

Bioactividad de extracto de *Annona muricata* y aceites esenciales de *Citrus aurantium* contra *Phytophthora cinnamomi*

Bioactivity from *Annona muricata* extracts and essentials oils from *Citrus aurantium* against *Phytophthora cinnamomi*

VITOLA R, DEIMER^{1*} Biol, PÉREZ C, ALEXANDER^{2**} Ph.D.

¹Investigador FED, Sincelejo, Colombia.

²Universidad de Sucre, Grupo de Investigación Bioprospección Agropecuaria, Sincelejo, Colombia

Keywords:

Bioactive;
Inhibition;
Linalool;
Phytol;
Bitter Orange;
Biocontrol.

Abstract

The aim of this research was determining raised antifungal activity *in vitro* against *P. cinnamomi* essential oils of fresh sour orange leaves collected in the municipalities of Sincelejo, Sampués and La Unión and dichloromethane extracts of dried leaves collected soursop in the municipalities of La Unión and Sincelejo, Sucre department. Direct seeding method was used to determine the bioactivity of oils and extracts. Essential oil concentrations of 15 $\mu\text{L/mL}$, 17,5 $\mu\text{L/mL}$ and 20 $\mu\text{L/mL}$ were prepared and plant extracts concentrations of 0,05 g/mL, 0,07 g/mL, 0,1 g/mL and 0,5 g/mL were prepared. Finding that for all essential oils and extracts the concentration that showed similar results with the positive control (Agrifos) was 20 $\mu\text{L/mL}$ and 0,5 g/mL respectively. With regard to the chromatographic profiles Sampués essential oils and La Unión as major metabolite they showed the Linalool, while the collected Sincelejo Linalyl anthranilate showed. Plant extracts for soursop was the major metabolite Phytol. It is demonstrated that essential oils of bitter orange leaves and extracts of soursop leaves can be constituted as an agroecological alternative for the biocontrol of *P. cinnamomi*.

Palabras Clave:

Bioactivos;
Inhibición;
linalool;
fitol;
naranja agria;
biocontrol.

Resumen

El objetivo de esta investigación fue determinar la actividad antifúngica *in vitro* contra *P. cinnamomi* de aceites esenciales de hojas frescas de naranja agria recolectada en los municipios de Sincelejo, Sampués y La Unión, y de extractos en diclorometano de hojas secas de guanábana recolectadas en los municipios de Sincelejo y La Unión, departamento de Sucre. Se utilizó el método de siembra directa para determinar la bioactividad de los aceites y extractos. Para los aceites esenciales se prepararon concentraciones de 15 $\mu\text{L/mL}$, 17,5 $\mu\text{L/mL}$ y 20 $\mu\text{L/mL}$ y para los extractos vegetales se prepararon concentraciones de 0,05 g/mL, 0,07 g/mL, 0,1 g/mL y 0,5 g/mL. Encontrándose que para todos los aceites esenciales y extractos la concentración que mostró resultados similares al control positivo (Agrifos) fue de 20 $\mu\text{L/mL}$ y 0,5 g/mL respectivamente. Con respecto a los perfiles cromatográfico los aceites esenciales de Sampués y La Unión mostraron como metabolito mayoritario al Linalool, mientras que el recolectado en Sincelejo mostró al Antranilato de linalilo. Para los extractos vegetales de guanábana el metabolito mayoritario fue el Fitol. Queda demostrado que los aceites esenciales de hojas naranja agria y extractos de hojas de guanábana se pueden constituir como una alternativa agroecológica para el biocontrol de *P. cinnamomi*.

INFORMACIÓN

Recibido: 20-07-2016;

Aceptado: 21-10-2016.

Correspondencia autor:

*alexpcor@yahoo.com

** fitoquimicpn@gmail.com

Introducción

P. cinnamomi fue identificado por primera en el año de 1922 por Rands, y desde entonces ha sido blanco de muchas investigaciones debido a que es considerado patógeno de muchos sistemas de producción agrícola de importancia comercial. El impacto que *P. cinnamomi* ha tenido en el departamento de Sucre es considerable, puesto que las condiciones climáticas propician la proliferación de este fitopatógeno afectando principalmente el cultivo del aguacate (*Pera americana*). Según AGUILERA, (2013) el aguacate juega un papel importante en la economía de los montes de María, departamento de Sucre donde a finales del siglo XX eran la zona de mayor producción de aguacate en Colombia y a principios del siglo XXI era el sexto productor a nivel mundial, sin embargo esta producción ha disminuido en los últimos años a causa principalmente de las enfermedades que afectaron los cultivos.

Para el año 2014, el INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO (ICA) socializó los resultados obtenidos en el censo aguacatero en los Montes de María, departamento de Sucre e informó que aproximadamente el 50% de las plantas de aguacate habían muerto con sintomatología concerniente a la tristeza del aguacate causada por *P. cinnamomi*. Sin embargo, a pesar de las grandes pérdidas de producción esta fruta ha sido catalogada como a nivel mundial como la quinta fruta tropical de mayor importancia (VEGA, 2012), y Colombia en el periodo de 2012 a 2013 se ubicaba de quinta como los países más productores con 273.273,5 toneladas y en el periodo de 2013 a 2014 aumentó dos casilla ubicándose en el tercer puesto con 303.340 toneladas (FAOSTAT, 2016), lo que indica que la producción de esta fruta en Colombia ha ido aumento y tomando importancia en la economía, por lo que se hace necesario implementar alternativas de manejo idóneas.

Para reducir las grandes pérdidas económicas ocasionada por *P. cinnamomi* sobre los cultivos de aguacate se han recurridos a diferentes alternativas agroquímicas como es el uso de Agrifos 400 SL. Sin embargo, estos fungicidas causar daño sobre la salud, la biomasa terrestre y el ambiente, además de ocasionar la aparición de nuevas cepas de fitopatógenos resistentes a los agroquímicos. Diversas investigaciones

están encaminadas a la resolución de dicho problema mediante la búsqueda de alternativas ecológicamente amigables con el ambiente como es el uso de hongos y bacterias endófitas, así como productos del metabolismo secundarios de las plantas. El objetivo del presente trabajo fue determinar la actividad antifúngica *in vitro* de aceites esenciales de hojas frescas de naranja agria y extracto vegetal de hojas secas de guanábana contra *P. cinnamomi* agente causal de la enfermedad tristeza del aguacate en cultivos del departamento de Sucre, Colombia.

Materiales y métodos

Sitio de muestreo: El material vegetal hojas de guanábana (*Annona muricata*) y de naranja agria (*Citrus aurantium*) fueron recolectadas en diferentes localidades del departamento de Sucre. En el municipio de Sincelejo, el material vegetal de guanábana fue colectado en el sitio georeferenciado con coordenadas 9°18'54,94"N y 75°23'20,78"O, altura de 189 msnm y temperatura de 30°C, y para material de vegetal para naranja agria en las coordenadas 9°17'21,56"N y 75°23'27,78"O, altura de 201 msnm y temperatura de 28°C.

En el municipio de Sampedo, en el material vegetal de naranja agria fue colectado el sitio con coordenadas 9°11'28,26"N y 75°22'48,12"O, altura de 144 msnm y temperatura de 29°C. En el municipio de La Unión, el material vegetal de guanábana se recolectó en las coordenadas 8°51'37,19"N y 75°16'27,25"O, altura de 57 msnm y temperatura de 28°C, y la naranja agria en ese mismo municipio se colectó en las coordenadas 8°51'36,87"N y 75°16'27,21"O, altura de 57 msnm y temperatura de 29°C.

Para el aislamiento de *P. cinnamomi* las muestras de suelo fueron recolectadas en la Finca Hato-Camagüey en el municipio de San Juan Nepomuceno, Bolívar ubicado a los 9°55'13.6" N y 75°08'42.7 O. A 442 msnm. Usando una pala pequeña, se tomó suelo de la base de árboles que mostraban síntomas de marchitez a una profundidad aproximada de 5 a 15 cm de profundidad (ALVARADO-ROSALES *et al.*, 2008). Estas muestras fueron almacenadas en bolsas plásticas rotuladas, y se empacó en un contenedor de poliestireno expandido (icopor), y transportadas

al Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas de la Universidad de Sucre. Para el aislamiento de *P. cinnamomi* a partir de plántulas de aguacate con sintomatología de enfermedad de tristeza, las plantas fueron colectadas de un vivero localizado en la vereda el Paraíso del municipio de Colosó con coordenadas a los 9°28'41.514"N y 75°22'05.706" O.

Recolección y almacenamiento del material vegetal: El muestreo de las especies vegetales se llevó a cabo durante la puesta del sol, para evitar que las altas temperaturas pudieran volatizar algunos componentes presentes en las muestras. El material vegetal se empacó en un contenedor de poliestireno expandido (icopor) y se preservó a 25°C (GRANADOS *et al.*, 2012). Muestras de cada una de las plantas, fueron identificadas en el Herbario de la Universidad de Sucre, registro nacional de colecciones biológicas.

Procesamiento del material vegetal: Las plantas y sus tejidos colectados fueron lavados con agua y seleccionados para garantizar su buen estado. El material para corroborar su identidad taxonómica se sometió a deshidratación con alcohol al 70% y después de 8 días se llevó a un horno a 60°C por 48 horas y posteriormente se trasladó al herbario de la Universidad de Sucre. Las hojas de guanábana se sometieron a deshidratación en un horno de 50°C por 48 horas, luego se pulverizaron.

Extracción de los aceites esenciales de hojas de naranja agria: La extracción de los aceites esenciales de hojas frescas de naranja agria se realizó por el método de hidrodestilación asistida por microondas (MWHD), empleando un equipo de hidrodestilación con capacidad para 2L (balón de destilación), adicionando dentro del mismo aproximadamente 300g de material vegetal, seleccionado y troceado, y 400mL de agua destilada. Como fuente de radiación microondas se empleó un horno convencional (SAMSUNG AME9114ST) cuyo tiempo de extracción fue de 45 minutos divididos en 3 ciclos de 15 minutos cada uno. Los aceites esenciales (AE) se colectaron en un recipiente tipo Dean Stark. Los AE se separaron por decantación e inmediatamente fue almacenado en un vial ámbar de 4mL.

Obtención del extracto de hojas de guanábana: Las hojas de guanábana seca y pulverizada

llevaron hasta un cartucho de celulosa y luego al dispositivo Soxhlet con capacidad de 250 mL y volumen suficiente de diclorometano. Dicha muestra se sometió a extracción continua por 4 horas después de la cual se filtró en caliente y se deshidrató con Na₂SO₄ anhidro, se volvió a filtrar y se evaporó a sequedad hasta obtener el extracto crudo.

Preparación de los tratamientos: Los tratamientos preparados para los aceites esenciales de hojas frescas de naranja agria fueron a concentraciones 15 µL/mL, 17,2 µL/mL y 20 µL/mL. Para los extractos de hojas secas de guanábana se prepararon concentraciones de 0,05 g/mL, 0,07 g/mL, 0,1 g/mL y 0,5 g/mL. Se utilizó un control positivo (agrifos), un control negativo (DMSO) y un testigo absoluto.

Aislamiento de *P. cinnamomi*: Para esto, se procedió a realizar 2 tipos de aislamientos: a partir de suelo de árboles con sintomatología de la enfermedad y de raíces de plántulas de vivero con síntomas.

A partir de suelo infectado. Con las muestras de suelos recolectadas se preparó una solución homogénea de cada muestra de suelo con agua destilada desionizada en una relación de 1:4, se puso en cajas de petri; luego se tomaron hojas de aguacate sanas y troceadas, se colocaron encima de la solución suelo-agua (MANSILLA *et al.*, 1993). Éstas se dejaron allí hasta que las hojas mostraran la característica de marchitez que es una coloración marrón. Como control se utilizó hojas de aguacate troceadas puestas encima de agua destilada desionizada durante el mismo tiempo.

Luego de ello, las hojas con característica de marchitez fueron lavadas con agua destilada desionizada, etanol al 70% v/v por 30 s, hipoclorito de sodio 3% p/v 30 s y finalmente se enjuagó con agua destilada desionizada, y secadas con papel absorbente estéril. Estas muestras fueron inoculadas en medio selectivo agar harina de maíz (CMA-BARN) 2 g/L y suplementado con 250 µg/mL de Ampicilina, 10 µg/mL de Rifampicina, 10 µg/mL de Benomil y 25 µg/mL de Nistatina (MASAGO *et al.*, 1977; FERGUSON Y JEFFERS, 1999). El micelio formado fue transferido a agar-CMA, agar-V8 y posteriormente a agar-V3 cuya

preparación original está a cargo de los autores de este manuscrito. Se observaron las características macroscópicas de los aislados.

A partir de muestras de raíces de plántulas infectadas. Se tomaron fragmentos de raíz de varias plantas que presentaba sintomatología asociada a la podredumbre de las raíces, y fueron sometidos a lavado primero con agua destilada desionizada, etanol al 70% v/v por 30 s, hipoclorito de sodio 3% p/v 30 s y finalmente se enjuagó con agua destilada desionizada (RAMÍREZ *et al.*, 2014). Luego, se secaron los tejidos en papel absorbente estéril, se colocaron sobre la superficie del medio selectivo mencionado en aislamiento de suelo y se incubaron durante 15 días a la oscuridad. Luego, el micelio formado en cada muestra fue transferido a agar PDA y se observaron las características macroscópicas de los aislados.

Los diferentes aislados fúngicos fueron montados en cámara húmeda durante 15 días. La corroboración de la identidad de los aislados fúngicos se hizo mediante las claves de WATANABE (2002).

Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica mediante el método de siembra directa. Para la prueba de actividad inhibitoria se utilizó el método de siembra directa con crecimiento puro de los aislados. Se realizaron siembras de cada aislado de aproximadamente 6mm de diámetro de área de crecimiento (PÉREZ *et al.*, 2011) los cuales fueron sembrados sobre la superficie del medio V8. La prueba de inhibición se desarrolló de la siguiente manera: Los aislados sembrados en V8, se les adicionó 40µL de cada tratamiento disuelto en DMSO. Se utilizó un control positivo con Agrifos 400 SL (6 mL/L), el cual corresponde con las dosis de este antifúngico utilizado por los cultivadores de aguacate en el departamento de Sucre y un testigo absoluto sin ningún tipo de tratamiento. Los ensayos se incubaron a 30°C por 7 días en intervalos de luz y oscuridad.

La actividad antifúngica se evaluó midiendo el crecimiento radial de cada aislado con las diferentes concentraciones después del día séptimo de iniciado el experimento. El resultado obtenido se interpretó como porcentaje de índice antifúngico (%I.A): $\% I.A = [1 - (D_a / D_b)] \times 100$, donde

D_a corresponde al crecimiento de cada tratamiento y D_b al crecimiento del testigo absoluto (GUO *et al.*, 2008). Para determinar la eficiencia de cada aceite, se resta el %I.A del control negativo (DMSO) al %I.A de cada aceite esencial y se compara con el control positivo.

Análisis por cromatografía de gases/espectrómetro de masa (GC/MS). La determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales se efectuó mediante la técnica instrumental de Cromatografía de Gases con detector selectivo de Masa (GC/MS), utilizando un equipo de cromatografía de gases Agilent 6890N acoplado a un detector selectivo de masa Agilent 5973N y con el inyector en modo splitless. Los índices de Kóvats fueron determinados en una columna capilar no polar DB_1MS y utilizando como gas de arrastre el Helio. La programación del horno se dividió en cuatro pasos: inicialmente la temperatura fue de 50°C y se mantuvo allí por 0,33 minutos, luego se incrementó la temperatura a razón de 5°C/min hasta 150°C y se mantuvo allí por 4,34 min, después se incrementó la temperatura a razón de 10°C/min hasta 250°C y se mantuvo por 3 min y por último se incrementó la temperatura a razón de 15°C/min hasta 300°C y se mantuvo por 4 min; toda la corrida duró 45 min.

La identificación tentativa de los compuestos registrados se estableció según sus espectros de masas, usando la base de datos que presente una mayor probabilidad de coincidencia para las bases de datos NIST02.L y NIST5a.L mayores a 90% ó en su defecto usando la base de datos NIST98.L,. Toda la información importante como tiempo de retención y porcentaje de área fue generada por el software MSD ChemStation.

Análisis estadístico: Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los aceites esenciales y los extractos se analizarán por separando aplicando en cada caso, un diseño por bloques aleatorizado con el software SPSS versión 22.0, con el objeto de establecer diferencias significativas en la eficiencia antifúngica de los aceites esenciales recolectados por localidad y concentraciones evaluadas. Para determinar la independencia entre el factor, se realizó un gráfico de interacción y para la determinación de comparaciones entre medias se realizó la prueba de Bonferroni.

Variable de respuesta: porcentaje de índice antifúngico (%I.A) de las concentraciones de aceites o extractos.

Factor: los aceites esenciales o extractos vegetales.

Bloques: los municipios de recolección del material vegetal.

El modelo de diseño por bloques totalmente al azar es:

$$y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

i= a la cantidad de aceites esenciales 1, 2, 3.

j= a las concentraciones a analizar 1, 2, 3.

y_{ij} = %I.A medido por el aceite esencial i con la concentración j.

μ = promedio de %I.A.

α_i = efecto medio adicional sobre el %I.A medido debido al aceite esencial o extracto i.

β_j = efecto medio adicional sobre el %I.A medido debido al aceite esencial o extracto j.

Se planteó la hipótesis nula H_0 de igualdad entre medias de la actividad fúngica de los aceites esenciales o extractos. ($H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = 0$).

Resultados

Clasificación científica del material vegetal.

El material vegetal fue corroborado su identidad taxonómica en el herbario de la Universidad de Sucre, guardadas bajo registro Voucher. *Citrus aurantium* L. perteneciente a la familia Rutaceae, la recolectada en La Unión esta almacenada con

el vouche N°919, la recolectada en Sincelejo voucher N°921 y la recolectada en Sampués voucher N°923. *Annona muricata* L. perteneciente a la Familia Annonaceae, recolectada en La Unión esta almacenada con el voucher N°920 y la recolectada en Sincelejo voucher N°922.

Aislamiento de *P. cinnamomi* causante de la tristeza del aguacate:

De los aislamientos fúngicos realizados tanto de suelo como de raíces infectadas con el microorganismo, sólo se obtuvieron los resultados de aislamiento realizado a partir de suelo infectado. La cepa aislada a partir de suelo infectado fue identificada como *P. cinnamomi* (Figura 1)

La cepa aislada fue identificada como *P. cinnamomi*. La identificación fue basada en características morfológicas de los aislados utilizando las claves taxonómicas propuestas por WATANABE (2002) y teniendo en cuenta que el sitio de muestreo presentaba muerte total de los árboles de aguacate con sintomatología causada por *P. cinnamomi* y reportes previos que indican presencia de dicho Oomycete en la zona de recolección.

Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica mediante el método de siembra directa.

Resultados de la actividad antifúngica *in vitro* de los aceites esenciales de hojas frescas de naranja agria y extracto de hojas secas de guanábana contra *P. cinnamomi* agente causal de la enfermedad conocida como tristeza del aguacate, se observan en la Figura 2.

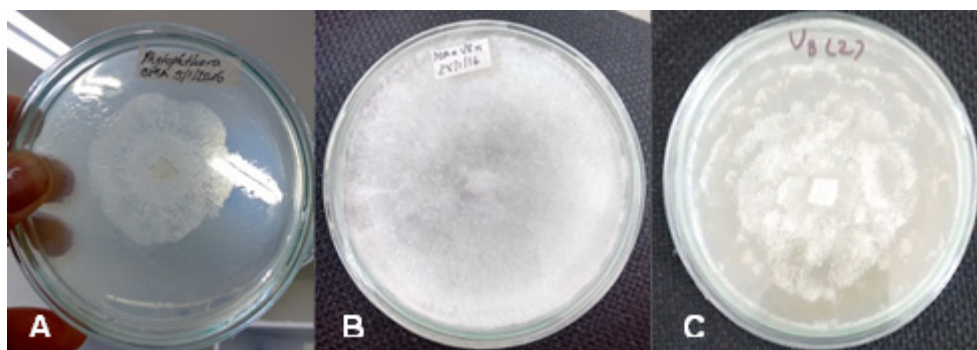


Figura 1. Crecimiento micelial de *P. cinnamomi* en: A= agar CMA, B= agar V8 y C= agar V3. Foto Vitola-Deimer 2015.

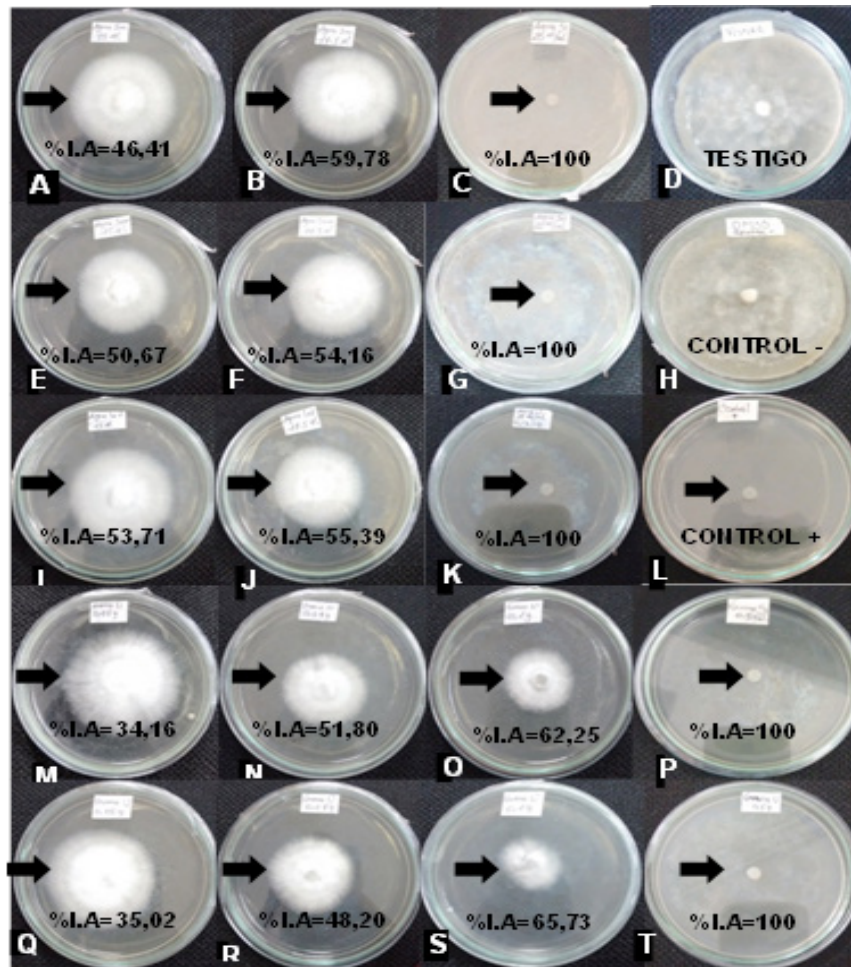


Figura 2. Actividad antifúngica de los aceites esenciales de naranja agria y extractos de guanábana contra *P. cinnamomi*.

Para cada uno de los aceites esenciales de hojas frescas de naranja agria se prepararon tres tratamientos con tres repeticiones y para los extractos vegetales en diclorometano de hojas secas de guanábana se utilizaron cuatro tratamientos con tres repeticiones. La mayor actividad antifúngica contra *P. cinnamomi* de aceite esencial de naranja agria recolectada en los municipios de Sincelejo, Sampués y la Unión se obtuvo para estas localidades a concentración de 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$, mostrando un índice de actividad inhibitoria de %I.A de 100, con respecto a los demás tratamientos (concentraciones) evaluadas.

Con relación a la mayor actividad antifúngica de extractos vegetales de hojas secas de guanaba contra *P. cinnamomi* recolectadas en el municipio de Sincelejo y el municipio de la Unión para la

concentración de 0,5 g/mL obteniéndose un índice de inhibición de (%I.A) de 100.

Con los resultados obtenidos de los %I.A para cada aceite esencial de naranja agria y extracto vegetal de guanábana con respecto al municipio de muestreo se realizó un análisis de varianza para determinar diferencias significativas entre los municipios y las concentraciones de aceite esencial utilizadas.

Para el caso de los AE obtenidos de esenciales de naranja agria, no se encontró diferencias significativas entre los tres municipios muestreados. Sin embargo, se encontró que si existen diferencias significativas entre cada una de las concentraciones analizadas, es decir 15 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 17,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$. La significancia

es inferior a $\alpha=0,05$. Además, el gráfico demostró que no existe una correlación entre los municipios y los aceites esenciales. La prueba de Bonferroni, aplicada arrojó que con un nivel de confianza del 95% existen diferencias significativas entre todas las concentraciones de aceites esenciales de naranja agria analizadas.

Con respecto a los extractos vegetales obtenidos de guanábana, se encontró que con un nivel de confianza del 95% no existen diferencias significativas entre los dos municipios muestreados. Sin embargo, con el mismo nivel de confianza se encontró que si existen diferencias significativas entre cada una de las concentraciones analizadas, es decir 0,05 g/mL, 0,07 g/mL, 0,1 g/mL y 0,5 g/mL. La significancia es inferior a $\alpha=0,05$. Además, el gráfico demostró que no existe una

correlación entre los municipios y los extractos vegetales. La prueba de Bonferroni arrojó que un nivel de confianza del 95% existen diferencias significativas entre todas las concentraciones de extractos vegetales de guanábana analizados.

Análisis químico por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa (GC-MS). El perfil cromatográfico de las muestras recolectadas por localidades se observa en la Figura 3.

Los perfiles cromatográfico realizados sobre las muestra evaluadas mediante análisis químico por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa (GC-MS) mostraron como metabolitos mayoritarios para el aceite esencial de hojas frescas de naranja agria recolectada en Sampués y La Unión al Linalool con un porcentaje de abundancia

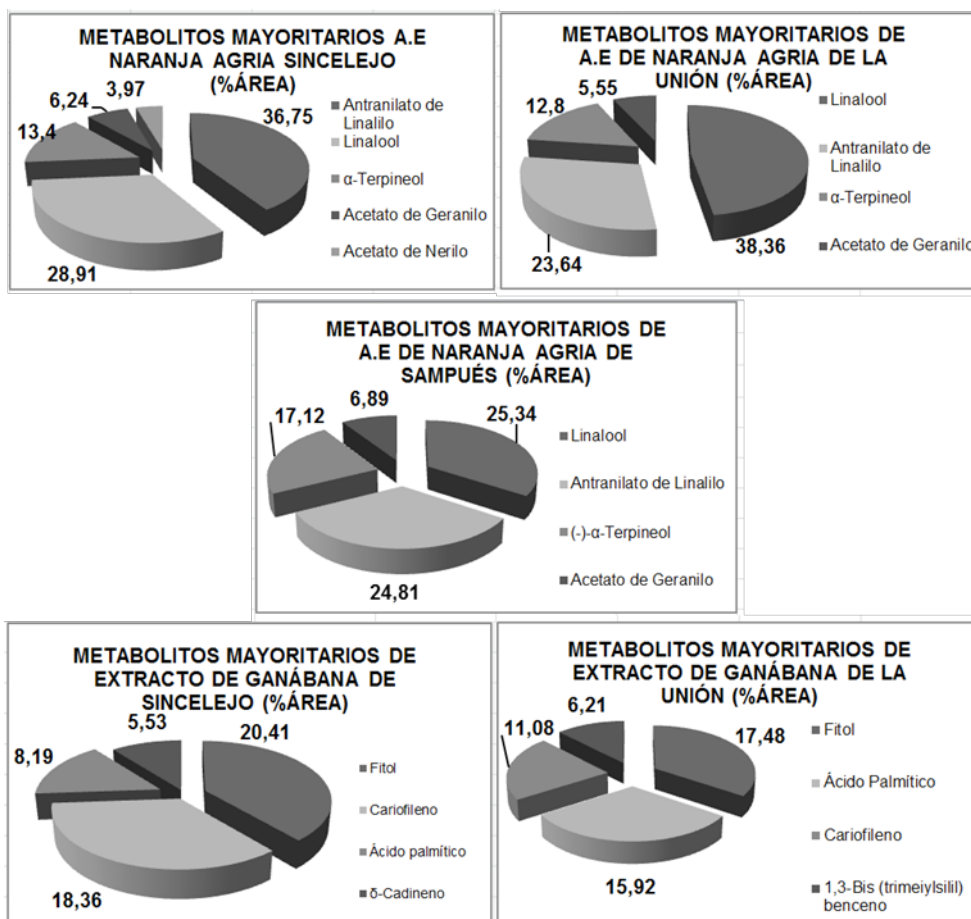


Figura 3. Caracterización química de cada muestra vegetal por la técnica de cromatografía de gases acoplada a masa (GC-MS) mostrando los porcentajes de abundancia de sus metabolitos mayoritarios.

de 25,34% y 38,36% respectivamente, lo que indican que estos dos quimiotipos corresponden al quimiotipo Linalool. Mientras que el aceite esencial recolectado en Sincelejo se encontró al Antranilato de linalilo como el metabolito mayoritario con un porcentaje de abundancia de 36,75%, lo cual lo representan como al quimiotipo Antranilato de linalilo. Con respecto a los extractos de hojas secas de guanábana recolectada en los municipios de Sincelejo y La Unión el metabolito mayoritario fue el Fitol con un porcentaje de abundancia del 20,41% y 17,48% respectivamente, correspondiendo los dos al quimiotipo Fitol. Los resultados de metabolito mayoritario en hojas de naranja agria concuerdan con los reportados por ABDERREZAK *et al.* (2014) donde reporto como mayoritario al Linalool a concentración de 18,6%.

Trabajos realizados por (BARRERA y GARCIA, 2008) sobre la actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium sp.*, encontraron que se presentó actividad antifúngica con los compuestos de citral, geraniol, linalol y citronelol a dosis de 200, 250 y 300 µg/ml.

El fitol, es un derivado alcohólico que forma parte de la molécula de clorofila, así como de varias vitaminas liposolubles. La función de este compuesto es mantener la clorofila integrada en la membrana fotosintética. Algunos estudios como el realizado por (TRONCOSO *et al.*, 2015), sobre Identificación de compuestos antibacterianos en macroalgas presentes en la Región del Biobío, Chile, encontraron que en todos los extractos obtenidos fue detectada la presencia del compuesto Fitol 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadeceno-1-ol, molécula esta con reconocidas propiedades antibacterianas y que además se le ha atribuido propiedades antimicóticas y/o antivirales.

Discusión

Los resultados obtenidos sobre el índice de actividad inhibitoria contra *P. cinnamomi* mostrado arriba, indican que para los AE de naranja agria

fue de 20 µL/mL y para los extracto vegetal de guanábana la concentración que mostros mejor actividad inhibitoria fue la de 0,5 g/mL. La actividad inhibitoria de los AE de naranja agria y de los extractos vegetales de guanábana fueron similares similar a los observados par el control positivo con agrifos, lo que posiblemente después de otros estudios permitirían utilizar estos biactivos de origen vegetal como una alternativa biológica y de bajo costo para el biocontrol *P. cinnamomi*. Estudios realizado sobre actividad antimicrobiana, han reportado que la especie vegetal de *C. aurantium* posee propiedades antifúngica, antimicrobianas, antioxidante (WEI y SHIBAMOTO, 2010) y anticancerígenas (ÁLVAREZ y RAMÓN-LACA, 2005). Así mismo a *Annona muricata* posee propiedades antitumorales contra líneas celulares de adenocarcinoma gástrico y pulmonar (QUISPE *et al.*, 2007), también propiedades de actividad antimicrobiana (GAJALAKSHMI *et al.*, 2012).

A la fecha de la realización del presente estudio, no se encontró en literatura especializada actividad antifúngica de aceites esenciales hojas frescas de naranja agria y extractos vegetales de hojas secas de guanábana contra *P. cinnamomi*, lo que permite inferir que este es el primer reporte en el departamento de la actividad inhibitoria de estos compuesto vegetales evaluados *in vitro* contra este hongo causante de la enfermedad conocida como la tristeza en cultivos de aguacate. Así mismo trabajos futuros permitirán elucidar la actividad antifúngica de los compuestos mayoritarios encontrados sobre el fitopatógeno causante de la enfermedad conocida como la marchitez en cultivo de aguacate.

Agradecimientos: Los autores agradecen el apoyo brindado a la Universidad de Sucre y la Fiduciaria de Bogotá S.A como vocera del patrimonio autónomo denominado Fondo Nacional para el Financiamiento de la Ciencia, Tecnología e Innovación Francisco José Caldas mediante Convenio especial de cooperación No 0169-2014 en el marco del “programa jóvenes investigadores e innovadores modalidad tradicional”.

Referencias

- ABDERREZAK, MK.; ABAZA, I.; ABURJAI, T.; KABOUCHE, A.; KABOUCHE, Z. 2014. Comparative compositions of essential oils of *Citrus aurantium* growing in different soils. J. Mater. Environ. Sci. 5 (6):1913-1918.
- AGUILERA, M. 2013. Montes de María: una subregión de economía campesina y empresarial. Banco de la República (195): 1-93.
- ALVARADO-ROSALES, D.; SAAVEDRA-ROMERO, L. L.; ALMARAZ-SÁNCHEZ, A. 2008. Primer reporte de *Phytophthora cinnamomi* Rands. asociado al encino (*Quercus* sp.) en Tecoaapa, Guerrero, México. Agrociencia 42:565-572.
- ÁLVAREZ, AB; RAMÓN-LACA, L. 2005. Pharmacological properties of citrus and their ancient and medieval uses in the Mediterranean region. Journal of Ethnopharmacology 97 (1):89-95.
- BARRERA, NL; GARCIA, BL. 2008. Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium* sp aislado de papaya (*Carica papaya*). Revista UDO Agrícola 8 (1):33-41.
- FAOSTAT (ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y AGRICULTURA, DIRECCIÓN DE ESTADÍSTICA). 2016. <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S>. Consultado: 06 de Abril de 2016.
- FERGUSON, AJ.; JEFFERS, SF. 1999. Detecting Multiple Species of *Phytophthora* in Container Mixes from Ornamental Crop. Plant Disease 83:1129-1136.
- GAJALAKSHMI, S.; VIJAYALAKSHMI, S.; RAJESWARI, DV. 2012. Phytochemical and pharmacological properties of *Annona muricata*: a review. Int J Pharm Sci. 4 (2):3-6.
- GRANADOS, C.; YÁÑEZ, X.; SANTAFÉ, G. 2012. Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* de Norte de Santander. Bistua 10 (1):12-23.
- GUO, Z.; XING, R.; LIU, S.; ZHONG, Z.; JI, X.; WANG, L.; LI, P. (2008). The influence of molecular weight of quaternized chitosan on antifungal activity. Carbohydrate Polymers 71 (4):694-697.
- ICA (INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO). 2014. Esta institución socializó los resultados del censo aguacatero en los Montes de María. Disponible en: <http://www.ica.gov.co/Noticias/Pecuaria/2013-%281%29/El-ICA-socializo-losresultados-del-censo-aguacate.aspx>. Consultado: 15 Junio de 2014.
- MANSILLA, JP.; PINTOS, C.; SALINERO, MC. 1993. Aislamiento e identificación en la provincia de Pontevedra de *Phytophthora cinnamomi* Rands como patógeno de viña. Plagas 19:541-549
- MASAGO, H.; YOSHIKAMA, M.; FUKADA, M.; NAKANISHI, N. 1977. Selective inhibition of *Pythium* spp. on a medium for direct isolation of *Phytophthora* spp. from soils and plants. Phytopathology (67):425-428.
- PÉREZ, A.; ROJAS, J.; CHAMORRO, L.; PÉREZ, K. (2011). Evaluación in vitro de actividad inhibitoria de extractos vegetales sobre cepas de hongos del género *Colletotrichum* sp. Acta Agronómica 60 (2):158-164.
- PROGRAMA SPSS: IBM SPSS STATISTICS BASE [programa de ordenar]. Versión 22.0. 2013.

RAMÍREZ, J.; CASTAÑEDA, D.; MORALES, J. 2014. Estudios etiológicos de la marchitez del aguacate en Antioquia-Colombia. Rev Ceres Viçosa 61 (1):50-61.

TRONCOSO, N.; SAAVEDRA, R.; OLIVARES, A.; FARÍAS JORGE.; SAN-MARTÍN, S.; URRUTIA, H.; AGURTO, C. 2015. Identificación de compuestos antibacterianos en macroalgas presentes en la Región del Biobío, Chile. Revista de Biología Marina y Oceanografía 50 (S1):199-204.

VEGA, YJ. 2012. *El aguacate en Colombia: Estudio de caso de los Montes de María, en el Caribe colombiano*. Banco de la República. Documentos de Trabajo Sobre Economía Regional. Sincelejo-Sucre, 167.

WATANABE, T. 2002. *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi. Morphologies of Culture Fungi and Key to species*. Segunda edición. Editorial CRC press. Washington D.C. E.U.

WEI, A.; SHIBAMOTO, T. 2010. Antioxidant/lipoxygenase inhibitory activities and chemical compositions of selected essential oils. J Agric Food Chem 58 (12):7218-7225.

UISPE, A.; ZAVALA, D.; POSSO, M.; ROJAS, J.; VAISBERG, A. 2007. Efecto citotóxico de *Annona muricata* (guanábana) en cultivos de líneas celulares de adenocarcinoma gástrico y pulmonar. CIMEL 12 (1):19-22.