



Determinación de la composición química de los aceites esenciales de Tomillo (*Thymus vulgaris*) y Romero (*Rosmarinus officinalis*) y su posible uso como antifúngico contra microorganismos fitopatógenos en productos agrícolas.

Carol Valentina Flórez Chacón

Jhoan Sebastian Mojica Flórez

Trabajo de investigación para optar al título de bacteriólogo y laboratorista clínico

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico

Bogotá, 2019



Determinación de la composición química de los aceites esenciales de Tomillo (*Thymus vulgaris*) y Romero (*Rosmarinus officinalis*) y su posible uso como antifúngico contra microorganismos fitopatógenos en productos agrícolas.

Carol Valentina Flórez Chacón
Jhoan Sebastian Mojica Flórez

Trabajo de investigación para optar al título de bacteriólogo y laboratorista clínico

Asesor interno
Jovanna Acero Godoy MSc
Profesor Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico
Bogotá, 2019

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos profundamente a nuestra profesora Jovana Acero Godoy por toda la formación académica que nos brindó, la gran dedicación, y colaboración en la elaboración de este trabajo, por apoyarnos y sobre todo hacernos reír incluso en los momentos más complicados. De la misma manera queremos agradecer a todos los docentes y la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por darnos la oportunidad de formarnos como profesionales.

A nuestros padres porque sin ellos y su constante esfuerzo y amor con nosotros no hubiese sido posible llegar hasta aquí.

A todas las personas que hicieron parte de este proceso y que nos brindaron su apoyo para lograrlo

Tabla de contenido

1	INTRODUCCIÓN	1
2	ANTECEDENTES	3
3	MARCO TEÓRICO	7
3.1	FITO-PROTECCIÓN	7
3.1.1	Definición	7
3.1.2	Bioplaguicidas	7
3.2	ACEITES ESENCIALES	8
3.2.1	Definición	8
3.2.2	Propiedades	8
3.2.3	Métodos de extracción	9
3.2.4	Cromatografía de gases/espectrometría de masas GC/MS	11
3.3	SOBRE LAS PLANTAS AROMATICAS	13
3.3.1	Romero, <i>Rosmarinus officinalis</i>	13
3.3.2	Tomillo, <i>Thymus vulgaris</i>	17
3.4	FITOPATÓGENOS PRESENTES EN EL CAMPO AGRÍCOLA	21
3.4.1	<i>Fusarium</i> spp.	22
3.4.2	<i>Alternaria</i> spp.	25
4	OBJETIVOS	30
4.1	Objetivo general	30
4.2	Objetivos específicos	30
5	DISEÑO METODOLÓGICO	31
5.1	Tipo de investigación	31

5.2	Universo, población, muestra	31
5.3	Hipótesis, variables.....	31
6	MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
6.1	Obtención del material vegetal	32
6.2	Identificación taxonómica	32
6.3	Procesamiento del material vegetal	33
6.4	Peso seco	33
6.5	Procedimiento de extracción de los AEs.....	34
6.6	Análisis de los Aes por cromatografía de gases/espectrometría de masas	36
6.7	Procedimientos microbiológicos.....	38
6.7.1	Recuento de esporas de hongos.....	38
6.7.2	Método de difusión en agar	39
6.7.3	Concentración mínima inhibitoria (CMI)	40
7	RESULTADOS	41
7.1	Identificación taxonómica	41
7.2	Determinación de peso seco	42
7.3	Extracción de aceite y porcentaje de rendimiento	44
7.4	Composición química de los AE	46
7.5	Actividad antifúngica y concentración mínima inhibitoria (CMI).....	48
8	DISCUSIÓN	52
9	CONCLUSIONES	56
10	RECOMENDACIONES	57
11	REFERENCIAS	58
12	ANEXOS.....	70

Índice de Tablas

Tabla 1. Componentes más comunes del aceite esencial de Romero	16
Tabla 2. Componentes más comunes del aceite esencial de Tomillo	20
Tabla 3. Porcentaje de peso seco de las especies de <i>Thymus vulgaris</i> y <i>Rosmarinus officinalis</i> .	42
Tabla 4. Porcentaje de rendimiento de los aceites esenciales de <i>T. vulgaris</i> y <i>R. officinalis</i> .	45
Tabla 5. Composición química relativa (%) de los AEs para <i>T. vulgaris</i> y <i>R. officinalis</i> .	46
Tabla 6. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de AE de Romero frente a <i>Fusarium</i> spp.	49
Tabla 7. Determinación de la concentración mínima inhibitoria del AE de Romero frente a <i>Alternaria</i> spp.	50

Índice de figuras

Figura 1. Romero	15
Figura 2. Tomillo	19
Figura 3. <i>Fusarium</i> spp, microconidias en cámara de Neubauer (40x)	25
Figura 4. Cultivo del hongo <i>Fusarium oxysporum</i> en placa de PDA	25
Figura 5. <i>Alternaria</i> spp, conidias en cámara de Neubauer (40x)	29
Figura 6. Cultivo de <i>Alternaria</i> spp. en agar Sabouraud	29
Figura 7. Equipo de destilación	35
Figura 8. Aceite extraído mediante la técnica destilación por arrastre de vapor	35
Figura 9. Cromatógrafo de gases Shimadzu GC2010 acoplado a un detector selectivo de masas MS/GCTQ8040	37
Figura 10. Agar sabouraud cloranfenicol con las diluciones del aceite esencial de romero	39
Figura 11. Porcentaje de peso seco de tomillo y romero.	43
Figura 12. Peso del aceite en gramos de <i>Thymus Vulgaris</i> y <i>Rosmarinus officinalis</i> .	44
Figura 13 Rendimiento del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> y <i>Rosmarinus officinalis</i> .	45

Lista de anexos

- Anexo 1.** Certificado de identificación taxonómica de las plantas de Romero y Tomillo. **70**
- Anexo 2.** Caracterización química mediante la técnica FID y GC/MS para *R. officinalis*. **71**
- Anexo 3.** Caracterización química mediante la técnica FID y GC/MS para *T. vulgaris*. **72**
- Anexo 4.** Cromatograma de primera repetición del AE de romero mediante GC-MS, α -Pinoeno es el compuesto seleccionado. **73**
- Anexo 5.** Cromatograma de segunda repetición del AE de romero mediante GC-MS, α -Pinoeno es el compuesto seleccionado. **74**
- Anexo 6.** Cromatograma de tercera repetición del AE de romero mediante GC-MS, α -Pinoeno es el compuesto seleccionado. **75**
- Anexo 7.** Cromatograma de primera repetición del AE de tomillo mediante GC-MS, γ -Terpineno es el compuesto seleccionado. **76**
- Anexo 8.** Cromatograma de segunda repetición del AE de tomillo mediante GC-MS, γ -Terpineno es el compuesto seleccionado. **77**
- Anexo 9.** Cromatograma de tercera repetición del AE de tomillo mediante GC-MS, γ -Terpineno es el compuesto seleccionado. **78**
- Anexo 10.** Cromatograma de cuarta repetición del AE de tomillo mediante GC-MS, γ -Terpineno es el compuesto seleccionado. **79**
- Anexo 11.** Cromatograma de primera repetición del AE de romero mediante GC-FID, α -Pinoeno es el compuesto seleccionado. **80**
- Anexo 12.** Cromatograma de segunda repetición del AE de romero mediante GC-FID, α -Pinoeno es el compuesto seleccionado. **81**
- Anexo 13.** Cromatograma de tercera repetición del AE de romero mediante GC-FID, α -Pinoeno es el compuesto seleccionado. **82**

- Anexo 14.** Cromatograma de segunda repetición del AE de tomillo mediante GC-FID, γ -Terpineno es el compuesto seleccionado. **83**
- Anexo 15.** Cromatograma de tercera repetición del AE de tomillo mediante GC-FID, γ -Terpineno es el compuesto seleccionado. **84**
- Anexo 16.** Cromatograma de cuarta repetición del AE de tomillo mediante GC-FID, γ -Terpineno es el compuesto seleccionado. **85**

Lista de abreviaturas

AE: Aceite esencial

AEs: Aceites esenciales

OMS: Organización mundial de la salud

FAO: Food and Agriculture Organization

GC-MS: Cromatografía de gases/espectrometría de masas

g: Gramos

µg: Microgramos

mL: Mililitros

mg/mL: Miligramos sobre mililitros

µg/mL: Microgramos sobre mililitros

CMI: Concentración mínima inhibitoria

mm: Milímetros

MWHD: Hidrodestilación asistida por microondas

Resumen

Introducción: Los aceites esenciales tienen diferentes propiedades aromáticas que les permiten jugar un papel importante en la Fito protección, actuando como agentes antibacterianos, anti fúngicos, antivirales e insecticidas.

Se realizó la caracterización de la composición química y el posible uso anti fúngico de dos aceites esenciales extraídos de romero y tomillo frente a cepas de *Fusarium spp.* y *Alternaria spp.*

Objetivo: Determinar la composición química de los aceites esenciales de las plantas romero y tomillo y su posible actividad antifúngica en fitopatógenos de interés agrícola.

Métodos: Los aceites esenciales se obtuvieron a partir de material vegetal fresco, en un equipo de destilación por arrastre con vapor, se hizo la caracterizaron por cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS) y la actividad antifúngica se hizo mediante la metodología de difusión en agar.

Resultados: Por medio del análisis de los aceites por GC / MS se pueden observar los componentes de las plantas. En el caso de romero resultó α -pineno (22,4 %), 1,8 cineol (16,6 %) y P-Menta-2,4(8) dieno (12,3 %); para el tomillo γ -terpineno (33,4 %), O-cimeno (17,2 %) y Timol (15,9%). Además los resultados de la actividad antifúngica in vitro frente a estas cepas por el método de difusión en agar, nos muestra que *Alternaria spp* fue el microorganismo más sensible.

Conclusiones: Los aceites esenciales si logran inhibir el crecimiento de los fitopatógenos, pudiendo ser usado como reemplazo de los agroquímicos.

Palabras clave: Actividad anti fúngica, aceites esenciales, romero, tomillo.

1 INTRODUCCIÓN

En Colombia existe un clima templado que oscila entre los 17° y 24°C que permite el cultivo de diferentes productos agrícolas en diferentes partes del país; estos varían según algunas zonas, entre estos se destacan el café, plátano, cacao, caña de azúcar, aguacate, tomate, yuca, maíz, entre muchos otros ⁽¹⁾.

De acuerdo a lo anterior es importante considerar que estos productos deben tener un manejo adecuado frente a enfermedades para prevenir que estas afecten los cultivos; entre los microorganismos que las generan, según la cámara de comercio de Bogotá en 2015 los más comunes son: *Fusarium oxysporum* ocasiona amarillamientos o marchitamiento de la planta, *Xanthomonas campestris* causante de la mancha bacteriana, que muestra lesiones oscuras en hojas y fruto, *Pseudomonas syringae* causante de la mancha negra en la planta y *Alternaria solani* o *Phytophthora infestans* causantes del tizón temprano-tardío, estas enfermedades deben tener un manejo adecuado ya que pueden generar un daño en los cultivos lo cual implica una pérdida económica, el manejo convencional que se le da es con controles químicos, que tienen ingredientes activos tales como: Glifosato, Carbendazim, Mancozeb, entre otros⁽²⁾; sin embargo la alta utilización de plaguicidas es equívoca por parte de los agricultores; un estudio de Corpoica estableció que el 93% de los agricultores no saben manejar las plagas, no hacen monitoreo, no tienen tecnología y usan plaguicidas con frecuencia de dos veces a la semana que pasa los límites de la normalidad ⁽³⁾. Cuando la sintomatología de los cultivos agrícolas afectados es muy avanzada es necesario este tipo de control, lo que lo hace contraproducente por el manejo mencionado anteriormente.

Por consiguiente, la presencia de estos microorganismos patógenos en los cultivos agrícolas hace pensar en buscar una alternativa de control y eliminación mediante la aplicación de sustancias naturales como los aceites esenciales (AEs); los cuales son muy conocidos por sus diferentes propiedades, que van a ser específicas según la planta y la composición química de la misma, por ejemplo el AE de la planta de tomillo que destaca por sus propiedades bactericidas, el de romero con propiedades conservantes y características antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes y por último el AE de pruntoalivio que puede ser de interés fitoterapéutico y se conoce que posee actividad antibacteriana. Para que los AEs cumplan con su cometido es importante tener en cuenta su proceso de recolección, extracción, conservación y reposo. Se han realizado estudios en los que sustancias de origen natural como los aceites esenciales presentan efectos anti fúngicos y antimicrobianos, como es el caso del aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) y tomillo (*Thymus vulgaris*).

Teniendo en cuenta las propiedades de los AEs y el actual interés de buscar alternativas naturales para control de distintos microorganismos en la industria agrícola, este proyecto tiene como fin determinar la posible actividad antifúngica de los aceites esenciales de Romero (*Rosmarinus officinalis*) y Tomillo (*Thymus vulgaris*) basados en su composición química y literatura.

Este proyecto pertenece a un macro proyecto que pretende determinar que los aceites esenciales de varias plantas nativas colombianas podrían llegar a ser bio-plaguicidas contra cultivos de importancia Colombiana.

2 ANTECEDENTES

Diferentes autores han manejado el tema de aceites esenciales en productos agrícolas, aunque los estudios no son tan abundantes como en el área clínica, los AEs son considerados una alternativa importante para el manejo de plagas en la agricultura, debido a su composición química que le otorga cierta actividad antifúngica sobre diferentes plagas en cultivos de importancia económica; a continuación algunos artículos relacionados con la importancia de los AEs:

Barrera L, *et. al.* en el 2008 investigaron el efecto anti fúngico de aceites esenciales contra el crecimiento micelial de *Fusarium* spp aislado de papaya, por medio de bioensayos de inhibición, el mejor efecto anti fúngico fue observado con el aceite esencial de *Thymus vulgaris*, el cual presentó una total inhibición de crecimiento micelial a 200, 250 y 300 µg/ml. La tasa de crecimiento para estas dosis fue de 0,0 comparada con el testigo que fue de 5,87 mm ⁽⁴⁾.

En ese mismo año, Ozcan M.M, *et. al.* analizaron el rendimiento del aceite de la planta seca de *Rosmarinus officinalis* obtenido por hidrodestilación, en el que se demostró que su rendimiento fue de 1,9%, además también se identificaron 20 compuestos que representan el 99,93% de los aceites; debido a su alto rendimiento se investigó el efecto de inhibición del aceite frente a *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum*. Este experimento se llevó a cabo in vitro utilizando difusión en disco para conocer la actividad antifúngica del aceite, con dosis de aceite esencial de 10 y 40 ppm. Para *A. alternata* la concentración de 40 ppm mostró una parcial

actividad antifúngica y en el caso de *F. oxysporum* se vio una actividad similar entre las dos concentraciones⁽⁵⁾.

En 2009 Ana Niurka *et. al.* describe que las plantas son capaces de protegerse frente a patógenos gracias a sus metabolitos secundarios como lo son los aceites esenciales, dado que se dice que pueden causar rompimiento de la membrana de los microorganismos a través de los compuestos lipofílicos. Estos aceites han sido estudiados frente a diferentes patógenos como *Botrytis cinérea* donde el aceite esencial de tomillo logra inhibirlo a concentraciones de 100 µg/ml. Los aceites al tener esta acción resultan útiles en el control de producciones post cosecha, controlando patógenos de cultivos agrícolas y es posible que al mezclarlos con más compuestos naturales el espectro de acción sea más grande e incremente su acción frente dichos patógenos⁽⁶⁾.

En el año 2015 Elshafie H.S. y colaboradores, estudiaron la posible actividad antifúngica del aceite esencial de Tomillo (*Thymus vulgaris*) junto con el aceite esencial de Verbena (*Verbena officinalis*), contra *Monilinia laxa*, *Monilinia fructigena* y *Monilinia fructicola*, con el fin de evitar las mayor cantidad de pérdidas de frutas frescas después de las cosecha. Los resultados muestran que el aceite esencial de *Thymus* en altas concentraciones (500 ppm) reduce significativamente el diámetro de la lesión de la pudrición marrón. Esta investigación demostró in vivo el posible papel fungicida de los aceites esenciales en pos cosecha de durazno; además se tienen en cuenta para combinarlos con otros tratamientos innovadores de la pos cosecha, como los agentes de control biológico⁽⁷⁾.

Asimismo en el 2015 S. Hmiri *et. al.* estudiaron la composición química y el efecto antifúngico del aceite esencial de romero y el aceite esencial de mirto frente a *Alternaria alternata*, *Botrytis cinérea* y *Penicillium expansum*. Los aceites fueron obtenidos mediante hidrodestilación y se identificaron 23 compuestos de romero en donde 1,8-cineol fue el mayor compuesto (43.16%). Los resultados muestran que el aceite esencial de romero logra una inhibición total de *Alternaria alternata* a una concentración de 800 µl/l, de *Botrytis cinérea* a una concentración de 1200 µl/l y *Penicillium expansum* a concentraciones mayores a 1800 µl/l. Con estos resultados concluyeron que se puede desarrollar un método de control biológico basado en aceites esenciales⁽⁸⁾.

Igualmente en este año, Da Silva Bomfim, N. *et. al.* investigaron los componentes del aceite esencial de romero y cuál de estos actuaba como anti fungicida e inhibidor de la fumonisina en el hongo *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg. En los resultados se demostró que el crecimiento de *Fusarium verticillioide* (Sacc.) Nirenberg se redujo en concentración de 150µg / mL de aceite esencial de romero, la rotura de la pared celular y la fuga del citoplasma se dió en concentración de 300µg / mL; esto nos propone que que el AE de romero contra *Fusarium verticillioide* (Sacc.) Nirenberg rompe la pared celular y causa la pérdida de componentes celulares del hongo, inhibiendo posteriormente la producción de fumonisinas y ergosterol ⁽⁹⁾.

En el 2018 Rueda Puentes E, y colaboradores evaluaron la actividad antibacteriana in vitro de los aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*) y orégano (*Lippia graveolens*) contra *Ralstonia solanacearum* (Rs), con el propósito de encontrar una alternativa natural para tratar este patógeno en

papa. Para el análisis de la actividad antimicrobiana realizaron difusión en agar utilizando sensidiscos, el microorganismo se diluyó en 1:1, 1:5 y 1:10, y se usaron 7.5, 10 y 15 μ l de los aceites esenciales de tomillo y orégano. Los aceites mostraron actividad inhibitoria frente a *Rs* en la dilución 1:1 y esta fue más efectiva que el resto de diluciones, y la cantidad aplicada más efectiva fue de 15 μ l del aceite de tomillo y orégano. Con esto concluyeron que los aceites esenciales pueden ser una alternativa de control de este patógeno en las plantas ⁽¹⁰⁾.

Finalmente en el 2019 Rahmouni, A *et. al.* evaluaron el efecto antifúngico de 5 aceites esenciales (*Rosmarinus officinalis*, *Thymus satureioides*, *Origanum compactum*, *Lavandula dentata* y *Myrtus communis*) contra *Fusarium oxysporum f. sp. Albedinis*. Los aceites fueron extraídos de las plantas por hidrodestilación y se le realizó su caracterización química donde los mayores compuestos presentes en romero fueron 1,8-cineol (26.45%), alcanfor (15.51%), y α - y β -pineno (21.31%). Los resultados mostraron que el aceite esencial de romero logró inhibir al patógeno a una concentración de 40 μ l/ml. Este resultado contra este patógeno podría ser una alternativa a fabricar fungicidas sintéticos con base en aceites esenciales que puedan ser distribuidos comercialmente⁽¹¹⁾.

3 MARCO TEÓRICO

3.1 FITO-PROTECCIÓN

3.1.1 Definición

La función de la Fito-protección es defender a los productos agrícolas de plagas, malezas y enfermedades; así logrando una eficaz producción de alimentos tanto en cantidad como en calidad. Su aplicación es importante ya que ayuda a controlar y prevenir cualquier tipo de agente de origen animal o vegetal que interfiera en todo el proceso de producción, transporte, almacenamiento y distribución del cultivo ⁽¹²⁾.

3.1.2 Bioplaguicidas

Los bioplaguicidas son plaguicidas naturales derivados de extractos de materias naturales de plantas, microorganismos o de sustancias que liberan dichos organismos, así también, se incluyen algunos minerales que por lo general solo afectan la plaga a la cual está dirigido.

Los bioplaguicidas se pueden clasificar según su ingrediente activo y según su modo de acción biocida. Se clasifica en 4 grupos; en el grupo 3 encontramos: Ingredientes activos de bioplaguicidas a base de sustancias bioactivas ⁽¹³⁾:

- Extractos botánicos
- Minerales
- Otras sustancias bioactivas derivadas de microorganismos

3.2 ACEITES ESENCIALES

3.2.1 Definición

Los aceites esenciales AEs de plantas aromáticas son extractos naturales de base lipídica que se encuentran en casi todas las plantas, que presentan una bioactividad alta, propiedades anti fúngicas, antibacterianas y antioxidantes, además tiene diversas aplicaciones industriales, en áreas como: Cosméticos, farmacéutica, perfumes y alimentos.

Actualmente destacan el área agrícola como Fito-fortificantes, bioestimulantes, herbicidas, y plaguicidas.

El uso indiscriminado de compuestos y de plaguicidas que afectan la salud humana y el medio ambiente tienden afectar todo el eslabón de la cadena alimenticia, produciendo efectos nocivos en la salud y además aumentando la resistencia de diferentes plagas a los compuestos químicos de los que estos están elaborados. Por lo mismo, los AEs han tomado gran importancia en esta área ⁽¹⁴⁾.

Los aceites esenciales son sustancias aromáticas que se encuentran en numerosas plantas. Estos son extraídos de diferentes partes de la planta como; hojas, raíces, tallos y flores. Los aceites esenciales son componentes heterogéneos de terpenos, sesquiterpenos, ácidos, ésteres, fenoles, lactonas; que son separables por métodos físicos o químicos⁽¹⁵⁾.

3.2.2 Propiedades

Los aceites esenciales han sido usados a lo largo de la historia como bactericidas, fungicidas, plaguicidas, medicinales, entre otros, ya que estos

poseen algunos componentes en diferentes proporciones que les confieren estas características de actividad biológica. Las propiedades funcionales de los extractos varían con la proporción de los compuestos presentes y el tipo de planta que se use.

Los aceites esenciales han sido estudiados ya que sus propiedades tienen la capacidad de inhibir crecimiento de patógenos, según Bakkali:

“En las bacterias los aceites esenciales pasan a través de la pared celular y la membrana citoplásmica, rompen la estructura de sus diferentes capas de polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos y los permeabilizan, también pueden coagular el citoplasma y dañar los lípidos y las proteínas generando un daño a la pared celular y la membrana puede provocar la fuga de macromoléculas y como producto final la lisis”⁽¹⁶⁾.

3.2.3 Métodos de extracción

Según la variedad del material vegetal, parte de la planta a emplear, se van a emplear diversos procedimientos físicos y químicos de extracción, donde su correcta aplicación va a determinar la calidad del producto final. Esto no quiere decir que ninguna mejora a la técnica usada va a compensar una mala calidad del material vegetal.

Se tienen diversas técnicas como lo son: Métodos directos, destilación y extracción con solventes, que van a tener un procedimiento y además un producto según cada una, por ejemplo, métodos directos para obtener aceites esenciales cítricos, gomas, resinas, o destilación para aceites esenciales aromáticos ⁽¹⁷⁾.

Estos métodos se definen como:

- **Destilación por arrastre de vapor:** En este método se lleva a cabo la vaporización selectiva del componente volátil del material vegetal, formada por este y otros componentes no volátiles. Lo anterior se da al aplicarle vapor de agua directamente a la caldera donde se encuentra el material vegetal a destilar; este vapor es denominado "vapor de arrastre". Se forman dos fases inmiscibles y cada líquido se comportará de manera independiente al otro.

Lo más importante para que esta destilación se pueda realizar es que el componente volátil sea insoluble en agua, ya que el producto destilado formará dos fases al condensarse lo que permitirá la separación del producto y el agua ⁽¹⁵⁾.

Las ventajas de este método es que es sencillo y de bajo costo.

- **Extracción con disolventes:** Este método usa disolventes volátiles, la muestra seca y molida se ponen en contacto con disolventes como el alcohol o cloroformo. Este método solubiliza la esencia pero también otros componentes como grasas y ceras, dando como resultado una oleorresina o extracto impuro ⁽¹⁵⁾.

- **Extracción por microondas:** Está técnica puede usarse utilizando un método convencional, o adaptando un equipo para establecerlo como método independiente, como la extracción por microondas sin disolvente. Para esta última se combina el calentamiento por microondas y la destilación seca; no es necesario agregar algún disolvente o agua si el material está fresco, en dado caso que no sea así se rehidrata y se retira el exceso antes de la extracción; para llevar a cabo esta técnica se modifica un microondas convencional realizándole una perforación en la parte superior, dentro del microondas ira el balón aforado con la muestra, este va a ir conectado a un condensador que a su vez va conectado a un tubo de separación por gravedad por el cual pasa corriente fría, sellando la conexión con el

horno para evitar la fuga de microondas. Así mismo, la hidrodestilación asistida con microondas adapta un aparato de destilación a un horno de microondas.

Esta extracción por microondas ofrece la reducción de tiempo y consumo de energía, sin embargo requieren de alta seguridad ⁽¹⁵⁾.

3.2.4 Cromatografía de gases/espectrometría de masas GC/MS

La cromatografía es una técnica de separación de los componentes de una mezcla haciéndolos pasar a través de una fase estacionaria mediante el flujo de una fase móvil, el objetivo de la fase móvil es transportar la muestra mientras que el de la fase estacionaria es retrasar el paso de los componentes, así cuando los componentes de la mezcla pasan a través del sistema estos son separados en distintos momentos según su afinidad con la fase estacionaria.

Según la naturaleza de la fase móvil los métodos cromatograficos se dividen en 2 grupos: cromatografía de gases cuando la fase móvil es un gas y cromatografía líquida cuando la fase móvil es un líquido; la fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido soportado en un sólido o un gel, según como este depositada la fase estacionaria la cromatografía se clasifica en cromatografía de columna y cromatografía plana.

La cromatografía de gases es una técnica de separación que utiliza como fase móvil un gas y como fase estacionaria un sólido o un líquido situado en una columna cromatográfica, se lleva a cabo en una columna cerrada en la cual se encuentra retenida la fase estacionaria y por la cual se hace pasar el gas portador que actúa como fase móvil, los componentes de la muestra se introducen a través del inyector, la temperatura debe ser la adecuada de forma que permita la vaporización de los componentes de la muestra, el gas

portador transporta estos componentes a través de la columna hasta el detector. Los gases más usados son el helio, nitrógeno, hidrogeno y argón. Cada soluto presente en la muestra tiene una diferente afinidad hacia la fase estacionaria, lo que permite su separación, si no existiera esta afinidad entre los componentes y la fase estacionaria estos se desplazarían por la columna a la misma velocidad que el gas portador y no sería posible la separación de los diferentes componentes de la muestra. Finalmente los componentes individuales aislados pasan inmediatamente a un detector; los detectores más utilizados son: Detector por ionización de llama (FID), detector de conductividad térmica, detector de captura electrónica, el espectrómetro de masas, y el detector de fotoionización. En este caso se usa el espectrómetro de masas⁽¹⁸⁾.

La espectrometría de masas es una técnica analítica que permite estudiar compuestos orgánicos, inorgánicos o biológicos, obteniendo de estas informaciones cualitativas o cuantitativas ⁽¹⁹⁾.

Para la espectrometría de masas las moléculas pasan a ser ionizados, donde se ionizan los componentes de la muestra separados por el cromatografo de gases; la técnica más usada generalmente es la llamada impacto electrónico, esta técnica consiste en bombardear la muestra con una corriente de electrones a alta velocidad.

Debido a este proceso, la muestra perderá electrones, fragmentándose en iones, radicales y moléculas neutras. Los iones (que son las moléculas cargadas) son conducidos mediante un acelerador de iones a un tubo analizador curvado sobre el que existe un campo magnético y nuevamente conducido a un colector sobre el que se recogen los impactos de dichos iones en función de la relación carga/masa de los mismos ⁽²⁰⁾.

Una vez separados, detectados e incluso cuantificados todos los componentes individuales de la muestra por cromatografía de gases, el único

dato disponible para la identificación de cada uno de ellos es el tiempo de retención de los correspondientes picos cromatograficos. Este dato no es suficiente para una identificación inequívoca, sin embargo la espectrometría de masas puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero normalmente no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin separar previamente sus componentes. Por lo tanto, la unión de estas dos técnicas permite la separación e identificación de muestras complejas ⁽²¹⁾.

3.3 SOBRE LAS PLANTAS AROMATICAS

3.3.1 Romero, *Rosmarinus officinalis*

3.3.1.1 Clasificación taxonómica

El romero es un arbusto de follaje perenne de la familia las *lamiaceae* (el orégano y la menta son pertenecientes a esta familia), puede alcanzar una altura hasta de 2 metros, este crece en suelos secos y rocoso, es una planta muy rústica y resiste altas y bajas temperaturas. Las condiciones óptimas para su crecimiento es un suelo con un pH alrededor de 4.5 a 8.7, crece también a una altitud entre 0 y 3000 msnm ⁽²²⁾.

El género *Rosmarinus* cuenta con 3 especies que se pueden diferenciar morfológicamente según la clasificación de Morales (2014), de la siguiente manera:

- Hojas de hasta 40 mm(milímetro), en general de tamaño variable en la misma rama, glabras por el haz; cáliz glabro o con pelos ramificados, inflorescencias axilares: *Rosmarinus officinalis*
- Hojas de hasta 20 mm, en general de tamaño homogéneo, de ápice redondeado, glabras o tomentosas por el haz, cáliz con pelos ramificados y pelos largos, inflorescencias terminales o axilares...
 - Hojas siempre glabras por el haz, núculas de hasta 2.9 mm: *Rosmarinus eriocalyx*.
 - Hojas pelosas por el haz, núculas de hasta 3.1 mm: *Rosmarinus tomentosus*.

Aunque solo se han identificado estas tres especies, la naturaleza cuenta con híbridos como: *Rosmarinus eriocalyx* x *Rosmarinus officinalis* y *Rosmarinus officinalis* x *Rosmarinus tomentosus* ⁽²³⁾.

3.3.1.2 Generalidades

La planta de romero ha tenido un peso importante a lo largo de la historia ya que se le atribuyen propiedades milagrosas por diferentes culturas. Esta planta se ha usado tradicionalmente en cocina y perfumería, pero en los últimos años se ha estudiado y evaluado la capacidad antimicrobiana y antioxidante que este posee en sus aceites esenciales, con esto ampliando el campo de uso de esta planta, a nivel agrícola, industrial y farmacéutico ⁽²³⁾.



Figura 1. Romero

Tomada de: Los autores

3.3.1.3 Composición química

Para la taxonomía química de los aceites esenciales de las plantas aromáticas-medicinales se tienen dos clases de componentes ⁽²³⁾:

- **NO SIGNIFICATIVOS TAXONÓMICAMENTE:** Apenas varían de un quimiotipo a otro, están en casi todas las especies y de manera minoritaria.
- **COMPONENTES TAXONÓMICOS:** Se encuentran los principios activos, están de manera mayoritaria.

Se consideran entonces, los componentes mayores que se encuentran en una proporción entre 8-99%, los componentes menores en proporciones de 5-8%, los microcomponentes entre 0,1-5%, y finalmente los componentes

traza que se encuentran en concentraciones de 0,0001-0,1% de abundancia en la totalidad del aceite estudiado.

Los componentes mayoritarios que definen el quimiotipo del aceite esencial de Romero son ⁽²³⁾:

- *Cineol*, donde hay alto contenido de 1,8-cineol en el aceite.
- *Alcanfor*, este supera el 20% del contenido total del aceite.
- *Verbenona*, el contenido total supera el 15% del aceite total.

Estos componentes coinciden con muchos estudios publicados, como se muestra en la tabla 1:

Tabla 1. Componentes más comunes del aceite esencial de Romero

Componente	Porcentaje (%)
Alfa pineno	15.3
Canfeno	5.7
Mirceno	4.9
Limoneno	3.7
1,8 cineol	21.5
Alcanfor	18.0
Borneol	3.7
Cariofileno	3.4

Tomado de: ⁽²⁴⁾

3.3.1.4 Aplicaciones

Gracias a los componentes que tiene el romero ha generado gran potencial de aplicaciones en amplios campos industriales, usado como tratamiento antimicrobiano frente a la proliferación de flora bacteriana en diferentes alimentos, se ha demostrado que el aceite esencial y el extracto tienen actividad bactericida y bacteriostática como medida preventiva al deterioro de alimentos ⁽²⁵⁾.

Otro campo investigado sobre la aplicación de aceites esenciales como el del romero, es la agrícola donde se ha puesto en acción sobre tubérculos, el suelo, insectos que afectan diferentes cultivos ⁽²⁵⁾.

3.3.2 Tomillo, *Thymus vulgaris*

3.3.2.1 Clasificación taxonómica

El género *Thymus* contiene aproximadamente 220 especies de hierbas aromáticas y sub-arbustos de 40 cm de alto, la especie más conocida es el *Thymus vulgaris*, este es un arbusto perenne perteneciente a la familia de las *labiadas* ⁽²⁶⁾.

- **Caracteres vegetativos**

Presentan una sola raíz leñosa con otras raíces secundarias, con una altura entre 15 y 30 cm alcanzando casi medio metro en zonas protegidas. Sus tallos están repletos de pequeñas hojas entre 4 y 5 mm con tonalidades verdes y en forma de racimos, estas están recubiertas en gran cantidad de aceite esencial y presentan un aspecto veloso muy particular al palparlo. La

forma de las hojas puede ser linear, ovalada, lanceolada, obovado, angulado-ovada o espatulada; el tamaño está entre 4 a 10 mm de longitud por 1 a 6 mm de anchura, en el envés de las hojas hay gran cantidad de vellosidades blancas y en el haz son lisas y se curvan hacia abajo en los bordes ⁽²⁷⁾.

- **Inflorescencia**

Las flores aparecen de mediados de primavera hasta comenzando la época de verano, estas se presentan en racimos terminales que comúnmente son de color violeta o púrpura aunque también pueden ser blancas. A su vez pueden ser bilabiadas, con tubo petalino recto y estambres salientes, y se agrupan en espiguillas o racimos terminales, muy densos ⁽²⁸⁾.

3.3.2.2 Generalidades

El género *Thymus*, conocido como tomillo, es de gran importancia en la flora Ibérica, ya que cuenta con la mayor cantidad de especies en el mundo, con 28 de las cuales 22 son endémicas. Es frecuente encontrar diferentes especies de este género extendidos en la vegetación conociéndoles como tomillares.

Se conoce desde la antigüedad que el hombre ha usado el tomillo con fines terapéuticos y culinarios, de hecho se sabe que se cultivan con fines ornamentales, además tienen gran importancia en la industria de la perfumería pues de ellos se obtienen las esencias ⁽²⁹⁾.



Figura 2. Tomillo

Tomada por: Los autores

3.3.2.3 Composición química

El aceite esencial de tomillo es uno de los productos comerciales más importantes obtenidos a partir de las especies *Thymus vulgaris* y *Thymus zygis*. Sus principales componentes van desde el 20 al 70% de los fenoles como el Timol y el Carvacrol. Los fenoles son los principales constituyentes del aceite esencial de tomillo, el timol es uno de los más valiosos gracias a sus propiedades medicinales, pero es el carvacrol (fenol isomérico), el que más predomina en algunos aceites vegetales. El P-cimeno y el Pineno también están presentes en este aceite, así como bajas concentraciones de

Mentona. También el borneol y linalol se han detectado en las fracciones de alto punto de ebullición de este aceite ⁽³⁰⁾.

Estos componentes son evidenciados en varios estudios como en la tabla 2:

Tabla 2. Componentes más comunes del aceite esencial de Tomillo

□ Compuesto	Quimiotipo Timol (%)	Quimiotipo Carvacrol (%)	Quimiotipo Linalol (%)
Y - terpineno	9.9	11.9	0.2
P - cimeno	18.9	20.8	1.5
Linalol	3.2	4.1	79.0
Timol	49.8	0.8	0.9
Carvacrol	2.0	43.9	1.1

Tomado de: ⁽³⁰⁾

3.3.2.4 Aplicaciones

Se ha estudiado que el aceite esencial de tomillo gracias a sus componentes presenta una gran variedad de propiedades y beneficios como antiséptico ya que según estudios realizados a pacientes con infecciones bucales, genitourinarias y de tracto respiratorio se encontró que tenía buena eficacia frente a cepas bacterianas del género *Staphylococcus* spp, *Enterococcus* spp, *Escherichia* spp. y *Pseudomonas* spp. (menor eficacia en este). También se

ha encontrado acción anti congestiva, antiparasitaria como un buen vermífugo y también a nivel estético ⁽³¹⁾.

También se han encontrado algunas propiedades en el campo agrícola ya que llega a ser efectivo frente a hongos patógenos, bacterias, orugas y como repelente de hormigas ⁽³²⁾.

3.4 FITOPATÓGENOS PRESENTES EN EL CAMPO AGRÍCOLA

Los daños producidos por las plagas en los cultivos han tenido un impacto negativo en el sector agrícola. Para abarcar el término plaga, según la FAO (Food and Agriculture Organization) se define como "Cualquier especie, raza o biotipo vegetal o animal o agente patógeno dañino para las plantas o productos vegetales" ⁽³³⁾, lo que también incluye microorganismos fitopatógenos o insectos.

Se estima que alrededor del mundo existen unas 70.000 especies de plagas agrícolas en el mundo las cuales incluyen insectos, bacterias, hongos y virus; esto conlleva a un impacto socioeconómico que afecta negativamente tanto a los agricultores como al país. Cada año la población aumenta, haciendo que haya una mayor demanda en la producción de alimentos lo que automáticamente deja en tela de juicio la seguridad alimentaria, ya que deben ser vigorosos los procesos y las técnicas empleadas para el control de estos.

Las plantas y los cultivos son inmóviles, esto los deja en predisposición a ser irrumpidos por agentes patógenos ya sea para parasitarlos o alimentarse de ellos, debido a estas circunstancias se han generado alternativas para controlar estas plagas al usar prácticas saludables, sostenibles y que protejan eficientemente estos cultivos ⁽³⁴⁾.

Gran parte de los cultivos agrícolas en Colombia se ven afectados por algunos fitopatógenos como hongos, bacterias y virus, los cuales causan daños irreversibles en el producto hasta alcanzar la pérdida total del cultivo. Entre las principales plagas de los productos agrícolas se puede encontrar:

3.4.1 *Fusarium* spp.

Los hongos del género *Fusarium* son ascomicetos filamentosos y cosmopolitas, tienen un micelio bien desarrollado, septado y conidióforos característicos. Son considerados principalmente como hongos de campo ya que causan un sin número de enfermedades en cultivos. Sus daños desencadenan en el hospedante una serie de afecciones generalmente de carácter irreversible, originando pérdidas económicas considerables⁽³⁵⁾. Este patógeno actúa en temperaturas cálidas entre 12 y 28°C acompañado de un pH bajo y suelo pobre en nutrientes⁽³⁶⁾.

Los hongos del género *Fusarium* son ampliamente conocidos alrededor del mundo, y se han convertido en un problema serio ya que producen metabolitos tóxicos que ponen en peligro la salud de seres humanos y animales. Además, incluye muchos patógenos de plantas de importancia agrícola ya que ocasiona enfermedades caracterizadas por marchitez, tizones, pudriciones en cultivos ornamentales; las especies de *Fusarium* causantes de marchitez siguen un patrón similar de infección; penetran por la raíz y colonizan en el tallo de las plantas el sistema vascular. Como hongo fitopatógeno emplea diversas estrategias de infección, así también, la especificidad del hospedero depende de cada especie de *Fusarium* spp. El hongo puede sobrevivir en el suelo como micelio o como esporas en ausencia de sus anfitriones, y si se encuentra cerca una planta hospedera, la infección

puede iniciar en las raíces, en partes de la planta por encima del suelo, a través del aire o el agua ⁽³⁵⁾.

Para que la infección se logre con éxito, la interacción entre hongo-planta responde a un proceso donde se deben movilizar diferentes conjuntos de genes para la señalización temprana del hospedero, la adhesión a la superficie de este, la descomposición enzimática de barreras físicas, la defensa contra los compuestos antifúngicos del anfitrión, y la inactivación y la muerte de las células huésped por micotoxinas segregadas ⁽³⁵⁾.

Fusarium oxysporum causa una enfermedad conocida como marchitez que se presenta en diferentes cultivos como tomate, chiles picantes y pimientos; la planta presenta un amarillamiento en las hojas, además la enfermedad afecta el sistema vascular y antes de que la planta madure varias hojas se amarillean y marchitan, afectando el desarrollo de los frutos y el crecimiento de la planta en general ⁽³⁷⁾.

Por otra parte, *Fusarium solani* es el causante de pudrición de la base del tallo, afecta sobre todo a tomates y pimientos; la planta se ve atacada principalmente en la zona de la base del tallo y raíz. Provoca marchitez y amarillamiento de las hojas, y crecimiento retardado. Provoca necrosis en raíces principales y secundarias. Las plantas se vuelven quebradizas cuando el ataque es severo ⁽³⁷⁾.

3.4.1.1 Patogenicidad del hongo

Varios estudios han buscado la identificación de genes básicos de patogenicidad que codifican para componentes esenciales de las vías involucradas para las señales exógenas y endógenas, tales como proteínas Ras (pequeñas GTPasas) los componentes de señalización de proteína G y

sus vías descendentes, diversos complejos proteínicos y las cascadas de señales de transducción que son reguladores para el desarrollo del hongo y su virulencia: el sistema de señalización de la adenosin monofosfato cíclico dependiente de protein quinasa (cAMP-PKA) y la cascada de protein quinasas activadas por mitogenos (MAPK). Estas vías juegan un papel crucial en la formación de estructuras infectivas, tales como los apresorios y la secreción de una mezcla de enzimas hidrolíticas para penetrar el complejo de barreras físicas del huésped, que incluyen quitinasas, celulasas, pectinasas, y proteasas ⁽³⁵⁾.

Las primeras señales de reconocimiento planta-hongo incluyen un factor de transcripción CTF1 β , que media constitutivamente la expresión del gen de quitinasa. Esto desencadena la transcripción de CTF1 α , este es mediador de la activación rápida del gen fúngico de quitinasa extracelular (cut1) para segregar esta enzima que sirve como un factor de virulencia. La planta genera diversas reacciones como mecanismo de defensa, tales como genes de defensa y producción de compuestos con propiedades antimicrobianas como la fitoalexina, o con capacidad de reforzar la estructura de la pared celular, como la lignina. Cuando la activación de estas respuestas es suficiente para evitar el crecimiento y reproducción del patógeno en el sitio de penetración, se produce la respuesta de hipersensibilidad (HR), que causa la muerte celular localizada en la región de invasión ⁽³⁵⁾.

3.4.1.2 Metabolitos tóxicos de *Fusarium spp.*

Las especies de *Fusarium spp* no sólo inactivan sustancias tóxicas producidas por el anfitrión, sino que también producen toxinas propias que aumentan su virulencia. Algunas, tales como eniatinas y ácido fusárico, son fitotoxinas, es decir, que son tóxicos para las plantas, mientras que otros, las micotoxinas, como tricotecenos y fumonisinas, son tóxicos para los animales ⁽³⁵⁾.

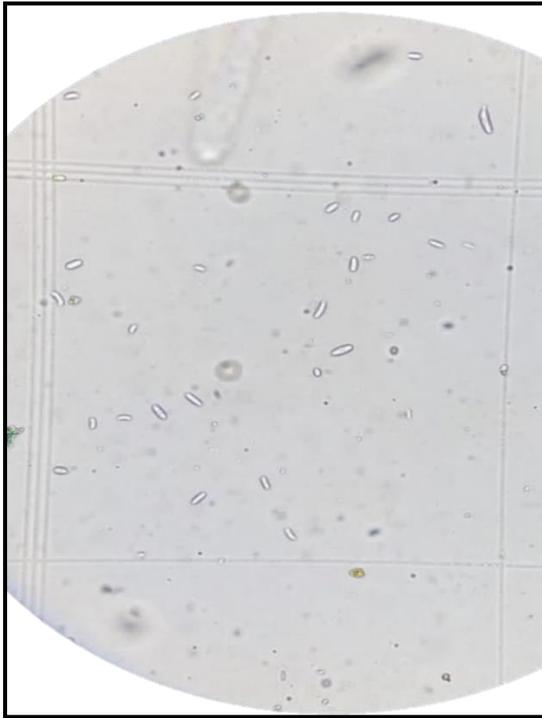


Figura 3. *Fusarium* spp, microconidias en cámara de Neubauer (40x)

Tomada de: Los autores

Figura 4. Cultivo del hongo *Fusarium oxysporum* en placa de PDA

Tomada de: ⁽³⁸⁾

3.4.2 *Alternaria* spp.

Es un género de hongos ascomicetos; las especies de *Alternaria* spp son principalmente hongos saprofitos, se asocian a la pudrición y descomposición de residuos de plantas, actúa en temperaturas cálidas alrededor de los 27°C. Sin embargo, algunas especies han adquirido capacidades patogénicas que causan colectivamente enfermedades en un amplio rango de huéspedes⁽³⁹⁾. Las especies de *Alternaria* spp se caracterizan por producir una variedad de

compuestos tóxicos que no solo afectan la planta sino que se ven asociados a efectos adversos a la salud humana y animal ⁽⁴⁰⁾.

Se asocia con frecuencia a la pudrición y descomposición de residuos de plantas. Son agentes patógenos de las plantas que generalmente infectan las hojas, las flores o las frutas. En algunos casos se ha visto que *Alternaria* spp parasita las plantas en la línea del suelo o bajo ella; no es considerada comúnmente un patógeno de enfermedades de las raíces, pero puede provocar daños en la raíz que tiene como resultado la muerte de la planta ⁽⁴¹⁾.

En infecciones de las raíces y el tallo: *Alternaria* spp sobrevive y puede pasar el invierno como esporas y micelios en residuos de plantas infectadas (hojas, tallos, semillas), las enfermedades por *Alternaria* spp provienen de residuos de plantas que pueden infectar plantas jóvenes y más maduras, lo que provoca lesiones en el tallo o pudrición de cuellos. Durante los períodos de lluvia o condiciones de gran cantidad de rocío o humedad en la tierra, la *Alternaria* crecerá y producirá esporas en el exterior o dentro de un invernadero. Las infecciones por *Alternaria* aparecen a menudo como lesiones hundidas oscuras que pueden aparecer en raíces, tubérculos, tallos y frutas. El crecimiento de micelio aparece en las lesiones como un crecimiento vellosos fino y negro que produce rápidamente esporas grises a negras⁽⁴¹⁾.

Es responsable de la enfermedad conocida como infección foliar; en las hojas aparece como "dianas" redondas, con círculos concéntricos alrededor del lugar de la infección. Comúnmente, hay una aureola amarilla alrededor de estas manchas, debido a las toxinas que emite la *Alternaria*. Al igual que con otros tejidos de plantas, estas manchas tendrán un crecimiento vellosos, negro y fino con esporas grises a negras⁽⁴¹⁾.

Las esporas de *Alternaria* se pueden propagar por el viento o al salpicar agua en las superficies de las plantas, donde puede comenzar una infección. Al igual que la botritis, las esporas necesitan humedad para germinar y crecerán en las aberturas o heridas de los estomas⁽⁴¹⁾.

3.4.2.1 Toxinas producidas por el género *Alternaria* spp

Alternaria incluye especies patógenas que pueden invadir los cultivos vegetales antes y después de la recolección y es responsable de considerables pérdidas económicas, debido a que reduce el rendimiento de las cosechas y produce alteraciones en los vegetales durante su almacenamiento. Las especies del género *Alternaria* sintetizan más de 70 metabolitos secundarios tóxicos para las plantas (fitotoxinas), algunos de los cuales afectan también a personas y animales, por lo que se consideran micotoxinas⁽⁴²⁾.

Atendiendo a sus efectos sobre las plantas, las toxinas de *Alternaria* spp. se agrupan en toxinas no específicas de hospedador y toxinas específicas de hospedador. Las toxinas no específicas de hospedador afectan a una amplia variedad de especies vegetales, tienen efectos fitotóxicos relativamente leves, aunque en muchos casos su modo de acción no se ha identificado. Aun así, se ha determinado la actividad fitotóxica de toxinas como el zinniol, el TeA y la tentoxina. El TeA inhibe la síntesis proteica, mientras que el zinniol afecta a la permeabilización de la membrana y la tentoxina inhibe la fosforilación debido a que se une a la cloroplasto ATP sintetasa. Además, algunas de estas toxinas no específicas como el AOH (Alternariol), AME (Alternariol monometil éter), ALT (Altenueno), TeA (Ácido tenuazónico) y ATX (Altertoxina) se han relacionado con la aparición de enfermedades en personas y animales⁽⁴²⁾.

Las toxinas específicas del hospedador afectan a un número menor de plantas, por lo general, causan alteraciones severas en determinadas plantas donde se desarrolla la especie de *Alternaria* spp productora de estas toxinas. Existen al menos 12 especies de *Alternaria* spp patógenas de plantas productoras de toxinas específicas del huésped, la mayoría de las cuales parecen ser variantes de *A. alternata*. Se propuso que estas variantes deberían considerarse patotipos de *A. alternata* ⁽³⁹⁾.

Aunque el sitio de acción de las diferentes toxinas de *Alternaria* spp varía, al final todos desencadenan la muerte de la célula huésped. Las toxinas AF, ACT y ACTG actúan en la membrana plasmática y causan permeabilización. La toxina AM no solo afecta la membrana plasmática, sino que también actúa sobre los cloroplastos, mientras que se encontró que las toxinas ACT y AT afectan las mitocondrias. La toxina ACR induce hinchazón y otras modificaciones morfológicas de las mitocondrias, y aumenta la oxidación de NADH, que es seguida por trastornos de la membrana plasmática que conducen a fugas de electrolitos y necrosis. Sin embargo, el mecanismo de acción de la mayoría de estas toxinas apenas se entiende ⁽³⁹⁾.

La toxina AAL es un análogo del precursor de la esfingosina esfinganina, que es producida por el patógeno del tomate *A. alternata f.sp. lycopersici*. Esta toxina se parece mucho a la micotoxina Fumonisina B1 que se identificó como una toxina de *Fusarium verticilloides* y también es producida por la especie *A. alternata* productora de toxina AAL. Al igual que Fumonisin B1, la toxina AAL es un inhibidor de la biosíntesis de esfingolípidos (ceramida)⁽³⁹⁾.

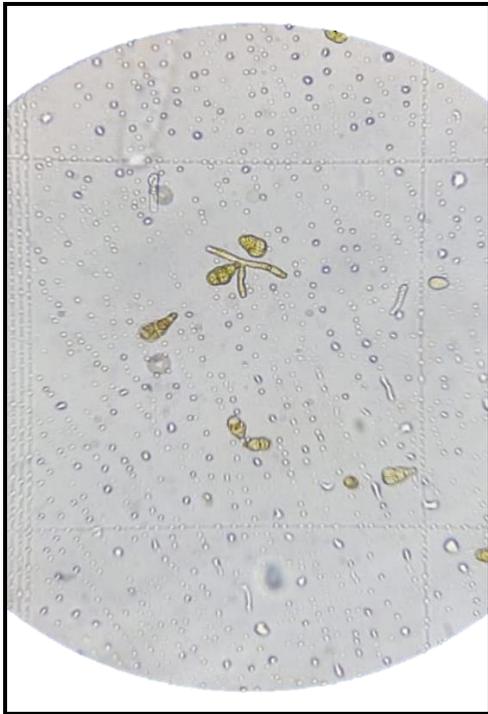


Figura 5. *Alternaria* spp, conidias en cámara de Neubauer (40x)

Tomada de: Los autores

Figura 6. Cultivo de *Alternaria* spp. en agar Sabouraud

Tomada de: ⁽⁴³⁾

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar la posible actividad antifúngica de los aceites esenciales en fitopatógenos de interés agrícola.

4.2 Objetivos específicos

- Realizar la extracción de los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* y *Thymus vulgaris* evaluando rendimiento y peso seco.
- Efectuar la caracterización química de los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* y *Rosmarinus officinalis*.
- Determinar la concentración específica o CMI en la que los aceites esenciales pueden inhibir el crecimiento de hongos patógenos en cultivos agrícolas.

5 DISEÑO METODOLÓGICO

5.1 Tipo de investigación

Esta es una investigación cuasi experimental en laboratorio y cuantitativa.

5.2 Universo, población, muestra

Universo: Plantas medicinales colombianas.

Población: *Thymus vulgaris* y *Rosmarinus officinalis*.

Muestra: Aceites esenciales extraídos de *Thymus vulgaris* y *Rosmarinus officinalis*.

5.3 Hipótesis, variables

Hipótesis

Los aceites esenciales son una alternativa contra el uso de químicos usados actualmente para el control biológico de cultivos agrícolas

Variable dependiente: Propiedades anti fúngicas de los aceites esenciales, control biológico de cultivos agrícolas.

Variable Independiente: Composición química de los aceites esenciales.

Variables controladas

- Cantidad de material vegetal usado
- Tiempo de destilación
- Concentración del aceite para dilución
- Cantidad de diluyente

6 MATERIALES Y MÉTODOS

Los métodos mencionados a continuación se realizaron en diferentes universidades, la extracción de los AEs se hizo en el laboratorio de productos naturales y vegetales de la Universidad Nacional de Colombia, y el análisis cromatográfico en el laboratorio de cromatografía de la Pontificia Universidad Javeriana.

Para obtener los aceites esenciales de las plantas se revisaron diferentes técnicas que se acoplaron a la disponibilidad del laboratorio para la extracción y además probar la actividad antifúngica que estos presentan según los productos agrícolas de interés.

6.1 Obtención del material vegetal

El material vegetal fue obtenido en la plaza de mercado Samper Mendoza, allí se pregunta la ubicación geográfica de las plantas; el Romero fue recolectado en el municipio Chipaque del departamento de Cundinamarca y el Tomillo fue recolectado en el municipio Choachí y Fomeque igualmente del departamento de Cundinamarca. El valor promedio de un kilo de cada planta oscila entre 3.000 y 6.000 pesos.

6.2 Identificación taxonómica

La determinación taxonómica de las plantas se realizó gracias al Herbario Nacional Colombiano de la Universidad Nacional de Colombia.

Para la determinación se necesitó una muestra botánica que incluía flores y/o frutos, el material se entregó prensado; tipo sándwich, separando cada ejemplar botánico por varios periódicos de la siguiente manera: cartón, papel periódico, papel periódico marcado con el número de colecta en este caso

romero y tomillo, 1R-2R y 1T-2T respectivamente, el ejemplar, y nuevamente papel periódico y finalmente cartón. Toda esta información se encuentra detallada en el instructivo para la entrega de colecciones botánicas para determinación⁽⁴⁴⁾.

6.3 Procesamiento del material vegetal

Después de la obtención y la identificación taxonómica de las plantas aromáticas, se procedió a seleccionar las hojas más frescas y desechar los tallos con el fin de obtener una mejor extracción del aceite.

6.4 Peso seco

Se conoce que el peso seco es el material vegetal al cual se le extrajo la mayor cantidad de agua posible gracias a un proceso de calentamiento controlado, con esto se busca conocer un aproximado de la cantidad de agua disponible en la planta; Para obtener el porcentaje de peso seco de la planta, se tomaron las hojas y se pesaron en la balanza Adventurer, ohaus AR3130: se realizó el secado con 10 gr de material vegetal en el horno BINDER modelo E28, durante 3 horas a 80° C⁽⁴⁵⁾.

El porcentaje de peso seco dará el valor de la planta sin biomasa de la siguiente manera:

$$\% \text{ Peso seco: } (Pds * 100) / Pas$$

Donde, **Pds** es el peso en gramos (g) del material vegetal después del secado y **Pas** corresponde al peso en gramos (g) del material vegetal antes del secado.

6.5 Procedimiento de extracción de los AEs

La obtención de los AEs se hizo mediante destilación por arrastre con vapor, este se efectuó en un equipo de destilación, para la extracción del AE de Romero se puso aproximadamente en el tanque de destilación 1.008 a 1.400 g de material vegetal; el tiempo de extracción fue de una 1 hora y media. En la extracción del Tomillo se usó 560 a 1.450 gr de material vegetal en promedio, el tiempo de extracción fue de 1 hora. Los gramos de material vegetal usado dependieron de la obtención de hojas para la extracción⁽⁴⁶⁾.

Los dos aceites esenciales obtenidos se separaron por decantación, se les agregó sulfato de sodio y se almacenaron en viales ámbar de capacidad de 15ml a 4° C hasta usarlos en los análisis correspondientes. Los rendimientos en la extracción se evaluaron por duplicado⁽⁴⁶⁾.

$$\% \text{ Rendimiento} = (W \text{ AE} / W \text{ MV}) * 100$$

Donde, **WAE** es el peso (g) obtenido del aceite esencial y **WMV** corresponde al peso en gramos (g) del material vegetal fresco.



Figura 7. Equipo de destilación

Tomada de: Los autores



Figura 8. Aceite extraído mediante la técnica destilación por arrastre de vapor

Tomada de: Los autores

6.6 Análisis de los Aes por cromatografía de gases/espectrometría de masas

Los aceites esenciales se analizaron por GC-MS en un cromatógrafo de gases Shimadzu GC2010, con inyector split/splitless acoplado a un detector selectivo de masas MS/GCTQ8040, modo de ionización IE, analizador de masas triple cuadrupolo y dos sistemas de separación. El primero empleó una columna apolar RTX-5MS (60 m x 0.25 mm x 0.25 μ m) bajo las siguientes condiciones de operación: El gas de arrastre fue helio a un flujo de 1.5 mL/min. La temperatura del horno se programó desde 40 °C (2 min) hasta 125 °C (2 min) a 4 °C/min, luego se incrementó hasta 160 °C (5 min) a 4 °C/min, posteriormente se aumentó hasta 220 °C (8 min) a 5 °C/min y finalmente la temperatura aumentó a 280 °C (4 min) a 5 °C/min. La temperatura en el puerto de inyección fue de 250 °C y la de la línea de transferencia de 290 °C, la relación de split 1:20 y el voltaje de ionización fue de 70 eV a una corriente de 60 μ A. La adquisición de los espectros de masas se realizó en un rango de masas entre 30-600 m/z. El segundo sistema de separación fue una columna polar DB-WAX (60 m x 0.25 mm x 0.25 μ m) operado bajo las mismas condiciones excepto por la programación de la temperatura del horno que fue de la siguiente forma: 45 °C (4 min) hasta 250 °C (8 min) a 4 °C/min. Se inyectó 1.0 μ L de cada solución analizada. Dilución 1/40 (25 μ l aceite a 1.0 ml utilizando hexano como diluyente)⁽²¹⁾

La abundancia relativa de cada uno de los compuestos de los aceites esenciales se determinó por GC-FID y se expresa como porcentaje, mientras que la identificación de los compuestos, presentes en cada uno de los Aes, se realizó por medio de sus índices de retención y por comparación de los espectros de masas obtenidos por GC-MS, con los espectros de masas reportados en las librerías NIST08, Pherobase y en Adams (Adams, 2007).

Los IR se calcularon teniendo en cuenta los tiempos de retención de una serie homóloga de hidrocarburos (C8 - C28), corridos bajo las mismas condiciones de análisis cromatograficos que el aceite esencial⁽⁴⁷⁾.



Figura 9. Cromatógrafo de gases Shimadzu GC2010 acoplado a un detector selectivo de masas MS/GCTQ8040

Tomada de: Los autores

6.7 Procedimientos microbiológicos

Una vez se realizó la extracción de aceite esencial de las dos plantas y se determinó el rendimiento de cada una de ellas, para la fase siguiente se utilizó el aceite esencial con cuya planta se obtuvo el rendimiento más alto determinado como porcentaje aceite/biomasa. Siendo escogido el AE Romero. Para lograr determinar la CMI del AE de Romero frente a cepas de *Fusarium* spp. (aislada de tomate) y *Alternaria* spp. (aislada de papa), ambas donadas en caja por el Centro de Biosistemas de la Universidad Jorge Tadeo Lozano, sede Chía al cepario de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca se usaron una serie de procedimientos explicados a continuación:

6.7.1 Recuento de esporas de hongos

El recuento de esporas se hace en la cámara de Neubauer con la finalidad de encontrar una concentración específica (número de esporas por mililitro), se adiciona un volumen de 5.0 ml de caldo Müller-Hinton a una caja de Petri que contiene el hongo cultivado, raspando el cultivo y mezclándolo con el caldo, cuando ya esté bien mezclado se debe filtrar con un tamiz para retirar pedazos de agar que hayan quedado adheridos o restos de micelios que impidan la lectura. Se hace la medición en la cámara de Neubauer; una vez agregada la gota de la solución se procede al conteo en los cuadrantes de los extremos (A, B, C, D) y en el central (E), una vez realizado esta medición se realiza la siguiente fórmula:

$$\text{Promedio de esporas} \times \text{Constante} = \text{Concentración de conidias/ml}$$

La constante dependerá de la cámara que se utilice.

Una vez hallada la concentración de la suspensión inicial se procede a hallar la concentración final que debe ser de 10.000 conidias/ml ya que este es el estándar para realizar la inoculación a las cajas⁽⁴⁸⁾.

6.7.2 Método de difusión en agar

Se realizaron los pozos con ayuda de un sacabocados estéril de 5.0 mm de diámetro, se selló con 30 ul de agar, posteriormente, se utilizó la solución hecha para el recuento de conidias e inocular cada una de las superficies del agar sabouraud con cloranfenicol, siguiente a ello se puso 30 ul de las diluciones de los aceites, un control positivo utilizando etanol, DMSO y un control negativo usando agua destilada⁽⁴⁹⁾.

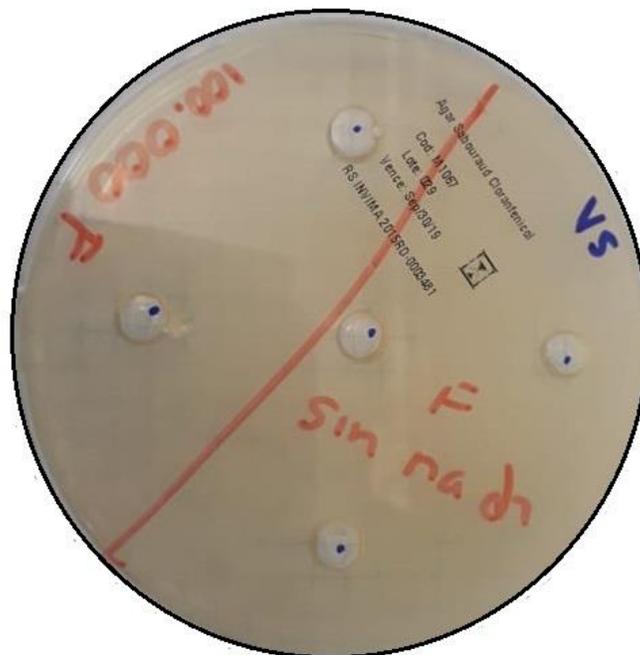


Figura 10. Agar sabouraud cloranfenicol con las diluciones del aceite esencial de romero

Tomada de: Los autores

6.7.3 Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Los 30 μ l de las diluciones de los aceites que se pusieron en cada pozo tenían concentraciones de 500 a 1 mg, se hizo por triplicado, y se incubó a temperatura ambiente. La CMI se determinó como la mínima concentración del aceite que inhibe el crecimiento fúngico y se expresó en mg/mL basándose en el CLSI M60-ED1:2017 Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts ⁽⁵⁰⁾.

7 RESULTADOS

Los aceites esenciales al ser un producto natural se han convertido en una herramienta biológica y económica encaminada a la ayuda del control microbiológico en diversos escenarios, en varias investigaciones se han encontrado que poseen unos buenos rendimientos de extracción del aceite esencial de las plantas de una manera sencilla y asequible, obteniendo un plus frente a múltiples productos que usan en la actualidad como plaguicidas. Además por sus múltiples estudios se han considerado una alternativa respecto al control de plagas, independientemente del origen (Hongos, Bacterias, Virus y Parásitos), ya que reducen la contaminación ambiental al ser de origen vegetal; una de sus ventajas es que no necesitan de purificación para su uso, logrando así una opción para el reemplazo de químicos altamente tóxicos que afectan directamente el ambiente por su actividad ⁽⁵¹⁾.

Cumpliendo los objetivos del trabajo de investigación, los resultados nos muestran el peso seco y la cantidad de agua que poseen las plantas estudiadas, que luego fueron usadas para la extracción de los AEs *Rosmarinus officinalis* y *Thymus vulgaris* evaluando cuál de ellos presenta mejor rendimiento; después se realizó la caracterización química de los AEs donde se comparó la cantidad en porcentaje de los compuestos hallados y su clasificación con la literatura e investigaciones realizadas de otros autores.

7.1.1 Identificación taxonómica

Existen múltiples diferencias entre especies de plantas que pueden hacer variar resultados en las investigaciones, como su composición química dependiendo el quimiotipo o simplemente su acción a estudiar, esto hace que al momento de evaluar una planta no guarde relación con la literatura

revisada, por ello se procura que las plantas a estudiar sean siempre del mismo sitio geográfico y de la misma especie.

La identificación taxonómica se encuentra certificada por el Herbario Nacional Colombiano, anexo 1.

7.2 Determinación de peso seco

El porcentaje de peso seco en promedio se observan en la tabla 3; donde para el peso seco se evidencia que más del 50 % corresponde a material vegetal sin agua y sin sustancias volátiles. Inmediatamente al terminar el secado se pesó para evitar que los ejemplares atraparan posible humedad del ambiente, se recomienda que se realice el pesado en un lugar sin humedad para evitar estos inconvenientes y se den falsos resultados.

Tabla 3. Porcentaje de peso seco de las especies de *Thymus vulgaris* y *Rosmarinus officinalis*.

Promedio	<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Rosmarinus officinalis</i>
	Tomillo	Romero
Peso seco	58%	62%

Además la posible cantidad de agua presente en la planta se puede determinar teniendo en cuenta la siguiente fórmula: $100 - \% \text{ de peso seco}$, el 100 equivale al total de la biomasa (material vegetal más agua), con el fin de determinar cuánto aceite esencial podría haber inmerso en la planta.

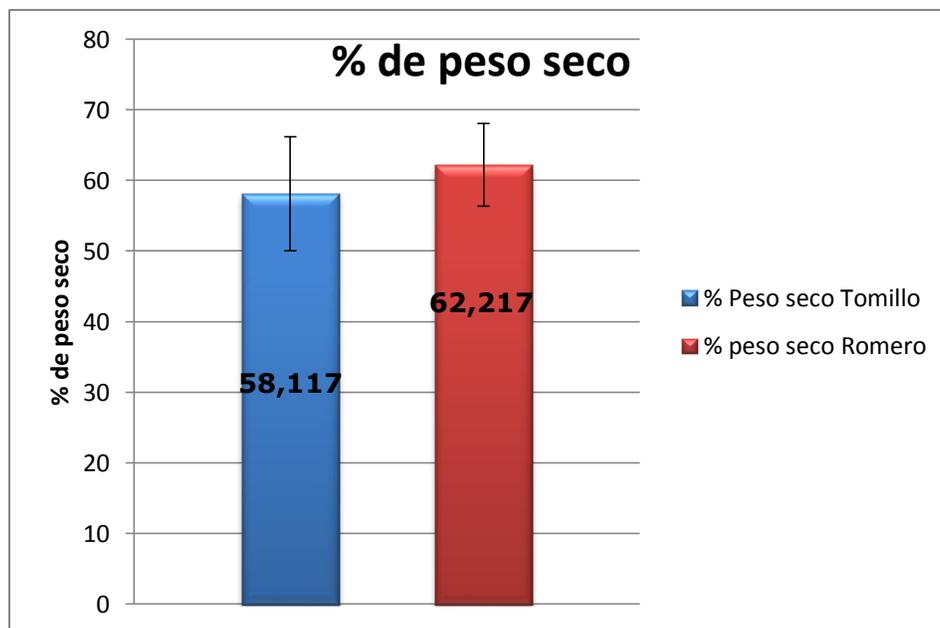


Figura 11. Porcentaje de peso seco de tomillo y romero.

Las barras verticales representan la desviación estándar.

Se realizaron 6 repeticiones para el proceso de secado de las plantas, por lo tanto estas 6 repeticiones se tuvieron en cuenta para los datos obtenidos de peso seco, además se hizo el promedio para el proceso mencionado.

En la figura 11 se hace la comparación entre peso seco, en esta gráfica se evidencia que de las dos plantas se logró un porcentaje similar de extracto seco, siendo *Rosmarinus officinalis* la planta con mayor extracción de agua. La cantidad de agua presente en la planta se correlaciona con el peso seco, al haber mayor cantidad de peso seco se espera que sea menos la cantidad de agua inmersa en la planta, *Thymus vulgaris* presentó menor porcentaje de peso seco; esta determinación es importante ya que lleva a comprender la eficiencia de la planta, teniéndolo en cuenta para la extracción de los aceites.

7.3 Extracción de aceite y porcentaje de rendimiento

La representación del peso del aceite en gramos obtenido de las plantas se refleja en la figura 12 donde podemos ver que se extrajo mayor cantidad de AE de romero (10.04 g) que de tomillo (2.60 g), la extracción se realizó por triplicado y cuadruplicado respectivamente, en las extracciones se trató de que fuera la misma cantidad de material vegetal agregado en el destilador.

La eficiencia de la extracción de los aceites de *T. vulgaris* y *R. officinalis* se muestra en la tabla 4, también se hace una comparación del rendimiento de las plantas en la figura 13; guarda correlación el rendimiento del AE respecto al peso obtenido en gramos, donde romero tiene un mejor rendimiento y también una mayor extracción de AE frente a tomillo.

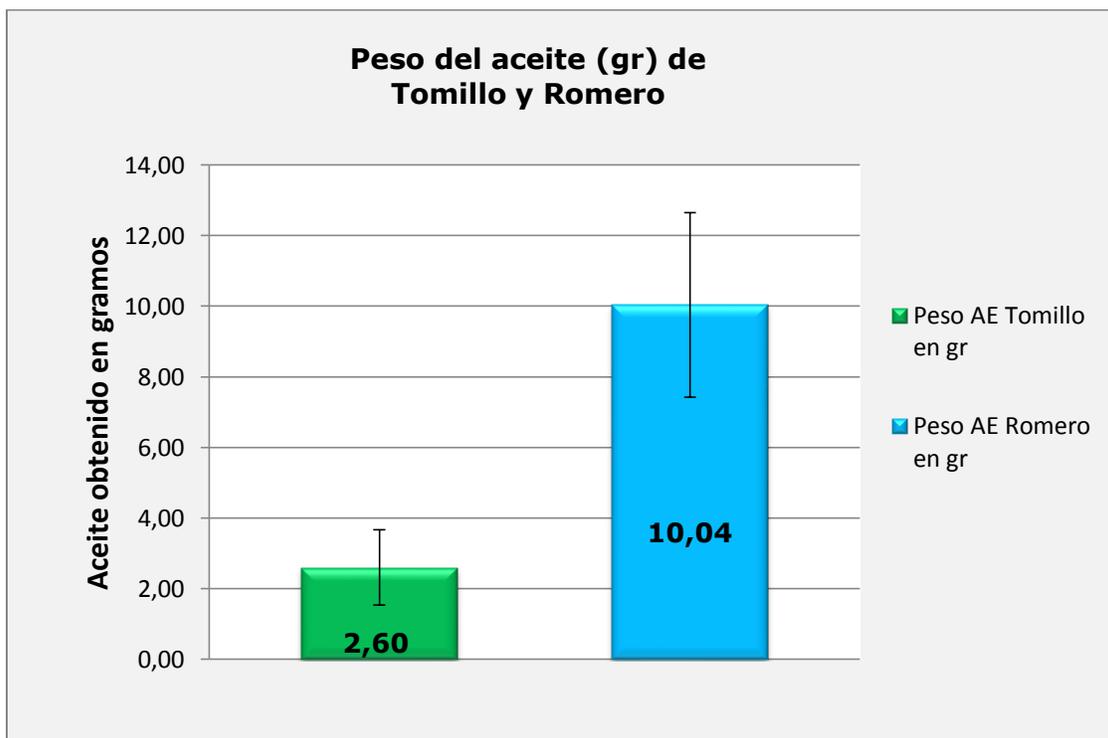


Figura 12. Peso del aceite en gramos de *Thymus Vulgaris* y *Rosmarinus officinalis*.

Tabla 4. Porcentaje de rendimiento de los aceites esenciales de *T. vulgaris* y *R. officinalis*.

Nombre científico	Nombre común	Rendimiento Biomasa A/E (w/w %)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Romero	0.86%
<i>Thymus vulgaris</i>	Tomillo	0.25%

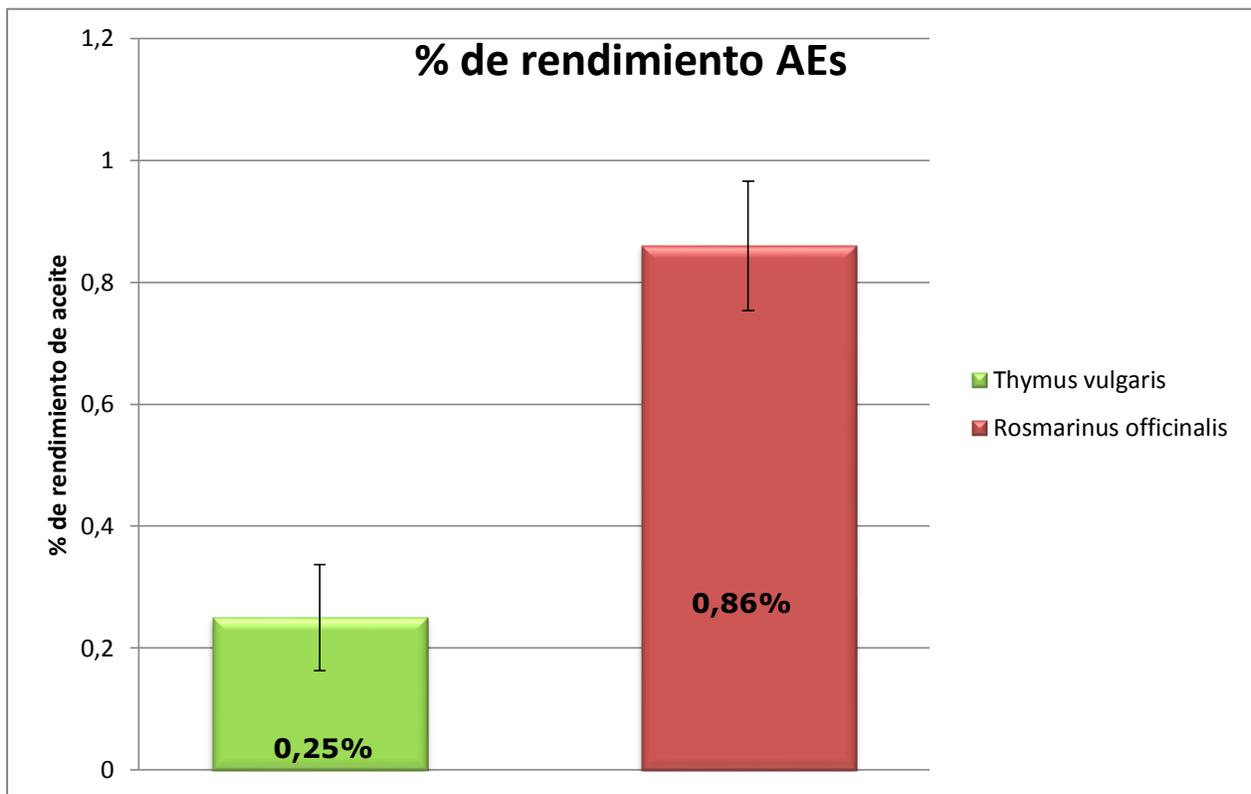


Figura 13 Rendimiento del aceite esencial de *Thymus vulgaris* y *Rosmarinus officinalis*.

7.4 Composición química de los AE

La identificación de los componentes y los tiempos de retención se realizaron mediante GC-MS y la abundancia relativa de cada uno de los compuestos expresado en porcentaje mediante GC-FID, dichos resultados son reportados en la tabla 5, Se puede observar que la composición química de AE de *T. vulgaris* cuenta con la presencia de 17 compuestos entre los cuales se destacan γ -Terpineno (33,4%), O-cimeno (17,20%) y Timol (15,9%). Ya para la composición química del AE de *R. officinalis* se encontraron 20 compuestos de los cuales se destacan α -Pineno (22,4%), 1,8 cineol (16,6%) y P-Mentha-2,4(8) dieno (12,3%). Los cromatogramas de la técnica GC-MS se pueden observar del anexo 4 al anexo 10 y los cromatogramas de la técnica GC-FID se pueden observar del anexo 11 al anexo 16.

Tabla 5. Composición química relativa (%) de los AEs para *T. vulgaris* y *R. officinalis*.

	T de retención	Columna HP-5MS	Teórico (Adams 2007)	<i>R. officinalis</i>	<i>T. vulgaris</i>
Compuesto	TR _r	IR _t	IR _L		
Triciclono	16.616	926	926	0.216	-
Tujeno	17.461	931	930	0.653	2.119
α -Pineno	17.128	938	939	22.480	1.148
Canfeno	17.822	956	954	9.529	-

β-Pineno	19.086	984	979	6.355	-
β-Mirceno	19.658	994	990	1.081	-
3-careno	19.762	1018	1011	2.251	1.687
3-octanol	19.086	982	991	-	1.222
ψ-Cumeno	20.781	1027	1025	0.616	-
2,4-tujadieno	21.123	960	960	0.474	-
Cis-hidrato de sabineno	21.150	1067	1070	7.053	1.698
O-Cimeno	21.309	1032	1026	-	17.200
Limoneno	21.372	1038	1029	-	0.641
3-Tujeno	21.539	1040	930	-	0.641
γ-Terpineno	23.065	1064	1059	1.602	33.473
1,8-Cineol	22.272	1042	1031	16.601	0.762
Acetaldehído	23.005	1048	1042	0.381	-
2,4(8)-p-Mentadieno	26.894	1095	1088	12.375	-
Linalol	29.903	1106	1096	1.270	-
Neo-alo-cimeno	24.461	1130	1144	-	0.252
Carvacrol metil éter	27.694	1239	1244	-	0.459
Geraniol	28.196	1259	1252	0.673	-
Timol	31.498	1307	1290	-	17.422

Acetato de bornilo	27.843	1297	1285	2.396	-
Acetato de isobornilo	30.980	1310	1288	-	0.820
Cariofileno	39.463	1436	1419	-	2.685
4,8-β-Epoxido de cariofileno	39.463	1436	1425	4.361	-
β-Bisaboleno	28.715	1515	1507	0.759	-
Óxido de cariofileno	41.699	1598	1584	0.612	0.443
10-epi-γ-Eudesmol	43.097	1639	1624	-	0.200

TRt: Tiempo de retención mediante la técnica FID

IRt: Índices de retención calculados con la columna apolar HP-5MS

IRL: índices de retención lineal teóricos obtenidos en "Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy", 4ta Edición. (Adams, 2007).

7.5 Actividad antifúngica y concentración mínima inhibitoria (CMI)

La CMI del AE de Romero frente a *Fusarium spp* y *Alternaria spp* se ve reflejada en la tabla 6 y tabla 7 respectivamente. La concentración mínima de AE de Romero a la cual *Fusarium spp* fue inhibido fue de 125 mg/ml

Tabla 6. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de AE de Romero frente a *Fusarium* spp.

Cepa	[] de AE (mg/mL)	Halo de inhibición (mm)
<i>Fusarium spp.</i>	AE puro	Inhibición total
	500	27 mm ± 2.05
	250	24 mm ± 2.94
	125	6 mm ± 0.82
	100	NH
	50	NH
	25	NH
	12.5	NH
	8	NH
	5	NH
	2.5	NH
	1	NH
	DMSO	NH
	Control (+)	14 mm ± 0.82

	Control (-)	NH
--	--------------------	-----------

NH: No presenta halo de inhibición

Tabla 7. Determinación de la concentración mínima inhibitoria del AE de Romero frente a *Alternaria* spp.

Cepa	[] de AE (mg/mL)	Halo de inhibición (mm)
<i>Alternaria</i> spp.	AE puro	Inhibición total
	500	Inhibición total
	250	Inhibición total
	125	12 mm ± 3.68
	100	13 mm ± 2.36
	50	NH
	25	NH
	12.5	NH
	8	NH
	5	NH
	2.5	NH
	1	NH

	DMSO	NH
	Control (+)	14 mm ± 0.82
	Control (-)	NH

NH: No presenta halo de inhibición

Las tablas de la determinación de la CMI nos muestra que *Alternaria spp* fue el microorganismo más sensible, ya que se observó una inhibición total desde el aceite sin diluir hasta la concentración 250 mg/mL, siendo la CMI 100 mg/mL.

En el caso de *Fusarium spp* se observa una inhibición total de crecimiento en el aceite sin diluir y una inhibición parcial desde la concentración 500 mg/mL hasta 125 mg/mL con halos de van desde 27mm a 6mm; siendo 125 mg/mL la CMI.

8 DISCUSIÓN

La extracción del aceite de las plantas estudiadas, *Thymus vulgaris* y *Rosmarinus officinalis* se hizo con el método de destilación por arrastre de vapor, este método se caracteriza por ser sencillo y de bajo costo, logrando en el estudio una extracción importante de aceite esencial de romero de manera asequible, del cual se obtuvo 10,04 g de AE de romero y un rendimiento de 0,86%, esto comparado con un estudio con romero realizado por Martinello et.al. 2005 ⁽⁵²⁾ donde indica que con extracción por solvente se obtuvo un rendimiento promedio de 15.5% y con destilación por arrastre de vapor su resultado fue de 1.3%; donde los resultados obtenidos con la misma metodología no varían mucho.

Así mismo Torrenegra M, *et.al.* 2017 hace una comparación entre el método MWHD e hidrodestilación HD, siendo este muy similar a la destilación por arrastre con vapor; en su estudio la técnica MWHD es más efectiva en la extracción de aceites debido a la acción de las microondas sobre las paredes glandulares que contiene el AE, lo cual hace que el material vegetal se rompa más rápido y eficientemente; aunque la destilación por arrastre de vapor tiene gran desventaja ya que se requiere de largos periodos de tiempo y se obtienen bajos rendimientos comparados con otros métodos, esta sigue siendo un método reproducible, económico y, sobre todo, ampliamente utilizado en la industria⁽⁵³⁾.

Basados en la literatura se puede encontrar diferentes estudios que muestran la composición química de los AE extraídos de las plantas de interés, donde se observa que la composición química obtenida en este estudio es acertada con los reportados en los mencionados estudios, por ejemplo en el estudio de Takayama C, *et. al.* el compuesto más abundante en el aceite esencial de romero es el α -Pinene (21.3%), y en el estudio de

Bouyahya A, *et. al.* el 1,8 cineol fue el compuesto más abundante (23.6%); Las diferencias que se presenten entre este estudio y otros respecto a los aceites de las plantas, pueden darse probablemente por una composición química diferente o abundancia de los componentes del aceite⁵⁴⁻⁵⁵.

En los aceites esenciales estudiados, el tipo de compuesto más abundante fue el monoterpeno. Aproximadamente, se puede establecer que del total de los AEs analizados el 95% son de naturaleza monoterpénica, con compuestos representativos como γ -Terpineno, O-cimeno y Timol para tomillo, en romero fue α -Pineno, 1,8 cineol y P-Mentha-2,4(8) dieno. La importancia de estos terpenos en la planta es que hacen parte del metabolismo secundario, se denominan así a los compuestos químicos que cumplen funciones no esenciales pero que les da una ventaja en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente, estos compuestos cumplen funciones de defensa contra patógenos ya que se ha descrito que presentan actividad frente a hongos, bacterias, nematodos e insectos agregando que estos compuestos intervienen en la defensa química de la planta⁽⁵⁶⁾. Según Borboa F *et.al.* los terpenos presentan un mecanismo de acción frente a microorganismos patógenos dado que intervienen en el rompimiento de la membrana, a través de compuestos lipofílicos⁽⁵⁷⁾.

En el caso de romero, el compuesto con mayor proporción fue el α -pineno, este compuesto es importante ya que los pinenos en la planta muestran actividad antifúngica. En el estudio Rivas A, *et. al.* determinaron que el α -Pineno inhibió completamente a *Candida albicans* en un lapso de 6 horas, concluyendo la potencialidad que presenta este compuesto frente a este hongo⁽⁵⁸⁾. También Xia Z, *et. al.* en su estudio determinó mediante microscopía electrónica que el α -Pineno tenía un papel importante en la inhibición y eliminación de *Candida albicans*, ya que la actividad del compuesto rompió la pared celular y la membrana citoplasmática; Los

componentes intracelulares se liberaron, se inhibió la síntesis de ADN, ARN, polisacárido de la pared celular y ergosterol de membrana citoplasmática⁽⁵⁹⁾. El segundo compuesto más abundante del aceite esencial de romero estudiado fue el 1,8-cineol, se ha descrito que este compuesto presenta actividad antifúngica, según el estudio de Morcia C, *et. al.* determinó que este compuesto redujo el crecimiento micelial de varias especies de *Fusarium* spp. a concentraciones mayores o iguales a 1%⁽⁶⁰⁾, esto guarda relación ya que también este compuesto podría estar implicado en la inhibición de los patógenos estudiados gracias a su acción antifúngica descrita en la literatura.

También se ha descrito que el α -Pinoeno junto con el 1,8-cineol pueden incrementar el potencial de acción dado que ambos presentan actividad biológica⁽⁶¹⁾, lo que refuerza que en la planta estudiada estos dos compuestos son los principales responsables del efecto inhibitorio del aceite. Basados en estas investigaciones previas y sabiendo que los terpenoides presentan estas actividades de daño a la integridad de la membrana celular, y la lisis celular, creemos que así logró la inhibición de los patógenos además de pensar que el aceite tuvo mejores halos de inhibición al estar puro ya que de esta manera los metabolitos secundarios están en mayor concentración.

Para disolver el AE evaluado se usó DMSO 5%, pensando en su posible actividad se realizó el mismo ensayo y demostró que no inhibe la viabilidad de ninguno de los dos fitopatógenos. Se observó la actividad antifúngica del aceite esencial de romero, dado que *Fusarium spp* y *Alternaria spp*, presentan inhibiciones totales con el aceite sin diluir, además *Alternaria spp* también presenta inhibición con concentraciones de 500 y 250 mg/mL. Estos resultados pueden ser comparados con estudios donde el AE de Romero inhibe parcialmente el crecimiento de *Fusarium spp* a una concentración de 0.6 mg/mL y se presenta una inhibición total a concentraciones desde 1

mg/mL⁽⁹⁾. También la acción del aceite puede deberse a los compuestos nombrados anteriormente.

Dado que por el bajo rendimiento del aceite de tomillo no se realizaron las pruebas microbiológicas, como se observan en los resultados los compuestos con mayor proporción en el aceite son monoterpenos puede usarse para proyectos futuros, según Abdalla, A *et. al.* describe que el timol es el compuesto encargado de la protección de la planta⁽⁶²⁾. En este caso el timol fue uno de los compuestos con mayor abundancia en el aceite esencial de esta planta.

En función los resultados obtenidos, se demuestra que el aceite esencial de romero presenta una posible actividad antifúngica, esto debido a la química de los aceites esenciales y su contenido alto de terpenos.

9 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten concluir que:

1. La técnica usada en este estudio es de las más usadas y sigue mostrando gran viabilidad para su uso, sin embargo el rendimiento de los aceites esenciales es dependiente del método de extracción utilizado para su obtención.
2. Los compuestos químicos caracterizados en este proyecto se correlacionan con otras investigaciones, permitiendo deducir que son estos compuestos los que les confiere la actividad antifúngica al aceite esencial.
3. El aceite esencial de romero presentó mayor inhibición del crecimiento de *Alternaria* spp.

10 RECOMENDACIONES

Ya que son importante las condiciones del crecimiento de la planta, se sugiere usar material biológico de un cultivo propio con el fin de controlar las variables para asegurar una población homogénea.

Si es posible, usar otros métodos de extracción como la extracción asistida por microondas, debido su alta efectividad y rapidez.

Se recomienda realizar las pruebas de inhibición de los aceites esencial in vivo a fin de comprobar en campo su viabilidad como alternativa natural para el control de cultivos.

Diseñar mezclas de los aceites esenciales entre sí o con compuestos puros para lograr elevar el potencial de acción antifúngica.

11 REFERENCIAS

1. Colombia: manual comercial e industrial [Internet]. Banrep.gov.co. [citado 15 Septiembre 2018]. Disponible en: http://www.banrep.gov.co/docum/Lectura_finanzas/pdf/lbr_manual_comercial_0.pdf
2. Molina Galindo G. Listado de Registros nacionales de plaguicidas químicos de uso agrícola [Internet]. Ica.gov.co. 2009 [citado 3 Noviembre 2019]. Disponible en: <https://www.ica.gov.co/getdoc/d3612ebf-a5a6-4702-8d4b->
3. Exceso de fumigación aumenta niveles de toxicidad en frutas | Economía | Portafolio [Internet]. [cited 2019 Nov 9]. Available from: <https://www.portafolio.co/economia/exceso-de-fumigacion-aumenta-niveles-de-toxicidad-en-frutas-504797>
4. Barrera Necha L, García Barrera L. Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium* sp. aislado de papaya (Carica papaya). Revista UDO agrícola [Internet]. 2008; 8(1):33-41 [citado 19 Octubre 2018]. Disponible en: <http://www.bioline.org.br/pdf?cg08005>
5. Özcan MM, Chalchat JC. Chemical composition and antifungal activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) oil from Turkey. Int J Food Sci

Nutr. 2008;59(7-8):691-8.

6. Niurka A, Lauzardo H, Bautista Baños S, Gerardo Velázquez Del Valle M. PROSPECTIVA DE EXTRACTOS VEGETALES PARA CONTROLAR ENFERMEDADES POSTCOSECHA HORTOFRUTÍCOLAS PROSPECTIVE OF PLANT EXTRACTS FOR CONTROLLING POSTHARVEST DISEASES OF HORTICULTURAL PRODUCTS. Vol. 30, Artículo de Revisión Rev. Fitotec. Mex. 2007.
7. Elshafie HS, Mancini E, Camele I, Martino L De, De Feo V. In vivo antifungal activity of two essential oils from Mediterranean plants against postharvest brown rot disease of peach fruit. Ind Crops Prod. 2015 Feb 1;66:11-5.
8. Hmiri S, Harhar H, Rahouti M. Antifungal activity of essential oils of two plants containing 1,8-cineole as major component: *Myrtus communis* and *Rosmarinus officinalis*. J Mater Environ Sci [Internet]. 2015 [citado 2019 Oct 12];6(10):2967-74. Disponible en: www.graphpad.com.
9. Da Silva Bomfim N, Nakassugi LP, Faggion Pinheiro Oliveira J, Kohiyama CY, Mossini SAG, Grespan R, et al. Antifungal activity and inhibition of fumonisin production by *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg. Food Chem. 2015 Jan 1;166:330-6.
10. Rueda-Puente EO, Juvera Bracamontes JJ, Romo López IG, Holguín

- Peña RJ. Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de aceites esenciales de orégano y tomillo contra *Ralstonia solanacearum*. *Rev Mex Ciencias Agrícolas*. 2018 Mar 22;(20).
11. Rahmouni A, Saidi R, Khaddor M, Pinto E, Da Silva Joaquim Carlos Gomes E, Maouni A. Chemical composition and antifungal activity of five essential oils and their major components against *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* of Moroccan palm tree. *Euro-Mediterranean J Environ Integr*. 2019 Dec;4(1).
 12. Fito-Protección de Cultivos Archives - Trisan AgroTrisan Agro [Internet]. Trisanagro.com. 2017 [Citado 15 enero 2019]. Disponible en: <http://trisanagro.com/product-category/fito-proteccion-cultivos/>
 13. Ramírez Soto J. BIOPLAGUICIDAS [Internet]. Infoagro.go.cr. 2012 [citado 20 Oct 2019]. Disponible en: <http://www.infoagro.go.cr/Infoagro/HojasDivulgativas/Bioplaguicidas.pdf>
 14. Ochando Martinez E. USOS AGRONÓMICOS DE LOS ACEITES ESENCIALES DE ESPECIES AUTÓCTONAS [Internet]. LinkedIn. 2017 [citado 15 Enero 2019]. Disponible en: <https://www.linkedin.com/pulse/uso-agron%C3%B3micos-de-los-aceites-esenciales-especies-ochando-mart%C3%ADnez/>
 15. H. A. Peredo-Luna, E. Palou-Garcia, A Lopez- Malo. Aceites esenciales:

- métodos de extracción. [Internet] 2009; 1 (3): 24-32 [Consultado 2019 Feb 13]. Disponible en: [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf)
16. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils - A review. Vol. 46, Food and Chemical Toxicology. 2008. p. 446–75.
 17. ACEITES ESENCIALES EXTRAIDOS DE PLANTAS MEDICINALES Y AROMATICAS [Internet]. [citado 2019 Nov 9]. Disponible en: [https://repositorio.sena.edu.co/sitios/introduccion_industria_aceites_esenciales_plantas_medicinales_aromaticas/pdf/ACEITES ESENCIALES EXTRAIDOS DE PLANTAS MEDICINALES Y AROMATICAS.pdf](https://repositorio.sena.edu.co/sitios/introduccion_industria_aceites_esenciales_plantas_medicinales_aromaticas/pdf/ACEITES_ESENCIALES_EXTRAIDOS_DE_PLANTAS_MEDICINALES_Y_AROMATICAS.pdf)
 18. La cromatografía (II): cromatografía de gases / espectrometría de masas — UPCTv. Universitat Politècnica de Catalunya. BarcelonaTech. [Internet]. [citado 2019 Nov 9]. Disponible en: <https://tv.upc.edu/contenidos/cromatografia-de-gases-espectrometria-de-masas>
 19. Carrera N. Espectrometría de masas [Internet]. [citado 2019 Nov 9]. Disponible en: <http://laboratoriotecnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/espectrometra-de-masas>
 20. Espectrometría de Masas [Internet]. [citado 2019 Nov 9]. Disponible en: <http://www.scai.uma.es/areas/aqcm/ems/ems.html>

21. Gutiérrez MC, Droguet M, Carmen M, Bouzán G, En Química D. LA CROMATOGRAFÍA DE GASES Y LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS: IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS CAUSANTES DE MAL OLOR. Vol. 122, N°. 2002.
22. Marcela A, Pencue R, De Grado T. Evaluación de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales e hidrosoles de *Rosmarinus officinalis* y *Taraxacum officinale* frente a microorganismos patógenos.
23. Vivancos Lax V. Estudio de la variabilidad química, propiedades antioxidantes y biocidas de poblaciones espontáneas de *Rosmarinus officinalis* L. en la región de Murcia. [Tesis para optar al grado de Doctor]. Región Murcia, España: Universidad de Murcia. Facultad de Biología; 2014. Disponible en: <https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/284820/TVLV.pdf?sequence=1>
24. Romeu CR, Ferret B, Díaz Finalé Y. CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE ROMERO (*ROSMARINUS OFFICINALIS* L.) Y EVALUACIÓN IN VITRO DE SU ACTIVIDAD ACARICIDA. Vol. 11. 2007.
25. Ramírez J, Gómez J M, Cotes J, Núñez C. Efecto insecticida de los aceites esenciales de algunas lamiáceas sobre *Tecia solanivora* Povolny en condiciones de laboratorio [Internet]. Scielo.org.co. 2010 [citado 21 Febrero 2019]. Disponible en:

<http://www.scielo.org.co/pdf/agc/v28n2/v28n2a15.pdf>

26. Tomillo- Características - Región de Murcia Digital [Internet]. Regmurcia.com. 2016 [citado 22 Febrero 2019]. Disponible en: http://www.regmurcia.com/servlet/s.SI?sit=c,543,m,2719&r=ReP-19737-DETALLE_REPORTAJESPADRE
27. A.Vogel b. Enciclopedia de Plantas - *Thymus vulgaris* L. (Tomillo) [Internet]. Avogel.es. 2018 [citado 22 Febrero 2019]. Disponible en: <https://www.avogel.es/enciclopedia-de-plantas/thymus-vulgaris.php>
28. Grieve M. A Modern Herbal | Thyme, Garden [Internet]. Botanical.com. 2017 [citado 23 Febrero 2019]. Disponible en: <http://www.botanical.com/botanical/mgmh/t/thygar16.html>
29. El cultivo del tomillo [Internet]. Infoagro.com. 2011 [citado 4 de Noviembre 2019]. Disponible en: <https://www.infoagro.com/aromaticas/tomillo.html>
30. Lizcano Gonzalez M. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO DE TOMILLO (*Thymus vulgaris*) CONTRA *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Sclerotinia sclerotiorum* [Internet]. Javeriana.edu.co. 2008 [citado 23 Febrero 2019]. Disponible en: <https://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis100.pdf>
31. Aceite Esencial de Tomillo: propiedades, cómo usarlo y contraindicaciones | ECOagricultor [Internet]. Ecoagricultor.com. 2012

- [citado 23 Febrero 2019]. Disponible en:
<https://www.ecoagricultor.com/tomillo-aceite-esencial-propiedades/>
32. Gimeno J. EL TOMILLO, UN FUNGICIDA Y BACTERICIDA AL ALCANCE DE TODOS. [Internet]. ecomaria.com. 2008 [citado 23 Febrero 2019]. Disponible en: <http://ecomaria.com/blog/el-tomillo-un-fungicida-y-bactericida-al-alcance-de-todos/>
33. Glosario de términos fitosanitarios [Internet]. Fao.org. 2017 [Citado 5 Mayo 2019]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/w3587e/w3587e03.htm>
34. Santos Diaz A, Cotes Prado A, Caro Quintero A, Bustillo Pardey A, Escobar A, Balbin A et al. Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros: agentes de control biológico. V. 1 [Internet]. Repository.agrosavia.co. 2011 [Citado 5 Mayo 2019]. Disponible en: <https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/33829>
35. Villa-Martínez A, Pérez-Leal R, Armando Morales-Morales H, Basurto-Sotelo M, Manuel Soto-Parra J, Martínez-Escudero E. Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales [citado 2019 Nov 11]; Disponible en: <http://dx.doi.org/10.15446/acag.v64n2.43358>
36. González P. *Fusarium* del tomate. Pv.fagro.edu.uy. [Internet] 2006 [citado 5 Mayo 2019]. Disponible en:

http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/enfermedades/Fusarium_tom.html

37. Barrios J. Qué es y cómo ataca el Fusarium. Seminis. [Internet] 2017 [citado 5 Mayo 2019]. Disponible en: <https://www.seminis.mx/blog-que-es-y-como-ataca-el-fusarium/>
38. Minden Pictures stock photos - A culture of the phytopathogenic fungus Fusarium oxysporum on PDA plate - Nigel Cattlin/ FLPA [Internet]. [citado 2019 Nov 12]. Disponible en: https://www.mindenpictures.com/search/preview/a-culture-of-the-phytopathogenic-fungus-fusarium-oxysporum-on-pda-plate/0_80106355.html
39. Thomma BPHJ. Alternaria spp.: From general saprophyte to specific parasite. Vol. 4, Molecular Plant Pathology. 2003. p. 225–36.
40. Rodríguez-Roa JH, Cárdenas M, Jiménez P. Especies de Alternaria de La Sabana de Bogotá, Colombia. Rev Fac Ciencias Básicas. 2013 Dec 10;9(2):228.
41. Farrar JJ, Pryor BA, Davis RM. Alternaria diseases of carrot. Vol. 88, Plant Disease. American Phytopathological Society; 2004. p. 776–84.
42. Á Pavón Moreno M, González Alonso I, Martín de Santos García Lacarra RT. Importancia del género Alternaria como productor de micotoxinas y agente causal de enfermedades humanas THE IMPORTANCE OF GENUS ALTERNARIA IN MYCOTOXINS PRODUCTION AND HUMAN DISEASES.

Nutr Hosp. 2012;27(6):1772–81.

43. Rivas LM. *Alternaria* spp [Internet]. Vol. 31, Rev Chilena Infectol. 2014 [cited 2019 Nov 12]. Available from: www.sochinf.cl
44. Colecciones Científicas: Facultad de Ciencias: Sede Bogotá: Universidad Nacional de Colombia [Internet]. [citado 2019 Nov 14]. Disponible en: <http://ciencias.bogota.unal.edu.co/departamentos/instituto-de-ciencias-naturales/colecciones-cientificas/>
45. DETERMINACIÓN DE MATERIA SECA EN PASTOS Y FORRAJES A PARTIR DE LA TEMPERATURA DE SECADO PARA ANÁLISIS | De La Roza-Delgado | Pastos [Internet]. [citado 2019 Nov 14]. Disponible en: <http://polired.upm.es/index.php/pastos/article/view/1308/1312>
46. Hilda M, Laura B. EQUIPO EXPERIMENTAL PARA LA DESTILACIÓN POR ARRASTRE DE VAPOR (DAV) DE ACEITES ESENCIALES, Caso: CÁSCARA DE NARANJA DULCE (CITRUS SINESIS) [Internet]. Vol. 14, Año. [citado 2019 Nov 14]. 18 p. Disponible en: www.quimicaorganica.net
47. Stashenko EE, René Martínez J. Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. 2010;2:29–47.
48. GUIA PARA EL CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN DE INÓCULO UNIVERSIDAD PEDAGOGICA Y TECNOLOGICA DE COLOMBIA FITOPATOLOGIA GENERAL [Internet]. [citado 2019 Nov 14]. Disponible

en: <https://virtual.uptc.edu.co/ova/fito/archivo/guia1.pdf>

49. Estudio del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Minthostachys mollis* combinado con inactivación térmica, sobre cepas de *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus* Pilar D, Rincon L [citado 2019 Nov 14]. Disponible en: <https://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis101.pdf>
50. EM100 Connect - CLSI M60 ED1:2017 [Internet]. [citado 2019 Nov 14]. Disponible en: <http://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI M60 ED1:2017&sbssok=CLSI M60 ED1:2017 TABLE 1&format=HTML#CLSI M60 ED1:2017 TABLE 1>
51. Lugo Trampe J, Morales F. Uso de los aceites esenciales en el control de plagas [Internet]. Artropodosysalud.com. 2017 [citado 15 de Septiembre 2019]. Disponible en: http://artropodosysalud.com/Publicaciones/No7-Jun2017/7Aceites_esenciales.pdf
52. van Eijnatten CLM. Cola. In: CRC Handbook of Flowering. CRC Press; 2018. p. 61-5.
53. Esther M, Alarcón T, Pájaro P, León Méndez G. Actividad antibacteriana in vitro de aceites esenciales de diferentes especies del género Citrus. Rev Colomb Cienc Quím Farm [Internet]. 2017 [citado 14 de Noviembre 2019]. Disponible en:

www.farmacia.unal.edu.co<http://dx.doi.org/10.15446/rcciquifa.v46n2.67934>

54. Takayama C, de-Faria FM, de Almeida ACA, Dunder RJ, Manzo LP, Socca EAR, et al. Chemical composition of *Rosmarinus officinalis* essential oil and antioxidant action against gastric damage induced by absolute ethanol in the rat. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2016 Aug 1;6(8):677–81.
55. Bouyahya A, Et-Touys A, Bakri Y, Talbau A, Fellah H, Abrini J, et al. Chemical composition of *Mentha pulegium* and *Rosmarinus officinalis* essential oils and their antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities. *Microb Pathog.* 2017 Oct 1;111:41–9.
56. Biología Vegetal D DE, Ciencias De La Tierra EY. UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA [Internet]. [citado 14 de Noviembre 2019]. Disponible en: <http://www.unex.es/publicaciones>
57. Autónoma de Yucatán México Borboa-Flores U. Tropical and Subtropical Agroecosystems. *Trop Subtrop Agroecosystems* [Internet]. 2010 [citado 14 de Noviembre 2019]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93915170014>
58. Silva ACR da, Lopes PM, Azevedo MMB de, Costa DCM, Alviano CS, Alviano DS. Biological Activities of α -Pinene and β -Pinene Enantiomers. *Molecules* [Internet]. 2012 May 25 [citado 14 de Noviembre

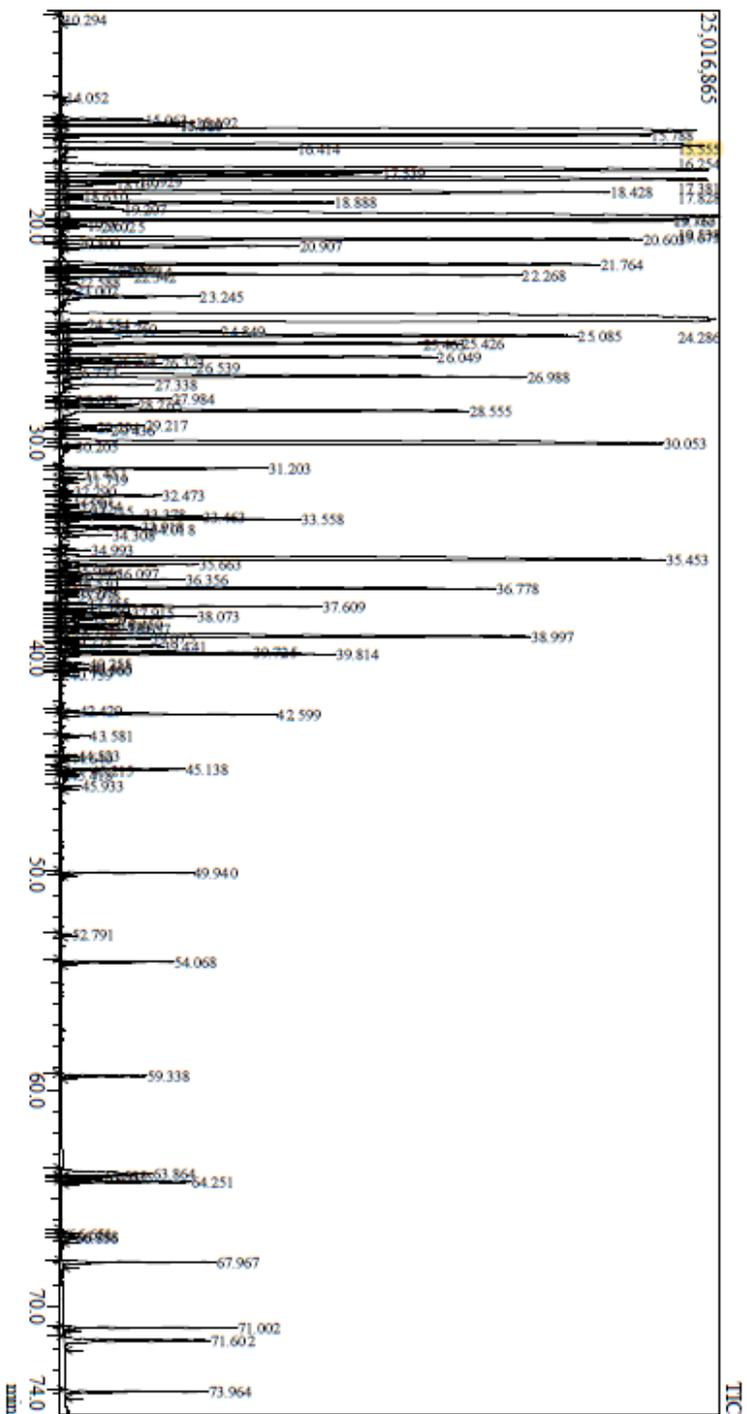
- 2019];17(6):6305–16. Disponible en: <http://www.mdpi.com/1420-3049/17/6/6305>
59. Xia Z, Mao X, Luo Y. [Study on antifungal mechanism of alpha-pinene]. Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao [Internet]. 1999 [citado 14 de Noviembre 2019]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12080706>
60. Morcia C, Malnati M, Terzi V. In vitro antifungal activity of terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1,8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens. Food Addit Contam - Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 2012;29(3):415–22.
61. Vista de Estudio de la composición química y actividad antioxidante del aceite esencial de Luma chequen (Moliná) A. Gray "arrayán" [Internet]. [Citado 14 de Noviembre 2019]. Disponible en: <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/5306/4396>
62. Abdalla AE, Roozen JP. The effects of stabilised extracts of sage and oregano on the oxidation of salad dressings. Eur Food Res Technol. 2001;212(5):551–60.

FID		G/M		Diferencia Ret. Time	Nombre ADAMS
Ret. Time	Promedio % Area	Ret. Time	Promedio % Area		
16.616	0,216	15,052	0,447	1,564	Triciclono
16.778	0,453	15,322	0,510	1,456	Tujeno
17.128	22,480	15,560	7,670	1,568	α -pineno
17.822	9,529	16,246	5,717	1,576	Carfeno
19.086	6,355	17,387	5,377	1,699	β -pineno
19.512	0,854	15,187	0,590	4,325	Tujeno
19.658	1,081	17,770	1,763	1,888	β -mirreno
20.224	2,251	18,815	1,320	1,409	3-careno
20.781	0,616	19,068	0,640	1,713	ψ -cumeno
21.123	0,474	16,407	0,350	4,716	2,4-tujadieno
21.372	6,217	19,532	6,500	1,840	cis-hidrato de sabineno
21.539	16,601	19,769	1,440	1,770	1,8-cineol
22.655	1,602	20,418	1,797	2,237	γ -terpino
23.005	0,381	19,907	0,357	3,098	Acetaldehido
23.915	0,836	20,918	1,070	2,997	cis-hidrato de sabineno
26.894	12,375	21,760	1,677	5,134	2,4(8)-p-mentadieno
27.843	2,396	30,066	2,750	2,223	Acetato de bornilo
28.196	0,673	28,521	0,920	0,325	Geraniol
28.715	0,759	38,778	0,867	10,063	β -Bisaboleno
29.903	1,270	22,235	1,250	7,668	Linolol
39.463	4,361	35,493	5,943	3,520	4,8- β -Epoxido de cariofileno
41.072	0,612	42,608	0,790	1,536	Oxido de cariofileno

Anexo 2. Caracterización química mediante la técnica FID y GC/MS para *R. officinalis*.

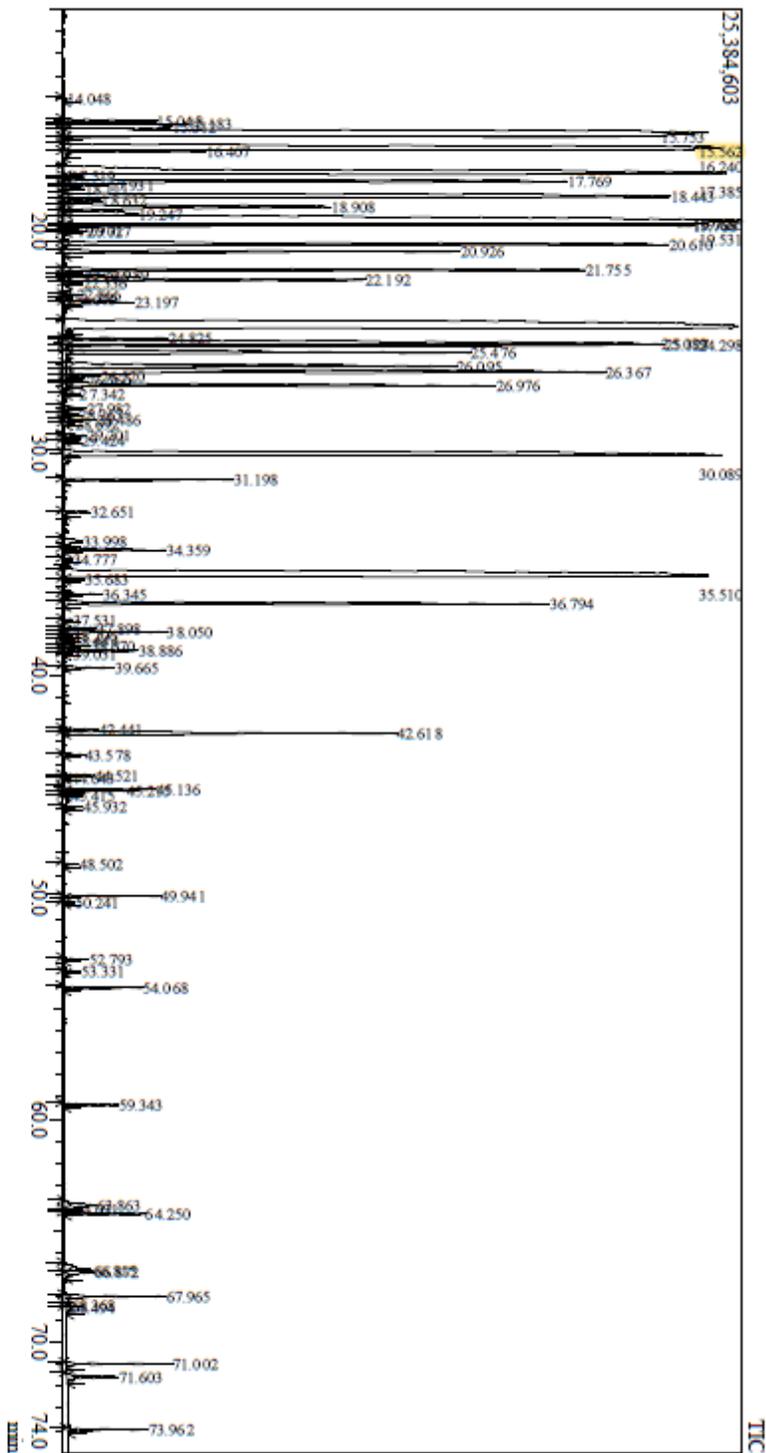
G/M		FID			Diferencia Ret. Time	Nombre ADAMS
Ret. Time	Promedio % Area	Ret. Time	Promedio % Area			
15,246	3,328	16,778	2,119	1,209	Tujeno	
15,545	2,253	17,128	1,148	1,583	α -pineno	
18,630	0,295	17,822	0,432	0,808	3-careno	
17,281	1,220	19,086	1,222	1,805	3-octanol	
21,182	1,383	19,658	1,698	1,524	cis-hidrato de sabineno	
18,953	3,315	20,781	2,943	1,828	3-careno	
19,277	5,358	21,309	17,200	2,032	O-Cimeno	
19,534	0,723	21,372	0,641	1,838	Limoneno	
19,605	0,513	21,539	0,641	1,934	3-tujeno	
20,672	6,535	22,655	33,473	1,983	γ -Terpineno	
19,657	0,908	23,005	0,762	3,348	1,8-Cineol	
21,030	5,168	24,295	2,366	3,265	γ -Terpineno	
23,214	0,168	24,461	0,252	1,247	Neo-alo-cimeno	
27,694	0,138	27,694	0,459	0	Carvacrol metil eter	
30,507	0,845	28,196	0,389	2,311	Timol	
30,578	0,793	30,980	0,820	0,402	Acetato de isobornil	
30,232	7,160	32,937	15,955	2,705	Timol	
30,672	0,908	33,363	1,078	2,691	Timol	
35,488	4,223	39,463	2,685	3,975	Cariofileno	
42,484	0,073	42,326	0,443	0,158	Oxido de cariofileno	
43,991	0,085	43,097	0,200	0,894	10-epi- γ -Eudesmol	

Anexo 3. Caracterización química mediante la técnica FID y GC/MS para *T. vulgaris*.



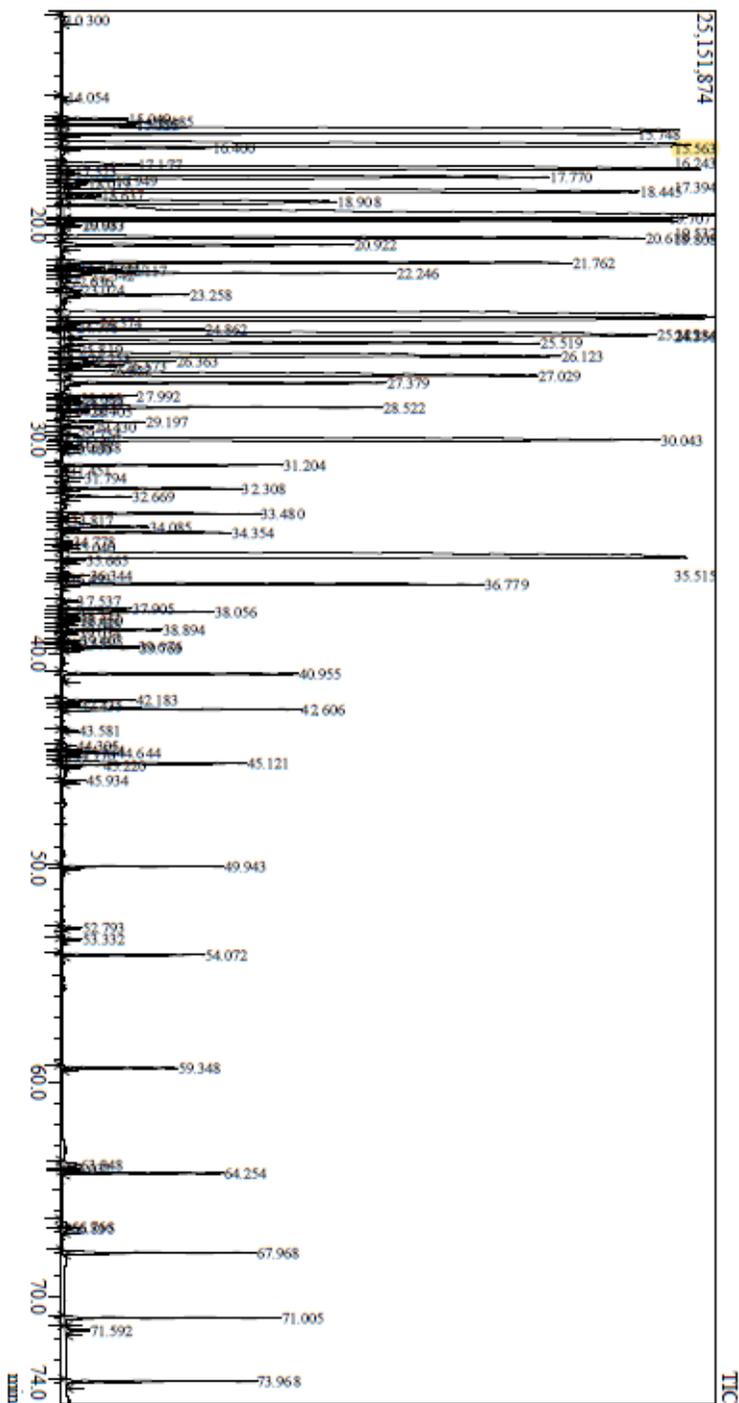
Peak#	R:Time	I:Time	F:Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	10.294	10.205	10.630	1721085	0.03	137421	0.02	12.52	V	Cyclopropane, 1,1,2,3-tetramethyl-
2	14.052	13.920	14.205	1490874	0.03	163352	0.02	9.13	V	Nonane
3	15.063	14.925	15.105	21344516	0.40	3132683	0.39	6.81	V	Tricyclo[2.2.1.0(2,6)]heptane, 1,7,7-
4	15.192	15.105	15.265	39875982	0.75	5031508	0.63	7.93	V	Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 2-methyl-5
5	15.329	15.265	15.345	20664326	0.39	4448065	0.56	4.61	V	Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 2-methyl-5
6	15.360	15.345	15.400	14525405	0.27	4447625	0.56	3.27	V	Commanin, 6-benzoyloxy-3,4-dihydro-
7	15.555	15.400	15.730	394280213	7.37	23995364	3.02	16.43	V	(1R)-2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1]h
8	15.788	15.730	15.940	98980044	1.85	22271436	2.80	4.44	V	alpha-Pinene
9	16.254	15.940	16.370	291464086	5.45	24333241	3.06	11.98	V	Camphene
10	16.414	16.370	16.765	23013676	0.43	8914652	1.12	2.58	SV	Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 4-methyl-1a
11	17.381	17.030	17.470	300140561	5.61	24459119	3.08	12.27	V	Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl
12	17.539	17.470	17.665	87313802	1.63	12074331	1.52	7.23	V	3-Octanone
13	17.828	17.665	17.875	193045339	3.61	24398195	3.07	7.91	V	beta-Myrcene
14	17.929	17.875	17.990	14525714	0.27	2911895	0.37	4.92	V	Cyclotetraloxane, octamethyl-
15	18.039	17.990	18.165	10503659	0.20	1989458	0.25	5.28	V	3-Octanol
16	18.428	18.500	18.500	121398521	2.27	20661972	2.60	5.88	V	alpha-Phellandrene
17	18.630	18.500	18.765	4227595	0.08	796893	0.10	5.31	V	gamma-Terpinene
18	18.888	18.765	19.030	80779372	1.51	10271711	1.29	7.86	V	(+)-4-Carene
19	19.207	19.030	19.235	14388854	0.27	2311909	0.29	6.18	V	Benzene, tert-butyl-
20	19.538	19.235	19.655	419522690	7.84	24864421	3.13	16.87	V	Cyclohexanol, 1-methyl-4-(1-methyl)
21	19.675	19.655	19.720	90688620	1.70	23420989	2.95	3.87	V	Eucalyptol
22	19.731	19.720	19.740	27598637	0.52	23007503	2.89	1.20	V	Eucalyptol
23	19.763	19.740	19.815	53943059	1.01	23077470	2.90	2.34	V	Eucalyptol
24	19.967	19.910	19.990	2278831	0.04	938450	0.12	2.43	V	Benzeneacetaldehyde
25	20.025	19.990	20.100	4167449	0.08	1475765	0.19	2.82	V	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (Z)-

Anexo 4. Cromatograma de primera repetición del AE de romero mediante GC-MS, α -Pino es el compuesto seleccionado.



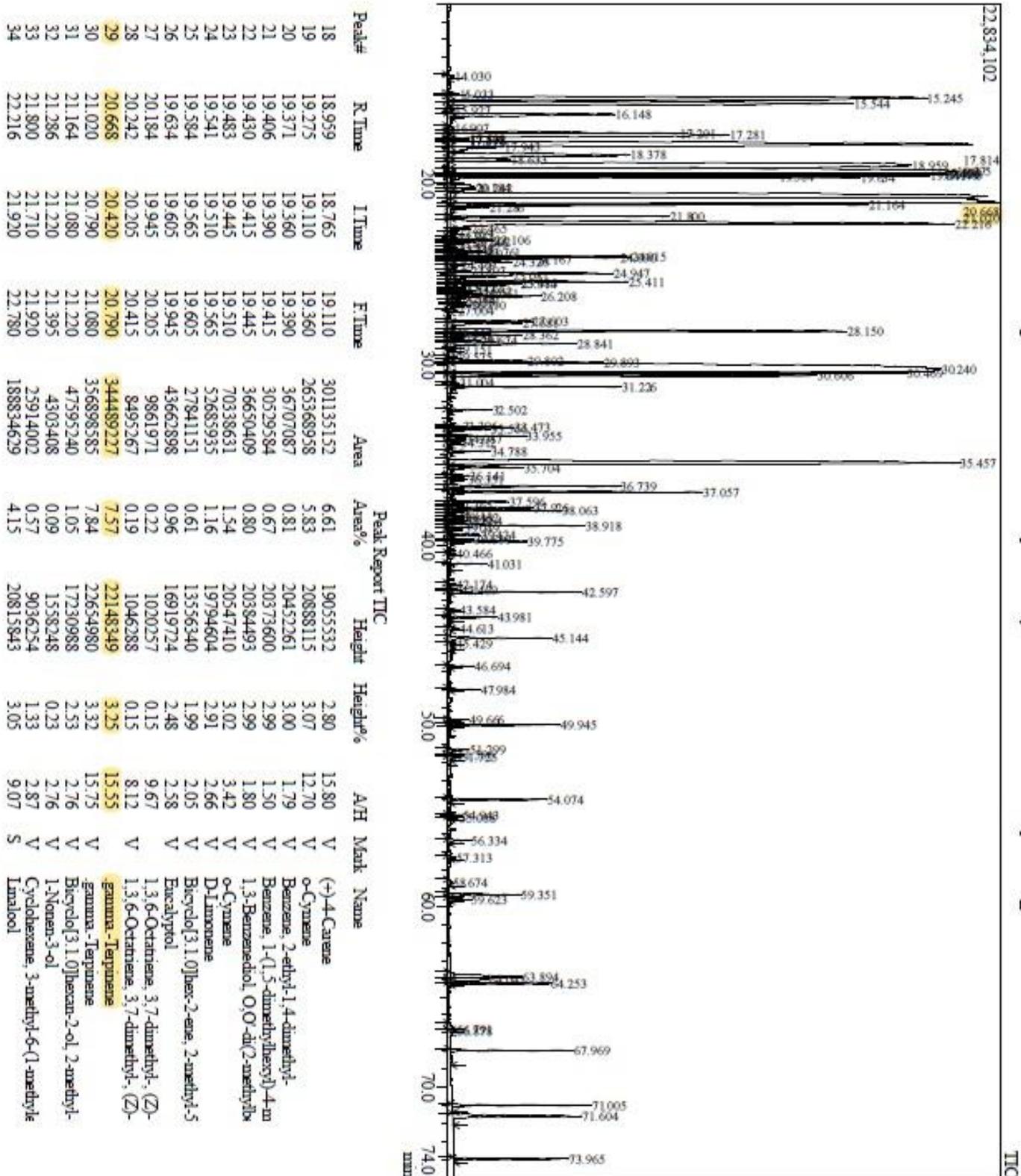
Peak#	R:Time	I:Time	F:Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	14.048	13.930	14.205	1360339	0.03	156028	0.02	8.72	V	Nonane
2	15.045	14.910	15.120	26280836	0.56	3472448	0.55	7.57	V	Tricyclol[2.1.0](2,6)]heptane, 1,7,7-
3	15.183	15.120	15.235	27687023	0.59	4660460	0.73	5.94	V	Bicyclol[3.1.0]hex-2-ene, 2-methyl-5
4	15.312	15.235	15.415	39520702	0.84	4009330	0.63	9.86	V	Bicyclol[3.1.0]hex-2-ene, 2-methyl-5
5	15.562	15.415	15.740	395966470	8.37	24024693	3.79	16.48	V	(1R)-2,6,6-Trimethylbicyclol[3.1.1]h
6	15.753	15.740	15.905	34478735	0.73	22203756	3.50	1.55	V	(1R)-2,6,6-Trimethylbicyclol[3.1.1]h
7	16.240	16.005	16.365	305476993	6.46	24480204	3.86	12.48	V	Camphene
8	16.407	16.365	16.740	14126154	0.30	5271254	0.83	2.68	SV	Bicyclol[3.1.0]hex-2-ene, 4-methyl-6
9	17.385	17.025	17.470	293467492	6.21	24696927	3.89	11.88	V	Bicyclol[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl
10	17.519	17.470	17.640	1410362	0.03	2009966	0.03	7.02	V	3-Octanone
11	17.769	17.640	17.855	120229674	2.54	18753278	2.96	6.41	V	beta-Myrcene
12	17.931	17.855	18.005	8872855	0.19	1659445	0.26	5.35	V	Cyclotetraoxane, octamethyl-
13	18.111	18.005	18.180	4338954	0.09	727533	0.11	5.96	V	Decane
14	18.443	18.260	18.505	174483696	3.69	22555136	3.56	7.74	V	Bicyclol[3.1.0]hex-2-ene, 2-methyl-5
15	18.632	18.505	18.760	6996055	0.15	1375079	0.22	5.09	V	3-Carene
16	18.908	18.765	19.040	83514191	1.77	9946068	1.57	8.40	V	(+)-4-Carene
17	19.247	19.040	19.255	19213529	0.41	2735766	0.43	7.02	V	Benzene, tert-butyl-
18	19.531	19.255	19.665	450260434	9.52	25261222	3.98	17.82	V	Bicyclol[3.1.0]hexan-2-ol, 2-methyl-
19	19.686	19.665	19.710	63409683	1.34	23588350	3.72	2.69	V	Bicyclol[3.1.0]hexan-2-ol, 2-methyl-
20	19.721	19.710	19.750	56001846	1.18	23417628	3.69	2.39	V	Eucalyptol
21	19.768	19.750	19.825	46552796	0.98	23404623	3.69	1.99	V	Eucalyptol
22	19.971	19.920	19.995	1234841	0.03	488627	0.08	2.53	V	Benzeneacetaldehyde
23	20.027	19.995	20.100	2295097	0.05	817373	0.13	2.81	V	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (Z)-
24	20.610	20.460	20.670	130891519	2.77	22538803	3.55	5.81	V	gamma-Terpinene
25	20.926	20.825	21.150	59999927	1.27	14743466	2.32	4.07	SV	Bicyclol[3.1.0]hexan-2-ol, 2-methyl-

Anexo 5. Cromatograma de segunda repetición del AE de romero mediante GC-MS, α -Pinoeno es el compuesto seleccionado.

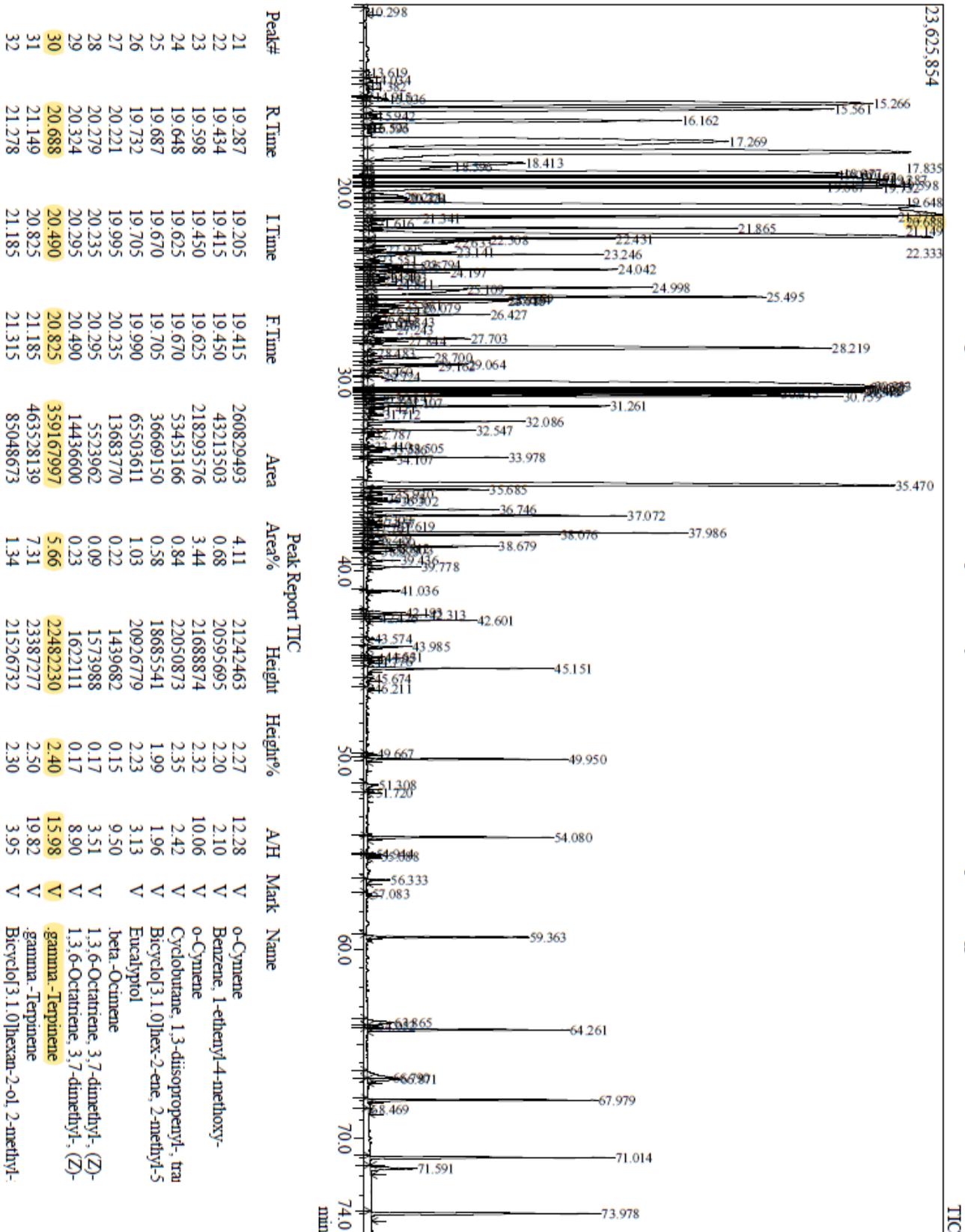


Peak#	R:Time	I:Time	F:Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	10.300	10.210	10.640	1647284	0.03	133617	0.02	12.33	V	3-Hexen-2-one
2	14.054	13.930	14.200	1510384	0.03	171207	0.02	8.82	V	Nonane
3	15.049	14.910	15.120	19246831	0.38	2538999	0.36	7.58	V	Tricyclo[2.2.1.0(2,6)]heptane, 1,7,7-
4	15.185	15.120	15.245	21641722	0.43	3399649	0.48	6.37	V	Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 2-methyl-5
5	15.292	15.245	15.310	10717768	0.21	2843601	0.40	3.77	V	Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 2-methyl-5
6	15.325	15.310	15.410	15438852	0.30	2823811	0.40	5.46	V	Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 2-methyl-5
7	15.363	15.410	15.725	369673745	7.27	23633805	3.33	15.64	V	(1R)-2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1]h
8	15.748	15.725	15.910	59289162	1.17	22013373	3.10	2.69	V	(1R)-2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1]h
9	16.243	16.020	16.350	266169973	5.24	24067807	3.39	11.06	V	Camphene
10	16.400	16.350	16.495	16305262	0.32	5710572	0.80	2.86	V	Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 4-methyl
11	17.177	17.015	17.215	18828446	0.37	2891982	0.41	6.51	V	Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 2-methyl-5
12	17.394	17.215	17.460	218888021	4.31	24389351	3.44	8.97	V	Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl
13	17.523	17.460	17.640	3035161	0.06	421640	0.06	7.20	V	3-Octanone
14	17.770	17.640	17.870	139825788	2.75	18604018	2.62	7.52	V	beta-Mycene
15	17.949	17.870	18.025	11659277	0.23	1964478	0.28	5.94	V	Cyclotrisiloxane, octamethyl-
16	18.079	18.025	18.205	5288931	0.10	903366	0.13	5.85	V	Carbonyl acid, decyl prop-1-en-2-yl-
17	18.445	18.250	18.520	188012464	3.70	22019867	3.10	8.54	V	Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 2-methyl-5
18	18.637	18.520	18.760	9129965	0.18	1445067	0.20	6.32	V	3-Carene
19	18.908	18.760	19.075	107181517	2.11	10489314	1.48	10.22	V	(+)-4-Carene
20	19.532	19.075	19.690	506974222	9.97	25004302	3.52	20.28	V	Bicyclo[3.1.0]hexan-2-ol, 2-methyl-
21	19.707	19.690	19.720	41571091	0.82	23124393	3.26	1.80	V	Cyclotrisiloxane, 1,3-dimethyl-5
22	19.808	19.720	19.860	142907637	2.81	23521493	3.31	6.08	V	Encalyptol
23	19.987	19.940	20.010	1696046	0.03	688060	0.10	2.46	V	Benzeneacetaldehyde
24	20.033	20.010	20.120	1948978	0.04	716082	0.10	2.72	V	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (Z)-
25	20.618	20.465	20.675	129013515	2.54	22289766	3.14	5.79	V	gamma-Terpinene

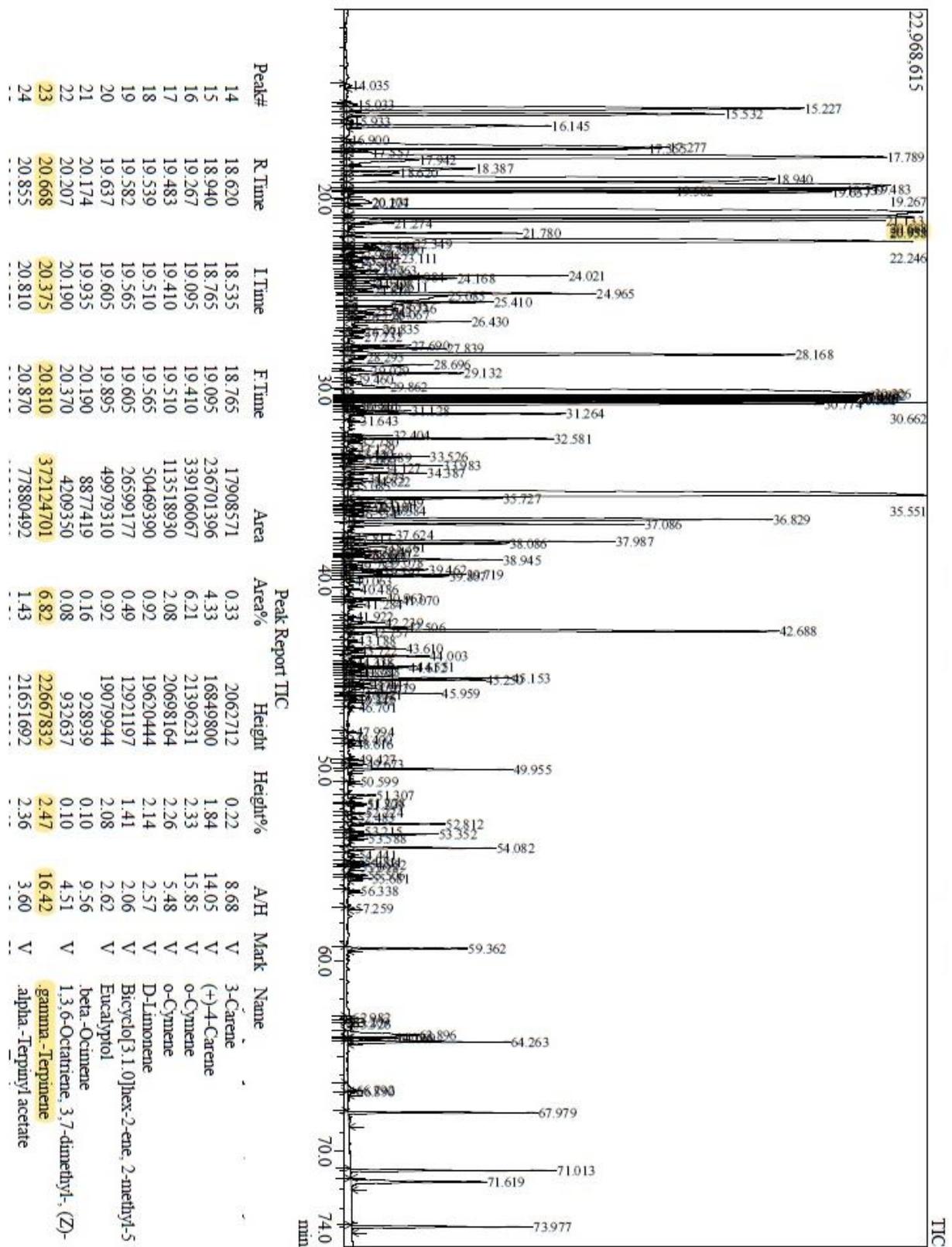
Anexo 6. Cromatograma de tercera repetición del AE de romero mediante GC-MS, α -Pino es el compuesto seleccionado.



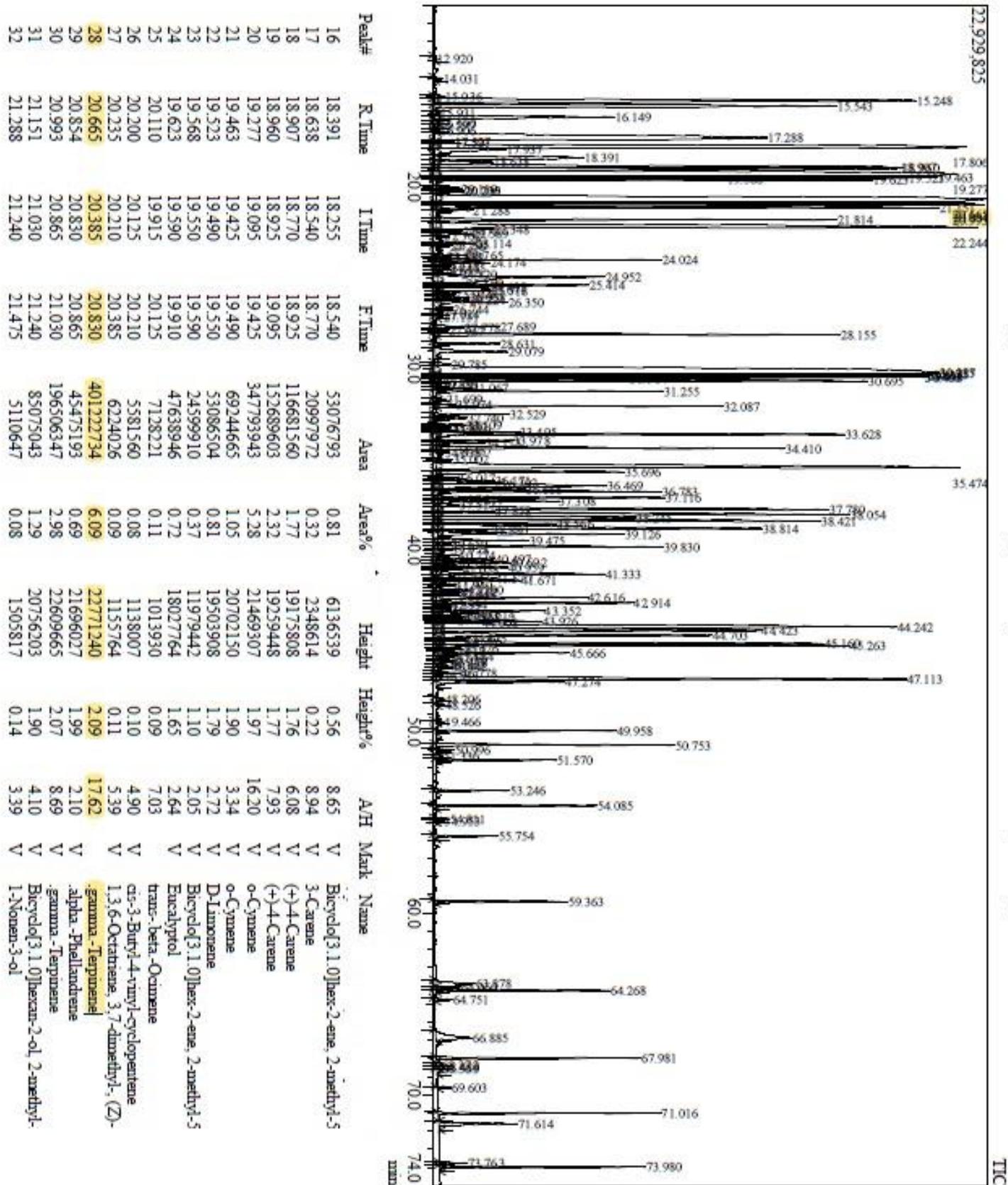
Anexo 7. Cromatograma de primera repetición del AE de tomillo mediante GC-MS, γ -Terpineno es el compuesto seleccionado.



Anexo 8. Cromatograma de segunda repetición del AE de tomillo mediante GC-MS, γ -Terpineno es el compuesto seleccionado.

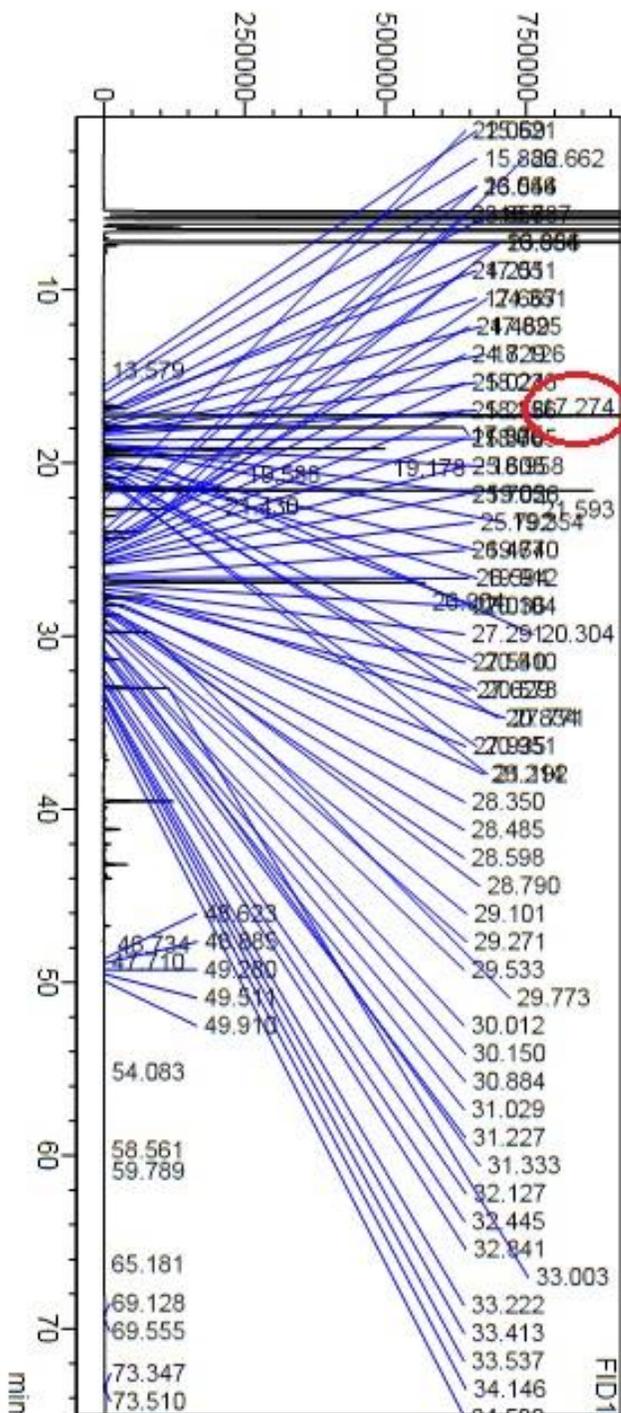


Anexo 9. Cromatograma de tercera repetición del AE de tomillo mediante GC-MS, γ -Terpineno es el compuesto seleccionado.



Anexo 10. Cromatograma de cuarta repetición del AE de tomillo mediante GC-MS, γ -Terpineno es el compuesto seleccionado.

<Chromatogram>
UV

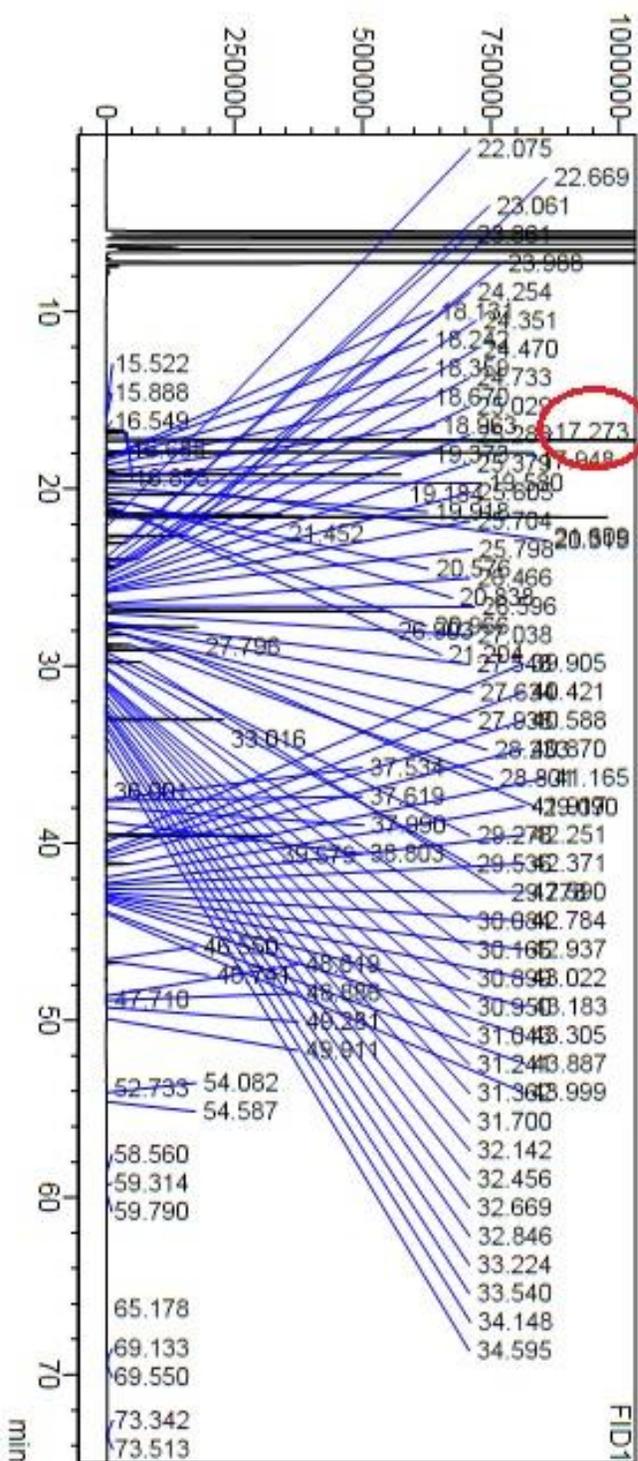


<Peak Tables>

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	13.579	1044	393	0.000			
2	15.521	2575	936	0.000	ppm		RT:15.451
3	15.886	2083	539	0.000	ppm		RT:15.824
4	16.544	2964	941	0.000	ppm	V	RT:16.616
5	16.687	77487	25901	0.000	ppm	V	RT:16.616
6	16.854	126302	39799	0.000	ppm	V	RT:16.778
7	17.051	1024	359	0.000	ppm	V	RT:17.128
8	17.274	5821250	1363830	0.000	ppm	SV	RT:17.128
9	17.667	1034	335	0.000	ppm	TV	RT:17.578

Anexo 11. Cromatograma de primera repetición del AE de romero mediante GC-FID, α -Pino es el compuesto seleccionado.

<Chromatogram>
UV

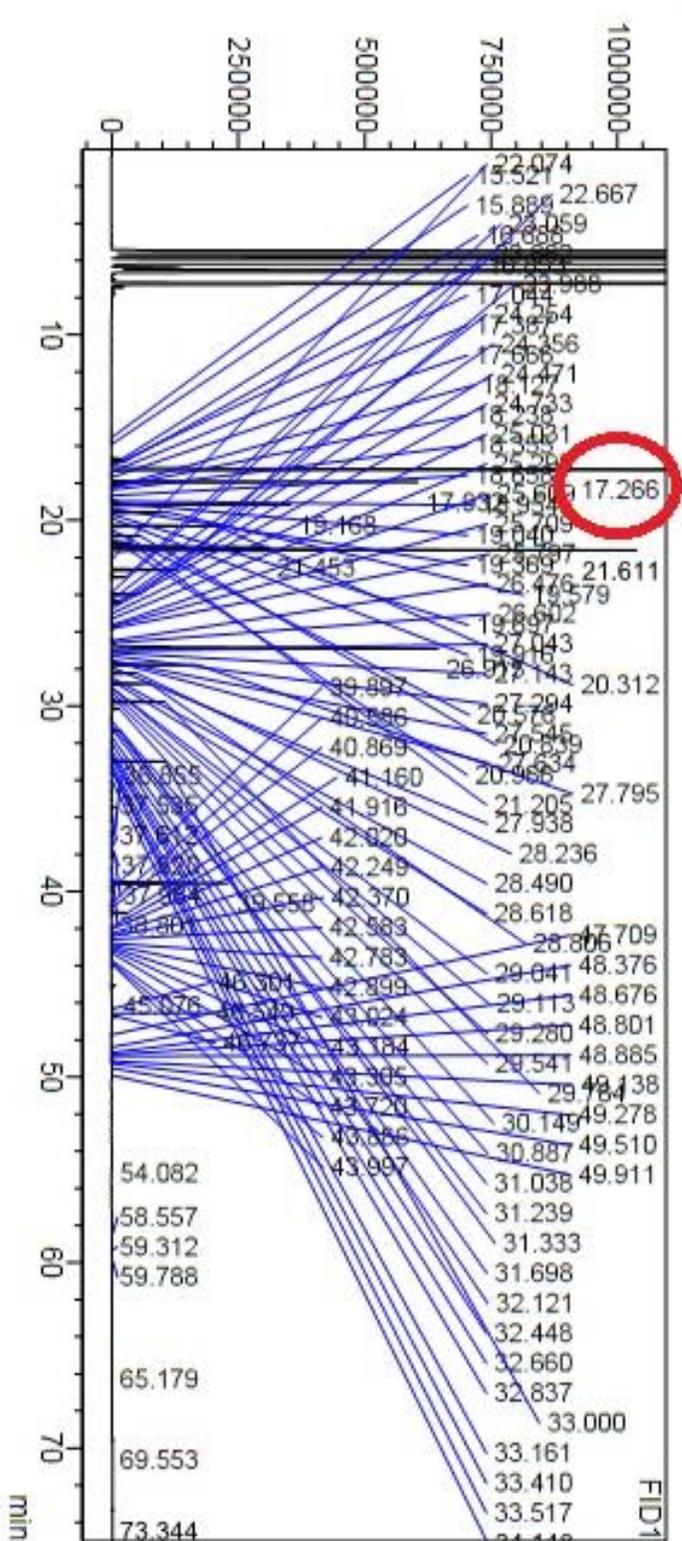


<Peak Table>

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	15.522	2704	978	0.000	ppm		RT:15.451
2	15.888	1840	438	0.000	ppm		RT:15.824
3	16.549	1091	336	0.000	ppm		RT:16.616
4	16.688	98710	33251	0.000	ppm	V	RT:16.616
5	16.855	126571	39742	0.000	ppm	V	RT:16.778
6	17.273	5620236	1325427	0.000	ppm		RT:17.128
7	17.948	2950252	826658	0.000	ppm		RT:17.822

Anexo 12. Cromatograma de segunda repetición del AE de romero mediante GC-FID, α -Pinoeno es el compuesto seleccionado.

<Chromatogram>
UV

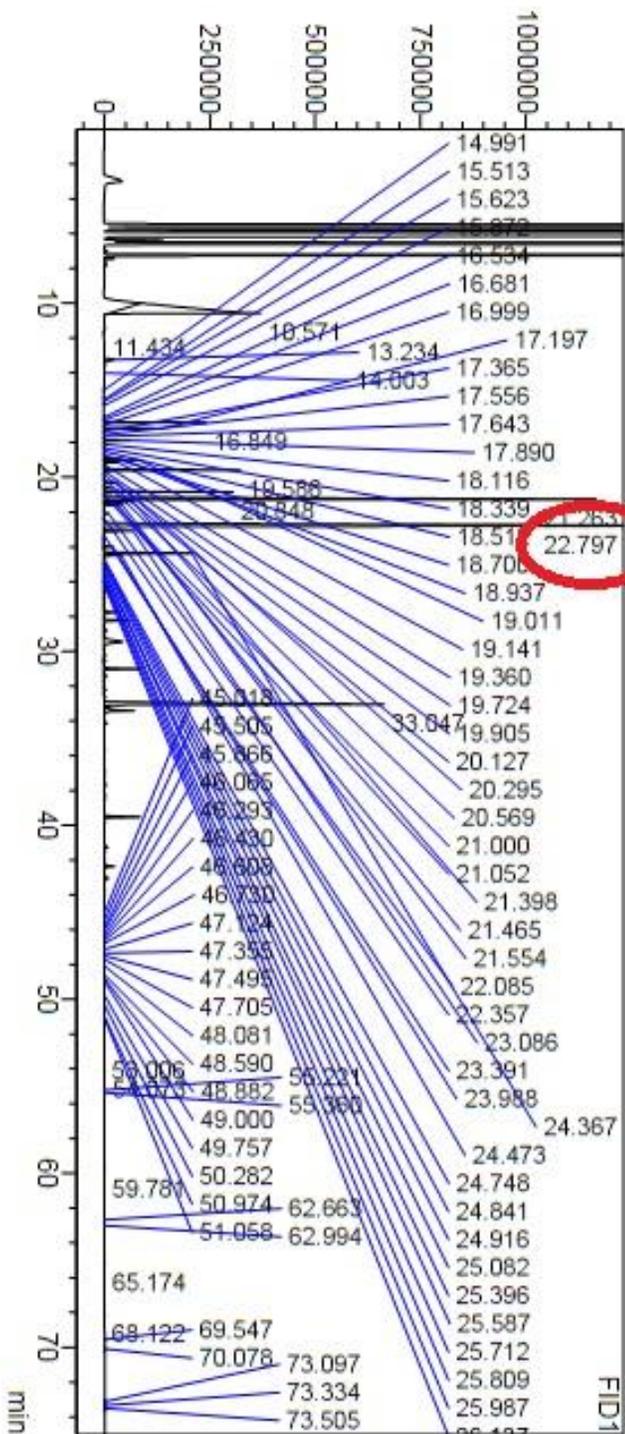


<Peak Table>

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	15.521	2582	932	0.000	ppm		RT:15.451
2	15.889	1529	339	0.000	ppm		RT:15.824
3	16.688	61835	20943	0.000	ppm	V	RT:16.616
4	16.853	77243	25068	0.000	ppm	V	RT:16.778
5	17.044	1032	356	0.000	ppm	V	RT:17.128
6	17.266	4916797	1204639	0.000	ppm	V	RT:17.128
7	17.387	1097	305	0.000	ppm	V	RT:17.578

Anexo 13. Cromatograma de tercera repetición del AE de romero mediante GC-FID, α -Pineno es el compuesto seleccionado.

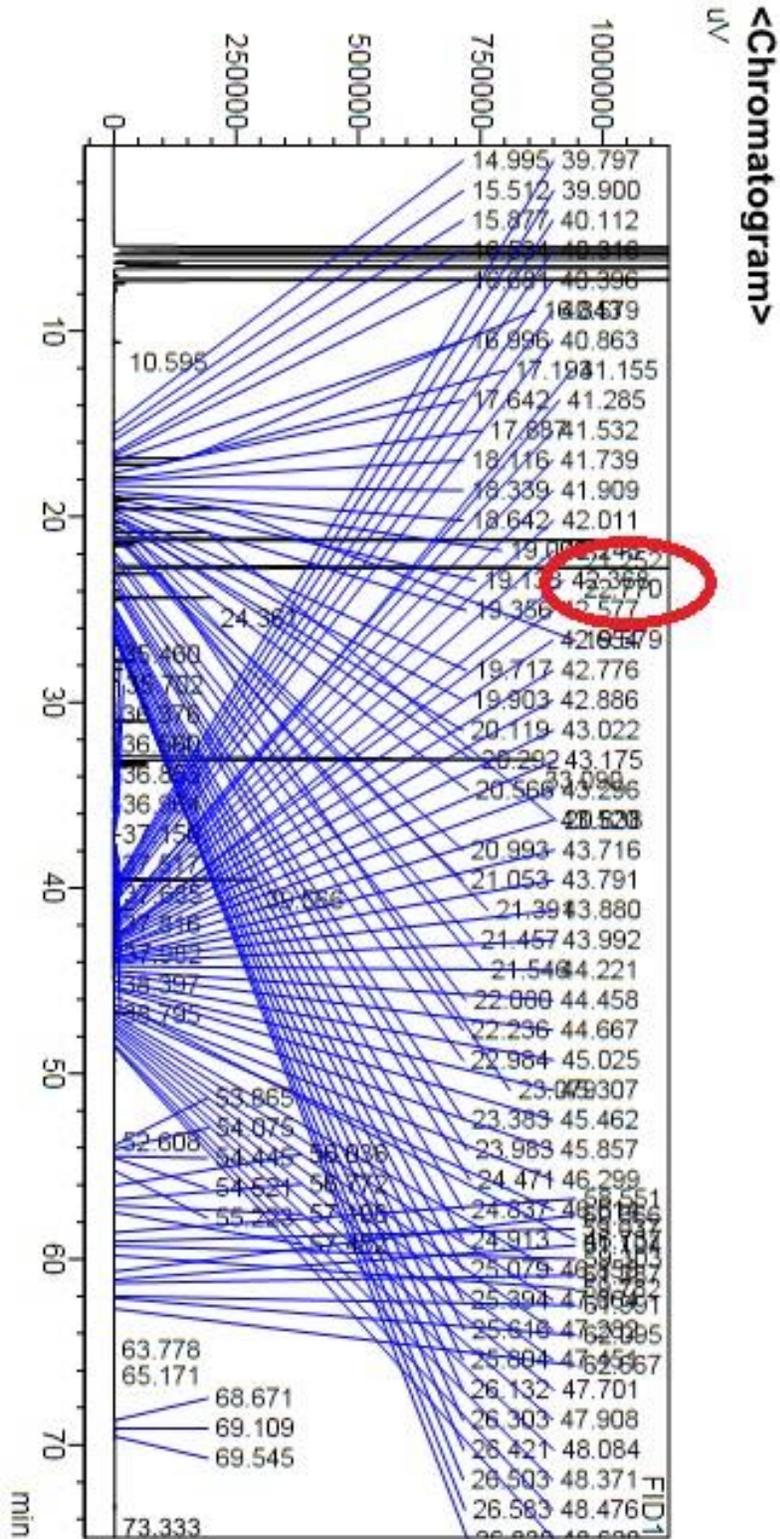
<Chromatogram>
UV



<Peak Table>
FID1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
33	21.000	8340	1678	0.000	ppm	V	RT:21.123
34	21.052	5443	1538	0.000	ppm	V	RT:21.123
35	21.263	5657498	1164026	0.000	ppm	V	RT:21.309
36	21.398	195124	67564	0.000	ppm	V	RT:21.372
37	21.465	80542	29085	0.000	ppm	V	RT:21.539
38	21.554	199246	41816	0.000	ppm	V	RT:21.539
39	22.085	51260	10854	0.000	ppm	SV	RT:22.007
40	22.357	1177	353	0.000	ppm	T	RT:22.655
41	22.797	10313136	1683024	0.000	ppm	SV	RT:22.655
42	23.086	204494	68079	0.000	ppm	IV	RT:23.005

Anexo 14. Cromatograma de segunda repetición del AE de tomillo mediante GC-FID, γ -Terpineno es el compuesto seleccionado.

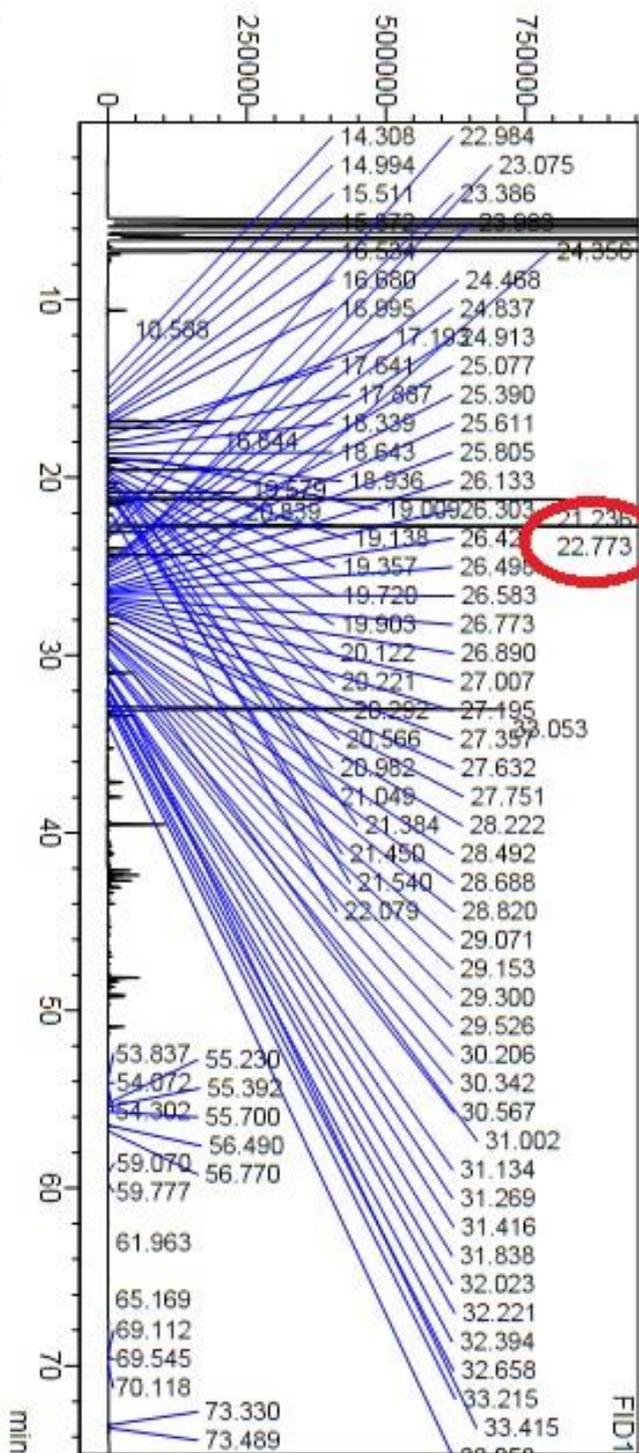


<Peak Table>

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
28	21.391	151683	51624	0.000	ppm	V	RT:21.372
29	21.457	55385	21052	0.000	ppm	V	RT:21.539
30	21.546	127710	41325	0.000	ppm	SV	RT:21.539
31	22.080	23298	6060	0.000	ppm		RT:22.007
32	22.236	1013	265	0.000	ppm	V	RT:22.007
33	22.770	7636952	1390633	0.000	ppm		RT:22.655
34	22.984	1471	505	0.000	ppm	V	RT:23.005

Anexo 15. Cromatograma de tercera repetición del AE de tomillo mediante GC-FID, γ -Terpineno es el compuesto seleccionado.

<Chromatogram>
UV



<Peak Table>

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
28	21.049	2267	589	0.000	ppm	V	RT:21.123
29	21.236	3755482	901402	0.000	ppm	V	RT:21.309
30	21.384	136061	44562	0.000	ppm	V	RT:21.372
31	21.450	45097	17496	0.000	ppm	V	RT:21.372
32	21.540	99954	31701	0.000	ppm	SV	RT:21.539
33	22.079	30334	7768	0.000	ppm	V	RT:22.007
34	22.773	8020790	1428312	0.000	ppm	V	RT:22.655
35	22.984	1149	408	0.000	ppm	V	RT:23.005
36	23.075	213945	70050	0.000	ppm	SV	RT:23.005

Anexo 16. Cromatograma de cuarta repetición del AE de tomillo mediante GC-FID, γ -Terpineno es el compuesto seleccionado.