

# Actividad inhibitoria del aceite esencial de *Lippia organoides* H.B.K sobre el crecimiento de *Phytophthora infestans*

## Antifungal activity of essential oil of *Lippia organoides* H.B.K on the growth of *Phytophthora infestans*

Óscar Arango Bedoya\*, Andrés Mauricio Hurtado Benavides,  
Diana Pantoja Daza y Lorena Santacruz Chazatar

Grupo de Investigación Tecnologías Emergentes en Agroindustria (TEA), Facultad de Ingeniería Agroindustrial, Universidad de Nariño. Ciudad Universitaria Torobajo, San Juan de Pasto, Nariño, Colombia. Autor para correspondencia: oscar769@hotmail.com

Rec.: 07.04.2014 Acep.: 09.29.2014

### Resumen

*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary es el fitopatógeno más perjudicial de la papa (*Solanum tuberosum*) al causar la enfermedad conocida como ‘gota o tizón tardío’. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad in vitro del aceite esencial obtenido de una especie de orégano silvestre (*Lippia organoides* H.B.K.) sobre *Phytophthora infestans*. Para el efecto se evaluaron diferentes concentraciones de este aceite esencial (10, 50, 100, 150, 200, 250 µg/ml) y de un fungicida comercial usado como testigo. La actividad antifúngica se determinó con base en la evaluación del crecimiento del micelio mediante el método de dilución en agar tomate. A partir de una concentración de aceite de 150 µg/ml se inhibió completamente el crecimiento del patógeno, por lo que ésta fue considerada como la concentración letal. Este estudio demostró que el aceite esencial de orégano silvestre del Alto Patía, Colombia, es un potencial agente antifúngico que podría ser usado en sistemas de control integrado de *P. infestans*.

**Palabras clave:** Aceite esencial, orégano, *Lippia organoides*, actividad antifúngica, *Phytophthora infestans*.

### Abstract

*Phytophthora infestans* is the most damaging agent for potato crops in the humid areas of the world, causing the disease known as ‘drop or late blight’. In vitro activity of an essential oil obtained from a wild oregano specie (*Lippia organoides*) was investigated. Different concentrations of the essential oil (10, 50, 100, 150, 200, 250 µg/mL) and a commercial fungicide used as control were evaluated. The antifungal activity was determined based on the assessment of mycelial growth by the agar tomato dilution method. From a concentration of 150 µg/mL the patogen’s growth was completely inhibited, therefore it was considered the lethal concentration. This study showed that essential oil of wild oregano from Alto Patía region, Cauca Department, Colombia, could be a potential antifungal agent to use in *P. infestans* integrated control systems.

**Keywords:** Essential oil, oregano, *Lippia organoides*, antifungal activity, *Phytophthora infestans*.

## Introducción

La reducción en el uso de fungicidas sintéticos en la agricultura es cada vez mayor, mientras que el uso de productos naturales es considerado como una alternativa interesante debido a sus bajos impactos negativos en el medio ambiente. *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary es el patógeno que causa el tizón tardío o gota de la papa, una enfermedad que ocasiona enormes pérdidas en las cosechas de este tubérculo, siendo los costos anuales de control y daño en Europa superiores a 1 billón de euros (Erwin y Ribeiro, 1996; Haverkort *et al.*, 2008). En Colombia, *P. infestans* es reconocido como el limitante de mayor incidencia en el cultivo de la papa debido, principalmente, a las condiciones climáticas favorables para su desarrollo y a la siembra de materiales altamente susceptibles (Lagos, 2002).

El tizón tardío es controlado mediante aplicaciones periódicas de pesticidas químicos, lo cual no sólo es altamente costoso sino además muy perjudicial para el ambiente, debido a la presencia de residuos del producto en el ambiente que causan resistencias en los microorganismos y afectan la salud humana debido a su lenta biodegradación (Murillo *et al.*, 2012; Isman, 2000). La reducción en la eficiencia, el elevado costo y el incremento de los daños colaterales sobre el ambiente de los fungicidas sintéticos, han generado la necesidad de desarrollar métodos de control y protección de los cultivos alternativos al uso de fungicidas y plaguicidas convencionales.

Los metabolitos secundarios de las plantas juegan un importante papel en su resistencia contra las plagas y enfermedades, por lo que las investigaciones sobre las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales permiten descubrir nuevos agentes para el control de fitopatógenos (Kordali *et al.*, 2007; Lee, 2007). Los compuestos químicos presentes en los aceites esenciales frecuentemente son activos contra un limitado número de especies microbianas, son productos biodegradables, no tóxicos y pueden ser utilizados en sistemas de manejo integrado de cultivos, por tanto constituyen una nueva clase de agentes seguros para el

control de enfermedades en plantas (Mine *et al.*, 2006). Los pesticidas de origen botánico resultan apropiados para la producción de alimentos orgánicos y juegan un papel importante en la producción y protección poscosecha de productos alimenticios en los países en desarrollo, razón por la cual la investigación científica sobre este tipo de productos es cada vez mayor (Gurjar *et al.*, 2012).

En la zona sur-occidente de Colombia, entre los departamentos de Cauca y Nariño, se encuentra la región del Alto Patía, caracterizada por un clima tropical muy seco, en la que crece de forma silvestre una especie conocida popularmente como 'orégano de monte' (*Lippia origanoides* H.B.K), planta perteneciente a la familia Verbenaceae que alcanza 3 m de altura, posee hojas verdes ovaladas muy aromáticas e inflorescencias en racimo, axilares y blancas. En Colombia esta planta se observa con frecuencia en los departamentos de Guajira, Magdalena, Cundinamarca, Norte de Santander y Santander (García-Barriga, 1992). La especie es nativa de algunos países de Centroamérica (México, Guatemala, Cuba) y Sudamérica (Colombia, Venezuela, Brasil) (Pascual *et al.*, 2001).

No obstante que en varios estudios se ha demostrado la actividad antimicrobiana de *L. origanoides* (Oliveira *et al.*, 2007; Dos Santos *et al.*, 2004) se conocen pocas investigaciones respecto a su efecto sobre hongos fitopatógenos. Bolívar *et al.* (2007) investigaron el efecto inhibitorio de extractos etanólicos de *L. origanoides* sobre el crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, encontrando un 100% de inhibición cuando aplicaron 2.5% del extracto en el medio de cultivo. Ospina *et al.* (2011). Evaluaron in vitro la actividad inhibitoria de aceites esenciales de *L. origanoides* sobre el desarrollo micelial y la formación de esclerocios de *Sclerotium cepivorum*, patógeno causante de la pudrición blanca en cebolla, encontrando que los aceites obtenidos a partir del quimiotipo I (timol 45%,  $\gamma$ -terpineno 13.5%, p-cimeno 10%) presentaron el mayor poder inhibitorio en el crecimiento del micelio y en la formación de esclerocios. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antifúngica del aceite

esencial de orégano de monte (AEO) (*L. origanoides*) de la región del Alto Patía contra *P. infestans*, agente causante de la enfermedad conocida como tizón tardío de la papa.

## Materiales y métodos

**Material vegetal.** Para el estudio, se recolectaron en forma manual hojas de *L. origanoides* en la zona del Alto Patía, municipio de Taminango, en límites entre los departamentos de Nariño y Cauca, al suroccidente de Colombia, las cuales fueron identificadas por su taxonomía en el Herbario de la Universidad de Nariño. La microrregión del estudio se caracteriza por un clima tropical seco, con temperatura promedio de 24°C, suelos semiáridos, baja precipitación (700 - 900 mm/año) y vegetación típica de un enclave subxerofítico. La recolección de las hojas se realizó en la época inmediatamente posterior al periodo de lluvias, entre julio y agosto del 2011. Las hojas se separaron de los materiales extraños, se pesaron y después se secaron a la sombra a temperatura ambiente (18°C) durante 8 días, hasta alcanzar una humedad aproximada de 12%, para proceder a su conservación en sacos de polietileno que fueron cuidados en un lugar limpio y libre de humedad hasta su procesamiento.

**Extracción del aceite esencial.** El proceso de extracción del AEO se realizó en la Planta Piloto de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad de Nariño, utilizando la técnica de arrastre con vapor. Las condiciones de operación del equipo de extracción fueron: tiempo 2 h, densidad de lecho 80 g/lit y presión de vapor de 0.32 psig. El rendimiento de extracción se calculó dividiendo el peso de aceite extraído entre el peso de muestra seca depositada en el equipo de extracción expresado en porcentaje.

**Análisis de la composición del aceite esencial.** Se utilizó un cromatógrafo de gases Shimadzu GC17A versión 3, equipado con un inyector split/splitless a temperatura de 250 °C, relación split 1:100 y un detector de ionización en llama (FID) (280 °C). Para la separación de mezclas se empleó una columna apolar DB-5 (JyW) de 30 m x 0.25 mm D.I. y 0.25 µm de una fase estacionaria de 5% fenil-polietilsiloxano. La temperatura del

horno fue programada a 40°C (5 min) hasta 250°C a 5°C/min. El volumen de los extractos inyectado fue de 1.0 µl. Los espectros de masas se obtuvieron en modo SCAN en un intervalo de masas entre 38 y 450 m/z. Para la identificación de los compuestos por medio de índices de Kovats se utilizó como referencia la mezcla de parafinas de C<sub>6</sub>- C<sub>32</sub>. Para confirmar la identificación de los metabolitos secundarios del aceite esencial se realizó un análisis por GC-MS en el Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander, utilizando un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890N acoplado a un detector selectivo de masas (MSD) Agilent Technologies 5975 Inert, operado en el modo barrido completo (full scan) de radiofrecuencia. La columna empleada en dicho análisis fue DB-WAX (J y W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.). La identificación de los compuestos químicos se basó en sus índices de retención y comparación de sus espectros de masas con aquellos de las librerías de Wiley y Adams.

**Obtención del patógeno.** Para obtener el patógeno se recolectaron muestras de tejido infectado en un lote experimental de papa, en el cual no se hicieron aplicaciones de productos químicos para el control de la enfermedad. El material fue llevado al Laboratorio de Fitopatología de la Universidad de Nariño, donde se cortó en trozos de 5 x 5 mm, se desinfectó con hipoclorito de sodio al 3% por 2 min y se enjuagó con agua destilada durante 1 min (Zapata *et al.*, 2003). Este material, consistente en cuatro trozos de hojas, fue sembrado en cajas Petri con medio de cultivo agar-tomate, adicionando una solución de Rifampicina<sup>®</sup> de 300 mg disuelta en 50 ml de etanol al 96% para evitar el crecimiento de bacterias, luego se incubaron durante 3 días. El patógeno se purificó por transferencia continua a nuevas cajas Petri hasta obtener una colonia pura de *P. infestans*. La identificación se realizó mediante el uso de claves taxonómicas, según se describe en el trabajo de Jaramillo (2003).

**Inoculación en el medio de cultivo.** El medio de cultivo esterilizado se sirvió en las cajas Petri enmendado con aceite esencial de orégano o con Ridomil Gold<sup>®</sup> (Metalaxyl-M

4% + Mancozeb 64%) según el diseño experimental que se describe más adelante. Este fungicida se eligió por ser el producto químico más comúnmente usado por los agricultores para el control del patógeno. Cuando el medio solidificó se inoculó con un disco del patógeno de micelio de 1.1 cm de diámetro, el cual se sembró en el centro de cada caja. En el caso de los tratamientos con aceite esencial de orégano se utilizó Tween-20 como agente emulsificante, en una relación 1:1 Tween-20: aceite de orégano.

**Diseño experimental.** Se empleó un diseño completamente al azar, en arreglo factorial con dos factores: el factor A consistió en los tratamientos con aceite esencial de orégano y un fungicida comercial como control (Ridomil Gold®); el factor B correspondió a las concentraciones (10, 50, 100, 150, 200, 250 µg/ml) de aceite esencial y Ridomil. El intervalo de concentraciones evaluado para el aceite esencial se determinó mediante ensayos previos, excluyendo concentraciones mayores en las cuales no se observó crecimiento del patógeno. Se incluyeron dos testigos, uno absoluto, es decir, únicamente con el medio de cultivo, el cual sirvió como control de posible contaminación durante el proceso de inoculación y otro, aplicando Tween-20 al medio de cultivo, en las mismas concentraciones que los tratamientos con aceite esencial. Por cada ensayo se sembraron porciones de hojas en cinco cajas Petri.

**Determinación de la sensibilidad del patógeno.** El comportamiento in vitro de los aislamientos fue evaluado en relación con el crecimiento radial de las colonias de *P. infestans* en los diferentes tratamientos. Cada unidad experimental fue evaluada mediante el programa gráfico Tpsdig2® después de un periodo de incubación de 8 días a temperatura de 18 °C (García *et al.*, 2008). El porcentaje de crecimiento fue determinado según la relación propuesta por Riveros *et al.* (2003):

$$PC = \frac{DMCM - 1.1cm}{DMCA} * 100$$

donde, PC = porcentaje de crecimiento, DMCM = diámetro medio de la colonia creciendo en tratamiento; 1.1 cm = diámetro

del cilindro con micelio, DMCA = diámetro medio de la colonia inoculada en el control con Tween-20. Finalmente se determinó la sensibilidad de los aislamientos evaluados mediante la escala propuesta por Shattock (1988) que se presenta en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Escala de sensibilidad propuesta por Shattock.

Nivel de sensibilidad	Crecimiento respecto al testigo absoluto (%)
Sensibles (S):	Menor que 10%
Intermedio (I):	Entre 10 y 60%
Resistente (R):	Mayor que 60%

**Análisis estadístico.** Para determinar la significancia estadística de los tratamientos se utilizó la técnica de análisis de varianza (Anova) con un nivel de significancia de 5% (P = 0.05). La evaluación de diferencias entre las medias de los tratamientos tuvo lugar mediante la prueba de Tukey. Para el análisis de resultados se empleó el programa estadístico Statgraphics Plus 5.0 (Statistical Graphics Corp. 1994-2000).

## Resultados y discusión

### Composición del aceite esencial

Con la técnica de arrastre por vapor se encontró un rendimiento de extracción de aceite esencial de orégano de 3.27% (g/g -aceite esencial/materia seca) el cual se puede considerar alto, si se compara con el de otras especies comerciales como menta (1.1 - 2.2%), limoncillo (0.02 - 0.19%), albahaca (1.3 - 2.1%) y manzanilla (0.03-0.3%) (Cannon *et al.*, 2013; Gawde *et al.*, 2014). Los componentes mayoritarios presentes en el aceite esencial utilizado en este estudio fueron en su orden: timol (73.7%),  $\rho$ -cimeno (10.5%), mirceno (3.1%) y  $\gamma$ -terpineno (2.9%). En trabajos previos los autores del presente estudio encontraron que la composición del aceite esencial de *L. origanoides* puede ser afectada por el método de extracción (Arango *et al.*, 2012a) y por factores ambientales (Arango *et al.*, 2012b). Según los componentes mayoritarios presentes en el aceite esen-

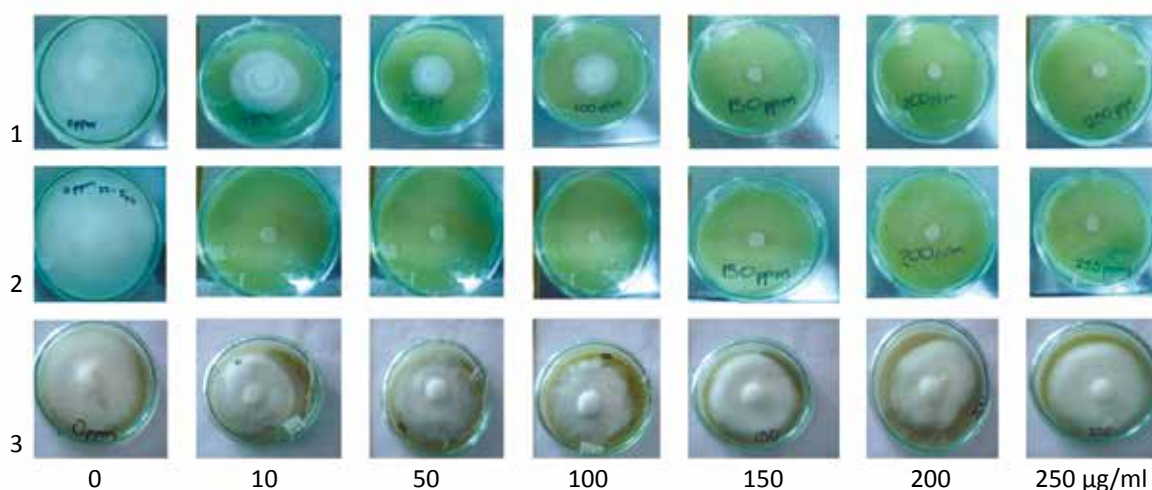
cial, se han encontrado diferentes quimiotipos de *L. organoides* en Colombia, Brasil y Venezuela. Por lo menos se han diferenciado tres quimiotipos, dos de ellos cuyos principales componentes son carvacrol y timol y un tercero, menos común, caracterizado por la ausencia o muy bajo contenido de estos compuestos (Stashenko *et al.*, 2010). Estas diferencias químicas pueden estar relacionadas con las características de los suelos, las condiciones climáticas y con variaciones genéticas intraespecíficas.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, el aceite esencial del orégano silvestre del Alto Patía corresponde a un quimiotipo muy rico en timol, lo que resalta el gran potencial de aprovechamiento industrial que podría tener esta especie, ya que este compuesto fenólico ha sido tema de nume-

rosos estudios por su actividad antioxidante (Ramos *et al.*, 2014; Quiroga *et al.*, 2014; Arango *et al.*, 2012c; Wojdylo *et al.*, 2007) y antimicrobiana (Ramos *et al.*, 2012; Guarda *et al.*, 2011; Michiels *et al.*, 2007; Falcone *et al.*, 2007; Bagamboula *et al.*, 2004).

### Evaluación de la capacidad antifúngica del aceite de orégano

En la Foto 1 se observa que el Tween-20 no presentó efecto como inhibidor del crecimiento del patógeno, por el contrario, el Ridomil® inhibió completamente el crecimiento del patógeno a partir de la mínima concentración (10 µg/ml). Con el aceite de orégano la acción antifúngica fue evidente ya que se redujeron los porcentajes de crecimiento micelial del patógeno con el aumento de las concentraciones evaluadas. (Cuadro 2).



**Foto 1.** Cajas Petri sembradas con *P. infestans* en medios enmendados con: (1) aceite esencial de orégano, (2) Ridomil®, (3) Tween 20. Concentraciones expresadas en µg/ml.

**Cuadro 2.** Porcentajes de crecimiento de *P. infestans* en medio de cultivo enmendado con AEO y niveles de sensibilidad, según escala de Shattock.

Concentración (µg/ml)	Crecimiento micelial (cm)	Crecimiento (%)	Nivel de sensibilidad
0	9.0	100.0	Resistente
10	6.2	58.4	Intermedio
50	5.8	47.5	Intermedio
100	6.5	46.4	Intermedio
150 - 250	0	0	Sensible

Como se observa en el Cuadro 2 el aceite esencial de orégano inhibió el patógeno *P. infestans* in vitro, causando una reducción media de crecimiento de 52.5% con una dosis de 50 µg/ml y una clasificación 'inter-medio' en la escala de sensibilidad, con un crecimiento entre 10 y 60% con respecto al testigo absoluto. Cuando el medio de cultivo fue enmendado con una concentración igual o superior que 150 µg/ml de AEO se inhibió completamente el crecimiento micelial del patógeno, por tanto el inóculo se llevó a cajas Petri con medio sin aceite esencial de orégano y se incubó durante otros 16 días, con el fin de evaluar si en estas concentraciones el aceite presenta efecto fungicida o fungistático. Después de este tiempo no se observó crecimiento, por tanto se deduce que en dichas concentraciones el aceite de orégano tiene actividad fungicida.

El valor CE<sub>50</sub>, es decir, la concentración de AEO que permite una inhibición en el crecimiento del patógeno de 50%, fue 20.53 µg/ml; mientras que el valor CE<sub>50</sub> encontrado para el fungicida comercial Ridomil® fue 4.73 µg/ml, siendo similar al valor citado en la literatura para este producto (García *et al.*, 2008). Como era de esperar, el CE<sub>50</sub> para Ridomil® fue inferior al del AEO, debido

a que éste es un fungicida de síntesis química que bloquea la transcripción del RNA, no obstante, la utilización prolongada, y en ocasiones exagerada de este tipo de productos puede ocasionar, no solo el desarrollo de cepas resistentes (Pomerantz *et al.*, 2014) sino además afectar el suelo y los ecosistemas (Smalling *et al.*, 2013), en consecuencia, el uso de sustancias de origen natural, como el AEO, es una alternativa posible para el control de fitopatógenos.

En el Cuadro 3 se presenta el análisis de varianza para los resultados entre los tratamientos vs. porcentajes de crecimiento del patógeno. Se observan diferencias (P < 0.05) entre los productos, lo que fue comprobado mediante la prueba de rangos múltiples de Tukey. En las cajas Petri enmendadas con AEO, el patógeno *P. infestans* tuvo un crecimiento promedio de 35.95% respecto al crecimiento del testigo absoluto; en las cajas con Ridomil el crecimiento medio fue de 14.28% y en las cajas con Tween-20 fue 87.37%, lo que indica que este último no presentó inhibición sobre la *P. infestans* y que la inhibición observada en los ensayos con AEO se debe únicamente a la acción de sus componentes.

**Cuadro 3.** Análisis de varianza para porcentaje de crecimiento del patógeno *P. infestans* según tratamientos.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrados mínimos	Valor F	Valor P<
Concentración	57934.1	6	9655.68	30.62	0.00001
Producto	98643.0	2	49321.5	156.40	0.00001
Residual	30273.3	96	315.347	—	—
TOTAL (corregido)	186850.0	104	—	—	—

En varios estudios se ha demostrado la actividad antimicrobiana de especies del género *Lippia*, que se caracterizan por ser ricas en compuestos fenólicos como timol y carvacrol, entre ellas *L. graveolens* (Salgueiro *et al.*, 2003) y *L. origanoides* (Dos Santos *et al.*, 2004). En el presente estudio, el efecto inhibidor que presenta el aceite esencial de orégano silvestre del Alto Patía sobre *P. infestans* se puede atribuir principalmente a su alto contenido de timol (73%), ya que este

compuesto tiene una comprobada acción antifúngica (Braga *et al.*, 2007). Krolow *et al.* (2006) evaluaron la actividad antifúngica de aceite esencial de *Origanum vulgare* contra el patógeno *P. infestans* y encontraron que a una concentración de 100 µg/ml se redujo el crecimiento en 59.84%, valor similar al encontrado en el presente estudio. En México (Gamboa *et al.*, 2002) evaluaron el efecto de extractos metanólicos de *O. mejorana* sobre el crecimiento micelial de *P. infestans*, en-

contrando un efecto inhibitor de 100% con dosis de 8000 ppm, siendo muy superior a las del AEO del presente estudio, lo que puede ser debido a que en los extractos acuosos o metanólicos los componentes activos están muy diluidos y suelen ser diferentes a los de los aceites esenciales.

Los mecanismos de la actividad anti-fúngica de los monoterpenos, como timol y carvacrol, aún no han sido completamente explicados; no obstante Marei *et al.* (2012) consideran que, como agentes lipolíticos, estos ejercen una acción sobre la membrana y las enzimas presentes en ella. Estos investigadores encontraron que el timol es un potencial inhibidor de la pectin metil esterasa, enzima que modifica el grado de metil-esterificación de las pectinas, que son los principales componentes de las paredes celulares de los hongos, lo que conlleva cambios en la adhesión celular, la plasticidad, el pH y el contenido iónico de esta pared celular, e influye en la permeabilidad e integridad de la membrana. Numpaque *et al.* (2011) consideran que el carvacrol (isómero del timol) puede actuar como intercambiador de protones, al reducir el gradiente de pH a través de la membrana citoplasmática, lo que ocasiona un colapso en la fuerza motriz de protones y la muerte celular. Si bien los resultados de la actividad *in vitro* del AEO sobre *P. infestans* resultan prometedores, es necesario realizar estudios que permitan evaluar su comportamiento y efectividad en campo, además de otros aspectos como su residualidad, fitotoxicidad e interacción con el medioambiente.

### Conclusiones

- En condiciones *in vitro* el aceite esencial de orégano de monte (*Lippia origanoides*) de la región del Alto Patía, Colombia, presenta un efecto fungicida sobre el fitopatógeno *Phytophthora infestans*.
- La concentración de aceite de orégano que permitió una inhibición en el crecimiento del patógeno de 50% (CE<sub>50</sub>) fue de 20.53 µg/ml. Por tanto, este aceite esencial podría ser incorporado dentro de un programa de manejo integral de la enfermedad del tizón tardío de la papa,

con el fin de reducir la aplicación de productos químicos.

### Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos a la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad de Nariño, por el financiamiento de esta investigación.

### Referencias

- Arango, O.; Bolaños, F.; Villota, O.; Hurtado, A.; y Toro, I. 2012a. Optimización del rendimiento y contenido de timol de aceite esencial de orégano silvestre obtenido por arrastre con vapor. *Biot. Sector Agrop. Agroind.* 10(2):217–226.
- Arango, O.; Hurtado, A.; y Toro, I. 2012b. Efecto del origen, la época de recolección y la edad de las hojas sobre el rendimiento y el contenido de timol de los aceites esenciales de *Lippia origanoides* H.B.K. *Acta Agronómica* 61(3):207 – 213.
- Arango, O.; Pantoja, D.; Santacruz, L.; y Hurtado, A. 2012c. Actividad antioxidante del aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides* H.B.K.) del Alto Patía. *Biot. Sector Agrop. Agroind.* 10(2):79 – 86.
- Bagamboula, C. F.; Uyttendaele, M.; y Debevere, J. 2004. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigellasonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiol.* 21:33 – 42.
- Bolívar, K.; Sanabria, M.; Rodríguez, D.; Ulacio, D.; y Pérez, M. 2007. Efecto de extractos de plantas y el método de inoculación sobre el control *in vitro* de *Colletotrichum gloesporioides* (penz.) penz. y sacc. XX Congreso Venezolano de Fitopatología. Sociedad Venezolana de Fitopatología. 20(2):75.
- Braga, C.; Alfierim, M.; y Dal Sasso, M. 2007. Inhibitory activity of thymol against the formation and viability of *Candida albicans* hyphae. *Mycoses.* 50(6):502 – 506.
- Cannon, J.; Cantrell, C.; Astatkie, T.; y Zheljzkov, V. 2013. Modification of yield and composition of essential oils by distillation time. *Ind. Crops Prod.* 41:214 – 220.
- Dos Santos, F.; Lopes, J.; y Cito, G. 2004. Composition and biological activity of essential oils from *Lippia origanoides* H.B.K. *J. Essential Oil Res.* 16 (5):504 – 506.
- Erwin, D.; y Ribeiro, O. 1996. *Phytophthora diseases worldwide*. Department of Plant Pathology, University of California, Riverside, USA. *Amer. Phytopath. Soc. Press.* P. 562.
- Falcone, P.; Mastromatteo, M.; Del Nobile, M.; Corbo, M.; y Sinigaglia, M. 2007. Evaluation

- in vitro antimicrobial activity of thymol toward hygiene-indication and pathogenic bacteria. *J. Food Prot.* 70(2):425 - 431.
- Gamboa, R.; Hernandez, F.; Guerrero, E.; y Sánchez, A. 2002. Inhibición del crecimiento micelial de *Rhizoctonia solana* Kuhn. y *Phytophthora infestans* Mont. (De Bary) con extractos vegetales metanólicos de hojas én (*Flourensia cernua* D.C), mejorana (*Origanum majorana* L.) y trompetilla (*Bouvardia ternifolia* (Ca.) Schlecht.). *Rev. Mex. Fitop.* 21(1):13 - 18.
- García, H.; Marín, M.; Jaramillo, S.; y Cotes, J. 2008. Sensibilidad de aislamientos colombianos de *Phytophthora infestans* a cuatro fungicidas sistémicos. *Agron. Col.* 26(1):47 - 57.
- García-Barriga, H. G. 1992. Flora Medicinal de Colombia. Botánica Médica. Tomo II. 2ª ed, Bogota: Tercer Mundo. p. 508.
- Guarda, A.; Rubilar, J.; Miltz, J.; y Galotto, M. 2011. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *Intern. J. Food Micr.* 146(2):144 - 150.
- Gurjar, M.; Ali, S.; Akhtar, M.; y Sing, K. 2012. Efficacy of plant extracts in plant disease management. *Agric. Sci.* 3:425 - 433.
- Haverkort, A.J.; Boonekamp, P.M.; Hutten, R.; Jacobsen, E.; Lotz, L.A.; y Kessel, G.J. 2008. Societal costs of late blight in potato and prospects of durable resistance through cisgenic modification. *Potato Res.* 51:47 - 57.
- Isman, M. 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Prot.* 19:603-608.
- Jaramillo-Villegas, S. 2003. Monografía sobre *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.
- Kordali, S.; Kotan, R.; y Cakir, A. 2007. Screening of *in vitro* antifungal activities of 21 oxygenated monoterpenes as plant disease control agents. *Allelopathy J.* 19:373 - 392.
- Krolow, V.; Bauer, C.; y Costa, J. 2006. Efeito de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de *Phytophthora infestans* em batata. Resumos do I Congresso Brasileiro de Agroecologia. Ver. Brasil. *Agroec.* 1(1):1712 - 1724.
- Lagos, L. E. 2002. Aislamiento y caracterización genética de las poblaciones de *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary en las zonas productoras de papa (*Solanum tuberosum* L.) en el departamento de Nariño. Tesis M.Sc en Microbiología. Universidad del Valle. Cali, Valle del Cauca, Colombia. 45 p.
- Lee, H. 2007. Fungicidal property of active component derived from *Acorus gramineus* rhizome against phytopathogenic fungi. *Biores. Techn.* 98:1324 - 1328.
- Marei, G.; Rasoul, M.; y Abdelgaleil, S. 2012. Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. *Pesticide Bioch. Physiol.* 103:56 - 61.
- Michiels, J.; Missotten, J.; Fremaut, D.; De Smet, S.; y Dierick, N. 2007. In vitro dose-response of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde and interaction of combinations for the antimicrobial activity against the pig gut flora. *Livestock Sci.* 109:157 - 160.
- Mine, S.; Soylu, S.; y Kurt, S. 2006. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathologia* 161:119 - 128.
- Murillo, W.; Araque, P.; y Pelaez, C. 2012. Actividad fungicida e insecticida de emulsiones agua/aceite de mezclas de extractos de nicotina tabacum, *Azadiractha indica* y *Eucalyptus tereticornis*. *Inform. Tecnol.* 23(1):139 - 152.
- Numpaque, M.; Oviedo, L.; Gil, J.; García, C.; y Durango, D. 2013. Thymol and carvacrol: bio-transformation and antifungal activity against the plant pathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* and *Botryodiplodia theobromae*. *Trop. Plant Pathol.* 36(1):003-013.
- Oliveira, D.; Leitao, G.; Bizzo, H.; Lopes, D.; Alviano, D.; Alviano, C.; y Leitão, S. 2007. Chemical and antimicrobial analysis of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. *Food Chem.* 101:236 - 240.
- Ospina, D.; Álvarez, V.; Torres, H.; Sánchez, M.; y Bonilla, C. 2011. Evaluación *in vitro* de la actividad inhibitoria de aceites esenciales de *Lippia origanoides* H.B.K. sobre el desarrollo micelial y la formación de esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk. *Acta Agronómica* 60(4):306 - 311.
- Pascual, M.E.; Slowing, K.; Carretero, E.; Sánchez, M.D.; y Villar, A. 2001. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *J. Ethnoph.* 76:201 - 214.
- Pomerantz, A.; Cohen, Y.; Shufan, E.; Ben-Naim, Y.; Mordechai, S.; Salman, A.; y Huleihel, M. 2014. Characterization of *Phytophthora Infestans* resistance to Mefenoxam using FTIR Spectroscopy. *J. Photoch. Photobiol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.10.005>.
- Quiroga, P.; Asensio, C.; y Nepote, V. 2014. Antioxidant effects of the monoterpenes carvacrol, thymol and sabinene hydrate on chemical and sensory stability of roasted sunflower seeds. *J. Sci. Food Agric.* 10.1002/jsfa.6744.
- Ramos, M.; Beltrán, A.; Peltzer, M.; Valente, A.; y Garrigós, M. 2014. Release and antioxidant activity of carvacrol and thymol from polypropylene active packaging films. *Food Sci. Technol.* 58:470 - 477.



- Ramos, M.; Jiménez, A.; Peltzer, M.; y Garrigós, M. 2012. Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. *J. Food Eng.* 109:513 - 519.
- Riveros, F.; Sotomayor, R.; Rivera, V.; Secor, G.; y Espinoza, B. 2003. Resistencia de *Phytophthora infestans* (montagne) de Bary a metalaxil, en cultivo de papas en el norte de Chile. *Agric. Téc.* 63(2):117 - 124.
- Salgueiro, R. L.; Cavaleiro, C.; Gonçalves, MJ.; y Proença, C. 2003. Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Lippia graveolens* from Guatemala. *Planta Medica* 69(1):80 - 83.
- Shattock, R. 1988. Studies on the inheritance or resistance to Metalaxil in *Phytophthora infestans*. *Plant Pathol.* 37:4 - 11.
- Smalling, K.; Kuivila, K.; Orlando, J.; Phillips, B.; Anderson, B.; Siegler, K.; Hunt, J.; y Hamilton, M. 2013. Environmental fate of fungicides and other current-use pesticides in a central California estuary. *Marine Poll. Bull.* 73:144 - 153.
- Stashenko, E.; Martinez, J.; Ruiz, C.; Arias, G.; Duran, C.; Salgar, W.; Cala, M. 2010. *Lippia organoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. *J. Separation Sci.* 33:93 - 103.
- Wojdylo, A.; Oszmiański, J.; y Czemerzys, R. 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem.* 105(3):940 - 949.
- Zapata, R.; Sanabria, M.; y Rodríguez, D. 2003. Reducción del desarrollo de hongos fitopatógenos con extracto de cardónlefaria (*Cereus deficiens* Otto y Diert). *Interciencia.* 28(5):302 - 306.