarpa</i> en placas tratadas aceites esenciales de <i>Baccharis trimera</i> . .....	78
Tabla 14. ANOVA para los rendimientos de extracción de los aceites esenciales. ....	105
Tabla 15. Test de comparación de medias de Tukey para los rendimientos de extracción de los aceites esenciales. En rosado se marcan aquellos que presentan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). .....	105
Tabla 16. ANOVA para cada día de los tratamientos realizados con AEs de <i>Lippia alba</i> contra <i>Penicillium digitatum</i> . .....	106
Tabla 17. Test de comparación de medias de Tukey en cada día para los distintos tratamientos con AEs de <i>Lippia alba</i> contra <i>Penicillium digitatum</i> . En rosado se marcan aquellos que presentan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). .....	107
Tabla 18. ANOVA para cada día de los tratamientos realizados con AEs de <i>Aloysia gratissima</i> contra <i>Penicillium digitatum</i> . .....	108
Tabla 19. Test de comparación de medias de Tukey en cada día para los distintos tratamientos con AEs de <i>Aloysia gratissima</i> contra <i>Penicillium digitatum</i> . En rosado se marcan aquellos que presentan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )... ..	109
Tabla 20. ANOVA para cada día de los tratamientos realizados con AEs de <i>Baccharis trimera</i> contra <i>Penicillium digitatum</i> . .....	110
Tabla 21. Test de comparación de medias de Tukey en cada día para los distintos tratamientos con AEs de <i>Baccharis trimera</i> contra <i>Penicillium digitatum</i> . En rosado se marcan aquellos que presentan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).....	111
Tabla 22. ANOVA para cada día de los tratamientos realizados con AEs de <i>Lippia alba</i> contra <i>Guignardia citricarpa</i> .....	112

Tabla 23. Test de comparación de medias de Tukey en cada día para los distintos tratamientos con AEs Lippia alba contra Guignardia citricarpa. En rosado se marcan aquellos que presentan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). .....	113
Tabla 24. ANOVA para cada día de los tratamientos realizados con AEs de Aloysia gratissima contra Guignardia citricarpa.....	114
Tabla 25. Test de comparación de medias de Tukey en cada día para los distintos tratamientos con AEs Aloysia gratissima contra Guignardia citricarpa. En rosado se marcan aquellos que presentan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).....	115
Tabla 26. ANOVA para cada día de los tratamientos realizados con AEs de Baccharis trimera contra Guignardia citricarpa.....	116
Tabla 27. Test de comparación de medias de Tukey en cada día para los distintos tratamientos con AEs de Baccharis trimera contra Guignardia citricarpa. En rosado se marcan aquellos que presentan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )...	117

## 1. ANTECEDENTES

En Uruguay los cítricos han sido uno de los rubros agrícolas que ha logrado desarrollar diferentes productos con características competitivas para la exportación. En particular, la cantidad total anual exportado de fruta fresca de cítricos es de aproximadamente 120 mil toneladas, lo que representa un valor estimado de 92 millones de dólares (Uruguay XXI, 2015). Desde la década del setenta del siglo pasado, se logró comercializar fruta cítrica fresca a mercados muy exigentes como el de los países miembros de la Unión Europea. En el 2013, gracias al Programa Nacional de Investigación en Producción cítrica, Uruguay logró acceder al mercado de cítricos en Estados Unidos, bajo un acuerdo que establece un estricto control sanitario, controlado por auditorías anuales (Uruguay XXI, 2015). Es por esto que para fortalecer la presencia comercial en el exterior, conquistando y manteniendo los mercados con fuerte poder adquisitivo, es necesario ofrecer una fruta que se destaque de los competidores reuniendo las condiciones de calidad exigidas, como lo son la ausencia de enfermedades cuarentenarias y la producción con un uso mínimo de agroquímicos.

Las frutas cítricas son susceptibles a la infección por distintos hongos, bacterias, fitoplasmas, micoplasmas, virus y viroides (Timmer, et al., 2000). Es así que, para que Uruguay mantenga su competitividad en el mercado debe preocuparse por la sanidad del producto, controlando los diferentes patógenos que causan enfermedades en los cítricos a lo largo de la cadena agroindustrial. Actualmente se utilizan fungicidas de síntesis (Ohkawa, et al., 2007) y el uso continuo de algunos de estos principios activos ha provocado la aparición de cepas resistentes en las plantas de empaque (Monteiro, et al., 1997), lo que ha ocasionado pérdidas y rechazos de las exportaciones en los mercados de destino.

Por estos motivos es que el desafío debería enfocarse en la búsqueda de nuevos productos inocuos que no perjudiquen el equilibrio ambiental y que posean bajo riesgo para la salud humana, permitiendo por lo tanto el desarrollo sustentable del mercado. En este sentido la búsqueda de biopesticidas elaborados en base a plantas nativas sería una alternativa interesante de control.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. GENERALIDADES DE LOS ACEITES ESENCIALES**

#### ***2.1.1. Definición y composición química***

Las plantas utilizan el carbono, nitrógeno y energía proveniente del sol para producir dos tipos de metabolitos: primarios y secundarios. Los metabolitos primarios son compuestos que cumplen funciones importantes en las plantas para su crecimiento y reproducción, siendo algunos de ellos los; aminoácidos, proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos (Taiz & Zeiger, 2006). Los metabolitos secundarios, son sustancias orgánicas de bajo peso molecular que no cumplen un papel esencial en el desarrollo de las plantas. Sin embargo, estos compuestos desempeñan un papel importante en la interacción de las plantas con su entorno, aportándoles ciertas ventajas. Se conocen más de 20 mil estructuras de metabolitos secundarios, las cuales presentan una composición química muy variada. Dentro de este grupo se encuentran los alcaloides, terpenos, cumarinas, taninos, flavonoides (Sepúlveda-Jiménez, 2003). Los metabolitos secundarios cumplen importantes roles en las plantas, funcionan como mecanismo de defensa frente a predadores y patógenos, regulan procesos de evaporación de agua, atraen polinizadores, entre otros (De Filippis, 2016).

Dentro de los metabolitos secundarios producidos por las plantas se encuentran los aceites esenciales (AEs). Estos son definidos por la Farmacopea Europea como un producto obtenido a partir de una planta mediante hidrodestilación, destilación con vapor, destilación en seco o por un proceso mecánico. Son producidos por estructuras especializadas en diferentes partes de la planta: hojas, flores, tallos, cáscara, frutos raíces y corteza (Azcón-Bieto & Talon, 2008; Alea, 2015 ).

Los aceites esenciales son fracciones líquidas volátiles, mezclas homogéneas compuestas principalmente por terpenos de bajo y medio peso molecular. Otros

compuestos que se presentan en los aceites esenciales son los fenilpropanoides, y compuestos alifáticos (alcanos, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos) (Figura 1) (Evans & Trease, 1991). Estos se emplean principalmente en la industria de la perfumería y cosmética, así como en la salud, con sus usos en aromaterapia y fitomedicina (Tiên Do, et al., 2015).

Los terpenos presentan una gran variedad estructural que provienen de la repetición de unidades ramificadas de cinco carbonos denominadas isopreno y se clasifican según el número de carbonos. Los monoterpenos (C<sub>10</sub>) y sesquiterpenos (C<sub>15</sub>) son los compuestos más frecuentes en los aceites esenciales, mientras que los diterpenos (C<sub>20</sub>) también se pueden encontrar pero en muy baja proporción debido a su baja volatilidad. (Bakkali, et al., 2008).

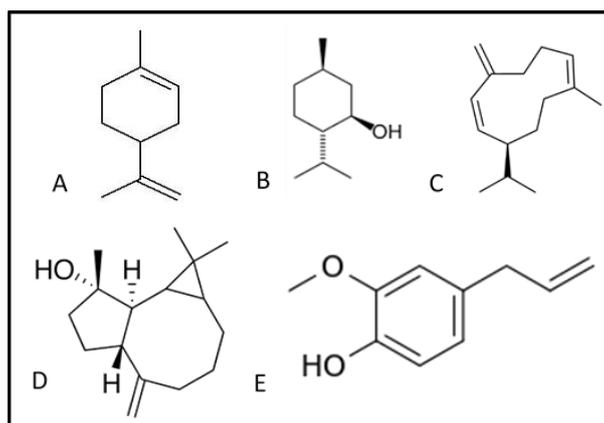


Figura 1. Algunos de los componentes principales de los aceites esenciales. A. Hidrocarburos monoterpénicos, B. Monoterpenos oxigenados, C. Hidrocarburos sesquiterpénicos, D. Sesquiterpenos oxigenados, E. Fenilpropanos.

La composición química de un aceite esencial se encuentra influida por varios factores, tanto intrínsecos a la especie vegetal así como extrínsecos a ella (Bandoni, 2002):

- Edad y estado vegetativo de la planta (Hudaib, et al., 2002).
- Parte de la planta utilizada en la extracción (hojas, flores, raíz, etc.) (Lonea, et al., 2014).

- Método de extracción del aceite esencial (Memarzadeh, et al., 2015).
- Condiciones geobotánicas: clima (lluvia, luminosidad, etc.), altitud, tipo de suelo (Djouahri, et al., 2015).
- Manejo agrícola: uso de fertilizantes sintéticos, abono, pesticidas, densidad de plantación, frecuencia de riego (Bandoni, 2002).
- Tratamiento en postcosecha: tiempo de oreado, almacenamiento, molienda (Bandoni, 2002).
- Variabilidad genética entre plantas: existen distintos quimiotipos (plantas de una misma especie que se diferencian entre sí por presentar diferente composición química) (Stashenko, et al., 2010).

Dado que estos factores pueden influir en la composición química de un aceite esencial, es imperioso la normalización de su obtención para poder tener un producto de calidad adecuada, con un mínimo de variabilidad.

### 2.1.2. Clasificación de los aceites esenciales

Los aceites esenciales se pueden clasificar basándose en distintos criterios (*Tabla 1*) de acuerdo al origen, la consistencia y la naturaleza de los componentes mayoritarios (Martinez, 2003; Alea, 2015).

Criterio	Características
Origen	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ <u>Naturales</u>: Se obtienen directamente de la planta y no se somete a ninguna modificación posterior.</li> <li>◆ <u>Artificiales</u>: Se obtienen a través de procesos de enriquecimiento del AE con uno o varios de sus componentes.</li> <li>◆ <u>Sintéticos</u>: Producidos por procesos de síntesis química.</li> </ul>
Consistencia	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ <u>Esencias fluidas</u>: Líquidos volátiles a temperatura ambiente.</li> <li>◆ <u>Bálsamos</u>: Consistencia más espesa, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de</li> </ul>

	<p>polimerización.</p> <p>◆ <u>Oleorresinas</u>: Líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas.</p>
Componentes Mayoritarios	<p>◆ <u>Monoterpenoides</u></p> <p>◆ <u>Sesquiterpenoides</u></p> <p>◆ <u>Fenilpropanoides</u></p>

Tabla 1. Clasificación de los aceites esenciales (Martínez, 2003).

### 2.1.3. Biogénesis de los aceites esenciales

Los compuestos volátiles que forman los aceites esenciales se pueden separar en dos grupos según su origen biosintético: en terpenos y terpenoides y en compuestos alifáticos y aromáticos (dentro de los que se encuentran los fenilpropanoides) (Alea, 2015). En la *Figura 2* se muestra la relación biosintética que existe entre los metabolitos secundarios y primarios.

Los compuestos volátiles provenientes de las plantas se originan principalmente de tres rutas biosintéticas:

- Vía de los ácidos grasos/ lipooxigenasa: esta vía es también llamada vía de los volátiles de hoja verde (VHV) y provienen a partir del ácido linoleico o ácido linolénico y sus hidroperóxidos. Estos derivados son fragmentados para formar el ácido 12-oxo-(Z)-9-dodecenóico y el (Z)-3-hexenal que luego mediante reordenamientos, reducciones o esterificaciones forman los compuestos VHV todos con 6 átomos de carbono. En esta vía las enzimas lipooxigenasa e hidroperóxido liasa son responsables de la catálisis en la formación de los VHV (Marín-Loaiza & Céspedes, 2007).
- Vía del mevalonato y vía del no mevalonato: Ambas vías tienen como intermediario el isopentenil pirofosfato (IPP) y según en qué compartimiento celular se sintetice (citosol o plastos) se forman los monoterpenos o sesquiterpenos. Cuando el IPP proviene del ácido

mevalónico la síntesis ocurre en el citosol, en donde dos moléculas de IPP se condensan con una de dimetil-alil-pirofosfato (DMAPP) y forman el farnesil pirofosfato (FPP), precursor de todos los sesquiterpenos. Cuando el IPP se sintetiza a partir del Deoxi-xilulosa-4-fosfato (DOXP) ocurre en los compartimentos plasmídicos, allí se transforma en su isómero DMAPP y se condensa con una molécula de IPP generándose el geranil pirofosfato (GPP), precursor de los monoterpenos (Marín-Loaiza & Céspedes, 2007).

- Vía del ácido shikímico: mediante esta vía se sintetizan los fenilpropanos, que contienen una o más unidades C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>, siendo C<sub>6</sub> un anillo bencénico. Los principales precursores de los fenilpropanos son el ácido cinámico y ácido p-hidroxicinámico, los cuales se originan a partir de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina, respectivamente. El ácido shikímico se sintetiza a partir de eritrosa 4-fosfato y fosfoenolpiruvato. La eliminación de uno de los alcoholes del anillo del ácido shikímico y la reacción con fosfoenol piruvato da el ácido chorismico. Es este compuesto quien forma el esqueleto de ácido fenilpropiónico. La aminación y la reducción de la cetona producen el aminoácido fenilalanina mientras que la reducción y la eliminación produce el ácido cinámico, quien a su vez produce ácidos *o*- y *p*- cumárico. Por otra parte, la aromatización del ácido shikímico da el ácido benzoico y derivados, presente en varios aceites esenciales (Vogt, 2010).

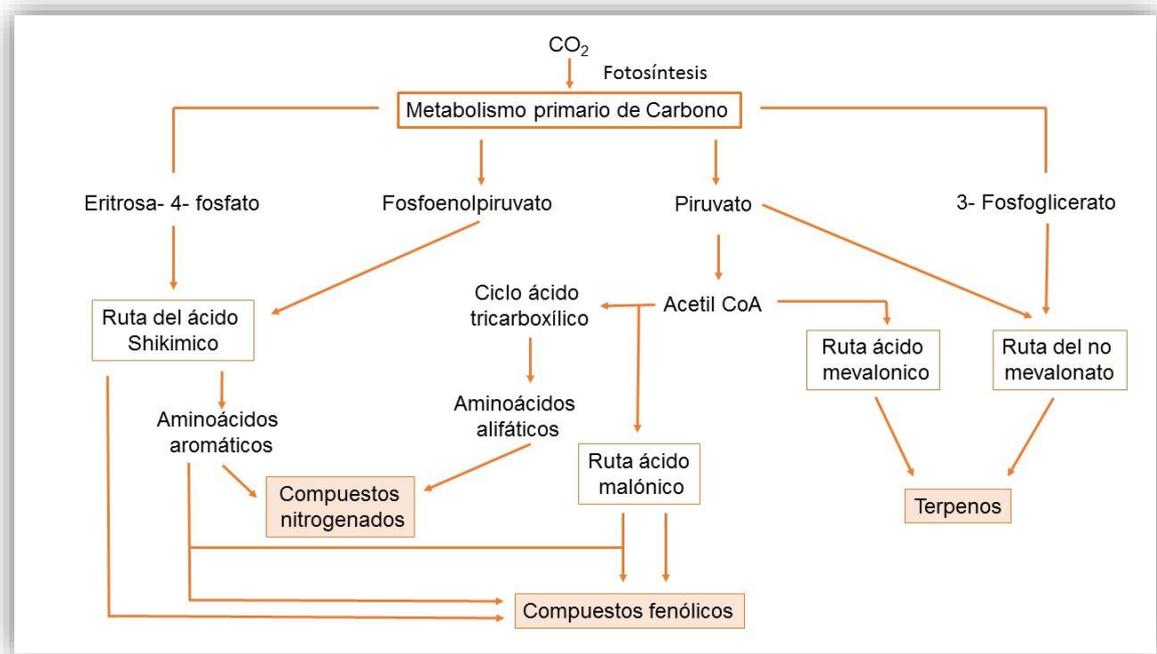


Figura 2. Vista simplificada de las principales vías de biosíntesis de los metabolitos secundarios y su interrelación con el metabolismo primario (Taiz & Zeiger, 2002).

#### 2.1.4. Extracción de los aceites esenciales

La extracción de los aceites esenciales puede ser realizada mediante distintas técnicas (Figura 3). Al momento de optar por una se debe de tener en cuenta varios factores; parte de la planta en donde se alojan los compuestos volátiles, la estabilidad de los componentes, el rendimiento, tipos de compuestos que se desea obtener, etc. Las técnicas más utilizadas se describen a continuación.

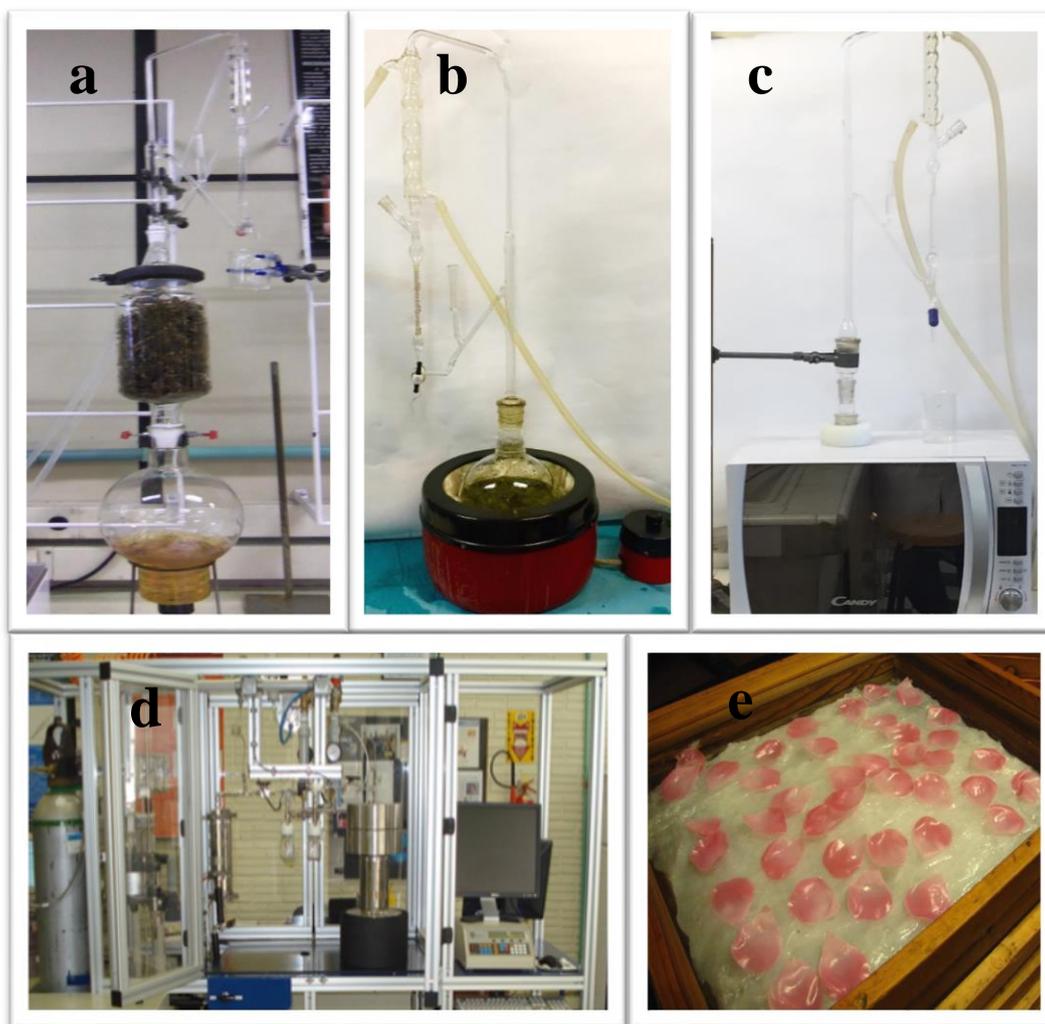


Figura 3. Técnicas de extracción de aceites esenciales: a. Destilación por arrastre con vapor; b. Hidrodestilación; c. Hidrodestilación asistida por microondas; d. Extracción con solventes supercríticos y e. Enfleurage.

#### 2.1.4.1. Destilación por arrastre con vapor

En la destilación de los AEs por arrastre con vapor de agua (*Figura 3a*) la planta y el agua no se encuentran inicialmente en contacto. Se coloca la planta en un vaso extractor por donde se le hace pasar vapor de agua, este vapor forma una fase inmisible que cederá su calor latente a la mezcla a destilar para lograr su evaporación. A medida que el material vegetal se va calentando se van liberando los compuestos volátiles, los cuales suben junto con el vapor de agua hasta un

condensador en donde la mezcla es enfriada (Cassel, et al., 2009). Luego, por diferencia de solubilidad, se separa la fase líquida de la oleosa (Cassel & Vargas, 2006; Peredo- Luna, et al., 2009).

#### **2.1.4.2. Hidrodestilación**

En este tipo de extracción el material vegetal y el agua están en íntimo contacto dentro de un balón, el cual se coloca sobre una manta térmica y es llevado a ebullición (*Figura 3b*). La solución acuosa se difunde a través de las membranas de las células y el aceite se vaporiza. El vapor de agua junto con los compuestos volátiles ascienden hasta un condensador en donde la mezcla es enfriada. Luego, por diferencia de solubilidad, se separan la fase líquida de la oleosa (Ortuño Sánchez, 2006; Benyoussef & Saibi, 2013).

#### **2.1.4.3. Hidrodestilación asistida por radiación microondas**

Este tipo de extracción comparte el fundamento de la hidrodestilación, salvo que la fuente de calor ya no es una manta térmica sino que es producida a través de microondas (*Figura 3c*). Dado que el material vegetal contiene agua, puede realizarse esta operación sin el agregado de agua extra. Este tipo de extracción tiene como ventaja la disminución del tiempo de extracción y del consumo energético (Peredo- Luna, et al., 2009; Schmidt, 2015; Farhat, et al., 2011).

#### **2.1.4.4. Extracción por solventes supercríticos**

La extracción con fluidos supercríticos puede ser definida como la solubilización de determinados compuestos de una matriz sólida en un solvente que se encuentra en condiciones supercríticas (*Figura 3d*). Durante la extracción el disolvente en estado supercrítico pasa por un contenedor de acero inoxidable en donde se encuentra empacado el material vegetal, así los compuestos son solubilizados y siguen hacia el recipiente colector y el solvente se elimina por descompresión hasta alcanzar presión y temperatura ambiente. Este método suele ser ventajoso ya que los tiempo de extracción son bajos, se obtienen altos rendimientos y menos consumo energético. Como desventaja presenta que otros

compuestos de alto peso molecular pueden ser extraídos junto con los aceites esenciales (Peredo- Luna, et al., 2009; Bertuccio & Franceschin, 2008).

#### **2.1.4.5. Enfleurage**

Esta técnica se utiliza para plantas con bajo contenido de AE y alto valor comercial. Este es el caso de los pétalos de flores que presentan un muy bajo rendimiento, por lo cual en caso de obtenerlo mediante destilación el AE, quedaría la mayor parte en el agua formando una microdispersión. El proceso consiste en depositar los pétalos sobre capas delgadas de grasa durante un período de tiempo determinado (*Figura 3e*). A medida que los pétalos se comienzan a marchitar son reemplazados hasta alcanzar una saturación total de la grasa. Cuando se llega a la saturación, se extrae con alcohol y luego se destila a baja temperatura para obtener un AE de alto valor comercial (Ortuño Sánchez, 2006).

#### **2.1.4.6. Expresión**

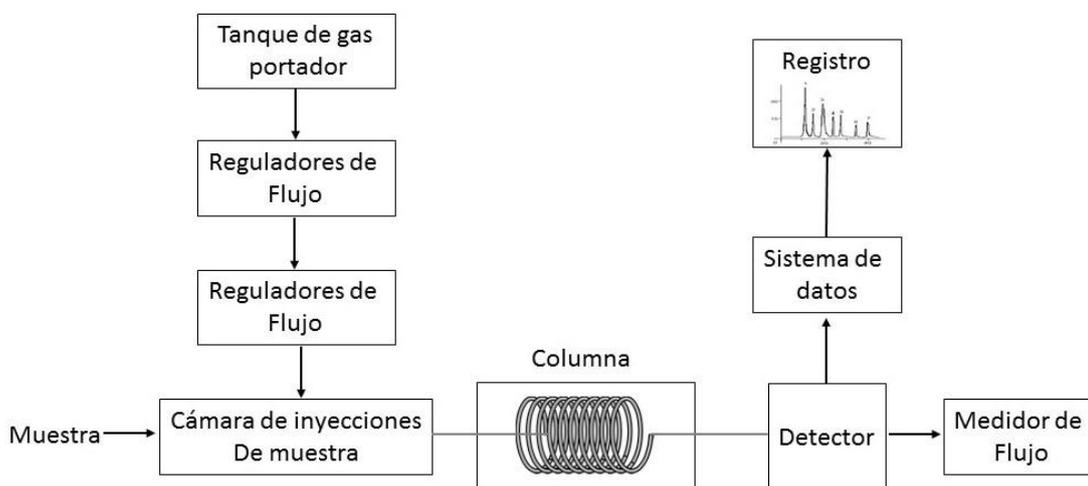
Es un método de extracción de AE de plantas o partes de plantas aplicando presión. Se utiliza comúnmente para obtener los AE de las frutas cítricas en donde el material vegetal es exprimido para liberar el AE y luego se separa de la emulsión formada con el agua por decantación, centrifugación o destilación fraccionada (Ortuño Sánchez, 2006; Elder, 2010).

#### **2.1.4.7. Extracción con solventes orgánicos**

En este método de extracción el material vegetal debe ser previamente molido para permitir mayor área de contacto con el solvente (etanol, cloroformo). Para lograr una mayor eficiencia de extracción es recomendable que el sólido y el líquido estén en continuo movimiento. Una vez culminada la extracción se debe evaporar el solvente a una temperatura lo más baja posible para no evaporar los compuestos de interés. El principal inconveniente que presenta esta técnica es que se extraen también otros compuestos apolares haciendo que el producto final sea un extracto impuro. Asimismo, pueden quedar residuos de los solventes, muchos de los cuales son tóxicos para la salud humana (Ortuño Sánchez, 2006).

## 2.2. ANÁLISIS QUÍMICO DE LOS ACEITES ESENCIALES

Actualmente la técnica más utilizada para el análisis de los aceites esenciales es la cromatografía gaseosa (GC). En esta técnica se utiliza un cromatógrafo de gases (*Figura 4*) en donde la muestra se inyecta, se volatiliza e ingresa en una columna cromatográfica, la cual se encuentra en un horno de temperatura controlada y programable, hasta llegar al detector. La muestra es separada por fenómenos de partición entre una fase móvil de un gas inerte (helio, hidrógeno, nitrógeno) y una fase estacionaria retenida en el interior de una columna cromatográfica (Skoog, West, et al., 2005; Dellacassa & Bandoni, 2011).



*Figura 4. Diagrama de bloques de un cromatógrafo de gases típico. Basado en (Skoog, et al., 2005).*

En cromatografía gaseosa los analitos se separan a lo largo de la columna dependiendo de la temperatura de la columna y de la naturaleza química del analito, de la fase móvil y de la estacionaria. Es así que cada analito tendrá un tiempo de retención ( $t_r$ ), que será característico de cada columna cromatográfica y de las condiciones operacionales utilizadas. (Stashenko & René, 2010). Dado que estos valores de  $t_r$  son susceptibles a las condiciones cromatográficas, es que se utilizan los índices de retención lineal (IR). Los IR son valores que solo dependen de la polaridad de la columna y pueden ser calculados a partir del  $t_r$  del analito y el

$t_r$  de una serie homologa de n-alcanos (Vandendool & Kratz, 1963). El IR se calcula con la siguiente fórmula:

$$IR = 100n + 100 \frac{tr_x - tr_n}{tr_N - tr_n}$$

Donde:

- n: número de carbonos que presenta el alcano que eluye a un tiempo de retención menor que el analito de interés.
- $tr_x$ : tiempo de retención del analito de interés.
- $tr_n$ : tiempo de retención del n-alcano que eluye antes del analito de interés.
- $tr_N$ : tiempo de retención del n-alcano que eluye después del analito de interés.

Los tiempos de retención son una importante herramienta para la identificación de los compuestos de un AE. Sin embargo, no son suficientes para lograr una identificación inequívoca ya que más de un compuesto puede presentar el mismo tiempo de retención. Es por ello que la identificación se complementa con el análisis del compuesto por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Es así que en el cromatógrafo los componentes se separan y se transfieren al detector de masas. El análisis por espectrometría de masas (*Figura 5*) comienza cuando la muestra entra a una fuente de ionización, donde sus moléculas se convierten en iones y se fragmentan. Luego los iones pasan al analizador, donde se separan según su relación masa/ carga. Finalmente los iones separados pasan al detector donde producen una señal eléctrica que se registra y representa en el sistema de datos (Skoog, et al., 2005).

Es así que en un análisis de un AE en GC-MS, cada compuesto se registra en forma de pico y se encuentra asociado a su respectivo espectro de masas. Por lo tanto, a partir de una mezcla compleja, mediante la comparación de bases de datos de espectros de masas e IR teóricos (Adams, 2007; Babushok, 2009) contra los resultados experimentales del compuesto en cuestión, se pueden identificar los componentes presentes en la muestra.

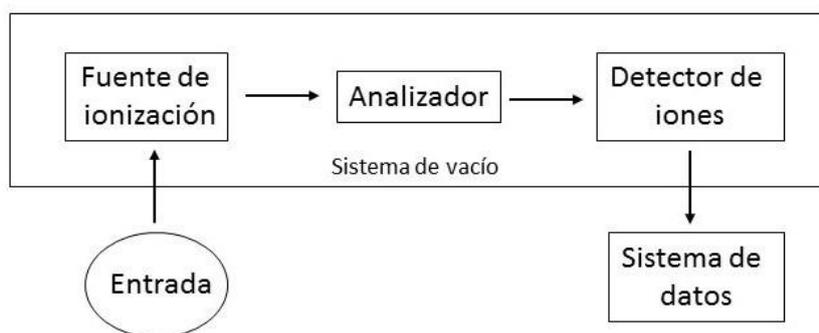


Figura 5. Diagrama de bloques de un espectrómetro de masas. Basado en (Skoog, et al., 2005)

### 2.3. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES

En nuestra flora nativa es posible encontrar moléculas novedosas con potencial uso antimicrobiano, que puedan sustituir total o parcialmente los pesticidas sintéticos (Umpiérrez, et al., 2016; Pérez Faggiani, et al., 2015). En particular, en los aceites esenciales, dada su gran variabilidad química, es posible encontrar diferentes actividades biológicas como: antifúngicos, antibacterianos, antivirales, anticancerígenos, antiinflamatorios, entre otras (Buchbauer, 2010; Raut & Karuppayil, 2014; Schelz, et al., 2006; Shahin et al., 2015). Dado que los aceites esenciales son mezclas complejas de numerosas moléculas, sus efectos biológicos son el resultado de la sinergia entre varios compuestos, lo hace que sea más difícil la aparición de cepas resistentes a los aceites (Bakkali, et al., 2008; Koul, et al., 2008).

Los aceites esenciales tienen cierta ventaja en su uso en tratamientos contra patógenos de postcosecha ya que, dada su gran volatilidad y capacidad de biodegradarse, por lo que es de esperar que se encuentre un nivel bajo o nulo de residuos en el producto final y a su vez poseen una gran aceptación por los consumidores, ya que actualmente son ampliamente usados en la industria alimentaria (Sivakumar & Bautista-Baños, 2014; Boubaker, et al., 2016),

Los compuestos activos de los aceites esenciales pueden tener distinta especificidad con respecto a los sitios diana de los microorganismos. Estos

pueden ser letales para las células o inhibir la producción de algún metabolito (López-Malo, Palou, & Alzamora, 2005).

En general, las bacterias Gram-negativas son menos susceptibles que las Gram-positivas a los aceites esenciales. Esto se debe a que las bacterias Gram-negativas contienen en sus membranas el lipopolisacárido que crea una barrera contra macromoléculas y moléculas hidrofóbicas (Nikaido, 2003). En los hongos los AEs pueden producir la lesión en la membrana citoplasmática así como producir una disminución del contenido de ergosterol, lo que resulta en la pérdida del contenido citoplasmático, con la consecuente pérdida de la viabilidad del hongo. (Pinto, et al., 2006; Park, et al., 2009). También los AEs pueden producir la permeabilización de la membrana mitocondrial, lo que conduce a la apoptosis y necrosis de las células (Raut & Karuppaiyil, 2014).

Se observa que existen muchos casos donde la actividad antimicrobiana reportada para aceites esenciales se encuentra asociada a la acción de compuestos fenólicos. Es por esto que se considera que los aceites esenciales con un alto contenido de fenoles presentan un gran potencial como antimicrobianos. Algunos de los compuestos fenólicos que han sido reportados como inhibidores de una gran variedad de microorganismos son el carvacrol, el timol y el eugenol (Davison & Naidu, 2000). Algunos de los mecanismos por el cual actúan los compuestos fenólicos son; alterando la permeabilidad de las membranas celulares, produciendo así la consiguiente pérdida de los componentes citoplasmáticos (López-Malo, et al., 2005), además pueden desnaturalizar las enzimas responsables de la germinación de esporas o interferir con los aminoácidos necesarios en los procesos de germinación (Nychas, 1995). Se cree además que su mecanismo depende de la concentración a la cual se encuentran; a bajas concentraciones afectan la actividad de enzimas encargadas de la producción de energía y a altas concentraciones produce la desnaturalización de proteínas (Tiwari, et al., 2009).

Los compuestos terpénicos oxigenados, han sido reportados por poseer actividad antimicrobiana, siendo los alcoholes más activos que los aldehídos y las cetonas.

En comparación con estos, los hidrocarburos terpénicos presentan menor actividad (Chalchat, et al., 1997).

## **2.4. PLANTAS NATIVAS SELECCIONADAS PARA LA EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES**

Las especies nativas son aquellas que crecen en el área biogeográfica de donde son originarias (Clérici, Torchán, et al., 2012). En Uruguay existe un número importante de especies que ya han sido ensayadas y utilizadas desde hace mucho tiempo con diversos fines (Brussa, et al., 2014). La búsqueda de nuevos usos para la flora nativa es muy importante para la valorización de la misma como recurso. A continuación se presentarán algunas características botánicas de las tres plantas elegidas como modelo en este trabajo: *Lippia alba*, *Aloysia gratissima* y *Baccharis trimera*. Estas plantas han sido utilizadas por nuestro grupo de trabajo y han demostrado potencialidad en su uso como fuente de compuestos antifúngicos (Umpiérrez, et al., 2016; Pérez Faggiani, et al., 2015).

### **2.4.1. Descripción botánica de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown**

Nombre científico: *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown.

Nombres comunes: Pronto alivio, juanilama, hierba luisa, erva cidreira, salvia morada, salvia trepadora.

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Lamiales

Familia: Verbenaceae

Género: *Lippia*

Especie: *Lippia alba*

*Lippia alba* (Mill) N. E. Brown es una planta perenne que se origina del bosque seco tropical y subtropical americano. Su distribución natural es amplia, encontrándose por todo el continente americano (Bandoni, 2002). Crece en forma de arbusto, con ramas largas que pueden alcanzar hasta los 2 metros. Presenta hojas simples opuestas o alternadas ovadas u oval-oblongas, cortamente pecioladas, con borde dentado de 2 a 7 cm de largo por 1,2 a 2,3 cm de ancho (Figura 6). Las flores son hermafroditas, con capítulos axilares, pedunculada, corola lilácea de 7 a 8 mm de longitud (Villamil, 2010; Tucker & Debaggio, 2009).



Figura 6. *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown hoja y flor.

Su uso tradicional en la medicina es a partir de la infusión de hojas y flores, su uso más difundido es para combatir trastornos gastrointestinales y digestivos. También se utiliza contra el resfriado, en cólicos hepáticos, como expectorante y febrífugo (Ciccio & Ocampo, 2010).

#### **2.4.2. Descripción botánica de *Aloysia gratissima* (Gill. et Hook) Tronc.**

Nombre científico: *Aloysia gratissima* (Gill. et Hook) Tronc.

Nombres comunes: Cedrón del monte, arrayan de campo, resedá del campo.

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Lamiales

Familia: Verbenaceae

Género: *Aloysia*

Especie: *Aloysia gratissima*

*Aloysia gratissima* (Gill. et Hook) Tronc, crece en forma de arbusto ramificado que puede alcanzar de 1 a 3 metros y forma matorrales densos. Su distribución natural abarca Estados Unidos, México, Brasil, Bolivia, Paraguay, Uruguay y Argentina. Presenta ramillas cuadrangulares, con braquiblastos de ápice agudo algo punzante. Presenta hojas simples, opuestas o alternadas lanceoladas a largamente elípticas, envés verde pálido o blanquecino. Las flores son hermafroditas, pequeñas, blancas abundantes, perfumadas, se disponen en panojas terminales o en largos racimos espiciformes axilares de 4 a 8 cm de longitud (*Figura 7*). Fruto seco, separándose en la madurez en dos mitades (mericarpios) grises (Brussa, et al., 2014; Siedo, 2006).



*Figura 7. Aloysia gratissima (Gill. et Hook) Tronc*

### **2.4.3. Descripción botánica de *Baccharis trimera* (Less.) DC.**

Nombre científico: *Baccharis trimera* (Less.) DC.

Nombres comunes: Carqueja, bacárida, carquejilla.

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Baccharis*

Especie: *Baccharis trimera*

*Baccharis trimera* (Less.) DC. es una hierba perenne subleñosa, presenta una distribución natural que abarca Brasil, Argentina, Paraguay y Uruguay. Crece formando matas que pueden medir entre 40 a 70 centímetros. Presenta tallos trialados con hojas triangulares a escuamiformes (*Figura 8*). Las flores se disponen en capítulos en la parte superior de las ramas en forma de espigas con una longitud de 5 a 6 milímetros, las flores masculinas tienen forma cilíndrica y las femeninas tienen forma hemisférica. (Bandoni, 2002; Instituto Nacional de Agropecuaria, 2004).



*Figura 8. Baccharis trimera* (Less.) DC.

## **2.5. GENERALIDADES SOBRE LOS HONGOS FITOPATÓGENOS: *Guignardia citricarpa* Y *Penicillium digitatum*.**

Durante el almacenamiento de las frutas, el deterioro causado por microorganismos limita su vida útil causando importantes pérdidas económicas durante la postcosecha. Los patógenos generalmente infectan tejidos que han sido dañados o que han sufrido un deterioro fisiológico, por lo que la incidencia en las enfermedades dependerá de las características propias del fruto, condiciones ambientales, manejo durante la cosecha y postcosecha de la fruta (Kader, 2002). En los cítricos las alteraciones son provocadas mayormente por hongos que producen una desvalorización del producto, incluso en muchos casos no se pueden comercializar (Guédeza, et al., 2010). Actualmente la principal estrategia de control es la aplicación de fungicidas sintéticos. Sin embargo su uso prolongado presenta varios inconvenientes, como son la contaminación ambiental, los efectos perjudiciales para la salud, la aparición de cepas resistentes y la alta residualidad (Lado, et al., 2013; Lado, et al., 2011; Yeoshua, 2005).

### **2.5.1. *Guignardia citricarpa***

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Clase: Dothideomycetes

Orden Botryosphaerales

Familia Botryosphaeriaceae

Género: *Guignardia*

Especie: *Guignardia citricarpa* Kiely

*Guignardia citricarpa* Kiely [anamorfo *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Van der Aa], es un hongo ascomicete responsable de la enfermedad denominada Mancha negra de los cítricos, que puede afectar la fruta y las hojas de cultivos comerciales del género *Citrus spp.* Esta enfermedad se caracteriza por afectar la estética del producto al producir manchas de color negro lo que conlleva a una pérdida de calidad y desvalorización del producto (EPPO, 2009). En Uruguay el gran inconveniente con este hongo es la restricción fitosanitaria impuesta por los países importadores, ya que se considera una enfermedad cuarentenaria tanto para la Unión Europea como para Estados Unidos (USDA, 2015; EPPO, 2016).

El microorganismo presenta dos tipos de reproducción, el estado asexual representado por los picnidios que dan lugar a los conidios y el sexual representado por los ascocarpos, donde se forman las ascosporas. Estas dos tipos de esporas: las ascosporas y los conidios constituyen las dos fuentes de inóculos, siendo las ascosporas las de mayor importancia, las cuales en períodos de humedad son dispersadas por el viento y el agua, pudiendo causar las infecciones en hojas y frutas que permanecerán latentes o evolucionarán hasta la producción de síntomas típicos de la enfermedad (EPPO, 2009; Pérez Faggiani, et al., 2012).

El desarrollo de los síntomas en los frutos se acelera con mayor intensidad luminosa, aumento de temperatura, sequía y envejecimiento del árbol (Timmer, et al., 2000). Los principales síntomas en la fruta son; la mancha dura, mancha en forma de peca, mancha virulenta, falsa melanosis, mancha recortada y mancha trincada (Pérez Faggiani, et al., 2012) (*Figura 9*). Los síntomas pueden aparecer cuando el fruto termina de desarrollarse en pre o postcosecha, es decir durante la fase de almacenamiento, este momento es en donde podría ser útil la aplicación de los aceites esenciales que presenten compuestos activos.

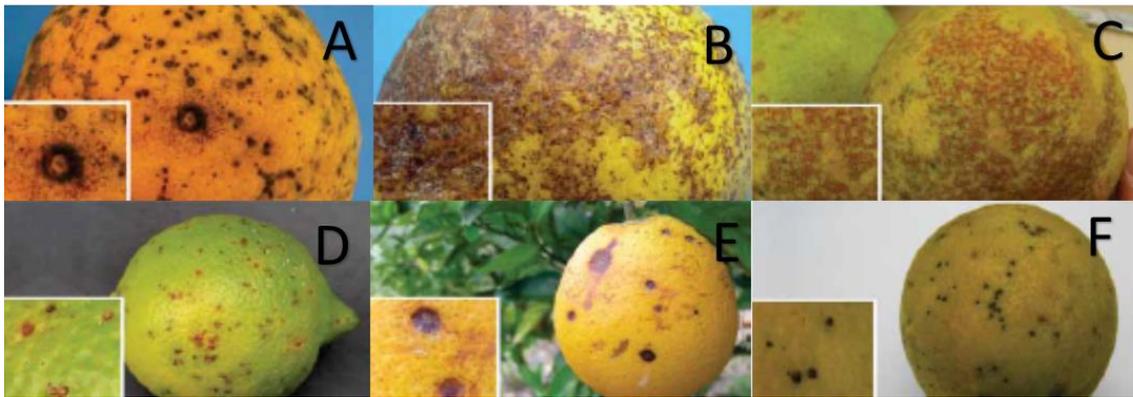


Figura 9. Principales síntomas de la Mancha negra de los cítricos. A: Mancha dura. B: Mancha trincada. C: Mancha recortada. D: Mancha pecosa. E: Mancha virulenta. F: Falsa melanosis (Pérez Faggiani, et al., 2012).

### 2.5.2. *Penicillium digitatum*

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Clase: Eurotiomycetes

Orden: Eurotiales

Familia Trichocomaceae

Género: *Penicillium*

Especie: *Penicillium digitatum* Sacc.

*Penicillium digitatum* Sacc. es el hongo responsable de la llamada “podredumbre verde” y es uno de los principales patógenos que afectan los cultivos cítricos tanto en el campo como luego de la cosecha (González-Candelas, et al., 2010). Se reproduce mediante esporas asexuales o conidios que se generan por escisión en cadenas de longitud variable y pueden presentar diferente tamaño. Estas esporas son ovales a cilíndricas con unas dimensiones de 6-8 x 4-7  $\mu\text{m}$  (Onions & Brady, 1987).

Las heridas en el fruto son la entrada del patógeno, estas pueden ser producidas durante la recolección o el manejo postcosecha de los frutos, aunque también pueden producirse en el campo o por causas fisiológicas. Es por ello que es de suma importancia, no solo la reducir la fuente de contaminación, sino también

minimizar los golpes durante y después de la cosecha (Palou, 2014; Korsten & Taverner, 2012).

La podredumbre verde comienza con una mancha circular acuosa y descolorida en la superficie del fruto alrededor del punto de infección. En condiciones favorables la mancha comienza a hacerse más grande y en el centro comienza a parecer un micelio color blanco y a medida que progresa la enfermedad se comienzan a producir esporas color verde (*Figura 10*). Cuando la enfermedad se encuentra avanzada se produce la descomposición interna del fruto y se cubre de esporas que son fácilmente dispersables por una corriente de aire infectando otros frutos (Korsten & Taverner, 2012; Palou, 2014).



*Figura 10. Naranja infectada con *Penicillium digitatum*, se pueden observar el micelio color blanco y en el centro las esporas color verde (López-Pérez, Ballester, & González-Candelas, 2011)*

Actualmente el control de *Penicillium digitatum* se basa en el uso de fungicidas de síntesis siendo los principios activos más utilizados: imazalil, procloraz, orto-fenil fenato de sodio y tiabendazol (Lado, Pérez, et al., 2013). Sin embargo su uso prolongado presenta ciertas desventajas como lo son, la aparición de cepas resistentes, presencia de residuos que superan el límite máximo permitido, contaminación ambiental y toxicidad en humanos (Lado, et al., 2011; Lado, et al., 2013; Palou, 2014).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluación de la composición química y actividad antifúngica de los aceites esenciales de *Lippia alba*, *Aloysia gratissima* y *Baccharis trimera* para el control de *Penicillium digitatum* y *Guignardia citricarpa*.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Identificación y recolección de plantas aromáticas nativas en distintos estados de desarrollo vegetativo así como en distintas regiones del país.
2. Obtención de los aceites esenciales mediante el proceso de hidrodestilación.
3. Determinar el rendimiento de los aceites esenciales por el proceso de extracción aplicado y evaluar su posible relación con el lugar de colecta y estado fenológico de la planta.
4. Estudio de la composición química de los aceites esenciales mediante la técnica de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de masas, utilizando bases de datos e información bibliográfica.
5. Evaluación de la actividad *in vitro* de los aceites esenciales frente a dos patógenos de postcosecha de cítricos: *Guignardia citricarpa* y *Penicillium digitatum*.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. ENTIDADES DONDE SE DESARROLLÓ LA INVESTIGACIÓN**

Las extracciones de los aceites esenciales se realizaron en la Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales de la Facultad de Química-UdelaR. Los análisis cromatográficos se desarrollaron en el Laboratorio de Biotecnología de Aromas-DQO-CYTAL y en el laboratorio de espectrometría de masas del Departamento de Química Orgánica. Los análisis de actividad biológica se realizaron en el Laboratorio de Fitopatología en el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Salto Grande.

### **4.2. RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL**

Se tomaron muestras en el Norte y Sur del país (*Figura 11*), tanto en los períodos vegetativo y de reproductivo de las plantas. Las especies recolectadas fueron *Lippia alba*, *Baccharis trimera* y *Aloysia gratissima*. El material vegetal fue colectado en la Estación Experimental INIA- Salto Grande, ubicada en la Colonia Gestido del Departamento de Salto (latitud 31° 16´S, longitud 57° 53´ W y altitud 50 m) y en la Estación Experimental INIA- Las Brujas ubicada al suroeste del departamento de Canelones, en el paraje denominado Rincón del Colorado (latitud 34° 40´S, longitud 56° 20´ W y altitud 32m). En la tabla 2 se muestran los detalles de cada una de las recolecciones y el número de extracciones realizadas con el material vegetal colectado.

El material vegetal fue identificado por el Prof. Eduardo Alonso Paz de la Cátedra de Botánica de la Facultad de Química de la Universidad de la República.



Figura 11. Lugares de colecta del material vegetal indicados con una estrella y sus correspondientes coordenadas.

Especie	Estado fenológico	Lugar de colecta	Fecha de recolección	Número de destilaciones
<i>Lippia alba</i>	Floración	Norte	30/01/2014	5
<i>Lippia alba</i>	Floración	Sur	15/02/2014	7
<i>Lippia alba</i>	Vegetativo	Norte	20/06/2014	2
<i>Lippia alba</i>	Vegetativo	Norte	23/09/2014	4
<i>Lippia alba</i>	Vegetativo	Sur	10/06/2014	7
<i>Lippia alba</i>	Floración	Sur	20/01/2015	2
<i>Aloysia gratissima</i>	Floración	Norte	13/02/2014	3
<i>Aloysia gratissima</i>	Floración	Sur	15/02/2014	3
<i>Aloysia gratissima</i>	Vegetativo	Norte	18/6/2014	2
<i>Aloysia gratissima</i>	Vegetativo	Norte	29/09/2014	3
<i>Aloysia gratissima</i>	Vegetativo	Sur	10/6/2014	6
<i>Aloysia gratissima</i>	Floración	Sur	01/01/2015	4
<i>Baccharis trimera</i>	Vegetativo	Norte	25/6/2014	4
<i>Baccharis trimera</i>	Floración	Sur	02/04/2014	4
<i>Baccharis trimera</i>	Vegetativo	Sur	10/06/2014	6
<i>Baccharis trimera</i>	Floración	Sur	23/03/2014	7

Tabla 2. Fecha de recolección del material vegetal y número de destilaciones realizadas.



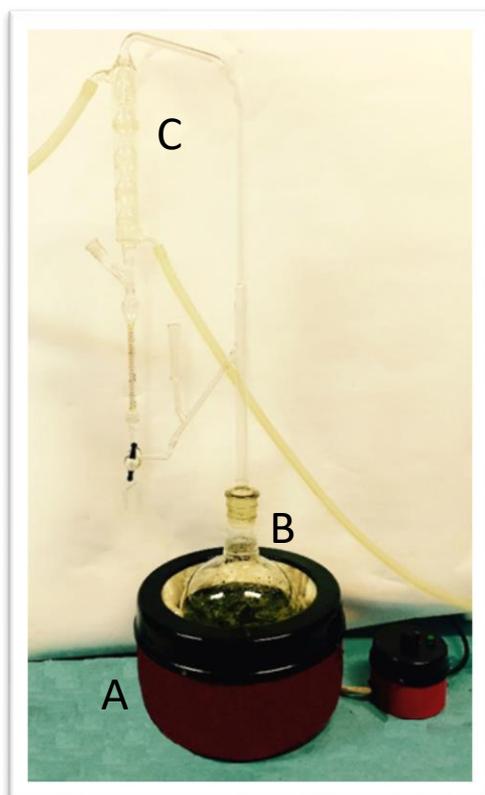


Figura 13. Sistema de hidrodestilación. A: manta eléctrica, B: balón de 2000mL, C: trampa tipo Clevenger y mangueras que conectan el sistema de refrigeración.

Se calculó el rendimiento del aceite esencial relacionando la masa del material vegetal utilizada y la masa final del aceite obtenida según la siguiente fórmula:

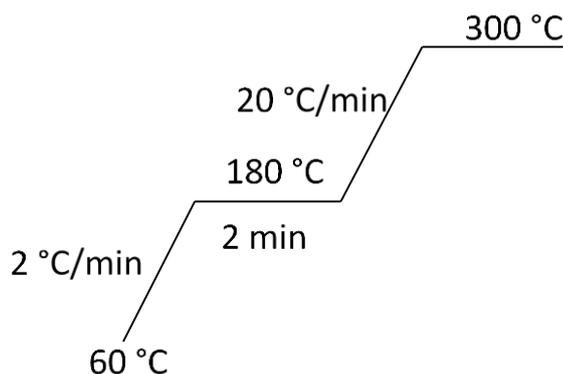
$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Vol AE (mL)}}{\text{m veg (g)}} \times 100$$

Donde:

- Vol AE (mL): es el volumen de aceite esencial destilado, expresado en mililitros.
- m veg (g): Es la masa en gramos del material vegetal utilizado en la hidrodestilación.

#### 4.4. ANÁLISIS QUÍMICO DE LOS ACEITES ESENCIALES

Los análisis químicos de las muestras se llevaron a cabo mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas, en el cromatógrafo de masas Shimadzu GCMS-QP 2010 Ultra. Los análisis se realizaron bajo las siguientes condiciones: columna capilar de polaridad media HP-5 MS (30 m x 0,25 mm d.i., con 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor de fase); la fase móvil utilizada fue Helio (1 mL/min); el programa de temperatura utilizado fue: 60 - 180°C, con una rampa de 2°C/min, 180°C (2 min), 180- 300°C a 20°C/min (*Figura 14*); el modo de inyección fue split-splitless, con una relación de split de 1:40; la ionización utilizada fue por impacto de electrones a 70 eV y el rango de  $m/z$  escaneado fue de 35 a 400 u.m.a.



*Figura 14. Programa de temperatura utilizado en la identificación de los aceites esenciales por GC-MS.*

La identificación de los compuestos fue realizada tanto por comparación de sus espectros de masas con los presentes en bases de datos comerciales (Adams, 2007; McLafferty & Stauffer, 1991; NIST, 2014), como por el cálculo de índices de retención lineal (IR), mediante el uso de una solución de una mezcla de una serie homóloga de hidrocarburos lineales (C9-C26), separados cromatográficamente en las mismas condiciones experimentales que las utilizadas para los aceites esenciales.

La cuantificación fue realizada en todos los casos por comparación con un estándar interno (n- heptadecano). Para ello se obtienen dos cromatogramas en las mismas condiciones, uno del AE y otro con del AE más el estándar interno, de modo de poder comprobar que este no interfiera con ninguno de los compuestos

presentes en el AE. La concentración se expresa en miligramo del compuesto por mililitro de la solución en hexano y se calculó de la siguiente forma:

$$Cx = \frac{Ax \times Ce}{Ae}$$

Donde:

- Ax: Área del compuesto de interés.
- Ae: Área del estándar.
- Cx: Concentración del compuesto de interés.
- Ce: Concentración del estándar.

#### **4.5. CEPAS**

Las cepas empleadas en este estudio, *Penicillium digitatum* y *Guignardia citricarpa*, fueron obtenidas de la colección de microorganismos del Laboratorio de Fitopatología del INIA Salto Grande. Los microorganismos fueron cultivados en el medio sólido Agar Papa Dextrosa (PDA) a una temperatura de 25°C durante los 5 días previos a la realización del ensayo.

#### **4.6. BIOENSAYOS REALIZADOS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES.**

La actividad de los aceites esenciales frente a los hongos fitopatógenos seleccionados fue determinada mediante dos técnicas: test de fase volátil (Pauli & Schilcher, 2007; Plaza, et al., 2004) y test de dilución en agar (Rahman & Al-Reza, 2011) en las cuales se evaluó la inhibición del hongo por el aceite esencial por contacto directo y por contacto con sus vapores.

#### 4.6.1. Test de fase volátil

Mediante este ensayo *in vitro* se evaluó la actividad de los componentes del aceite esencial en fase volátil (Pauli & Schilcher, 2007; Plaza, et al., 2004). Se preparó el medio de cultivo Agar Papa Dextrosa en las proporciones indicadas por el fabricante y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Se dispensó 15 mL del medio de cultivo en placas de Petri estériles de 9 cm de diámetro.

Una vez que el medio de cultivo se solidificó, se colocó sobre el centro de la placa, un disco de 4 mm de diámetro del hongo en cuestión (*Figura 15*) (*Penicillium digitatum* o *Guignardia citricarpa*). En la tapa opuesta de la placa de Petri se colocaron 85 µL del aceite esencial sobre un portaobjetos de vidrio estéril y se mantuvo la placa de forma tal que el AE no caiga sobre el disco del hongo, para asegurarse que solo los vapores sean los que ejerzan la acción. Por otro lado, se preparó una placa control en donde se colocó el disco del hongo sin aceite esencial. Por último, se cerraron las placas de Petri, se sellaron con Parafilm M® y se incubaron a 25 °C en forma invertida.

Las lecturas de los diámetros del crecimiento radial del hongo, se realizaron cada dos días hasta que no se observó más crecimiento del hongo en la placa testigo. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se repitieron dos veces.

Se calculó el Índice de Inhibición del Crecimiento (IIC) de acuerdo a la siguiente fórmula (Manici, Lazzeri, & Palmieri, 1997):

$$IIC (\%) = \frac{C - T}{C} \times 100$$

Donde:

- C: Promedio de las repeticiones del diámetro de crecimiento miceliar de la placa control.
- T: Promedio de las repeticiones del diámetro de crecimiento miceliar de la placa tratada con Aceite esencial.

En caso que el valor de IIC (%) sea negativo se considera que hubo un cero por ciento de inhibición del hongo en cuestión.



Figura 15. Incorporación del disco del hongo sobre el medio de cultivo PDA.

#### **4.6.2. Test de dilución en agar**

Mediante esta prueba se evaluó la actividad *in vitro* de los componentes del aceite esencial en dilución sobre el agar (Rahman & Al-Reza, 2011). Se preparó el medio de cultivo Agar Papa Dextrosa en las proporciones que lo indica el fabricante y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos y se colocó en un baño de agua hasta termostatar (45°C). Luego se inoculó una dilución del aceite esencial en Dimetil Sulfoxido (1000ppm) y se dispensó en placas de Petri estériles.

Una vez solidificado el medio de cultivo se colocó sobre el centro de la placa, un disco de 4 mm de diámetro del hongo en cuestión (*Penicillium digitatum* o *Guignardia citricarpa*). Por otra parte, se preparó una placa control donde se disolvió el Dimetil Sulfoxido (DMSO) en PDA (sin AE). Una vez solidificado el medio de cultivo, se colocó el disco del hongo correspondiente en las mismas condiciones que el caso anterior.

Finalmente, se cerraron las placas de Petri, se sellaron Parafilm M<sup>®</sup> y se incubaron a 25 °C. Cada dos días se realizaron lecturas de los diámetros del crecimiento radial del hongo, hasta que no se observó más crecimiento del hongo en la placa testigo. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se repitió dos veces. A partir de los resultados obtenidos se calculó el Índice de Inhibición del Crecimiento.

#### **4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Past (versión 3.11) (Hammer & Harper, 2006).

Se realizó un análisis de conglomerados (Clusters), para evaluar cuantos grupos se forman en función de la composición química de los aceites esenciales, según los distintos lugares de colecta y estados vegetativos.

Para comparar los resultados de los ensayos de actividad antimicrobiana, realizados por triplicado, se utilizó un análisis estadístico de varianza para un factor (one way ANOVA), con el cual es posible determinar si las diferencias de los resultados es una diferencia real o es una diferencia debida a las variaciones de las repeticiones. El supuesto de normalidad de los datos se comprobó mediante el test de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas mediante el test de Levene. En caso de encontrarse diferencias significativas entre ensayos, se utilizó el test de comparaciones múltiples de Tukey para verificar en cuales tratamientos existe diferencia entre medias (Sokal & Rohlf, 2012). En todos los casos, para aceptar o rechazar las hipótesis, se utilizó un nivel de probabilidad  $p = 0.05$ . En el *Anexo 2* se presenta en detalle las tablas obtenidas del análisis estadístico.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

Durante su crecimiento, las plantas anuales pasan por estadios sucesivos (período vegetativo y período de floración), en los cuales la composición de sus metabolitos secundarios volátiles puede presentar cierta variabilidad. Con el fin de evaluar la influencia del estado fenológico y lugar de procedencia en el rendimiento, composición y actividad antifúngica de los aceites esenciales, se recolectaron un total de 12 poblaciones de planta0073 distribuidas en el Norte y Sur de Uruguay, en distintos estados fenológicos.

De las muestras recolectadas se extrajo el aceite esencial mediante hidrodestilación y se calculó el rendimiento de la extracción. El rendimiento obtenido (*Tabla 2*) presenta una gran variabilidad, que depende de la planta en cuestión, época y lugar de colecta (Bandoni, 2002). Los análisis estadísticos realizados se encuentran en el *Anexo 2*.

Material vegetal	Código	Rendimiento (% v/p)
<i>Lippia alba</i> - Sur- Floración	LASF	1,85± 0,13
<i>Lippia alba</i> - Sur- Vegetativo	LASV	1,20± 0,10
<i>Lippia alba</i> - Norte- Floración	LANF	1,91± 0,24
<i>Lippia alba</i> - Norte- Vegetativo	LANV	1,20± 0,10
<i>Baccharis trimera</i> - Sur- Floración	BTSF	1,00± 0,15
<i>Baccharis trimera</i> - Sur- Vegetativo	BTSV	1,08± 0,03
<i>Baccharis trimera</i> - Norte- Floración	BTNF	1,08± 0,13
<i>Baccharis trimera</i> - Norte- Vegetación	BTNV	1,15± 0,05
<i>Aloysia gratissima</i> - Sur- Floración	AGSF	0,85± 0,09
<i>Aloysia gratissima</i> - Sur- Vegetativo	AGSV	1,25± 0,13
<i>Aloysia gratissima</i> - Norte- Floración	AGNF	0,96± 0,21
<i>Aloysia gratissima</i> - Norte- Vegetativo	AGNV	1,08 ± 0,03

Tabla 3. Rendimiento de extracción de los aceites esenciales

El rendimiento del aceite esencial de *Lippia alba* (Figura 16) fue significativamente mayor para aquellas plantas recolectadas en estado de floración tanto en el Norte como en el Sur del país. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los rendimientos de extracción entre las plantas recolectadas en estado de floración de los distintos puntos de colecta, ni en las recolectadas en estado vegetativo. Es decir que, en estas condiciones, el rendimiento de extracción del aceite esencial de esta especie está influido por el estado fenológico de la planta, no dependiendo del lugar de colecta.

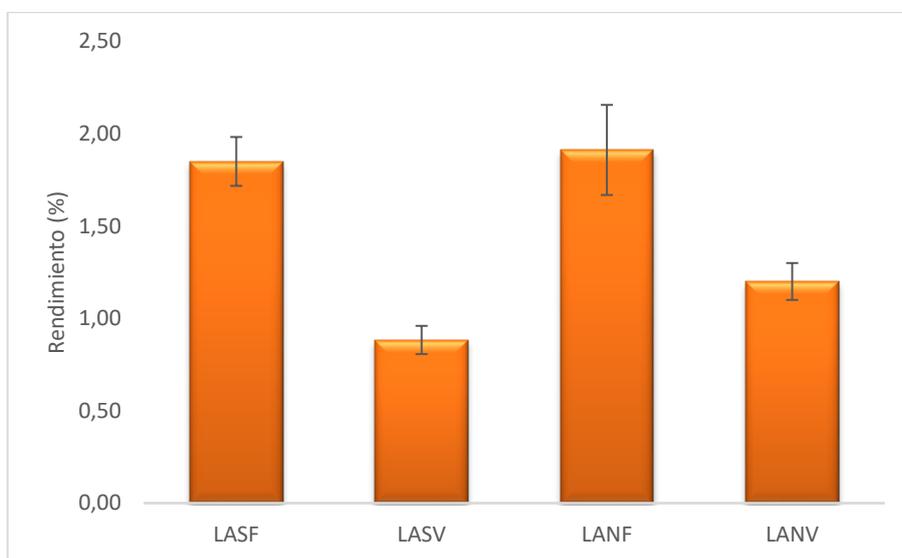


Figura 16. Porcentaje de rendimiento del aceite esencial de *Lippia alba* en estado de floración, vegetación, recolectadas en Norte y Sur del País.

El rendimiento del aceite esencial de *Aloysia gratissima* (Figura 17) y *Baccharis trimera* (Figura 18) no presentaron diferencias significativas al comparar entre los distintos estados fenológicos y/o lugar de colecta. Por lo que, en las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo, se podría afirmar que ni el estado fenológico, ni el lugar de colecta intervienen sobre la capacidad de producción del esencial por parte de la planta.

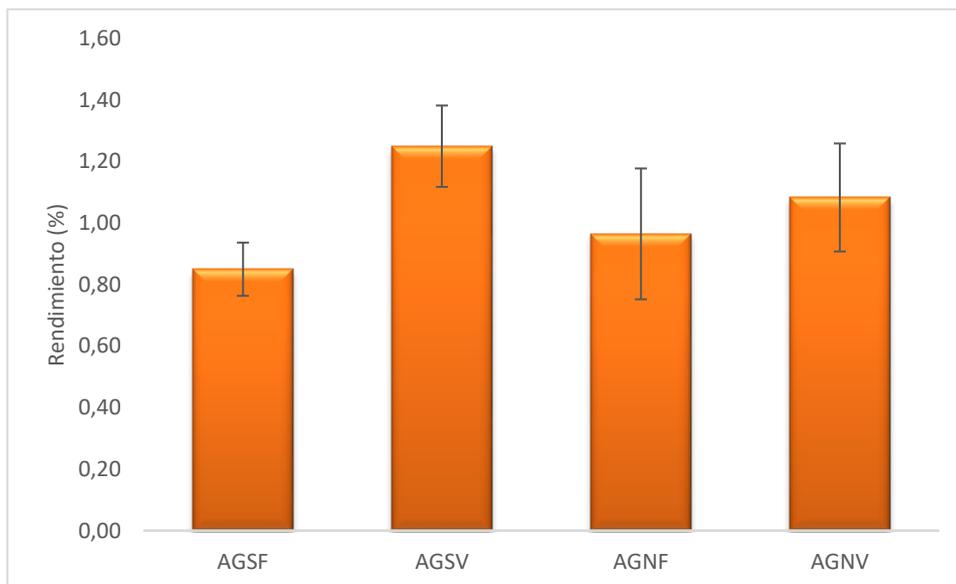


Figura 17. Porcentaje de rendimiento del aceite esencial de *Aloysia gratissima* en estado de floración, vegetación, recolectada en Norte y Sur del País.

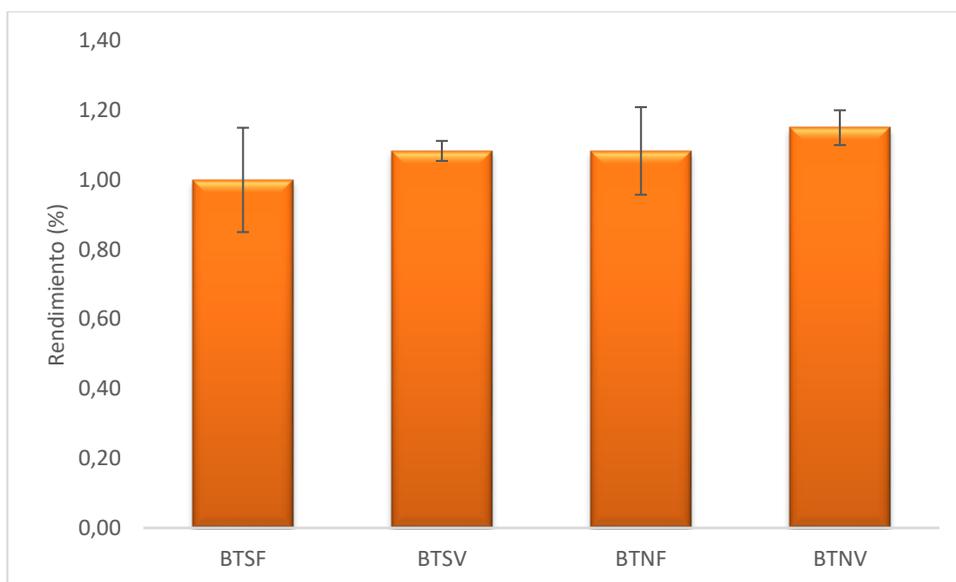


Figura 18. Porcentaje de rendimiento del aceite esencial de *Baccharis trimera* en estado de floración, vegetación, recolectada en Norte y Sur del País.

## 5.2. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

Es muy importante el conocimiento de la composición cualitativa y cuantitativa de los aceites esenciales, ya que esto permite obtener datos valiosos en estudios

biológicos sistemáticos de plantas como por ejemplo, en la búsqueda de agentes antimicrobianos. Las diferencias que se encuentran en la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales provenientes de distintas zonas geográficas, distintos tiempos de colecta y métodos de extracción, pueden ser disminuidas si las condiciones son previamente estandarizadas.

A partir del análisis mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa, se pudo determinar la composición química de los distintos aceites esenciales, así como las posibles variantes entre los distintos estados fenológicos y región de colecta. Se observaron entre todos los aceites esenciales diferencias tanto cualitativas como cuantitativas que se relaciona con la variabilidad que existen en cada uno de los puntos de colecta así como en cada una de las épocas de colecta. Los factores que inciden en esa diferencia son las diferencias de temperatura, humedad relativa, grado de luminosidad, características del suelo, pH, grado de humedad, entre otras (Bandoni, 2002). Cada perfil se muestra en los cromatogramas ubicados en el *Anexo 1*.

La especie *Lippia alba* presenta varios quimiotipos (Hennebelle, et al., 2006), esto refleja que la especie presenta una gran capacidad para responder a diferentes condiciones extrínsecas del ambiente (Ciccío & Ocampo, 2010). El quimiotipo presente en todos los aceites esenciales estudiados en este trabajo corresponden al quimiotipo linalol, siendo este además el compuesto mayoritario (59,01- 77,98 mg/ mL). Según estudios anteriores en Uruguay se observó la presencia de dos quimiotipos, linalol y alcanfor en plantas de *Lippia alba* (Dellacassa, et al., 1990; Lorenzo, et al., 2001). Según la clasificación realizada por Hennebelle, et al., 2006, estos aceites esenciales pertenecerían al quimiotipo 1, subtipo 1b, el cual se caracteriza por presentar al linalol como compuesto mayoritario en todas las estaciones. En otros países se pueden encontrar los quimiotipos tagetenona, dihidrocarbona, carbona, limoneno, piperitona, mirceno, entre otros (Hennebelle, et al., 2006).

A partir del análisis por GC- MS de las distintas muestras recolectadas de *Lippia alba* se pudieron identificar un total de 84 compuestos (*Tabla 3*). La fracción monoterpénica representa en todos los casos la fracción mayoritaria. En las

plantas recolectadas en el sur de Uruguay, los monoterpenos oxigenados presentaron una concentración total de 65 mg/ mL; mientras que en las plantas recolectadas en el Norte la concentración fue de 70 y de 83 mg/ mL para las recolectadas en estado vegetativo y floración respectivamente.

Los metabolitos secundarios volátiles mayoritarios identificados fueron: Sabineno, Limoneno, 1,8-Cineol,  $\beta$ -(E)-Ocimeno, Linalol, p-Menta-1,5-dien-8-ol,  $\beta$ -Elemeno, (E)-Cariofileno,  $\gamma$ -Elemeno, el Germacreno B y D. Estos compuestos se encuentran en concentraciones diferentes en los AE obtenidos en los distintos lugares de colecta y/o estados fenológicos. El linalol se encuentra en mayor concentración en los AEs provenientes del norte del país, asimismo se observa que tanto en el norte como en el sur se encuentra en mayor concentración en las plantas recolectadas en estado de floración. En cuanto al Sabineno, se observa que se encuentra en mayor concentración cuando el AE es extraído de plantas en estado de floración y menor si las plantas se encontraban en estado vegetativo. Al comparar los distintos lugares de colecta, se encuentra en mayor concentración en los AE provenientes del Sur. El limoneno se encuentra en mayor proporción en los AE provenientes del norte, siendo más abundante en el AE de las plantas en estado vegetativo. Para los compuestos  $\beta$ -(E)-ocimeno, (E)-cariofileno y el Germacreno B, se observa que la mayor concentración se encuentra en los AE provenientes del norte del país, no encontrándose grandes diferencias en cuanto al estado fenológico de las plantas. El 1,8-cineol se encuentra en mayor concentración en los AE de plantas provenientes del sur del país. Para los compuestos  $\beta$ -Elemeno y  $\gamma$ -Elemeno no se puede afirmar que haya alguna relación entre la concentración y el lugar de colecta de la planta o estado fenológico, ya que estos compuestos se encuentran en concentraciones similares en los AEs de las plantas provenientes del norte así como en el de las plantas provenientes del sur en estado vegetativo.

Tabla 4. Composición química del aceite esencial de *Lippia alba* en estado de floración y vegetativo recolectadas en el Norte y Sur del País. IK: Índice de Kovats, tr: trazas.

No.	Compuesto	IR	LASF (mg/ mL)	LANF (mg/ mL)	LANV (mg/ mL)	LASV (mg/mL)
1	2-Hexenal	846	0,04	0,06	0,02	0,01
2	3- (Z)- Hexenol	850	0,01	0,07	-	0,08
3	n- Hexanol	863	0,02	0,01	-	tr
4	Acetato de 2- metilbutanoil	875	-	0,02	-	-
5	Isobutanoato de isobutilo	908	0,02	0,04	0,04	0,02
6	$\alpha$ -Tujeno	924	0,03	0,03	0,13	0,02
7	$\alpha$ - Pineno	934	0,04	0,04	0,04	0,04
8	Sabineno	969	1,06	0,83	0,63	0,79
9	$\beta$ - Pineno	974	0,06	0,02	0,05	0,04
10	1- Octen-3-ol	974	0,13	0,19	0,06	0,93
11	6-Metil-5-heptene-2-ona	985	0,01	0,04	0,01	-
12	Mirceno	988	0,38	0,60	0,93	0,22
13	p-Cimeno	1022	0,04	0,01	0,04	0,02
14	Limoneno	1024	0,85	1,14	4,17	0,17
15	1,8-Cineol	1026	5,67	3,77	2,75	5,89
16	$\beta$ -(Z)-Ocimeno	1032	0,06	0,09	0,07	0,03
17	$\beta$ -(E)-Ocimeno	1044	0,64	1,57	1,08	0,65
18	$\gamma$ -Terpineno	1054	0,01	0,03	0,06	0,02
19	(Z)-Hidrato de sabineno	1065	0,16	0,08	0,11	0,19
20	(Z)-Oxido de linalol	1067	0,50	0,31	0,20	0,03
21	(E)-Oxido de linalol (furanoide)	1084	0,47	0,32	0,21	Tr
22	Linalol	1095	62,03	77,98	66,48	59,01
23	1,3,8-p-Mentatrieno	1108	-	-	0,05	-
24	$\alpha$ -Canfonelal	1124	-	-	-	0,02
25	(Z)-p-Menta-2,8-dien-1-ol	1133	-	-	0,05	-
26	(E)-Pinocarveol	1135	0,03	0,04	-	0,01
27	(E)-Verbenol	1140	0,09	0,05	0,08	0,09
28	Isobutanoato de 3-(,Z)- hexenilo	1142	0,08	0,13		0,13
29	Pinocarvone	1160	-	-	-	0,12
30	p-Menta-1,5-dien-8-ol	1166	1,00	1,34	2,18	1,95
31	Umbellulone	1167	-	-	0,03	-
32	(Z)-Oxido de linalol	1170	0,02	0,01	-	-
33	Terpinen- 4- ol	1174	0,12	0,07	0,02	0,08
34	$\alpha$ -Terpineol	1186	0,43	0,29	0,11	0,30
35	Mirtenal	1195	0,06	0,06	-	0,08
36	(Z)-Dihidrocarvona	1191	0,04	0,27	0,13	-
37	(E)-Dihidrocarvona	1200	0,25	0,31	0,55	-
38	(E)-Carveol	1215	0,02	0,04	-	-
39	Nerol	1227	-	-	-	0,02
40	Citronelol	1223	-	-	-	0,03
41	Neral	1235	0,12	0,06	0,04	0,26
42	Geranial	1264	0,14	0,07	0,06	0,32
43	Acetato del óxido de linalilo	1287	0,05	0,11	0,04	0,04

Continuación						
No.	Compuesto	IR	LASF (mg/ mL)	LANF (mg/ mL)	LANV (mg/ mL)	LASV (mg/mL)
44	Acetato de mirtenilo	1326	0,02	0,02	-	0,03
45	δ- Elemeno	1335	0,03	0,08	0,06	0,05
46	Acetato de (E)-carvilo	1339	0,01	0,03	0,03	-
47	α-Cubebeno	1345	0,01	0,02	0,01	-
48	Acetato de neoisodihidro carveol	1356	-	-	0,02	-
49	Eugenol	1356	0,06	0,07	-	-
50	Acetato de nerilo	1359	-	0,03	-	0,03
51	α-Copaeno	1374	0,30	0,34	0,42	0,22
52	β-Bourboneno	1387	0,15	0,03	0,04	0,05
53	β-Cubebeno	1387	0,15	0,22	0,20	0,22
54	β-Elemeno	1389	1,34	2,48	2,57	2,46
55	Metil eugenol	1403	0,02	0,03	0,03	0,02
56	(E)-Cariofileno	1417	2,94	5,11	5,89	3,39
57	β-Copaeno	1430	0,20	-	-	0,38
58	γ-Elemeno	1434	1,07	2,13	2,20	2,91
59	α-Cariofileno	1452	0,39	0,60	0,60	0,56
60	Aromandreno	1459	0,09	0,09	0,07	0,19
61	(E)-β-Farneseno	1454	0,37	0,42	0,29	0,47
62	γ-Muroleno	1478	0,08	-	-	-
63	Germancreno D	1484	1,89	3,86	3,16	4,32
64	β-Selineno	1489	0,02	-	-	0,01
65	epi-Cubebol	1493	0,18	0,18	0,09	0,22
66	α-Muroleno	1500	0,06	0,11	0,03	0,15
67	(E)-β-Guaieno	1502	-	0,01	-	-
68	Cubebol	1514	0,59	-	-	0,89
69	δ-Cadineno	1522	0,10	0,18	0,12	0,22
70	(Z)-Nerolidol	1531	0,33	0,19	0,23	0,27
71	Elemol	1548	0,10	0,10	0,11	0,16
72	Germancreno B	1559	0,62	1,10	1,20	0,90
73	(E)-Nerolidol	1561	0,46	0,53	0,53	0,59
74	Germancreno D-4-ol	1574	0,15	0,26	0,31	0,35
75	Longipinanol	1567	2,53	0,68	0,64	-
76	Epoxido de humuleno II	1608	0,18	0,06	0,03	0,04
77	1,10-di-epi-Cubenol	1618	0,04	0,05	-	0,13
78	1- epi- Cubenol	1627	-	-	-	0,09
79	Murola- 4,10(14)-dien-1β-ol	1630	0,13	-	-	-
80	α-1,7 diepi-Cedrenal	1639	-	0,27	-	-
81	Caryophylla-4(12),8(13)- dien-5β-ol	1639	0,13	-	-	-
82	Cubenol	1645	-	-	-	0,03
83	Selin-11-en-4-α-ol	1658	-	-	0,09	-
84	Germacra-4(15),5,10(14)- trien-1-α-ol	1678	0,51	0,09	0,08	-

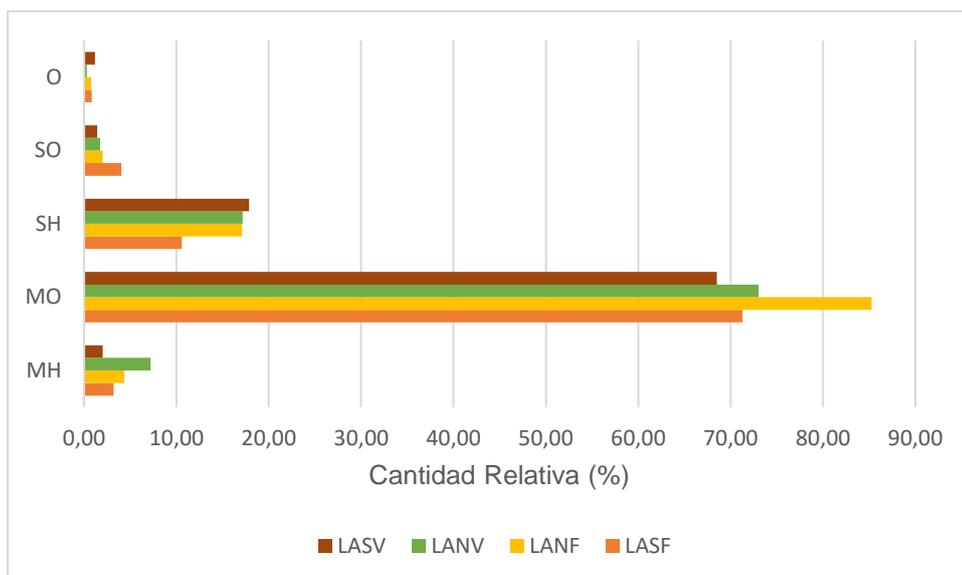


Figura 19. Agrupado de los componentes de los aceites esenciales de *Lippia alba*. MH: Monoterpenos hidrocarbonados. MO: Monoterpenos oxigenados. SH: Sesquiterpenos hidrocarbonados. SO: Sesquiterpenos oxigenados. O: otros.

El agrupamiento de las poblaciones mostrado mediante el Dendograma, obtenido luego de realizar un análisis de conglomerados basados en las distancias Euclidianas entre grupos (Figura 20), separó las muestras en dos clusters. El cluster I se relaciona con los AEs obtenidos de plantas en estado de floración y vegetativo recolectadas en el sur del país, mientras que el cluster II se relaciona con los AEs de muestras obtenidas en el norte del país. En cuanto a las diferencias dentro del grupo se observa que los AEs de muestras del sur presentan mayor similitud entre sí que aquellas obtenidas del norte.

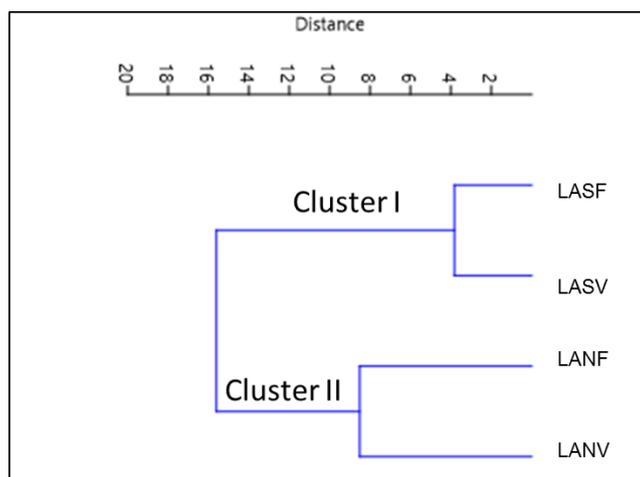


Figura 20. Dendograma del Análisis de Cluster de los aceites esenciales de *Lippia alba*, utilizando el método de Ward basado en distancias euclídeas entre grupos.

A partir del análisis mediante CG- MS de las distintas muestras de *Aloysia gratissima* se pudieron identificar un total de 125 compuestos (*Tabla 4*). Las plantas de *Aloysia gratissima* presentan, al igual que *Lippia alba*, diferentes quimiotipos que se encuentran resumidos en la *Tabla 5*. Se ha encontrado que en una misma área fitogeográfica, distintos ejemplares de *Aloysia gratissima* ubicados a muy poca distancia entre sí, presentan quimiotipos diferentes (Romero Márquez, 2004). En las muestras analizadas en el presente trabajo se encontró la presencia de dos quimiotipos diferentes. En los AEs de las plantas recolectadas en el norte de Uruguay se encontró que el compuesto mayoritario es el Sabineno (14- 18 mg/mL), mismo compuesto reportado en plantas recolectadas en Minas, Uruguay (Soler et al., 1985).

Esta diferencia en composición se puede observar en el dendograma obtenido luego de realizar un análisis de conglomerados basados en las distancias Euclidianas entre grupos (*Figura 22*), el cual separó las muestras en dos clusters. El cluster I se relaciona con los AEs obtenidos de plantas en estado de floración y vegetativo recolectadas en el sur del país, mientras que el cluster II se relaciona con los AEs de muestras obtenidas en el norte del país.

Si bien los AEs de las plantas provenientes del norte recolectadas en estado vegetativo y floración presentan el mismo compuesto mayoritario, se observa que este compuesto se encuentra en mayor concentración en plantas recolectadas en estado vegetativo que en floración, lo que concuerda con los resultados de Soler, et al., 1986. Asimismo, se pudo determinar varias diferencias en el resto de los compuestos mayoritarios. En las plantas recolectadas en estado de floración se presentan en gran concentración el (Z)-Crisantenol (8.35 mg/L), acetato de (Z)-crisantenilo (10.84 mg/mL),  $\gamma$ -Elemeno (4.50 mg/ mL), Germancreno D (7.63 mg/ mL). Sin embargo, en las plantas en estado vegetativo, si bien estos compuestos se encuentran presentes, las concentraciones son mucho menores (0.22 a 1.10 mg/mL).

En las plantas recolectadas en el sur, el sabineno se encuentra en una concentración mucho más baja que en los AEs de las plantas recolectadas en el norte. En estos AEs los compuestos mayoritarios son el 1,8-Cineol (18- 29

mg/mL) y el Germacreno D (17 mg/mL). Hasta el momento estos compuestos no han sido reportados como compuestos principales de los AEs de *A. gratissima* en Uruguay. Sin embargo, se encontró en plantas recolectadas en Brasil que, si bien tenían distinta composición, presentaba estos compuestos como mayoritarios en sus aceites esenciales (Santos, et al., 2015; Benovit, et al., 2015). Otros compuestos mayoritarios que se encontraron en las plantas recolectadas en el sur son el linalol,  $\beta$ -Elemeno (4– 7 mg/L), (E)- Cariofileno (7- 6 mg/L),  $\gamma$ -Elemeno (7- 8 mg/L), Germancreno B (4mg/L) y Epatulenol (10- 1 mg/L). En el caso del Epatulenol se ve una gran diferencia en la concentración en los distintos estados vegetativos de la planta, teniendo en estado floración una concentración mucho mayor.

Tabla 5. Composición química del aceite esencial de *Aloysia gratissima* en estado de floración y vegetativo recolectadas en el Norte y Sur del País. IK: Índice de Kovats.

No.	Compuesto	IK	AGNF (mg/mL)	AGNV (mg/mL)	AGSF (mg/ mL)	AGSV (mg/ mL)
1	Hexanal	801	-	-	0,01	0,02
2	(E)-2-Hexenal	827	-	-	0,04	0,06
3	Triclceno	918	0,03	-	-	-
4	$\alpha$ -Tujeno	923	0,89	0,67	0,11	0,25
5	$\alpha$ -Pino	929	5,16	1,97	1,28	2,38
6	Canfeno	942	0,23	0,02	0,02	0,04
7	2,4-Tujadieno	948	0,02	-	-	-
8	Benzaldehido	954	0,98	0,04	-	-
9	Sabineno	968	14,18	18,79	2,58	4,59
10	$\beta$ -Pino	971	1,50	0,98	0,21	0,30
11	1-Octen-3-ol	976	0,38	0,01	0,26	0,10
12	Mirceno	988	0,79	0,25	0,20	0,47
13	$\alpha$ -Felandreno	1001	0,02	0,02	0,03	0,10
14	$\alpha$ -Terpineno	1013	0,12	0,07	0,06	0,13
15	p-Cimeno	1022	1,05	0,14	0,18	0,03
16	Limoneno	1025	1,89	0,96	0,27	0,33
17	1,8-Cineol	1030	0,18	0,08	18,09	29,38
18	(Z)- $\beta$ -Ocimeno	1035	0,03	0,02	0,02	0,03
19	(E)- $\beta$ -Ocimeno	1045	0,21	0,18	0,58	0,57
20	$\gamma$ -Terpineno	1054	0,23	0,13	0,12	0,21
21	(Z)-Hidrato de sabineno	1062	1,33	0,59	0,94	2,00
22	(Z)-Oxido de linalol (furanoid)	1068	-	-	0,06	0,02
23	Terpinoleno	1084	0,13	0,06	0,03	0,04
24	(E)-Oxido de linalol (furanoid)	1085	-	-	0,04	0,02
25	(E)-Hidrato de Sabineno	1094	1,51	0,60	0,26	0,13
26	Linalol	1101	0,27	0,05	4,34	7,30
27	(E)-Tujeno	1112	0,50	0,04	-	-
28	(E)-p-Menta-2,8-dien-1-ol	1116	0,14	0,04	0,05	0,04
29	Crisantenona	1120	0,22	0,03	-	-
30	$\alpha$ -Camfolenal	1122	0,03	-	0,03	-
31	(Z)-p-Menta-2,8-dien-1-ol	1130	-	-	0,01	-
32	(E)-Pinocarveol	1133	0,15	0,01	0,04	-
33	(E)-Sabinol	1135	0,11	0,03	0,01	-
34	(E)-Verbenol	1140	1,40	Tr	0,11	0,04
35	Sabina cetona	1152	0,23	0,05	0,02	-
36	Borneol	1160	-	-	0,03	0,03
37	(Z)-Crisantenol	1163	8,35	1,10	-	-
38	$\delta$ -Terpineol	1162	-	-	0,18	0,30
39	p-Menta-1,5-dien-8-ol	1164	0,06	-	-	-
40	Tujenona	1169	0,04	0,03	-	-
41	Terpinen-4-ol	1171	0,98	0,43	0,53	0,52
42	3,10-Tujenal	1178	-	0,01	-	-

Continuación						
No.	Compuesto	IK	AGNF (mg/mL)	AGNV (mg/mL)	AGSF (mg/ mL)	AGSV (mg/ mL)
43	p-Cimen-8-ol	1181	-	0,01	-	-
44	$\alpha$ -Terpineol	1186	0,08	0,01	0,37	0,74
45	Mirtenal	1190	0,08	0,06	0,14	0,21
46	Mirtenol	1192	0,13	0,12	0,83	1,75
47	Verbenona	1203	0,10	-	0,01	-
48	(E)-3-Caren-2-ol	1207	1,14	-	-	-
49	(E)-Carveol	1214	0,03	-	0,08	-
50	Butanoato de 2-metil-(Z)-3-hexenilo	1231	0,03	-	-	-
51	Cuminal	1234	0,09	0,01	0,02	-
52	Carvona	1238	0,12	-	0,04	-
53	(Z)-Mirtanol	1249	0,05	-	-	-
54	Acetato de linalilo	1254	0,02	-	0,07	0,07
55	Acetato de (Z)-crisantenilo	1261	10,84	0,97	-	-
56	p- Menta-1,8-dien-3-one	1267	0,13	0,01	-	-
57	Perillaldehído	1269	0,02	-	-	-
58	Terpinen-7-al	1277	0,08	0,01	-	-
59	Bornil acetato	1281	0,33	0,02	-	-
60	p-Cimen-7-ol	1287	0,09	-	-	-
61	Acetato de sabinilo	1290	0,09	-	-	-
62	Acetato de (E)-verbenilo	1292	0,01	-	-	-
63	Carvacrol	1300	0,02	0,02	0,01	-
64	Acetato de $\delta$ -terpinilo	1313	-	-	0,07	-
65	p-Menta-1,4-dien-7-ol	1325	0,03	-	-	-
66	$\delta$ -Elemeno	1332	2,76	2,99	2,89	2,47
67	Piperitenon	1335	0,04	-	-	-
68	Acetato de (E)-carvilo	1335	0,01	-	0,01	-
69	$\alpha$ -Cubebeno	1343	0,01	-	-	-
70	Acetato de $\alpha$ -terpinilo	1345	-	-	0,44	0,37
71	Eugenol	1353	-	-	0,03	-
72	$\alpha$ -Copaeno	1369	0,08	-	0,20	-
73	$\beta$ -Bourboneno	1376	-	0,03	-	0,54
74	$\beta$ -Cubebeno	1384	0,04	-	0,08	-
75	$\beta$ -Elemeno	1388	2,89	0,73	4,53	7,00
76	$\alpha$ -Gurjuneno	1401	0,04	-	-	-
77	Sesquitujeno	1401	-	0,03	-	-
78	(E)-Cariofileno	1414	2,43	0,81	7,36	5,78
79	$\alpha$ -Ylangeno	1420	-	0,04	-	0,18
80	$\beta$ -Copaeno	1421	0,53	-	-	-
81	(E)- $\alpha$ -Bergamoteno	1429	-	0,04	-	-
82	$\gamma$ -Elemeno	1431	4,50	0,62	7,38	8,23
83	(Z)- $\alpha$ -Farneseno	1437	-	0,02	-	-
84	Aromandreno	1438	0,14	-	0,28	-
85	$\alpha$ -Cariofileno	1446	0,73	0,08	0,98	0,87
86	(E)- $\beta$ -Farneseno	1452	-	0,27	-	-
87	allo-Aromandreno	1452	0,46	-	-	-
88	Sesquisabineno	1454	-	0,16	-	-
89	$\beta$ -Chamingreno	1468	-	0,01	-	-

Continuación						
No.	Compuesto	IK	AGNF (mg/mL)	AGNV (mg/mL)	AGSF (mg/ mL)	AGSV (mg/ mL)
90	ar-Curcumeno	1477	-	0,03	-	-
91	Germancreno D	1479	7,63	0,61	17,81	17,69
92	$\beta$ -Selineno	1481	0,05	-	0,12	-
93	$\alpha$ -Muroleno	1494	0,07	-	-	0,11
94	Cupareno	1497	0,08	-	-	-
95	(Z)- $\alpha$ -Bisaboleno	1498	-	0,01	-	-
96	$\alpha$ -Selineno	1498	-	-	0,05	-
97	Biciclogermacreno	1500	-	-	-	6,19
98	(E,E)- $\alpha$ -Farneseno	1503	-	0,12	-	-
99	$\gamma$ -Cadineno	1508	0,58	-	-	-
100	Cubebol	1514	-	-	-	1,44
101	$\delta$ -Cadineno	1517	-	-	0,32	0,02
102	(Z)-Nerolidol	1522	0,41	0,10	0,08	-
103	Elemol	1545	0,13	0,15	0,33	0,16
104	Germancreno B	1550	2,47	0,42	4,09	4,14
105	1-nor-Bourbonanon	1553	0,06	-	0,21	0,09
106	Longipinanol	1563	0,10	-	-	-
107	(E)-Nerolidol	1564	0,06	0,45	1,16	0,86
108	Germacreno D-4-ol	1575	-	-	-	3,19
109	Espatulanol	1575	6,20	0,22	10,04	1,14
110	Oxido de Cariofileno	1577	0,88	-	2,50	1,27
111	Viridiflorol	1585	0,11	-	0,21	-
112	Fokienol	1593	-	0,10	-	-
113	Ledol	1598	-	-	-	0,10
114	Longiborneol	1595	-	-	0,41	-
115	epi- $\alpha$ -Cadinol	1634	0,46	-	-	0,47
116	Cubenol	1640	0,22	-	-	-
117	$\alpha$ -Cadinol	1647	0,18	-	-	0,19
118	Himachalol	1649	-	-	0,70	-
119	epi- $\alpha$ -bisabolenol	1678	-	0,22	0,22	-
120	$\alpha$ -Bisabolol	1680	-	0,15	-	-
121	Germacra-4(15),5,10(14)- trien-1- $\alpha$ -ol	1680	-	-	1,10	0,34
122	Germacrona	1686	-	0,07	-	-
123	Oxido de manool	1987	-	-	0,02	-
124	(E)-Fitol	2111	0,12	0,01	0,18	0,01
125	Tricosano	2296	-	-	0,01	0,12

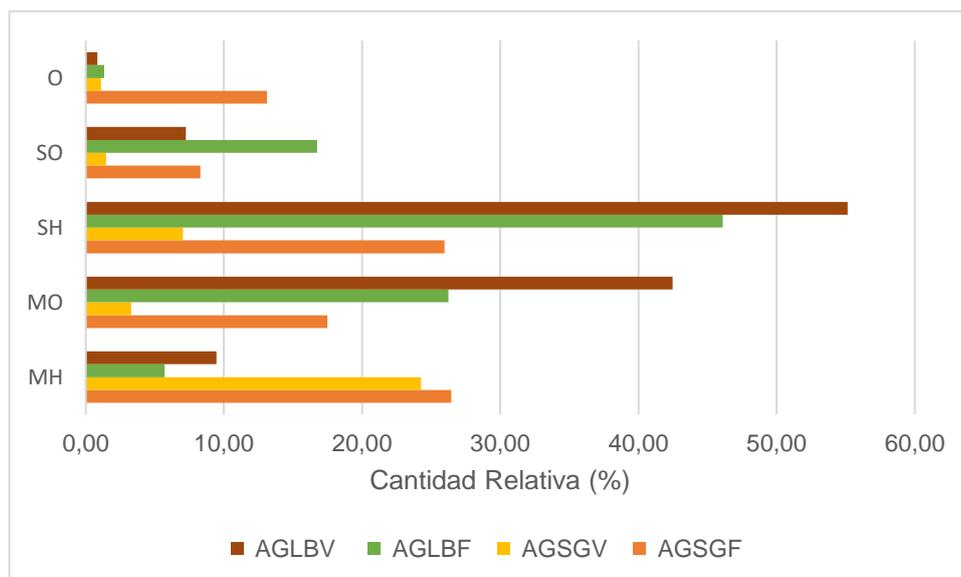


Figura 21. Agrupado de los componentes de los aceites esenciales de *Aloysia gratissima*. MH: Monoterpenos hidrocarbonados. MO: Monoterpenos oxigenados. SH: Sesquiterpenos hidrocarbonados. SO: Sesquiterpenos oxigenados. O: otros.

Compuestos Principales	Lugar	Referencia
1,8-Cineol (18.5 %) Sabineno (9.5 %)	Santa María, Rio Grande do Sul, Brasil	(Benovit, y et al., 2015)
$\beta$ -Pineno (27.0 %) (E)-Pinocanfona (11.9 %)	Lavras, Mina Gerais, Brasil	(Costa da Silva, et al., 2012)
Acetato de Pinocarveol (17.6 %) (E)-Pinocanfona (11.9 %) Guaiol (11.5 %)	Lavras, Mina Gerais, Brasil	(Santos, et al., 2013)
1,8-Cineol (13.7%) Germacreno D (13.4%) $\beta$ -Cariofileno (12.7%) $\beta$ -Pineno (11.7%)	Guabiruba, Santa Catarina, Brasil	(Santos, et al., 2015)
$\beta$ - Pineno (10.5- 12.0 %)* (E)-Pinocanfona (13.5- 16.3 %)* Acetato de Pinocarveol (8.3- 7.3 %)*	Campinas, São Paulo, Brasil	(Silva, et al., 2007)
Isopinocanfona (25.4 %) Limoneno (15.1 %) Guaiol (12.7 %)	São Carlos, São Paulo, Brasil	(Trovati, et al., 2009)
Sabineno (29.9 %) $\beta$ -Pineno (9.7 %)	Minas, Uruguay	(Soler, et al., 1985) (Soler, et al., 1986)
epi- $\alpha$ -Cadinol (33.0 %) Óxido de Cariofileno (11.0 %)	San Luis, Argentina	(Bailac, et al., 1999)
$\gamma$ -Elemene (19.7 %) Espatuleno (13.4 %) Globulol (18.6 %)	Los Llanos, La Rioja Argentina	(Juliani, et al., 2004)
$\beta$ -Cariofileno (15.2 – 25.1 %)*	San Lorenzo, Corrientes,	(Ricciardi, et al.,

Biciclogermacreno (5.6- 12.6 %)* $\alpha$ -Tujona (6.8- 17.5 %)*	Argentina	2006)
$\beta$ -Elemeno (1.6- 23.6%)* $\beta$ -Cariofileno (3.0- 28.0%)* Viridiflorol (0.9- 33.6%)* Linalol (0.1- 139%)*	Rio Empedrado, Corrientes, Argentina	(Ricciardi, et al., 2006)
$\beta$ -Elemeno (24.4- 35.7%)* 10-epi-Cubebol (0.5- 13.4%)*	Perichón, Corrientes, Argentina	(Ricciardi, et al., 2006)
Pulegona (65.8 %)	Córdoba, Argentina	(Zygodlo, et al., 1995)
$\beta$ -Cariofileno (8.5 %) 6- $\alpha$ -Hidroxigermacra-1(10)4-dieno (16,3 %)	Mizque, Cochabamba, Bolivia	(Lopez Arze, et al., 2013)

Tabla 6. Compuestos mayoritarios de aceites esenciales de *Aloysia gratissima* en distintas regiones. Valores de concentración expresados en porcentajes de área relativos. \* Distintas épocas de colecta.

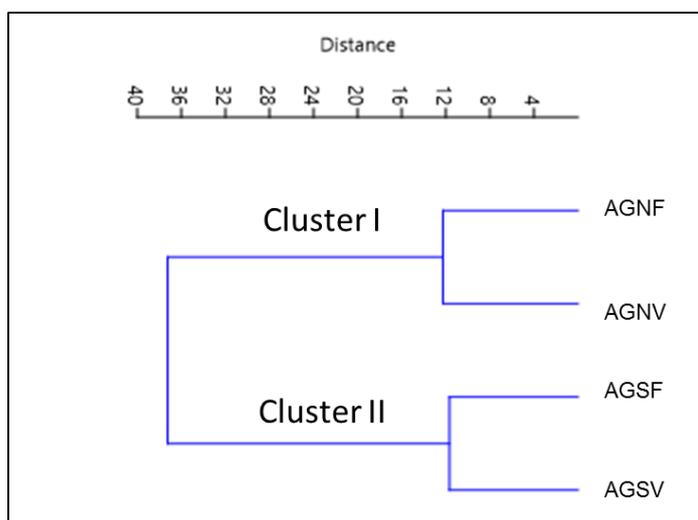


Figura 22. . Dendrograma del Análisis de Cluster de los aceites esenciales de *Aloysia gratissima*, utilizando el método de Ward basado en distancias euclídeas entre grupos.

A partir del análisis mediante CG- MS de las distintas muestras de *Baccharis trimera* se pudieron identificar un total de 69 compuestos (Tabla 6). En este caso, los 4 aceites esenciales destilados de las distintas regiones y distintos estados vegetativos no presentaron grandes diferencias en cuanto a composición, como sí lo hicieron *Lippia alba* y *Aloysia gratissima*. A pesar de ello, como se puede observar del dendrograma obtenido, luego de realizar un análisis de conglomerados basados en las distancias Euclídeas entre grupos (Figura 24), las muestras se separaron en dos clusters. El cluster I se relacionó con los AEs

obtenidos de plantas en estado de floración y vegetativo recolectadas en el sur del país, mientras que el cluster II se relaciona con los AEs de muestras obtenidas en el norte del país. En cuanto a las diferencias dentro del grupo, se observa que los AEs de muestras del norte presentan mayor similitud entre sí que aquellas obtenidas del sur.

Todos los aceites esenciales presentaron como compuesto mayoritario al acetato de carquejilo 39-58 mg/L. Este compuesto es reportado como compuesto mayoritario de los aceites esenciales de *Baccharis trimera* de diferentes regiones, y ha sido propuesto como un quimiomarcador de la especie (Simoës-Pires, et al., 2005; Minteguiaga, et al., 2015). Sin embargo, esto ha sido cuestionado por algunos autores dado que no se ha encontrado presente en algunos AEs, ya que, como se ha mencionado la composición está sujeta a numerosas variaciones (Minteguiaga, et al., 2015; Palácio, et al., 2007; Silva, et al., 2009). Otros metabolitos secundarios volátiles mayoritarios identificados fueron:  $\beta$ - Pineno, Silvestreno, (E)-  $\beta$ - Ocimeno, Palustrol, Viridiflorol, Ledol y  $\beta$ - Eudesmol. Estos compuestos se encuentran en concentraciones diferentes en los AEs obtenidos en los distintos lugares de colecta y/o estados fenológicos. El  $\beta$ - Pineno, Silvestreno y (E)-  $\beta$ - Ocimeno se encuentran en menor concentración en los AEs destilados de plantas en estado de floración, siendo siempre más concentrados en los aceites provenientes de plantas del Norte del país. En cuanto al Palustrol, se observa que en el AE extraído de plantas en estado de floración del sur se encuentra en mayor concentración que aquel de la misma región pero en estado vegetativo. Sin embargo, en los AE del norte no se aprecian grandes diferencias entre la concentración de plantas en estado de floración y vegetativo. Para los compuestos Viridiflorol, Ledol y  $\beta$ - Eudesmol se observa que en los tres casos el AE extraído de plantas en estado de floración del sur se encuentra en mayor concentración que en los AEs recolectados en el Norte y el recolectado en el sur en estado de vegetación.

Tabla 7. Composición química del aceite esencial de *Baccharis trimera* en estado de floración y vegetativo recolectadas en el Norte y Sur del País. IK: Índice de Kovats.

No.	Compuesto	IK	BTSF (mg/ mL)	BTSV (mg/ mL)	BTNF (mg/ mL)	BTNV (mg/ mL)
1	Hexanal	801	0,04	0,01	-	0.02
2	(E)-2-Hexenal	846	0,01	-	0,03	0.02
3	(Z)-3-Hexenol	850	-	-	0,09	0.08
4	$\alpha$ -Tujeno	924	0,08	0,19	0,11	0.12
5	$\alpha$ -Pino	934	0,17	0,46	0,23	0.31
6	Canfeno	946	0,02	0,04	0,03	0.03
7	Sabineno	969	1,01	2,53	1,66	1.03
8	$\beta$ -Pino	974	2,68	6,04	5,12	8.68
9	$\alpha$ -Metilestireno	973	-	-	0,01	-
10	Mirceno	988	0,60	1,30	0,83	0.83
11	$\alpha$ -Felandreno	1002	0,04	0,08	0,04	0.03
12	Acetato de (Z)-3-hexenilo	1004	-	-	0,05	0.09
13	$\alpha$ -Terpineno	1014	0,03	0,04	0,02	0.03
14	Silvestreno	1025	3,58	6,00	4,76	5.11
15	1,8-Cineol	1026	-	-	-	0.03
16	(E)- $\beta$ -Ocimeno	1044	1,74	3,80	2,60	2.78
17	$\gamma$ -Terpineno	1054	0,16	0,18	0,11	0.04
18	Hidrato de (Z)-sabineno	1065	-	-	-	0.01
19	Terpinoleno	1086	0,09	0,18	0,11	0.14
20	Linalol	1095	-	0,85	0,36	0.02
21	Isoforona	1118	0,13	0,17	0,18	0.06
22	Terpinen-4-ol	1174	0,08	0,10	0,09	0.06
23	Safranal	1196	-	-	-	0.03
24	Verbenona	1204	0,02	0,04	0,07	0.03
25	Acetato de (Z)-crisantenil	1261	-	0,07	0,05	-
26	Acetato de carquejilo	1298	39,45	40,34	57,48	57.93
27	Mirtenil acetato	1324	-	-	0,20	0.17
28	(E,E)-2,4-Decadienal	1315	0,02	-	-	-
29	$\delta$ -Elemeno	1335	0,13	0,30	0,14	0.03
30	Acetato de (E)-carvilo	1339	0,02	-	-	-
31	Acetato de $\alpha$ -terpinilo	1346	-	-	-	0.18
32	Acetato de (Z)-carvilo	1365	0,08	-	-	-
33	$\alpha$ -Longipino	1350	-	0,04	-	-
34	$\alpha$ -Cubebeno	1345	-	0,04	-	-
35	$\alpha$ -Ylangeno	1373	0,15	0,34	0,13	0.11
36	Acetato de (E)-mirtanol	1385	0,07	0,07	0,06	0.02
37	$\beta$ -Cubebeno	1387	0,06	0,11	0,08	0.07
38	$\beta$ -Elemeno	1389	1,92	2,17	0,73	1.19
39	Metil eugenol	1403	0,43	-	-	-
40	$\alpha$ -Gurjuneno	1409	-	0,52	0,19	0.15
41	(E)-Cariofileno	1417	0,29	1,16	0,44	0.26

Continuación						
No.	Compuesto	IK	BTSF (mg/ mL)	BTSV (mg/ mL)	BTNF (mg/ mL)	BTNV (mg/ mL)
42	$\beta$ -Copaeno	1430	-	-	-	0.03
43	$\gamma$ -Elemeno	1434	-	0,20	-	-
44	$\alpha$ -Himachalene	1449	0,09	0,25	-	-
45	$\alpha$ -Humuleno	1452	0,09	0,18	0,10	0.05
46	Alloaromadendreno	1458	0,06	0,08	-	0.09
47	(E)- $\beta$ -Farneseno	1454	0,13	0,55	0,11	0.11
48	$\gamma$ -Gurjuneno	1475	0,10	0,23	0,07	0.06
49	$\beta$ -chamigreno	1476	0,06	0,06	-	-
50	Germancreno D	1484	1,11	0,16	1,44	1.69
51	$\beta$ -Selineno	1489	0,08	0,88	0,02	0.04
52	Biciclogermacreno	1500	-	-	-	0.66
53	$\gamma$ -Cadineno	1513	-	0,10	-	-
54	$\delta$ -Cadineno	1522	0,37	0,68	0,38	0.34
55	Elemol	1548	1,30	0,22	1,45	0.94
56	Germancreno B	1559	-	0,14	-	-
57	Palustrol	1567	7,18	4,74	5,29	5.55
58	Germacreno D-4-ol	1574	-	-	0,34	0.47
59	Espatulenol	1578	0,55	0,20	0,21	-
60	Oxido de cariofileno	1582	0,10	0,13	-	-
61	Viridiflorol	1592	3,25	1,53	1,51	1.38
62	Ledol	1602	2,24	1,02	1,45	1.43
63	1-epi-Cubenol	1627	0,08	-	-	0.05
64	10-epi $\gamma$ -Eudesmol	1622	0,13	-	-	-
65	$\beta$ -Eudesmol	1649	3,74	0,94	1,53	1.57
66	Pogostol	1651	-	-	-	0.28
67	$\alpha$ -Bisabolol	1685	-	-	-	0.11
68	Himachalol	1652	0,35	-	-	-
69	Neofitadieno	1840	0,06	0,21	-	-

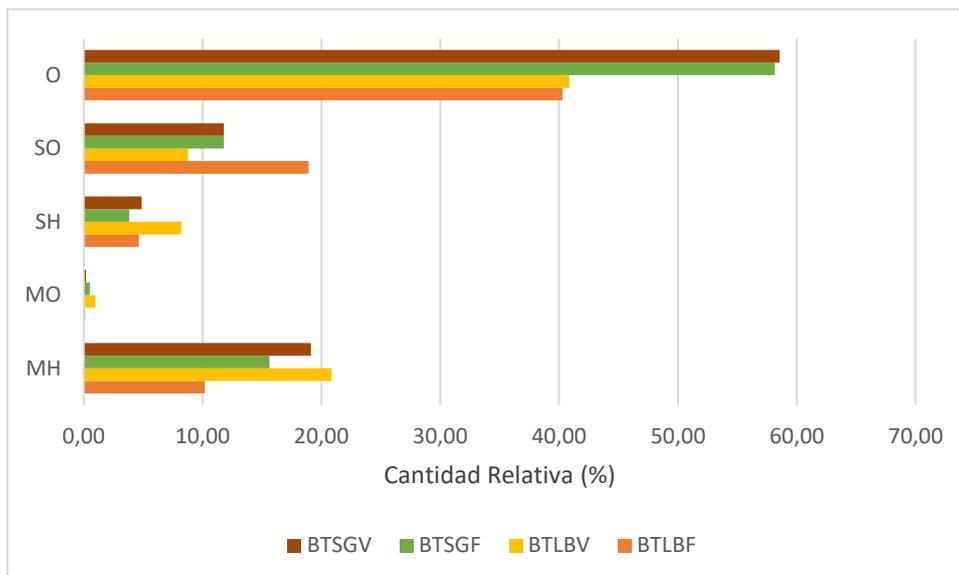


Figura 23. Agrupado de los componentes de los aceites esenciales de *Baccharis trimera*. MH: Monoterpenos hidrocarbonados. MO: Monoterpenos oxigenados. SH: Sesquiterpenos hidrocarbonados. SO: Sesquiterpenos oxigenados. O: otros.

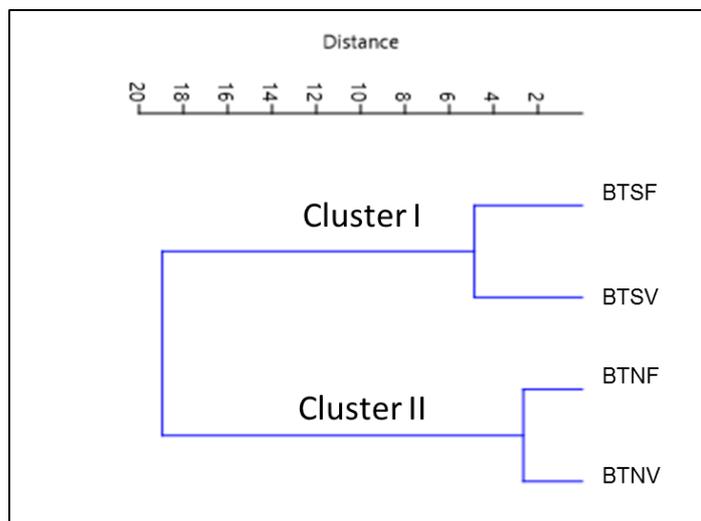


Figura 24. Dendrograma del Análisis de Cluster de los aceites esenciales de *Baccharis trimera*, utilizando el método de Ward basado en distancias euclídeas entre grupos.

### **5.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS AEs CONTRA *Penicillium digitatum* y *Guignardia citricarpa*.**

Los aceites esenciales, por ser compuestos que provienen del metabolismo secundario, están sujetos a posibles cambios en función de las necesidades de la planta. La producción de estos son el producto final de un complejo proceso biológico que se encuentra fuertemente condicionado por diversos factores, entre ellos, los más importantes serían: el estado vegetativo, la parte de la planta utilizada, las condiciones climáticas y de crecimiento, la variabilidad genética y el proceso de extracción (Bandoni, 2002). Este hecho es de gran importancia a la hora de la búsqueda de propiedades antimicrobianas en los aceites esenciales, ya que un cambio en la composición puede conllevar una disminución o supresión de la actividad. Debido a esta variabilidad química fue que en el presente trabajo se decidió evaluar la actividad de los aceites esenciales provenientes de dos regiones que presenten cierta variabilidad en las condiciones geoclimáticas (norte y sur de Uruguay) y dos estados fenológicos de la planta (floración y vegetativo). De esta manera es posible evaluar si la actividad inhibitoria de *Penicillium digitatum* y *Guignardia citricarpa* de los aceites esenciales de cada especie estudiada, presenta alguna diferencia dentro de las 4 variables seleccionadas.

#### **5.3.1. Test de fase volátil**

En las curvas de crecimiento radial de *Penicillium digitatum* en el medio de cultivo PDA y expuesta a los vapores de los aceites esenciales de *Lippia alba* (Figura 25), se puede observar que todos los aceites esenciales producen inhibición del crecimiento del hongo, alcanzando valores máximos al comienzo de la prueba que luego disminuye con el correr de los días. En la Tabla 7 se observan los valores del índice de inhibición de crecimiento radial de *Penicillium digitatum* con respecto al testigo. Allí se observa que hasta el cuarto día de incubación todos los aceites esenciales producen un 100 % de inhibición del hongo, a partir de este día la inhibición comienza a disminuir gradualmente. A partir del análisis de varianza y del test de comparación de medias de Tukey (Anexo 2), se puede determinar que

hasta el día 8 todos aceites esenciales producen inhibición del hongo ya que se diferencian significativamente del testigo. Desde el día 10 el AE de las plantas de *Lippia alba* proveniente del sur en estado de vegetativo no produce inhibición del hongo ya que no se diferencia significativamente del testigo. Si bien son los aceites esenciales provenientes de plantas en floración son los que presentan mayores porcentajes de inhibición hasta el día 10, ya a partir del día 14 el AE de las plantas de *Lippia alba* proveniente del norte en estado de floración ya no produce inhibición, debido a que no se diferencia significativamente del testigo. Solo los aceites esenciales de *Lippia alba* del norte en vegetativo y del sur en floración son quienes producen inhibición hasta el final de la prueba.

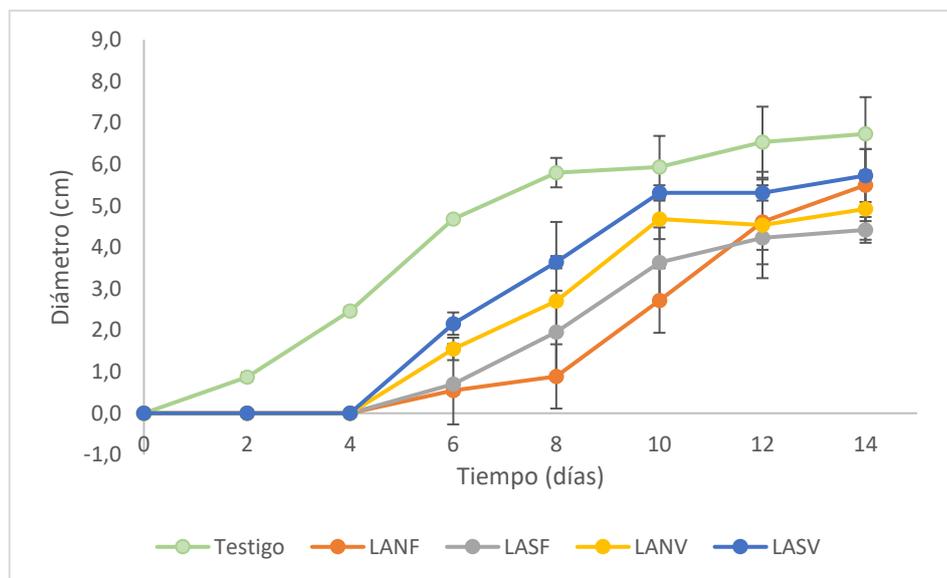


Figura 25. Efecto de los AEs de *Lippia alba* sobre el crecimiento micelial de *Penicillium digitatum*.

Días	IIC (%) de <i>Penicillium digitatum</i>			
	LANF	LASF	LANV	LASV
2	100,0	100,0	100,0	100,0
4	100,0	100,0	100,0	100,0
6	88,3	85,1	66,9	53,9
8	84,7	66,2	53,4	37,2
10	54,2	38,8	21,1	10,5
12	29,4	35,3	30,5	18,7
14	18,3	34,4	26,9	14,9
16	16,6	34,6	25,7	16,1

Tabla 8. Índice de inhibición del crecimiento radial de *Penicillium digitatum* en placas tratadas aceites esenciales de *Lippia alba*.

Las curvas de crecimiento radial de *Guignardia citricarpa* en el medio de cultivo PDA, expuesta a los vapores de los aceites esenciales de *Lippia alba* (Figura 26) muestran que todos los aceites esenciales presentan inhibición del hongo en los primeros días. Asimismo, en la Tabla 8 se presentan los valores del índice de inhibición de crecimiento radial del hongo con respecto al testigo, en donde se aprecia que todos los aceites esenciales presentan un 100% de inhibición en los primeros cuatro días y conforme avanzan los días esta va disminuyendo gradualmente. Este comportamiento puede estar relacionado a la volatilización de los compuestos que forman el aceite esencial con la consecuente disminución de la actividad (Inouye, et al., 2001).

A partir del análisis de varianza y del test de comparación de medias de Tukey (Anexo 2), se puede determinar que hasta el día 12 todos AEs producen inhibición del hongo ya que se diferencian significativamente del testigo. A partir de este día la inhibición del hongo por parte de los AEs de las plantas provenientes del norte disminuyen hasta hacerse cero en el día 14. Los AEs de las plantas provenientes del sur producen inhibición por mayor cantidad de días, inhibiendo por 22 días para los AEs extraídos de plantas en estado vegetativo y 18 días para aquellas en estado de floración. Para el último día del ensayo ninguno de los AEs produce inhibición ya que no se diferencian significativamente del testigo.

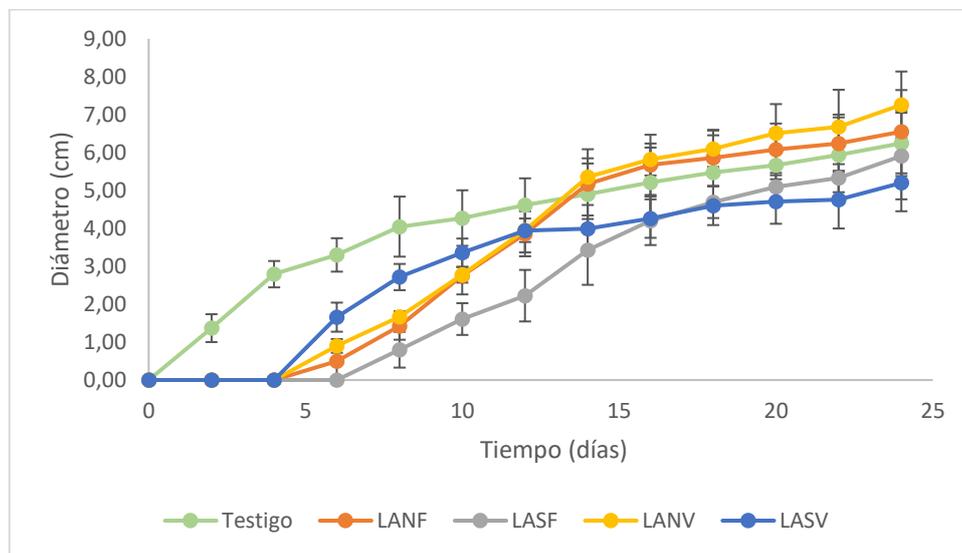


Figura 26. Efecto de los AEs de *Lippia alba* sobre el crecimiento micelial de *Guignardia citricarpa*.

Días	IIC (%) de <i>Guignardia citricarpa</i>			
	LANF	LASF	LANV	LASV
2	100,0	100,0	100,0	100,0
4	100,0	100,0	100,0	100,0
6	84,8	100,0	72,7	49,7
8	64,8	80,2	58,8	32,9
10	35,6	62,4	35,1	21,4
12	16,5	51,8	14,5	14,6
14	0,0	30,1	0,0	18,5
16	0,0	19,5	0,0	18,3
18	0,0	14,3	0,0	16,0
20	0,0	10,2	0,0	17,0
22	0,0	10,2	0,0	19,9
24	0,0	5,4	0,0	16,7

Tabla 9. Índice de inhibición del crecimiento radial de *Guignardia citricarpa* en placas tratadas aceites esenciales de *Lippia alba*.

En las curvas de crecimiento radial de *Penicillium digitatum* en el medio de cultivo PDA y expuesta a los vapores de los aceites esenciales de *Aloysia gratissima* (Figura 27), se puede observar que en mayor o menor medida todos los aceites esenciales producen inhibición del crecimiento del hongo.

En la *Tabla 9* se observan los valores del índice de inhibición de crecimiento radial de *P. digitatum* con respecto al testigo. Allí se observa que a los dos días de incubación los aceites esenciales provenientes del norte del país producen un 100 % de inhibición del hongo, mientras que los provenientes del Sur producen 49% (vegetativo) y 59% (floración). Esta diferencia es coherente con lo discutido anteriormente y se puede atribuir a que los aceites de ambas regiones presentan una composición química distinta (*Figura 22*), teniendo quimiotipos diferentes.

La gran inhibición al comienzo de la incubación puede ser producida porque los compuestos oxigenados serán los primeros en generar contacto con el hongo ya que son quienes presentan mayor afinidad por la fase hidrofílica del medio de cultivo. Estos compuestos son también reportados por ser quienes presentan mayor actividad antimicrobiana (Lang & Buchbauer, 2011; Tongnuanchan & Benjakul, 2014; Chalchat, et al., 1997). A partir del segundo día, la inhibición del crecimiento del hongo con respecto al testigo desaparece en todos los tratamientos de los AEs, luego en el sexto día la inhibición vuelve a aumentar. Una explicación para este comportamiento podría ser la distinta volatilidad, afinidad y actividad antifúngica de los compuestos que forman el aceite esencial, es así que a medida que pasan los días, distintos compuestos, con distintas actividades, van a ser quienes van teniendo contacto con el hongo produciendo su la inhibición.

A partir del análisis de varianza y del test de comparación de medias de Tukey (*Anexo 2*), se puede determinar que en el día 4 ninguno de los AEs presenta actividad inhibitoria del hongo, ya que no se observan diferencias significativas con respecto al testigo. A partir del día 6 todos los AEs, excepto el AGSV comienzan a presentar inhibición del hongo, ya que se diferencian significativamente del testigo. Desde el día 8 hasta el final del ensayo se observa que todos los AEs presentan inhibición de *P. digitatum*, ya que todos se diferencian significativamente del testigo. Al final del ensayo, en el día 16 se observa que todos inhiben al hongo y no se encuentran diferencias significativas entre ellos.

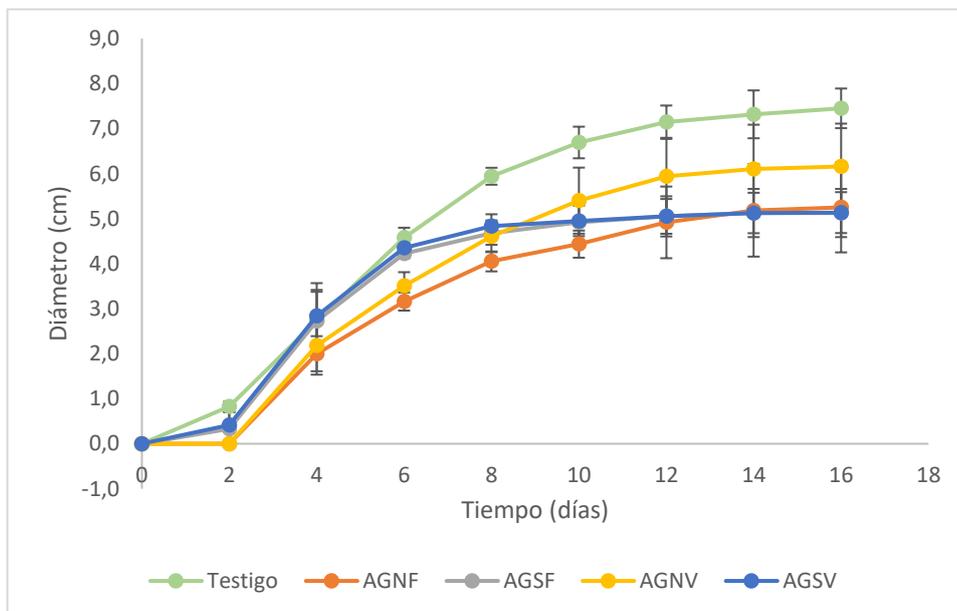


Figura 27. Efecto de los AEs de *Aloysia gratissima* sobre el crecimiento micelial de *Penicillium digitatum*.

Días	IIC (%) de <i>Penicillium digitatum</i>			
	AGNF	AGSF	AGNV	AGSV
2	100,0	59,6	100,0	49,5
4	26,8	0,3	20,1	0,0
6	31,0	7,7	23,3	4,9
8	31,8	21,3	22,4	18,7
10	33,7	26,5	19,3	26,0
12	31,2	29,3	16,8	29,3
14	29,2	30,0	16,6	30,0
16	29,5	31,2	17,3	31,1

Tabla 10. Índice de inhibición del crecimiento radial de *Penicillium digitatum* en placas tratadas aceites esenciales de *Aloysia gratissima*.

Las curvas de crecimiento radial de *Guignardia citricarpa* en el medio de cultivo PDA, expuesta a los vapores de los aceites esenciales de *Aloysia gratissima* (Figura 28), muestran que todos los aceites esenciales presentan inhibición del hongo en los primeros días. Asimismo en la Tabla 10 se presentan los valores del índice de inhibición de crecimiento radial del hongo con respecto al testigo, en donde se aprecia que la inhibición disminuye conforme avanzan los días. Este comportamiento puede estar relacionado a la volatilización de los compuestos que forman el aceite esencial que ocasiona la consecuente disminución de la actividad (Inouye, et al., 2001).

A partir del análisis de varianza y del test de comparación de medias de Tukey (Anexo 2), se puede determinar que el aceite esencial proveniente de plantas recolectadas en el norte en estado de floración es quien mantiene la actividad por mayor tiempo, presentando diferencias significativas con el testigo hasta el día 16. Por su parte, los AEs del norte en estado vegetativo y del sur en estado de floración producen inhibición del hongo hasta el día 8 y el AE del sur en estado vegetativo presenta actividad hasta el día 6.

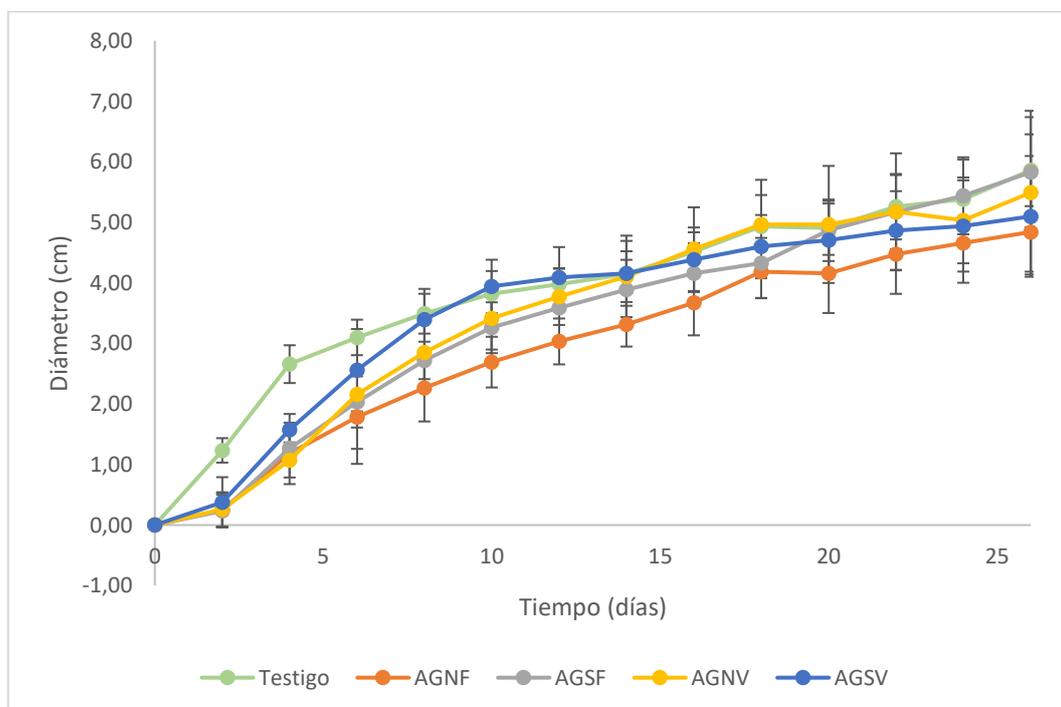


Figura 28. Efecto de AEs de *Aloysia gratissima* sobre el crecimiento micelial de *Guignardia citricarpa*.

Días	IIC (%) de <i>Guignardia citricarpa</i>			
	AGNF	AGSF	AGNV	AGSV
2	79,7	81,1	79,1	69,6
4	55,5	52,4	59,6	40,8
6	42,5	34,4	30,4	17,5
8	35,1	22,1	18,4	2,9
10	29,5	14,7	10,6	0,0
12	23,8	9,8	5,2	0,0
14	20,1	6,3	1,0	0,0
16	18,7	8,0	0,0	3,0
18	15,2	12,3	0,0	6,8
20	15,3	0,8	0,0	4,1
22	14,9	1,7	1,6	7,5
24	13,4	0,0	6,4	8,1
26	17,4	0,0	6,3	13,0

Tabla 11. Índice de inhibición del crecimiento radial de *Guignardia citricarpa* en placas tratadas aceites esenciales de *Aloysia gratissima*.

Dado que los aceites esenciales de *Aloysia gratissima* fueron los que presentaron mayor variación en cuanto a la composición química, encontrándose quimiotipos diferentes en el Norte y Sur del país, era de esperar que la actividad antifúngica variara significativamente en las distintas regiones. A partir de los resultados obtenidos se observa que, si bien existen diferencias en el grado de inhibición de los hongos, todos los AEs poseen actividad antifúngica. Es decir, que a pesar de

tener distintos compuestos mayoritarios, ambos quimiotipos poseen compuestos con actividad antifúngica. En cuanto a los aceites esenciales extraídos de plantas provenientes del sur, se determinó que uno de los compuestos mayoritarios era el 1,8-Cineol, que es reportado como un compuesto con actividad antimicrobiana frente a varios hongos y bacterias (Bakkali, et al., 2008; Rocha Vilela, et al., 2009). Mientras que en los AEs de plantas recolectadas en el norte el compuesto mayoritario fue el Sabineno, que también es reportado por poseer actividad antimicrobiana (Raveendrakurup, et al., 2014). Otro compuesto que se encuentra en gran proporción en estos AEs es el  $\alpha$ - Pineno, que según el trabajo de Glisic, et al., 2007, las fracciones con alto contenido de  $\alpha$ - Pineno y mezcla de  $\alpha$ -pineno con Sabineno mostraron la mayor actividad antimicrobiana, especialmente contra hongos, lo que podría significar un efecto sinérgico de ambos compuestos.

Las curvas de crecimiento radial de *Penicillium digitatum* en el medio de cultivo PDA y expuesta a los vapores de los AEs de *Baccharis trimera* se puede observar en la *Figura 29*. En este gráfico se observa que todos los tratamientos produjeron una muy leve inhibición del crecimiento del hongo, y que a partir del día 6 esa inhibición se mantiene por el resto de los días que duró la prueba.

En la *Tabla 11* se observan los valores del índice de inhibición de crecimiento radial de *P. digitatum* con respecto al testigo con los aceites esenciales de *Baccharis trimera*. A partir de dicha tabla, del análisis de varianza y del test de comparación de medias de Tukey (*Anexo 2*), se puede determinar que en el día dos, las plantas provenientes del norte y la del sur en estado de floración producen actividad inhibitoria del crecimiento miceliar del hongo, ya que se diferencian significativamente del testigo. A partir de este día la inhibición se reduce llegando a ser nula en el día cuatro. A partir del día 6 y hasta el final del experimento se observa que todas las plantas producen inhibición en el crecimiento miceliar del hongo, ya que todas se diferencian significativamente del testigo. En el día 16 se observa que los AEs de las plantas en estado de floración no se diferencian significativamente entre ellas, lo mismo ocurre con los AEs de las plantas en estado vegetativo.

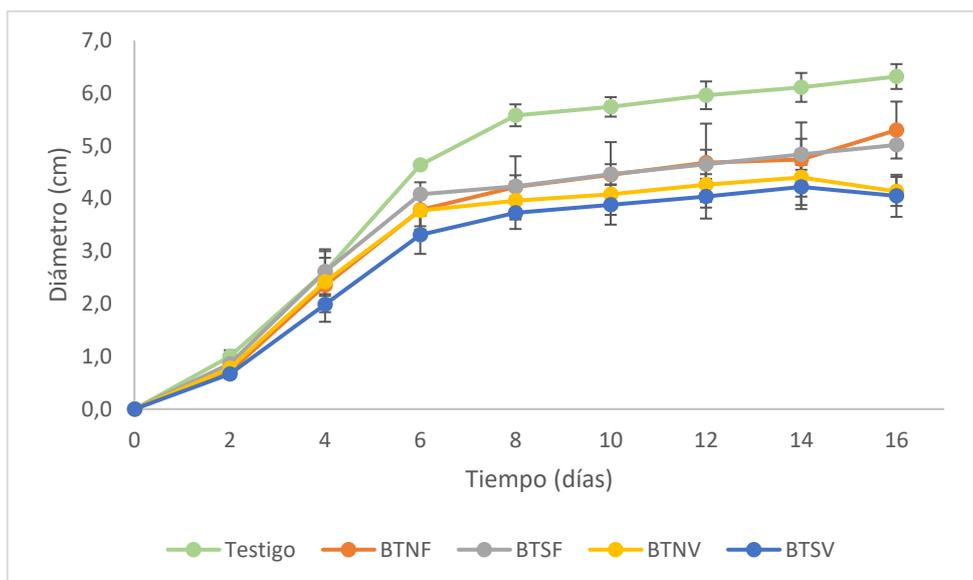


Figura 29. Efecto de los AEs de *Baccharis trimera* sobre el crecimiento micelial de *Penicillium digitatum*.

Días	IIC (%) de <i>Penicillium digitatum</i>			
	BTNF	BTSF	BTNV	BTSV
2	28,3	14,2	22,5	33,3
4	10,0	0,0	7,3	23,8
6	18,5	12,1	18,8	28,7
8	24,4	24,2	29,0	33,2
10	22,5	22,3	28,9	32,4
12	21,5	22,0	28,5	32,2
14	22,4	20,8	28,0	30,9
16	16,1	20,6	34,6	35,9

Tabla 12. Índice de inhibición del crecimiento radial de *Penicillium digitatum* en placas tratadas aceites esenciales de *Baccharis trimera*.

Las curvas de crecimiento radial de *Guignardia citricarpa* en el medio de cultivo PDA y expuesta a los vapores de los aceites esenciales de *Baccharis trimera* (Figura 30), muestran que todos los aceites esenciales presentan buena inhibición del hongo hasta el día diez. Asimismo, en la Tabla 12 se presentan los valores del índice de inhibición de crecimiento radial del hongo con respecto al testigo, en donde se aprecia que la inhibición en todos los tratamientos llega al máximo de inhibición en el día 4 y luego disminuye conforme avanzan los días. Este comportamiento puede estar relacionado con el hecho de que inicialmente algunos de los compuestos volátiles necesitan un tiempo inicial para tener contacto con el hongo y producir la actividad. A medida que transcurren los días va ocurriendo la volatilización de los compuestos que forman el aceite esencial con la consecuente disminución de la actividad (Inouye, et al., 2001; Al-Samarrai, et al., 2012; Freiesleben & Jäger, 2014).

A partir del análisis de varianza y del test de comparación de medias de Tukey (Anexo 2), se pudo determinar que hasta el día 10 todas las muestras producen inhibición del crecimiento radial del hongo pues presentan diferencias significativas con el testigo. Asimismo, el AE extraído de plantas del sur en estado vegetativo produce actividad inhibitoria hasta el día 14. Los tratamientos realizados con los AEs de plantas del norte en estado de floración y vegetativo, así como los de plantas del sur en estado de floración, no presentan diferencias significativas entre sí.

A partir de los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial de ambos hongos testeados con aceites esenciales de *Baccharis trimera*, se puede observar que *Guignardia citricarpa* presenta mayor sensibilidad a estos AEs que *Penicillium digitatum*, sobre todo en los primeros días de incubación.

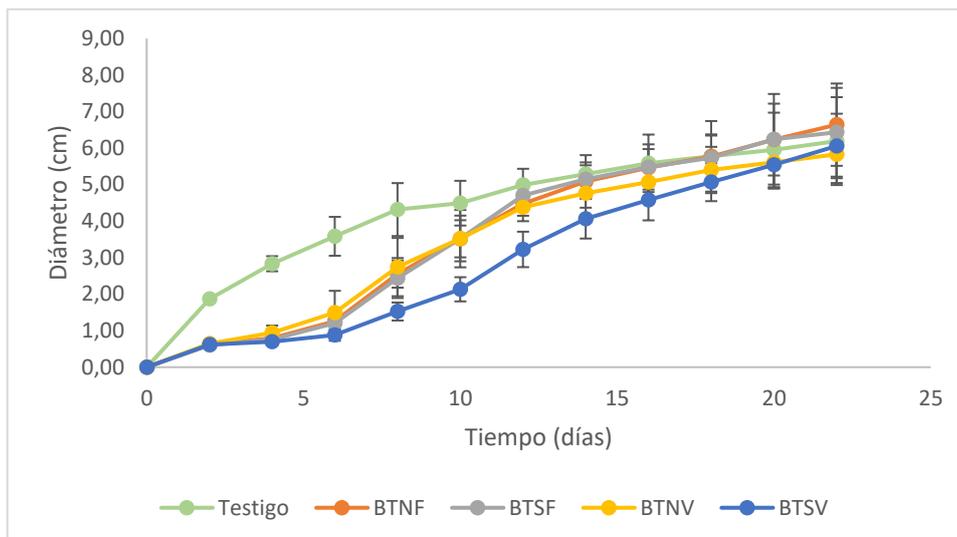


Figura 30. Efecto de AEs de *Baccharis trimera* sobre el crecimiento micelial de *Guignardia citricarpa*.

Días	IIC (%) de <i>Guignardia citricarpa</i>			
	BTNF	BTSF	BTNV	BTSV
2	67,0	67,9	65,6	67,0
4	72,1	73,2	66,8	75,3
6	64,9	66,3	58,4	75,3
8	40,9	43,4	36,5	64,7
10	21,7	21,5	21,6	52,5
12	10,4	5,8	12,3	35,4
14	3,8	2,5	9,9	23,0
16	2,1	1,8	9,2	17,9
18	0,1	0,7	6,5	12,3
20	0,0	0,0	5,7	6,9
22	0,0	0,0	5,8	2,2

Tabla 13. Índice de inhibición del crecimiento radial de *Guignardia citricarpa* en placas tratadas aceites esenciales de *Baccharis trimera*.

### 5.3.2. Test de dilución en agar.

Mediante este ensayo se procuró evaluar la actividad de los compuestos que forman el aceite esencial por contacto directo con el hongo. Sin embargo, en los resultados se encontró, a diferencia de los resultados obtenidos del test de fase volátil, que ninguno de los tratamientos produjo inhibición los hongos testeados (Figuras 31, 32, 33, 34, 35 y 36). La razón de este hecho puede haber sido que, debido a que los aceites esenciales son insolubles en agua, estos se incorporaron al medio de cultivo junto con un solvente (DMSO) que mejore el contacto del microorganismo con los compuestos a testear. Cabe mencionar que este agregado puede causar cambios en las propiedades fisicoquímicas del sistema, lo que puede resultar ya sea en la mejora o reducción de la actividad antimicrobiana (Mann & Markham, 1998). La baja solubilidad en agua de los componentes de los aceites esenciales no permite una buena difusión en el agar, lo que puede producir un ineficiente contacto entre los metabolitos activos y el hongo. Como resultado pueden observarse falsos negativos, en donde AEs con compuestos activos de baja solubilidad dan baja o nula inhibición del microorganismo. Es por ello que este test no representa fielmente la actividad antimicrobiana, ya que un compuesto con mayor capacidad de dilución en el agar puede producir mayor inhibición en el microorganismo a pesar de tener menor actividad (Vero, 2006).

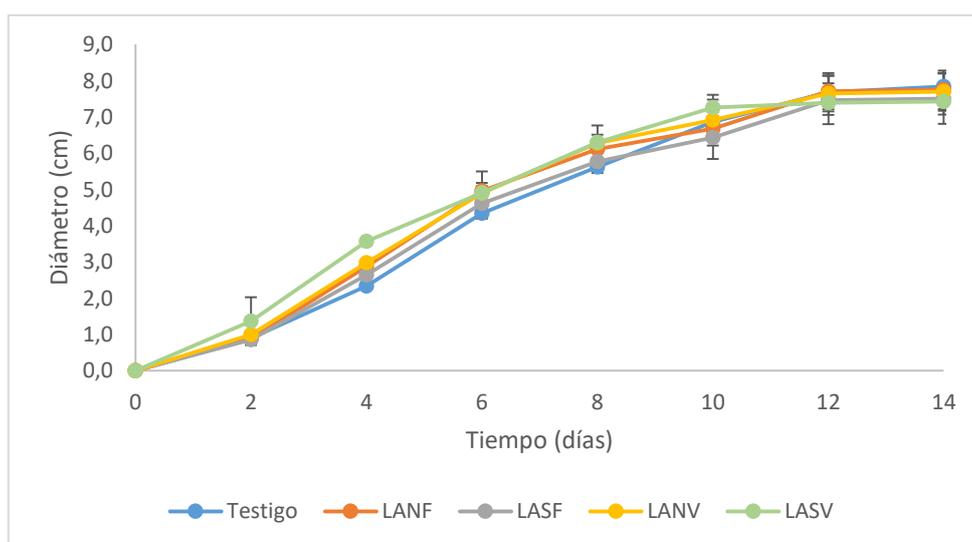


Figura 31. Efecto de los AEs de *Lippia alba* en dilución sobre el crecimiento micelial de *Penicillium digitatum*.

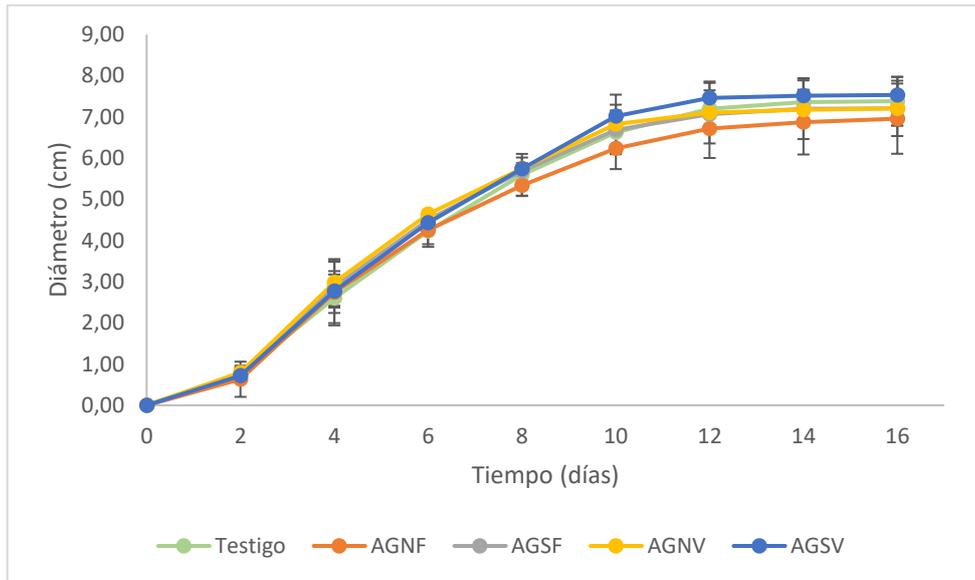


Figura 32. Efecto de los AEs de *Aloysia gratissima* en dilución sobre el crecimiento micelial de *Penicillium digitatum*.

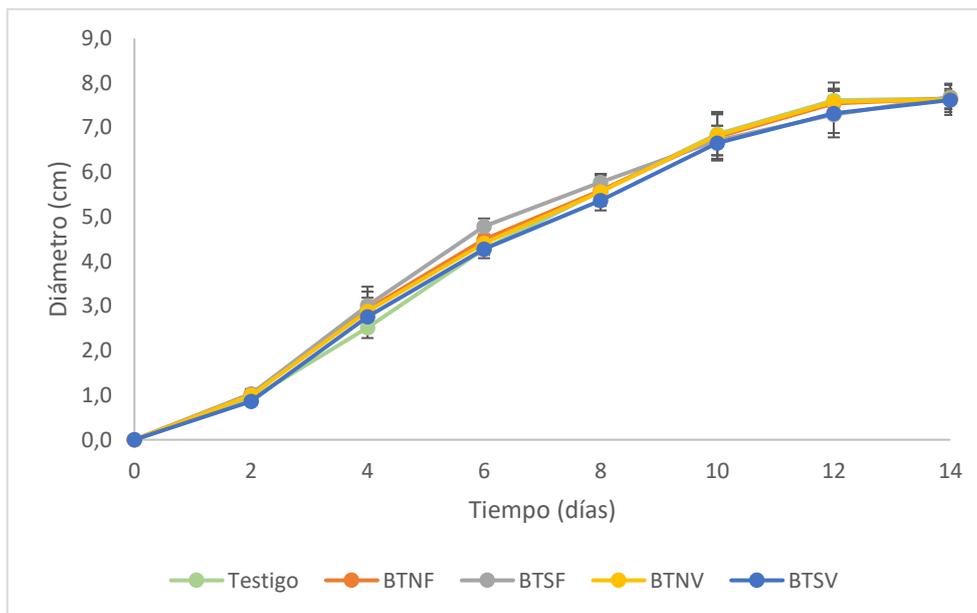


Figura 33. Efecto de los AEs de *Baccharis trimera* en dilución sobre el crecimiento micelial de *Penicillium digitatum*.

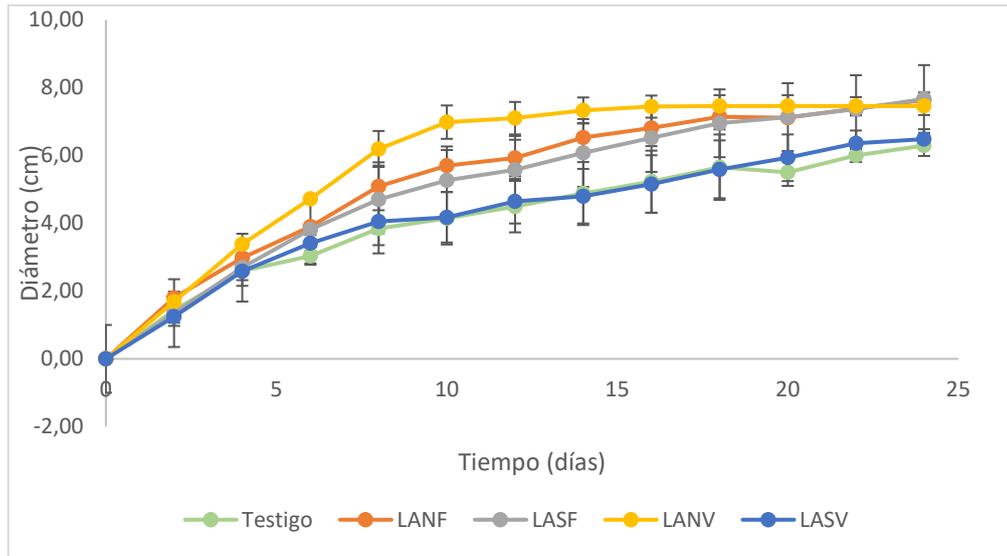


Figura 34. Efecto de AEs de *Lippia alba* en dilución sobre el crecimiento micelial de *Guignardia citricarpa*.

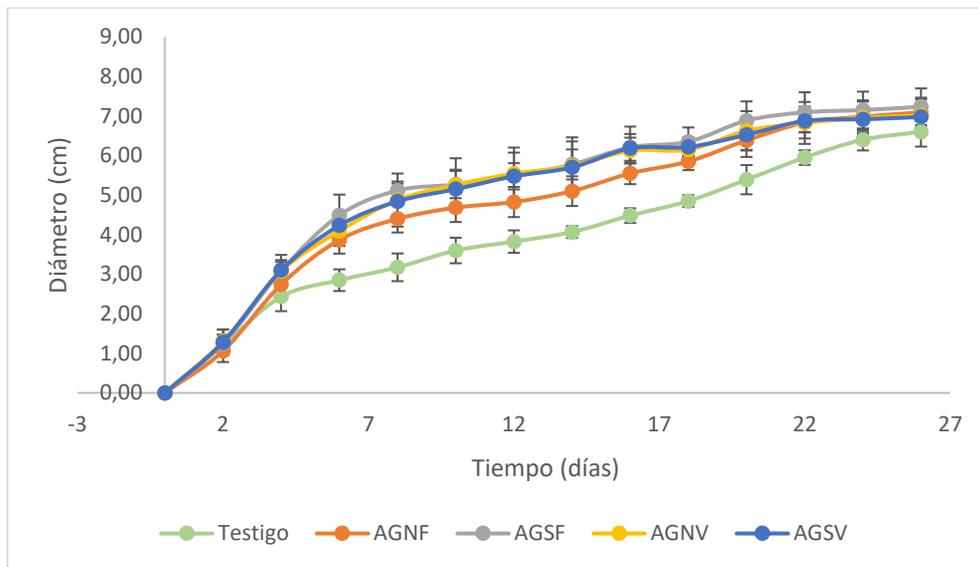


Figura 35. Efecto de AEs de *Aloysia gratissima* en dilución sobre el crecimiento micelial de *Guignardia citricarpa*.

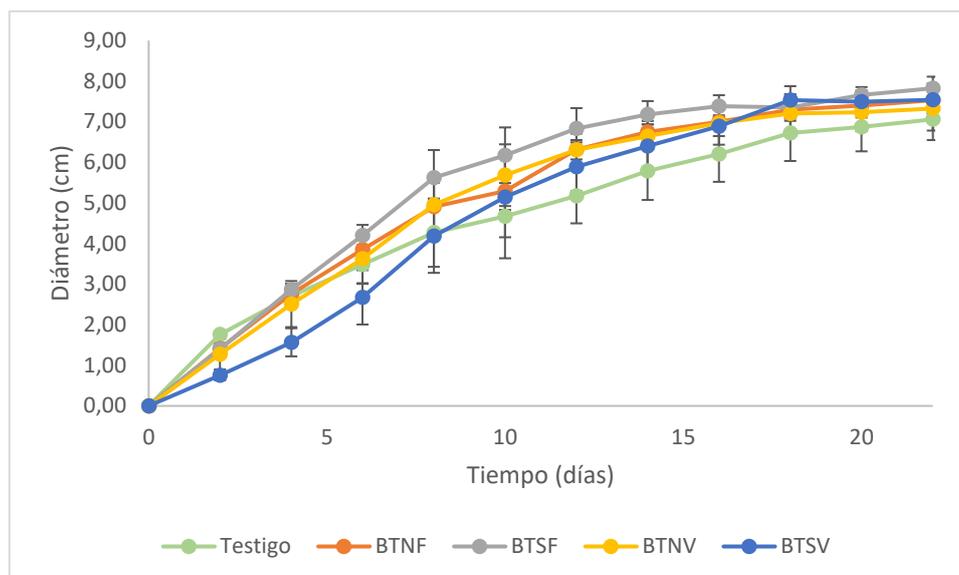


Figura 36. Efecto de los AEs de *Baccharis trimera* en dilución sobre el crecimiento micelial de *Guignardia citricarpa*.

## 6. CONCLUSIONES

Se concluye que es de gran importancia realizar una estandarización del cultivo así como su caracterización química cualitativa y cuantitativa, de modo de asegurarse la eficacia de la acción propuesta. En este caso, la acción sobre hongos fitopatógenos de fruta cítrica. La composición química de los aceites esenciales de *Lippia alba*, *Aloysia gratissima* y *Baccharis trimera* presentaron grandes variaciones dependiendo de la etapa de crecimiento y región geográfica donde se ubica la planta, siendo este último el factor preponderante, generando mayor variabilidad de la composición química. En el caso del AE de *Aloysia gratissima* esta diferencia se ve bien marcada, ya que se encontró que en el Norte y Sur del Uruguay existen quimiotipos diferentes.

Los resultados obtenidos de actividad antimicrobiana mediante el test de fase volátil contra *Penicillium digitatum* y *Guignardia citricarpa*, indican que los aceites esenciales extraídos de las plantas aromáticas utilizadas como modelo en este trabajo poseen un uso potencial como fuente de compuestos antimicrobianos. Fue posible demostrar que la actividad antifúngica de un AE varía según su estado fenológico y lugar de colecta. Se encontró que los AEs de *Lippia alba* y

*Aloysia gratissima* son quienes alcanzan mayores porcentajes de inhibición para ambos hongos, siendo el AE de *Lippia alba* el que produce la inhibición por mayor tiempo.

Se encontró que uno de los inconvenientes del uso de los AEs como antimicrobianos es su pérdida de eficacia con el tiempo debido a su volatilidad y gran lipofilidad. La alta lipofilidad de los AEs no permitió sacar resultados al evaluar su capacidad con el test de dilución en agar.

A partir de los resultados obtenidos, se puede afirmar que el uso de aceites esenciales para el control de hongos fitopatógenos, al menos para los estudiados en este modelo, pueden ser utilizados como una herramienta alternativa más para el manejo integrado de enfermedades de plantas (control cultural, genético, físico y químico). Sin embargo, también es posible concluir que las características particulares en la composición de cada aceite esencial afectarán las actividades que lo caracterizan.

Estos resultados dan muestra de las grandes potencialidades que tiene la producción de biopesticidas elaborados en base aceites esenciales de plantas nativas. En este sentido, resulta deseable la realización de nuevas investigaciones que profundicen, entre otras cosas, en los mecanismos de aplicación en forma individual para cada aceite, fitopatógeno y etapa de aplicación en la poscosecha de la fruta. La coordinación de estas nuevas investigaciones, así como la integración entre instituciones nacionales y regionales, resultan de vital importancia para potenciar el progreso en esta área y explotar así al máximo los beneficios que presenta en un modelo de desarrollo productivo, preocupado no solo por el crecimiento económico, sino también por la innovación y el cuidado de nuestro ecosistema.

## 7. REFERENCIAS

- Adams, R. Identification of essential oils components by Gas Chromatography / Mass Spectrometry, 4 ed., Carol Stream: Allured, 2007.
- Alea, P. Aceites química, bioquímica, producción y usos. Editorial Universitaria: La Habana, 2015.
- Al-Samarrai, G., Singh, H., & Syarhabil, M. Evaluating eco-friendly botanicals (natural plant extracts) as alternatives to synthetic fungicides. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 2012, 19, 673-676.
- Azcón-Bieto, J., & Talon, M. Fundamentos de fisiología vegetal, 2 ed; McGraw-Hill Interamericana: España, 2008.
- Babushok, V. Retention Indices for Most Frequently Reported Essential Oil Compounds in GC. *Chromatographia*, 2009, 69, 257- 269.
- Bagamboula, C., Uyttendaele, M., & Debevere, J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol. *Food Microbiology*, 2004, 21, 33–42.
- Bailac, P., Dellacasa, A., Duschatzky, C., Firpo, N., & Ponzi, M. Composición del Aceite Esencial y Actividad Antimicrobiana de *Aloysia gratissima* de San Luis-Argentina. *Anales de la Asociación Química Argentina*, 1999, 87, 149-153.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 2008, 46, 446–475.
- Bandoni, A. Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica: Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores, 1<sup>ra</sup> ed. CYTED: Buenos Aires, 2002.
- Benovit, S., Silva, L., Salbego, J., Loro, V., Mallmann, C., Baldisserotto, B., Heinzmann, B. Anesthetic activity and bio-guided fractionation of the essential oil of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. in silver catfish *Rhamdia quelen*. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 2015, 87, 1675-1689.

Benyoussef, E.-H., & Saibi, S. Influence of essential oil composition on water distillation kinetics. *Flavor Fragrance Journal*, 2013, 28, 300-308.

Bertucco, A., & Franceschin, G. Supercritical Fluid Extraction of Medicinal and Aromatic Plants: Fundamentals. In *Extraction technologies for medicinal and aromatic plant*; S. S. Handa, S. P. Singh Khanuja, G. Longo, & D. D. Rakesh, Eds.; International Centre for Science and High Technology: Trieste, 2008, 169-180.

Bonifacino, M. Identificación botánica *Conyza bonariensis*. Comunicación personal, 2016.

Boubaker, H., Karim, H., Hamdaoui, A., Msanda, F., Leach, D., Bombarda, I., Chemical characterization and antifungal activities of four *Thymus* species essential oils against postharvest fungal pathogens of citrus. *Industrial Crops and Products*. 2016, 86, 95-101.

Bruno, Y. Cítricos: situación y perspectivas. *Anuarios de OPYPA, MGAP*, 2009, 179-196.

Brussa, C., Delfino, L., Nicoli, N., Muñoz, F., Gago, J., Rodriguez, R., & García, A. Curso de conocimiento y reconocimiento de Flora Indígena [Online], 2014, [http://jardinbotanico.montevideo.gub.uy/sites/jardinbotanico.montevideo.gub.uy/files/articulos/descargas/manual\\_del\\_curso\\_de\\_flora\\_indigena.pdf](http://jardinbotanico.montevideo.gub.uy/sites/jardinbotanico.montevideo.gub.uy/files/articulos/descargas/manual_del_curso_de_flora_indigena.pdf) (accessed Setiembre 20, 2016).

Buchbauer, G. Biological Activities of Essential Oils. In *Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications*. Can Baser, H. & Buchbauer G., Eds., CRC Press Taylor & Francis Group: Florida, 2010, 235-280.

Caputi, P., & Montes, F. Plan estratégico y diseño institucional para el sector cítrico en Uruguay. FAO: Montevideo, 2010.

Carey, F. *Química Orgánica*, 6ta ed.; McGraw-Hill: EEUU, 2006.

Cassel, E., & Vargas, R. Experiments and Modeling of the Cymbopogon winterianus. Essential Oil Extraction by Steam Distillation. Journal of Mexican Chemical Society, 2006, 50, 126-129.

Cassel, E., Vargas, R., Martinez, N., Lorenzo, D., & Dellacassa, E. Steam distillation modeling for essential oil extraction process. Industrial crops and products, 2009, 29, 171-176.

Chalchat, J.-C., Garry, R.-P., Menut, C., Lamaty, G., Robert, M., & Chopineau, J. Correlation Between Chemical Composition and Antimicrobial Activity. VI. Activity of Some African Essential Oils. Journal of essential oil research, 1997, 9, 67-75.

Ciccio, J., & Ocampo, R. Distribución biogeográfica de Lippia alba (Mill.) N.E. Br. ex Britton y Wilson y quimiotipos en América y el Caribe. In Normalización de productos naturales obtenidos de especies de la flora Aromática Latinoamericana, Dellacassa E., Ed.; ediPUCRS: Porto Alegre, 2010, 107-130.

Clérici, S., Torchán, C., Di Barbaro, G., & Torchán, S. Estudio de la variabilidad genética de plantas nativas en el distrito chaqueño árido de la provincia de catamarca. Biología en Agronomía. 2012, 2, 26-41.

Costa da Silva, A., de Souza, A., Machado, J. d., Marques da Silva, B., & Pereira Pinto, J. Effectiveness of essential oils in the treatment of Colletotrichum truncatum-infected soybean seeds. Tropical Plant Pathology, 2012, 37, 305-313.

Council of Europe, European Pharmacopoeia, 5ta ed., Strasbourg, 2005.

Davison, P., & Naidu, A. Phyto- Phenol. In Natural Food Antimicrobial Systems, Naidu, A., Ed.; CRC Press: California, 2000, 265-294.

De Filippis, L. F. Plant secondary metabolites: from molecular biology to health products. In Plant-environment interaction. Responses and approaches to mitigate stress. Azooz, M. M.; Ahmad, P. Eds.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2016, 263-299.

Dellacassa, E., & Bandoni, A. El control de calidad en la industria de los aceites esenciales. In *Aceites Esenciales. Química, ecología, comercio, producción y salud*; Zygaldo, J. Ed.; Editorial Científica Universitaria: Córdoba, 2011, 143-164.

Dellacassa, E., Soler, E., Menéndez, P., & Moyna, P. Essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown and *Aloysia chamaedrifolia* Cham. (verbenaceae) from Uruguay. *Flavour and Fragrance Journal*, 1990, 5, 107-108.

Djouahri, A., Boualem, S., Boudarene, L., & Baaliouamer, A. Geographic's variation impact on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils from wood and leaves of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. *Industrial Crops and Products*, 2015, 63, 138-146.

Dorman, H., & Deans, S. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 2000, 88, 308–316.

Elder, H. Optimización de procesos extractivos aplicados a especies vegetales aromáticas y medicinales. Buenas prácticas de operaciones unitarias. In *Normalización de productos naturales obtenidos de especies de la flora aromática latinoamericana: proyecto CYTED IV.20*; Dellacassa, E., Ed.; EdiPUCRS: Porto Alegre, 2010, 37- 62.

EPPO. EPPO A1 and A2 list of pests recommended for regulation as quarantine pests QUARANTINE PESTS, European and Mediterranean Plant Protection Organization: Paris, 2016, 2-17.

EPPO. *Guignardia citricarpa*. European and Mediterranean Plant Protection Organization, 2009, 39, 318-327.

Evans, W., & Trease, G. *Farmagonosia*, 13 ed.; Interamericana-Mc Graw- Hill: Mexico D. F., 1991.

Farhat, A., Fabiano-Tixier, A.-S., El Maataoui, M., Maingonnat, J.-F., Romdhane, M., & Chemat, F. Microwave steam diffusion for extraction of essential oil from orange peel: Kinetic data, extract's global yield and mechanism. *Food Chemistry*. 2011, 125, 255- 261.

Fischer, A. La resistencia a herbicidas es una complejidad que puede manejarse [Online] 2013, <http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/18429080413103109.pdf> (accessed Feb 15, 2016).

Freiesleben, S., & Jäger, A. Correlation between plant secondary metabolites and their antifungal mechanisms—a review. *Medicinal & Aromatic Plants*, 2014, 3, 1-6.

Friedman, M., Henika, P., & Mandrell, R. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*, 2002, 65, 1545-1560.

Glisic, S., Milojevic, S., Dimitrijevic, S., Orlovic, A., & Skala, D. Antimicrobial activity of the essential oil and different fractions of *Juniperus communis* L. and a comparison with some commercial antibiotics. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 2007, 72, 311-320.

González- Candelas, L., Alamar, S., Ballester, A., Sánchez- Torres, P., Forment, J., Gadea, J., Marcos, J. Chapter 5 Global regulation of genes in citrus fruit in response to the postharvest pathogen *Penicillium digitatum*. In *Post-harvest Pathology*; Prusky, D. & Gullino L., Eds.; Springer: New York, 2010, 57-67.

Guédeza, C., Cañizalez, L., Castillo, C., Olivar, R., & Maffei, M. Alternativas para el control de hongos postcosecha en naranjas valencia (*Citrus sinensis*). *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 2010, 30, 1315-2556.

Hammer, & Harper, D. *Paleontological Data Analysis*. Blackwell, 2010.

Hennebelle, T., Sahpaz, S., Dermont, C., Joseph, H., & Bailleul, F. The Essential Oil of *Lippia alba*: Analysis of Samples from French Overseas Departments and Review of Previous Works. *Chemistry & Biodiversity*, 2006, 3, 1116-1125.

Hudaib, M., Speroni, E., Speroni, A. M., & Cavrini, V. GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2002, 29, 691-700.

Inouye, S., Tsutomu, T., Katsuhisa, U., & Hideyo, Y. Effect of Sealing and Tween 80 on the Antifungal Susceptibility Testing of Essential Oils. *Microbiology and Immunology*, 2001, 45, 201-208.

Instituto Nacional de Agropecuaria, INIA, Estudios en domesticación y cultivo de especies medicinales y aromáticas nativas [Online], 2004, 71-74, <http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/15630041107070839.pdf>, (accessed Feb 15, 2016).

Juliani, H., Koroch, A., Simon, J., Biurrun, F., Castellano, V., & Zygadlo, J. Essential Oils from Argentinean Aromatic Plants. *Acta Horticulturae*, 2004, 629, 491-498.

Kader, A. *Postharvest Technology of Horticultural Crops*, 3era ed.; Division of Agriculture Natural Resources, University of California: California, 2002.

Korsten, L., & Taverner, P. Citrus. In *Crop Post-Harvest: Science and Technology, Perishables*; Rees, D., Farrell, G., & Orchard, J., Eds.; Wiley-Blackwell, 2012, 43-52.

Koul, O., Suresh, W., & Dhaliwal, S. Essential Oils as Green Pesticides: Potential and Constraints. *Biopesticides International*, 2008, 4, 63-84.

Lado, J., Luque, E., Blanco, O., & Pérez, E. Evaluación de alternativas para el control poscosecha de aislamientos de *Penicillium digitatum* resistentes a imazalil. *Agrociencia Uruguay*, 2011, 15, 55-63.

Lado, J., Pérez, E., De Nigris, A., & Knochen, M. Residuos en frutos de naranja del fungicida imazalil aplicado en postcosecha y su efecto en el control de moho verde. *Agrociencia Uruguay*, 2013, 17, 83-90.

Lang, G., & Buchbauer, G. A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 2011, 27, 13- 39.

Lonea, S., Bhat, K., Bhat, H., Majeed, R., Anand, R., Hamid, A., & Khuroo, M. Essential oil composition of *Senecio graciliflorus* DC: Comparative analysis of

different parts and evaluation of antioxidant and cytotoxic activities. *Phytomedicine*, 2014, 21, 919–925.

Lopez Arze, J. B., Collin, G., Garneau, F.-X., Jean, F.-I., & Gagnon, H. Essential Oils from Bolivia. XI. Verbenaceae: *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. and Boraginaceae: *Cordia chacoensis* Chodat. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 2013, 16, 545 - 550.

López-Malo, A., Palou, E., & Alzamora, S. Naturally Occurring Compounds — Plant Sources. In *Antimicrobials in Food*; Davison, M., Sofos, J. & Branen A., Eds.; Taylor and Francis: EEUU, 2005, 429- 446.

Lorenzo, D., Paz, D., Davies, P., Vila, R., & Cañigüeral, S. Composition of a new essential oil type of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown from Uruguay. *Flavour and Fragrance Journal*, 2001, 16, 356-359.

Manici, L., Lazzeri, L., & Palmieri, S. In Vitro Fungitoxic Activity of Some Glucosinolates and Their Enzyme-Derived Products toward Plant Pathogenic Fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, 45, 2768-2773.

Mann, C. M., & Markham, J. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, 1998, 84, 538-544.

Marín-Loaiza, C., & Céspedes, C. Volatile compounds from plants. Origin, emission, effects. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 2007, 30, 327-351.

Martinez, A. *Aceites esenciales*. Universidad de Antioquia: Medellín, 2003.

Matias, E., Alves, E., Silva, M., Carvalho, V., Figueredo, F., Ferreira, J., Costa, J. Seasonal variation, chemical composition and biological activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* DC (Boraginaceae) and the sabinene. *Industrial Crops and Products*. 2016, 87, 45–53.

McLafferty, F., & Stauffer, D. *The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data*, 5th ed.; Wiley New York, 1991.

Memarzadeh, S. M., Pirbalouti, A. G., & AdibNejad, M. Chemical composition and yield of essential oils from Bakhtiari savory (*Satureja bachtiarica* Bunge.) under different extraction methods. *Industrial Crops and Products*. 2015, 76, 809-816.

Minteguiaga, M., Umpierrez, N., Fariña, L., Cassel, E., & Dellacassa, E. ¿Es el acetato de carquejilo un quimiomarcador válido para las "carquejas" *Baccharis* sect. *Cauloptereae* (Asteraceae)?. *Revista Lilloa*. 2015, 52, 62-64.

Minteguiaga, M., Umpiérrez, N., Xavier, V., Lucas, A., Mondin, C., Fariña, L., Cassel, E., Dellacassa, E. Recent findings in the odorants chemistry from four *Baccharis* species and their impact as chemical markers. *Chemistry & Biodiversity* 2015, 12, 1339-1347.

Monteiro, C., Rebellato, L., & Díaz, L. Servicio de detección de resistencia a fungicidas de *penicillium* spp en plantas de empaque de citrus de Uruguay. Congreso Latinoamericano de Fitopatología: Montevideo, 1997.

Mouna, D., Abdennacer, B., Hedia, C., Mongia, S. Z., & Hervé, C. Seasonal changes in essential oil composition of *Aristolochia longa* L. ssp. *paucinervis* Batt. (Aristolochiaceae) roots and its antimicrobial. *Industrial Crops and Products*. 2016, 83, 301-306.

Nikaido, H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2003, 67, 593-656.

NIST Standard Reference. (n.d.). NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library with Search Program. Data Version: NIST 14, 2014.

Nychas, G. Natural antimicrobials from plants. In *New methods of food preservation*; Gould G., Ed.; Springer: US, Gaithersburg, 1995, 58-89.

Ohkawa, H., Miyagawa, H., & Lee, P. Pesticide chemistry. Crop protection, public health, environmental safety. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007, 43-53.

Onions, A., & Brady, B. Taxonomy of *Penicillium* and *Acremonium*. In *Penicillium and Acremonium* (Biotechnology Handbooks); Peberdy J., Ed.; Plenum Press: New York, 1987, 1-36.

Ortuño Sánchez, M. Manual Práctico de Aceites esenciales, aromas y perfumes. Aiyana ediciones: España, 2006.

Palacio, A., Biasi, L., Nakashima, T., & Serrat, B. Biomassa e óleo essencial de carqueja (*Baccharis trimera* (Less) DC.) sob influência de fontes e doses de nitrogênio. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. 2007, 9, 58-63.

Palou, L. *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* (Green mold, Blue mold). In Postharvest Decay. Control Strategies; Bautista-Baños, S., Ed.; Elsevier Inc: London. 2014, 45-102.

Park, M., Gwak, K., I, Y., Kim, K., Jeung, E., Chang, J., & Choi, I. Effect of citral, eugenol, nerolidol and  $\alpha$ -terpineol on the ultrastructural. Fitoterapia. 2009, 80, 290-296.

Parmar, B., & Walia, S. Prospects and Problems of Phytochemical Biopesticides. In Phytochemical Biopesticides; Koul, O. & Dhaliwal, G., Eds.; CRC Press: Amsterdam. 2000, 133–210.

Pauli, A., & Schilcher, H. In Vitro Antimicrobial Activities of Essential Oils 6ta ed.; European Pharmacopoeia: Florida, 2007.

Peredo- Luna, H., Palou- García, E., & Lopez- Malo, A. Aceites Esenciales: Métodos de extracción. Temas selectos de Ingeniería de Alimentos, 2009, 1, 24-32.

Pérez Faggiani, E., Alves, P., & Blanco, O. Reconocimiento en síntomas de enfermedades en cítricos: Mancha negra de los cítricos. Revista INIA, 2012, 28, 48-49.

Pérez Faggiani, E., Lombardo, P., Umpiérrez, N., Minteguiaga, M., Alves, P., Blanco, O., Guimaraens, A., Rodriguez, F., Pardo, H., Dellacassa, E. Fungicidas Botánicos: aceites esenciales de plantas nativas que controlan enfermedades de poscosecha de los cítricos. Revista de INIA 2015, 40, 52-56.

Pinto, E., Pina-Vaz, C., Salgueiro, L., Goncalves, C., Cavaleiro, C., Ana Palmeira, R. A., & Martinez de Oliveira, J. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus*

pulegioides on Candida, Aspergillus and dermatophyte species. Journal of Medical Microbiology, 2006, 55, 1367-1373.

Plaza, P., Torres, R., Usall, J., & Vinas, I. Evaluation of the potential of commercial post-harvest application of essential oils to control citrus decay. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 2004, 79, 935-940.

Rahman, A., & Al-Reza, S. M. Antifungal Activity of Essential Oil and Extracts of Piper chaba Hunter Against Phytopathogenic Fungi. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2011, 88, 573-579.

Raut, J. S., & Karuppayil, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. Industrial Crops and Products, 2014, 62, 250-264.

Raveendrakurup, A., Sadasivan, A. N., Koranappallil Bahuleyan, R., & Appian, S. The Essential Oil Constituents of *Zornia diphylla* (L.) Pers, and Anti-Inflammatory and Antimicrobial Activities of the Oil. Records of natural products, 2014, 8, 238-393.

Ricciardi, G., van Baren, C., Di Leo Lira, P., Ricciardi, A., Lorenzo, D., & Dellacassa, E. Volatile constituents from aerial parts of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. var. *gratissima* growing in Corrientes, Argentina. Flavour and Fragrance Journal, 2006, 21, 698-703.

Rocha Vilela, G., Steffen de Almeida, G., Bismara Regitano D'Arce, M. D., Calori-Domingues, M., & Micotti da Gloria, E. Activity of essential oil and its major compound, 1,8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill, against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. Journal of Stored Products Research, 2009, 45, 108-111.

Romero Márquez, M. D. Plantas aromáticas. Tratado de Aromática científica. Kier: Buenos Aires, 2004.

Santos, F., Pinto, J., Bertolucci, S., Alvarenga, A., Alves, M., Duarte, M., & Sartoratto, A. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil

from the leaves and flowers of *Aloysia gratissima*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 2013, 15, 583-588.

Santos, T., Laemmle, J., Rebelo, R., Dalmarco, E., Cruz, A., Schmit, A., Zeni, A. Chemical composition and antimicrobial activity of *Aloysia gratissima* (Verbenaceae) leaf essential oil. *Journal of Essential Oil Research*, 2015, 27, 125–130.

Schelz, Z., Molnar, J., & Hohmann, J. Antimicrobial and antiplasmodial activities of essential oils. *Fitoterapia*, 2006, 77, 279-285.

Schmidt, E. Production of Essential oils. In *Handbook of Essential Oils*; Baser, H. & Buchbauer, G., Eds.; CRC Press, 2015, 127-162.

Sepúlveda-Jiménez, G. La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 2003, 21, 355- 363.

Shahin, G., Sayedeh, S. S., Behrouz, L., & Bakhtar, A. Antiviral activity of some plant oils against herpes simplex virus type 1 in Vero cell culture. *Journal of Acute Medicine*, 2015, 5, 62-68.

Siedo, J. S. *Systematics of Aloysia (Verbenaceae)*. University of Texas: Texas, 2006.

Silva, D., Bresciani, L., Dalagnol, R., Danielski, L., Yunes, R., & Sandra, F. Supercritical fluid extraction of carqueja (*Baccharis trimera*) oil: Process parameters and composition profiles. *Food and Bioproducts Processing*, 2009, 87, 317-326.

Silva, D., Meireles, M., Brat, P., Magalhães, P., & C., M. Chemical composition and biological activity of natural extracts obtained from a Brazilian aromatic plant (*Aloysia gratissima*) by supercritical CO<sub>2</sub> and hydrodistillation. *International Journal of Essential Oil Therapeutics*, 2007, 1, 172-178.

Simoës-Pires, C., Debenedetti, S., Spegazzini, E., Mentz, L., Matzenbacher, N., Limberger, R., & Henriques, T. Investigation of the essential oil from eight species

of *Baccharis* belonging to sect. *Caulopterae* (Asteraceae, Astereae): a taxonomic approach. *Plant Systematics and Evolution*, 2005, 253, 23-32.

Sivakumar, D., & Bautista-Baños, S. A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. *Crop Protection*, 2014, 64, 27-37.

Skoog, D., West, D., Holler, F., & Crouch, S. *Fundamentos de Química Analítica*, 8va ed.; Cengage Learning, 2005.

Sokal, R., & Rohlf, J. *Biometry; the principles and practice of statistics in biological research*, 4ta ed., W. H. Freeman and Co: New York, 2012.

Soler, E., Dellacassa, E., & Moyna, P. Composition of *Aloysia gratissima* Flower Essential Oil. *Plata médica*, 1986, 6, 488- 90.

Soler, E., Dellacassa, E., & Patrick, M. Composition of *Aloysia gratissima* leaf essential oil. *Phytochemistry*, 1985, 25, 1343-1345.

Stashenko, E., & René, J. Algunos aspectos prácticos para la identificación. *Scientia Chromatographica*, 2010, 2, 29-47.

Stashenko, E., Martínez, J., Ruíz, C., Ginna, A., Durán, C., Salgar, W., & Cala, M. *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. *Journal of Separation Science*, 2010, 33, 93-103.

Taiz, L., & Zeiger, E. *Plant Physiology*, 3ra ed., Sinauer Associates: Sunderland, 2002.

Taiz, L., & Zeiger, E. *Fisiología Vegetal*, 1ra ed. Castelló de la Plana: Universitat Jaume I, 2006.

Tiên Do, T. K., Hadji-Minaglou, F., Antoniotti, S., & Fernandez, X. Authenticity of essential oils. *Trends in Analytical Chemistry*, 2015, 66, 146-157.

Timmer, L., Garnsey, S., & Graham, J. *Compendium of Citrus Diseases* 2da ed.; St. Paul, MN: American Phytopathological Society Press, 2000.

Tiwari, B., Valdramidis, V., O' Donnell, V., Muthukumarappan, K., Bourke, P., & Cullen, P. Application of Natural Antimicrobials for Food Preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57, 5987-6000.

Tongnuanchan, P., & Benjakul, S. Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *Journal of Food Science*, 2014, 79, 1231-49.

Trovati, G., Chierice, G., Sanches, E., & Galhiane, M. Essential Oil Composition of *Aloysia gratissima* From Brazil. *Journal of Essential Oil Research*, 2009, 21, 325-326.

Tucker, A., & Debaggio, T. *The Encyclopedia of Herbs: A Comprehensive Reference to Herbs of Flavor and Fragrance*. Timber Press Inc: Portland, 2009.

Umpiérrez, N., Perez, E., Minteguiaga, M., & Dellacassa, E. In vitro and in vivo antifungal activity of the essential oil of *Lippia alba* against *Alternaria tenuissima*, a postharvest pathogens of blueberries. *Revista Virtual de Química*, 2016, 8, 108.

Uruguay XXI. Producción y comercio exterior Citrícola del Uruguay. Montevideo, 2015.

USDA. Global pest list of Citrus spp. pathogens and an examination of evidence for seed transmission. United States Department of Agriculture: Raleigh, 2015.

Vandendool, H., & Kratz, P. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography*, 1963, 2, 463-471.

Vero, S. Mecanismos de biocontrol. In *Control biológico de patógenos de plantas*, Mondinío, P. & Vero S., Eds.; Comisión sectorial de educación permanente: Montevideo, 2006, 49-78.

Villamil, J. El modelo *Lippia alba*. In *Normalización de productos naturales obtenidos de especies de la flora aromática latinoamericana: proyecto CYTED IV.20*, Dellacassa, E., Ed.; ediPUCRS: Porto Alegre, 2010, 97-105.

Vogt, T. Phenylpropanoid Biosynthesis. *Molecular Plant*, 2010, 3, 2-20.

Yeoshua, S. B. Environmentally Friendly Technologies for Agricultural Produce Quality; CRC Press: Boca Raton, 2005.

Zygadlo, J., Lamarque, A., & Guzman, C. Composition of the Flower Oils of Some Lippia and Aloysia Species from Argentina. *Journal of Essential Oil Research*, 1995, 7, 593-595.

## 8. ANEXOS

### 8.1. ANEXO 1: CROMATOGRAMAS DE LOS ACEITES ESENCIALES.

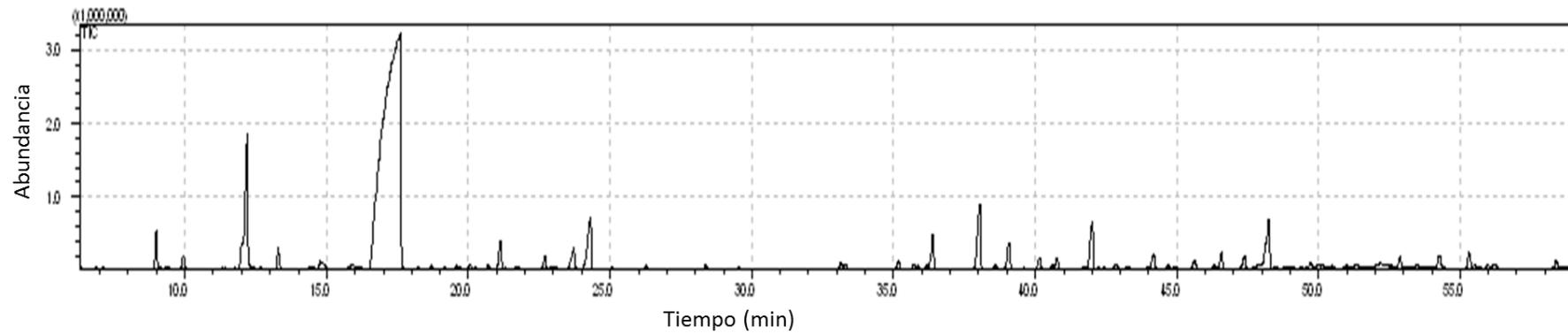


Figura 37. Cromatograma del aceite esencial de *Lippia alba* proveniente del Sur de Uruguay en estado de floración.

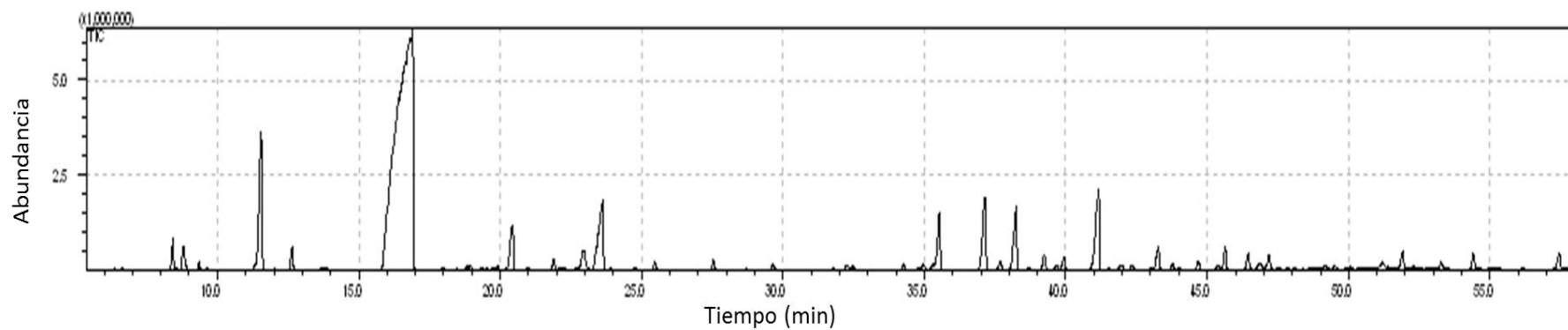


Figura 38. Cromatograma del aceite esencial de *Lippia alba* proveniente del Sur de Uruguay en estado vegetativo.

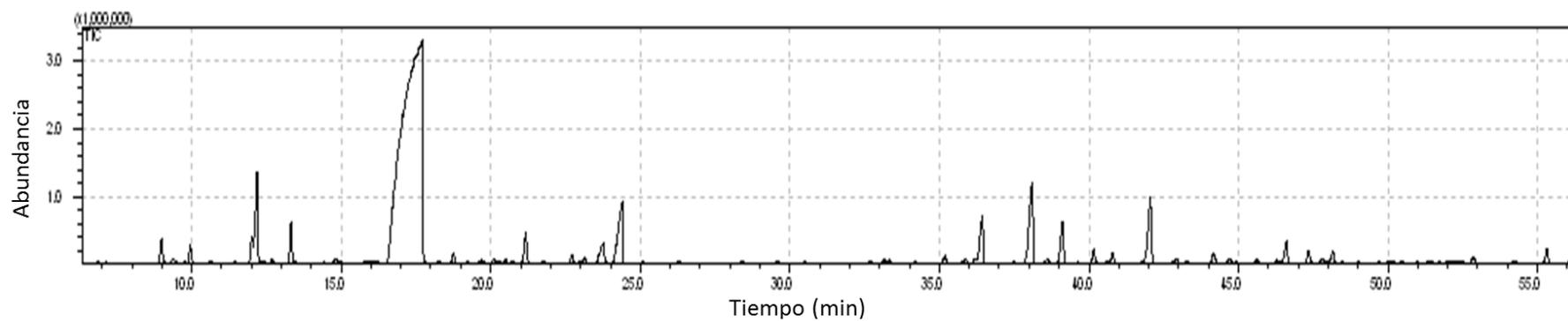


Figura 39. Cromatograma del aceite esencial de *Lippia alba* proveniente del Norte de Uruguay en estado de floración.

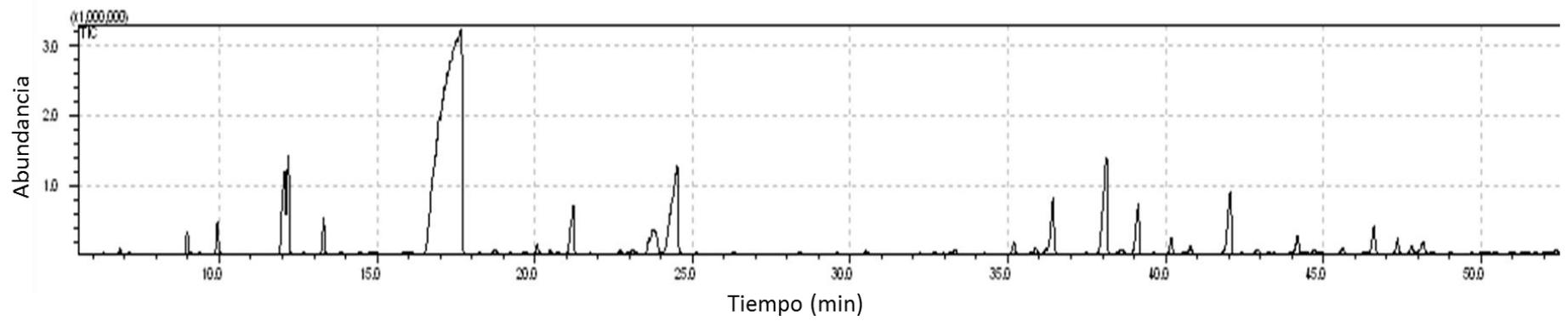


Figura 40. Cromatograma del aceite esencial de *Lippia alba* proveniente del Norte de Uruguay en estado vegetativo.

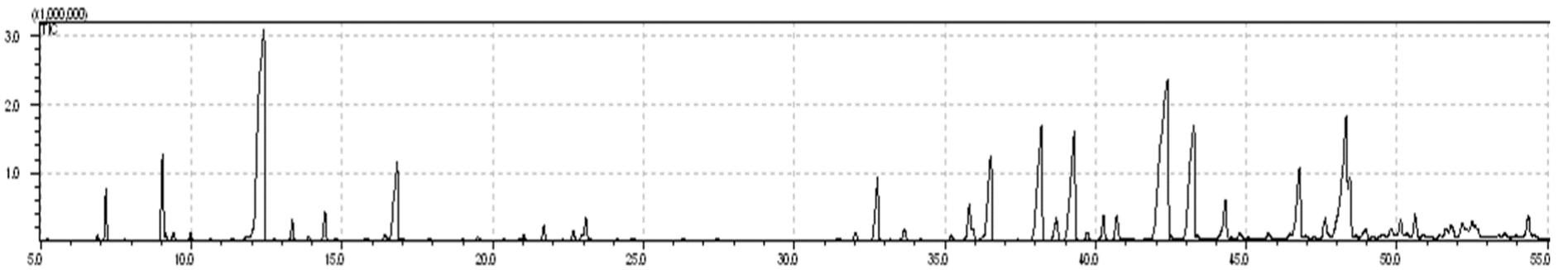


Figura 41. Cromatograma del aceite esencial de *Aloysia gratissima* proveniente del Sur de Uruguay en estado de floración.

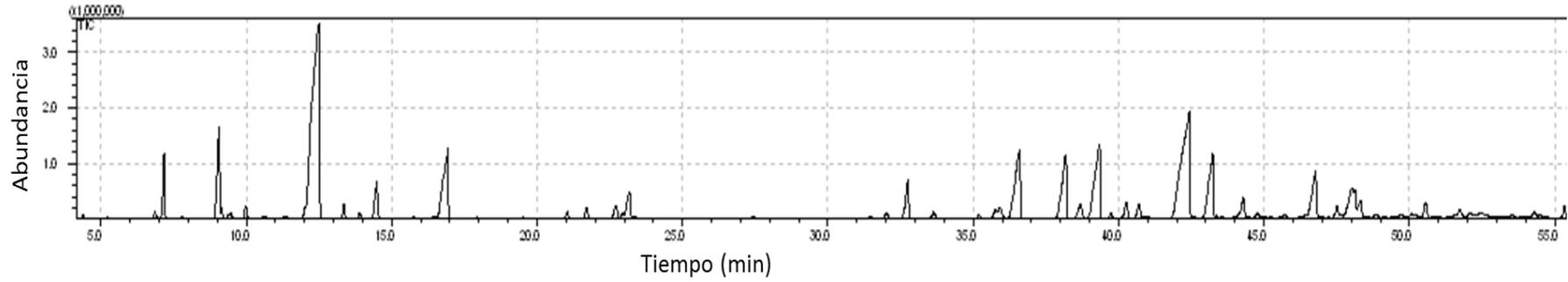


Figura 42. Cromatograma del aceite esencial de *Aloysia gratissima* proveniente del Sur de Uruguay en estado de vegetativo.

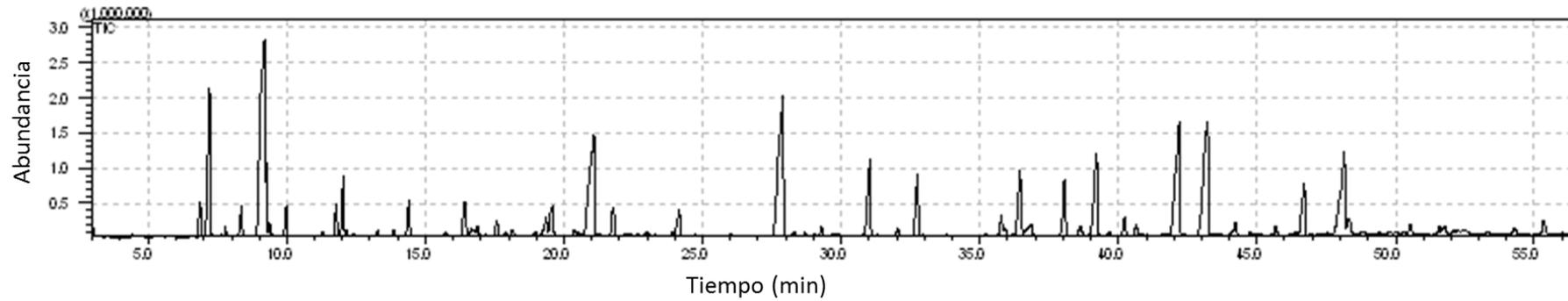


Figura 43. Cromatograma del aceite esencial de *Aloysia gratissima* proveniente del Norte de Uruguay en estado de floración.

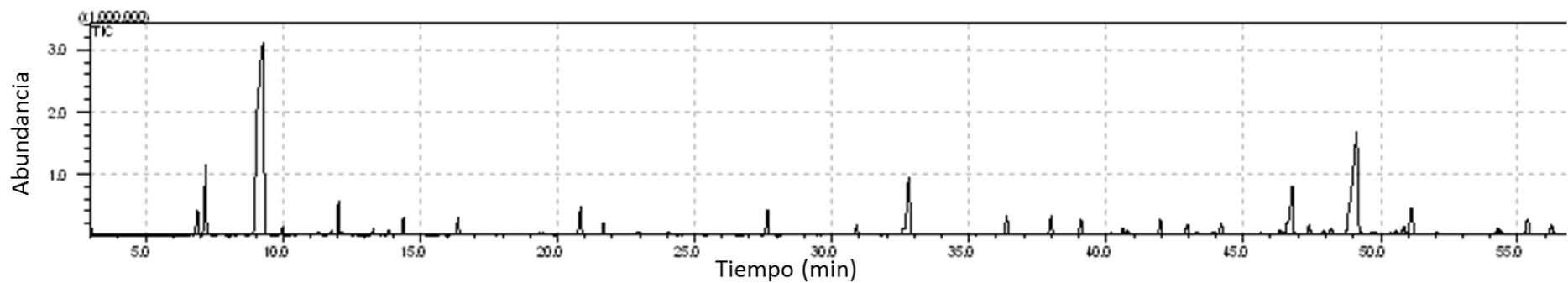


Figura 44. Cromatograma del aceite esencial de *Aloysia gratissima* proveniente del Norte de Uruguay en estado de vegetación.

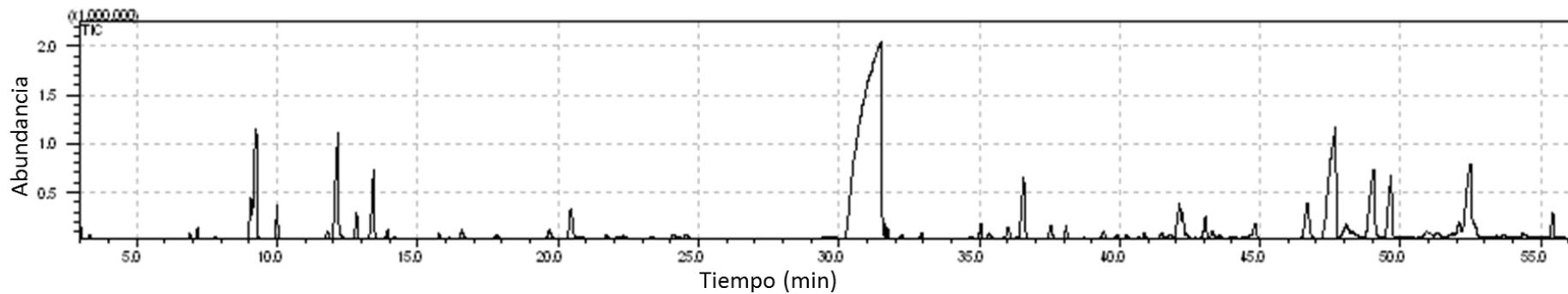


Figura 45. Cromatograma del aceite esencial de *Baccharis trimera* proveniente del Sur de Uruguay en estado de floración.

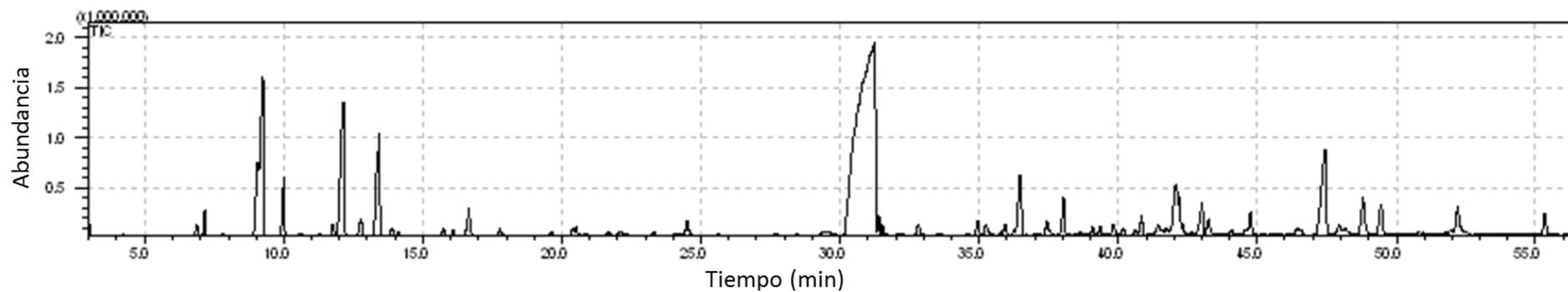


Figura 46. Cromatograma del aceite esencial de *Baccharis trimera* proveniente del Sur de Uruguay en estado de vegetativo.

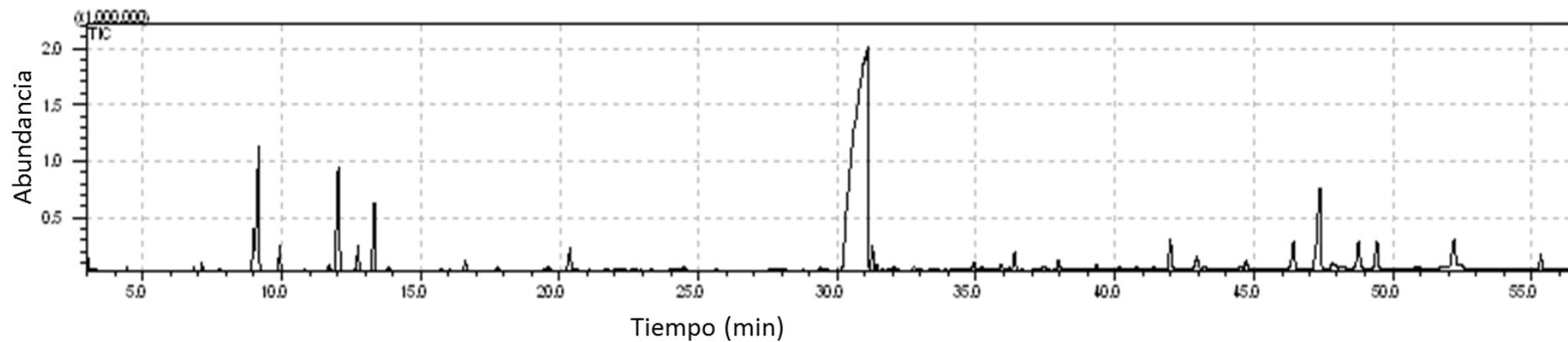


Figura 47. Cromatograma del aceite esencial de *Baccharis trimera* proveniente del Norte de Uruguay en estado de floración.

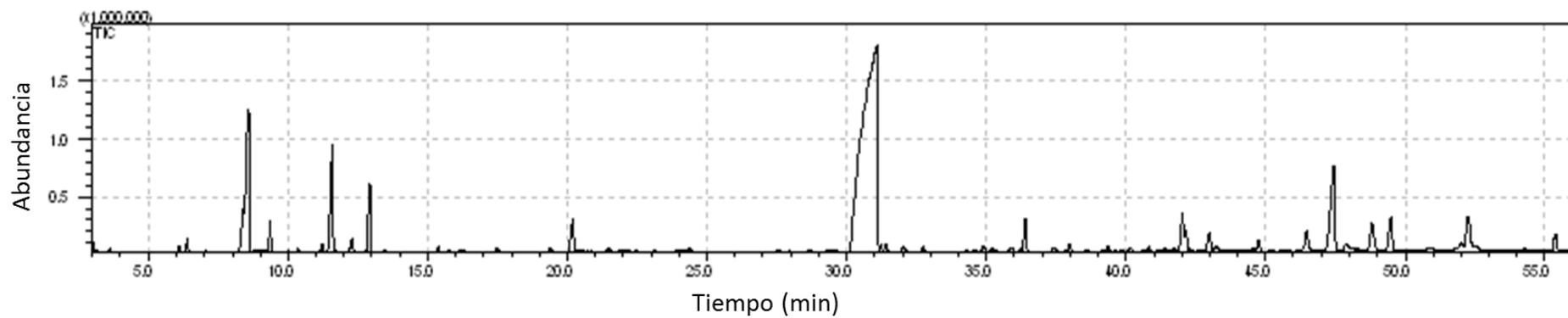


Figura 48. Cromatograma del aceite esencial de *Baccharis trimera* proveniente del Norte de Uruguay en estado de vegetativo

## 8.2. ANEXO 2: ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### 8.2.1. Evaluación de las diferencias en los rendimientos de extracción de los aceites esenciales

		Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Sig.	Homogeneidad Test Levene	Normalidad Shapiro-wilk
<i>Lippia alba</i>	Inter grupos	2,27323	3	0,757744				
	Intra grupos	0,183733	8	0,022967	32,99	7,46E-05	0,7029	0,22
	Total	2,45697	11					
<i>Aloysia gratissima</i>	Inter grupos	0,0339583	3	0,011319				
	Intra grupos	0,0833333	8	0,010417	1,087	4,09E-01	0,3516	0,1843
	Total	0,117292	11					
<i>Baccharis trimera</i>	Inter grupos	0,262292	3	0,087431				
	Intra grupos	0,200533	8	0,025067	3,488	7,00E-02	0,7934	0,3695
	Total	0,462825	11					

Tabla 14. ANOVA para los rendimientos de extracción de los aceites esenciales.

	LALBV	LASGF	LASGV
LALBF	0,000423	0,954	0,003547
LALBV		0,000346	0,1239
LASGF			0,00204
	BTLBV	BTSGF	BTSGV
BTLBF	0,7539	0,7539	0,3398
BTLBV		1	0,8527
BTSGF			0,8527
	AGLBV	AGSGF	AGSGV
AGLBF	0,05832	0,8042	0,3377
AGLBV		0,2051	0,5938
AGSGF			0,8042

Tabla 15. Test de comparación de medias de Tukey para los rendimientos de extracción de los aceites esenciales. En rosado se marcan aquellos que presentan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

**8.2.2. Evaluación de las diferencias en los tratamientos en cada día de los AEs contra *Penicillium digitatum* y**

***Guignardia citricarpa.***

		Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Sig.	Homogeneidad Test Levene	Normalidad Shapiro- wilk
Día 6	Inter grupos	61,3075	4	15,3269	22,67	5,18E-07	0,2321	0,0591
	Intra grupos	12,8458	19	0,676096				
	Total	74,1533	23					
Día 8	Inter grupos	71,8855	4	17,9714	13,31	2,47E-05	0,3654	0,4668
	Intra grupos	25,6528	19	1,35015				
	Total	97,5383	23					
Día 10	Inter grupos	22,8588	4	5,71471	8,748	7,49E-04	0,3507	0,8335
	Intra grupos	9,79867	15	0,653244				
	Total	32,6575	19					
Día 12	Inter grupos	18,4993	4	4,62483	7,254	1,01E-03	0,05118	0,3402
	Intra grupos	12,114	19	0,637579				
	Total	30,6133	23					
Día 14	Inter grupos	17,1325	4	4,28313	8,232	4,99E-04	0,1103	0,3456
	Intra grupos	9,88583	19	0,520307				
	Total	27,0183	23					
Día 16	Inter grupos	16,9992	4	4,24979	7,021	1,20E-03	0,03161	0,08014
	Intra grupos	11,5008	19	0,605307				
	Total	28,5	23					

Tabla 16. ANOVA para cada día de los tratamientos realizados con AEs de *Lippia alba* contra *Penicillium digitatum*.

		LANF	LASF	LANV	LASV
Testigo	Día 6	0,000138	0,000139	0,0002264	0,001242
LANF			0,9977	0,3466	0,05106
LASF				0,5199	0,09479
LANV					0,8099
Testigo	Día 8	0,000156	0,000717	0,00502	0,04665
LANF			0,6054	0,157	0,01349
LASF				0,8715	0,2268
LANV					0,7336
Testigo	Día 10	0,001465	0,0249	0,04468	0,9624
LANF			0,5743	0,03803	0,004899
LASF				0,4468	0,08473
LANV					0,8183
Testigo	Día 12	0,01202	0,002471	0,009792	0,1818
LANF			0,9448	1	0,6525
LASF				0,9661	0,2568
LANV					0,5949
Testigo	Día 14	0,09667	0,000763	0,007814	0,2169
LANF			0,1741	0,7401	0,9904
LASF				0,7917	0,07521
LANV					0,4706
Testigo	Día 16	0,2057	0,001411	0,01897	0,216
LANF			0,1449	0,7348	1
LASF				0,7403	0,1375
LANV					0,718

Tabla 17. Test de comparación de medias de Tukey en cada día para los distintos tratamientos con AEs de *Lippia alba* contra *Penicillium digitatum*. En rosado se marcan aquellos que presentan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

		Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Sig.	Homogeneidad Test Levene	Normalidad Shapiro- wilk
Día 4	Inter grupos	0,282467	4	0,0706167	2,19	0,09932	0,08655	0,2805
	Intra grupos	0,8062	25	0,032248				
	Total	1,08867	29					
Día 6	Inter grupos	8,683	4	2,17075	52,35	8,61E-12	0,1716	0,1077
	Intra grupos	1,03667	25	0,0414667				
	Total	9,71967	29					
Día 8	Inter grupos	0,577947	4	0,144487	38,69	2,293E-10	0,8449	0,0861
	Intra grupos	0,09335	25	0,003734				
	Total	0,671297	29					
Día 10	Inter grupos	0,409487	4	0,102372	20,43	1,4E-07	0,6041	0,01702
	Intra grupos	0,1253	25	0,005012				
	Total	0,534787	29					
Día 12	Inter grupos	0,44712	4	0,11178	13,68	4,868E-06	3,07E-01	0,05465
	Intra grupos	0,20435	25	0,008174				
	Total	0,65147	29					
Día 14	Inter grupos	0,439187	4	0,109797	9,564	7,814E-05	0,496	0,03387
	Intra grupos	0,287	25	0,01148				
	Total	0,726187	29					
Día 16	Inter grupos	0,474647	4	0,118662	11,2	2,401E-05	0,4819	0,02201
	Intra grupos	0,264783	25	0,0105913				
	Total	0,73943	29					

Tabla 18. ANOVA para cada día de los tratamientos realizados con AEs de *Aloysia gratissima* contra *Penicillium digitatum*.

		AGNF	AGSF	AGNV	AGSV
Testigo	Día 2	0,002725	0,01213	0,002725	0,02347
AGNF			0,07314	1	0,07401
AGSF				0,07314	0,9312
AGNV					0,07401
Testigo	Día 4	0,2694	1	0,526	0,9994
AGNF			0,2908	0,9884	0,1839
AGSF				0,5554	0,9987
AGNV					0,3956
Testigo	Día 6	0,00013	0,04592	0,0001299	0,3364
AGNF			0,00013	0,04592	0,0001299
AGSF				0,0001516	0,8233
AGNV					0,0001305
Testigo	Día 8	0,00013	0,00013	0,0001299	0,0001313
AGNF			0,002313	0,007217	0,0003245
AGSF				0,9892	0,8766
AGNV					0,6228
Testigo	Día 10	0,00013	0,000143	0,001009	0,0001447
AGNF			0,26	0,005747	0,2271
AGSF				0,3991	1
AGNV					0,4448
Testigo	Día 12	0,000147	0,000184	0,02841	0,0001763
AGNF			0,9819	0,04059	0,9887
AGSF				0,1251	1
AGNV					0,1105
Testigo	Día 14	0,000548	0,000496	0,04314	0,0005206
AGNF			1	0,1903	1
AGSF				0,1729	1
AGNV					0,1814
Testigo	Día 16	0,000333	0,000229	0,04551	0,0002442
AGNF			0,9991	0,1782	0,9997
AGSF				0,1109	1
AGNV					0,1237

Tabla 19. Test de comparación de medias de Tukey en cada día para los distintos tratamientos con AEs de *Aloisia gratissima* contra *Penicillium digitatum*. En rosado se marcan aquellos que presentan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

		Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Sig.	Homogeneidad Test Levene	Normalidad Shapiro- wilk
Día 2	Inter grupos	0,6	4	0,15				
	Intra grupos	0,326667	25	0,0130667	11,48	1,99E-05	0,3031	0,9267
	Total	0,926667	29					
Día 4	Inter grupos	1,06852	4	0,267129				
	Intra grupos	3,617	24	0,150708	1,772	1,67E-01	0,1332	0,3549
	Total	4,68552	28					
Día 6	Inter grupos	4,34461	4	1,08615				
	Intra grupos	2,16367	24	0,0901528	12,05	1,64E-05	0,1899	0,2808
	Total	6,50828	28					
Día 8	Inter grupos	0,281971	4	0,0704928				
	Intra grupos	0,156473	25	0,00625892	11,26	2,31E-05	0,9317	0,3334
	Total	0,438444	29					
Día 10	Inter grupos	9,76001	4	2,44				
	Intra grupos	4,13033	24	0,172097	14,18	4,51E-06	0,4926	0,05167
	Total	13,8903	28					
Día 12	Inter grupos	10,4209	4	2,60521				
	Intra grupos	5,44467	24	0,226861	11,48	2,37E-05	0,6667	0,07762
	Total	15,8655	28					
Día 14	Inter grupos	9,84229	4	2,46057				
	Intra grupos	5,87633	24	0,244847	10,05	6,35E-05	0,4076	0,1703
	Total	15,7186	28					
Día 16	Inter grupos	10,1827	4	2,54567				
	Intra grupos	1,06667	10	0,106667	23,87	4,24E-05	0,4972	0,3847
	Total	11,2493	14					

Tabla 20. ANOVA para cada día de los tratamientos realizados con AEs de *Baccharis trimera* contra *Penicillium digitatum*.

		BTNF	BTSF	BTNV	BTSV
Testigo	Día 2	0,00028	0,04084	0,001164	0,0001532
BTNF			0,1871	0,9403	0,9403
BTSF				0,5627	0,04084
BTNV		1,071	2,143		0,5627
Testigo	Día 4	0,9183	1	0,9823	0,1829
BTNF			0,9275	0,9984	0,5979
BTSF				0,9856	0,1926
BTNV					0,4243
Testigo	Día 6	0,001149	0,01626	0,0007631	0,0001276
BTNF			0,7887	0,9997	0,1621
BTSF				0,682	0,0149
BTNV					0,2256
Testigo	Día 8	0,002391	0,000887	0,0003346	0,0001495
BTNF			0,9925	0,875	0,3364
BTSF				0,9846	0,5815
BTNV					0,8682
Testigo	Día 10	0,000414	0,000195	0,0001357	0,0001271
BTNF			0,9815	0,7355	0,306
BTSF				0,9584	0,6135
BTNV					0,9421
Testigo	Día 12	0,001801	0,000451	0,0001957	0,0001336
BTNF			0,9643	0,7241	0,2868
BTSF				0,9747	0,6537
BTNV					0,9361
Testigo	Día 14	0,001681	0,000996	0,0002828	0,0001588
BTNF			0,9994	0,8883	0,5452
BTSF				0,9575	0,6844
BTNV					0,9689
Testigo	Día 16	0,02464	0,004642	0,0002247	0,0002103
BTNF			0,7906	0,009574	0,006649
BTSF				0,04533	0,03625
BTNV					0,999

Tabla 21. Test de comparación de medias de Tukey en cada día para los distintos tratamientos con AEs de *Baccharis trimera* contra *Penicillium digitatum*. En rosado se marcan aquellos que presentan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

		Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Sig.	Homogeneidad Test Levene	Normalidad Shapiro- wilk
Día 6	Inter grupos	32,906	4	8,2265				
	Intra grupos	2,29708	16	0,143568	57,3	2,79E-09	0,5673	0,08924
	Total	35,2031	20					
Día 8	Inter grupos	51,5686	4	12,8922				
	Intra grupos	5,1481	25	0,205924	62,61	1,17E-12	0,3091	0,08786
	Total	56,7167	29					
Día 10	Inter grupos	30,867	4	7,71675				
	Intra grupos	5,37667	25	0,215067	35,88	5,10E-10	0,5489	0,5706
	Total	36,2437	29					
Día 12	Inter grupos	23,7988	4	5,94971				
	Intra grupos	8,41792	25	0,336717	17,67	5,30E-07	0,6163	0,06899
	Total	32,2167	29					
Día 14	Inter grupos	20,8372	4	5,20929				
	Intra grupos	12,7396	25	0,509583	10,22	4,80E-05	0,5394	0,3222
	Total	33,5768	29					
Día 16	Inter grupos	16,1408	4	4,03521				
	Intra grupos	11,4729	25	0,458917	8,793	0,0001417	0,781	0,744
	Total	27,6138	29					
Día 18	Inter grupos	12,3858	4	3,09646				
	Intra grupos	11,8729	25	0,474917	6,52	0,0009757	0,6823	0,3506
	Total	24,2587	29					
Día 20	Inter grupos	13,843	4	3,46075				
	Intra grupos	12,9617	25	0,518467	6,675	0,0008474	0,769	0,1544
	Total	26,8047	29					
Día 22	Inter grupos	14,8808	4	3,72021				
	Intra grupos	19,4496	25	0,777983	4,782	0,005282	0,9518	0,5841
	Total	34,3304	29					
Día 24	Inter grupos	14,2355	4	3,55888				
	Intra grupos	24,9129	25	0,996517	3,571	0,01951	0,9296	0,5937
	Total	39,1484	29					

Tabla 22. ANOVA para cada día de los tratamientos realizados con AEs de *Lippia alba* contra *Guignardia citricarpa*.

		LANF	LASF	LANV	LASV
Testigo	Día 6	0,000142	0,000142	0,0001421	0,0002106
LANF			0,4034	0,6093	0,004896
LASF				0,03485	0,0002649
LANV					0,08188
Testigo	Día 8	0,00013	0,00013	0,0001299	0,000131
LANF			0,1525	0,8856	0,000521
LASF				0,02186	0,0001303
LANV					0,004144
Testigo	Día 10	0,00013	0,00013	0,0001303	0,0003862
LANF			0,002247	1	0,1874
LASF				0,001806	0,0001411
LANV					0,2205
Testigo	Día 12	0,01736	0,00013	0,03244	0,03067
LANF			0,000578	0,9987	0,9992
LASF				0,0003606	0,0003745
LANV					1
Testigo	Día 14	0,8981	0,00038	0,9928	0,007917
LANF			0,002459	0,9899	0,06022
LASF				0,0008419	0,6487
LANV					0,02145
Testigo	Día 16	1	0,007356	0,9961	0,0105
LANF			0,007356	0,9961	0,0105
LASF				0,003064	0,9999
LANV					0,004384
Testigo	Día 18	1	0,04621	0,9789	0,02768
LANF			0,05	0,9727	0,03042
LASF				0,01275	0,9994
LANV					0,007378
Testigo	Día 20	1	0,147	0,8519	0,02089
LANF			0,1525	0,8427	0,02188
LASF				0,01736	0,8857
LANV					0,001925
Testigo	Día 22	1	0,361	0,9372	0,04419
LANF			0,4048	0,9118	0,05276
LASF				0,09422	0,7899
LANV					0,007489
Testigo	Día 24	0,9999	0,8603	0,6582	0,2081
LANF			0,7981	0,735	0,1651
LASF				0,1651	0,735
LANV					0,01183

Tabla 23. Test de comparación de medias de Tukey en cada día para los distintos tratamientos con AEs *Lippia alba* contra *Guignardia citricarpa*. En rosado se marcan aquellos que presentan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

		Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Sig.	Homogeneidad Test Levene	Normalidad Shapiro-wilk
Día 2	Inter grupos	5,3255	4	1,33137	16,29	1,09E-06	0,5001	0,227
	Intra grupos	2,04292	25	0,0817167				
	Total	7,36842	29					
Día 4	Inter grupos	1,41995	4	0,354986	17,79	4,98E-07	0,5411	0,06695
	Intra grupos	0,49886	25	0,0199544				
	Total	1,91881	29					
Día 6	Inter grupos	7,10383	4	1,77596	4,784	5,27E-03	0,1893	0,3826
	Intra grupos	9,28083	25	0,371233				
	Total	16,3847	29					
Día 8	Inter grupos	7,19467	4	1,79867	11,3	2,25E-05	0,4854	0,3843
	Intra grupos	3,98	25	0,1592				
	Total	11,1747	29					
Día 10	Inter grupos	6,158	4	1,5395	8,382	1,97E-04	0,8748	0,2483
	Intra grupos	4,59167	25	0,183667				
	Total	10,7497	29					
Día 12	Inter grupos	4,482	4	1,1205	5,744	2,02E-03	0,7314	0,2521
	Intra grupos	4,87667	25	0,195067				
	Total	9,35867	29					
Día 14	Inter grupos	3,182	4	0,7955	3,287	2,70E-02	0,1772	0,4854
	Intra grupos	6,05	25	0,242				
	Total	9,232	29					
Día 16	Inter grupos	3,112	4	0,778	2,995	3,79E-02	0,5544	0,5815
	Intra grupos	6,495	25	0,2598				
	Total	9,607	29					
Día 18	Inter grupos	1,49733	4	0,374333	1,182	3,76E-01	0,5701	0,5267
	Intra grupos	3,16667	10	0,316667				
	Total	4,664	14					
Día 20	Inter grupos	2,66867	4	0,667167	1,561	2,16E-01	0,5189	0,9792
	Intra grupos	10,685	25	0,4274				
	Total	13,3537	29					
Día 22	Inter grupos	2,42533	4	0,606333	1,04	4,07E-01	0,5711	0,7604
	Intra grupos	14,5817	25	0,583267				
	Total	17,007	29					
Día 24	Inter grupos	2,59533	4	0,648833	1,179	3,44E-01	0,7888	0,1985
	Intra grupos	13,7633	25	0,550533				
	Total	16,3587	29					
Día 26	Inter grupos	5,12467	4	1,28117	1,219	0,3277	0,6378	0,8587
	Intra grupos	26,27	25	1,0508				
	Total	31,3947	29					

Tabla 24. ANOVA para cada día de los tratamientos realizados con AEs de *Aloysia gratissima* contra *Guignardia citricarpa*.

		AGNF	AGSF	AGNV	AGSV
Testigo	Día 2	0,000141	0,00014	0,0001421	0,0001753
AGNF			1	1	0,9404
AGSF				0,9999	0,9093
AGNV					0,953
Testigo	Día 4	0,000139	0,000147	0,0001302	0,0009914
AGNF			0,9663	0,9882	0,1968
AGSF				0,7906	0,5109
AGNV					0,0779
Testigo	Día 6	0,006263	0,02963	0,03125	0,04904
AGNF			0,9625	0,9575	0,2114
AGSF				1	0,5476
AGNV					0,5621
Testigo	Día 8	0,000263	0,007517	0,001876	0,9771
AGNF			0,5161	0,8471	0,0007056
AGSF				0,9771	0,02903
AGNV					0,007517
Testigo	Día 10	0,001077	0,09567	0,5012	0,9893
AGNF			0,317	0,04726	0,0004204
AGSF				0,8482	0,03513
AGNV					0,2564
Testigo	Día 12	0,004356	0,3797	0,8317	0,9997
AGNF			0,2288	0,04963	0,002722
AGSF				0,9328	0,2832
AGNV					0,7276
Testigo	Día 14	0,03423	0,766	0,9965	0,9998
AGNF			0,3252	0,07324	0,0504
AGSF				0,9215	0,854
AGNV					0,9998
Testigo	Día 16	0,04922	0,7573	1	0,9788
AGNF			0,4203	0,04922	0,1545
AGSF				0,7573	0,97
AGNV					0,9788
Testigo	Día 18	0,4918	0,6534	1	0,9457
AGNF			0,9982	0,4918	0,8737
AGSF				0,6534	0,9622
AGNV					0,9457
Testigo	Día 20	0,2618	0,9998	1	0,9777
AGNF			0,3439	0,2435	0,5712
AGSF				0,9995	0,9945
AGNV					0,9709
Testigo	Día 22	0,4299	0,9997	0,9999	0,9183
AGNF			0,5416	0,5187	0,8915
AGSF				1	0,9665
AGNV					0,9589
Testigo	Día 24	0,3805	1	0,8295	0,7695
AGNF			0,4452	0,9346	0,9629
AGSF				0,8811	0,8295
AGNV					1
Testigo	Día 26	0,322	0,991	0,9042	0,5766
AGNF			0,5766	0,8199	0,991
AGSF				0,993	0,8335
AGNV					0,9706

Tabla 25. Test de comparación de medias de Tukey en cada día para los distintos tratamientos con AEs *Aloysia gratissima* contra *Guignardia citricarpa*. En rosado se marcan aquellos que presentan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

		Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Sig.	Homogeneidad Test Levene	Normalidad Shapiro-wilk
Día 2	Inter grupos	1,57088	4	0,39272	574,9	3,32E-24	0,5932	0,5521
	Intra grupos	0,0170773	25	0,000683093				
	Total	1,58796	29					
Día 4	Inter grupos	3,07217	4	0,768042	156,2	2,68E-17	0,6549	0,682
	Intra grupos	0,12289	25	0,00491559				
	Total	3,19506	29					
Día 6	Inter grupos	3,30553	4	0,826382	36,35	4,45E-10	0,2293	0,8332
	Intra grupos	0,56837	25	0,0227348				
	Total	3,8739	29					
Día 8	Inter grupos	2,16079	4	0,540197	19,45	2,20E-07	0,2219	0,3309
	Intra grupos	0,694169	25	0,0277668				
	Total	2,85496	29					
Día 10	Inter grupos	17,7047	4	4,42617	13,32	6,07E-06	0,576	0,6618
	Intra grupos	8,31	25	0,3324				
	Total	26,0147	29					
Día 12	Inter grupos	0,69217	4	0,173043	19,59	2,07E-07	0,6394	0,05107
	Intra grupos	0,220866	25	0,00883463				
	Total	0,913036	29					
Día 14	Inter grupos	5,75133	4	1,43783	6,332	1,16E-03	0,992	0,2441
	Intra grupos	5,67667	25	0,227067				
	Total	11,428	29					
Día 16	Inter grupos	0,209305	4	0,0523263	3,213	2,94E-02	0,9716	0,0937
	Intra grupos	0,407155	25	0,0162862				
	Total	0,61646	29					
Día 18	Inter grupos	2,52533	4	0,631333	1,355	2,78E-01	0,8105	0,09663
	Intra grupos	11,6467	25	0,465867				
	Total	14,172	29					
Día 20	Inter grupos	0,122854	4	0,0307134	0,878	4,91E-01	0,8245	0,9153
	Intra grupos	0,874484	25	0,0349794				
	Total	0,997338	29					
Día 22	Inter grupos	0,118925	4	0,0297313	0,6984	0,6003	0,8881	0,03151
	Intra grupos	1,0643	25	0,0425722				
	Total	1,18323	29					

Tabla 26. ANOVA para cada día de los tratamientos realizados con AEs de *Baccharis trimera* contra *Guignardia citricarpa*.

		BTNF	BTSF	BTNV	BTSV
Testigo	Día 2	0,00013	0,00013	0,0001299	0,0001299
BTNF			0,9612	0,8655	1
BTSF				0,4867	0,9591
BTNV					0,8698
Testigo	Día 4	0,00013	0,00013	0,0001299	0,0001299
BTNF			0,9915	0,3184	0,7047
BTSF				0,15	0,9163
BTNV					0,02601
Testigo	Día 6	0,00013	0,00013	0,0001299	0,0001299
BTNF			0,9982	0,8577	0,2625
BTSF				0,6995	0,4108
BTNV					0,03802
Testigo	Día 8	0,000486	0,000256	0,001435	0,0001299
BTNF			0,9938	0,9855	0,007551
BTSF				0,8869	0,01974
BTNV					0,002208
Testigo	Día 10	0,03467	0,03467	0,01962	0,0001303
BTNF			1	0,9991	0,002905
BTSF				0,9991	0,002905
BTNV					0,00532
Testigo	Día 12	0,2207	0,7488	0,1208	0,0001299
BTNF			0,8646	0,9973	0,0001596
BTSF				0,6913	0,0001312
BTNV					0,0001942
Testigo	Día 14	0,9482	0,9882	0,2955	0,001554
BTNF			0,9992	0,7101	0,008819
BTSF			0,3427	0,5631	0,004925
BTNV			1,799	2,142	0,1422
Testigo	Día 16	0,9981	0,9988	0,4739	0,04425
BTNF			1	0,6586	0,08424
BTSF				0,6363	0,07813
BTNV					0,6749
Testigo	Día 18	1	1	0,7601	0,4089
BTNF			1	0,7601	0,4089
BTSF				0,8051	0,4568
BTNV					0,9751
Testigo	Día 20	0,9825	0,984	0,9207	0,9421
BTNF			1	0,6563	0,7
BTSF				0,6643	0,7078
BTNV					1
Testigo	Día 22	0,9396	0,9939	0,9314	0,9997
BTNF			0,9965	0,5415	0,8739
BTSF				0,7532	0,9741
BTNV					0,9741

Tabla 27. Test de comparación de medias de Tukey en cada día para los distintos tratamientos con AEs de *Baccharis trimera* contra *Guignardia citricarpa*. En rosado se marcan aquellos que presentan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).