

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE AGRONOMÍA



**“FORMULACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES PARA EL
CONTROL DE ENFERMEDADES AGRÍCOLAS”**

**TRABAJO DE SUFICIENCIA PROFESIONAL PARA OPTAR EL
TÍTULO DE INGENIERA AGRÓNOMA**

NADIR FIORELLA RAMIREZ QUISPE

LIMA – PERÚ

2021

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

**“FORMULACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES PARA EL
CONTROL DE ENFERMEDADES AGRÍCOLAS”**

Nadir Fiorella Ramirez Quispe

Trabajo de Suficiencia Profesional para optar el título de:

INGENIERA AGRÓNOMA

Sustentado y aprobado ante el siguiente jurado:

.....
Ph. D. Walter Apaza Tapia
PRESIDENTE

.....
Ing. Mg. Sc. Liliana Aragón Caballero
ASESORA

.....
Ing. Mg. Sc. Medali Huarhua Zaquinaula
MIEMBRO

.....
Ing. Mg. Sc. Isabel Montes Yarasca
MIEMBRO

LIMA – PERÚ

2021

DEDICATORIA

A Dios por su infinito amor y bondad.

A mis padres y hermana por su constante apoyo
en la realización de todos mis proyectos.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Agraria La Molina porque las enseñanzas otorgadas me han abierto muchas oportunidades y me han llevado a ser la persona de hoy en día.

Agradezco a los profesores por brindarme sus conocimientos y contribuir a mi formación profesional, por su orientación en la vida universitaria y por siempre forjarnos el espíritu de ser los mejores.

Agradezco a mis compañeros de estudios por compartir sus conocimientos conmigo, por ser un soporte durante la vida universitaria y, sobre todo, por brindar su amistad y cariño.

Un agradecimiento especial a la Ing. Liliana Aragón por su apoyo, consejos y orientación en la realización de este trabajo.

Finalmente, agradecer a la especialidad de Fitopatología y a mis amigos Cledy Ureta, Juan José Oviedo, José Soto, Walter Chacón y Carlos Huamán por las enseñanzas impartidas y contribuir en gran medida a mi desarrollo profesional.

PRESENTACIÓN

Los extractos vegetales son una alternativa para el control de enfermedades agrícolas, ya que el abanico de productos químicos utilizados para el control de dichos patógenos, es cada vez más reducido, debido a las restricciones impuestas por los mercados de destinos de los productos agrícolas. Estos extractos gozan de mayor aceptación, pues el mercado de productos biológicos está en crecimiento.

Sin embargo, un producto formulado a partir de un extracto vegetal para el control de enfermedades debe cumplir una serie de requisitos y debe seguir varios pasos para llegar al agricultor. Dos extractos vegetales obtenidos de la misma especie vegetal no tienen el mismo comportamiento ni eficacia, pues ésta varía en función de los componentes de aquel. Una especie vegetal tiene características especiales, en función del clima, suelo y manejo agronómico. Los aditivos de la formulación otorgan al producto un desempeño diferenciado, pues éstos pueden darle mayor humectación, mayor dispersión, menor volatilidad, mayor vida en almacén y, por tanto, mayor eficacia. Los formulados con extractos vegetales deben cumplir parámetros de calidad y controles de eficacia antes de salir al mercado.

El desarrollo de productos con extractos vegetales para controlar enfermedades agrícolas es una actividad que invita a la investigación y al análisis de los diversos datos de las investigaciones previas. Una vez elegido el extracto a trabajar se debe plantear el tipo de formulación considerando el costo de producción, las características del extracto como sustancia, la disponibilidad de los aditivos y las preferencias del cliente final. La formulación en sí misma presenta los desafíos de entender qué componentes y en qué cantidad deben incluirse en la formulación y su relación con el extracto vegetal que actúa como principio activo. Luego, la evaluación de la eficacia en laboratorio y en campo permite determinar si el producto es eficaz y en qué porcentaje, asimismo si es necesario un reajuste para mejorar la eficacia u otra característica. La finalidad es formular un extracto vegetal que sea el producto de referencia para el control de la enfermedad para el cual fue desarrollado.

ÍNDICE

I.	Introducción.....	1
II.	Objetivos.....	3
III.	Revisión de literatura.....	4
3.1	Extractos vegetales.....	4
3.1.1.	Principales familias botánicas de los extractos vegetales.....	6
3.1.1.1.	Asteraceae.....	6
3.1.1.2.	Lamiaceae.....	6
3.1.1.3.	Rutaceae.....	6
3.1.1.4.	Poaceae.....	7
3.1.2	Tipos de compuestos presentes en los extractos vegetales.....	7
3.1.2.1	Terpenos.....	7
3.1.2.2	Hidrocarburos.....	7
3.1.2.3	Alcoholes.....	8
3.1.2.4	Fenólicos.....	8
3.1.2.5	Éteres.....	8
3.1.2.6	Aldehídos.....	9
3.1.2.7	Cetonas.....	9
3.1.2.8	Ésteres.....	9
3.1.2.9	Lactonas.....	9
3.1.3	Propiedades antimicrobianas de los extractos vegetales frente a fitopatógenos.....	10
3.1.4	Factores que influyen en la composición de extractos vegetales.....	11
3.1.4.1	Factor genético.....	11
3.1.4.2	Condiciones medioambientales.....	12
3.1.4.3	Origen geográfico.....	12
3.1.4.4	Estado fenológico.....	13

3.1.4.5 Órgano vegetal.....	13
3.1.5 Mecanismos de acción.....	14
3.1.5.1 Disrupción de la membrana celular e inhibición de la formación de la pared celular.....	14
3.1.5.2 Disfunción de la mitocondria.....	15
3.1.5.3 Inhibición de las bombas de flujos.....	16
3.1.5.4 Producción de ROS.....	16
3.2. Patógenos cuyo control por extractos vegetales constituye una acción determinante	17
3.2.1. <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	17
3.2.2. <i>Botrytis cinerea</i>	19
3.2.3. <i>Cladosporium</i> sp.....	21
3.2.4. <i>Alternaria alternata</i>	23
3.3. Formulación de productos para el control de enfermedades.....	24
3.3.1 Tipo de formulaciones.....	25
3.3.1.1. Concentrado soluble.....	24
3.3.1.2. Concentrado emulsionable.....	25
3.3.1.3. Aceite en agua.....	25
IV. Desarrollo de la experiencia profesional.....	26
4.1. Situación encontrada.....	26
4.2. Contexto	27
4.3. Proceso de selección del Extracto vegetal potencial.....	30
4.4. Proceso de formulación del extracto vegetal.....	35
4.4.1. Formulación.....	35
4.4.2. Pruebas fisicoquímicas.....	37
4.5. Proceso de evaluación del Principio activo como futuro prospecto.....	38
4.5.1. Pruebas de eficacia	38
4.6. Problemática y desafíos.....	43
4.7. Competencias y habilidades desarrolladas.....	44
V. Conclusiones y recomendaciones.....	46
VI. Bibliografía.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de interrupción de la membrana celular e inhibición de la formación de la pared celular de hongos por los extractos vegetales.....	14
Figura 2. Ciclo de la enfermedad de <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	18
Figura 3. Ciclo de la enfermedad de <i>Botrytis cinerea</i> en fresa.....	20
Figura 4. Ciclo de la enfermedad de <i>Alternaria alternata</i> , agente causal de la mancha marrón de los cítricos.....	24
Figura 5. Flujograma del proceso de formulación de extractos vegetales hasta su llegada al consumidor final.....	32
Figura 6. Factores que intervienen en la formulación de productos para el control de enfermedades.....	36
Figura 7. Factores que intervienen en la formulación de productos para el control de enfermedades.....	42
Figura 8. Prueba in vitro de extractos de citronela y canela frente a <i>Botrytis cinerea</i>	43

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Resultados de la evaluación in vitro de los extractos de citronela y canela frente a <i>Botrytis cinerea</i>	42
---	----

I. INTRODUCCIÓN

El Perú es un país agrícola, actividad desarrollada desde los primeros asentamientos humanos en la costa y sierra, que tiene como cultivos tradicionales a la papa, maíz y las hortalizas (Salaverry, 2012). Esta agricultura fue por muchas décadas familiar o de pequeños agricultores; sin embargo, en las últimas décadas ha experimentado un crecimiento hacia una agricultura intensiva y con mayor rentabilidad con cultivos como espárrago, mango, cítricos, palto y uva, destinados a la exportación (Zegarra, 2019). Lo anterior se ve reflejado en el valor de las ventas de agroexportaciones, con 275 millones de dólares en 1995 y 5 353 millones de dólares en 2016 (Larrea, Ugaz y Flórez, 2018; Zegarra, 2019). Este crecimiento ha sido impulsado por la instalación de proyectos de irrigación a lo largo de la costa, la implementación de tratados de libre comercio con otros países, la inversión privada, la Ley de Promoción Agraria (Ley N°27360) y las características climáticas del Perú que encajan con las ventanas comerciales de exportación. En el 2018, el Perú se ubicó en el decimotercer lugar como agroexportador de frutas y hortalizas frescas, a diferencia del 2004, que se hallaba en el trigésimo octavo lugar, reafirmando así el crecimiento de sector. La industria agrícola peruana seguirá creciendo, pues las compañías locales e internacionales continúan invirtiendo, aún hay proyectos de irrigación por concretar, la apertura de mercados y la diversificación de cultivos (Ortiz, 2019).

La agricultura provee de alimentos a la población humana, pero ésta experimenta un rápido crecimiento y se necesita implementar mayores áreas para satisfacer la demanda mundial. Se estima que para el 2050 se necesitará aumentar en un 70 % la producción mundial de alimentos para una demanda de 9.8 millones de personas y garantizar la seguridad alimentaria (Naciones Unidas, 2017). Dentro de este marco, se hace necesario que los productores mejoren la eficiencia de los recursos utilizados en sus procesos para que tengan un menor impacto en el ambiente. Por otro lado, en la actualidad los consumidores exigen alimentos producidos de forma sostenible y que no sean perjudiciales para su salud, contribuyendo a que la industria tenga parámetros de producción y calidad más estrictos.

Desde mediados de 1940 el uso de plaguicidas de origen sintético ha ido en crecimiento, dejando de lado al control biológico; sin embargo, esto ha conllevado al surgimiento de otros problemas que afectan la salud humana y al ambiente. El uso frecuente de un plaguicida origina la aparición de resistencia en los patógenos, se observa que cuando una dosis no es útil, se incrementa y solo se consigue realizar una selección de la población resistente, hasta que el activo no tiene efecto. Los plaguicidas químicos no solo tienen efecto contra el patógeno objetivo, sino también contra la microbiota presente en el suelo o sobre la filosfera; existe contaminación del entorno, como fuentes de agua y aire, lo cual afecta a la población circundante; y finalmente, existe riesgo de la presencia de residuos de pesticidas en los alimentos destinados al consumo, lo que implica un grave riesgo a la salud humana.

En relación a la problemática expuesta, el uso del control biológico como alternativa a la aplicación de pesticidas de origen sintético, se erige como la mejor opción. El control biológico utiliza microorganismos, sus metabolitos secundarios y extractos de plantas como principios activos para el control de fitopatógenos. Se ha determinado que los extractos vegetales pueden inhibir el crecimiento de bacterias y hongos en el área de alimentos, medicina y agricultura. Los extractos de plantas contienen diversos compuestos que son responsables, en mayor o menor medida, de la acción biocida, y estos compuestos están en función a muchos factores como estado fenológico, lugar y parte de la planta de donde fue extraído, por lo cual se hace necesario evaluar el potencial de cada extracto y constatar su eficacia frente a un determinado fitopatógeno, antes de su aplicación en campo.

II. OBJETIVOS

3.1. Describir el proceso de formulación de un extracto vegetal con acción sobre fitopatógenos.

3.1.1. Describir el proceso de selección del extracto vegetal potencial.

3.1.2. Describir el proceso de formulación de un extracto vegetal potencial.

3.1.3 Describir el proceso de evaluación de un extracto vegetal como futuro prospecto.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

Las enfermedades agrícolas se presentan anualmente ocasionando pérdidas en los cultivos. Para minimizar o evitar estas pérdidas se utilizan sustancias que eliminan o reducen el daño de los patógenos asociados a estas enfermedades. Existen diversos métodos de control de estos fitopatógenos y uno de ellos es el control biológico que ha despertado el interés de los investigadores en los últimos años por la necesidad de reemplazar los pesticidas químicos. El control biológico de enfermedades agrícolas tiene como finalidad reducir el inóculo o la enfermedad producida por un fitopatógeno en su estado activo o latente mediante el uso de organismos, sus derivados y productos de plantas (Choudhary, Arun, Jha y Rai, 2015). El control biológico está dentro del control biorracional que se define como sustancias o procesos que cuando se utilizan no tienen un efecto dañino a los organismos no objetivo pero que tienen acción supresora o letal, modifican el comportamiento del organismo objetivo, aumentando el control. Este enfoque a diferencia del control biológico, no tiene en cuenta el origen de las sustancias, sino que prioriza las consecuencias de su aplicación en los organismos y el medio ambiente, pudiendo incluirse aquí los productos químicos de acción selectiva (Horowitz, Ellsworth y Ishaaya, 2009).

Los extractos vegetales son uno de los métodos de control biológico y biorracional que han despertado el interés de los investigadores, pues las plantas son un gran reservorio de compuestos que tienen propiedades antimicrobianas, siendo su principal ventaja que son biodegradable y no tóxicos a mamíferos (Choudhary, Arun, Jha y Rai, 2015).

3.1 Extractos vegetales

Los extractos vegetales son productos obtenidos de distintas partes de la planta, tallos, hojas, flores, corteza, etc. Éstos están compuestos por varias sustancias, de las cuales son los compuestos aromáticos, lo que tienen las propiedades antimicrobianas

y se hallan en la fracción oleosa o aceites esenciales. Estos aceites se extraen utilizando métodos como la destilación por arrastre de vapor, prendado en frío y extracción mediante solventes (Herman *et al.*, 2019; Tongnuanchan y Benjakul, 2014).

Los estudios acerca de la composición química de los extractos de plantas reportan que existen uno, dos o tres sustancias predominantes y que le dan las propiedades biológicas; sin embargo, las sustancias minoritarias influyen en el desempeño del extracto vegetal, dado que pueden tener un efecto sinérgico o antagónico con las mayoritarias (Bassolé y Juliani, 2012). Entre estas sustancias bioactivas reportadas como mayoritariamente presentes, están el limoneno, timol, cinnamaldehído, carvacrol y mentol (Shaaban, El-Ghorab, y Shibamoto, 2012), las cuales se producen dentro de los órganos vegetales como productos de su metabolismo secundario y su concentración depende de la parte de la planta, especie, estación, solventes utilizados o método de extracción (Hyltdgaard, Mygind y Meyer, 2012; Falleh, Ben Jeema, Saada y Ksouri, 2020; Ait-Ouazzou *et al.*, 2011). Además, estos compuestos se agrupan según su naturaleza química en terpenos, carbohidratos, compuestos fenólicos, éteres, cetonas, alcoholes y aldehídos (Tabassum y Vidyasagar, 2013).

Las propiedades antimicrobianas y antioxidantes de los extractos de plantas también son de gran interés en la industria de alimentos. La Administración de Alimentos y fármacos de Estados Unidos (FDA) ha catalogado a los aceites esenciales, componentes de los extractos de plantas, como seguros por lo que se incorpora en los alimentos para evitar la proliferación de microorganismos contaminantes (Llana-Ruiz-Cabello *et al.*, 2015; Manso, Pezo, Gómez-Lus y Nerín, 2014; Wrona, Bentayeb y Nerín, 2015; Yildirim *et al.*, 2018).

Otras industrias como la cosmética y cuidado personal, higiene y agricultura usan los extractos naturales como parte de sus productos, ya que se consideran seguros comparados con las sustancias químicas sintéticas (Shaaban *et al.*, 2012).

3.1.1 Principales familias botánicas de los extractos vegetales

3.1.1.1 Asteraceae

Son plantas herbáceas, arbustivas o leñosas, que contienen compuestos de lactona sesquiterpeno por lo cual es ampliamente estudiada, pues se relaciona con la dermatitis alérgica por contacto; sin embargo, también es estudiada por sus propiedades antifúngicas. El extracto de *Chrysanthemum coronarium* inhibe el crecimiento micelial en condiciones in vitro y su acción es por contacto (Alvarez-Castellanos, Bishop y Pascual, 2001). La especie *Artemisia santonicum* son potentes inhibidores del crecimiento de *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata* y *Rhizoctonia solani* (Kordali, Cakier, Mavi, Kili y Yildirim, 2005).

3.1.1.2 Lamiceae

Las especies de esta familia tienen importancia, gastronómica, médica y ornamental. La composición química de las plantas de esta familia es la razón de su gran potencia antimicrobiana. El extracto de *Lavandula stoechas* inhibe el crecimiento de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*, pero es menos efectivo frente a *Aspergillus flavus* (Argioni, Barra, Coroneo, Dessi y Cabras, 2006). Giordani *et al.*, (2004) realizó comparativo del efecto de algunas especies de esta familia, entre ellas *Lavandula angustifolia*, *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinales* y *Origanum vulgare* sobre la levadura *Candida albicans* y el mejor control lo tuvo *Thymus vulgaris*.

3.1.1.3 Rutaceae

A esta familia pertenecen los cítricos, que son de gran importancia agrícola en las zonas de clima tropical y subtropical. *Citrus sinensis* tiene efecto fungitóxico sobre patógenos postcosecha como *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Botryodiplodia theobromae* y *Cladosporium cladosporioides* (Sharma y Tripathi, 2006). El extracto de *Haplophyllum tuberculatum* inhibe el crecimiento de *Curvularia lunata* y *Fusarium oxysporum*, mas no tiene

efecto sobre las conidias (Al-Burtamani, Fatope, Marwah, Onifade y Al-Saidi, 2005).

3.1.1.4 Poaceae

La familia Poaceae está conformada por las gramíneas y están ampliamente distribuidas alrededor del mundo. Los extractos de plantas de esta familia presentan compuestos fungitóxicos como la especie *Cymbopogon citratus* que controla el desarrollo de *Cladosporium* sp., *Aspergillus niger* y *Mucor* sp. (Sun et al., 2007). El extracto de *C. citratus* o también llamado citronela es capaz de inhibir el 80 % de hongos que afectan la piel de los humanos (Prasad, Anandi, Balasubramanian y Pugalendi, 2004).

3.1.2 Tipos de compuestos presentes en los extractos vegetales

3.1.2.1 Terpenos

Los terpenos tienen una estructura en base a isopreno, una molécula formada por cinco carbonos unidos. Estos compuestos tienen como precursor al isopentenil difosfato (IPP), el cual forma una cadena según el tipo de terpeno a sintetizar para luego formar el esqueleto del compuesto y finalmente, éste sufre modificaciones secundarias mediante reacciones tipo redox para darle sus propiedades funcionales. Los principales compuestos de este grupo son los monoterpenos (C10) con dos isoprenos unidos como el limoneno, los sesquiterpenos (C15) por su parte contienen tres unidades de isopreno, como en caso de la zingiberina, y los terpenoides, que se diferencian por presentar oxígeno en su estructura (Bhavaniramya, Vishnupriya, Al-Aboody, Vijayakumar y Baskaran, 2019; Tisserand y Young, 2013).

3.1.2.2 Hidrocarburos

Los hidrocarburos son compuestos que están conformados por hidrógeno y carbono. Se clasifican en alifáticos, alcanos e hidrocarburos aromáticos. Los

alifáticos son cadenas carbonadas lineales sin un anillo aromático. Éstos se hallan en pequeñas cantidades, y son los responsables del olor característico como en el aceite de cítricos. Los alcanos son cadenas de carbonos unidos por enlace simple. Los hidrocarburos aromáticos tienen la característica de tener un anillo de benceno en su estructura y otorgan un olor agradable en las plantas (Naveed *et al.*, 2013).

3.1.2.3 Alcoholes

Químicamente los alcoholes presentan un grupo funcional hidroxilo y el nombre llevan la terminación “ol”. Los alcoholes monoterpénicos son antisépticos y el mentol es un ejemplo de este grupo (Tisserand y Young, 2013).

3.1.2.4 Fenólicos

Los fenoles son sustancias que químicamente se caracterizan por tener un anillo aromático, benceno, unido a uno o más grupos hidroxilo y una cola isopropil, por lo cual es débilmente ácido y muy reactivo. Tienen solubilidad en agua y por ello se encuentran en la vacuola celular (Tisserand and Young, 2013). En este grupo de compuesto se hallan los fenilpropanoides, flavonoides, antocianinas, flavones, flavonoles, taninos y quininas; y tienen funciones biológicas como pigmentos de flores y frutos, antioxidantes y antimicrobianos. Su actividad antioxidante se debe a sus propiedades redox, pues les permiten actuar con agentes reductores. Además, actúan como antimicrobianos, debido a que inhiben enzimas a través de la oxidación de compuestos. Eugenol, timol y carvacrol son fenoles que se encuentran comúnmente en los extractos vegetales de clavo, tomillo y orégano (Kothari, Shah, Gupta, Punjabi y Ranka, 2010).

3.1.2.5 Éteres

Son sustancias en la cual un átomo de oxígeno está ligado a dos carbonos en la cadena o puede estar en forma cíclica como parte de un anillo. Existen dos tipos

de éteres cíclicos, los óxidos y los epóxidos. El 1,8-cineole es un ejemplo de óxidos y metileugenol, de un epóxido (Tisserand y Young, 2013).

3.1.2.6 Aldehídos

Los aldehídos son compuestos que presentan un grupo funcional CHO, el cual se halla al final de la cadena y se encuentra como un carbono unido a un oxígeno por un doble enlace. Son alcoholes primarios parcialmente oxidados. Presentan olor ligeramente afrutado como el comino aldehído (Tisserand y Young, 2013).

3.1.2.7 Cetonas

Son similares a los aldehídos, pues tienen un grupo carbonilo (C=O) y se sintetizan a partir de alcoholes secundarios. Comúnmente se utilizan para tratar enfermedades respiratorias como gripe, tos y asma. Estas sustancias se hallan en las plantas de romero, cedro rojo y salvia; el carvone es una de las cetonas más conocidas (Nazzaro *et al.*, 2013; Tisserand y Young, 2013).

3.1.2.8 Ésteres

Son sustancias que se forman producto de una reacción de esterificación que se produce por la unión de ácido y un alcohol. Estos compuestos presentan olores afrutados como el acetato de linalilo que se encuentra en lavanda, bergamota y salvia, pero hay otros que, además, presentan propiedades biocidas como los que están en el extracto de geranio (Arumugam, Swamy y Sinniah, 2016; Lang y Buchbauer, 2012).

3.1.2.9 Lactonas

Son ésteres cíclicos derivados de ácido láctico, en su estructura tienen un átomo de oxígeno unido a un átomo de carbono mediante doble enlace, este carbono está enlazado a otro oxígeno que es parte de un anillo aromático. Butilftalida y sedanolida son lactonas presentes en apio (Marongiu *et al.*, 2013), y otra lactona

es la cumarina, la cual tiene notas especiadas (Tisserand y Young, 2013). Los nombres de las sustancias del grupo de las lactonas, usualmente terminan en “lactona” o “ina” (Tisserand y Young, 2013).

3.1.3 Propiedades antimicrobianas de los extractos vegetales frente a fitopatógenos

Estos compuestos bioactivos de origen vegetal han despertado gran interés en el campo de la medicina y farmacología, principalmente debido a que las bacterias patógenas han adquirido resistencia a varios antibióticos, lo cual hace difícil el tratamiento de las enfermedades en humanos. De la misma manera en el campo de la agricultura se observa resistencia de los fitopatógenos a los pesticidas tradicionales. De allí, que los constituyentes de tales extractos surgen como una alternativa para tratar las infecciones ocasionadas por estas bacterias multirresistentes (Raut y Karuppayil, 2004; Tariq *et al.*, 2019). Menta (*Mentha piperita*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) tienen actividad antimicrobiana contra bacterias gram negativa y gram positivas (Reichling, 2018). Murbach, Nunes, da Silva y Fernandes (2013) estudiaron el efecto inhibitorio contra bacterias y determinaron que *Staphylococcus aureus* fue susceptible a *Piper nigrum* y *Melaleuca alternifolia*, *Cinnamomum cassia* y *Syzygium aromaticum* contra *Escherichia coli*, y *S. aromaticum* contra *Pseudomonas aeruginosa*. Por otro lado, también hay estudios sobre otras propiedades farmacológicas, por ejemplo, Nieto (2017) realizó un estudio con algunas especies de la familia Lamiaceae como *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula angustifolia*, *Mentha haplocalyx*, y halló que tienen propiedades antitumorales, antiinflamatorias, antimicrobianas y antioxidantes.

Las propiedades antimicrobianas de las plantas aromáticas frente a patógenos que afectan la salud humana, llevaron al estudio de estas propiedades frente a patógenos de cultivos, pues era muy probable que los buenos resultados se replicaran en el área agrícola. Es así que, se ha evaluado el efecto fungitóxico de los metabolitos secundarios de plantas, como carvacrol y timol, los cuales inhiben fuertemente el crecimiento de *Botrytis cinerea*, ambos presentes en *Origanum vulgare* (Bouchra, Achouri, Idrissi y Hmamouchi, 2003). Estos compuestos también están presentes en

Lavandula latifolia, *L. angustifolia*, *Thymus vulgaris* y *Thymus serpyllum* por lo que son capaces de inhibir el crecimiento de *Fusarium oxysporum* (Tullio *et al.*, 2007).

Syzygium aromaticum, una especie de la familia Mirtaceae, tiene actividad antimicrobiana sobre el micelio de *Botrytis cinerea* (Sirirat, Wimolpun y Sanit, 2009). También, inhiben parcialmente el crecimiento de *Aspergillus fumigatus* y *A. acculeatus* (Lambert, Skandamis, Coote y Nychas, 2001). Se ha reportado el fuerte efecto de control de *Tagetes patula* sobre *Botrytis cinerea* y *Penicillium digitatum*, pues inhibe completamente su crecimiento (Romagnoli *et al.*, 2005).

El extracto de *Punica granatum* tiene efecto de control de algunos fitopatógenos como *Penicillium citrinum* (roya de los cítricos) y *Rhizopus oryzae* (afecta a mango y piña) (Dahham, Ali, Tabassum y Khan, 2010). La canela china (*Cinnamomum cassia*) tiene efecto significativo de control sobre los patógenos fúngicos como *Botrytis cinerea*, *Fusarium moniliforme* y *Phyllosticta caricae* (Lee, Chang, Su, Huang y Jang, 2007). *Ocimum gratissimum* tiene efecto de inhibir la germinación de conidias y el micelio de *Botryodiplodia theobromae*, *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* (Okigbo y Ogbonnaya, 2006).

3.1.4 Factores que influyen en la composición de extractos vegetales

La composición de los extractos vegetales es variable, inclusive dentro de la misma especie vegetal, debido a factores propios de la estructura vegetal y a factores externos.

3.1.4.1 Factor genético

La composición química de una planta está determinada por su genética, la cual permanece constante a través del tiempo; sin embargo, puede haber diferencias en el contenido de los metabolitos secundarios, dando como

resultados varios quimiotipos de una misma especie vegetal (Sadeghi *et al.*, 2015).

Un quimiotipo está definido por el metabolito secundario producido en mayor cantidad por una planta, como consecuencia de factores externos e internos del organismo y que no afectan sus características morfológicas. El tomillo (*Thymus vulgaris*) tiene siete quimiotipos en función de la mayor presencia de timol, carvacrol, linalool, geraniol, tujanol, alfa terpineol o eucaliptol, pero que en el aspecto morfológico son iguales (Keefover-Ring *et al.*, 2009).

Es preciso señalar que, si bien un quimiotipo está definido por el principal metabolito secundario, existen otros componentes en los extractos vegetales que van a influenciar en el impacto que dicho extracto tendrá en los patógenos (Keefover-Ring *et al.*, 2009).

3.1.4.2 Condiciones medioambientales

La composición de los extractos vegetales influenciada por el entorno determina la existencia de “ecotipos”. Las condiciones medioambientales que influyen en las características son las condiciones climáticas (temperatura, fotoperiodo y humedad) y las condiciones de cultivo (tipo de suelo, densidad de cultivo, fertilización y riego) (Rioba, Itulya, Saidi, Dudai y Bernstein, 2015; Cavar Zeljković, Šolić y Maksimović, 2015; Pirbalouti, Hossayni y Shirmandi, 2013).

Un estudio determinó que los monoterpenos 1,8 cineole, alfa y beta tujhone, y camfor, presentes en las hojas jóvenes de *Salvia officinalis* dependen de la temporada en la que se realiza el cultivo (Grausgruber-Groger, Schmiderer, Steinborn, y Novak, 2012). También se observó que la cantidad de monoterpenos oxigenados y sesquiterpenos oxigenados en los extractos de

Ocimum basilicum fueron de 80.9 % y disminuyeron a 74.3 %, en invierno (Gazim *et al*, 2010).

3.1.4.3 Origen geográfico

La zona geográfica de cultivo de la planta está relacionada con la composición de los extractos vegetales, pues la radiación, así como la altitud inducen a diferencia en la cantidad y calidad de dichos componentes (Ćavar Zeljkovic', Šolić y Maksimović, 2015).

3.1.4.4 Estado Fenológico

La composición de los extractos vegetales está influenciada por el estado de crecimiento de las plantas. El estado de crecimiento o estado fenológico de una planta determina las modificaciones en su metabolismo secundario y en su actividad enzimática, razón por la cual la producción de un compuesto puede activarse, incrementarse, disminuir o detenerse dependiendo según la etapa de crecimiento en la que se encuentre el cultivo (Ghani, Saharkhiz, Hassanzadeh y Msaada, 2009).

Estudios realizados en *Tagetes minuta* y *Ocimum cyminum* dieron como resultado diferencias en la composición de sus extractos a diferentes etapas fenológicas (Moghaddam, Pirbalouti, Mehdizadeh y Pirmoradi, 2015b; Moghaddam, Miran, Pirbalouti, Mehdizadeh y Ghaderi, 2015a).

Por tanto, es importante relacionar la etapa de crecimiento del cultivo con la mayor producción de compuestos químicos y la cosecha. En el caso de *Thymus capitatus*, se observó que después de la floración, es la mejor etapa para cosechar y obtener la mayor cantidad de compuestos fenólicos como carvacrol, γ -terpinene y p-cymene (Casiglia, Bruno, Scandolera, Senatore y Senatore, 2015).

3.1.4.5 Órgano vegetal

Los metabolitos secundarios están codificados por genes que determinan su síntesis y estos genes, en algunos casos, se expresan solo en algunos órganos de la planta. En estos órganos se sintetizan estos compuestos porque tiene la ruta metabólica de terpenoides (Niu *et al.*, 2015). Un ejemplo son los frutos de culantro, en el que se produce la mayor cantidad de aceite esencial (Galata, Sarker y Mahmoud, 2014).

3.1.5 Mecanismos de acción

3.1.5.1 Disrupción de la membrana celular e inhibición de la formación de la pared celular

La naturaleza lipofílica de la mayoría de los compuestos presentes en los extractos vegetales y de los aceites esenciales, que es la fracción donde se hallan estos principios activos, facilita su ingreso a la célula causando la ruptura de la membrana plasmática y la salida de pérdida de iones, colapso de la bomba de protones y la pérdida de ATP, lo que causa que haya un vaciado del contenido celular (Figura 1) (Nazzaro, Fratiani, De Martino, Coppola y De Feo, 2013). El extracto de *Litsea cubeba*, específicamente el metabolito secundario citral, inhibe la biosíntesis del ergosterol en *Candida albicans*, lo cual resulta mortal debido a que el ergosterol es esencial para los hongos, pues es su fuente de esteroides (Rajput y karuppayil, 2013). La fluidez y permeabilidad de la membrana plasmática de esta levadura se ve afectada por el extracto de *Melaleuca alternifolia* (Hammer, Carson y Riley, 2004). La alteración de la cantidad de ergosterol en la membrana por *Coriandrum sativum* altera el metabolismo de la célula, lo que afecta la reproducción y la patogenicidad de los hongos (Freires de Almeida *et al.*, 2014).

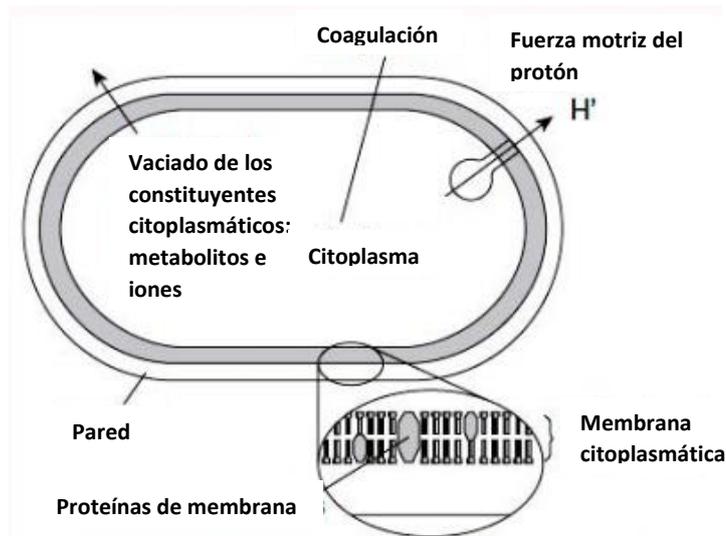


Figura 1. Mecanismo de ruptura de la membrana celular e inhibición de la formación de la pared celular de hongos por los extractos vegetales. Adaptado de Sadaka *et al.* (2014).

La pared celular está conformada por polisacáridos como glucano, quitina y mananos, que son esenciales para la sobrevivencia de los hongos (Wu, Cheng, Sun y Lou, 2008). Algunos componentes de los extractos vegetales, como el Trans-anethole del anís, inhiben la síntesis de quitina afectando la formación de septas y de yemas como consecuencia de la alteración de la división celular (Yutani *et al.*, 2011). El limonene presente en los cítricos, causa la pérdida del contenido citoplasmático de las hifas, inhibiendo el crecimiento de *Aspergillus niger* (Gogoi, Baruah y Nath, 2008). El citral presente en *Litsea cubeba* daña la pared celular al inhibir la síntesis de peptidoglucanos, inhibir parcialmente la síntesis de ADN, ARN y proteínas de *Alternaria alternata*, *Fusarium monoliforme* y *F. solani* (Freires de Almeida *et al.*, 2014).

Nazzaro *et al.*, (2013) indican que, la estructura de la pared celular de bacterias estaría relacionada con el grado de resistencia a los extractos vegetales. Los compuestos no entran tan rápidamente al interior de las bacterias gram negativas comparado con las gram positivas, y esto se debe a que éstas poseen doble membrana. Es importante señalar que la mayoría de las bacterias fitopatógenas son gram negativas y es por ello que su control es difícil. Otro factor relacionado

con la resistencia a los antimicrobianos naturales es la capacidad de partición de los lípidos de la membrana.

La inhibición de la producción de amilasa y proteasa, lo cual detiene la producción de toxinas, el flujo de electrones y, por consiguiente, la coagulación del citoplasma, es otro de los posibles mecanismos de antimicrobianos de los extractos vegetales (Bakkali, Averbeck, Averbeck y Idaomar, 2008).

3.1.5.2 Disfunción de la Mitocondria de los hongos

Algunos extractos vegetales afectan el funcionamiento de la mitocondria, a través de la inhibición de las enzimas que intervienen en la síntesis del ATP como en el caso del extracto de *Anethum graveolens*. También se ha postulado que los extractos inducen la producción de ROS como consecuencia de la disminución del contenido de la mitocondria. Otros como el alcanfor incrementan las mutaciones, ocasionando daños al organelo (Haque *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2013; Bakkali *et al.*, 2006).

3.1.5.3 Inhibición de bombas eflujo

La enzima H⁺-ATPasa tiene una función importante en la célula fúngica como reguladora del gradiente electroquímico de protones a través de la membrana celular, regula el pH interno de la célula y su crecimiento. Otro aspecto de esta enzima es su rol en la patogenicidad de los hongos, ya que influye en la acidificación del medio y consumo de nutrientes. El timol y eugenol ejercen su actividad fungicida al inhibir a la enzima H⁺-ATPasa, lo cual trae como consecuencia la acidificación del citoplasma y posterior muerte de la célula (Haque *et al.*, 2016; Ahmad, Khan y Manzoor, 2013).

3.1.5.4 Producción de ROS

Las bacterias sintetizan óxido nítrico para incrementar su resistencia a antibióticos y los hongos también producen este óxido para proteger el micelio del estrés oxidativo causado por el calor. Se ha determinado que diferentes antibióticos destinados a eliminar bacterias, ocasionan la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), pues estarían relacionadas con la muerte celular. Los extractos vegetales tienen efecto antioxidante, ya que se observó que tiene la capacidad de reducir el nivel de óxido nítrico, y disminuir la síntesis de peróxido de hidrógeno (Kong, Huang, Chen, Zou y Zhang, 2012; Kohanski, Dwyer, Hayete, Lawrence y Collins, 2007; Cotoras, Castro, Vivanco, Meo y Mendoza, 2013). Un ejemplo es el timol presente en el extracto de orégano y tomillo, que elimina la enfermedad ocasionada por *Aspergillus flavus* mediante la generación de ROS y óxido nítrico en las esporas (Shen, Zhou, Li, hu y Mo, 2016).

3.2 Patógenos cuyo control por extractos vegetales constituye una acción determinante

3.2.1 *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl.

Lasiodiplodia theobromae (Pat.) Griffon & Maubl. es un patógeno oportunista que se encuentra en zonas tropicales y subtropicales y ocasiona síntomas de muerte regresiva, pudrición de raíces y pudrición de frutos (Hashem y Alamri, 2009; Abeywickrama, Wijerathna, Rajapaksha, Sarananda y Kannangara, 2012). El género *Lasiodiplodia* causa enfermedades en cultivos tropicales como palto, papaya, chirimoya, cacao, durazno y caña de azúcar (Picos-Muñoz, García-Estrada, León-Félix, Sañido-Barajas y Allende-Molar, 2019).

Este patógeno es favorecido por los climas cálidos y húmedos, con temperaturas medias de 24 °C (Rodríguez, 2010). En climas tropicales, la alta pluviosidad del verano, la temperatura y la humedad del riego favorecen la esporulación y dispersión de conidias de *L. theobromae* (Muhammad, 2009). Otros factores que

favorecen la infección de este hongo en árboles frutales es el estrés hídrico, suelos con poca aireación, suelos salinos, nutrición deficiente, exceso de riego, heridas a causa de la poda, alta humedad (Agustí, 2003).

Los síntomas que producen de manera externa incluyen hojas con bordes necróticos, acortamiento de entrenudos, brotes débiles, y a medida que avanza la infección se observa una afección general que lleva a la muerte de la planta. Internamente, se observa con necrosis de tejido parenquimático de manera discontinua en ramas y tallos (Oliveira et al., 2004). Valle-De la Paz *et al.* (2019) describieron los síntomas que produce *Lasiodiplodia theobromae* en lima, los que incluyen rajaduras de tallo, gomosis, canchales al pie de planta, follaje amarillento, muerte regresiva de ramas y presencia de picnidios en las ramas.

El hongo ingresa de forma directa e indirecta, mediante heridas, siendo la última la que ocasiona un desarrollo más rápido de la colonización. Las esporulaciones de picnidias que se encuentran en restos de fruta, restos de poda en el campo y plantas enfermas constituyen el inóculo primario. Estas conidias se esparcen a través del viento a todo el campo e inician la invasión del tejido necrótico de una planta. La infección puede permanecer latente y cuando las condiciones son favorables continúan su desarrollo. La infección de frutos producida por *L. theobromae* se origina en el pedúnculo antes de la cosecha, permanece latente, y se evidencia cuando el fruto madura después de la cosecha. Inicialmente el fruto es firme, pero a medida que progresa la enfermedad, se torna blando (Figura 2). El estado fisiológico del fruto y la velocidad de crecimiento del patógeno influyen en la rapidez del desarrollo de la enfermedad (Zhang, 2014).



Figura 2. Ciclo de la enfermedad de *Lasiodiplodia theobromae* (Rangel, 2016).

Los fungicidas recomendados para el control de este patógeno son tiofanate metil, benomil, carbendazina, tiabendazol y los que contienen cobre de manera rotativa para evitar la aparición de aislamientos resistentes a fungicidas (Tamayo, 2007). A nivel in vitro se ha determinado que los fungicidas procloraz, tebuconazol, piraclostrobin+boscalid y ciprodinil+fludioxonil inhiben al micelio de este patógeno (Tovar et al., 2013). Los productos a base de cobre como oxiclórico de cobre se aplican de manera preventiva y se recomiendan, también, aplicarlos a las heridas de las podas (Varela, Orozco, Torres y Silva, 2013, Canales 2007).

3.2.2 *Botrytis cinerea* Pers.

Botrytis cinerea Pers. es un hongo filamentoso que ataca a muchos cultivos, en varios estados fenológicos de las plantas, lo cual ocasiona muchas pérdidas económicas alrededor del mundo (Dewey y Grant-Downton, 2016; Latorre, ElfarK y Ferrada, 2015).

Es un patógeno necrótrofo, pues infecta tejidos senescentes o dañados, llevándolos a la muerte mediante la liberación de toxinas, a diferencia de las infecciones en tejidos inmaduros, donde el daño es reducido y se forma una infección quiescente, la cual es la infección primaria (Dewey y Grant-Downton, 2016). Las conidias son el inóculo primario durante la floración y la madurez de la fruta, se diseminan a través del aire y se halla en altas cantidades en días húmedos y cálidos (Mundy *et al.*, 2012; Leyronas y Nicot, 2013). Se presenta en climas húmedos y templados (Acuña, 2010). El micelio y los esclerotes pueden sobrevivir hospedantes, residuos de plantas, cultivos vecinos o malezas, también sobre restos de frutos y peciolas (Mundy, Agnew y Wood, 2012).

Las conidias requieren de humedad libre y temperatura adecuada, 20-25°C, para iniciar el proceso de germinación, normalmente ocurre luego de 3 horas. Luego de depositarse sobre la superficie del hospedante, éstas emiten un tubo germinativo, se adhieren con la ayuda del apresorio, el cual se forma al final del tubo germinativo, y penetran el tejido mediante una hifa de penetración y la liberación de enzimas; además puede infectar a través de heridas o aberturas naturales como estomas y lenticelas (Figura 3) (Ciliberti, Fermand, Languasco y Rossi, 2015).

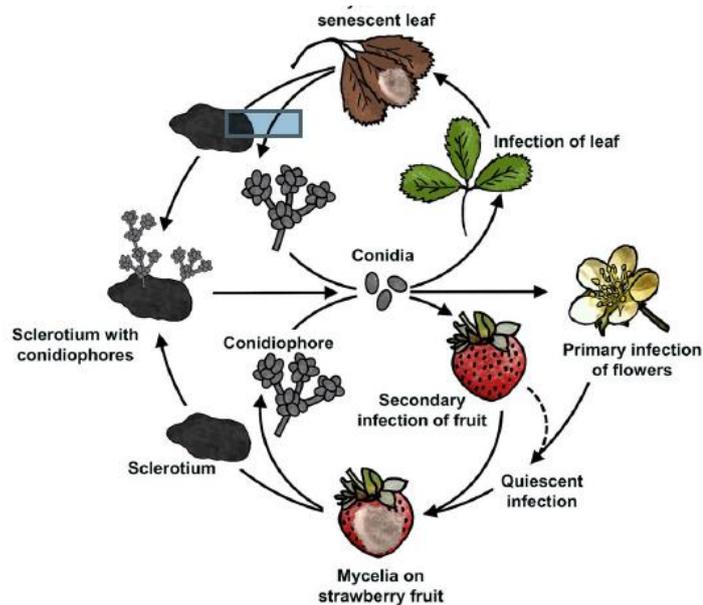


Figura 3. Ciclo de la enfermedad de *Botrytis cinerea* en fresa (Petrasch, Knapp, Van Kan y Blanco-Ulate, 2019).

El control químico es una importante herramienta para la protección de los cultivos de *B. cinerea*. Se realizan aplicaciones foliares para reducir las tasas de infección; sin embargo, cada vez se restringe el uso de fungicidas debido a problemas ambientales y de salud humana (La Torre y Torres, 2012). Actualmente se utilizan activos como fudioxonil, ciprodinil, pirimetanil, boscalid, fenhexamid, fluazinam, azoxystrobin, tebuconazole e iprodione contra *B. cinerea* (Latorre, Elfar y Ferrada, 2015). Es debido a ello, que se considera a este patógeno como de alto riesgo de resistencia, ya que se realizan un alto número de aplicaciones, produce abundantes conidias como inóculo primario, tiene un amplio rango de hospedantes, eficiente diseminación y alto grado de variabilidad genética. Se ha asociado la resistencia a fungicidas con el uso de productos con el mismo modo de acción de manera reiterada en una campaña y para evitarla, se sugiere alternar las aplicaciones con productos de distinto modo de acción (Latorre y Torres, 2012, Cosseboom, Ivors, Schnabel, Bryson y Holmes, 2019).

A nivel postcosecha, *B. cinerea* causa muchas pérdidas, debido a que el inóculo ingresa en campo y la infección se manifiesta durante el trayecto a su destino. Es así que, con la finalidad de evitar estas pérdidas, se realizan aplicaciones antes de cosecha para proteger a la fruta durante su almacenamiento y transporte, además se utilizan atmósferas controladas, con baja cantidad de oxígeno y alta cantidad de dióxido de carbono para reducir el metabolismo de la fruta y la proliferación de hongos (Smilanick et al., 2010; Feliziani y Romanazzi, 2016).

3.2.3 *Cladosporium* sp.

El género *Cladosporium* está distribuido en diversos ambientes a nivel mundial. *Cladosporium* se halla presente en el suelo y en tejido vegetal, donde se hallan como saprófitos o patógenos secundarios, pues ingresa luego de que otro patógeno inicia la infección en un determinado hospedante (Bensch, Braun, Goenenwald y Crous, 2012). También pueden estar presentes en las plantas como endófitos y al sufrir un

período de estrés por falta de agua o deficiencia nutricional, pasa a comportarse como patógeno (Zhang *et al.*, 2010).

Este patógeno afecta flores, ocasionando necrosis de la flor completa y sobre ella se presenta un micelio de color gris o verde con abundante esporulación, los cuales son dispersados por el viento (Nam, Park, Kim, Kim y Kim, 2015). En frutos de mandarina causa manchas negras pequeñas durante el transporte, a destino en empaques que favorecen la humedad, cuyo micelio se expande sobre la piel del fruto y finalmente se observan manchas de mayor tamaño similares al hollín, cabe señalar que las zonas adyacentes al micelio se tornan blancas (Tashiro, Noguchi, Ide y Kuchiki, 2013). Los síntomas que se observan en hojas de tomate afectadas por este patógeno, se observa lesiones amarillas de forma irregular en zona adaxial y esporulaciones grisáceas debajo de las lesiones (Robles-Yerena *et al.*, 2019). En bayas de uva causa pudrición superficial con presencia de micelio esporulante de color verde olivo (Briceño y Latorre, 2008). Briceño y Latorre (2008) determinaron que *Cladosporium cladosporioides* y *C. fulvum* crecen en un rango de temperatura de 0-30 °C y que su temperatura óptima de crecimiento es 20 °C.

Ingresa a la planta a través de heridas, penetración directa o estomas, mediante el uso de estructuras como los apresorios, que permiten su adherencia. Utilizan un complejo enzimático para penetrar el tejido, entre las que encuentran hifrofobinas y proteínas quinazas para la germinación de conidias y formación de apresorio; además utilizan celulasas, pectinasas, peptidasas, entre otras, para degradar la pared celular (Malinovsky, Fangel, y Willats, 2014; Yew, Chan, Ngeow y Toh, 2016).

Mengal *et al.* (2019) evaluaron en condiciones *in vitro* la inhibición del micelio de *Cladosporium cladosporioides*, a la dosis de 200 ppm, y los resultados muestran que propineb inhibe 30.5 mm; fosetil de aluminio, 31.5 mm; Iprovalicarb+Propineb, 30.5 mm; Tiofanate metil, 33 mm y Metiram+Piraclostrobin, 36.5 mm. El crecimiento máximo del testigo es 90 mm. Por otro lado, Serey, Torres y Latorre (2007) evaluaron

el desempeño de Hexaconazole (94.44 %), Propiconazole (81.53 %), Carbendazim (84.93 %), Difenoconazole (75.97 %) y Tiofanate metil (51.21 %) frente a *Cladosporium*.

3.2.4 *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl.

El género *Alternaria* presenta especies patógenas y saprófitas de cultivos agrícolas. Estas especies se hallan distribuidas a nivel mundial y se aíslan de diversas fuentes como suelo, polvo materia orgánica y de plantas (Oviedo, 2012).

Estas especies ocasionan enfermedades foliares, causando manchas necróticas mediante la producción de toxinas, que reducen el potencial fotosintético. Al afectar la parte foliar, no suelen degradar los haces conductores, ni interferir con el transporte de nutrientes y agua. Las esporas se diseminan hacia tejidos sanos a través del viento y son las áreas debilitadas de la planta, las más susceptibles a la infección por *Alternaria* spp. El micelio puede permanecer latente en restos de plantas esparcidos por el campo hasta que se instale el hospedante. Otra característica importante, es la producción de metabolitos secundarios, que sirven para ayudar al proceso de patogénesis, en la calidad y en la industria alimentaria (Pavón Moreno, 2012).

A nivel postcosecha, *Alternaria* spp, causa pudrición de frutos; sin embargo, existen alternativas para evitar estos daños, como las películas a base de quitosano que recubren el fruto, formando una barrera mecánica que lo protege de las infecciones de levaduras, hongos y bacterias. El quitosano se adhiere a la plasmamembrana de los hongos, favoreciendo las interacciones entre las cargas positivas de aquel y las negativas de los fosfolípidos de éste, lo cual favorece su ingreso al citoplasma, ocasiona la pérdida de la homeostasis de la célula, y finalmente, hay una pérdida de cationes, lo que lleva a la muerte celular (Ramos-García *et al.*, 2010).

El ciclo de *Alternaria alternata* se inicia con la infección de hojas de cítricos. Las conidias, producidas sobre las manchas necróticas, se liberan favorecidas por la lluvia o el rocío de la mañana, y se diseminan vía aérea. Una vez que llegan a la superficie de hojas o frutos, germinan e inician la producción de la toxina, en presencia de humedad, finalmente el patógeno ingresa al tejido vegetal por el estoma o de forma directa (Figura 4) (Akimitsu, Peever y Timer, 2003).

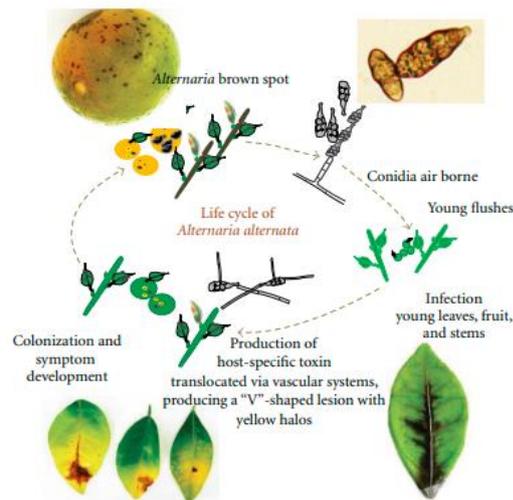


Figura 4. Ciclo de la enfermedad de *Alternaria alternata*, agente causal de la mancha marrón de los cítricos (Chung, 2012).

3.3 Formulación de productos para el control de enfermedades

3.3.1 Tipo de formulaciones

3.3.1.1 Concentrado soluble (SL)

Los concentrados solubles contienen ingredientes activos que son solubles en agua, tienen partículas en suspensión y para que éstos humecten la superficie del follaje se agregan surfactantes. El solvente de la formulación es el agua o sustancias solubles en agua y tienen una apariencia clara. Estas formulaciones son muy estables y presentan pocos problemas en almacén (Dipak, Karmakar, Poi, Bhattacharya y Mondal, 2017).

3.3.1.2 Concentrado emulsionable (EC)

Los concentrados emulsionables son formulaciones cuyos ingredientes activos son solubles en solventes no polares. Estos activos se formulan en solventes orgánicos y emulsificantes, la cual tiene la apariencia final similar a un aceite y al entrar en contacto con el agua emulsiona, dando como resultado una emulsión de apariencia “lechosa” estable y sin separaciones de fases aceitosa o acuosa (Dipak, Karmakar, Poi, Bhattacharya y Mondal, 2017).

3.3.1.2 Emulsión aceite en agua (EW)

Estas formulaciones se basan en agua y presentan ventajas frente a los concentrados emulsionables de no contener solventes orgánicos, disminución de costos, manejo seguro durante la producción transporte, razones por las que este tipo de formulación está siendo tomada en cuenta hoy en día frente a un concentrado emulsionable. El principio activo tiene muy poca solubilidad en agua, por tanto, se disuelve en un solvente inmiscible en agua (Hazra, 2015; Dipak, Karmakar, Poi, Bhattacharya y Mondal, 2017).

IV. DESARROLLO DE LA EXPERIENCIA PROFESIONAL

4.1 Situación encontrada

La empresa tenía pocos meses de haber iniciado la formulación local de plaguicidas y fertilizantes y para ello había destinado un solo ambiente provisional para esta actividad, dado que no existía un laboratorio construido para esta área. En cuanto a capital humano, solo contaba con la presencia de un profesional del área química. Este laboratorio estaba destinado solo a la formulación de productos de origen químico.

En este contexto, inicialmente se apoyó en la formulación de fertilizantes y luego de plaguicidas químicos, a la par se trabajó en el desarrollo del primer producto en base a extracto vegetal. Si bien no se contaba con la formación profesional para formular, las bases que brinda la carrera de agronomía, como química y bioquímica, sirvieron de apoyo para comprender el proceso y el análisis en el desarrollo de formulaciones. El conocimiento de botánica sistemática y fisiología vegetal también contribuyeron al entendimiento de cómo influyen las especies vegetales y manejo del cultivo en los extractos vegetales, así como comprender la finalidad y funcionalidad en campo de las formulaciones que se realizaban. También es importante señalar, que la formación profesional permitió ayudar a los compañeros de otras carreras a entender mejor las características que deben presentar algunos productos para un mejor desempeño en campo, ya que, si bien cuentan con la experiencia en formulaciones, su conocimiento sobre las características de plantas, plagas y enfermedades era limitado.

Acerca de la evaluación de eficacia de los productos desarrollados, se realizaban solo en ensayos instalados en campo, puesto que no contaban con un profesional del área agrícola y tampoco con un laboratorio de análisis de eficacia productos formulados. En ese sentido, las evaluaciones en campo toman tiempo, implican el envío de muestras grandes, hay que

considerar que los insumos para el desarrollo de productos en algunos casos pueden ser limitados, y son costosas, por lo cual se apoyó la idea de realizar evaluaciones en laboratorio, previo al análisis de campo, pues permitía una evaluación rápida y menos costosa, además de que se tendría mayor certeza del control sobre los patógenos, pues en campo, es difícil evaluar la eficacia en algunos patógenos por su baja presencia.

Por otro lado, en lo referente a la propuesta de los proyectos, es decir los productos nuevos a desarrollar en el laboratorio eran determinados por la gerencia técnica. Sin embargo, debido a la formación profesional, se tenía conocimiento de la importancia que estaba cobrando el control de enfermedades con productos biológicos, por otro lado, la cartera de productos de la empresa contaba con muy pocos biológicos, por lo cual se incentivó a realizar investigaciones con un mayor número de extractos para el desarrollo de las formulaciones, y es así que se propuso trabajar con extracto de citronela, menta y canela.

4.2 Contexto

Los cultivos agrícolas son afectados por plagas y enfermedades que disminuyen los rendimientos y la calidad de los productos cosechables. Los agentes que producen infecciones son bacterias, virus, hongos y nematodos, disminuyendo su calidad, condiciones organolépticas, condiciones nutritivas y vida postcosecha. Estas infecciones se producen a lo largo de las diferentes etapas fenológicas del cultivo, incluso hasta la etapa de almacenamiento. De allí, la importancia de estos microorganismos y de su control durante el desarrollo de las plantas en campo y hasta su llegada al consumidor final.

Los hongos fitopatógenos constituyen los principales microorganismos que causan enfermedades en el país, debido a que son responsables de la mayoría de epifitias de los cultivos que se desarrollan en el Perú. Estos microorganismos afectan a varios frutales y vegetales debido a que cuentan con numerosas enzimas que los facultan para romper los polímeros que se encuentran en las células vegetales a moléculas más simples para ser utilizados como fuente alimento. Por otro lado, los frutos y vegetales presentan características como concentración de solutos, potencial de agua, pH y temperatura que los hacen susceptibles al ataque de estos fitopatógenos.

Tradicionalmente se utilizan productos formulados con moléculas de origen sintético para el manejo de estos fitopatógenos y, así proteger o disminuir las pérdidas de rendimiento del cultivo. Sin embargo, estas moléculas presentan algunos problemas como los residuos tóxicos en las plantas y que afectan la salud humana. Un ejemplo lo constituyen los triazoles que son un grupo químico que inhibe la síntesis de ergosterol en la membrana celular de los hongos; éstos evitan el crecimiento de hongos en plantas y en fruta, pero pueden permanecer en el producto comestible hasta que éste llega al consumidor, si el periodo entre la cosecha y la aplicación es corto.

Otro efecto perjudicial del uso de químicos sintéticos en el control de enfermedades es la aparición de resistencia en los fitopatógenos. Esta generación de resistencia es producto del abuso de las aplicaciones de la misma molécula que tiene efecto sobre el mismo proceso fisiológico en los patógenos y que causa una selección de individuos que son tolerantes y luego resistentes a la acción de éstos. En consecuencia, con el tiempo se observa que la dosis de aplicación recomendada ya no es eficaz en el control de la enfermedad, por lo que se incrementa y se continúa realizando una selección de individuos resistentes, esta vez a una dosis mayor. Este tipo de manejo ocasiona que se generen poblaciones resistentes a los fungicidas, que se dispersan a zonas aledañas y que, con el tiempo, se vuelve un problema a nivel de región o país.

La manipulación de estos productos químicos por los seres humanos puede generar efectos tóxicos cuando no se utiliza los equipos de protección personal y si es prolongado, con el tiempo pueden aparecer efectos de infertilidad (Cavieres, 2004). De la misma forma, ocasiona efectos de intoxicación a los seres humanos que se encuentra viviendo en zonas aledañas a los campos de producción de cultivos, dado que las aplicaciones son arrastras por el viento hacia zonas circundantes, según la dirección del viento.

Estos productos sintéticos permanecen por largo tiempo en el ecosistema, puesto que no se degradan rápidamente, ocasionando problemas como la contaminación de fuentes de agua

y, en consecuencia, intoxicación de animales en ríos y mares; contaminación del suelo y del aire.

Además, los productos químicos están limitados para su aplicación en etapas cercanas y durante cosecha en campos de manejo convencional; y, se hallan restringidos para el uso en agricultura orgánica. Este es un punto importante, en vista de que las grandes extensiones de cultivos se destinan principalmente al mercado de exportación y son, precisamente estos mercados, los que limitan la variedad de moléculas químicas disponibles.

Finalmente, las aplicaciones de estos productos sintéticos para el control de enfermedades resultan costosos, pues se presumen que representan la quinta parte del costo total de producción del cultivo.

Los perjuicios que ocasionan los pesticidas químicos se han realizado investigaciones para hallar nuevas formas de control de las enfermedades de los cultivos. Estos métodos deben incluir el uso de sustancias de origen natural para reemplazar a los productos químicos o utilizarlos de forma alternada en los programas de manejo integrado de cultivos.

Las plantas son fuente de metabolitos secundarios, que no son esenciales para su desarrollo, y son utilizados como medio de defensa naturales contra patógenos. Estos metabolitos tienen efecto antimicrobiano, no son dañinos al medio ambiente, ni al ser humano, no contienen metales pesados, no generan resistencia en los patógenos y no tienen efecto residual por largo tiempo en las plantas. Otro punto a favor del uso de extractos de plantas, es que son aceptados por los mercados de destino de exportación y que muchos de ellos, son utilizados en la industria cosmética y alimentaria, demostrando así su carácter inocuo. Por lo tanto, son una buena opción como alternativa para reemplazar el uso de pesticidas químicos.

4.3 Proceso de selección del extracto vegetal potencial

El desarrollo o formulación de productos destinados al uso agrícola consta de varios pasos a través de los cuales se evalúa que éstos cumplan con las características deseadas dentro de los parámetros de calidad para ofrecer al cliente un producto final óptimo (Figura 5).

Cada producto de uso agrícola que sale a la venta es el resultado final de un proyecto. Este proyecto inicia para suplir la necesidad de control de un fitopatógeno que causa una enfermedad en un cultivo determinado, con un producto de origen biológico, en este caso un extracto vegetal.

Existe un amplio abanico de posibilidades en cuanto a especies vegetales que ofrecen potenciales beneficios para el control de microorganismos patógenos, bacterias y hongos, que han sido ampliamente estudiados en áreas de salud, alimentos, cosmética y agrícola. Para realizar una adecuada elección de un extracto de determinada planta es importante comprender qué es un extracto y cómo está compuesto. En esta línea, un extracto vegetal se obtiene de raíces, hojas, tallos, flores, frutos y raíces mediante maceración con solventes.

Estos extractos pueden ser utilizados para evaluar su actividad antimicrobiana pero también puede purificarse. La eliminación de la fracción acuosa del extracto crudo permite obtener aceites esenciales que contienen los compuestos volátiles que se producen en los tricomas de algunas plantas. De la misma forma, se pueden separar los compuestos presentes en los aceites esenciales y obtener estas sustancias en su forma pura. Estos compuestos son los metabolitos secundarios.

Los extractos vegetales están conformados por varios metabolitos secundarios en distintos porcentajes, es así que, si bien dos extractos vegetales pueden tener los mismos metabolitos, pero su porcentaje podría variar en relación al otro, en consecuencia, también sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas, etc. Sin embargo; siempre hay un metabolito

que se encuentra en mayor porcentaje, respecto a los demás, el cual va a determinar el quimiotipo. Dicho de otro modo, el metabolito secundario predominante es el quimiotipo.

Las propiedades antimicrobianas de un extracto vegetal son ejercidas por el conjunto de sustancias que lo componen. Aunque la mayor responsabilidad del efecto es del quimiotipo, los demás metabolitos también tienen influencia, pues puede haber un efecto sinérgico o, también, antagónico entre ellos.

Entonces, al ser el metabolito mayoritario es el que va a ejercer el mayor efecto control sobre el patógeno, es importante tener clara su identidad y el rango de porcentaje en el que debe estar presente en el extracto. Estos metabolitos pueden estar presentes entre un 40-60 % o 60-80 % y el porcentaje restante lo componen otros metabolitos secundarios. Cabe señalar que, el segundo compuesto en mayor presencia también puede impactar en el porcentaje de control del patógeno. Debido a lo anterior, es importante tener claro la composición del extracto que requerimos.

Otra alternativa es trabajar con el metabolito secundario puro ya que, al ser el responsable en gran medida de la inhibición del fitopatógeno, resulta una alternativa. Aunque, es importante analizar el costo-beneficio, pues estos suelen ser más costosos que un extracto vegetal.

Otros factores que también influyen es la zona geográfica de origen, ya que la altitud y la radiación influyen en la síntesis de los metabolitos secundarios. En relación a este punto, también se debe tener claro el nombre científico de la especie vegetal, ya que en varios países distintas existen distintas especies con el mismo nombre común, Un ejemplo de ello es el orégano, que en Perú es *Origanum vulgare*, pero en México se le llama orégano a *Lippia graveolens*.

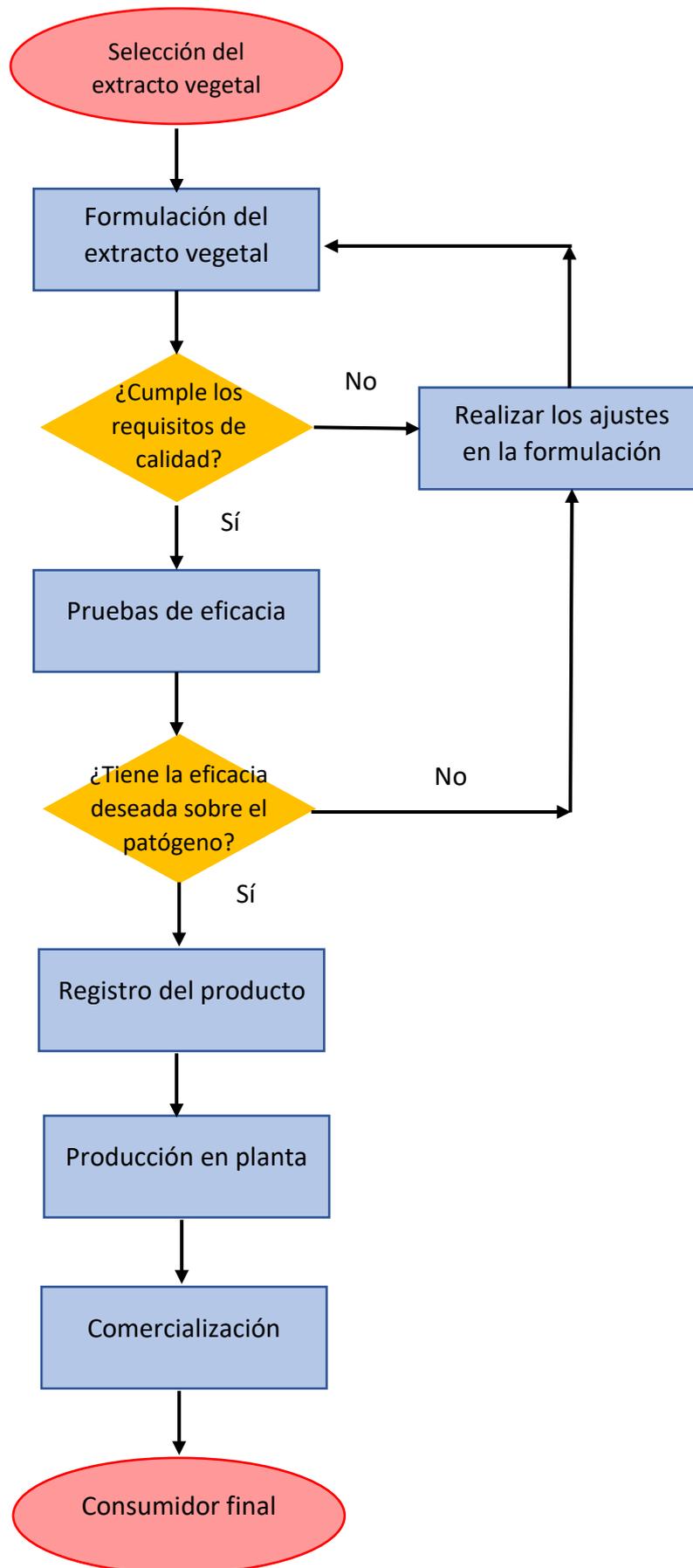


Figura 5. Flujograma del proceso de formulación de extractos vegetales hasta su llegada al consumidor final.

El órgano vegetal de donde se realiza el extracto tiene gran impacto en la composición de sustancias metabólicas, pues se sintetizan solo o en mayor cantidad en ciertas zonas de la planta. El caso del extracto de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) es un ejemplo de la importancia de determinar cuál es el órgano vegetal del cual se realiza la extracción; las raíces de esta especie contienen en mayor cantidad alcanfor, las hojas contienen mayormente eugenol y la madera contiene en mayor porcentaje cinnamaldehído. Finalmente, la etapa fenológica también influye en la composición del extracto.

Una vez que se tiene claro las características del extracto vegetal que deseamos, se procede a realizar cotizaciones con proveedores, a los cuales se debe indicar el nombre científico de la planta, el componente que debe estar en mayor cantidad, por ello es importante saber el grupo al que pertenece el metabolito porque hay nombres parecidos que solo se diferencian en el sufijo, y en algunos casos indicar el órgano vegetal del cual debe provenir. Una forma de evitar confusiones, por el hecho de que un proveedor tiene varias presentaciones de extractos de una misma planta o los nombres de los metabolitos secundarios son muy similares, es preferible manejar las características del extracto mediante número CAS, ya que éste es único para cada sustancia existente. Éste es un paso importante porque el potencial de un extracto vegetal no solo radica en sus características químicas o biológicas, sino en su costo puesto en puerto nacional. Si bien un extracto puede tener el mejor desempeño reportado por la literatura, y tener un proveedor que comercializa el extracto según el quimiotipo deseado, pero resulta muy costoso, no tendría potencial para ser utilizado para el control de enfermedades en el mercado peruano, ya que los clientes no lo comprarían y no sería rentable para la empresa formuladora.

El análisis de costo tiene dos aspectos principales: el costo de los productos de referencia de extractos vegetales en el mercado y el margen de ganancia que plantee el área comercial. El estudio de mercado se realiza para determinar el precio de venta de los productos comerciales de referencia y se saca un promedio, pues éste no debería ser mucho mayor al promedio porque podría no ser aceptado por los clientes. El margen de ganancia del precio de venta, se establece según el análisis del área comercial. Otro costo que influye en el precio del

producto formulado, es el costo de producción, el cual está en función de las horas hombre por tipo de formulación del producto, de los costos de energía y del desgaste de la maquinaria. El rango del costo de formulación propuesto es la diferencia del precio de venta y el margen de ganancia. Éste usualmente incluye el costo del extracto vegetal, de los aditivos, del frasco o bolsa, etiqueta, caja y horas hombre. Una vez que tenemos el rango de precio de formulación podemos compararlo con el de las cotizaciones y evaluar si están dentro de dicho rango, si fuera así sería un extracto vegetal potencial en cuanto a la composición de metabolitos secundarios y precio.

Algunos de los proyectos trabajados, en una empresa del sector agrícola, incluyeron extracto de canela, extracto de orégano, extracto de menta y extracto de citronella para el control de *Botrytis cinerea*. Se eligieron estas especies vegetales porque existen muchos reportes científicos sobre sus propiedades antimicrobianas (Dehghani, Afsharmanesh, Salarmoini, y Ebrahimnejad, 2018; Huang, Xu, Liu, Zhanf y Hu, 2014; Hoang, Lee y Adukwu, 2020).

El carvacrol es un compuesto fenólico que tiene buen efecto antifúngico, reportado ampliamente como antimicrobiana en estudios realizados en la industria alimentaria y medicina, por lo que se decidió trabajar con él. Este metabolito secundario se halla presente en orégano y tomillo, pero es predominante en la planta de orégano, y dentro de esta *Lippia graveolens* y *Origanum vulgare* contiene este metabolito; no obstante, la especie *O. vulgare* tiene mayor porcentaje, por lo que se decidió trabajar con esta especie.

En el caso del extracto de canela se decidió trabajar con la especie *Cinnamomum cassia*, pues contenía un alto grado de cinnamaldehído comparado con el extracto de *C. zeylanicum* proveniente de hojas, que era con el que contaba el proveedor consultado. Cabe señalar que, el extracto de madera de *C. zeylanicum* contiene en mayor cantidad cinnamaldehído.

Existen varias especies de menta, no obstante, se eligió el extracto de *Mentha pulegium* por los reportes revisados y cuyo mayor compuesto es una cetona, llamada pulegona. El extracto

de citronella también es frecuentemente nombrado en los estudios de extractos de plantas con propiedades antimicrobianas por lo que se eligió trabajar con *Cymbopogon* sp., cuyo mayor constituyente es un aldehído, el geranial.

4.4 Proceso de formulación del extracto vegetal potencial

Luego de elegir el extracto vegetal a trabajar, sigue la etapa en la que se realiza el desarrollo de un producto biológico, cuyo ingrediente activo es dicho extracto, y que se comercializará para el control de enfermedades agrícolas.

4.4.1 Formulación

La etapa de formulación del producto inicia cuando se tiene el principio activo, en este caso el extracto vegetal, en el laboratorio (Figura 6). El paso inicial es elegir el tipo de formulación a realizar, lo cual está en función a las propiedades fisicoquímicas del extracto vegetal a utilizar, por ejemplo, si es un aceite esencial o un compuesto fenólico, a la evaluación del costo y a las preferencias del cliente final, que lo indica el área técnica, en ciertos casos.

Los extractos vegetales insolubles en agua se pueden formular como concentrados emulsionables, concentrados solubles o emulsión aceite en agua. Esto dependerá de la naturaleza del extracto, por ejemplo, si es un metabolito secundario puro como el mentol, que es un alcohol, podría disolverse en un alcohol y en base a esto formularse un aceite en agua; otro factor a considerar es la concentración del activo en el producto final, por ejemplo, si se formula con un extracto mayor al 60 % podría formularse como concentrado emulsionable porque habría que añadir los surfactantes y emulsionante probablemente se llegaría a un 100 %. También se debe tener en cuenta los costos del producto formulado, pues uno que lleve agua en su composición, como una emulsión aceite en agua, será menos costoso que un concentrado soluble, porque en la composición de éste, todos los aditivos tienen un mayor costo que el agua. Además, el costo del extracto también influye en la elección del tipo de formulación, ya que, si el activo tiene un costo alto, para disminuir los

costos, sería conveniente que la formulación lleve agua. En el caso de formular un concentrado soluble, se puede realizar cuando el porcentaje del extracto en la formulación es bajo, pues si bien no es soluble en agua, al estar en baja proporción, con la ayuda de tensoactivos y al estar el agua en un porcentaje alto, se comporta como un concentrado soluble al mezclarse para la aplicación.

Luego de elegir el tipo de formulación, se inician con los ensayos de las mezclas del extracto vegetal con los aditivos hasta lograr estabilizar el producto. La estabilización del producto se logra con tensoactivos que favorecen la mezcla de los extractos en agua, favorecen en algunos casos la emulsión y la humectabilidad del producto sobre el tejido vegetal. Finalmente, se deja en observación para determinar si hay separación de los componentes del producto con el pasar de las horas, usualmente durante 24 horas.



Figura 6. Factores que intervienen en la formulación de productos para el control de enfermedades.

En función al costo se preparó el extracto de orégano como concentrado soluble (CS) al 2.91 %; los extractos de citronella y canela se formularon al 30 % como concentrados emulsionables (CE), se formularon por indicación directa de gerencia técnica; y finalmente, el extracto de menta se formuló como emulsión aceite en agua (EW) al 10 %, también en función a la evaluación del costo.

4.4.2 Pruebas fisicoquímicas

Las pruebas fisicoquímicas tienen el objetivo de evaluar el cumplimiento del producto formulado con las características de calidad establecidas por la FAO para un determinado tipo de formulación. Las evaluaciones de densidad, pH y pruebas de almacenamiento son comunes a todos los productos formulados, pero existen otras evaluaciones como viscosidad, estabilidad de la emulsión o solubilidad que se emplean según el tipo de formulación del producto o solicitud del ente formulador o requerido para realizar un control de calidad más exhaustivo. Estas pruebas se llevan a cabo en el laboratorio de investigación y desarrollo. Es importante señalar que, el análisis de ingrediente activo se realiza a todo tipo de formulaciones con la finalidad de comprobar la identidad y lo realiza el área de control de calidad dado que contaban con los equipos necesarios para esta evaluación, los mismos que utiliza para efectuar el análisis del control de calidad a los lotes de producción.

Una vez que se ha realizado los controles fisicoquímicos y se tienen los datos se procede a elaborar la documentación del producto, la cual se adjunta al expediente que se ingresa a SENASA para iniciar el proceso de registro y para la evaluación que se realiza a cada lote de producción por parte del área de control de calidad. Esta documentación incluye especificación, certificado de composición, certificado de análisis, certificado de análisis de metales pesados y certificado de estabilidad.

Las pruebas realizadas a la formulación con extracto de orégano, al ser un SL, fueron estabilidad de la solución, pH y espuma persistente. En el caso de los extractos formulados como CE, se realizaron medición de pH, estabilidad de la emulsión y re-emulsión, y persistencia de la espuma. La emulsión aceite en agua (EW) se midió el pH, capacidad de vertido y la estabilidad de la emulsión y re-emulsión. Todas las evaluaciones se ejecutan a temperatura ambiente y en almacenamiento.

4.5 Proceso de evaluación de principio activo como futuro prospecto

Luego de tener el producto biológico formulado en base a un extracto vegetal, se debe evaluar el nivel de control sobre el fitopatógeno causante de la enfermedad agrícola para el cual se planteó su desarrollo en la etapa inicial (Figura 7).

4.5.1 Pruebas de eficacia

Las pruebas de eficacia de los productos formulados con extractos constituyen un paso importante en su desarrollo, pues permiten definir el potencial del extracto vegetal en el control de una enfermedad específica. Estas pruebas incluyen evaluaciones *in vitro*, *in vivo* y en invernadero (Figura 6). Debe señalarse que se realizan en el orden indicado.

Las pruebas *in vitro* se realizan con patógenos que puedan cultivarse en medio de cultivo sintético, esta característica corresponde a aquellos que son necrótrofos, pues se alimentan de moléculas simples degradadas de polímeros presentes en los tejidos de las plantas. Por consiguiente, para obtener el fitopatógeno en el laboratorio, deben de aislarse de muestras traídas de campo con la sintomatología de la enfermedad.

Las muestras de campo se desinfectan y se siembran en medio de cultivo para que los microorganismos presentes en la zona afectada del tejido desarrollen. Otra opción es realizar cámaras húmedas con las muestras, ya que al otorgarle un medioambiente húmedo se favorece el crecimiento de fitopatógeno. En cualquiera de los casos, se debe presentar la esporulación para realizar la identificación, aislar y purificar el patógeno de interés para utilizarlo como inóculo en las evaluaciones del producto.

Una vez, realizado el aislamiento del fitopatógeno se ejecutan los ensayos de eficacia *in vitro*, ya sea con micelio o esporas. Las pruebas *in vitro* con micelio se realizan al mezclar el medio de cultivo con el producto biológico, a la dosis a evaluar, agregarlo a la placa Petri y cuando haya solidificado, se siembra un disco de agar que contiene el micelio en pleno crecimiento del fitopatógeno en cuestión, en el centro de la placa. Estas placas se incuban a

la temperatura óptima de crecimiento para el patógeno, la cual está ligada a la estación en la suele presentarse en campo, hasta que el testigo llene la placa. Se tiene un testigo, al cual no se le añade ningún producto al medio de cultivo.

Para realizar las pruebas sobre esporas, se debe tener colonias con abundante esporulación del patógeno, con las cuales se preparan una suspensión de esporas. Esta suspensión se coloca sobre un medio de cultivo mezclado con el producto biológico a evaluar. Aproximadamente después de 24-48 horas de la instalación, se realiza la observación para determinar si han germinado o no y, por ende, si el producto inhibe la germinación.

Ambas evaluaciones son importantes para caracterizar el desempeño de los productos biológicos formulados en base a extractos vegetales. Algunos extractos tienen efecto como inhibidores del crecimiento de micelio y germinación de esporas, pero en otras ocasiones tienen un mejor desempeño frente a esporas y no sobre micelio o viceversa.

Las pruebas in vitro permiten determinar el porcentaje de control del patógeno objetivo. El control puede ser nulo, parcial o del 100 %. Cuando el control es nulo o muy bajo, generalmente se descarta el producto formulado como opción de control para el patógeno evaluado; no obstante, se puede evaluar su eficacia frente a otros fitopatógenos, pues es dable que algunos extractos no presenten eficacia frente a ciertos fitopatógenos y frente a otros sí. En otras ocasiones, el control está por encima del 50 %, en este escenario existe la opción de concentrar el extracto en la formulación o aumentar la dosis, pero en este punto se debe realizar una evaluación de cómo se vería afectado el costo del producto y del porcentaje que se desee obtener con el producto formulado. Finalmente, si el control es del 100 %, se debe conocer cuál es la dosis mínima a la que hay un control del 100 % y luego se inician las evaluaciones en frutos o invernadero.

Los patógenos de importancia son aquellos que causan enfermedades en varios cultivos de agroexportación, los cuales tienen como destino los mercados de USA, Europa y Japón, por

tal motivo tienen restringido el uso de pesticidas químicos para evitar los residuos en los alimentos, es así que los productos biológicos son una alternativa para el manejo de las enfermedades ocasionadas por tales patógenos. Se ha observado que los fitopatógenos que están presentes en los cultivos destinados a los mercados extranjeros son *Botrytis cinerea*, que afecta al arándano y uva de mesa; *Lasiodyplodia theobromae* causante de pudrición de tejidos en el cultivo de palto, arándano y mango; *Cladosporium* sp., afecta mandarina y palto; y finalmente, *Alternaria alternata*, que afecta a las mandarinas. Es por ello que, si un extracto es eficaz o no para el fitopatógeno objetivo inicialmente, es importante evaluar el control sobre otros patógenos de importancia, pues éstos afectan a cultivos con grandes áreas de instalación.

Otro método de evaluación son las pruebas en frutos y para ello, se desarrolla la metodología de inoculación del patógeno en los frutos a utilizar. Las evaluaciones se repiten por lo menos 3 veces para disminuir el error. Este tipo de prueba resulta útil cuando el producto formulado controla al 100 % en las pruebas in vitro, ya que permite establecer diferencias en la eficacia de las dosis o para casos en los que no se presenta la enfermedad en campo, o el inóculo es muy bajo.

También se realizan pruebas en invernadero, luego de tener una dosis tentativa producto de los ensayos realizados en la fase in vitro y en frutos. De la misma forma que en las pruebas anteriores, se debe implementar una metodología de inoculación y evaluación del patógeno objetivo en el cultivo a ensayar, para esto es necesario conocer en qué etapa del cultivo se presenta el fitopatógeno, cuál la forma de infección y cuáles son las condiciones que favorecen la infección. En este sentido se realizaron pruebas en fresa inoculando *Botrytis cinerea* para la evaluación del extracto de orégano y canela. Se decidió trabajar con este fitopatógeno, pues se quería evaluarlo en el cultivo de uva en campo; sin embargo, el fitopatógeno no se presentaba en campo y tampoco, se realizó en el cultivo de fresa en campo debido a que usualmente se realizan constantes aplicaciones de productos de origen químico y se sospechaba que éstos podrían tener efecto residual e influir en los resultados del ensayo, es así que se decide cultivar fresa en invernadero para realizar los ensayos.

Por último, se envía la muestra del producto formulado para los ensayos de campo. Estas pruebas son el último filtro antes de iniciar el proceso de registro en el ente regulador del producto y el que determinará si el potencial del extracto hallado en laboratorio se replica en campo. En ese sentido, si los resultados de los ensayos en campo no muestran un control esperado, usualmente por encima del 85 %, se opta por una reformulación, y se vuelve a enviar a pruebas en campo ya que, en este punto, las evaluaciones in vitro tienen un control alto y el filtro serían las evaluaciones en campo. La reformulación implica realizar una mejora en el desempeño del producto, mediante la concentración del extracto en la fórmula, cuando el precio lo permite, siendo éste el principal factor a analizar en este punto. En este escenario, es importante que la reformulación cumpla los mismos parámetros de calidad que los evaluados inicialmente.

Una vez logrado el control esperado en campo, se inicia el proceso de registro, dado que se ha demostrado el potencial del extracto vegetal para el control de la enfermedad ocasionada por el patógeno objetivo.

La importancia de las evaluaciones realizadas en laboratorio es que permiten determinar si el extracto vegetal tiene potencial para ejercer control sobre una determinada enfermedad y/o la dosis más efectiva, y así colaborar con la reducción de los ensayos de campo porque se envía la muestra con una o dos dosis a evaluar, además permite reducir costo del producto, pues se utiliza el mínimo porcentaje efectivo en la composición. Además, permiten la evaluación de la eficacia frente a varios fitopatógenos al mismo tiempo, discriminar su comportamiento frente al micelio y conidias, evaluar el tiempo de control y comparar el efecto frente a diferentes aislamientos. En otras palabras, permiten caracterizar el desempeño del producto formulado en base a un extracto vegetal de manera mas clara, comparado si es que se enviaría directo a pruebas de campo, y a menor costo y tiempo.

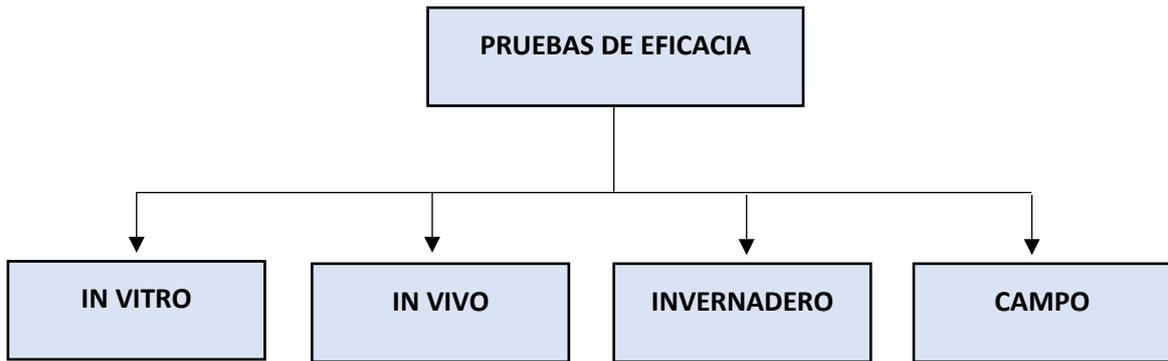


Figura 7. Tipo de evaluaciones realizadas a los productos para el control de enfermedades durante su desarrollo. Factores que intervienen en la formulación de productos para el control de enfermedades.

Como parte del análisis del potencial de los extractos trabajados, se realizaron pruebas in vitro para determinar si la concentración a la que se trabajó tenía eficacia sobre el patógeno objetivo, en este caso fue *Botrytis cinerea* (Tabla 1 y Figura 8).

Tabla 1. Resultados de la evaluación in vitro de los extractos de citronela y canela frente a *Botrytis cinerea*.

TRAT.	PRODUCTO	I.A.	DOSIS	CRECIMIENTO (mm)	INHIBICIÓN (%)
T1	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Botrytis cinerea</i>		42.5	0
T2	Cyprodinil + Fludioxonil	Cyprodinil + Fludioxonil	1 g/L	0	100
T3	Extracto 1	Citronella 30%	2.5 ml/L	0	100
T4	Extracto 2	Canela 30%	2.5 ml/L	0	100

Las pruebas realizadas en laboratorio mostraron que los extractos de citronela y canela, a la concentración de 30 %, presentaban un control del 100 %, por lo cual se pasó al siguiente paso, pruebas en frutos.

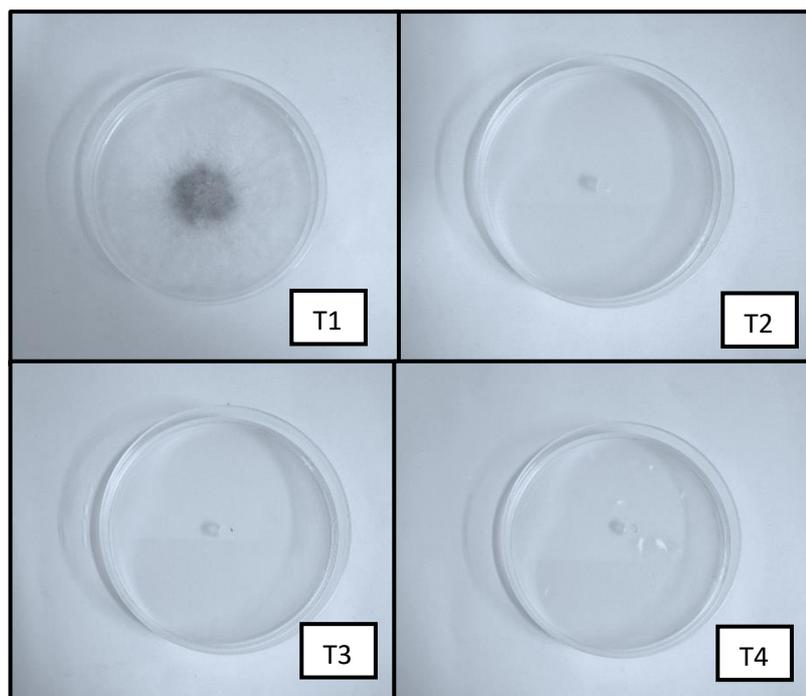


Figura 8. Prueba in vitro de extractos de citronela y canela frente a *Botrytis cinerea*.

4.6 Problemática y desafíos

Durante el desarrollo de labores se presentaron varios desafíos producto de las nuevas labores que se implementaban en el área de I+D, los proyectos encomendados y los relacionados al producto comercial.

El primer desafío fue el aprendizaje del proceso de formulación, dado que durante la formación de la carrera de agronomía no imparten estos conocimientos, aunque los cursos generales de química al inicio de carrera me sirvieron como punto de inicio. Asimismo, los controles fisicoquímicos y la elaboración de la documentación de los productos formulados.

Otro desafío fue realizar los trabajos sin contar con un área para dicha actividad, ya que se trabajó durante los primeros años en un espacio provisional y reducido. De allí se implementó, en la medida de lo posible, las metodologías para realizar el aislamiento de fitopatógenos, pruebas de eficacia en laboratorio y el proceso de formulación de productos.

También se presentó el desafío de diseñar las áreas destinadas a los trabajos de fitopatología, en el proyecto de construcción de laboratorios de la empresa, para la evaluación de la eficacia de los extractos vegetales, las cuales estarían dentro del laboratorio de investigación y desarrollo agrícola. Estas áreas comprendían un área de aislamiento de patógenos, de preparación y esterilización de medios, un invernadero y un área destinada a la crianza de insectos.

Finalmente, el desafío de liderar el área de productos biológicos, es decir proponer los nuevos extractos vegetales a partir de los cuales se formularían productos para el control de enfermedades, la realización de las pruebas de eficacia de laboratorio, el costeo de materias primas y producto final, así como el envío de muestras para ensayos en campo y la mejora de la fórmula, según la retroalimentación de los ensayos de campo.

4.7 Competencias y habilidades desarrolladas

Durante el desempeño laboral se contribuye con los conocimientos y experiencia al crecimiento del centro de labores, pero no es una relación unilateral, sino que hay un beneficio mutuo, pues contribuye a la formación de competencias y habilidades, tales como las intelectuales, personales, interpersonales y organizacionales, que son el producto de las diferentes situaciones y desafíos a los que se hace frente.

Las competencias intelectuales se mejoran durante el ejercicio de las actividades diarias. Estas competencias son la solución de problemas, la toma de decisiones y la creatividad. El desarrollo de productos de uso agrícola plantea desafíos ante los cuales se debe tomar decisiones para desarrollarlos y se requieren ideas creativas para solucionar los problemas rápidamente y de manera eficaz.

Las competencias personales desarrolladas fueron la ética, la adaptación al cambio y la inteligencia emocional. La investigación para la formulación con principios activos novedosos o poco difundidos en el mercado nacional requiere un compromiso ético en cuanto a discreción y manejo responsable de la información producida. Por otro lado, es

importante señalar que un área de investigación y desarrollo está conformada por un equipo multidisciplinario, personas de distintos caracteres, con los cuales se busca crear una relación armónica y de cooperación, para ello es importante el uso de la inteligencia emocional y la adaptación al cambio.

Las competencias interpersonales que se adquirieron fueron el trabajo en equipo, la resolución de conflictos, liderazgo y proactividad. El crecimiento de un área o una compañía se sustenta en el trabajo realizado por los equipos que la conforman, de allí que se necesite conocer a cada persona que conforma un equipo para poder liderarlos de manera efectiva y lograr el máximo rendimiento del área en cuestión. No obstante, no solo es importante ejercer el liderazgo del equipo, sino también la resolución de conflictos, pues la oposición de ideas puede presentarse dentro del equipo o entre equipos y/o áreas.

Finalmente, las competencias organizacionales aprendidas fueron la gestión de recursos e información, la orientación de servicio, la orientación a resultados y el aprendizaje a través de experiencias laborales de otros. Uno de los componentes importantes del manejo de un área es la apropiada gestión de los recursos, es decir, usarlos de manera eficiente para evitar los gastos en vano y lograr el máximo beneficio, contribuyendo así a mejorar la productividad del área. De la misma manera, la gestión de la información debe estar orientada a la distribución de la data necesaria para que el personal y del área puedan cumplir con sus funciones, así como proteger, la que sea confidencial. Las áreas dentro de una organización están interconectadas, siendo proveedores y clientes internos de otras áreas, por lo cual la orientación al servicio y resultados contribuye al logro de los objetivos, tanto de unos como de los otros. Cabe señalar que en un equipo multidisciplinario existen muchas experiencias que contribuyen a enriquecer el conocimiento y la capacidad de decisión de los demás, por lo que hay que estar abierto a escuchar las experiencias laborales de los demás.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. El proceso de formulación de extractos vegetales con acción sobre fitopatógenos que causan enfermedades agrícolas tiene dos etapas principales, la primera se refiere a conocer qué extracto se va a trabajar y definir las características que debería de tener en función a costo y componentes; y la segunda etapa es la formulación y evaluación de la eficacia en laboratorio y/o invernadero, frente al fitopatógeno causante de la enfermedad agrícola a controlar.

5.1.1. Las características que debe tener un extracto vegetal potencial para el control de una enfermedad son: tener un precio menor al precio al cual se planea comercializarlo, de tal manera que permita tener el porcentaje de rentabilidad definida por el área comercial; y debe tener los metabolitos secundarios característicos de la especie vegetal en un alto porcentaje para desempeñar un control de o cercano al 100 %.

5.1.2 La formulación del extracto vegetal se basa en las características químicas de sus componentes y en el tipo de formulación a realizar. Las características permiten determinar solubilidad y afinidad con los aditivos. El tipo de formulación a realizar se determina en función al costo y/o a la cantidad del extracto vegetal en el producto final y sus características químicas.

5.1.3 El potencial de los extractos vegetales formulados se analiza en pruebas de eficacia a nivel in vitro, in vivo y/o en invernadero frente al o a los patógenos objetivos que originan las enfermedades agrícolas. Se considera que un extracto vegetal formulado debe tener un control por encima del 85 % para considerar que tiene potencial para un buen desempeño en campo.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Abeywickrama, K., Wijerathna, C., Rajapaksha, N., Sarananda, K. y Kannangara, S. (2012). Disease control strategies for extending storage life of papaya (*Carica papaya*), cultivars 'Red Lady' and 'Rathna'. *Ceylon Journal of Science. Biol. Sci.*, 41, 27–34.
- Afsharmanesh, M., Salarmoini, M., & Ebrahimnejad, H. (2018). Characterization of pennyroyal (*Mentha pulegium*) essential oil as an herbal, antibacterial, and antioxidant substance. *Comparative Clinical Pathology*. doi:10.1007/s00580-018-2776-4
- Agustí, M. (2003). Citricultura. Mundi–Prensa. Madrid, España. 422 p.
- Ahmad, A., Khan, A. y Manzoor, N. (2013) Reversal of efflux mediated antifungal resistance underlies synergistic activity of two monoterpenes with fluconazole. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 48, 80–86.
- Ait-Ouazzou, A., Cherrat, L., Espina, L., Lorán, S., Rota, C. y Pagán, R. (2011). The antimicrobial activity of hydrophobic essential oil constituents acting alone or in combined processes of food preservation. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 12, 320–329.
- Akimitsu, A., Peever, T. L. y Timmer. (2003). Molecular, ecological and evolutionary approaches to understanding *Alternaria* diseases of citrus. *Mol. Plant. Pat.*, 4, 435–446.
- Al-Burtamani, S. K. S., Fatope, M. O., Marwah, R. G., Onifade, A. K. y Al-Saidi, S. H. (2005). Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of the essential oil of *Haplophyllum tuberculatum* from Oman. *J Ethnopharmacology.*, 96,107–112.

- Alvarez -Castellanos, P.P., Bishop, C. D. and Pascual, M. (2001). Antifungal activity of the essential oil of flowerheads of garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. *J Phytochemistry.*, 57(1), 99-102.
- Angioni, A., Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S. y Cabras, P. (2006). Seasonal Plant Part Chemical Variability and Antifungal Activity Investigation of *Lavandula stoechas* L. ssp. *Stoechas* Essential Oils. *J Agric Food Chem.*, 54, 4364-4370.
- Arumugam, G., Swamy, M. y Sinniah, U. (2016). *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng: botanical, phytochemical, pharmacological and nutritional significance. *Molecules*, 21, 369.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. y Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology*, 46,446-475.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Zhiri, A., Baudouxc, D. y Idaomar, M. (2006). Antigenotoxic effects of three essential oils in diploid yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) after treatments with UVC radiation, 8-MOP plus UVA and MMS. *Mutat. Res.* 2006, 27–38.
- Bassolé, I. H. N., y Juliani, H. R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17: 3989–4006. doi: 10.3390/molecules17043989
- Bensch, K., Braun, U., Groenewald, J. Z., Crous, P. W. 2012. The genus *Cladosporium*. *Stud. Mycol.*, 72, 1– 401. <http://dx.doi.org/10.3114/sim0003>.
- Bhavaniramy, S., Vishnupriya, S., Al-Aboody, M. S., Vijayakumar, R. y Baskaran, D. (2019). Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. *Grain and Oil Science and Technology*, 2,49-55.
- Bouchra, C., Achouri, M., Idrissi, H. L. M. y Hmamouchi, M. (2003). Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: *Fr. J Ethnopharmacology.*, 89, 65-169.
- Briceño, E. X. y Latorre, B. A. (2008). Characterization of *Cladosporium* rot in grapevine a problem of growing importance in Chile. *Plant Disease*. doi:10.1094/ PDIS-92-12-1635.

- Canales, C.R. 2007. Control de la necrosis en frutos de marañón *Anacardium occidentale* en la península de Yucatán. Reporte anual de investigación e innovación tecnológica INIFAP. http://utep.inifap.gob.mx/tecnologias_agricolas.php (consulta, febrero 2021).
- Casiglia, S., Bruno, M., Scandolera, E., Senatore, F. y Senatore, F. (2015). Influence of harvesting time on composition of the essential oil of *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. & Link. growing wild in northern Sicily and its activity on microorganisms affecting historical art crafts. *Arab. J. Chem.* 12(8), 2704-2712
- Ćavar Zeljković, S., Šolčić, M.E. y Maksimović, M. (2015). Volatiles of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don from Croatia. *Natural Prod. Res.* 29 (19), 1874-1877.
- Cavieres, M. F. (2004). Exposición a pesticidas y toxicidad reproductiva y del desarrollo en humanos. Análisis de la evidencia epidemiológica y experimental. *Rev Med Chile*, 132, 873-879.
- Chen, Y., Zeng, H., Tian, J., Ban, X., Ma, B. y Wang, Y. (2013). Antifungal mechanism of essential oil from *Anethum graveolens* seeds against *Candida albicans*. *J. Med. Microbiol.*, 62, 1175–1183.
- Choudhary, C. S, Arun, A., Jha, P. K. y Rai, B. (2015). Bio-rational approach in plant disease management. *Rashtriya Krishi*, 10(2), 39-42.
- Chung, K. (2012). Stress response and pathogenicity of the necrotrophic fungal pathogen *Alternaria alternata*. *Scientifica*, 12, 1-17.
- Ciliberti, N., Fermaud, M., Languasco, L. y V. Rossi. (2015). Influence of fungal strain, temperature, and wetness duration on infection of grapevine inflorescences and young berry clusters by *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 105, 325-333.
- Cosseboom, S.D., Ivors, K.L., Schnabel, G., Bryson, P.K. y Holmes, G.J. (2019). Within-season shift in fungicide resistance profiles of *Botrytis cinerea* in California strawberry fields. *Plant Dis.*, 103(1), 59–64. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-18-0406-RE>.
- Cotoras, M., Castro, P., Vivanco, H., Melo, R. y Mendoza, L. (2013). Farnesol induces apoptosis-like phenotype in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Mycologia*, 105, 28–33.

- Dahham, S. S., Ali, M. N., Tabassum, H., Khan, M. (2010). Studies on antibacterial and antifungal activity of pomegranate (*Punica granatum* L.). *Am-Euras J Agric & Environ Sci.*, 9 (3), 273-281.
- Dehghani, N., Afsharmanesh, M., Salarmoini, M. y Ebrahimnejad, H. (2018). Characterization of pennyroyal (*Mentha pulegium*) essential oil as an herbal, antibacterial, and antioxidant substance. *Comp. Clin. Pathol. Dehghani*, 27(6),1575-1581.
- Dewey, F.M. y Grant-Downton, R. (2016). *Botrytis* - Biology, detection and quantification. In: *Botrytis – The Fungus, the Pathogen and Its Management in Agricultural Systems*, (Fillinger, S. and Elad, Y., eds), pp. 17–34. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0_2.
- Falleh, H., Ben Jemaa, M., Saada, M., y Ksouri, R. (2020). Essential oils: A promising eco-friendly food preservative. *Food Chem.*, 330, 127268. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127268>
- Feliziani, E. y Romanazzi, G. (2016). Postharvest decay of strawberry fruit: Etiology, epidemiology, and disease management. *J. Berry Res.*, 6(1), 47–63. <https://doi.org/10.3233/JBR-150113>.
- Franck, J., Latorre, B. A., Torres, R. y Zoffoli, J. P. (2005). The effect of preharvest fungicide and postharvest sulfur dioxide use on postharvest decay of table grapes caused by *Penicillium expansum*. *Postharv. Biol. Technol.*, 37, 20–30.
- Freires de Almeida, I., Murata, R.M., Furletti, V.F., Sartoratto, A., Matias de Alencar, S., Figueira, G.M., de Oliveira Rodrigues, J.A., Duarte, M.C.T. y Rosalen, P.L. (2014). *Coriandrum sativum* L. (Coriander) essential oil: Antifungal activity and mode of action on *Candida* spp. and molecular targets affected in human whole-genome expression. *PLoS ONE*, 9, e99086.
- Galata, M., Sarker, L.S. y Mahmoud, S.S. (2014). Transcriptome profiling, and cloning and characterization of the main monoterpene synthases of *Coriandrum sativum* L. *Phytochemistry.*, 102, 64-73.
- Gazim, Z.C., Amorim, A.C.L., Hovell, A.M.C., Rezende, C.M., Nascimento, I.A., Ferreira, G.A. y Cortez, D.A.G. (2010). Seasonal variation, chemical composition, and

- analgesic and antimicrobial activities of the essential oil from leaves of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd in Southern Brazil. *Molecules* 15 (8), 5509–5524.
- Ghani, A., Saharkhiz, M., Hassanzadeh, M. y Msaada, K. (2009). Changes in the essential oil content and chemical compositions of *Echinophora platyloba* DC. during three different growth and developmental stages. *J. Essential Oil Bear. Plant.* 12 (2), 162–171.
- Giordani, R., Regli, P., Kaloustian, J., Mikail, C., Abou, L. y Portugal, H. (2004). Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. *Phytother Res.* 18(12), 990-5.
- Gogoi, P., Baruah, P. y Nath, S.C. (2008). Microbiological Research. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem.). *Microbiol. Res.*, 163, 337–344.
- Grausgruber-Groger, S., Schmiderer, C., Steinborn, R. y Novak, J. (2012). Seasonal influence on gene expression of monoterpene synthases in *Salvia officinalis* (Lamiaceae). *J. Plant Physiol.* 169 (4), 353–359.
- Hammer, K.A., Carson, C.F. y Riley, T.V. (2004). Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 12, 1–5.
- Haque, E., Irfan, S., Kamil, M., Sheikh, S., Hasan, A., Ahmad, A., Lakshmi, V., Nazir, A. y Mir, S.S. (2016). Terpenoids with antifungal activity trigger mitochondrial dysfunction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 85, 436–443.
- Hashem, M., Alamri, S. (2009). The biocontrol of postharvest disease (*Botryodiplodia theobromae*) of guava (*Psidium guajava* L.) by the application of yeast strains. *Postharvest Biol. Technol.*, 53, 123–130.
- Hazra, D. K. (2015). Recent advancement in pesticide formulations for user and environment friendly pes management. *International Journal of Research and Review*, 2(2), 35-40.

- Hazra, D.K., Karmakar, R., Poi Rajlakshmi, Bhattacharya, S. and Mondal, S. (2017). Recent advances in pesticide formulations for eco-friendly and sustainable vegetable pest management: A review. *Archives of Agriculture and Environmental Science*, 2(3), 232-237.
- Herman, R.A., Ayepa, E., Shittu, S., Fometu, S. S. y Wang, J. (2019). Essential oils and their applications-A mini review. *Adv Nutr Food Sci*, 4(4), 1-13.
- Hoang, N. H. T., Lee, G. y Adukwu, E. (2020). In vitro antifungal activity of *Cinnamomum zeylanicum* bark and leaf essential oils against *Candida albicans* and *Candida auris*. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 10, 8911–8924.
- Horowitz, A. R., Ellsworth, P. C y Ishaaya, I. (2009). Biorational pest control-An overview. DOI 10.1007/978-90-481-2316-2_1, © Springer Science+Business Media.
- Huang, D. F., Xu, J.-G., Liu, J.-X., Zhanf, H. y Hu, Q. P. (2014). Chemical Constituents, antibacterial activity and mechanism of action of the essential oil from *Cinnamomum cassia* Bark against four food-related bacteria. *Microbiology*, 83(4), 1-9.
- Hyldgaard, M., Mygind, T. y Meyer, R. (2012). Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components. *Front. Microbiol*, 3, 12.
- Keefover-Ring, K., Thompson, J.D. y Linhart, Y.B. (2009). Beyond six scents: defining a seventh *Thymus vulgaris* chemotype new to southern France by ethanol extraction. *Flavour Frag. J.* 24 (3), 117-122.
- Kong, W., Huang, C., Chen, Q.; Zou, Y.; Zhang, J. (2012) Nitric oxide alleviates heat stress-induced oxidative damage in *Pleurotus eryngii* var. *tuoliensis*. *Fungal Genet. Biol.*, 49, 15–20.
- Kohanski, M.A.; Dwyer, D.J., Hayete, B., Lawrence, C.A. y Collins, J.J. (2007). A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*, 130, 797–810.
- Kordali, S., Cakir, A., Mavi, A., Kilic, H. and Yildirim. (2005). A Screening of chemical composition and antifungal and antioxidant activities of the essential oils from three Turkish artemisia species. *J Agric Food Chem.*, 53(5), 1408-16.

- Kothari, V., Shah, A., Gupta, S., Punjabi, A. and Ranka, A. (2010). Revealing the antimicrobial potential of plants. *International Journal of Biosciences and Technology*, 3(1), 1-20.
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. y Nychas, G. J. E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol.*, 9,453-462.
- Lang, G. y Buchbauer, G. (2012). A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 27, 13-39.
- Larrea, H., Ugaz, C. y Flórez, M. (2018). El sistema de agronegocios en el Perú: de la agricultura familiar al negocio agroalimentario. *Revista Mexicana de Agronegocios*, 45, 1-17.
- Latorre, B., Elfar, K. y Ferrada, E. (2015). Gray mold caused by *Botrytis cinerea* limits grape production in Chile. *Cienc. Inv, Agr.*, 42(3), 305-330.
- Latorre, B.A., y Torres, R. (2012). Prevalence of isolates of *Botrytis cinerea* resistant to multiple fungicides in Chilean vineyards. *Crop Prot.*, 40, 49-52.
- Lee, S. H., Chang, K. S., Su, M. S., Huang, Y. S. y Jang, H. D. (2007). Effects of some Chinese medicinal plant extracts on five different fungi. *Food Control*, 18, 1547-1554.
- Leyronas, C., and P.C. Nicot. (2013). Monitoring viable airborne inoculum of *Botrytis cinerea* in the South-East of France over 3 years: relation with climatic parameters and the origin of air masses. *Aerobiologia*, 29, 291-299.
- Llana-Ruiz-Cabello, M., Pichardo, S., Maisanaba, S., Puerto, M., Prieto, AI., et al. (2015). In vitro toxicological evaluation of essential oils and their main compounds used in active food packaging: a review. *Food and Chemical Toxicology*, 81, 9-27.
- Malinovsky, F.G., Fangel, J. U. y W.G. Willats (2014). The role of the cell wall in plant immunity. *Front. Plant. Sci.*, 5, 178.

- Manso, S., Pezo, D., Gómez-Lus, R. y Nerín, C. (2014). Diminution of aflatoxin B1 production caused by an active packaging containing cinnamon essential oil. *Food Control*, 45, 101-108.
- Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S., Falconieri, D., Maxia, A., Frau, M., Goncalves, M., Cavaleiro, C. y Salgueiro, L. (2013). Isolation of the volatile fraction from *Apium graveolens* L. (Apiaceae) by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation: chemical composition and antifungal activity. *Natural Prod. Res.*, 27 (17), 1521–1527.
- Mengal, H. S., Abro, M. A., Jatoi, G. H., Nawad, L., Poussio, G. B., Ahmed, N., Zehri, A. Q. y Ali, A. (2019). Efficacy of different fungicides, botanical extracts and bio-control agents against *Cladosporium cladosporioides*, the causal agent of *Cladosporium* rot in grapes. *Acta Ecologica Sinica*. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2019.08.002>.
- Moghaddam, M., Miran, S.N.K., Pirbalouti, A.G., Mehdizadeh, L. y Ghaderi, Y. (2015a). Variation in essential oil composition and antioxidant activity of cumin (*Cuminum cyminum* L.) fruits during stages of maturity. *Ind. Crop. Prod.*, 70, 163-169.
- Moghaddam, M., Pirbalouti, A.G., Mehdizadeh, L. y Pirmoradi, M.R. (2015b). Changes in composition and essential oil yield of *Ocimum ciliatum* at different phenological stages. *Eur. Food Res. Technol.*, 240 (1), 199-204.
- Muhammad, S., Zafar, I., Ahmad, S. y Muhammad, A. (2009). Association of *Lasiodiplodia theobromae* with different decline disorders in mango (*Mangifera indica* L.) *Pak. J. Bot.*, 41(1), 359-368.
- Mundy, D.C., R.H. Agnew, y Wood, P. N. (2012). Grape tendrils as an inoculum source of *Botrytis cinerea* in vineyards: a review. *N.Z. Plant Prot.*, 65, 218-227.
- Murbach, B.F., Nunes, B. y da Silva, I. (2014). Antimicrobial activity of essential oils. *Journal of essential Oil Research.*, 26(1), 34-40. doi: [10.1080/10412905.2013.860409](https://doi.org/10.1080/10412905.2013.860409)
- Nam, M. H., Park, M. S., Kim, H. S., Kim, T. I. y Kim, H. G. (2015). *Cladosporium cladosporioides* and *C. tenuissimum* cause blossom blight in strawberry in Korea. *Microbiology*, 43 (3), 354-359.

- Naveed, R., Hussain, I., Tawab, A., Tariq, M., Rahman, M. y Hameed, S. (2013). Antimicrobial activity of the bioactive components of essential oils from Pakistani spices against Salmonella and other multi-drug resistant bacteria. *BMC Complement Altern Med*, 13, 265.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R. y De Feo, V., (2013). Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmacology*, 6, 1451-1474.
- Nieto, G. (2017). Biological activities of three essential oils of the Lamiaceae family. *Medicines*, 4, 63.
- Niu, J., Hou, X., Fang, C., An, J., Ha, D., Qiu, L., Ju, Y., Zhao, H., Du, W. y Qi, J. (2015). Transcriptome analysis of distinct *Lindera glauca* tissues revealed the differences in the unigenes related to terpenoid biosynthesis. *Gene.*, 559 (1), 22-30.
- Okigbo, R. N., Ogbonnaya, U. O. (2006). Antifungal effects of two tropical plant leaf extracts (*Ocimum gratissimum* and *Aframomum melegueta*) on postharvest yam (*Dioscorea* spp.) rot. *Afr J Biotechnol.*, 5(9), 727-731
- Oliveira, H., Rego, M. y Nascimento, T. (2004). Decline of Young grapevines caused by fungi. *Acta Horticulturae*, 652, 295-304.
- Ortiz, M. (2019, Setiembre). Perú en vías a transformarse en una potencia agroalimentaria. *Redagícola*. Recuperado de <https://www.redagricola.com/pe/peru-vias-transformarse-una-potencia-agroalimentaria/>.
- Oviedo, M. S. (2012). Ecofisiología de *Alternaria* spp. en soja. Micotoxinas. Río Cuarto. Córdoba. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Río Cuarto. Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales.
- Pavón Moreno, M. Á. (2012). Importancia del género *Alternaria* como productor de micotoxinas y agente causal de enfermedades humanas. Madrid. España. *Nutrición Hospitalaria*, 27 (6), 1772-1781.
- Petrasch, S, Knapp, S. J, Van Kan, J. A. L y Blanco-Ulate, B. (2019). Grey mould of strawberry. *Molecular Plant Pathology*. DOI: 10.1111/mpp.1279 4.
- Picos-Muñoz, P. A., García-Estrada, R. S., León-Félix J., Sañudo- Barajas, A. y Allende-Molar R. (2015). *Lasiodiplodia theobromae* en cultivos agrícolas de México:

- Taxonomía, hospedantes, diversidad y control. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 33 (1), 54-74.
- Pirbalouti, A.G., Hossayni, I. y Shirmardi, H.-A. (2013). Essential oil variation, antioxidant and antibacterial activity of mountain fennel (*Zaravschanica membranacea* (Boiss.) M. Pimen.). *Ind. Crop. Prod.*, 50, 443-448.
- Prasad, N. R., Anandi, C., Balasubramanian, S. y Pugalendi, K. V. Antidermatophytic activity of extracts from *Psoralea corylifolia* (Fabaceae) correlates with the presence of a flavonoid compound. *J Ethnopharmacology*, 2004; 91: 21–24.
- Reichling, J. (2018). Plant-Microbe Interactions and Secondary Metabolites with Antiviral, Antibacterial and Antifungal Properties. *Annual Plant Reviews online*, 2018, 189-279.
- Rajput, S.B. y Karuppayil, S.M. (2013). Small molecules inhibit growth, viability and ergosterol biosynthesis in *Candida albicans*. *Springerplus*, 2, 26.
- Ramos-García, M. D., Bautista-Baños, S., Barrera-Necha, L. L., Bosquez-Molina, E., AliaTejagal, I., y Estrada-Carrillo, M. (2010). Compuestos Antimicrobianos Adicionados en Recubrimientos Comestibles para Uso en Productos Hortofrutícolas. *Revista mexicana de Fitopatología*, 28 (1), 44-57.
- Rangel, E. A. (2016). Respuesta a inhibidores de melanina y condiciones de estrés en el hongo *Lasiodiplodia theobromae*. Centro de Investigación científica y de Educación Superior de ensenada, Baja California. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias.
- Rioba, N.B., Itulya, F.M., Saidi, M., Dudai, N. y Bernstein, N. (2015). Effects of nitrogen, phosphorus and irrigation frequency on essential oil content and composition of sage (*Salvia officinalis* L.). *J. Appl. Res. Med. Arom. Plant.*, 2 (1), 21-29.
- Rodríguez, G.E. (2010). *Lasiodiplodia theobromae*: fitopatógeno de mango (*Mangifera indica*) y palto (*Persea americana*). Lima: Manufacturas Gráficas S.A.C.
- Robles-Yerena, L., Ayala-Escobar, V., Leyva-Mir, S. G., Lima, B. N., Camacho-Tapia, M. y Tovar-Pedraza, J. M. (2019). First report of *Cladosporium cladosporioides* causing leaf spot on tomato in Mexico. *Journal of Plant Pathology*, 101,759.

- Romagnoli, C., Bruni, R, Andreotti, E., Rai, M. K., Vicentini, C. B. y Mares, D. (2005). Chemical characterization and antifungal activity of essential oil of capitula from wild Indian *Tagetes patula* L. *Protoplasma*, 225(1-2), 57-65.
- Roman, S., Sanchez-Siles, L., and Siegrist, M. (2017). The importance of food naturalness for consumers: Results of a systematic review. *Trends in food science & technology*, 67, 44-57.
- Sadaka, F., Nguimjeu, C., Brachais, C. H., Vroman, I., Tighzert, L. y Couvercelle JP. (2014). WITHDRAWN: Review on antimicrobial packaging containing essential oils and their active biomolecules. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 20, 350.
- Sadeghi, H., Robati, Z., y Saharkhiz, M.J. (2015). Variability in *Zataria multiflora* Bioss. essential oil of twelve populations from Fars province. *Iran. Indus. Crops Products*, 67, 221-226.
- Salaverry, O. (2012). Haku mikumusum, la comida en el antiguo Perú. *Rev. Perú Med. Exp. Salud Pública*, 29(3), 409-413.
- Serey, R. A., Torres, R. y Latorre, B. A. (2007). Pre-and post-infection activity of new fungicides against *Botrytis cinerea* and other fungi causing decay of table grapes, *Ciencia e investigación agrarian*, 34 (3), 215–224.
- Shaaban, H. A. E., El-Ghorab, A., H., y Shibamoto, T. (2012). Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components: Review. *The Journal of Essential oil Research*, 24(2), 203-212.
- Sharma, N. y Tripathi, A. (2006). Fungitoxicity of the Essential oil *Citrus sinensis* on postharvest pathogens. *World J Micro Biotech.*, 22, 587-593.
- Shen, Q., Zhou, W., Li, H., Hu, L. y Mo, H. (2016). ROS involves the fungicidal actions of thymol against spores of *Aspergillus flavus* via the induction of nitric oxide. *PLoS ONE*, 11, e0155647.
- Smilanick, J.L., Mansour, M. F., Mlikota Gabler, F., Margosan, D. A. y Hashim-Buckey, J. 2010. Control of postharvest gray mold of table grapes in the San Joaquin Valley of California by fungicides applied during the growing season. *Plant Dis.*, 94, 250-257.

- Sun, O. L., Gyung, J. C., Kyoung, S. J., He, K.L., Kwang, Y. C. y Jin-Cheol, K. (2007). Antifungal Activity of Five Plant Essential Oils as Fumigant against Postharvest and Soil borne Plant Pathogenic Fungi. *Plant Path J.*, 23(2), 97-102.
- Tabassum, N., y Vidyasagar, G. M. (2013). Antifungal investigations on plant essential oils. A review. *Int. J. Pharm. Pharmacol. Sci.*, 5, 19–28.
- Tamayo, P. J. 2007. Enfermedades del aguacate. *Politécnica*, 4, 51-70.
- Tashiro, N., Noguchi, N., Ide, Y. y Kuchiki, F. (2013). Sooty spot caused by *Cladosporium cladosporioides* in postharvest Satsuma mandarin grown in heated greenhouses. *J. Gen. Plant Pathol.*, 79, 158-161.
- Tisserand, R. y Young, R., (2013). Essential Oil Safety: A Guide for Health Care Professionals. Elsevier Health Sciences, United Kingdom.
- Tongnuanchan, P. y Benjakul, S. (2014) Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *Journal of food science*, 79, 1231-1249.
- Tovar, P. J. M., Mora, A. J. A., Nava, D. C., Téliz, O.D., Villegas, M.Á. y Leyva, M.S.G. 2013. Control of *Lasiodiplodia theobromae*, the causal agent of dieback of sapote mamey [*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore and Stearn] grafts in Mexico. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 36, 233-238.
- Tullio, V., Nostro, A., Mandras, N., Dugo, P., Banche, G. y Cannatelli, M. A. (2007). Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapour contact methods. *J Appl Microbio.*, 102, 1544-1550.
- United Nations. Department of Economic and Social Affairs. Population Division. (2017). World population prospects: The 2017 revision. UN. URL: http://www.un.org/en/development/desa/population/events/pdf/other/21/21June_FINAL%20PRESS%20RELEASE_WPP17.pdf
- Valle-De la Paz, M., Guillén-Sánchez, D., Gijón- Hernández, A. R., Alía- Tejacal, I., López-Martínez, V., Juárez- López, P., Martínez- Fernández, V., Hernández- Arenas, M. y Ariza- Flores, F. (2019). Species of *Lasiodiplodia* in lima ‘Persa’ (*Citrus latifolia* Tanaka) in Morelos, Mexico. *Revista Bio Ciencias* 6 e595. DOI: 10.15741/revbio.06.01.35.

- Varela, F. S. E., Orozco, S. M., Torres, A.R.I. y Silva, A. G. L. (2013). Guía técnica para la identificación y manejo de plagas y enfermedades en cítricos. Universidad Autónoma de Tamaulipas 428 p.
- Sirirat, S., Wimolpun, R. y Sanit, S. (2009). Antifungal activity of essential oils derived from some medicinal plants against grey mould (*Botrytis cinerea*). *Asian J Food Ag-Ind., Special Issue*, S229-S233.
- Wu, X.Z., Cheng, A.X., Sun, L.M. y Lou, H.X. (2008). Effect of plagiocin E, an antifungal macrocyclic bis (bibenzyl), on cell wall chitin synthesis in *Candida albicans*. *Acta Pharmacol. Sin.*, 12, 1478–1485.
- Wrona, M., Bentayeb, K. y Nerín, C. (2015). A novel active packaging for extending the shelf-life of fresh mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Food Control*, 54, 200-207.
- Yew, S.M., Chan, C. L., Ngeow, Y.F., Toh, Y. F. et al. (2016). Insight into different environmental niches adaptation and allergenicity from the *Cladosporium sphaerospermum* genome, a common human allergy-eliciting Dothideomycetes. *Sci. Rep.* 6, 27008.
- Yildirim, S., Röcker, B., Kvalvåg Pettersen, M., Nilsen-Nygaard, J., Ayhan, Z. et al. (2018) Active packaging applications for food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17, 165-199.
- Yutani, M., Hashimoto, Y., Ogita, A., Kubo, I., Tanaka, T. y Fujita, K. (2011). Morphological changes of the filamentous fungus *Mucor mucedo* and inhibition of chitin synthase activity induced by anethole. *Phytother. Res.*, 25, 1707–1713.
- Zegarra, E. (2019). Auge agroexportador en el Perú: un análisis de sobrevivencia de productos y empresas. Recuperado de https://www.cies.org.pe/sites/default/files/investigaciones/ifinal_agroexport.pdf
- Zhang, J., 2014. *Lasiodiplodia theobromae* in citrus fruit (Diplodia stem-end rot). In: Bautista-Baños, S. (Ed.), Postharvest Decay. Control Strategies. Academic Press, Elsevier Inc., London, UK, pp. 309–335.

Zhang, Z.B., Q.G. Zeng, R.M. Yan, Y. Wang, et al. (2010). Endophytic *fungus Cladosporium cladosporioides* LF70 from *Huperzia serrata* produces Huperzine A. *World J. Microb. Biot.*, 27(3), 479-486.