

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO DE PUNO**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**EFEECTO ANTIMICÓTICO DEL ACEITE ESENCIAL DE  
*Minthostachys mollis* (MUÑA) EN CEPAS DE *Fusarium* sp.  
PUNO – 2017**

**TESIS**

**PRESENTADO POR:**

**Br. KATHERINE KARINA QUISPE FLORES**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

**PUNO – PERÚ**

**2018**

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO DE PUNO  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



EFFECTO ANTIMICÓTICO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis*  
(MUÑA) EN CEPAS DE *Fusarium* sp. PUNO – 2017

TESIS

PRESENTADO POR:

Br. KATHERINE KARINA QUISPE FLORES

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADA EN BIOLOGÍA

APROBADO POR EL JURADO REVISOR:

PRESIDENTE :

.....  
Dr. Nicanor Miguel Bravo Choque

PRIMER MIEMBRO :

.....  
Blgo. M. Sc. Eva Laura Chauca de Meza

SEGUNDO MIEMBRO :

.....  
Mg. María Isabel Vallenias Gaona

DIRECTOR / ASESOR :

.....  
D. Sc. Juan José Pauro Roque

Área : Ciencias Biomédicas

Tema : Biotecnología vegetal

Fecha de sustentación: 27/12/2018.

## DEDICATORIA

*A Dios, por haberme dado salud, esperanza y vida para lograr mis objetivos, además de no apartarse de mí en ningún momento.*

*Con profundo amor a mis padres Crispín y Elena, por todo su apoyo, abnegación, sacrificio, paciencia, constante lucha y por darme siempre todo su amor incondicional, siendo el motor y el pilar fundamental en todo el trayecto de mi vida.*

*Con especial cariño a mis abuelos María y Basilio, por brindar todo el amor incondicional a sus nietos. A mis tíos (as), primos (as) por ser parte de mi vida.*

*A mis docentes de la universidad por sus enseñanzas, dedicación y esmero en mi formación profesional, por ser una fuente de motivación e inspiración.*

*Katherine K. Quispe Flores*

## AGRADECIMIENTOS

La finalización de esta tesis no hubiese sido posible sin la cooperación desinteresada de todas y cada una de las personas que a continuación citare, siendo muchas el apoyo y soporte en momentos difíciles durante el desarrollo de la tesis.

- A Dios por haberme permitido llegar a este momento, por todos estos años de cuidado y abnegado amor.
- A la Universidad Nacional del Altiplano y a la Facultad de Ciencias Biológicas, por recibirme en sus aulas y contribuir en mi formación profesional.
- A los docentes de la Escuela Profesional de Biología por sus conocimientos impartidos durante mi formación académica.
- Con gratitud al Dr. Juan José Pauro Roque, Director de la tesis, por su motivación, apoyo intelectual y paciencia que hizo posible la culminación de este trabajo.
- A los miembros del jurado: Dr. Nicanor Miguel Bravo Choque, M.Sc. Eva Laura Chauca de Meza y Mg. María Isabel Vallenas Gaona por el apoyo y sugerencias para el enriquecimiento de este trabajo durante la corrección y dictamen del borrador de tesis.
- Mi especial agradecimiento al Lic. Lorgio Palacios, por su apoyo, consejos, sugerencias y orientación incondicional, en el desarrollo del trabajo de investigación.
- A la Facultad de Ingeniería Agroindustrial de la UNA – Puno, por facilitarme el uso del equipo del Laboratorio de Frutas y Hortalizas.
- A la Facultad de Ingeniería Agronómica de la UNA-Puno y al CIP Camacani por facilitarme las muestras de papa para esta investigación.
- Al Sr. Jacinto Quispe y Sr. Gregorio Ordoñez, quienes me apoyaron y me animaron en toda circunstancia, a pesar de las adversidades.
- A mis amigos, quienes me ayudaron en la realización de este trabajo.
- A todas las personas que contribuyeron en alguna manera, me brindaron ideas y consejos para que se culmine mi proyecto de investigación.

## ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	5
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	7
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	9
<b>INDICE DE ANEXOS</b> .....	10
<b>INDICE DE ACRONIMOS</b> .....	11
<b>RESUMEN</b> .....	12
<b>ABSTRACT</b> .....	13
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	14
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	16
2.1. Antecedentes.....	16
2.2. Marco teórico.....	21
2.2.1. Descripción de <i>Minthostachys mollis</i> (muña).....	21
2.2.2. Descripción del hongo <i>Fusarium</i> .....	31
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	71
3.1. Área de estudio .....	71
3.2. Diseño y tipo estudio .....	73
3.3. Muestra .....	73
3.4. Diseño de investigación.....	73
3.5. Metodología.....	74
3.6. Método estadístico .....	80
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	82
4.1. Determinación de la Concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> (muña) en cepas de <i>Fusarium</i> sp. dentro del rango de concentración del 20 a 100 % .....	82

4.2. Determinación de la susceptibilidad antimicótica de <i>Fusarium</i> sp., frente al aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> (muña) comparado con el fungicida comercial (Carbendazim).....	89
<b>V. CONCLUSIONES</b> .....	96
<b>VI. RECOMENDACIONES</b> .....	97
<b>VII. REFERENCIAS</b> .....	98
<b>ANEXOS</b> .....	109

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructuras de monoterpenos presentes en hojas de <i>Minthostachys mollis</i> (muña). .....	27
<b>Figura 2.</b> Destilación por arrastre de vapor de agua en el laboratorio. ....	31
<b>Figura 3.</b> Pared celular de un hongo. ....	34
<b>Figura 4.</b> Micromorfologías de diferentes especies de <i>Fusarium</i> (microconidias, macroconidias y clamidosporas). ....	41
<b>Figura 5.</b> Micromorfología de diferentes especies de <i>Fusarium</i> (microconidias, macroconidias y clamidosporas). ....	42
<b>Figura 6.</b> Observaciones de exámenes directos de diferentes especies de <i>Fusarium</i> . ....	49
<b>Figura 7.</b> Observaciones de exámenes directos de diferentes especies de <i>Fusarium</i> . ....	50
<b>Figura 8.</b> Micromorfología de <i>Fusarium</i> , en tinción azul de algodón y microscopia electrónica de barrido. ....	51
<b>Figura 9.</b> Microscopia electrónica de barrido, se observa a <i>Fusarium</i> . ....	52
<b>Figura 10.</b> Crecimiento de las colonias y características macromorfológicas de <i>Fusarium</i> sp. ....	55
<b>Figura 11.</b> A. Prueba de difusión. B. Prueba E con una tira gradiente del antimicrobiano. ....	57
<b>Figura 12.</b> Acción de los fármacos antimicóticos. ....	59
<b>Figura 13.</b> Signos y síntomas de Pudrición seca o Fusariosis en tubérculos almacenados. ....	67
<b>Figura 14.</b> Tubérculos con pudrición seca con micelios visibles. ....	68
<b>Figura 15.</b> Ciclo biológico de <i>Fusarium</i> sp. ....	68
<b>Figura 16.</b> Zona de procesamiento y ejecución de la investigación, Universidad Nacional del Altiplano Puno, Facultad de Biología. ....	71
<b>Figura 17.</b> Zona de colección de la planta <i>Minthostachys mollis</i> , Distrito de Capachica. .	72
<b>Figura 18.</b> Zona de colección de los tubérculos. Distrito de Platería, Centro Poblado de Camacani, CIP Camacani. ....	72
<b>Figura 19.</b> Preparación de discos de sensibilidad con concentraciones de aceite esencia de <i>Minthostachys mollis</i> . ....	76

<b>Figura 20.</b> Concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> (muña) en cepas de <i>Fusarium</i> sp. dentro del rango de concentración del 20 a 100%. .....	84
<b>Figura 21.</b> Susceptibilidad antimicótica de <i>Fusarium</i> sp., frente al aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> (muña) comparado con el fungicida comercial (Carbendazim).....	92
<b>Figura 22.</b> <i>Minthostachys mollis</i> en su hábitat natural, Distrito de Capachica, Provincia de Puno, Abril - 2018.....	109
<b>Figura 23.</b> Obtención del aceite esencial de hojas de <i>Minthostachys mollis</i> (muña) por el método de destilación de arrastre por vapor.....	109
<b>Figura 24.</b> Aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> (muña) en frasco color ámbar. ....	110
<b>Figura 25.</b> A. Materiales e instrumentos de Laboratorio; B. Fungicida “Carbendazim”. .....	110
<b>Figura 26.</b> Papa con características de infección por <i>Fusarium</i> sp. (Pudrición seca).....	110
<b>Figura 27.</b> A. Cepa aislada de papa infectada de <i>Fusarium</i> sp. en Agar Sabouraud; B. Cepa de <i>Fusarium</i> sp.....	111
<b>Figura 28.</b> A. Observación en el microscopio óptico para corroborar la presencia de <i>Fusarium</i> sp.; B. <i>Fusarium</i> sp. a 40 X. en tinción de lugol. ....	111
<b>Figura 29.</b> A. Dilución del aceite esencial de Muña las concentraciones de 20 a 100 %, en etanol de 96°; B. Aplicación de aceite esencial de Muña con micropipeta.....	112
<b>Figura 30.</b> A y B: Halos de inhibición de aceite esencial de Muña a concentraciones de 100 %, 75 %, 50 % y 40 %.....	112
<b>Figura 31.</b> Halos de inhibición de aceite esencial de Muña a concentraciones de 30 % y 20 %.....	112
<b>Figura 32.</b> A. Control negativo B. Control positivo (Fungicida Carbendazim). ....	113
<b>Figura 33.</b> Medición de halos de inhibición utilizando vernier. ....	113
<b>Figura 34.</b> Aislamiento e identificación de las cepas del genero <i>Fusarium</i> sp. a partir de muestras de papa infectada.....	113

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Diseño de investigación para determinar la CMI del aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> (muña) frente a cepas de <i>Fusarium</i> sp.....	73
<b>Tabla 2.</b> Diseño de investigación para la susceptibilidad del aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> (muña) frente a cepas de <i>Fusarium</i> sp.....	74
<b>Tabla 3.</b> Cuadro estandarizado de medida de halos de inhibición (mm).....	80
<b>Tabla 4.</b> Crecimiento de cepas de <i>Fusarium</i> sp. frente al aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> dentro del rango de concentración del 20 a 100 %.....	82
<b>Tabla 5.</b> Análisis de varianza (ANOVA) para la determinación del efecto antimicótico del aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> (muña) en cepas de <i>Fusarium</i> sp.....	83
<b>Tabla 6.</b> Concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> (muña) de acuerdo a un antibiograma estandarizado. ....	86
<b>Tabla 7.</b> Porcentajes de inhibición, tratados con diferentes concentraciones de aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> , comparado con el control positivo Carbendazim frente a <i>Fusarium</i> sp.....	90
<b>Tabla 8.</b> Análisis de varianza (ANOVA) para la determinación de la susceptibilidad antimicótica de <i>Fusarium</i> sp., frente al aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> (muña) comparado con el fungicida comercial (Carbendazim).....	90
<b>Tabla 9.</b> Datos redondeados de las diferentes concentraciones, de medias del diámetro de los halos de inhibición en (mm). Comparando con el control positivo (6 concentraciones y 28 repeticiones).....	93
<b>Tabla 10.</b> Categorización de la susceptibilidad de <i>Fusarium</i> sp. frente al aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> (muña) según el diámetro del halo de inhibición. ....	94
<b>Tabla 11.</b> Análisis de varianza (ANOVA) y Prueba de Tukey para inhibición antifúngica de las diferentes concentraciones del aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> (muña) en cepas de <i>Fusarium</i> sp.....	114
<b>Tabla 12.</b> Análisis de varianza (ANOVA) y Prueba de Tukey para porcentaje de inhibición de las diferentes concentraciones del aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> (muña) en cepas de <i>Fusarium</i> sp. ....	115

**INDICE DE ANEXOS**

<b>Anexo 01.</b> Constancia de obtención de aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> (muña). 116	
<b>Anexo 02.</b> Constancia de ejecución en el laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Biológicas. ....	117

## INDICE DE ACRONIMOS

**ASD:** Agar Sabouraud dextrosa

**ANOVA:** Analysis Of Variance

**°C:** Grados centígrados

**%:** Porcentaje

**cm:** Centímetro

**CMI:** Concentración Mínima Inhibitoria

**CLSI:** Clinical and Laboratory Standards Institute

**D.C.A.:** Diseño completamente al azar

**DHI:** Diámetro de halo de inhibición

**g:** Gramos

**INS:** Instituto Nacional de Salud

**kg:** Kilogramos

**ml:** Mililitro

**mm:** Milímetro

**msnm:** Metros sobre el nivel del mar

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**µg:** microgramos

**µl:** microlitros

**µm:** micrómetros

## RESUMEN

*Fusarium* sp. es un hongo que en la actualidad causa la enfermedad conocida como Pudrición seca en el cultivo de la papa que causa pérdidas económicas considerables, esto hace que sea un problema para los productores y comercializadores, por tanto se sugiere una alternativa de control utilizando el aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña). Los objetivos fueron determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) en cepas de *Fusarium* sp. dentro del rango de concentración del 20 a 100 % y determinar la susceptibilidad antimicótica de *Fusarium* sp., frente al aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) comparado con el fungicida comercial (Carbendazim). La extracción del aceite esencial se realizó por el método de arrastre a vapor de agua. La concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial se determinó por el método de Kirby-Bauer (antibiograma antimicótico) a concentraciones (%) de 20, 30, 40, 50, 75, 100 % y un control negativo; para la determinación de la susceptibilidad antimicótica se empleó el mismo método a concentraciones de 20/80, 30/70, 40/60, 50/50, 75/25, 100/0 y un control positivo (Carbendazim). Los resultados encontrados fue que la CMI del aceite esencial de *Minthostachys mollis* frente a cepas de *Fusarium* sp. es de 50 % con un halo de inhibición de 14.75 mm, además el promedio de halo menor fue de 8.53 mm (20%) y el halo mayor fue de 18.18 mm (100%). Por otro lado en la susceptibilidad antimicótica de *Fusarium* sp., el porcentaje de inhibición del aceite esencial fue menor al del control positivo, como es el caso de las concentraciones de 100/0 y 75/25 con porcentajes de 93 y 87% de inhibición respecto al control, estos datos fueron analizados estadísticamente mediante pruebas de análisis de varianza (ANOVA) y Prueba estadística de Tukey para ambos objetivos, en el primero presentaron diferencia estadística significativa ( $F_c=273.15$ ;  $gl=6$ ;  $P=0.001<0,05$ ) y para el segundo objetivo presento diferencia estadística significativa ( $F_c=284.20$ ;  $gl=6$ ;  $P=0.001<0,05$ ). Concluyendo que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) tuvo menor efecto frente a *Fusarium* sp. a diferencia del control positivo Carbendazim.

**Palabras Clave:** Aceite esencial, efecto inhibitorio, *Fusarium* sp., *Minthostachys mollis*, Concentración mínima inhibitoria.

## ABSTRACT

*Fusarium* sp. is a fungus that currently causes the disease known as dry rot in the potato crop that causes considerable economic losses, this makes it a problem for producers and marketers, therefore an alternative control using essential oil is suggested of *Minthostachys mollis* (muña). The objectives were to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of the essential oil of *Minthostachys mollis* (muña) in strains of *Fusarium* sp. within the concentration range of 20 to 100% and determine the antifungal susceptibility of *Fusarium* sp., against the essential oil of *Minthostachys mollis* (muña) compared to the commercial fungicide (Carbendazim). The extraction of the essential oil was carried out by the method of steam drag. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the essential oil was determined by the Kirby-Bauer method (antimicrobial antibiogram) at concentrations (%) of 20, 30, 40, 50, 75, 100% and a negative control; For the determination of antifungal susceptibility, the same method was used at concentrations of 20/80, 30/70, 40/60, 50/50, 75/25, 100/0 and a positive control (Carbendazim). The results found that the MIC of the essential oil of *Minthostachys mollis* against strains of *Fusarium* sp. it is 50% with a halo of inhibition of 14.75 mm, in addition the average of minor halo was 8.53 mm (20%) and the major halo was 18.18 mm (100%). On the other hand, in the antifungal susceptibility of *Fusarium* sp., the percentage of inhibition of the essential oil was lower than that of the positive control, as in the case of the 100/0 and 75/25 concentrations with percentages of 93 and 87% of inhibition compared to the control, these data were analyzed statistically by means of tests of analysis of variance (ANOVA) and Tukey's statistical test for both objectives, in the first presented significant statistical difference ( $F_c = 273.15$ ,  $gl = 6$ ,  $P = 0.001 < 0.05$ ) and for the second objective I present significant statistical difference ( $F_c = 284.20$ ,  $gl = 6$ ,  $P = 0.001 < 0.05$ ). Concluding that the essential oil of *Minthostachys mollis* (muña) had less effect against *Fusarium* sp. unlike the Carbendazim positive control.

**Key Words:** Essential oil, inhibitory effect, *Fusarium* sp., *Minthostachys mollis*, Minimum inhibitory concentration.

## I. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo de investigación se basa en la determinación del efecto antimicótico del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) en cepas de *Fusarium* sp. La muña es una planta arbustiva leñosa oriunda del Perú, su nombre científico es *Minthostachys mollis*. Desde tiempos preincaicos se utilizó para preservar tubérculos. En épocas prehispánicas, para conservar alimentos de origen vegetal, contra el ataque de insectos en condiciones de almacenamiento, se preparó como fumigante orgánico contra el gorgojo de los Andes y antihongo.

La papa (*Solanum tuberosum*) es un tubérculo de importancia alimenticia y económica en nuestra región, los cultivos son atacados por la Pudrición seca, efectuados por el hongo *Fusarium* sp., el mismo que disminuye la producción agrícola, teniendo en cuenta el uso de diferentes aceites esenciales de plantas medicinales en el control de diferentes plagas, tenemos a la muña (*Minthostachys mollis*) que es una gran alternativa para preservar y disminuir los daños agrícolas sobre todo en comunidades aisladas, constituyendo motivos suficientes para profundizar en el conocimiento de dicha planta de nuestra región.

El hongo del genero *Fusarium* sp. produce enfermedades en tubérculos almacenados, el cual posee estructuras de propagación (conidias, micelio) o de conservación (esclerocios, clamidosporas, oosporas) que se encuentran presentes en la superficie de los tubérculos almacenados o en el interior, la presencia de estos se debe a que los agricultores seleccionan tubérculos enfermos, lo cual origina la Pudrición seca que es una enfermedad considerada en los tubérculos almacenados. Las pudriciones por *Fusarium* sp., constituyen una de las principales enfermedades en bodega, elevándose en muchos casos sobre el 5 %. Esta enfermedad se encuentra favorecida principalmente

por daños mecánicos causados en el cultivo, como la cosecha, transporte, selección y almacenaje. Reduce hasta en 2 % el producto cosechado.

Las pérdidas económicas tanto al agricultor como al comerciante proveedor directo hacia el consumidor, como región exportadora de tubérculos, se ve afectado de manera directa disminuyendo los estándares de calidad del tubérculo y a la economía de nuestra región.

Los resultados obtenidos dan respuesta al efecto antimicótico del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) frente al hongo *Fusarium* sp. Este aporte contribuirá al conocimiento de un biofungicida natural frente a *Fusarium* sp., sin costos significativos y estos datos servirán como base para su utilización en la industria productora de fungicidas. De esta manera se valida el efecto antifúngico de *Minthostachys mollis* (muña) y el valor científico de esta investigación.

En tal sentido se plantearon los siguientes objetivos:

**Objetivo general:**

Determinar el efecto antimicótico del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) en cepas de *Fusarium* sp. Puno – 2017.

**Objetivos específicos:**

Determinar la Concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) en cepas de *Fusarium* sp. dentro del rango de concentración del 20 a 100 %.

Determinar la susceptibilidad antimicótica de *Fusarium* sp., frente al aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) comparado con el fungicida comercial (Carbendazim).

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Antecedentes

Dueñas (2013) demostró que *Minthostachys acris* Schmidt-Leb, tuvo efecto antimicótico sobre *Sporothrix schenkii*, empleando el método de Difusión en agar, mostrando al 1 % de concentración en fase levaduriforme y micelial al 10 % de concentración, se determinó que el diámetro del halo de inhibición, no hubo crecimiento a los volúmenes de 50 ul, 25 ul, 10 ul, 5 ul, 4 ul, 3 ul y 2 ul, obteniéndose crecimiento al volumen de 1 ul; por otro lado, Alcalá *et al.* (2011) reportaron que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 100% tuvo efecto contra *Cándida albicans*; además, el efecto antimicótico del Fluconazol fue mayor que la *Minthostachys mollis* al 25 %, y fue el mismo que la *Minthostachys mollis* al 50 %. Del mismo modo, Hernandez (2018) determino el efecto antifúngico del aceite esencial de *Minthostachys mollis* sobre *Cándida albicans* ATCC10231 se observó que a las 24 y 72 horas las concentraciones al 75 % y 100 % presentaron efecto antifúngico obteniendo un valor mayor a 10 mm de halo de inhibición.

Jauregui (2016) demostró que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* más el antifúngico fluconazol tiene efecto sinérgico en las diferentes concentraciones. La concentración inhibitoria se presentó en todas las concentraciones excepto en el control (fluconazol) en el que se obtuvo un crecimiento de  $4.5 \times 10^3$ , ( $p < 0.001$ ). Por otro lado, Salas (2016) obtuvo que *Minthostachys mollis* en cepas de *Cándida albicans*, la muña de 1/250 (T6) tiene mayor efecto contra *Cándida albicans* que el fluconazol. Mientras Zapata *et al.* (2009) reportó que *Minthostachys mollis* y *Hyptis mutabilis* mostraron actividad antimicótica, *Minthostachys mollis* frente a *Aspergillus fumigatus* tuvo rangos de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) entre 250 y 375 ug/mL, no fue

citotóxico sobre células Vero y el principal componente de *M. mollis* fue epóxido de cis-piperitona.

Cano *et al.* (2008) reportó que en hojas de *Minthostachys mollis* se encontraron monoterpenos como pulegona, mentona, limoneno y mirceno, los cuales inhibieron el desarrollo de *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Microsporun canis*, también, para *Cándida albicans* se logró un halo de inhibición de 30 mm para el aceite esencial al 100 % y de 35 mm al 50 %. Mientras, Moína (2015) demostró que la actividad antibacteriana del colutorio elaborado con el aceite esencial de *Minthostachys spicata*, presento una mayor actividad antibacteriana frente *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Asimismo Carhuapoma *et al.* (2009) determinaron que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* tuvo resultados frente a *S. dysenteriae* 21,41 mm; *H. pylori* 17,07 mm; *S. typhi* 14,25 mm y *P. aeruginosa* 11,45 mm. La concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida para *H. pylori*, resulto 2 µg/mL. Para *S. dysenteriae* 4 µg/mL, *S. typhi* 4 µg/mL, y *P. aeruginosa* 9 µg/mL de CMI y 10 µg/mL de CMB.

Calderon & Guerrero (2013) demostraron el efecto antibacterial de *Minthostachys tomentosa* que presenta actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* (220 – 470 µg/mL) y *Salmonella typhimurium* (320 – 776 µg/mL). Incluso Huari (2014) obtuvo que *Minthostachys mollis* frente a *Streptococcus mutans* al 100 % tuvo efecto antibacteriano, obtuvo un halo promedio de 10.79 mm, al 50 % promedio de 7.6 mm, al 25 % promedio de 5 mm (tamaño de discos) igual que el control negativo, el control positivo (amoxicilina) promedio de 49.3 mm. A parte de ello, Peña & Gutierrez (2017) demostraron que *Minthostachys mollis* presento efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* con halo de inhibición 19,3 mm y de 8,0 frente a *Klebsiella*

*pneumoniae*. *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophylus influenzae* no presento halos de inhibición.

Baca (2017) determinó que *Minthostachys mollis* tiene efecto inhibitorio frente al género *Proteus* y a la concentración mínima inhibitoria del 50 % (50 mg/ml) frente a *Proteus vulgaris*, tiene un halo de inhibición de 11.90 mm, *Proteus mirabilis* con 75 % (75 mg/ml) tiene un halo de 7.37 mm, *P. rettgeri* con 75 % (75 mg/ml) tiene un halo de 7.00 mm y *Proteus morgani* con 75 % (75 mg/ml) tiene un halo de 6.90 mm. De la misma manera, Ccallo (2013) comprobó que el aceite esencial de muña inhibe a *Streptococcus mutans* y a *Porphyromonas gingivalis* con una concentración mínima inhibitoria para *Streptococcus mutans* es 0.448 g/ml, y para *Porphyromonas gingivalis* es mayor a 0.448 g/ml. Además, Calixto (2006) menciona que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* presenta actividad frente a bacterias orales. Sin embargo el Instituto Nacional de Salud (2011) recomienda tener cuidado en el consumo de la muña, ya sea como infusión o cocimiento, ya que no se han realizado estudios clínicos.

Ulloa (2015) demostró que *Minthostachys mollis* es utilizada en Bolivia para condimentar la sopa de pescado, chupe verde y lagua de maíz. Además, Merma (2014) probó que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* sirve para la conservación del filete de trucha arco iris envasada, presentaron ausencia de *Escherichia coli* y *Salmonella sp.* Asimismo, Ccopa (2014) determinó que *Minthostachys spicata* inhibe la presencia de microorganismos en el Ketchup. Paredes (2009) demostró la efectividad antibacteriana de la infusión del té verde a base de *Camelia sinensis* y *Minthostachys mollis* que fue similar a la clorhexidina. Además, Casas (2011) comprobó la eficacia en la cicatrización del apósito con aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) versus el apósito quirúrgico convencional en gingivectomias en *Oryctolagus cuniculus* (conejos),

*Minthostachys mollis* después de las gingivectomías presentaron menor grado de células PMN (polimorfonucleares- neutrófilos) en comparación con el grupo que se trató con apósito quirúrgico convencional y el control.

Castañeda *et al.* (2008) evaluó la capacidad antioxidante, por el método de la decoloración del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), a las concentraciones de 50 ug/mL, el extracto etanólico de hojas de muña presento una actividad antioxidante en promedio de 92.41 %. Así mismo, Granados *et al.* (2012) encontró que los componentes mayoritarios de *Minthostachys mollis* fueron Acetato de  $\alpha$ -Eudesmol, Acetato de (-)-Isolongifolol, Germacreno-D, Eucaliptol y Pulegona. *Minthostachys mollis* presento la mayor actividad antioxidante que podría estar asociada a los componentes mayoritarios de aceite esencial. Además, Yapuchura (2010) demostró la capacidad antioxidante de la inca muña fue superior (1004.1  $\mu\text{mol TE/g}$  (b.s.)) a la muña (868.0  $\mu\text{mol TE/g}$  (b.s.)), ya que presentaron contenidos fenólicos, además de flavonoles y flavonas. Por otro lado, Guerrero & Pozo (2016) probaron que *Minthostachys mollis* presenta capacidad captadora de radicales libres y actividad antioxidante.

Alegre *et al.* (2017) demostraron que el extracto acuoso de *M. mollis* al 20 % de concentración, causa mortalidad en *T. urticae* de 28,9; el extracto etanólico registro la mayor toxicidad de todos los extractos evaluados a las 75 h de exposición en *C. externa*, con una mortalidad del 75,7 %. También, Gleiser *et al.* (2007) demostraron la bioactividad del aceite esencial de *Minthostachys mollis* contra mosquitos. Los resultados sugieren que este aceite puede tener potencial como insecticida y merita mayores estudios. Por otro lado Fuertes *et al.* (2010) colectaron e investigaron 40 especies vegetales con propiedades biocidas e insecticidas frente a los nauplios de *Artemia salina* y entre las plagas *Aphis gossypii*, *Bemisia tabaco* y *Dysdercus*

*peruvianus*), mostraron resultados significativos tanto nivel de laboratorio como en los cultivos de algodón en el campo, siendo su toxicidad: (CL50 39), (CL50 64) y (CL 50) respectivamente.

Duarte *et al.* (2013) demostraron que el efecto inhibitorio de diez aceites esenciales sobre *Alternaria solani* Sorauer, todos los aceites, excepto *Citrus sinensis* (naranja dulce), inhibieron el crecimiento micelial hasta los 7 días y a los 14 días. Por otro lado Avello *et al.* (2012) determinaron que los efectos antimicrobianos de extractos de plantas chilenas de las familias Lauraceae (*Cryptocarya alba* Looser (Peumo), *Persea lingue* (Lingue)) y Atherospermataceae (*Laurella sempervirens* (laurel chileno)), los resultados obtenidos indican que los aceites esenciales tienen un efecto selectivo frente a hongos (*Penicillium* sp. y *Fusarium oxysporum*) y bacterias (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*), lo cual sugiere que su naturaleza química diferente tendría un papel en el mecanismo de acción.

Villa *et al.* (2015), en la investigación denominada “Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales”, se discuten y presentan algunos de los muchos estudios realizados alrededor del mundo sobre la efectividad biológica de diversas especies vegetales para el control de *Fusarium* spp., ya que ha sido uno de los géneros de hongos fitopatógenos más incidentes y devastadores de cultivos en el planeta en los últimos años. Condori (2018), en su investigación sobre el control bacteriano del aceite esencial de *Minthostachys mollis* frente a *Erwinia* spp. demuestra la eficiencia del control de muña (*Minthostachys mollis*) a 24 y 72 h, mostrando valores por mercados: Laykakota 10 mm, 15.3 mm, Central 14.6 mm y 12.8 mm, Unión y Dignidad 12.5 mm y 15.2 mm, presentado diferencias a las 72 h frente al paico (*Chenopodium ambrosioides*).

## 2.2. Marco teórico

### 2.2.1. Descripción de *Minthostachys mollis* (muña)

#### Clasificación taxonómica

<b>Dominio:</b>	Eukarya
<b>Reino:</b>	Plantae
<b>División:</b>	Magnoliophyta
<b>Clase:</b>	Magnoliopsida
<b>Orden:</b>	Tubiflorae
<b>Familia:</b>	Lamiaceae o Labiatae
<b>Género:</b>	<i>Minthostachys</i>
<b>Especie:</b>	<i>Minthostachys mollis</i>

**Nombre vulgar:** “Chancua”, “Muña” (Condori & Vilca, 2005).

#### Sinonimia popular

Se denomina en la lengua Quechua “muña”, y en la Aymara tiene 2 nombres: “Coa” y “Huaycha”. Los españoles la denominaban poleo silvestre por poseer características semejantes al poleo y orégano. Otros nombres vulgares son: “Muña”, “Muña negra”, “Hupaimuña” “Muña-muña”, “Arach muña”, “Kon”, “Orcco-muña” “Polco silvestre”, “Coz”, “huayco”, “Coa”, “Chancua”, “Chancua blanca”, “Chancas”, “Tinto”, “Ayamanchana”, “Poleo” o “Ismuña”, “Poleo blanco”, “Tipo blanco”, “Tifu” y “Yurac tipo”, siendo estas muy empleadas en Sudamérica. Así como las siguientes denominaciones: Perú (muña, muña muña, arash muña); Ecuador (Tipo, tipillo); Paraguay (Burrito); Bolivia (Martín muña); Argentina y Brasil (Peperina); Venezuela: (Oreganote) y Colombia (orégano) (Azaña, 2010; Malpartida, 2010; Ordoñez, 2015; Aigaje, 2016).

### Descripción botánica

*Minthostachys mollis* es una planta arbustiva, leñosa, hemicriptofila y aromática (semejante a la menta), mide de 0,80 m. a 1,20 m., tiene aspecto glauco, erecto y pubescente, posee tallos semileñosos, con forma prismática y cuadrilátera. Sus hojas son opuestas, de aspecto bien tupido, con peciolos de 0,5- 1 cm. de largo y láminas de 1- 5 por 1 – 3 cm., aovadas, agudas, con bordes enteros o irregularmente aserrados en la mitad superior, cubiertas de una pilosidad breve. El limbo es pubescente tanto en el haz como en el envés, presenta una coloración verde pálida (Condori & Vilca, 2005; Cano, 2007; Azaña, 2010; Malpartida, 2010; Ordoñez, 2015; Aigaje, 2016; Salas, 2016).

Inflorescencias plurifloras más cortas que la hoja axilante, tiene flores numerosas actinomorfas con cáliz y corola pentámera, cáliz soldado con 13 venaciones terminado en 5 lóbulos dentados casi iguales entre sí con pelos cerulosos en la base, la corola raramente es de 6 mm. de largo, dividida en 2 labios: 2 lóbulos o labio superior y 3 lóbulos o labio inferior, androceo y 4 estambres, gineceo supero formado por 4 lóbulos y un estilo bifido, con pétalos de color blanco, purpura o violácea, en forma de tubo y de 0,5 mm. Androceo constituido por 2 estambres concrecentes por sus filamentos al labio inferior en su parte central e interna. Gineceo superior formado por 4 lóbulos y un estilo bifido, ovario supero, sentado sobre un rodete nectarífero. El fruto es de tonalidad marrón y alberga una semilla, formado por 4 clusas elipsoides, pardas, finamente reticuladas. Semillas son de 0,5 a 1 mm. de largo y de color marrón (Cano, 2007; Azaña, 2010; Malpartida, 2010; Ccallo, 2013; Aigaje, 2016).

### **Distribución geográfica**

La muña, es un recurso natural que tiene un plano altitudinal de crecimiento entre los 2500 – 3900 msnm, se la puede encontrar distribuida en Colombia, Venezuela, Brasil, Ecuador, Perú, Bolivia y Argentina. En Perú 6 especies han sido reconocidos, estos son: *M. mollis*, *M. glabrescens*, *M. setosa*, *M. spicata*, *M. griseb* y *M. salisifolia*., crece en lugares cercanos a acequias y manantiales. Habita en laderas abiertas, rocosas, pedregosas, laderas de arbustos, bordes de carreteras, terrenos pedregosos, borde de campos de cultivo, cercos, ricos en materia orgánica, drenados, con retención de humedad, pH entre 5 a 8, clima con luminosidad, templado o templado cálido, temperatura (°C): 10 – 26, precipitación (mm): 500 – 2000 y humedad atmosférica (%): 60 – 90, florece en época de lluvia (Azaña, 2010; Malpartida, 2010; Calderon & Guerrero, 2013; Ccallo, 2013; Aigaje, 2016).

### **Principios activos presentes en *Minthostachys mollis***

Los vegetales elaboran productos propios denominados “principios activos”, que son sustancias que ejercen una acción farmacológica, benéfica o perjudicial, sobre el ser vivo. El valor medicinal se debe a la presencia del mismo, que produce un efecto fisiológico. Muchos de estos son sumamente complejos, desconociéndose aun su naturaleza química; otros han sido purificados, sintetizados o imitados. Por lo general pertenecen a una de estas categorías: aceites esenciales, alcaloides, glúcidos, taninos, sapogeninas, fenoles, quinonas, terpenos, carotenoides, cumarinas, flavonoides y resinas (Huamani, 2015; Salas, 2016).

### **Aceite esencial de *Minthostachys mollis***

El aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña), posee las siguientes características fisicoquímicas, tiene un aspecto líquido, claro y transparente, además es incoloro y tiene un olor característico a menta, asimismo un sabor picante, el rendimiento es de 0,7 %, la densidad relativa es de 0,92, su índice de refracción es de 1,4699, solubilidad en alcohol al 70 %: 5; índice de mentona: 33.88%; índice de menta: 22 %; índice de acidez: 1.683; índice de esteres: 5.819; rotación específica:  $-2^{\circ}45''$ ; índice de éter: 16.80%; contenido de mentol total: 4.042%; solubilidad en etanol: 95 % (Azaña, 2010; Huamani, 2015).

### **Componentes bioquímicos**

La composición de la muña es: aceite esencial, glucósidos, mucilagos, saponinas, taninos, alcaloides y esteroides. Contiene carbohidratos, calcio, fosfato, hierro, trazas de vitamina B1, esencias y mentón. Presenta una estructura aldehídica, cetónica, alcohólica (mentol y mentona), esteres, éteres y terpenos en mayor porcentaje. Está compuesto por monoterpenos como son: pulegona (19,3%), mentona (18,4%), carvona (1,7%); presenta limoneno, isomentona,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, ácido piperínico, mentol y eucaliptol. El aceite esencial se determina un 89,90% para la fracción terpenica y 10,20% para la fracción no terpenica. Existen compuestos volátiles en proporciones significativas como el: carvacrol, acetato de carvacrilo y trans- $\beta$ -cariofileno (Cano, 2007; Malpartida, 2010; Ccallo, 2013; Huamani, 2015; Salas, 2016).

### **Terpenoides**

Los terpenos proceden de la condensación del isopropeno  $C_5H_8$ , en los mismos aceites esenciales aparecen compuestos derivados del Isopreno, de modo que la calificación de terpeno se extiende a todos aquellos, dividiéndolos en hemiterpenos

$C_5H_8$ , terpenos propiamente dichos, sesquiterpenos  $C_{15}H_{24}$ , diterpenos  $C_{20}H_{32}$  y politerpenos  $(C_5H_8)_n$ , siendo “n” un número elevado. Los productos derivados de los terpenos que tienen oxígeno reciben el nombre de alcanfores. La pulegona y la mentona, son los componentes mayoritarios de los géneros *Mentha* y *Minthostachys*, generalmente, la pulegona está presente en mayor porcentaje en contraste con la *Minthostachys*. La presencia de pulegona, mentona, limoneno y mentol en trazas en el aceite esencial de hojas de *Minthostachys mollis* (muña) es por lo cual tiene efecto fungicida (Figura 1) (Cano *et al.* 2006; Azaña, 2010; Ccallo, 2013; Ordoñez, 2015).

**Pulegona.-** Es uno de los componentes más importantes, pero es mejor conocido por pulegium poleo (*Mentha*). Es un compuesto orgánico de origen natural obtenido a partir de los aceites esenciales de una variedad de plantas, es un monoterpeno, líquido incoloro, aceitoso transparente y tiene un olor agradable se utiliza en agentes aromatizantes, es tóxico para las ratas si se consume en gran cantidad, es un insecticida lo que explica la actividad contra plagas, parásitos, daña el hígado y puede provocar el aborto. Su toxicidad probablemente explica algunos de los efectos del aceite de *Minthostachys* contra las plagas y parásitos. La sustancia también se usa en perfumería, saborizantes y como conservante de alimentos (Figura 1) (Ccallo, 2013; Ordoñez, 2015; Aigaje, 2016).

**Mentona.-** Otro componente muy importante, junto con la pulegona a menudo representa más del 75% de la composición del aceite entero. Es un compuesto orgánico perteneciente al grupo de las cetonas y monoterpenos, está relacionado estructuralmente con el mentol. El más conocido es la menta (*Mentha piperita*). Tiene un aroma muy agradable sabor a menta, se usa en perfumería, es ampliamente utilizado en la

fabricación de productos cosméticos y farmacéuticos pero también tiene propiedades digestivas y no tiene toxicidad (Figura 1) (Ccallo, 2013; Ordoñez, 2015, Aigaje, 2016).

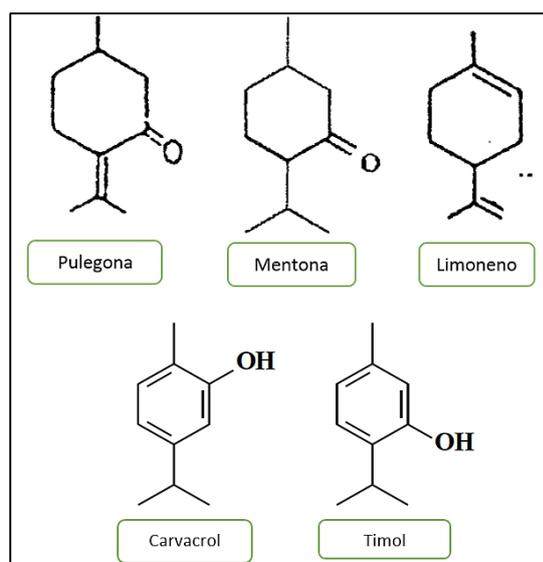
**Carvacrol.-** Se han encontrado para ser componentes dominantes en una menor proporción de los estudios de los aceites de *Minthostachys mollis*. También se encuentra en varias hierbas conocidas como el orégano (*Origanum vulgare*), la ajedrea de verano (*Satureja hortensis*) o tomillo del monte serpolio (*Thymus serpyllum*), y es sobre todo un valor para sazonar, tiene la propiedad de ser un “antioxidante” y presenta un alto nivel de actividad contra microorganismos Gram-negativos con excepción de *P. aeruginosa*. También, es el compuesto mayoritario encontrado en varios artículos de investigación, con un porcentaje de abundancia relativa de 21,24 % (Figura 1) (Ccallo, 2013; Ordoñez, 2015; Aigaje, 2016; Torrenegra *et al.*, 2017).

**Carvona.-** Como su nombre lo sugiere, esta sustancia es conocida como un producto de semillas de alcaravea (*Carum carvi*), tiene propiedades digestivas y se utiliza para dar sabor. Además tiene la propiedad de ser un agente fungicida, insecticida y antibacterial, es una sustancia saborizante ampliamente utilizada en productos farmacéuticos, goma de mascar, pasta dental, enjuagues bucales, alimentos y bebidas (Ccallo, 2013; Aigaje, 2016).

**Mentol.-** Por lo general, es mucho menos importante en *Minthostachys mollis*, pero algunas veces se puede encontrar como componente menor de la mezcla de aceite. Este componente sirve para calmar dolores, por ejemplo en el dolor de garganta, y uno de los principales usos es que actúa como antiséptico, es utilizado también en la agricultura para prevenir plagas e históricamente ha sido utilizado en la elaboración de perfumes y licores (Ccallo, 2013; Aigaje, 2016).

**Linalol.-** Frecuentemente es uno de los menores componentes del aceite de *Minthostachys mollis*, es empleado como condimento y también como insecticida, el linalol es más conocido de cilandro (*Coriandrum sativum*) de la familia Apiaceae. Muchas veces es un componente menor en el aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Azaña, 2010; Ccallo, 2013; Baca, 2017).

**Timol.-** Los aceites de distintas especies de tomillo. Asimismo, el timol es un compuesto fenólico volátil monoterpeneo, el cual tiene eficacia antibacteriana, antifúngica, antioxidante, antiséptico urinario, antiséptico de la cavidad bucofaríngea, antiespasmódico y antioxidante. Este compuesto se usa frente a bacterias Gram-positivas (*S. aureus*, *L. monocytogenes*), Gram-negativas (*S. typhi*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli*), hongos filamentosos (*A. niger*, *F. oxysporum* y *Mucor* spp.), y levaduras (*C. albicans*). Respecto al mecanismo de acción, es capaz de desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, liberando lipopolisacaridos (LPS), aumentando la permeabilidad de la membrana citoplasmática, reduciendo la tasa de síntesis del ATP y permitiendo la liberación de iones (Figura 1) (Ccallo, 2013; Ordoñez, 2015).



**Figura 1.** Estructuras de monoterpenos presentes en hojas de *Minthostachys mollis* (muña).

**Fuente:** Cano *et al.* (2006); Ordoñez (2015).

### **Mecanismo de acción**

El mecanismo de acción de los aceites esenciales no se conoce en toda su extensión. Se sabe que protegen a las plantas contra los agentes externos y que en general tienen una elevada capacidad antioxidante. Observaciones realizadas al microscopio electrónico han demostrado una rotura de la membrana celular de los microorganismos sensibles a su acción. Mientras que, se reconoce que dependen de sus propiedades lipofílicas o hidrofílicas. Los terpenoides pueden servir como un ejemplo de agentes liposolubles, los cuales afectan la actividad de las enzimas catalizadoras a nivel de la membrana, ciertos componentes del aceite esencial pueden actuar como desacopladores, los cuales interfieren en la translocación de protones sobre la membrana y subsecuentemente interrumpir la fosforilación del ADP. En síntesis, el modo de acción dependerá del tipo de microorganismos y la estructura de la pared celular y la membrana externa de los mismos (Azaña, 2010; Malpartida, 2010; Aigaje, 2016).

### **Usos y aplicaciones**

El aceite esencial de *Minthostachys mollis* posee propiedades medicinales, es un antibacteriano natural, tiene propiedades comestibles y aromáticas, posee propiedades preservantes de alimentos, se usa en el campo pecuario, actúa como repelente y se usa como pólvora. Desde la antigüedad se ha empleado en preparaciones culinarias, aromatizantes y como conservantes naturales inhibiendo el deterioro oxidativo y los daños causados por microorganismos. En la medicina natural, industria farmacológica, industria de alimentos, perfumería y cosmética, pastas dentífricas, champús, cremas, aceites para masajes, perfumes, lociones, en múltiples productos de aseo, de higiene personal, como desinfectantes, o desodorantes. En las industrias, textil y de pinturas; como saborizantes, gaseosas, aromatizantes y enmascaradores de olores, como fijadores

y principios activos, componentes en artículos de limpieza, bioinsecticidas entre otros (Stashenko, 2009; Salas, 2016; Baca, 2017).

El aceite esencial de *Mithostachys mollis* posee actividad insecticida contra larvas, pupas y adultos de mosquitos, según protocolos estándar. Se evaluaron entre 10 y 160 ppm del aceite esencial y se registró la mortalidad a las 1, 2,3 y 24 h de exposición. La dosis de 160 ppm mostro una clara actividad insecticida en larvas y adultos, pero no en pupas. Asimismo, algunos extractos de *Lupinus* spp. ricos en alcaloides poseen actividad fungicida sobre *Sclerotium rolfsii*, *Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*. Del mismo modo, el extracto de *L. exaltatus* tiene actividad fungicida contra *R. solani* y *S. rolfsii* De la misma manera, los aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*), limoncillo (*Cymbopogon citratus*), y sus componentes mayoritarios, timol y citral, poseen actividad antifúngica contra la especie *C. acutatum* (Bernal *et al.*2005; Gleiser *et al.* 2007; Alzate *et al.* 2009).

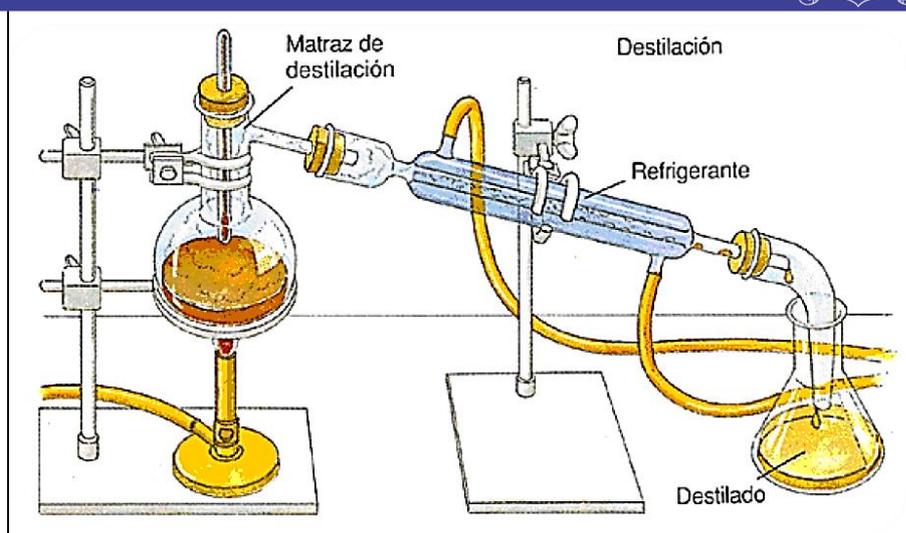
### **Métodos de extracción por destilación**

El termino destilar proviene del latín “*destillare*”: separar por medio de calor, alambiques u otros vasos, una sustancia volátil llamada esencia, de otras más fijas, enfriando luego su vapor para reducirla nuevamente a líquido. Por la temperatura del vapor (100°C) en un cierto tiempo, el tejido vegetal se rompe liberando el aceite esencial. La destilación por arrastre de vapor es una técnica aplicada en la separación de sustancias poco solubles en agua y se emplea para separar una sustancia de una mezcla que posee un punto de ebullición muy alto y que se descomponen al destilar. Es el más sencillo de los métodos y se asemeja a la obtención de licores en los antiguos alambiques. Este método usa gracias a la propiedad que tienen las moléculas de agua en estado de asociarse con moléculas de aceite (Stashenko, 2009; Araneda *et al.* 2014).

### **Arrastre con vapor**

El método de arrastre con vapor se usa para extraer aceites de rizomas, raíces, semillas (vetiver, valeriana, jengibre, anís, cardamomo, etc.) y hojas secas o fermentadas. Esta técnica es una de las más simples y económicas para obtener el aceite esencial. Las ventajas son su simplicidad, bajo costo y poder maniobrar grandes volúmenes de materia prima. En la destilación por arrastre de vapor de agua se da la vaporización selectiva del componente volátil de una mezcla (vapor de agua y aceite) y otros no volátiles. Lo anterior se logra por medio de la inyección de vapor de agua en el seno de la mezcla, denominándose “vapor de arrastre”, pero, su función no es la de arrastrar el componente volátil, si no condensarse formando otra fase inmiscible que cederá su calor latente a la mezcla a destilar para lograr su evaporación (Figura 2) (Stashenko, 2009; Azaña, 2010; Aigaje, 2016).

El equipo de destilación está compuesto de doble balón, uno de los balones contiene agua y es sometido al calor directo; mientras, el segundo balón contiene la planta licuada, recibe los vapores de agua, para liberar el vapor mixto (agua-aceite esencial) hacia el condensador. Este método requiere de un generador de vapor externo (caldero), el cual genera vapor que puede ser transportado por tuberías hacia la cámara de extracción (vapor seco o húmedo), debe tener una presión promedio de 3 kg-f/cm<sup>2</sup>. El agua al hervir puede arrastrar todo líquido no miscible, debido a que la presión de vapor es igual a la presión atmosférica, el sistema entra en ebullición y la presión parcial de cada vapor será inferior a la presión externa, en consecuencia cada líquido entra en ebullición a una temperatura inferior (Figura 2) (Azaña, 2010; Huamani, 2015; Aigaje, 2016).



**Figura 2.** Destilación por arrastre de vapor de agua en el laboratorio.

**Fuente:** Aigaje (2016).

### 2.2.2. Descripción del hongo *Fusarium*

Los hongos del género *Fusarium* tienen una amplia distribución en el mundo, son ascomicetos filamentosos y cosmopolitas que se encuentran ampliamente distribuidos en el suelo, aire, agua y plantas; debido a su capacidad de crecer a 37°C son considerados oportunistas. Además, poseen un micelio bien desarrollado, septado y conidióforos característicos, aunque algunas especies tienen un talo unicelular. Puede sobrevivir por largos periodos en el suelo, debido a sus estructuras de resistencia denominadas clamidosporas. Por esta razón, se les considera hongos de campo con capacidad de sobrevivir en materia orgánica en descomposición y de manera saprofita. Tienen la capacidad de infectar especies vegetales cuando sufren algún tipo de desbalance, colonizan las partes aéreas y subterráneas de las plantas. Algunas especies del género *Fusarium* son benéficas en la agricultura y se han utilizado en el control biológico de ciertas especies patogénicas, se ha utilizado como microherbicida por su potencial de destruir algunas malezas (Garcés *et al.* 2001; Marín, 2010; Tapia & Amaro, 2014; Villa *et al.*, 2015; Retana *et al.* 2018).

Estos hongos son considerados fitopatógenos porque infectan a una amplia gama de cultivos, ya que poseen mecanismos para vencer las defensas de muchas plantas, además la dispersión del patógeno se da por movimientos de suelo infectado, agua de escorrentía y el uso de almacigo infectado. A parte de ello, esto reduce la calidad y el rendimiento de plantas originando pérdidas económicas considerables, ya que causan un sin número de enfermedades en el hospedante, así como también una serie de afecciones generalmente de carácter irreversible. Es evidente que producen micotoxinas responsables de enfermedades en seres humanos y animales, del mismo modo pueden causar infecciones sistémicas en pacientes inmunocomprometidos, con una alta mortalidad (Alexopoulos & Mims, 1985; Tapia & Amaro, 2014; Bonifaz, 2015; Villa *et al.*, 2015; Forero *et al.*, 2017; Leyva *et al.*, 2017).

#### **Taxonomía de *Fusarium*.**

La clasificación taxonómica del género *Fusarium* es controvertida según diversos taxónomos en su identificación hasta especie porque existe variación en las características culturales de las colonias del hongo y tamaño de las esporas; el sistema taxonómico está basado en dichas características y la clasificación se centra en el estudio de la morfología y ausencia o presencia de tres tipos de esporas asexuales que son: macroconidios, microconidios y clamidosporas. Otras claves son la morfología de la colonia, pigmentación y presencia de peritecios, es por eso que, debe ser hecha por expertos para evitar errores. Las especies con mayor variación son: *F. avenaceum*, *F. graminearum*, *F. moniliforme* y *F. solani*. A pesar de la taxonomía molecular y metodologías como MALDI-TOF, la taxonomía clásica continúa vigente. A pesar de eso, no existe ningún manual disponible (Alexopoulos & Mims, 1985; Arbeláez, 2000; Estupiñán & Ossa, 2007; Marín, 2010; Tapia & Amaro, 2014; Bonifaz, 2015; Forero *et al.*, 2017; Leyva *et al.*, 2017).

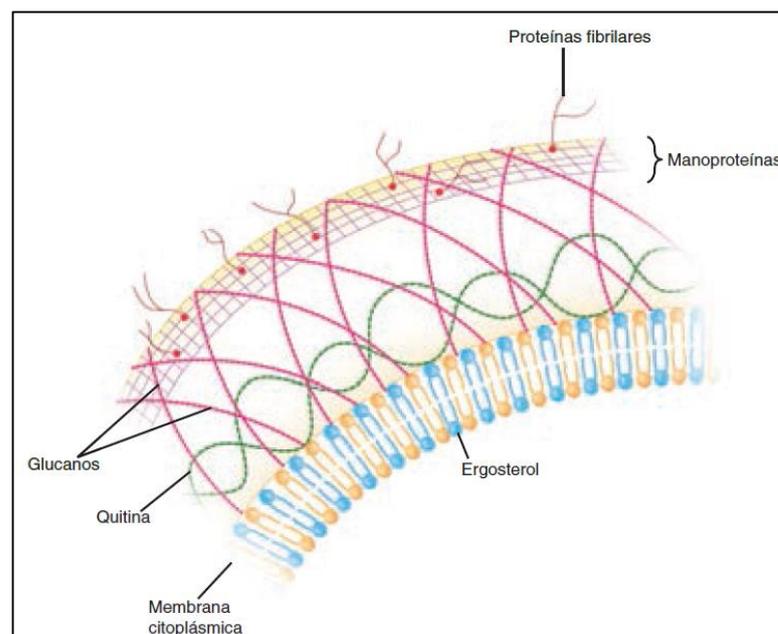
Pertenece al Phylum *Ascomycota*, Orden *Hypocreales* y existen 160 géneros de Tuberculariaceas, se han reconocido entre nueve y 78 especies, además se han descrito alrededor de 150 especies morfológicas y/o filogenéticamente diferentes, de las patógenas para el ser humano, destacan *F. solani*, *F. oxysporum* y *F. verticilloides*. También, en Estados Unidos se han registrado 30 especies y en Colombia cuatro. Asimismo, 120 diferentes formas especiales que no se pueden diferenciar por su morfología o por las características culturales de las colonias, sin embargo son fisiológicamente diferentes debido a la infección que produce el patógeno en un hospedante específico. A parte de ello las variaciones en la patogenicidad son poco frecuentes y consisten principalmente en la pérdida o en la disminución de la virulencia. Asimismo, se subdividen en razas por la habilidad de infectar diferentes haplotipos o variedades en una especie hospedante (Alexopoulos & Mims, 1985; Arbeláez, 2000; Estupiñán & Ossa, 2007; Marín, 2010; Tapia & Amaro, 2014; Bonifaz, 2015; Forero *et al.*, 2017; Leyva *et al.*, 2017).

### **Estructura**

Las células micóticas poseen al menos un núcleo con un nucléolo, membrana nuclear, un retículo endoplásmico, ribosomas, organelos como las mitocondrias, aparato de Golgi y cromosomas lineales ya que son organismos eucarióticos; el citoplasma contiene un citoesqueleto con microfilamentos de actina y microtúbulos que contienen tubulina. Además tienen una pared celular rígida externa a la membrana citoplásmica; una diferencia importante es que las membranas citoplásmicas están constituidas por esteroides, en los hongos el esteroide dominante es el ergosterol. Muchos son aerobios obligados o facultativos, son quimiotrofos, secretores de enzimas que degradan una amplia variedad de sustratos orgánicos en nutrientes solubles que luego son absorbidos

pasivamente o integrados a la célula por transporte activo (Brooks *et al.* 2011; Kenneth & George, 2011).

Todos los hongos cuentan con una pared esencial rígida que les da su forma. Las paredes están compuestas en gran medida de capas de carbohidratos (cadenas largas de polisacáridos), también glucoproteínas y lípidos. La estructura química de la pared celular en los hongos poseen polisacáridos manano, glucano (polímeros de glucosilo, algunos de los cuales forman fibrillas que incrementan la fuerza de la pared celular micótica), quitina (que es el componente principal de la pared celular que está compuesta de cadenas largas, no ramificadas, de poli-N-acetilglucosamina) y proteínas estructurales. Las manoproteínas son polímeros de manosa que se encuentran en la superficie de la matriz estructural de la pared celular, donde se encuentran unidas a proteínas. En la Figura 3, se muestra la superposición de elementos de manano, glucanos, quitina y elementos proteínicos. Las proteínas que forman complejos con el manano (manoproteínas) se extienden más allá de la pared celular (Brooks *et al.*, 2011; Kenneth & George, 2011).



**Figura 3.** Pared celular de un hongo.

**Fuente:** Kenneth & George (2011).

## **Metabolismo**

El metabolismo de los hongos es heterótrofo, pues degradan sustratos orgánicos como fuente exógena de carbono ya que viven en la naturaleza y proliferan fácilmente si tienen una fuente sencilla de nitrógeno y carbohidratos. La diversidad metabólica es grande, pero la mayor parte de los hongos crecen solo con fuentes de carbono orgánico y amonio o iones nitrato. En esencia, los nutrientes para los hongos de vida libre se derivan de la descomposición de la materia orgánica. El medio tradicional en micología, el agar de Sabouraud, que contiene glucosa y peptona modificada (pH 7.0). Una diferencia fundamental entre hongos y plantas es que los hongos carecen de cloroplastos y de mecanismos fotosintéticos productores de energía. En su mayor parte son aerobios estrictos, aunque algunos pueden crecer en condiciones anaerobias. Solo unos pocos son anaerobios, ninguno de los cuales es patógeno para los seres humanos (Brooks *et al.*, 2011; Kenneth & George, 2011).

## **Características macroscópicas del genero *Fusarium* sp.**

La morfología de las colonias es muy variable, puede presentar dos tipos: una de tipo pionotal con la formación de poco o ningún micelio aéreo y otra de tipo micelial caracterizada por la producción de abundante micelio aéreo, poseen un tamaño ilimitado, con textura algodonosa o lanosa, tiene forma vellosa y aspecto seco, y muchas veces se adhiere a las paredes del tubo, en el lado anverso del medio de cultivo posee coloración variable, es de color blanco en un inicio, (uno a tres días), luego se torna en tonalidades con diversos pigmentos según la especie aislada como crema, naranja, rosado durazno, amarillo, salmón, café, morado, lila, pero usualmente con un tinte púrpura o violeta más intenso en la superficie del agar, pardo claro o pardo rojizo mezcladas con zonas de color púrpura. Al lado reverso del cultivo en placa presenta

color naranja, café o violeta, todos difusibles al medio (Garcés *et al.*, 2001; Estupiñán & Ossa, 2007; Guevara *et al.* 2007; Onan, 2013; Martínez *et al.* 2014; Bonifaz, 2015).

### **Macromorfología de las principales especies de *Fusarium*.**

Las especies de *Fusarium* poseen colonias de rápido desarrollo a 25 y 37°C (siete días). Posee colonias de color crema, pardo claro o pardo rojizo mezcladas con zonas de color purpura, la textura es algodonosa o lanosa; *Fusarium solani* tiene colonias vellosas, planas y blancas que se tornan de verde a café azulado y violeta, el reverso sin pigmento. *Fusarium oxysporum* posee colonias vellosas, planas y blancas, que se tornan violeta, el reverso puede ser sin pigmentos o de color azul o purpura oscuro. *Fusarium verticillioides* tiene colonias vellosas, planas y blancas, que se tornan a purpura, reverso sin pigmentos. *Fusarium dimerum* tiene colonias vellosas, de crecimiento lento, planas, de color naranja y el reverso sin pigmentos. *Fusarium chlamydosporum* posee colonias vellosas, planas y blancas que se tornan rosa oscuro, rojo y ocre; el reverso con pigmento de rojo carmín a café (Guevara *et al.*, 2007; Bonifaz, 2015).

### **Características microscópicas del genero *Fusarium* sp.**

Los miembros del género *Fusarium* poseen hifas hialinas que varían en diámetro, generalmente en angulaciones de 45 y 90°, así como también tienen conidios (fialosporas) hialinas, variables, principalmente de dos tipos, a menudo sostenidas en pequeñas cabezas parecidas a gotas, que son las microconidias y las macroconidias, aparecen sobre la superficie de las plantas que han sido destruidas por el patógeno, además pueden sobrevivir en estado de reposo en el suelo durante muchos años e incluso infectar después de 20 a 40 años a través de estas estructuras de resistencia. Este género posee un micelio macrosifonado de 1 a 2  $\mu\text{m}$  de diámetro, septado y hialino, y la modalidad de micelio es que las hifas se organizan en *coremium*, también participa en la

identificación e incluso sugerir una especie o genero de hongo (Figura 4) (Alexopoulos & Mims, 1985; Kenneth & George, 2011; Onan, 2013; Bonifaz, 2015).

## **Reproducción de *Fusarium***

### **Fase sexual**

Los *Ascomycetes* forman esporas sexuales conocidas como ascosporas, mediante la fusión de dos células del mismo micelio o de dos micelios distintos, en este tipo de reproducción los núcleos haploides de las células donadoras y receptoras se fusionan para formar un núcleo diploide, el cual se divide por meiosis clásica. Las esporas resultantes de la división de la célula formada una vez han tenido lugar la conjugación se encuentran en el interior de un asca, o receptáculo que suele contener ocho esporas. Las ascas pueden ser simples o estar agrupadas dentro de una envoltura común denominada ascocarpo, el cual se forma por ramificación y entrecruzamiento de hifas contiguas. Algunas especies del genero *Fusarium* suelen reproducirse por procesos sexuales conocida como fase sexual (teleomorfica o perfecta), siendo *Gibberella* el género que agrupa la mayoría de los teleomorfos de *Fusarium*, las especies restantes de *Fusarium* son *Neocosmospora* (o *Haematonectria*), *Cosmospora* y *Albonectria* (Frazier & Westhoff, 1993; Kenneth & George, 2011).

### **Fase asexual**

La mayoría de las especies del genero *Fusarium*, presentan fase asexual (anamorfica o forma imperfecta) ya que aparentemente ha perdido el estado perfecto o sexual, y su elemento reproductor se llama “conidia” formada de manera exógena, puede originarse directamente de la hifa o de una estructura especial en forma de tallo, el conidióforo. En el cual se incluye la división mitótica del núcleo haploide con la reproducción asociada de conidias con forma de esporas por gemación o la separación

de elementos de las hifas. Existen tres tipos de conidias que son microconidias, macroconidias y clamidosporas; estas estructuras asumen una gran variedad de tamaños, formas relaciones con la hifa progenitora, y la morfología, así como también el desarrollo de estas estructuras son la base primaria para la identificación. Asimismo, estas unidades reproductoras cumplen funciones tales como multiplicación y diseminación en la planta (Arbeláez, 2000; Garcés *et al.*, 2001; Estupiñán & Ossa, 2007; Marín, 2010; Kenneth & George, 2011; Martínez *et al.*, 2014).

En términos microscópicos, se reproduce por microconidios y macroconidios fusiformes que varían en forma y numero según la especie aislada. Se utilizan términos como macroconidia y microconidia para indicar el tamaño y complejidad de estas conidias que se desarrollan en el interior de la hifa se denominan clamidoconidia o artroconidia. La clamidoconidia se vuelve más grande que la hifa misma; son estructuras redondeadas, de pared gruesa, que pueden ubicarse en el extremo terminal de la hifa o en su trayecto. La artroconidias adquiere la forma y tamaño de unidades de hifa, pero se encuentran engrosadas o diferenciadas de alguna manera. Las artroconidias pueden formar un grupo de conidias delicadamente unidas que se separan y diseminan cuando se agitan (Arbeláez, 2000; Garcés *et al.*, 2001; Estupiñán & Ossa, 2007; Marín, 2010; Kenneth & George, 2011; Martínez *et al.*, 2014).

### **Fialide**

Al microscopio, la fialide es generalmente fina, con forma de botella; simple o ramificada; cortas o largas; monofialidica (que emergen esporas de un poro de la fialide) o polifialidica (de varios poros). Las Tuberculariaceas están caracterizadas porque todas ellas producen esporodoquios. Probablemente los géneros más conocidos

son *Tubercularia*, *Votulella* y *Fusarium*, además en los tres géneros, los conidios se producen a partir de fialides (Alexopoulos & Mims, 1985; Tapia & Amaro, 2014).

### **Conidióforo**

El género *Fusarium* se caracteriza por presentar conidióforos de hifas aéreas generalmente no ramificados, muy largos, variables, delgados, simples, cortos, con ramificaciones irregulares o con fialides simples más o menos cilíndricas, en cuyo ápice se puede encontrar un conidio no desprendido; o agrupadas en esporoquios los cuales son una formación de conidios al medio de cultivo mediante estroma y agregaciones filamentosas, que pueden ser cortos o ramificados (Guevara *et al.*, 2007; Onan, 2013; Bonifaz, 2015).

### **Microconidios**

Es frecuente encontrar algunas conidias que parecen intermedias de 2 a 3 células entre los microconidios y los macroconidios, oblongos o ligeramente curvados. Los microconidios están ausentes en algunas especies, son pequeñas agrupaciones (estructuras mucoides llamadas “falsas cabezas”), suelen ser esporas unicelulares, simples o en cadenas (largas o cortas) todas observables a la lupa (40x), sin septas, hialinas, lisas, de forma variable dependiendo de la especie por ejemplo: esférica, ovalada, clavada, ovoide, oblonga, elipsoidal a cilíndrica o subcilíndrica, recta o ligeramente curvada, fusiformes, entre otras, además pueden variar en tamaño de 1 a 3  $\mu\text{m}$  de largo por 1  $\mu\text{m}$  de ancho; otros autores refieren que el largo es de 5-12 o 7 – 16  $\mu\text{m}$  y tienen un ancho de 2.5- 3.5 o 2,5 – 4,5  $\mu\text{m}$ ; se forman sobre fialides laterales, cortas, simples o sobre conidióforos poco ramificados (Figura 4 y Figura 5) (Alexopoulos & Mims, 1985; Garcés *et al.*, 2001; Estupiñán & Ossa, 2007; Guevara *et al.*, 2007; Onan, 2013; Tapia & Amaro, 2014; Bonifaz, 2015).

### **Macroconidios**

Reciben la denominación debido a su tamaño y es producido a partir de fialides. Además, son masas mucosas que son esporas de paredes delgadas, hialinas, largas, multicelular, multiseptadas (3 a 5), célula basal elongada y célula apical atenuada, en forma de media luna o de canoa, moderadamente curvados en forma de hoz o doblados en las en las puntas, tienen un tamaño de 27-60 x 3-5  $\mu\text{m}$ , con extremos más o menos redondeados 28-50 x 4-6  $\mu\text{m}$ , fusiformes de 5-8  $\mu\text{m}$  de largo por 1-2  $\mu\text{m}$  de ancho, otros autores indican de 27 a 46  $\mu\text{m}$  de largo por 3.0 a 4.5  $\mu\text{m}$  de ancho, ubicadas en los esporodoquios, algunos géneros no forman esporodoquios y pueden encontrarse separados, hecho que hace que la inclusión de *Fusarium* en las Tuberculariaceas sea algo arbitraria. Para su correcta clasificación es importante el largo, ancho, curvatura, septos, agrupaciones mucoides (esporodoquios) y detalles de las células de los extremos (célula apical y pie) (Figura 4 y Figura 5) (Alexopoulos & Mims, 1985; Garcés *et al.*, 2001; Estupiñán & Ossa, 2007; Guevara *et al.*, 2007; Onan, 2013; Tapia & Amaro, 2014; Bonifaz, 2015).

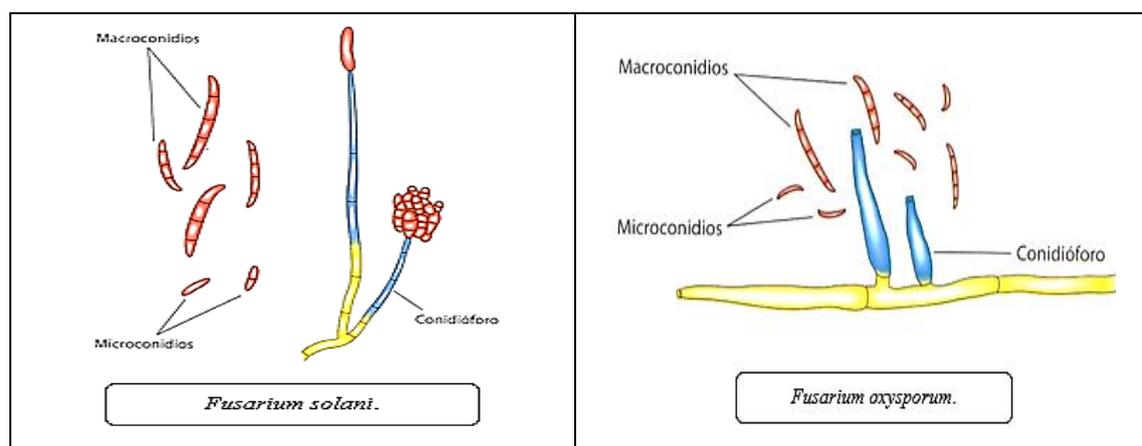
### **Clamidosporas**

El hongo sobrevive en condiciones ambientales desfavorables y en el suelo como saprofito de vida libre en tejidos muertos de plantas hospedantes por largos periodos con estructuras llamadas clamidosporas terminales e intercalares, las cuales son esporas formadas a partir de la condensación del contenido de las hifas y las conidias, se caracterizan por poseer doble pared gruesa, lisa o rugosa, parduzca, son globosas; de manera aislada, en pareja o en grupo, lo que las hace muy resistentes, estas se forman simples o en pares, son terminales o intercalares, su tamaño varía de 5 a 15  $\mu\text{m}$  de diámetro, 10  $\mu\text{m}$  de ancho. Del mismo modo, la estructura y las características de

las clamidosporas son muy importantes para la identificación de las especies (Figura 5) (Arbeláez, 2000; Garcés *et al.*, 2001; Estupiñán & Ossa, 2007; Guevara *et al.*, 2007).

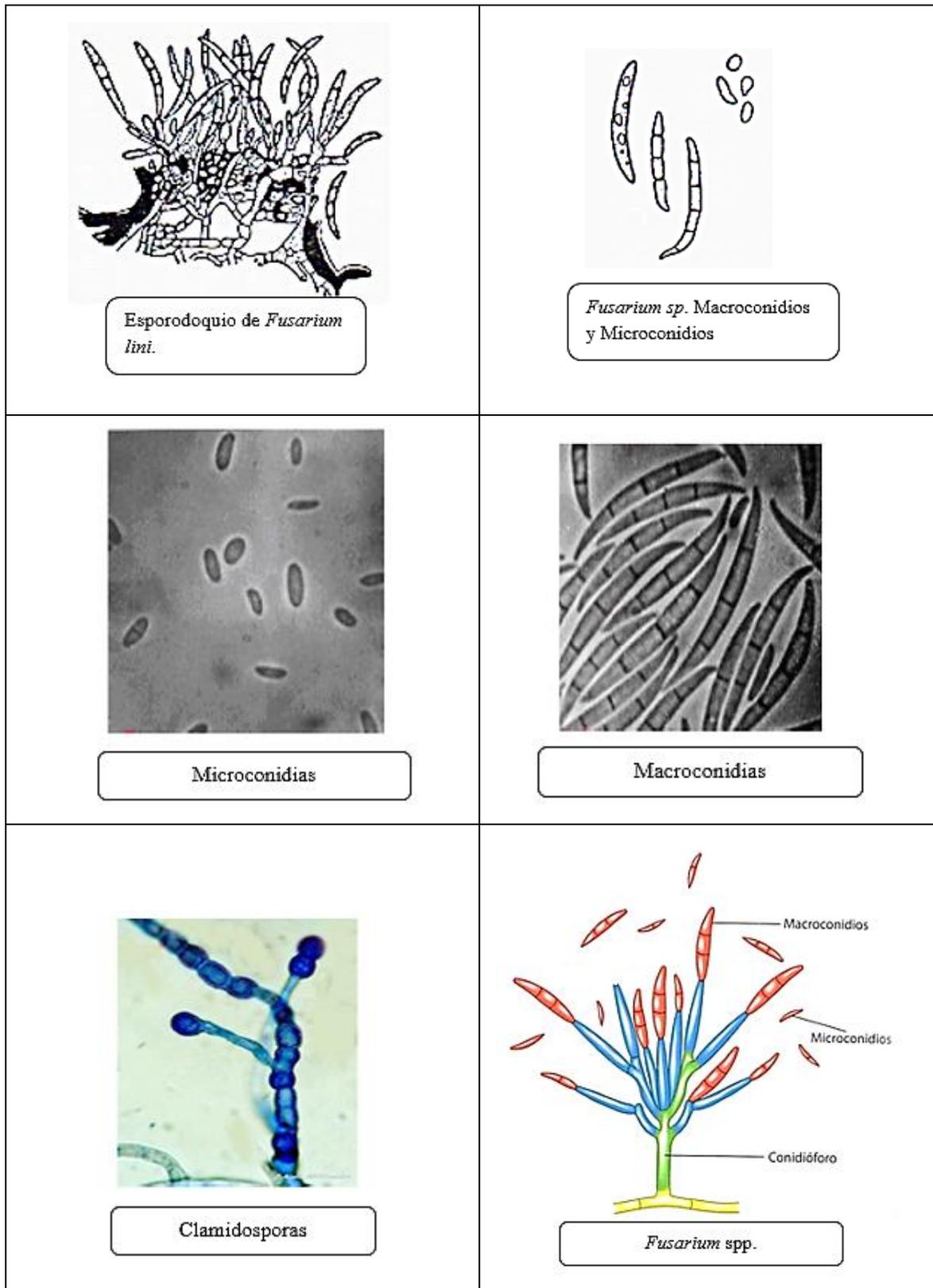
### Micromorfología de las principales especies de *Fusarium*.

El género *Fusarium* presenta conidióforos de esporodoquios cortos, ramificados, conidióforos de hifas aéreas no ramificados largos, reducidos a una fialide. *F. solani* tiene hifas delgadas y tabicadas, conidióforos, macroconidios abundantes (3-5), microconidios fusiformes y clamidoconidios. *F. oxysporum* posee hifas delgadas y tabicadas, conidióforos, macroconidios (3-5) y microconidios abundantes. *F. verticillioides* tiene hifas delgadas y tabicadas, conidióforos, con monofialides y macroconidios fusiformes (3-5), microconidios solos y en cadenas. *F. dimerum* posee hifas delgadas y tabicadas, conidióforos ramificados cortos, con macroconidios fusiformes (1-2) y sin microconidios, puede presentar clamidoconidios. *F. chlamydosporum* poseen hifas delgadas y tabicadas, conidióforos ramificados cortos y dispersos, con macroconidios fusiformes (4-6), microconidios y escasos blastoconidios, presenta abundantes clamidoconidios rugosos (solos o juntos) (Figura 4 y Figura 5) (Guevara *et al.*, 2007; Bonifaz, 2015).



**Figura 4.** Micromorfologías de diferentes especies de *Fusarium* (microconidias, macroconidias y clamidosporas).

**Fuente:** Alexopoulos & Mims (1985); Bonifaz (2015).



**Figura 5.** Micromorfología de diferentes especies de *Fusarium* (microconidias, macroconidias y clamidosporas).

**Fuente:** Alexopoulos & Mims (1985); Bravo *et al.* (2012); Bonifaz (2015).

### **Micotoxinas del genero *Fusarium***

El género *Fusarium* produce metabolitos secundarios conocidas como micotoxinas, actualmente se conocen cerca de 300 micotoxinas, muchos han sido aislados de alimentos sometidos a deterioro, semillas, materias primas agrícolas, productos derivados y almacenados. Aquellas que actúan sobre las plantas de manera directa se denominan fitotoxinas. Por otro lado, estas sustancias producen micotoxicosis graves, agudas o crónicas en animales y en el ser humano, debido a la ingestión o inhalación de estas. Su toxicidad es variada, puede afectar al sistema nervioso central, cardiovascular, pulmonar y tracto digestivo. Además actúan como agentes cancerígenos, mutagénicos, teratogenicos e inmunodepresores. En países en desarrollo son susceptibles de contaminación de forma significativa por la morbilidad y las muertes prematuras relacionadas con las micotoxinas (Wainwright, 1992; Marín, 2010; Bonifaz, 2015; Villa *et al.*, 2015).

### **Fumonisinias**

Las fumonisina (FBs) es una micotoxina frecuente y toxica para animales y humanos, producida por el género *Fusarium spp.*, pues sus efectos van desde carcinógeno, mutagenico, teratogenico, citotoxico, neurotoxico, nefrotoxico, gastrotoxico, neumotoxico, hasta inmuno-supresores y estrogenico. Las especies más comunes son *F. moniliforme* *F. verticillioides* y *F. proliferatum* que son patógenos del maíz. Además en la estructura química encontramos que son aminopolioles con una cadena lineal de 20 átomos de carbono, la cual tiene un grupo amino en el carbono 2, junto con grupos metilo, hidroxilo y ácido tricarbóxilo en diferentes posiciones a lo largo del esqueleto carbonado. Se pueden clasificar en cuatro series: fumonisinas A, B, C y P. Las de serie B son de cuatro tipos FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub>, FB<sub>3</sub> y FB<sub>4</sub>, siendo la más importante la fumonisina FB<sub>1</sub> (Marín, 2010; Murray *et al.* 2014; Bonifaz, 2015).

### Tricotecenos

Los tricotecenos son producidas por *F. graminearum*, *F. acuminatum* y *F. avenaceum*, contaminan cereales de grano pequeño, como el trigo, centeno, cebada, maíz, avena y semillas de girasol. Además, la ingestión de estos cereales contaminados causa enfermedades en el hombre y animales, sus efectos en el hombre van desde carcinógenos, mutagénicos, teratogenicos, citotoxicos, neurotoxicoa, nefrotoxicas, hasta inmuno-supresores y estrogenicos; en los animales producen efectos gastricos (náuseas y vomitos), neurotoxicos, afecta a cerdos, perros, gatos y patos. La estructura química está constituida por 60 metabolitos sesquiterpenoides, además comparten un núcleo tricíclico llamado tricodieno caracterizado por un doble enlace en la posición 9, 10 y un grupo epóxido entre los carbonos 12 y 13, responsable de su toxicidad. Existen cuatro tipos que son de tipo A, B, C y D (Wainwright, 1992; Marín, 2010; Bonifaz, 2015; Villa *et al.*, 2015).

Los del tipo A son más tóxicos que los del tipo B, ya los del tipo B poseen un grupo ceto en el carbono 8. Al contrario a los de tipo A que se caracterizan por la ausencia de un grupo ceto en el carbono 8, están representados por la toxina T-2 y la toxina HT-2. Los más importantes son el deoxinivalenol (DON), también conocida por vomitoxina o toxina Rd y el nivalenol; además están considerados como factores de virulencia; su toxicidad se debe a la síntesis proteica en eucariotas, al unirse al ribosoma e inhibir la actividad peptidil-transferasa. Además, es la responsable de la “aleukia toxica alimentaria” (ATA), Los síntomas producidos por la toxina T-2 serían gastrointestinales, dermatológicos (necrosis dérmica, irritacion), neurológicos y carcinogénica, el cual afecta a ganado vacuno y al ser humano (Wainwright, 1992; Marín, 2010; Bonifaz, 2015; Villa *et al.*, 2015).

### **Zearalenona**

La zearalenona (ZEA) o toxina F-2, son producidas por *F. graminearum*, *F. verticilloides* y *F. oxysporum* contaminan los cereales como trigo, cebada, maíz, frutos y semillas. La ingestión de alimentos contaminados no tiene asociado graves micotoxicosis en el ser humano, pero tiene toxicidad estrogénica y abortiva, además afecta a ganado porcino y bovino. La zearalenona es un macrolido que se describe como 6-(10-hidroxi-6-oxo-trans-1-undecenil)- $\beta$ -ácido resorcíclico. Su toxicidad se debe a que tienen estructura de lactonas, además de actividad estrogénica, por su similitud con la estructura química del 17- $\beta$ -estradiol y otros estrógenos. A pesar de su escasa semejanza estructural aparente con los estrógenos fisiológicos. Sin embargo, la estructura tridimensional del anillo de lactona sitúa un grupo OH en una posición tal que puede interactuar con los receptores de estrógenos (Wainwright, 1992; Marín, 2010; Bonifaz, 2015; Villa *et al.*, 2015).

### **Eniانتinas**

Las eniانتinas (ENs) están producidas por diversas especies del género *Fusarium*. Puesto que estas especies colonizan cereales, estas toxinas se pueden acumular en el grano. Sin embargo, aún no se las ha asociado a ningún brote o enfermedad animal trascendente vía natural. Las eniانتinas son depsipeptidos hexacíclicos no ribosomales. En función de los grupos funcionales que pueden unirse a los residuos ácido N-metilamino se han aislado hasta 10 eniانتinas diferentes. La más importante de todas es la beauvericina (BEA), por aislarse predominantemente de trigo. Su toxicidad es leve o moderada y se debe a que producen un aumento de la permeabilidad de las membranas a los iones. Además son desacopladores de la fosforilación oxidativa. Concretamente, la beauvericina es altamente tóxica en células de mamífero, y se ha demostrado que son capaces de inducir la apoptosis en líneas

celulares humanas y de ratón, así como en otras especies (Wainwright, 1992; Marín, 2010).

### **Moniliformina y Fusaproliferina**

La “moniliformina” es una micotoxina producida por distintas especies de *Fusarium*, se ha aislado de trigo y de maíz. Su estructura química es de una sal sódica o potásica de 1-hidroxíciclobut-1-en-3,4-diona. Su toxicidad consiste en la inhibición del sistema enzimático de la piruvato deshidrogenasa, y como consecuencia en la inhibición del ciclo de Krebs y por tanto, la respiración celular. Las manifestaciones tóxicas incluyen hipertrofia cardíaca y desórdenes hematológicos. Se ha descrito una alta mortalidad asociada al consumo de piensos contaminados con moniliformina en pollos. Asimismo tenemos a la micotoxina conocida como “fusaproliferina” que es un terpeno que se aisló por primera vez en 1995 de un cultivo de *F. proliferatum* procedente de maíz del norte de Italia. Posteriormente se comprobó que también podía ser sintetizado por *F. subglutinans*. La fusaproliferina es tóxica para linfocitos B humanos y causa efectos teratogénicos en embriones de pollo (Wainwright, 1992; Marín, 2010).

### **Otras micotoxinas**

Se han descrito otras micotoxinas producidas por *Fusarium*, como el “butenilido” que es producido por *F. graminearum* o *F. nivale*, el cual se encuentra en avena y cereales, el tipo de toxicidad es neurotóxica y gastrotóxica, afecta a caballos y el ser humano. Es moderadamente tóxico frente a ratones, aunque también se ha descrito una enfermedad del ganado que se conoce con el nombre de “*fescue foot*”, se caracteriza por edemas y gangrena en las extremidades. Tenemos también la “equitesina” es de particular interés debido a su actividad contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Se ha descrito que la producen *F. equiseti* y *F.*

*semitectum*. También tiene una leve actividad contra bacterias gram positivas y moderada toxicidad frente a ratones (Wainwright, 1992; Marín, 2010; Bonifaz, 2015).

Otra micotoxina es la “fusarina C” que ha estado asociada con brotes epidémicos, a pesar de que nunca se ha llegado a esclarecer esta relación. En determinadas condiciones es capaz de tener carácter mutagénico, aunque nunca derivado de la ingesta de alimentos contaminados con esta micotoxina. La “fusarina” es producida por los hongos *F. roseum*, *F. tricinctum*, *F. poae*, *Stachybotrys* sp., *Trichoderma* y *Trichothecium*. La fusarina se puede encontrar en maíz, trigo, cebada, avena, sorgo, arroz, ajonjolí, frutos y verduras (tomates, cítricos), semillas y piensos. El tipo de toxicidad es que es estrogenica y abortiva, inmunodepresora, la cual afecta a ganado porcino y bovino. También se puede encontrar la “fusarina T-2, fusarina HT-2, fusarina HT-2 y DAS”. Por ultimo podemos encontrar “alcaloides de ergot, eniatinas y ácido fusarico”, que son fitotoxinas (Wainwright, 1992; Marín, 2010; Bonifaz, 2015).

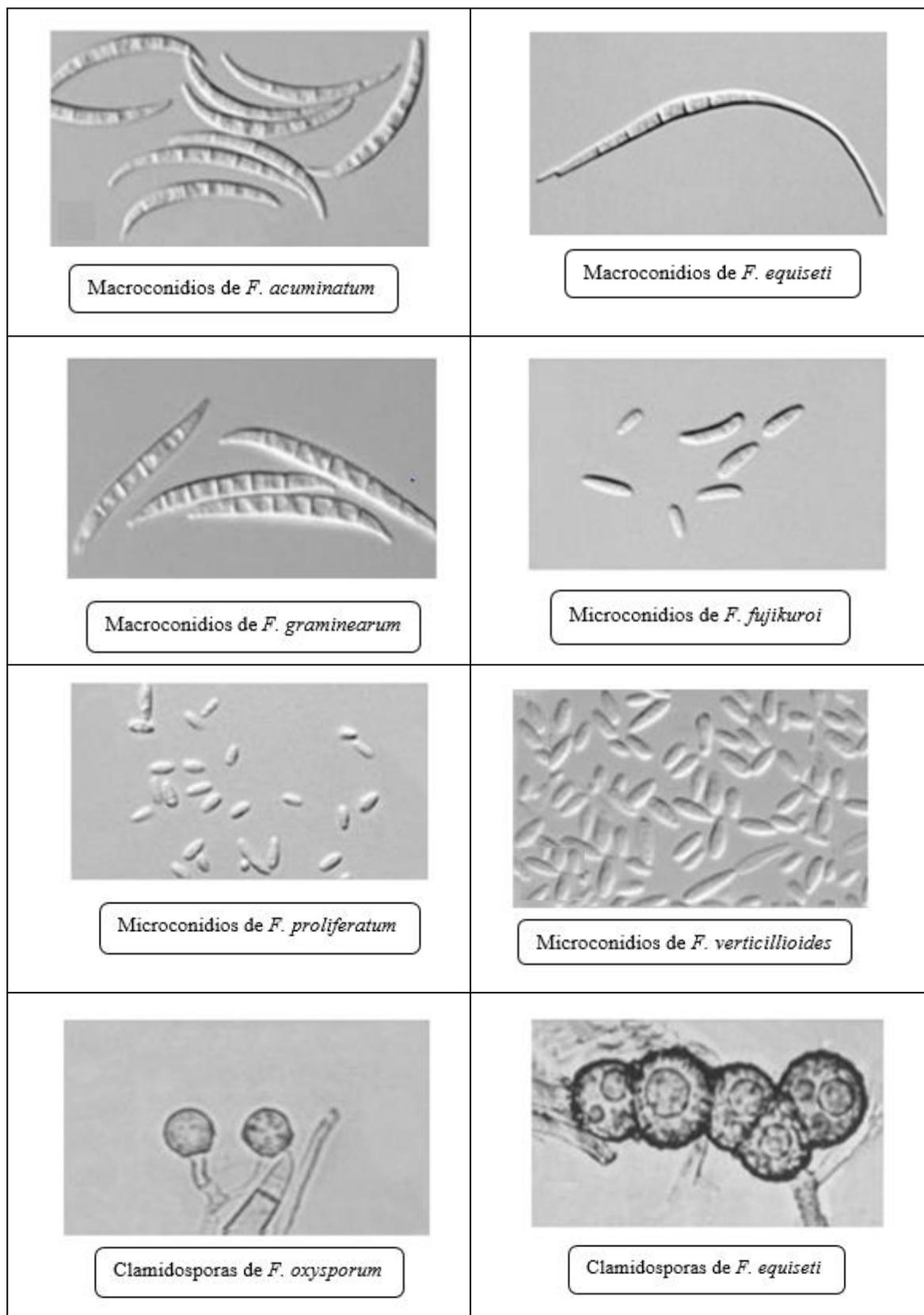
### **Diagnostico por laboratorio**

#### **Exámenes directos y tinciones**

El método más simple consiste en realizar un frotis colocándolo entre portaobjetos y cubreobjetos con hidróxido de potasio (KOH) al 10%. El KOH disuelve más rápidamente los elementos celulares que los hongos (protegidos por la pared celular). Los álcalis digieren los elementos hísticos pero no las paredes celulares rígidas de mohos o levaduras, después de la digestión del material, el hongo puede observarse bajo microscopia de luz con o sin tinción. Para el examen directo puede añadirse fluoruro de calcio blanco, un colorante que tiñe los polisacáridos en la celulosa y quitina. Bajo luz ultravioleta, el fluoruro de calcio blanco adquiere un color

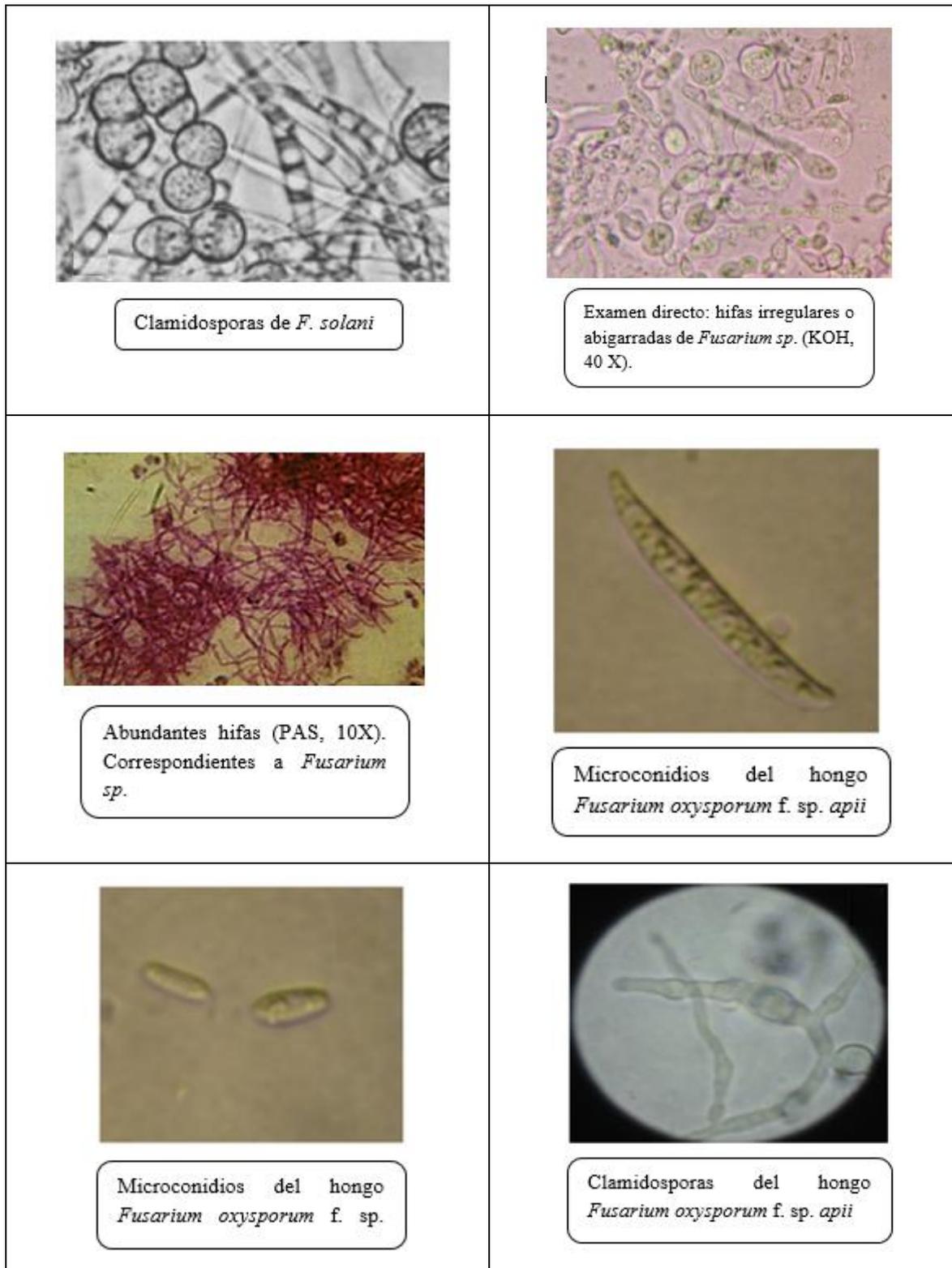
fluorescente, incrementando la detección de hongos en líquidos o cortes de tejido (Figura 6 y Figura 7) (Llovo & Pontón, 2007; Kenneth & George, 2011; Bonifaz, 2015).

Se realiza un frotis que pueden teñirse con diversas técnicas como Giemsa, PAS, naranja de acridina, Grocott y Papanicolau; la tinción de azul de lactofenol preserva e identifica a los componentes estructurales de los hongos, tiñe hifas, conidias y esporas, puede observarse producción de conidias por días o semanas después del crecimiento inicial del moho, además la coloración de tinta china es un método de contraste el cual permite visualizar la capsula de polisacárido de *Cryptococcus neoformans*, mediante la presencia de un halo claro y nítido alrededor de la levadura. Por otro lado, la coloración de Giemsa es útil para el diagnóstico de histoplasmosis, neumocistosis y otras micosis; asimismo, la coloración Gram permite observar blastoconidias y pseudomicelios de las especies del género *Cándida*, *Malassezia* y *Cryptococcus* (Figura 8 y Figura 9) (Guevara, Urcia, & Casquero, 2010; Kenneth & George, 2011; López *et al.*, 2014; Bonifaz, 2015).



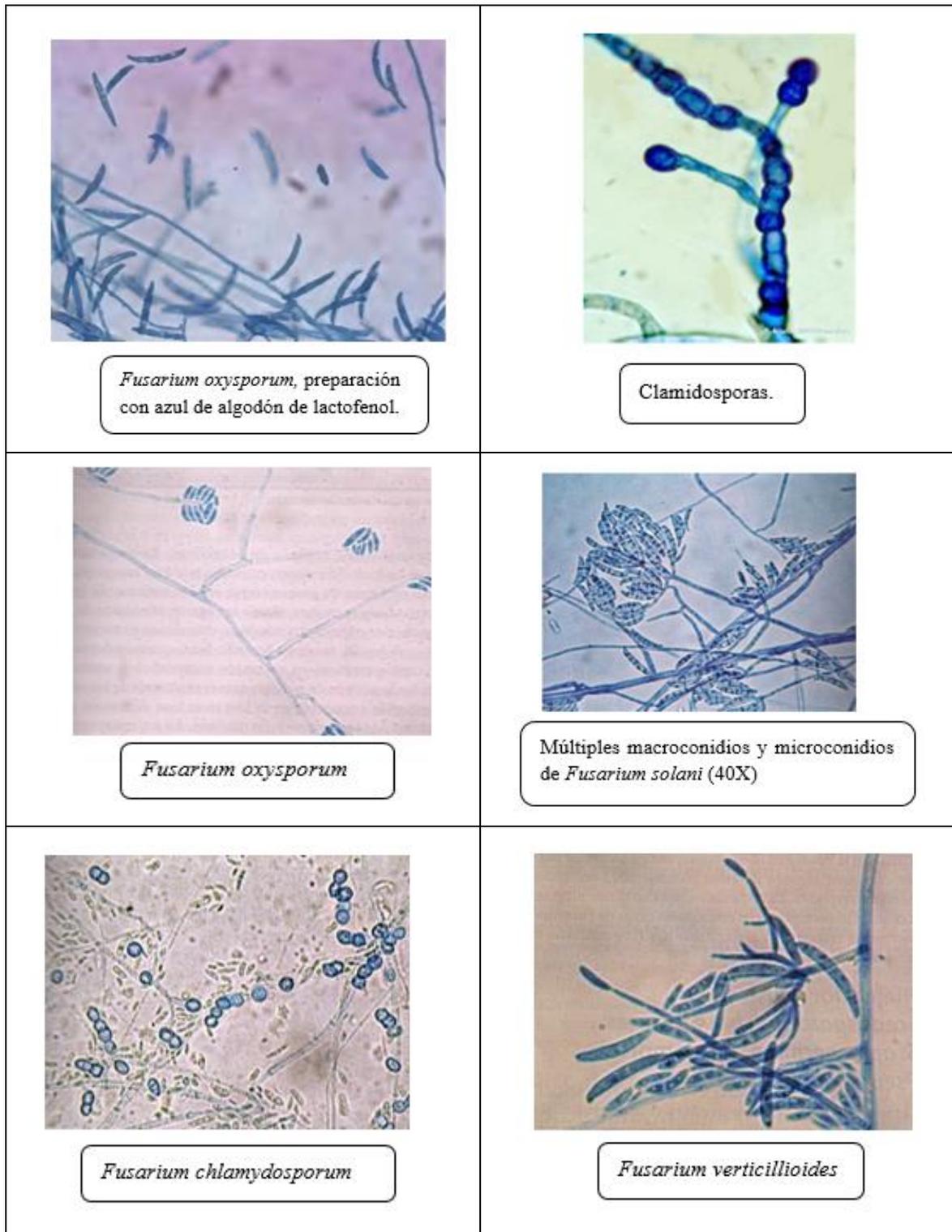
**Figura 6.** Observaciones de exámenes directos de diferentes especies de *Fusarium*.

**Fuente:** Marín (2010); Bonifaz (2015); Retana *et al.* (2018).



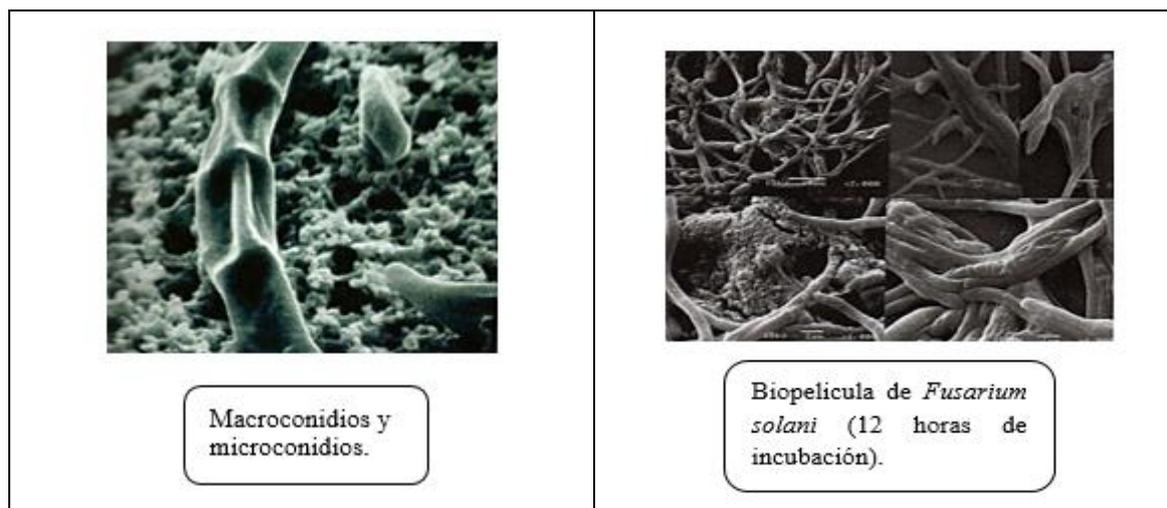
**Figura 7.** Observaciones de exámenes directos de diferentes especies de *Fusarium*.

**Fuente:** Marín (2010); Bonifaz (2015); Retana *et al.* (2018).



**Figura 8.** Micromorfología de *Fusarium*, en tinción azul de algodón y microscopía electrónica de barrido.

**Fuente:** Murray *et al.* (2014); Bravo *et al.* (2012); Bonifaz (2015).



**Figura 9.** Microscopia electrónica de barrido, se observa a *Fusarium*.

**Fuente:** Bonifaz (2015).

### Cultivo

El cultivo se considera la prueba de oro para el diagnóstico, el género *Fusarium* se caracteriza por producir colonias de crecimiento rápido, se obtienen en aproximadamente 60% de los casos y necesitan mayor tiempo para desarrollarse y poder realizar su posterior identificación; sin embargo, son de utilidad no solo para demostrar la especie, sino que también esta puede ser procesada para pruebas de susceptibilidad *in vitro*. Una vez que se ha aislado el hongo, los procedimientos de identificación dependen de si el hongo es una levadura o un moho, si es una levadura se realizan pruebas bioquímicas similares a las utilizadas para bacterias, asimismo se usa la capacidad de formar pseudohifas; y en el caso de hongos saprofitos se utiliza la observación en el microscopio de la morfología de las conidias (Figura 10) (Kenneth & George, 2011; Bonifaz, 2015).

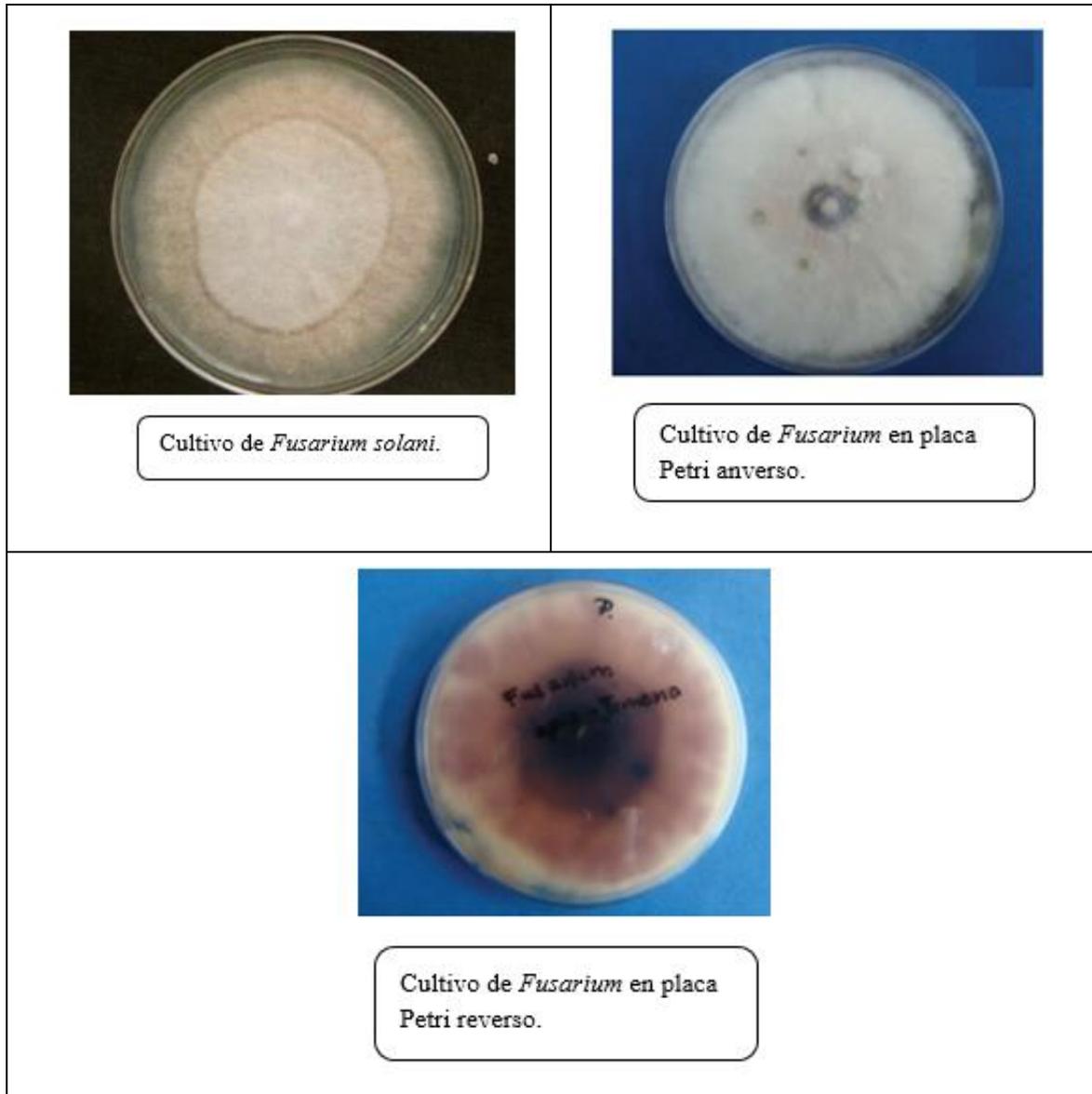
Las colonias se desarrollan con rapidez, entre tres a cinco días a temperatura de 25 a 28 °C, algunos crecen mejor en 25 a 30 °C y temperaturas en este intervalo se utilizan para el aislamiento primario. Los cultivos pareados que incuban a 30 y 35 °C pueden utilizarse para demostrar dimorfismo. Sin embargo, muchos cultivos de hongos requieren días a semanas de incubación para lograr el crecimiento inicial; las bacterias presentes en la muestra crecen con mayor rapidez y pueden interferir con el aislamiento de un hongo lento. Requieren también la nutrición mínima, humedad, buena aireación y temperatura ambiental favorecen el desarrollo de conidias (Garcés *et al.*, 2001; Guevara *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2014; Kenneth & George, 2011; Tapia & Amaro, 2014; Bonifaz, 2015; Retana *et al.*, 2018).

Crecen en medios de cultivos habituales ordinarios sin antibióticos como actidione (ciclohexamida), de la misma manera pueden ser inhibidos por la misma al ser usadas, como es el caso del papa dextrosa agar (PDA), extracto de levadura, Sabouraud dextrosa agar, agar Clavel (CLA), agar de Spezieller Nährstoff-agar (SNA) y agar avena. Además, el medio más utilizado más a menudo para el cultivo de hongos es el agar Sabouraud, que contiene solo glucosa y peptonas como nutrientes. Tiene un pH de 5.6, que es óptimo para el crecimiento de dermatofitos y satisfactorio para el crecimiento de otros hongos. La mayor parte de las bacterias no proliferan o muestran proliferación inadecuada en el agar de Sabouraud (Garcés *et al.*, 2001; Guevara *et al.*, 2007; Kenneth & George, 2011; Martínez *et al.*, 2014; Tapia & Amaro, 2014; Bonifaz, 2015; Retana *et al.*, 2018).

Asimismo, las colonias de este género tienen una tasa de rápido desarrollo diario cercano a un centímetro en medio de cultivo papa-dextrosa agar (PDA) a 25 y 37 °C (siete días). Así como en el agar Sabouraud, el agar papa dextrosa PDA, permite observar el diámetro de la colonia, morfología y pigmento (café, rojo, violeta, naranja, gris, blanco) difusible al medio. En cada uno de los aislamientos en medio sintético PDA, se observa el crecimiento de colonias de apariencia algodonosa y de color blanquesino-rosado en los primeros estados de desarrollo. Posteriormente, conforme el micelio se desarrolla, se torna de un color levemente púrpura en el centro del mismo. Por el reverso de la caja Petri se observa un color morado oscuro hacia el centro y de un tono más claro hacia el borde externo (Garcés *et al.*, 2001; Guevara *et al.*, 2007; Kenneth & George, 2011; Martínez *et al.*, 2014; Tapia & Amaro, 2014; Bonifaz, 2015; Retana *et al.*, 2018).

Mientras que en el medio de cultivo CLA se da una producción abundante de conidias, permite observar el desarrollo de cadenas de microconidios y morfología en detalle de macroconidios los cuales presentan la forma típica de los macroconidios de *Fusarium*, en el caso de los microconidios se observa más comúnmente la forma oval, la mayoría sin septos y que se forman sobre monofialides cortas. Las clamidosporas de tipo verrugosas en cadena, encontradas en el medio de clavel. No obstante, el agar sangre u otros medios bacteriológicos enriquecidos se utilizan cuando se esperan cultivos puros. Se crea un medio selectivo para hongos mediante la adición de antibióticos con actividad antibacteriana como el cloranfenicol y gentamicina. La cicloheximida es un antibiótico que inhibe a los hongos saprofitos y en ocasiones se añade al agar Sabouraud para evitar la proliferación excesiva de mohos contaminantes del medio ambiente. El crecimiento ocurre con facilidad en medios bacteriológicos enriquecidos como Agar chocolate y agar sangre que son utilizados a menudo en

laboratorios (Garcés *et al.*, 2001; Guevara *et al.*, 2007; Kenneth & George, 2011; Martínez *et al.*, 2014; Tapia & Amaro, 2014; Retana *et al.*, 2018).



**Figura 10.** Crecimiento de las colonias y características macromorfológicas de *Fusarium sp.*

**Fuente:** Bonifaz (2015); Retana *et al.* (2018).

### **Pruebas de susceptibilidad antifúngica**

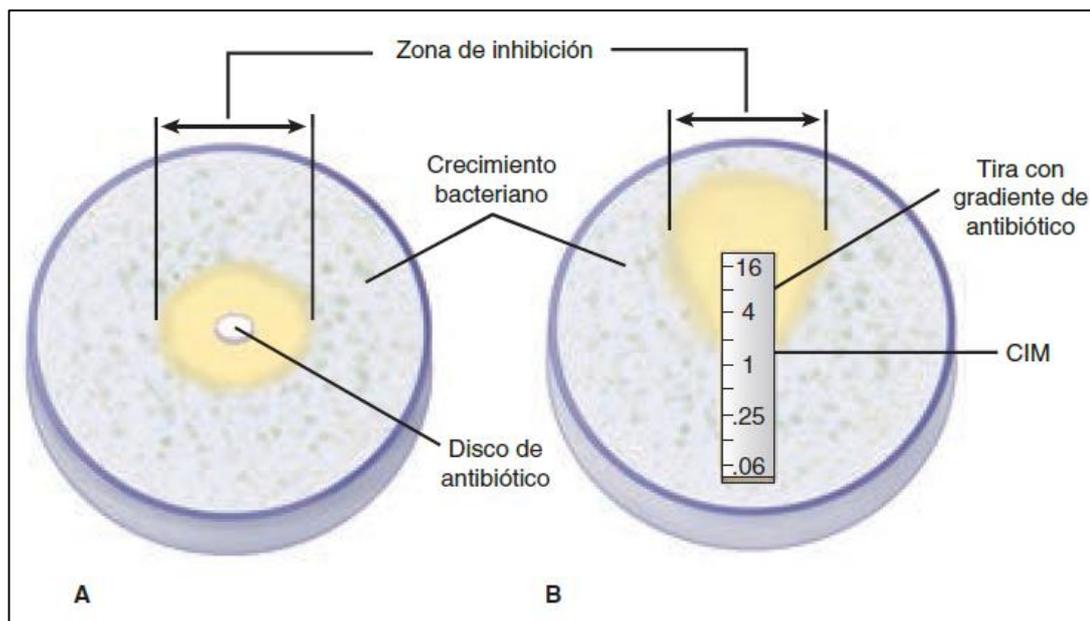
Las pruebas de susceptibilidad con antimicóticos han evolucionado rápidamente desde 1982. Además el conocimiento actual de estas pruebas en levaduras y hongos filamentosos es comparable al de las realizadas con bacterias. Existe una cierta controversia sobre la utilidad clínica de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos. La mayoría de los expertos coinciden en señalar que los estudios de sensibilidad no son necesarios en todos los enfermos, ya que la información epidemiológica establece cual puede ser el tratamiento empírico más adecuado. Hay cuatro principios básicos a tomar en cuenta en la interpretación de los resultados en las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana las cuales son: una CMI no es una medición física o química, la susceptibilidad *in vitro* no siempre predice el éxito de una terapia específica y la resistencia *in vitro* con frecuencia se correlaciona con fracaso en el tratamiento (Cercenado & Canton, 2006; Bonifaz, 2015).

### **Métodos de dilución en caldo para hongos filamentosos**

Los métodos de dilución en caldo para hongos filamentosos constituyen el estándar de oro para determinar la susceptibilidad *in vitro*, tanto de levaduras como de hongos filamentosos y miden CIM a distintos fármacos antifúngicos, como Anfotericina B, fluocitosina, fluconazol, ketoconazol, itraconazol y los nuevos triazoles como voriconazol, posaconazol y ravuconazol. En 1998 el CLSI publicó el documento M38 – P que alcanzó el nivel de aprobación en 2002. El procedimiento detalla la metodología de macrodilución y microdilución en caldo para la determinación de susceptibilidad en los hongos filamentosos. En la actualidad se dispone de dos estándares, uno es el documento M27-A2, de la CLSI y otro es el estándar europeo EUCAST-AFST, cuya versión definitiva se publicó el año 2007 (Tapia, 2009; Bonifaz, 2015).

### Método de difusión en disco para hongos no dermatofitos

En 2009, el CLSI publico el documento de propuesta conocido como M51 – P, el cual alcanzo el nivel de aprobación en 2010 (M51 - A). Fue desarrollado para diferentes especies de hongos filamentosos dentro de los cuales se encuentra *Fusarium spp.* Los antifúngicos que pueden utilizarse son anfotericina B, itraconazol, posaconazol, caspofungina y voriconazol. En la prueba de difusión por disco se observa el diámetro de la zona de inhibición del cultivo alrededor de un disco con un contenido antimicrobiano fijo es inversamente proporcional a la concentración inhibitoria mínima (CIM) para ese antimicrobiano; es decir, mientras más amplia la zona, menor la CIM (Figura 11). Los diámetros de las zonas de inhibición obtenidas con los diversos antibióticos se convierten en categorías “susceptible”, “moderadamente susceptible” y “resistente” (Tapia, 2009; Kenneth & George, 2011; Bonifaz, 2015).



**Figura 11.** A. Prueba de difusión. B. Prueba E con una tira gradiente del antimicrobiano.

**Fuente:** Kenneth & George (2011).

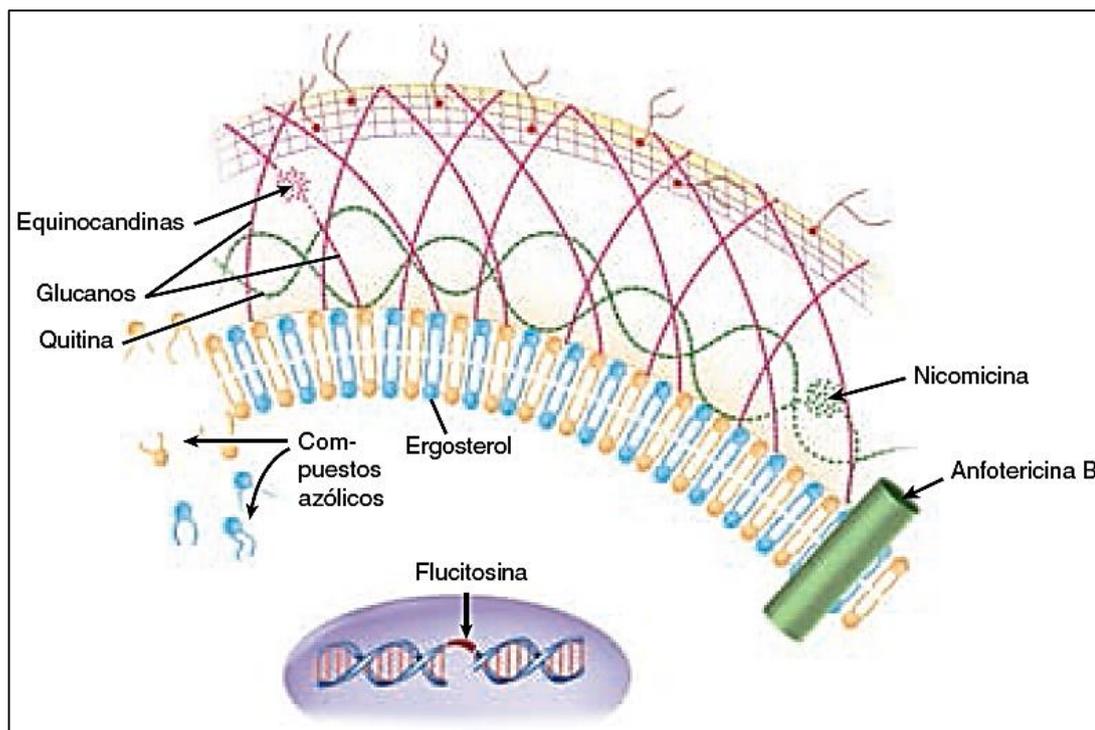
## **Acción de los fármacos antimicóticos en la membrana citoplasmica**

### **Polienos**

La Anfotericina B es el fármaco más eficaz contra las micosis sistémicas graves ya que posee espectro amplio y rara vez genera resistencia porque casi todos los hongos son “susceptibles” a la anfotericina B. Además tiene mayor afinidad por el ergosterol que es el esteroles predominante en la membrana. Los polienos como la nistatina y anfotericina B son compuestos lipófilos y se unen al ergosterol dominante en la membrana citoplasmica de las células micóticas. El mecanismo de acción de los polienicos entraña la formación de complejos con ergosterol en la membrana del hongo, después de su unión, forman conductos anulares que penetran en la membrana y ocasionan la fuga de moléculas pequeñas esenciales desde el citoplasma, con muerte celular (Figura 12) (Brooks *et al.*, 2011; Kenneth & George, 2011).

### **Compuestos azolicos**

Los compuestos azolicos son compuestos azolicos antimicóticos de importancia son cetoconazol, fluconazol, itraconazol y voriconazol. El clotrimazol y miconazol se limitan al uso tópico. Los azolicos interfieren en la síntesis de ergosterol; bloquean la desmetilación  $14\alpha$ , que depende del citocromo P450, del lanosterol, precursor del ergosterol en los hongos. Sin embargo, los citocromos P450 de hongos son 100 a 1000 veces más sensibles a los azolicos. Otros compuestos azolicos se encuentran bajo desarrollo o valoración. Su actividad se basa en la inhibición de la enzima  $14\alpha$ -desmetilasa, que produce la conversión de lanosterol a ergosterol, el principal componente de la membrana citoplasmica micótica. Esto ocasiona acumulación de lanosterol y formación de membrana defectuosa. En la Figura 12 se observan los sitios donde actúan los principales fármacos antimicóticos (Brooks *et al.*, 2011; Kenneth & George, 2011).



**Figura 12.** Acción de los fármacos antimicóticos.

**Fuente:** Kenneth & George (2011).

### Resistencia antimicótica

#### Resistencia a los polienos

La anfotericina B se une directamente a la membrana citoplasmática y, por tanto el único método para resistir esta acción es modificar la composición de la membrana. Se ha comunicado la disminución de la sensibilidad a la Anfotericina B en cepas de *Cándida*. De forma global, el género *Aspergillus* es sensible a la Anfotericina B; los mecanismos de resistencia a la Anfotericina B parecen deberse a modificaciones cuali y cuantitativas de la célula fúngica. Los mutantes resistentes a Anfotericina B del género *Cándida* poseen un menor contenido en ergosterol, han sustituido los esteroides de unión a polienos por otros con menor afinidad por estas moléculas (fecosterol) o han enmascarado el ergosterol presente en sus membranas celulares, de modo que impiden la unión de los polienos a través de diversos factores (Kenneth & George, 2011; Murray *et al.*, 2014).

### **Resistencia a los compuestos azolicos**

Hay cuatro mecanismos principales de resistencia que incluyen a todos los compuestos azolicos. Los dos más importantes incluyen bombas de expulsión y modificación del sitio de acción. Las bombas de expulsión transportan fármacos del interior al exterior de la célula. Algunas bombas actúan para todos los compuestos azolicos, en tanto que otras solo tienen actividad contra uno de ellos. La alteración de subunidades de la enzima desmetilasa por mutación disminuye la afinidad del compuesto azolico para la enzima. Múltiples mutaciones pueden tener efectos aditivos. La resistencia a los azoles en el género *Cándida* se debe a una modificación de la estructura de las enzimas diana, reducción del acceso del fármaco a su diana; o alguna combinación de ambos mecanismos. Las mutaciones puntuales del gen (ERG11) que codifica la enzima diana, lanosterol 14  $\alpha$ -desmetilasa, genera una diana modificada con una menor afinidad por los azoles (Kenneth & George, 2011; Murray *et al.*, 2014).

### **Patogenicidad sobre la papa**

Las especies del genero *Fusarium* son consideradas de importancia fitopatológica, capaces de colonizar plantas y materias primas agrícolas o como saprofitos sobre restos vegetales. Asimismo, *Fusarium* es capaz de colonizar una gran variedad de hospedadores vegetales como la “papa” causando una enfermedad conocida como “Pudrición seca o Fusariosis”. Ocasionan pérdidas económicas porque disminuyen la cantidad y calidad del tubérculo. Además de mostrar una elevada resistencia a los agentes antifúngicos y fungicidas. También, emplea diversas estrategias de infección que puede iniciar en las raíces, partes de la planta por encima del suelo, semillas, a través del aire o el agua; además la descomposición enzimática de barreras físicas, la defensa contra los compuestos antifúngicos del anfitrión, la inactivación y la muerte de las células huésped está dada por micotoxinas, además posee enzimas líticas

que despolimerizan la pared celular de plantas (Arbeláez, 2000; Cueto, 2010; Marín, 2010; Villa *et al.*, 2015; Acuña & Araya, 2017).

### **Pudrición seca o Fusariosis**

La “Pudrición seca” es causada por especies del genero *Fusarium*, son visibles en campo y almacenaje. Además la pudrición se inicia en cualquier parte del tubérculo, sobre todo si se han producido diferentes lesiones como ataques de larvas que hacen heridas cuando se alimentan. Un mismo tubérculo puede tener varios puntos de infección, una vez que el hongo ha entrado en contacto con el tejido del tubérculo, se desarrolla formando cavidades circulares tapizadas de un tejido micelial algodonoso tenue de color blanco, con lesiones oscuras, pudrición firme de 3 a 5 cm, ligeramente hundidas que se extienden hacia el interior, dejando cavidades dentro de la papa. La cavidad crece hasta que al final el tubérculo se deshidrata y queda reducido a su mínima expresión; es simplemente un residuo momificado de color negro y consistencia dura (Figura 13 y Figura 14) (Ames, 1997; Alvarado, 2005; Castro & Contreras, 2011; Acuña & Araya, 2017).

Otro tipo de pudrición seca se inicia en lesiones sobre los tubérculos (daño mecánico, de insecto, otros patógenos), se vuelven evidentes alrededor de un mes de almacenaje, además sobre las lesiones es posible observar pequeñas zonas con micelio blanco. No obstante, al principio se observan manchas sobre la piel del tubérculo las cuales evolucionan en zonas hundidas blandas, de color más oscuro, contrastando con las zonas sanas. La piel y la pulpa del tubérculo se van arrugando y además la infección se va expandiendo lentamente con formación de áreas redondas recubiertas de un micelio algodonoso de color blanco sucio o ligeramente rosado con una gran cantidad de conidias y las partes lesionadas se hunden, arrugan y se van secando. Asimismo, en

este tipo de pudrición el tejido afectado es de consistencia corchosa y presenta anillos concéntricos, finalmente se momifican y queda reducido a una pasa (Figura 13 y Figura 14) (Moscardi & Garcia, 1987; Ames, 1997; Alvarado, 2005; Castro & Contreras, 2011).

### **Epidemiología**

*Fusarium* es un organismo eficiente en la descomposición de materia orgánica. Vive en el suelo en su forma saprofítica, en ausencia de un hospedante apropiado, o se mantiene latente como clamidospora en cultivos como papa, banano, plátano, tomate, algodón, clavel, crisantemo, lenteja y garbanzo, entre otros. No se conocen los factores que influyen en el desarrollo de la enfermedad en el campo, pero en el almacén, donde la temperatura prevalente es de 15-18 °C y la humedad es alta, producto de la transpiración de los tubérculos, *Fusarium* es sumamente activo, pues consume el sustrato en un tiempo relativamente corto. En medio de cultivo de laboratorio crece a temperatura ambiental (22°C). La enfermedad se inicia en el campo antes de la cosecha, esto es, durante la cosecha se recogen los tubérculos que ya están infectados, sobre todo en campos donde hay larvas de insectos noctúdeos que al alimentarse dejan heridas, las mismas que son invadidas por *Fusarium* y otros hongos patógenos (Ames, 1997; Arbeláez, 2000).

### **Ciclo de la enfermedad (Pudrición seca o Fusariosis)**

De manera general, el ciclo infectivo de *Fusarium* en tubérculos parte de un inóculo primario que procede de los residuos de la cosecha, además puede sobrevivir de manera saprofita en forma de peritecios, clamidosporas, macro y microconidias. Asimismo estos se encuentran en la superficie de los tubérculos enteros o fraccionados, envases, sacos, bolsas, equipo usado para la recolección, infraestructura con deficientes

manejos sanitarios (galpones donde se maneja la papa, paredes y pisos), que fueron utilizados con semillas infectadas; su presencia es en el momento de la cosecha y transporte, Los tubérculos son resistentes a la infección, al momento de la cosecha; la susceptibilidad aumenta durante el almacenaje. Las condiciones de alta humedad relativa y temperatura entre 15 y 20 °C en almacenaje, ya que el parasito penetra en el tubérculo a través de heridas causadas por daños mecánicos en la cosecha y transporte, o por otros organismos (Figura 15) (Moscardi & Garcia, 1987; Marín, 2010; Castro & Contreras, 2011; Acuña & Araya, 2017).

### **Importancia económica**

Las pudriciones por *Fusarium*, constituyen una de las principales enfermedades en bodega, elevándose en muchos casos sobre el 5%. Es favorecida por daños mecánicos causados por prácticas en el cultivo, cosecha, transporte, selección y almacenaje o lesiones causadas por otros patógenos. La enfermedad se manifiesta en tubérculos de papa, donde causa una necrosis o pudrición. Causan una gran pérdida económica anual de alimentos, en USA un 25% de la cosecha y a nivel mundial un 50%. Ataca diversos tipos de plantas, causando marchitamientos vasculares y muerte de las plantas. En hortalizas se registra atacando entre otras plantas al tomate, apio, pepino cohombro, cebolla, repollo, esparrago y remolacha (Wainwright, 1992; Arbeláez, 2000; Castro & Contreras, 2011).

### **Métodos de control preventivo**

Es importante desarrollar estrategias de prevención y control que permitan reducir los riesgos de contaminación por especies del genero *Fusarium*. Para llevar a cabo esto, debemos tener información de los factores ecofisiológicos que condicionan el crecimiento de los hongos y la producción de las micotoxinas. Del mismo modo, evitar

plantar y cosechar en suelos muy fríos, calientes, saturados o secos. Asimismo debe usarse semillas certificadas y trasplantes sanos, o variedades resistentes. También puede realizarse técnicas culturales como la rotación de cultivos; en el sistema integrado, el suelo es tratado selectivamente con un agente que aumenta la población natural de un hongo agente del biocontrol, pero generalmente es un agente químico utilizado que da lugar a un desequilibrio temporal donde la mayor parte de las poblaciones microbianas del suelo mueren con el tratamiento (Wainwright, 1992; Torres, 2002; Cueto, 2010; Castro & Contreras, 2011; Acuña & Araya, 2017).

Durante la cosecha de debe desinfectar las estructuras y útiles de trabajo. Igualmente evitar cortar papas grandes para aumentar la papa-semilla. Es clave considerar para el control de esta enfermedad que debemos prevenir heridas en tubérculos, magulladuras, golpes y heridas en cosecha, selección y transporte. De la misma manera, se debe eliminar las plantas enfermas y restos del cultivo. Durante el almacenamiento de tubérculos se debe tener ventilación por al menos 14 días postcosecha para que la piel de la papa cicatrice pronto, desinfectar herramientas y cajones, limpiar y desinfectar la bodega. De la misma manera, almacenar en ambientes donde los tubérculos pierdan peso lo menos posible por defecto del almacenamiento, además tener una temperatura de 10 a 13°C con una humedad de 80 a 90%, y buena ventilación por al menos 14 días postcosecha (Wainwright, 1992; Torres, 2002; Cueto, 2010; Castro & Contreras, 2011).

Durante el almacenamiento se desinfectan los tubérculos con fungicidas que pueden ser utilizados como soluciones. Sin embargo incrementan la población de organismos fitopatógenos resistentes, con lo que hay un aumento significativo de los costos de producción y problemas graves de contaminación ambiental. De la misma

manera, el tratamiento químico al tubérculo semilla la protege de nuevas infecciones, no curan las ya establecidas. La desinfección de tubérculos se recomienda especialmente para aquellos que van a ser utilizados como semilla, se debe desinfectar los tubérculos con una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 3 minutos, luego, el hipoclorito precipita la tierra adherida a la superficie de los tubérculos y elimina las células bacterianas de *Erwinia*, se trata con una mezcla de carbendazim + dithane en polvo, hasta que la mezcla de fungicidas cubra totalmente la superficie de los tubérculos (Wainwright, 1992; Torres, 2002; Bernal *et al.*, 2005; Villa *et al.*, 2015).

### **Efecto fungicida del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña)**

Como se ha demostrado, en la búsqueda de alternativas confiables y benéficas para el control del hongo *Fusarium*, se ha investigado acerca del aceite esencial de *Minthostachys mollis*, el cual posee componentes bioquímicos que constituyen una alternativa para contrarrestar el efecto negativo de este hongo, además de poseer un bajo costo, y por cuidar el medio ambiente y la salud en general. La actividad biológica dichos metabolitos puede ofrecer una alternativa para el control de esta plaga, por ejemplo la “pulegona” es toxica para ratas y es insecticida. Por otra parte, el “carvacrol” presenta actividad contra microorganismos Gram-negativos. Además, la “carvona” tiene la propiedad de ser un agente fungicida, insecticida y antibacterial. También, el “mentol” actúa como antiséptico, es utilizado en agricultura para prevenir plagas y el “linalol” es usado como condimento e insecticida (Ccallo, 2013; Ordoñez, 2015; Villa *et al.*, 2015; Aigaje, 2016; Torrenegra *et al.*, 2017; Baca, 2017).

Los metabolitos de aceite esencial de muña presentan actividad antibacteriana y antimicótica. La presencia de terpenoides en trazas en el aceite esencial tienen amplio espectro fungicida y fungistático frente a cepas de hongos tales como: *Cándida*

*albicans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans*, *Fusarium* y *Microsporium canis*. Además el “timol” tiene eficacia antibacteriana, “antifúngica”, antioxidante, antiséptico urinario, antiséptico, antiespasmódico y antioxidante. Este compuesto se usa frente a bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, hongos filamentosos (*A. niger*, *F. oxysporum* y *Mucor* spp.), y levadura. Respecto al mecanismo de acción sobre hongos se explica por la destrucción de la pared del hongo y la membrana citoplasmática, los cuales resultan en el rompimiento de la membrana y coagulación del citoplasma. El aceite esencial también inhibe la síntesis de ADN, ARN, proteínas y polisacáridos en los hongos (Cano *et al.*, 2006; Ccallo, 2013; Ordoñez, 2015).

### **Sensibilidad**

El mecanismo de acción de los aceites esenciales no se conoce en toda su extensión. Se sabe que protegen a las plantas contra los agentes externos y que en general tienen una elevada capacidad antioxidante. Observaciones realizadas al microscopio electrónico han demostrado una rotura de la membrana celular de los microorganismos sensibles a su acción. Mientras que, se reconoce que dependen de sus propiedades lipofílicas o hidrofílicas. Los terpenoides pueden servir como un ejemplo de agentes liposolubles, los cuales afectan la actividad de las enzimas catalizadoras a nivel de la membrana, ciertos componentes del aceite esencial pueden actuar como desacopladores, los cuales interfieren en la translocación de protones sobre la membrana y subsecuentemente interrumpir la fosforilación del ADP. En síntesis, el modo de acción dependerá del tipo de microorganismos y la estructura de la pared celular y la membrana externa de los mismos (Azaña, 2010; Malpartida, 2010; Aigaje, 2016).



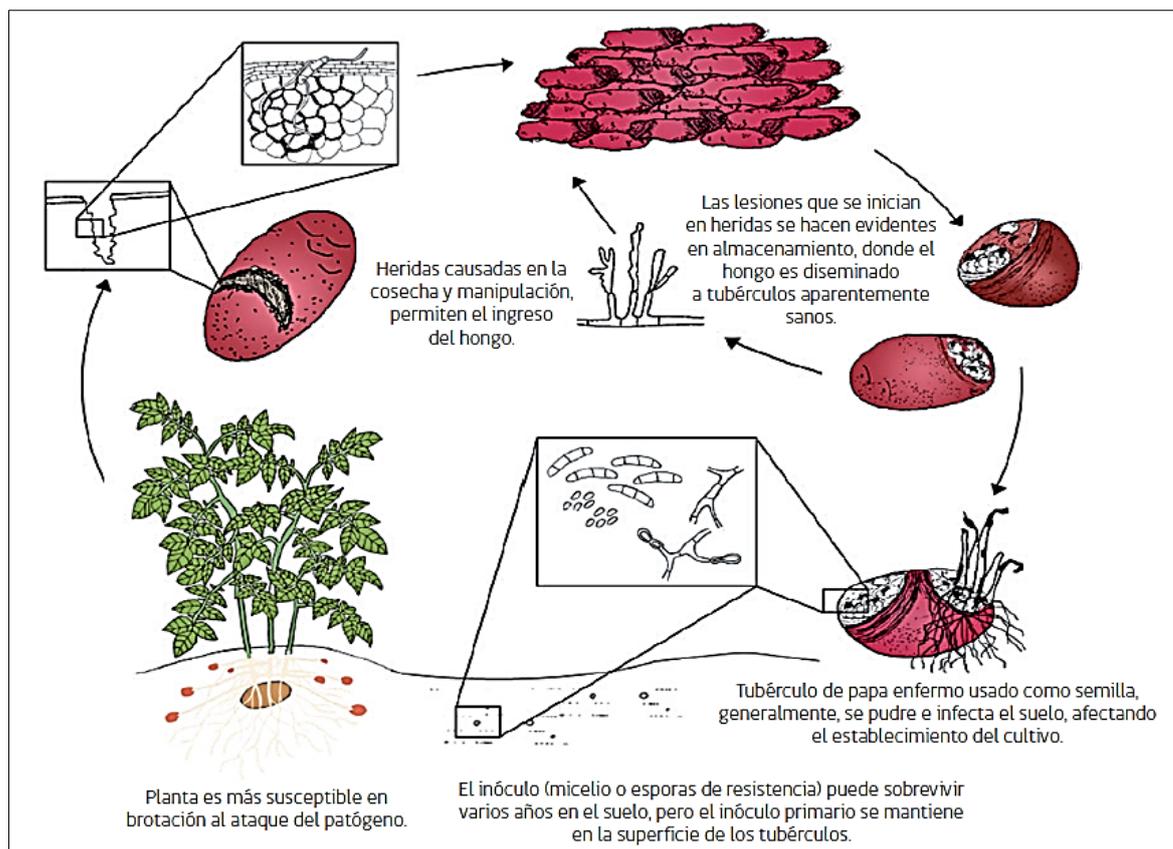
**Figura 13.** Signos y síntomas de Pudrición seca o Fusariosis en tubérculos almacenados.

**Fuente:** Torres (2002); Castro & Contreras (2011); Acuña & Araya (2017).



**Figura 14.** Tubérculos con pudrición seca con micelios visibles.

**Fuente:** Acuña & Araya (2017).



**Figura 15.** Ciclo biológico de *Fusarium sp.*

**Fuente:** Acuña & Araya (2017).

### **Marco conceptual**

**Aceite esencial.-** Líquido oleoso volátil, generalmente insaponificable, algo soluble, contiene terpenos, alcoholes, cetonas, fenoles, ácidos, aldehídos, éteres, se encuentran generalmente en las flores, hojas y tallos de plantas (Stashenko, 2009).

**Antimicótico.-** Sustancia que tiene la capacidad de inhibir o eliminar el crecimiento de hongos (Salas, 2016).

**Antimicrobiano.-** Cualquier sustancia con suficiente actividad antimicrobiana que se emplea para el tratamiento de las enfermedades (Kenneth & George, 2011).

**Aseptado.-** Referente al filamento fúngico, que carece de septos (Zurita *et al.* 2017).

**Blastoconidio.-** Conidio holoblastico que se produce en forma solitaria (Zurita *et al.*, 2017).

**Concentración mínima inhibitoria (CIM).-** Término de laboratorio que define la menor concentración ( $\mu\text{g/mL}$ ) que puede inhibir el crecimiento del microorganismo (Kenneth & George, 2011).

**Destilación.-** Separación de una mezcla de varios componentes aprovechando sus distintas volatilidades, o bien separar los materiales volátiles de los no volátiles (Salas, 2016).

**Destilación por arrastre de vapor con agua.-** Destilación por medio de una corriente de vapor que arrastra selectivamente algunos compuestos de la mezcla (Stashenko, 2009).

**Efecto inhibitorio.-** Es el impedimento del crecimiento o destrucción (muerte) de bacteria u hongos, por la actividad de un agente antibacteriano o antimicótico natural o sintético (Malpartida, 2010).

**Hongo.-** Organismo eucariota que pertenece al reino fungi (Salas, 2016).

**Halo de inhibición.-** Este es un resultado cualitativo, cuyo diámetro será directamente proporcional a la potencia del antifúngico frente al hongo en cuestión es inversamente proporcional a la concentración inhibitoria mínima (CIM) del agente antifúngico (Zurita *et al.*, 2017).

**Hidróxido de potasio al 10 %.-** Es una solución que disuelve la queratina y aclara la capa cornea de la piel y los anexos cutáneos, sin afectar la morfología de los elementos fúngicos, permitiendo una mejor visualización de los mismos (Zurita *et al.*, 2017).

**Inhibición.-** Impedir o reprimir el ejercicio de facultades o hábitos (Salas, 2016).

**Método kirby – Bauer.-** Método utilizado para determinar la sensibilidad de agentes patógenos ante nuevas sustancias en investigación (Salas, 2016).

**Metabolitos primarios.-** Son proteínas, lípidos, azúcares, etc. en las plantas son vitales para que la planta crezca, se multiplique y viva (Stashenko, 2009).

**Micelio.-** Conjunto de hifas que constituye el cuerpo de un hongo (Zurita *et al.*, 2017).

**Resistente.-** Organismos que no se inhiben por las concentraciones clínicamente posibles de un agente antimicrobiano (Kenneth & George, 2011).

**Susceptibilidad antifúngica.-** Proceso conocido habitualmente como antifungigrama, guía de elección del tratamiento antimicótico. Se utilizan diferentes métodos como difusión con discos y la microdilución (Zurita *et al.*, 2017).

**Susceptible o sensible.-** Términos aplicados a los microorganismos que indican que se les inhibirá con concentraciones de la sustancia antimicrobiana utilizando las dosis generalmente recomendadas (Kenneth & George, 2011).

**Pudrición seca.-** es la enfermedad causada por especies del género *Fusarium* consisten en pudrición de tubérculos (Torres, 2002).

**Queratina.-** Proteína fibrosa y resistente (Zurita *et al.*, 2017).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Área de estudio

La recolección de la planta *Minthostachys mollis* (muña) se realizó a 3820 msnm en el distrito de Capachica – Puno, dicha área presenta un clima seco y templado, variante en diferentes épocas del año, teniendo una temperatura máxima de 20 °C y una temperatura mínima de 5 °C, se encuentra al norte de Puno. La recolección de tubérculos con pudrición seca, fue en el CIP Camacani, ubicado en el distrito de Platería, Centro Poblado de Camacani, a una altura de 3826 msnm (Google Maps). La obtención del aceite esencial, se realizó en el Laboratorio de Frutas y Hortalizas de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial. El aislamiento e identificación de cepas de *Fusarium* sp. y el efecto antimicótico en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Altiplano – Puno (Figura 16, Figura 17 y Figura 18).



**Figura 16.** Zona de procesamiento y ejecución de la investigación, Universidad Nacional del Altiplano Puno, Facultad de Biología.

**Fuente:** Google Maps.



**Figura 17.** Zona de colección de la planta *Minthostachys mollis*, Distrito de Capachica.

**Fuente:** Google Maps.



**Figura 18.** Zona de colección de los tubérculos. Distrito de Platería, Centro Poblado de Camacani, CIP Camacani.

**Fuente:** Google Maps.

### 3.2. Diseño y tipo de estudio

El trabajo de investigación es de tipo descriptivo, analítico y experimental.

### 3.3. Muestra

Constituida por:

- Cepas de *Fusarium* sp.
- Aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña).

### 3.4. Diseño de investigación

La distribución de las unidades experimentales para el estudio del efecto del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) frente a *Fusarium* sp.

**Tabla 1.** Diseño de investigación para determinar la CMI del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) frente a cepas de *Fusarium* sp.

Repet.	Control negativo	Concentraciones de Aceite esencial de “muña” (%)						Total
		20	30	40	50	75	100	
1	1	1	1	1	1	1	1	7
2	1	1	1	1	1	1	1	7
3	1	1	1	1	1	1	1	7
4	1	1	1	1	1	1	1	7
<b>Total</b>	4	4	4	4	4	4	4	28

Control negativo: Medio de cultivo Agar Sabouraud Dextrosa (con agua destilada estéril), sin concentración de aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña).

Para determinar el primer objetivo, se trabajó con 28 unidades experimentales, conformado por 4 repeticiones para cada dosis utilizada, además se utilizó un control negativo (medio de cultivo sin aceite esencial), cada unidad experimental estuvo constituida por determinados porcentajes de aceite esencial 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 75 % y 100 % (Tabla 1).

**Tabla 2.** Diseño de investigación para la susceptibilidad del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) frente a cepas de *Fusarium* sp.

Repet.	Control Positivo	Concentraciones de Aceite esencial de “muña”						
		20/80	30/70	40/60	50/50	75/25	100/0	Total
1	1	1	1	1	1	1	1	7
2	1	1	1	1	1	1	1	7
3	1	1	1	1	1	1	1	7
4	1	1	1	1	1	1	1	7
<b>Total</b>	4	4	4	4	4	4	4	28

Para determinar la susceptibilidad del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) frente a cepas de *Fusarium* sp. se trabajó con 28 unidades experimentales conformado por 4 repeticiones para cada concentración utilizada, además se usó un control positivo, el fungicida comercial Carbendazim para *Fusarium* sp., que sirvieron para comparar el efecto inhibitorio, ya que se conoce que dicho hongo es sensible a este antifúngico (Tabla 2).

### 3.5. Metodología

La investigación se realizó en tres fases:

#### Fase pre analítica

##### Obtención de muestra de *Minthostachys mollis* (muña)

Se recolecto plantas en buenas condiciones, en estado fresco y estado fenológico de crecimiento, se colecto 7 Kg, de planta entera, en el distrito de Capachica (Zona alta). Utilizando un objeto punzocortante (tijera de podar), se seleccionó las impurezas (ramas secas, tallos secos o dañados, tierra, etc.). Además estas fueron guardadas en sacos enmallados. El proceso de secado del material vegetal se realizó en un ambiente bajo sombra, con ventilación ambiental durante 10 días, en este tiempo las hojas seleccionadas pierden humedad. Después de los 10 días de secado se empaquetaron solamente las hojas secas, con respectivo rotulo, la cantidad fue de 6 kg de muestra.

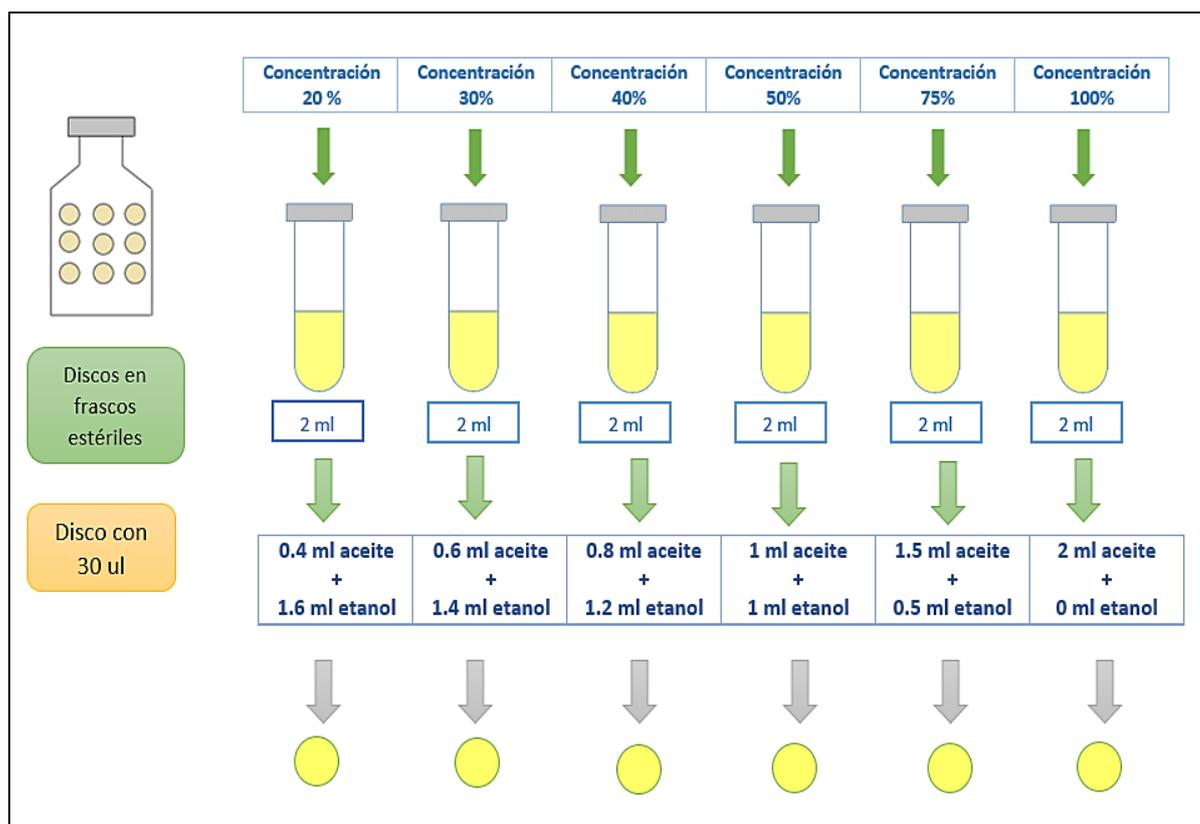
### **Método de Destilación por arrastre de vapor de agua para la obtención de aceite esencial**

Se colocó los 6 Kg. de muña seca (hojas) empaquetada en paquetes de papel kraft, en el hidroddestilador, posteriormente se calentó con el equipo generador de vapor llegando a un punto de ebullición de 84 °C, el vapor atravesó las hojas de la muña que se encontraban en el hidroddestilador, aceite y agua se separaron de la muña, en vapor saliendo estos por un conducto, el cual se condensa en un sistema de refrigeración, por diferencia de densidades el aceite se separó del agua en una pera de decantación, se obtuvo un total de 5 ml de aceite esencial de muña. Finalmente para su conservación se colocó en un frasco color ámbar a temperatura baja; todo el proceso se realizó en periodo de 2 horas y 30 minutos.

### **Preparación de los discos de sensibilidad**

Para la preparación de concentraciones con aceite esencial de muña y controles (positivo y negativo), se obtuvieron discos a partir de papel filtro Watman N° de 5 mm de diámetro con un perforador, los cuales se colocaron en frascos estériles. Se realizaron las concentraciones (%) con aceite esencial de muña se realizó en tubos de ensayo de la siguiente manera: 1° concentración (20 %) = 0.4 ml de aceite esencial de muña + 1.6 ml de etanol, 2° concentración (30 %) = 0.6 ml de aceite esencial de muña + 1.4 ml de etanol, 3° concentración (40 %) = 0.8 ml de aceite esencial de muña + 1.2 ml de etanol, 4° concentración (50 %) = 1 ml de aceite esencial de muña + 1 ml de etanol, 5° concentración (75 %) = 1.5 ml de aceite esencial de muña + 0.5 ml de etanol y 6° concentración (100 %) = 2 ml de aceite esencial de muña + 0 ml de etanol.

Finalmente se preparó los controles siendo estos los siguientes: Carbendazim 0.5ml + 1 ml de agua destilada, para el control negativo solo se usó 2 ml de agua estéril (Figura 19).



**Figura 19.** Preparación de discos de sensibilidad con concentraciones de aceite esencia de *Minthostachys mollis*.

### Fase Analítica

**Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de muña (*Minthostachys mollis*) frente a cepas de *Fusarium* sp., se realizó los siguientes procedimientos:**

#### **Aislamiento e identificación de *Fusarium* sp.**

Las muestras de papa se recolectaron en el Distrito de Camacani, se seleccionaron papas con características de “pudrición seca”, fueron examinadas con el fin de detectar la infección de *Fusarium*. En el laboratorio de Microbiología de Alimentos, cada muestra se lavó con agua destilada; los tubérculos fueron acondicionados en “cámaras húmedas” (algodón humedecido, con una abertura en la tapa), en un lapso de 7 a más días con el fin de inducir la aparición de hifas. Después de ese lapso de tiempo, para el aislamiento se preparó 8.45 gramos de Agar Sabouraud

Dextrosa en 130 ml de agua destilada para 6 placas. Luego se llevó el medio a esterilización en autoclave a 120 °C por 30 minutos. Antes que el medio de cultivo se enfríe, se realizó el plaqueo, vertiendo aproximadamente 20 ml de medio Sabouraud Dextrosa en cada placa estéril vacía, luego se esperó su solidificación.

Una vez solidificado se procedió a sembrar el hongo a partir de las 20 muestras que se encontraban en las “cámaras húmedas”, en las 6 placas con Agar Sabouraud Dextrosa, se cortó con la ayuda de un bisturí estéril un pedazo de zona dañada del tubérculo, con las características de la infección y se procedió al sembrado. Se incubo a 25°C por 7 días. Después, de los 7 días se observó colonias entre blancas y rosadas. En este lapso de tiempo las colonias crecieron pero algunas no eran del genero *Fusarium* sp., se observó cada género primero con cinta adhesiva y luego con lugol, es por eso que nuevamente se preparó 4.55 gramos de Agar Sabouraud Dextrosa en 70 ml de agua destilada para 3 placas. Luego se llevó el medio a esterilización en autoclave a 120 °C por 30 minutos. Antes que el medio de cultivo se enfríe, se realizó el plaqueo, vertiendo aproximadamente 20 ml de medio Sabouraud Dextrosa en cada placa estéril vacía, luego se esperó su solidificación.

Para el aislamiento de la cepa de *Fusarium* sp., se escogió el género que contaba con las características macroscópicas y microscópicas se tomó una colonia de cada placa, y sembró con el asa de kolle, se incubo a 25°C por 7 días. Después, del lapso de tiempo se observó colonias entre blancas y rosadas.

Asimismo para la identificación se observó primero con cinta adhesiva y luego con lugol para lo cual se colocó 2 o 3 gotas de la suspensión en una lámina portaobjeto y se cubrió con lamina cubreobjetos, asimismo se observó al microscopio con el objetivo de 40X, se observó conidias, macroconidias con tres septos en forma de media

luna, y microconidias en forma de media luna sin septos como lo indica en la bibliografía.

### **Preparación del inocular**

Para estandarizar la densidad del inocular se utilizó una suspensión de sulfato de bario (0.5 en la escala de Mac. Farland) como estándar de turbidez, se agregó 0.5 ml de BaCl<sub>2</sub> en 99.5 ml de agua de una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se verificó la densidad correcta del estándar. Una vez preparada el estándar de turbidez, se estandarizaron las muestras. En un tubo de ensayo estéril con tapa se colocaron 4 ml de solución salina estéril, se recogió 3 a 5 colonias con el asa de kolle y se colocó en el respectivo tubo de ensayo. Luego se homogenizó la suspensión inmediatamente ajustada a la escala 0.5 de Mc. Farland, correspondiente a una suspensión aproximada de  $1 \times 10^8$  ufc/ml.

### **Preparación de los volúmenes de aceite esencial**

Inicialmente se dividieron las placas con un rotulador por la mitad con la ayuda de una regla. Se preparó 18.85 gramos de agar en 290 ml de agua destilada para 14 placas. Luego se llevó el medio a esterilización en autoclave a 120 °C por 30 minutos. Antes que el medio cultivo se enfríe, se realizó el plaqueo, vertiendo aproximadamente 20 ml de medio Sabourad Dextrosa en cada placa estéril vacía, luego se esperó su solidificación. Seguidamente, del tubo de ensayo estandarizado con la escala de Mc Farland con el inocular de cepa de *Fusarium* sp., con la ayuda de hisopos estériles se sembró en placas preparadas de agar Sabouraud Dextrosa, extendiéndolo en forma horizontal y vertical rotando la placa en cada extensión hasta que esté totalmente dispersa y cubierta la superficie de la placa.

Se realizó el procedimiento repitiendo todo, en cada placa preparada con medio de Agar Sabourad Dextrosa. Luego se realizó pozos con pinzas estériles (2 por cada

placa), se colocó el papel filtro perforado, que se encontraba en frascos estériles, con la ayuda de pinzas estériles (2 discos por cada placa), para luego colocar 30 ul de aceite a diferentes concentraciones (%) con la ayuda de micropipeta calibrada a 30 ul, en la primera placa las concentraciones de (20 % y 30 %), luego (40 % y 50 %), (75 % y 100 %), y así sucesivamente se repitió el procedimiento en todas las placas.

En el caso del control positivo se usó una placa y al igual que las concentraciones también se realizaron pozos en el agar, se tomó el tubo de ensayo con la concentración de Carbendazim y agua, se colocó un disco de papel watman de 5 mm, y con la ayuda de una micropipeta de 10 ul se colocó esa cantidad. Y para la concentración del control negativo también se realizó pozos en el agar con un disco de papel watman de 5 mm, y con la ayuda de una micropipeta de 30 ul se colocó agua destilada estéril. Todas las placas se colocaron las 14 placas Petri por especie a 25°C en la incubadora por 7 días. Así como las placas de controles positivo y negativo.

### **Fase Post Analítica**

**Para la determinación de la susceptibilidad antimicótica de *Fusarium sp.*, frente al aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) comparado con el fungicida comercial (Carbendazim).**

### **Lectura e interpretación de halos de inhibición**

El diámetro de cada zona de inhibición se midió con una escala de Vernier o pie de rey, también con una regla milimetrada. Para su interpretación de acuerdo al siguiente cuadro estandarizado recomendado por el Instituto estandarizado de laboratorios clínicos (Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI) (Tabla 3) (Cercenado & Cantón, 2006).

**Tabla 3.** Cuadro estandarizado de medida de halos de inhibición (mm).

Antifúngico	Concentración	Halo de inhibición (mm)		
		R	S-DD	S
Fluconazol	25 µg	≤ 14	15 -18	≥ 19
<b>Anfotericina B</b>	10 µg	≤ 10	11-14	≥ 15
Itraconazol	8 µg	≤ 10	11-14	≥ 15
ketoconazol	15 µg	≤ 20	21-27	≥28
Voriconazol	1 µg	≤ 13	14 - 16	≥17

Fuente: Cercenado & Cantón, (2006).

### 3.6. Método estadístico

Se utilizó el Diseño Completamente al Azar (DCA) para demostrar del efecto antimicótico del aceite esencial de la muña (*Minthostachys mollis*) en cepas de *Fusarium* sp.

#### Diseño Completamente al Azar (DCA):

##### Modelo lineal simple

En este diseño el valor de cada unidad experimental  $Y_{ij}$  se aplica según el siguiente modelo estadístico lineal:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} \begin{cases} i = 1, 2, 3, \dots, 7, t \\ J = 1, 2, 3, \dots, 15, r \end{cases}$$

Donde:

$Y_{ij}$  = Es la observación en la j-esima unidad experimental, sujeta al i-esimo concentración.

$T_i$  = Efecto del i – esimo concentración.

$\mu$  = Es el efecto de la media general o constante común.

$E_{ij}$  = Efecto verdadero de la  $j$ -ésima unidad experimental (replica), sujeta al  $i$ -ésima concentración (error experimental).

**Hipótesis a probarse son:**

$H_0$ :  $T_i = 0$  (todos los tratamientos tienen el mismo efecto).

$H_a$ :  $T_i \neq 0$  (al menos uno de los tratamientos es diferente de los otros).

**Nivel de significación:**

$\alpha = 0.05$ , o

$\alpha = 0.01$

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. Determinación de la Concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) en cepas de *Fusarium* sp. dentro del rango de concentración del 20 a 100 %.

En los resultados del crecimiento de *Fusarium* sp. frente a las diferentes concentraciones de aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) determinó que la concentración mínima inhibitoria en todos los bioensayos fue del 50 % con una media del diámetro total del halo de inhibición (14.75 mm), evidenciado por la inhibición del crecimiento fúngico. En los resultados de 4 repeticiones se observó que en el rango de concentración del aceite esencial de 30 % hasta 100 % presento halos de inhibición, es decir estas concentraciones fueron suficientes para inhibir el crecimiento de dicho hongo, también se puede observar que las placas testigo (Control negativo) sin concentración alguna para cada una de las cuatro repeticiones, no obtuvo halos de inhibición en ninguna de las cuatro repeticiones (Tabla 4).

**Tabla 4.** Crecimiento de cepas de *Fusarium* sp. frente al aceite esencial de *Minthostachys mollis* dentro del rango de concentración del 20 a 100 %.

Repeticiones	Diámetro total del halo de inhibición (mm) en diferentes concentraciones						
	Control negativo	20 %	30 %	40 %	50 %	75 %	100 %
<b>R1</b>	0	8.9	9.8	13.6	15.5	16.9	18.9
<b>R2</b>	0	8.8	9.9	13.5	15.3	16.8	18.7
<b>R3</b>	0	8.9	9.8	13.5	14.1	16.7	17.5
<b>R4</b>	0	7.5	10.1	14.7	14.1	17.7	17.6
<b>Promedio</b>	0	8.53	9.90	13.83	14.75	17.03	18.18
<b>DE</b>	0	0.68	0.14	0.59	0.75	0.46	0.73
<b>LI (95)</b>	0	7.44	9.67	12.89	13.55	16.30	17.02
<b>LS (95)</b>	0	9.61	10.13	14.76	15.95	17.75	19.33
<b>T</b>	0	24.89	140.01	47.25	39.07	74.45	49.97
<b>P</b>	0	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

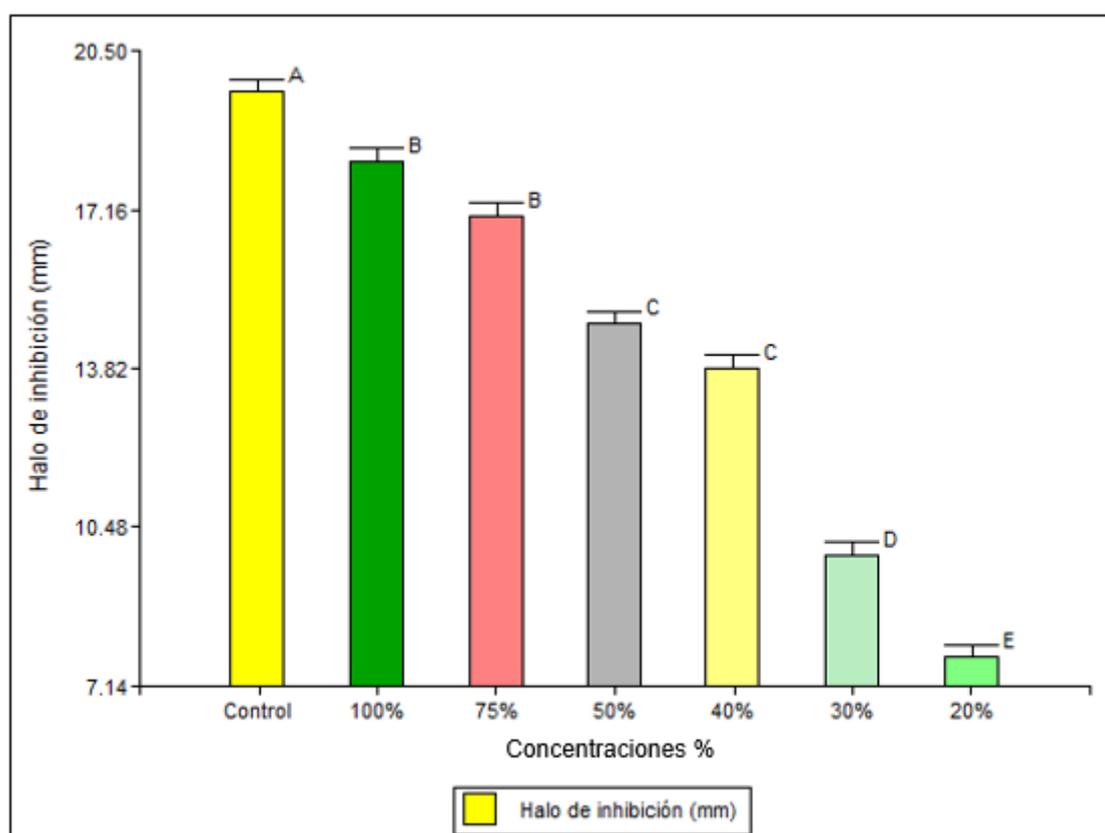
Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) en cepas de *Fusarium* sp. dentro del rango de concentración del 20 a 100 %, se realizó primero el análisis de varianza (ANOVA) para determinar la significancia de la prueba y si al menos una de las concentraciones es diferente a los demás; que posteriormente se corroboró con la prueba de contraste de Tukey.

**Tabla 5.** Análisis de varianza (ANOVA) para la determinación del efecto antimicótico del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) en cepas de *Fusarium* sp.

Análisis de Varianza (ANOVA) $\alpha = 0.05$					
Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F-Valor	Pr>F
Modelo	6	453.43	75.57	273.15	<0.0001
Tratamiento	6	453.43	75.57	273.15	<0.0001
Error	21	5.81	0.28		
Total corregido	27	459.24			

En la Tabla 5, de un total de 6 concentraciones utilizadas para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), el estadístico  $F = 273.15$  con el valor de  $P = 0.0001$  resultado menor a 0.05 el cual estadísticamente es altamente “significativo” entre las medias del halo de inhibición, demuestra que al menos una de las concentraciones es diferente y que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) posee efecto antimicótico frente a cepas de *Fusarium* sp., por lo cual rechazamos la hipótesis nula y aceptamos la hipótesis alterna, la cual indica que existe diferencias entre las 6 concentraciones de aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) con respecto a los halos de inhibición.

El análisis de varianza (ANOVA) determinó que existe diferencia significativa en todas las concentraciones (%) y en la Prueba estadística de Tukey se determinó que los promedios de los halos de inhibición de las diferentes concentraciones (%) de aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) a una dosis de 30  $\mu\text{L}$ , comparado con el fungicida Carbendazim a dosis de 10  $\mu\text{L}$ , las concentraciones variaron estadísticamente, además se determinó el grado de significancia  $\alpha=0.05$ , demostrándonos que si existe diferencia significativa entre las concentraciones (%) y control positivo Carbendazim. La Prueba estadística de Tukey indica que medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).



**Figura 20.** Concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) en cepas de *Fusarium* sp. dentro del rango de concentración del 20 a 100%.

En la Figura 20, el fungicida Carbendazim con un halo de inhibición de 19.63 mm, está representado de color amarillo por la letra “A” que no se repite con las demás letras, lo cual indica que posee diferencia significativa al no repetirse con las demás letras; en cambio, la concentración (%) de aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) de 100 % de color verde y 75 % de color rojo, con halos de inhibición de 18.18 y 17.03 mm respectivamente, no son significativamente diferentes ya que tienen la misma letra “B” ambos; de la misma manera, las concentraciones de 50 % con un halo de inhibición de 14.75 mm, representado por el color plomo y 40 % con un halo de inhibición de 13.83, de color amarillo claro poseen la misma letra “C”, es por eso que no son significativamente diferentes porque poseen la misma letra, por otro lado en la concentración del 30 % representado por la letra “D” de color verde claro, con un halo de inhibición de 9.90 mm, es significativamente diferente a las demás y la concentración del 20 % representada por la letra “E” de color verde pálido, con un halo de inhibición de 8.53 mm, también es significativamente diferente de las demás ya que es una letra diferente.

Teniendo en cuenta la prueba estadística de Tukey resulto que el Carbendazim posee un mejor efecto antimicótico que las demás por ser significativamente diferente con las demás letras y la concentración del 20 % de aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) tuvo menor efecto antimicótico como se observa en la Figura 20 la cual se encuentra ordenada de acuerdo a su media en forma descendente (A, B, C, D y E).

De los resultados observados se evidencia que la respuesta es distinta frente a las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña), lo que indica que a mayor concentración de aceite esencial mayor será el efecto inhibitorio, esto se expresa en el aumento proporcional del diámetro de halo de inhibición.

**Tabla 6.** Concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) de acuerdo a un antibiograma estandarizado.

Concentraciones (%) de aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i>	Halos de inhibición (mm)	Categorización
20 %	9 mm	Resistente
30 %	10 mm	Resistente
40 %	14 mm	Intermedio
50 %	15 mm	Sensible
75 %	17 mm	Sensible
100 %	18 mm	Sensible

En la Tabla 6 se determinó que la concentración mínima inhibitoria de acuerdo a un antibiograma estandarizado que está dada por el halo de inhibición a la cual esta es “sensible”, podemos decir que la concentración del 50 % de aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) será considerada como concentración mínima inhibitoria. A la concentración del 50 %, *Fusarium* sp. no mostro resistencia ya que hubo formación de halo de inhibición de 14.75 mm, siendo redondeado para la lectura con números enteros, lo cual nos permite usarlo como un importante biofungicida natural frente a los fungicidas convencionales que son utilizados por parte de la población.

Los resultados obtenidos en esta investigación respecto al efecto antimicótico fueron similares a los obtenidos por Alcalá *et al.* (2011) quienes reportaron que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 100% tuvo efecto contra *Cándida albicans*, el efecto antimicótico del Fluconazol fue mayor que la de *Minthostachys mollis* al 25% y fue el mismo al 50 %, Zapata *et al.* (2009) quienes reportaron que *Minthostachys mollis* y *Hyptis mutabilis* mostraron actividad antimicótica frente al hongo *Aspergillus fumigatus* ya que tuvo rangos de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) entre 250

y 375 ug/mL, Cano *et al.* (2008) encontraron los metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña) que son pulegona, mentona, limoneno y mirceno, además demostraron el efecto antimicótico del aceite esencial de muña que inhibió completamente el desarrollo de *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Microsporun canis*, para *Cándida albicans* se logró un halo de inhibición de 30 mm para el aceite esencial al 100 % y de 35 mm al 50 %, se demostró la actividad antimicótica del aceite esencial de muña, probablemente por la acción de los monoterpenos encontrados.

Los resultados obtenidos en esta investigación fueron similares respecto a la concentración y al efecto antimicótico obtenidos por Lizcano (2007) quien evaluó la actividad antifúngica del extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*) contra *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Sclerotinia sclerotiorum* el cual presentó resultados favorables para la actividad fungicida y fungistática obtuvieron en que el aceite esencial presentó menor efectividad fungicida en la concentración 6250 mg/L y fungistática de 1560 mg/L lo cual indica que a menor concentración la inhibición es menor a diferencia de una concentración mucho mayor el cual inhibe mucho mejor, Cárdenas (2018) demostró que los aceites esenciales de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*), cedron (*Lippia citriodora*) y guaraní poleo (*Clinopodium* spp.) controlan el crecimiento de *Fusarium*, estableciendo como el aceite más efectivo el obtenido de la hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) en una dosis mínima de 1.65 uL, el cual difiere al resultado obtenido en esta investigación ya que la concentración mínima fue del 50 % (1000 uL), Cueto (2010) determinó que los extractos de orégano mexicano *Lippia berlandieri* mostraron actividad fungicida sobre *Fusarium oxysporum* a concentraciones de 250-1000 ppm.

Los resultados obtenidos en la investigación respecto a la concentración son parecidos a los obtenidos por Ruano & Vallejo (2014) evaluó el extracto esencial de

*Lippia origanoides* como componente de un biofungicida capaz de disminuir la incidencia de enfermedad aplicando un biopolímero del aceite de orégano más carboximetil – celulosa 0,3 % más alginato de sodio ácido 1,5% el cual presentó buenos resultados a una concentración de 800 uLmL<sup>-1</sup> el cual disminuyó la incidencia de marchitez vascular, Villa *et al.* (2015) presentó algunos de los muchos estudios realizados alrededor del mundo sobre la efectividad biológica de diversas especies vegetales para el control de *Fusarium spp.*

Resultados similares respecto al efecto antimicótico sobre otras especies de microorganismos obtuvo Jauregui (2016) quien demostró que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* más el antifúngico fluconazol tiene efecto sinérgico en las diferentes concentraciones. La concentración inhibitoria se presentó en todas las concentraciones excepto en el control (fluconazol) en el que se obtuvo un crecimiento de  $4.5 \times 10^3$ , ( $p < 0.001$ ), Salas (2016) obtuvo que *Minthostachys mollis* en cepas de *Cándida albicans*, la muña de 1/250 (T6) tiene mayor efecto contra *Cándida albicans* que el fluconazol, Peña & Gutierrez (2017) demostraron que *Minthostachys mollis* presentó efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* con halo de inhibición 19,3 mm y de 8,0 frente a *Klebsiella pneumoniae*. *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* no presentó halos de inhibición, Baca (2017) determinó que *Minthostachys mollis* tiene efecto inhibitorio frente al género *Proteus* y una concentración mínima inhibitoria del 50 % (50 mg/ml) frente a *Proteus vulgaris*, tiene un halo de inhibición de 11.90 mm, *Proteus mirabilis* con 75 % (75 mg/ml) tiene un halo de 7.37 mm, *P. rettgeri* con 75 % (75 mg/ml) tiene un halo de 7.00 mm y *Proteus morganii* con 75 % (75 mg/ml) tiene un halo de 6.90 mm.

#### **4.2. Determinación de la susceptibilidad antimicótica de *Fusarium* sp., frente al aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) comparado con el fungicida comercial (Carbendazim).**

En la Tabla 7, se puede observar las lecturas del ensayo de disco difusión a dosis de 30 uL de aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) frente a *Fusarium* sp., resultaron de la siguiente manera: el control positivo (Carbendazim 10 uL), obtuvo un promedio de diámetro de halo de inhibición de 19.63 mm, el cual representa el 99 % de inhibición, para los discos con aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) a dosis de 30 uL cada disco, se obtuvieron los siguientes resultados para la concentración de 20/80 obtuvo un promedio de halo de inhibición de 8.53 mm que representa el 39 % de inhibición respecto al control positivo.

Se puede observar además que para la concentración de 30/70 se tuvo un promedio de halo de inhibición de 9.90 mm el cual es el 50 % de inhibición; para la concentración del 40/60 que tuvo un promedio de 13.83 mm de halo de inhibición que es el 70 % de inhibición respecto al control; de la misma manera para la concentración del 50/50 obtuvo un halo de inhibición de 14.75 mm que es el 75 % de inhibición respecto al control; además para la concentración del 75/25 se obtuvo un promedio de halo de inhibición de 17.03 mm que representa un 87 % de inhibición y por ultimo tenemos a la concentración de 100/0 que obtuvo un promedio de halo de 18.18 mm que representa el 93 % de efecto inhibitorio respecto al control positivo (Tabla 7).

En la Tabla 7, se observó que los porcentajes de inhibición del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) frente a *Fusarium* sp., se observó que son mayores para la concentración de 100/0, seguidos por las concentraciones de 75/25, 50/50, 40/60, 30/70

y el menor porcentaje de inhibición fue para 20/80, respecto al control positivo el fungicida Carbendazim.

**Tabla 7.** Porcentajes de inhibición, tratados con diferentes concentraciones de aceite esencial de *Minthostachys mollis*, comparado con el control positivo Carbendazim frente a *Fusarium* sp.

Repeticiones	Diámetro total del halo de inhibición (mm) y porcentajes de inhibición, tratados con diferentes concentraciones						Control positivo
	20/80	30/70	40/60	50/50	75/25	100/0	
<b>R1</b>	8.9	9.8	13.6	15.5	16.9	18.9	19.9
<b>R2</b>	8.8	9.9	13.5	15.3	16.8	18.7	19.8
<b>R3</b>	8.9	9.8	13.5	14.1	16.7	17.5	19.9
<b>R4</b>	7.5	10.1	14.7	14.1	17.7	17.6	18.9
<b>Promedio (mm)</b>	8.53	9.90	13.83	14.75	17.03	18.18	19.63
<b>% de inhibición</b>	39 %	50 %	70 %	75 %	87 %	93 %	99 %

Para determinar la susceptibilidad antimicótica de *Fusarium* sp., frente al aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) comparado con el fungicida comercial (Carbendazim), se realizó primeramente el análisis de varianza (ANOVA) para determinar la significancia de la prueba y si al menos una de las concentraciones es diferente a los demás; que en lo posterior se corroboró con la prueba de contraste de Tukey.

**Tabla 8.** Análisis de varianza (ANOVA) para la determinación de la susceptibilidad antimicótica de *Fusarium* sp., frente al aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) comparado con el fungicida comercial (Carbendazim).

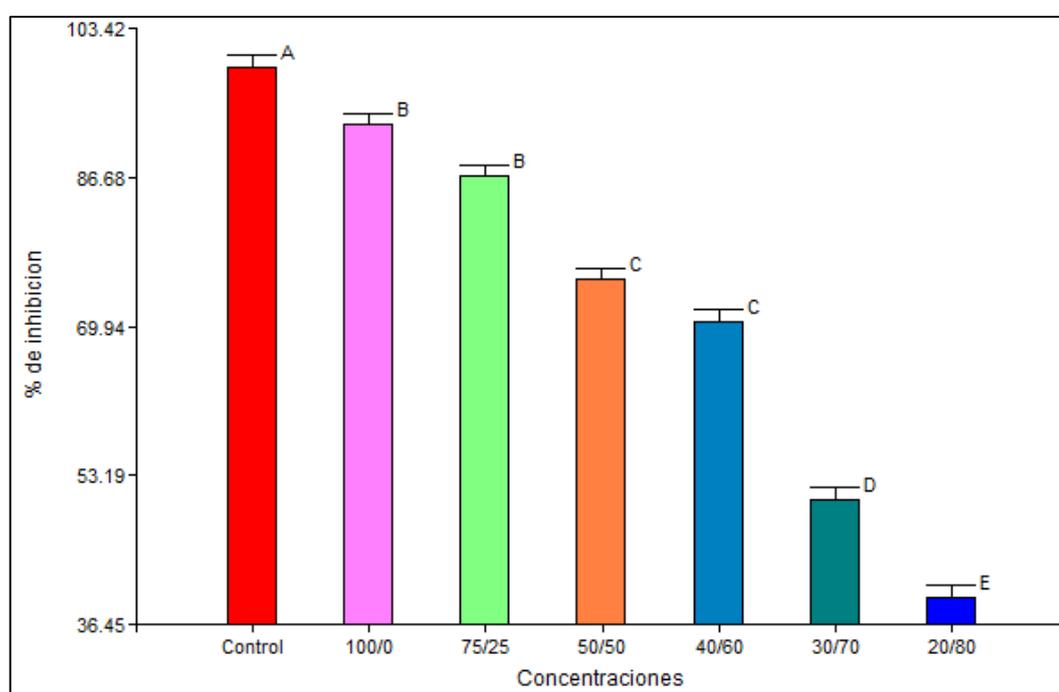
Análisis de Varianza (ANOVA) $\alpha = 0.05$					
Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F-Valor	Pr>F
Modelo	6	11580.42	1930.07	284.20	<0.0001
Concentraciones	6	11580.42	1930.07	284.20	<0.0001
Error	21	142.61	6.79		
Total	27	11723.03			

En la Tabla 8, de un total de 6 concentraciones utilizadas para la determinación de la susceptibilidad antimicótica de *Fusarium* sp., frente al aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) comparado con el fungicida comercial (Carbendazim), el estadístico  $F = 284.20$  con el valor de  $P = 0.0001$  resultado menor a 0.05 el cual estadísticamente es “altamente significativo” entre las medias de los porcentajes de inhibición respecto al control positivo que es el fungicida Carbendazim, así como también existe diferencia significativa con las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña). Con estos resultados podemos rechazar la hipótesis de que no existen diferencias entre las medias de los porcentajes de inhibición del Carbendazim y las concentraciones del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) frente a *Fusarium* sp.

En la Figura 21, se puede observar la Prueba estadística de Tukey, el control positivo Carbendazim que esta de color rojo tiene diferencia significativa ya que posee una letra diferente que no se repite que es “A”, la cual tiene un porcentaje de 99 %; por el contrario, las concentraciones de aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) obtuvieron los siguientes resultados: para la concentración de 100/0 que se encuentra de color rosado y la concentración de 75/25 que esta de color verde no tienen diferencia significativa ya que tienen la misma letra que es “B”, además representan un 93 y 87 % de porcentaje de inhibición respectivamente respecto al control positivo Carbendazim; del mismo modo las concentraciones de 50/50 que esta de color anaranjado y la concentración de 40/60 de color celeste tienen un porcentaje de inhibición de 75 y 70 % respecto al control positivo, además tienen la misma letra que es “C” lo cual indica que no son significativamente diferentes; por otro lado, la concentración de 30/70 representa un porcentaje de 50 % respecto al control el cual se encuentra de color verde oscuro y posee una letra diferente que es “D” lo que indica que es significativamente diferente de

las demás y por ultimo tenemos la concentración de 20/80 que representa un porcentaje de inhibición de 39 % respecto al control, que está de un color azul, además posee una letra diferente que es E lo que indica que es significativamente diferente.

Teniendo en cuenta la significancia de la prueba de análisis de varianza, la prueba de Tukey resulto que el mejor tratamiento es del control positivo de Carbendazim con la letra A y el tratamiento con menor efecto antimicótico fue la concentración 20/80 como se observa en la figura con la letra E (Figura 21).



**Figura 21.** Susceptibilidad antimicótica de *Fusarium* sp., frente al aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) comparado con el fungicida comercial (Carbendazim).

La categorización según el CLSI ha publicado cuatro documentos con información de las pruebas de susceptibilidad con antifúngicos, además indica que una cepa es Resistente al antibiótico Anfotericina B (10  $\mu$ g) con valores  $\leq 10$ , Intermedio =11-14 y Sensible con valores  $\geq 15$ . Esto está estandarizado de acuerdo a tablas establecidas de sensibilidad para el tratamiento control (Anfotericina B), el cual estamos

adecuando al fungicida (Carbendazim) (Bonifaz, 2015; Salas, 2016); Cercenado & Canton (2006).

Para establecer la categorización de la susceptibilidad antimicótica del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) y el fungicida Carbendazim frente a *Fusarium* sp., se procedió a llevar los promedios a “números enteros”, los cuales se pueden observar en la Tabla 9, en la cual se obtuvieron los números enteros de todos los diámetros de los halos de inhibición de las cuatro repeticiones en cada caso, obteniendo un promedio final de cada concentración empezando por el control positivo que es el Carbendazim en cual se obtuvo una media de 20 mm, de la misma manera para la concentración de 100/0 se obtuvo una media de 18 mm, por otro lado para la concentración de 75/25 se obtuvo una media de 17 mm, además para la concentración de 50/50 se tuvo una media de 15 mm, asimismo para la concentración de 40/60 se obtuvo una media de 14 mm, además para la concentración de 30/70 se tuvo una media de 10 mm, por otro lado para la concentración de 20/80 se obtuvo una media de 9 mm.

**Tabla 9.** Datos redondeados de las diferentes concentraciones, de medias del diámetro de los halos de inhibición en (mm). Comparando con el control positivo (6 concentraciones y 28 repeticiones).

Concentraciones (tratamientos) v/v							
Repeticiones	20/80	30/70	40/60	50/50	75/25	100/0	Control (+)
<b>R1</b>	9	10	14	16	17	19	20
<b>R2</b>	9	10	14	15	17	19	20
<b>R3</b>	9	10	14	14	17	18	20
<b>R4</b>	8	10	15	14	18	18	19
<b>Media (promedio)</b>	9	10	14	15	17	18	20

En la Tabla 10, se observa que el tratamiento control positivo obtuvo un diámetro de inhibición de 20 mm, lo cual se categoriza como “Sensible” según el CLSI, así como también los tratamientos con concentraciones de 50/50, 75/25 y 100/0 a dosis de 30  $\mu$ L del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña), obtuvieron valores mayores o iguales a “15 mm”, por lo cual se categorizan como “Sensible”, y existe una susceptibilidad “Intermedia” para el tratamiento con concentraciones de 40/60 a dosis de 30  $\mu$ L que resulto con 14 mm de halo de inhibición. Por ultimo resultaron “Resistente” para los tratamientos de con concentraciones de 20/80 y 30/70 a dosis de 30  $\mu$ L de aceite esencial de muña, quienes formaron halos de inhibición de 9 y 10 mm respectivamente.

**Tabla 10.** Categorización de la susceptibilidad de *Fusarium* sp. frente al aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) según el diámetro del halo de inhibición.

Concentraciones de aceite esencial (30 $\mu$ L) de <i>Minthostachys mollis</i> y Carbendazim (10 $\mu$ L).	Halos de inhibición (mm)	Categorización
20/80 (30 uL)	9	Resistente
30/70 (30 uL)	10	Resistente
40/60 (30 uL)	14	Intermedio
50/50 (30 uL)	15	Sensible
75/25 (30 uL)	17	Sensible
100/0 (30 uL)	18	Sensible
Carbendazim (10 $\mu$ L)	20	Sensible

Los resultados obtenidos en la investigación respecto a la susceptibilidad, fueron similares a los obtenidos por Scalvenzi *et al.* (2016) quienes demostraron que *Fusarium solani* es sensible al aceite esencial de *Cymbopogon citratus* ya que mostro una significativa actividad antifúngica dependiente de la dosis, registro una inhibición del

crecimiento del 95 %, a la concentración máxima (500 uL/mL), así como también es sensible al aceite esencial de *Citrus limon* ya que logro inhibir en un 72 % a *Fusarium solani*, a la concentración de 500 ul/mL. Al igual que en ambos aceites el hongo *Fusarium sp.* se mostró sensible a *Minthostachys mollis* a la concentración de 50 % con un halo de inhibición de 15 mm, Aceves *et al.* (2008) demostraron que *Fusarium oxysporum* es sensible al propóleos, Sanabria *et al.* (2006) determinaron que *Fusarium oxysporum* f. sp. *cuebense* y *Colletotrichum gloeosporioides* son sensibles a *Lippia origanoides* indujo entre 70 y 90 % de inhibición.

Los resultados obtenidos en esta investigación son similares respecto a la susceptibilidad de otras especies de microorganismos, Hernandez (2018) determino el efecto antifúngico del aceite esencial de *Minthostachys mollis* sobre *Cándida albicans* ATCC10231 se observó que a las 24 y 72 horas las concentraciones al 75 % y 100 % presentaron efecto antifúngico obteniendo un valor mayor a 10 mm de halo de inhibición, Condori (2018) demostro la eficiencia del control de *Minthostachys mollis* frente a *Erwinia* spp. 24 y 72 h, mostrando valores por mercados: Laykakota 10 mm, 15.3 mm, Central 14.6 mm y 12.8 mm, Unión y Dignidad 12.5 mm y 15.2 mm.

Los resultados obtenidos en esta investigación son semejantes respecto a la sensibilidad de otros microorganismos, Moina (2015) demostró que la actividad antibacteriana del colutorio elaborado con el aceite esencial de *Minthostachys spicata*, presento una mayor actividad antibacteriana frente *Streptococcus mutans* ATCC 25175, Huari (2014) obtuvo que *Minthostachys mollis* frente a *Streptococcus mutans* al 100 % tuvo efecto antibacteriano, obtuvo un halo promedio de 10.79 mm, al 50 % promedio de 7.6 mm, al 25 % promedio de 5 mm (tamaño de discos) igual que el control negativo, el control positivo (amoxicilina) promedio de 49.3 mm.

## V. CONCLUSIONES

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) en cepas de *Fusarium* sp. dentro del rango de concentración del 20 a 100 % siendo esta 50 % de concentración con un halo de inhibición de 14.75 mm, en el análisis de varianza resultó que el estadístico  $F = 273.15$  con el valor de  $P = 0.001$  resultó menor a 0,05 el cual estadísticamente es altamente significativo entre las medias del halo de inhibición, con la prueba de comparación de Tukey la media mayor fue del aceite esencial de muña a una concentración del 100 % con un halo de inhibición de 18.18 mm y la concentración del 20 % tuvo el halo de inhibición menor de 8.53 mm.

Se determinó la susceptibilidad antimicótica de *Fusarium* sp. frente al aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) comparado con el fungicida comercial (Carbendazim) siendo este “sensible” a las concentraciones de 100/0,75/25 y 50/50, “intermedia” a la concentración de 40/60 y “Resistente” a las concentraciones de 30/70 y 20/80, en el análisis de varianza resultó que el estadístico  $F = 284.20$  con el valor de  $P = 0.001$  resultó menor a 0.05 el cual estadísticamente es altamente significativo entre los porcentajes de inhibición respecto al control, con la prueba de Tukey el porcentaje mayor fue del fungicida Carbendazim con porcentaje de 99% además de ser altamente sensible respecto a las concentraciones de aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña).

## VI. RECOMENDACIONES

Se recomienda aislar e identificar especies más patógenas sobre la papa en la región de Puno, como *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* en fase estacionaria para observar el efecto antimicótico de *Minthostachys mollis* (muña) en las concentraciones del 20 al 100 %.

Se recomienda realizar investigaciones *in vivo* con la aplicación del biofungicida *Minthostachys mollis* (muña) en papa como muestra piloto en laboratorio, utilizar concentraciones menores al 20/80 a una cantidad de 30 ul. Luego de la prueba piloto hacer un estudio de campo en parcelas pequeñas de infección, para luego aplicar el producto con las investigaciones correspondientes.

## VII. REFERENCIAS

- Aceves, T., Virgen, G., Posos, P., & Contreras, M. (2008). Actividad fungicida de los propoleos sobre *Fusarium oxysporum* y *Sclerotium rolfsii*. *Avances En La Investigacion Cientifica En El CUCBA*,1, 1–9.
- Acuña, I., & Araya, M. (2017). Pudrición seca o fusariosis. *Sanidad vegetal*, 48, 2p.
- Aigaje, A. (2016). “Efectividad antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Tipo) al 25, 50, 100 % frente a *Porphyromonas gingivalis* estudio *in vitro*”. Tesis para optar el Titulo Profesional de Odontologo. Universidad Central del Ecuador, Quito - Ecuador.
- Alcalá, K., Alvarado, A. G., Alejandro, A., & Huayané, E. (2011). Actividad antimicótica del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña) comparado con el fluconazol en cultivo de *Candida albicans*. *CIMEL Ciencia e Investigacion Medica Estudiantil Latinoamericana*, 16(2), 83–86.
- Alegre, A., Iannacone, J., & Carhuapoma, M. (2017). Toxicidad del extracto acuoso, etanolico y hexanico de *Annona muricata*, *Minthostachys mollis*, *Lupinus mutabilis* y *Chenopodium quinoa* sobre *Tetranychus urticae* y *Chrysoperla externa*. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*, 33(3), 273–284.
- Alexopoulos, C., & Mims, J. (1985). *Introduccion a la micologia*. Barcelona: Omega.
- Alvarado, P. (2005). Identificación de cepas patógenas de *Fusarium* Link. causantes de nueva patología en el cultivo de calas de colores bajo condiciones productivas de invernadero en Chile. Tesis para optar el Titulo Profesional de Ingeniero Agronomo. Universidad Austral de Chile, Valdivia - Chile.
- Alzate, D., Mier, G., Afanador, L., Durango, D., & García, C. (2009). Evaluación de la fitotoxicidad y la actividad antifúngica contra *Colletotrichum acutatum* de los aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*), limoncillo (*Cymbopogon citratus*),

- y sus componentes mayoritarios. *Vitae*, 16(1), 116–125.
- Ames, T. (1997). *Enfermedades Fungosas y Bacterianas de Raíces y Tuberculos Andinos*. Lima: CIP.
- Araneda, X., Quilamán, E., Martínez, M., & Morales, D. (2014). Elaboración y evaluación de jugo de maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz) por arrastre de vapor. *Scientia Agropecuaria*, 5(3), 149–156.
- Arbeláez, G. (2000). Algunos aspectos de los hongos del género *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. *Agronomía Colombiana*, 17, 11–16.
- Avello, M. (et al) (2012). Efectos antimicrobianos de extractos de plantas chilenas de las familias Lauraceae y Atherospermataceae. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17(1), 73–83.
- Azaña, I. (2010). “Efectividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de *Minthostachys mollis* griseb (muña) sobre bacterias prevalentes en patologías periapicales crónicas de origen endodóntico”. Tesis para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima - Peru.
- Baca, C. (2017). Efecto inhibitorio del aceite esencial “muña” *Minthostachys mollis* sobre el género *Proteus*, causantes de infecciones del tracto urinario. Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología. Universidad Nacional del Altiplano, Puno - Peru.
- Bernal, A., Zamora, J., Virgen, G., & Nuño, R. (2005). Actividad biológica *in vitro* de extractos de *Lupinus spp.* sobre hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23(2), 140–146.
- Bonifaz, A. (2015). *Micología medica basica*. Mexico.: Mc Graw-Hill- Interamericana.
- Bravo, C., Larriva, W., & Minchala, L. (2012). *Manejo integrado de la marchitez vascular o fusariosis (Fusarium oxysporum) en el cultivo de Babaco*. Cuenca -

- Ecuador: INIAP.
- Brooks, G., Carroll, K., Butel, J., Morse, S., & Mietzner, T. (2011). *Jawetz, Melnick y Adelberg Microbiología médica*. (25va ed.). Mexico: Mc Graw - Hill - Interamericana.
- Calderon, D., & Guerrero, A. (2013). Análisis del efecto antibacterial de aceites esenciales de *Lepechinia rufocampii* y *Minthostachys tomentosa* sobre cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella thyphimurium*". Tesis para optar el Título Profesional de Bioquímico Farmacéutico. Universidad de Cuenca, Cuenca.
- Calixto, M. (2006). Plantas medicinales utilizadas en odontología (parte 1). *Kiru*, 3(2), 80–84.
- Cano, C. (2007). Actividad antimicótica *in vitro* y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* "muña". Tesis para optar el grado académico de Magister en Recursos Vegetales y Terapéuticos. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima - Peru.
- Cano, C., Bonilla, P., Roque, M., & Ruiz, J. (2006). Actividad antimicótica *in vitro* y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* "muña." *Ciencia e Investigación*, 9(1), 27–31.
- Cano, C., Bonilla, P., Roque, M., & Ruiz, J. (2008). Actividad antimicótica *in vitro* y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (Muña). *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 25(3), 298–301.
- Cárdenas, J. (2014). Control biológico de *Fusarium* en hortalizas de la parroquia de San Joaquin. Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Agropecuario. Universidad del Azuay, Cuenca - Ecuador.
- Carhuapoma, M., Lopez, S., Roque, M., Velapatiño, B., Bell, C., & Whu, C. (2009). Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb "ruyaq

- muña.” *Ciencia e Investigación*, 12(2), 83–89.
- Casas, S. (2011). Eficacia en la cicatrización del apósito con aceite esencial de *Mithostachys mollis* (muña) versus el apósito quirúrgico convencional en gingivectomias en *Oryctolagus cuniculus* (conejos). Tesis para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista. Universidad Nacional Federico Villarreal. Lima - Peru.
- Castañeda, B., Ramos, E., & Ibáñez, L. (2008). Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. *Revista Horizonte Médico*, 8(1), 56–72.
- Castro, I., & Contreras, A. (2011). *Manejo de plagas y enfermedades en el cultivo de la papa*. Valdivia - Chile: Imprenta Austral.
- Ccallo, S. (2013). Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial del *Minthostachys mollis* (muña), frente a la actividad bacteriana de *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*. Tesis para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista. Universidad Nacional del Altiplano, Puno - Peru.
- Ccopa, L. (2014). Evaluación de la conservación de filetes de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) envasada con películas biodegradables con la adición de aceite esencial de muña (*Minthostachys mollis*). Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial. Universidad Nacional del Altiplano, Puno - Peru.
- Cercenado, E., & Canton, R. (2006). *Diagnóstico microbiológico de las micosis y estudios de sensibilidad a los antifúngicos*. España: Seimc.
- Condori, E., & Vilca, D. (2005). *Sistematica de Fanerogamas*. Puno-Peru: Biología.
- Condori, P. (2018). Evaluación del control antibacteriano de *Erwinia spp* en papa con dos aceites esenciales: muña (*Minthostachys mollis*) y paico (*Chenopodium ambrosioides*) Puno 2017. Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en

- Biología. Universidad Nacional del Altiplano, Puno - Peru.
- Cueto, M. (2010). Determinación del efecto inhibitorio del aceite esencial y diferentes extractos de oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum* tanto *in vitro* como en plantula de tomate. Tesis para optar el Grado de Doctor en Ciencias Biológicas con acentuación en Alimentos. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- Duarte, Y., Pino, O., Infante, D., Sánchez, Y., Travieso, M., & Martínez, B. (2013). Efecto *in vitro* de aceites esenciales sobre *Alternaria solani* Sorauer. *Revista Protección Vegetal*, 28(1), 54–59.
- Dueñas, M. (2013). “Actividad antimicótica *in vitro* del aceite esencial de la muña *Minthostachys acris* Schmidt-Leb. (Lamiaceae) sobre *Spotothrix schenckii*”. Tesis para optar el Título Profesional de Biólogo. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Cusco - Peru.
- Estupiñán, H., & Ossa, J. (2007). Efecto del agente causal de la marchitez vascular de la uchuva (*Physalis peruviana* L.) el hongo *Fusarium oxysporum* Schlecht, sobre algunas Solanaceas y otras especies cultivadas afectadas por formas especiales del microorganismo. Tesis para optar el Título Profesional de Microbiólogo agrícola y veterinario. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- Forero, C. (et al) (2017). Evaluación de la capacidad patogénica de *Fusarium spp.* en modelos vegetal y murino. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(1), 90–96.
- Frazier, W., & Westhoff, D. (1993). *Microbiología de los alimentos*. (4ta ed.). Zaragoza - España: Acribia.
- Fuertes, C., Jurado, B., Gordillo, G. C., Negrón, L., Esteban, M., & Távora, A. (2010). Estudio integral de plantas biocidas del algodónero. *Ciencia e Investigación*, 13(1), 34–41.

- Garcés, E., Orozco, M., Bautista, G., & Valencia, H. (2001). *Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta conocer. *Acta Biológica Colombiana*, 6(1), 7–25.
- Gleiser, R., Bonino, M., & Zygadlo, J. (2007). Bioactividad de aceites esenciales de *Minthostachys mollis* contra mosquitos. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 6(6), 350–351.
- Granados, C., Yañez, X., & Santafe, G. (2012). Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* de Norte de Santander. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 10(1), 12–23.
- Guerrero, P., & Pozo, K. (2016). Evaluación de la actividad antioxidante bioautográfica de cinco variedades de aceites esenciales andinos (*Aristeguietia glutinosa*; *Myrcianthes rhopaloides*; *Ambrosia arborescens*; *Lantana camara*; *Minthostachys mollis*). Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales. Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito, Quito.
- Guevara, M., Urcia, F., & Casquero, J. (2007). *Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas*. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud.
- Guevara, M., Urcia, F., & Casquero, J. (2010). Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas. *Medicina & Laboratorio*, 16(7–8), 373–397.
- Hernandez, M. (2018). Efecto antifúngico del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) sobre las cepas de *Candida albicans* ATCC10231. Estudio *In Vitro*. Tesis para optar el Título Profesional de Odontólogo General. Universidad Central del Ecuador, Quito - Ecuador.

- Huamani, W. (2015). "Estudio de compuestos bioactivos del aceite esencial de muña (*Minthostachys mollis*) por cromatografía de gases-espectrometría de masas en tres niveles altitudinales del Distrito de Huando". Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial. Universidad Nacional de Huancavelica, Acobamba - Huancavelica - Peru.
- Huari, G. (2014). Efecto antibacteriano *in vitro* del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) en *Streptococcus mutans*. Tesis para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima - Peru.
- Instituto Nacional de Salud. (2011). Boletín Semanal Instituto Nacional de Salud. *Boletín Semanal Instituto Nacional de Salud*, 20, 1–7.
- Jauregui, A. (2016). Efecto sinérgico *in vitro* del aceite esencial de *Minthostachys mollis* más fluconazol sobre *Candida albicans* ATCC 10231. Tesis para optar el Título Profesional de Médico Cirujano. Universidad Privada Antenor Orrego, Trujillo - Peru.
- Kenneth, R., & George, R. (2011). *Sherris. Microbiología médica*. (5ta ed.) Mexico: Mc Graw - Hill - Interamericana.
- Leyva, S., Vega, H., Villaseñor, H., Tlapal, B., Vargas, M., Camacho, M., & Tovar, J. (2017). Caracterización de especies de *Fusarium* causantes de pudrición de raíz del trigo en el Bajío, México. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*, 33(2), 142–151.
- Lizcano, M. (2007). Evaluación de la actividad antifúngica del extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*) contra *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Sclerotinia sclerotiorum*. Tesis para optar el Título Profesional de Microbiólogo agrícola y Veterinaria. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.

- Llovo, J., & Pontón, J. (2007). Diagnostico microscopico de las micosis. *Revista Iberoamericana de Micologia*, 14, 1-14.
- López, L., Hernández, M., Colín, C., Ortega, S., Cerón, G., & Franco, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigacion de Discapacidad Medigraphic*, 3(1), 10–18.
- Malpartida, F. (2010). "Efecto inhibidor del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) en comparacion al paramonoclorofenol alcanforado y gluconato de clorhexidina al 2% frente a cepas de *Enterococcus faecalis*. Estudio *in vitro*. Lima 2009". Tesis para optar el Grado Academico de Maestro en Estomatologia. Universidad Alas Peruanas, Lima - Peru.
- Marín, P. (2010). Análisis de factores ecofisiologicos que influyen en la expresion de genes relacionados con la biosíntesis de toxinas en especies de "*Fusarium*". Tesis para optar el Grado de Doctor en Biologia. Universidad Complutense de Madrid, Madrid - España.
- Martínez, L., Caro, C., & Bonifaz, A. (2014). Infecciones por *Fusarium*. *Dermatologia Revista Mexicana*, 58(5), 432–442.
- Merma, A. (2014). "Conservacion del ketchup de tomate de arbol (*Cyphomandra betacea*) mediante la utilizacion del aceite esencial de muña (*Minthostachys spicata*). Tesis para optar el Titulo Profesional de Ingeniero Agroindustrial. Universidad Nacional del Altiplano, Puno - Peru.
- Moina, V. (2015). Actividad antibacteriana *in vitro* de colutorios elaborados con aceites esenciales de *Luma chequen* (*Feuilleé ex Molina*) A.Gray "arrayan" y *Minthostachys spicata* (*Benth*). *Epling* "yuraq muña" frente a la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Tesis para optar el Titulo Profesional de Quimico Farmaceutico. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco,

cusco - Peru.

Moscardi, C., & Garcia, S. (1987). Enfermedades de la papa. *Physica Scripta*, 37, 249–255.

Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2014). *Microbiología médica*. (6ta ed.) España: Elsevier.

Onan, E. (2013). Evaluación de cuatro fungicidas para el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi en el cultivo de arveja dulce (*Pisum sativum* L.); Tecpan Guatemala, Chimaltenango. Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Agrónomo. Universidad Rafael Landívar, Guatemala de la Asunción.

Ordoñez, E. (2015). Desarrollo de películas eco-amigables con capacidad antimicrobiana a partir de nanocompositos de acetato de celulosa y aceite esencial de muña (*Minthostachys spicata*). Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial. Universidad Nacional del Altiplano, Puno - Peru.

Paredes, N. (2009). Efectividad antibacteriana *in vitro* de una infusión a base de *Camelia sinensis* y *Minthostachys mollis* sobre flora salival mixta. Tesis para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima - Peru.

Peña, D., & Gutierrez, M. (2017). Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Minthostachys mollis* sobre microorganismos frecuentes en vías respiratorias bajas. *Revista Ciencia y Tecnología*, 13(3), 55–66.

Retana, K., Ramírez, J., Castro, O., & Blanco, M. (2018). Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium oxysporum* f.sp. *Apii* asociado a la marchitez del apio en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 42(1), 115–126.

Ruano, E., & Vallejo, A. (2014). Formulación de un biofungicida a partir de una emulsión con aceite esencial de orégano silvestre (*Lippia origanoides* H.B.K)

- frente al fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* causante de la marchitez vascular de arveja (*Pisum Sativum* L.). Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial. Universidad de Nariño, San Juan de Pasto.
- Salas, A. (2016). Efecto antimicótico del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) en cepas de *Candida albicans*. Puno - 2015. Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología. Universidad Nacional del Altiplano, Puno - Peru.
- Sanabria, M., Rodríguez, D., & Rodríguez, J. (2006). Inhibición de hongos fitopatógenos con extractos de *Phyllanthus niruri* L. y *Lippia origanoides* (H.B.K.). *VII Congreso SEAE Zaragoza*, 77. 5p.
- Scalvenzi, L., Yaguache, B. D., Guerrini, A., Radice, M., & Chiurato, M. (2016). Efectos de los aceites esenciales amazónicos de *Citrus limon* y *Cymbopogon citratus* sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos. *Revista Amazónica Ciencia y Tecnología*, 5(3), 206–217.
- Stashenko, E. (2009). *Aceites Esenciales*. Bucaramanga - Santander: CENIVAM.
- Tapia, C. (2009). Actualización en pruebas de susceptibilidad antifúngica. *Revista Chilena de Infectología*, 26(2), 144–150.
- Tapia, C., & Amaro, J. (2014). Género *Fusarium*. *Revista Chilena de Infectología*, 31(1), 85–86.
- Torrenegra, M., Granados, C., Durán, M., León, G., Yáñez, X., Martínez, C., & Pájaro, N. (2017). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis*. *ORINOQUIA*, 20(1), 69 - 74.
- Torres, H. (2002). *Manual de las enfermedades más importantes de la papa en el Peru*. Lima - Peru: CIP.

- Ulloa, C. (2015). Aromas y sabores andinos. *Botanica Economica de los Andes Centrales*, 24(1), 313–328.
- Villa, A., Pérez, R., Morales, H., Basurto, M., Soto, J., & Martínez, E. (2015). Situación actual en el control de *Fusarium spp* . y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*, 64(2), 194–205.
- Wainwright, M. (1992). *Introduccion a la biotecnologia de los hongos*. Zaragoza - España: Acribia.
- Yapuchura, R. (2010). Estudio de los componentes antioxidante de las hojas de muña (*Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb.) e inca muña (*Clinopodium bolivianum* (Benth.) Kuntze). Tesis para optar el grado de Magister Scientiae en Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima - Peru.
- Zapata, B., Durán, C., Stashenko, E., Betancur, L., & Mesa, A. (2009). Actividad antimicótica, citotoxicidad y composición de aceites esenciales de plantas de la familia Labiatae. *Revista Salud UIS*, 41, 223–230.
- Zurita, S., Urcia, F., & Navarro, A. (2017). *Manual de procedimientos técnicos para el diagnóstico micológico*. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud.

## ANEXOS



**Figura 22.** *Minthostachys mollis* en su hábitat natural, Distrito de Capachica, Provincia de Puno, Abril - 2018.



**Figura 23.** Obtención del aceite esencial de hojas de *Minthostachys mollis* (muña) por el método de destilación de arrastre por vapor.



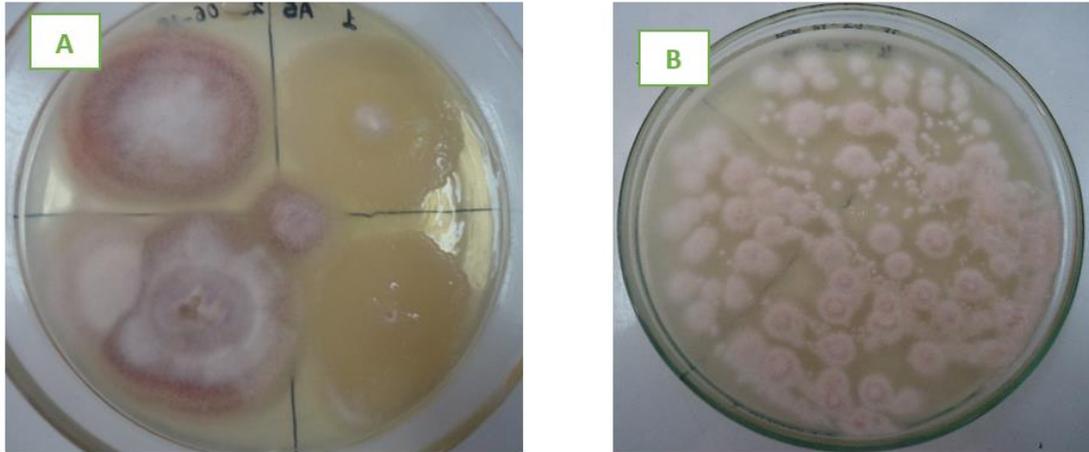
**Figura 24.** Aceite esencial de *Menthostachys mollis* (muña) en frasco color ámbar.



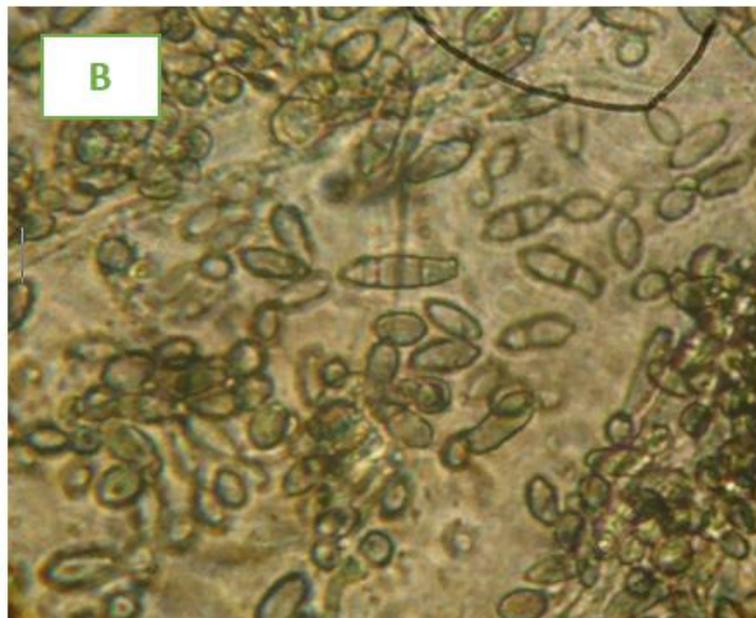
**Figura 25.** A. Materiales e instrumentos de Laboratorio; B. Fungicida “Carbendazim”.



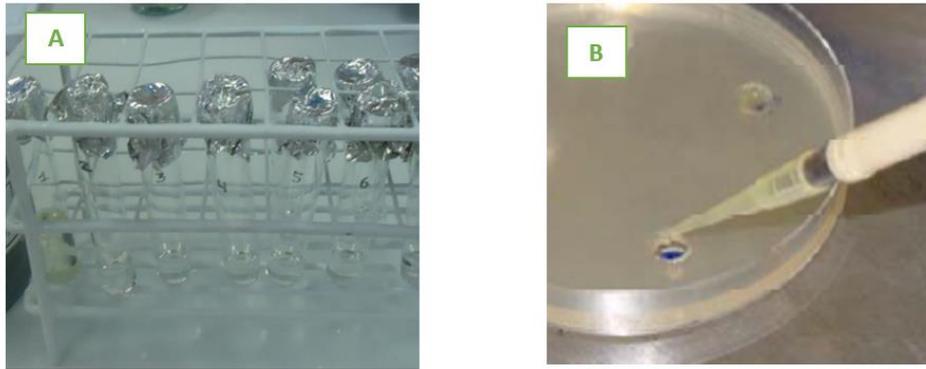
**Figura 26.** Papa con características de infección por *Fusarium* sp. (Pudrición seca).



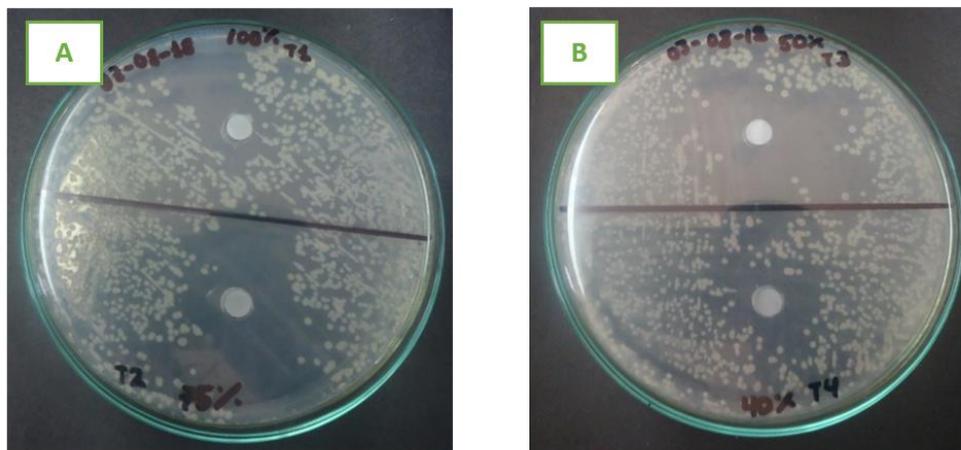
**Figura 27.** A. Cepa aislada de papa infectada de *Fusarium* sp. en Agar Sabouraud; B. Cepa de *Fusarium* sp.



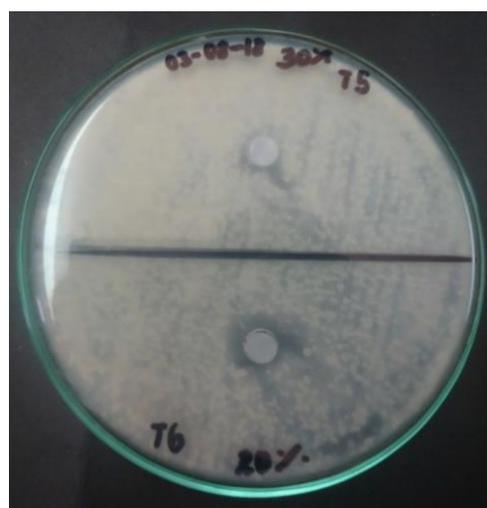
**Figura 28.** A. Observación en el microscopio óptico para corroborar la presencia de *Fusarium* sp.; B. *Fusarium* sp. a 40 X. en tinción de lugol.



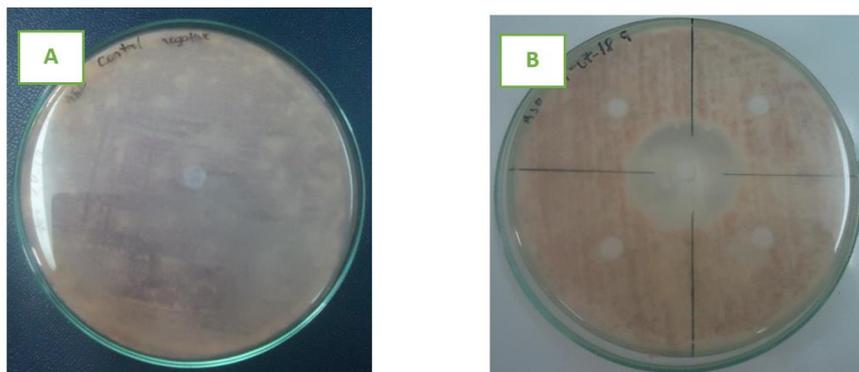
**Figura 29.** A. Dilución del aceite esencial de Muña las concentraciones de 20 a 100 %, en etanol de 96°; B. Aplicación de aceite esencial de Muña con micropipeta.



**Figura 30.** A y B: Halos de inhibición de aceite esencial de Muña a concentraciones de 100 %, 75 %, 50 % y 40 %.



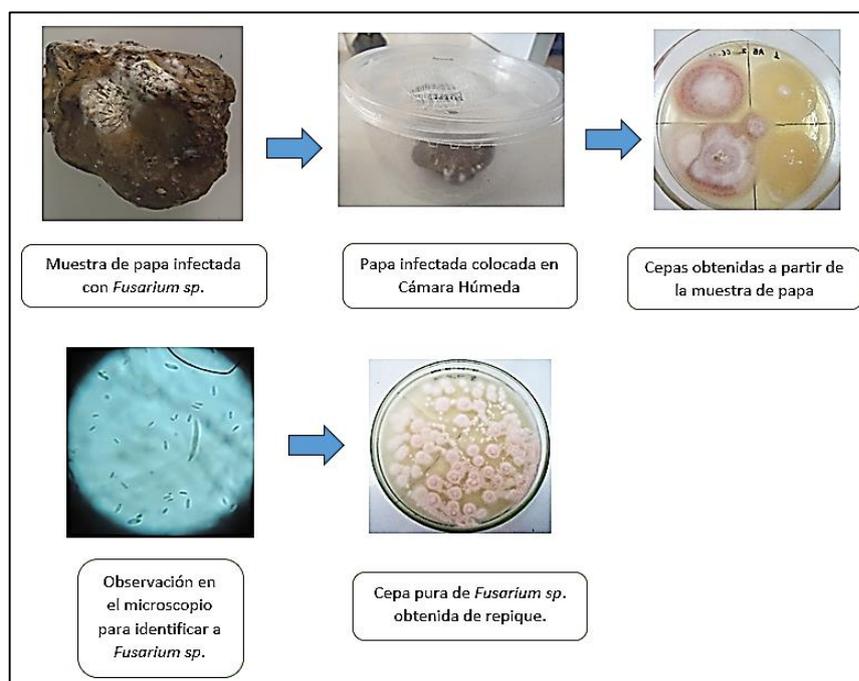
**Figura 31.** Halos de inhibición de aceite esencial de Muña a concentraciones de 30 % y 20 %.



**Figura 32.** A. Control negativo B. Control positivo (Fungicida Carbendazim).



**Figura 33.** Medición de halos de inhibición utilizando vernier.



**Figura 34.** Aislamiento e identificación de las cepas del genero *Fusarium* sp. a partir de muestras de papa infectada.

**Tabla 11.** Análisis de varianza (ANOVA) y Prueba de Tukey para inhibición antifúngica de las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) en cepas de *Fusarium* sp.

Prueba t para una media

Valor de la media bajo la hipótesis nula: 0

Variable	n	Media	DE	LI(95)	LS(95)	T	p(Bilateral)
Control	4	19.63	0.49	18.85	20.40	80.82	<0.0001
100%	4	18.18	0.73	17.02	19.33	49.97	<0.0001
75%	4	17.03	0.46	16.30	17.75	74.45	<0.0001
50%	4	14.75	0.75	13.55	15.95	39.07	<0.0001
40%	4	13.83	0.59	12.89	14.76	47.25	<0.0001
30%	4	9.90	0.14	9.67	10.13	140.01	<0.0001
20%	4	8.53	0.68	7.44	9.61	24.89	0.0001

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Halo de inhibición (mm)	28	0.99	0.98	3.64

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	453.43	6	75.57	273.15	<0.0001
Tratamiento	453.43	6	75.57	273.15	<0.0001
Error	5.81	21	0.28		
Total	459.24	27			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1.20907

Error: 0.2767 gl: 21

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
Control	19.63	4	0.26	A
100%	18.18	4	0.26	B
75%	17.03	4	0.26	B
50%	14.75	4	0.26	C
40%	13.83	4	0.26	C
30%	9.90	4	0.26	D
20%	7.75	4	0.26	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

**Tabla 12.** Análisis de varianza (ANOVA) y Prueba de Tukey para porcentaje de inhibición de las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) en cepas de *Fusarium* sp.

Prueba t para una media

Valor de la media bajo la hipótesis nula: 0

Variable	n	Media	DE	LI (95)	LS (95)	T	p (Bilateral)
Control	4	99.08	1.85	96.14	102.01	107.40	<0.0001
100/0	4	92.61	3.71	86.71	98.52	49.93	<0.0001
75/25	4	86.75	2.33	83.05	90.46	74.51	<0.0001
50/50	4	75.16	3.84	69.04	81.28	39.10	<0.0001
40/60	4	70.45	2.98	65.70	75.19	47.28	<0.0001
30/70	4	50.45	0.72	49.31	51.59	140.81	<0.0001
20/80	4	39.49	0.88	38.09	40.89	89.71	<0.0001

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	11580.42	6	1930.07	284.20	<0.0001
Concentraciones	11580.42	6	1930.07	284.20	<0.0001
Error	142.61	21	6.79		
Total	11723.03	27			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=5.99026

Error: 6.7912 gl: 21

Concentraciones	Medias	n	E.E.	
Control	99.08	4	1.30	A
100/0	92.61	4	1.30	B
75/25	86.75	4	1.30	B
50/50	75.16	4	1.30	C
40/60	70.45	4	1.30	C
30/70	50.45	4	1.30	D
20/80	39.49	4	1.30	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

**Anexo 01.** Constancia de obtención de aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña).



Universidad Nacional del Altiplano - Puno  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

Ciudad Universitaria, Av. Sesquicentenario N° 1150, Telf.: (051)599430 / IP. 10301 / (051) 366080



N° 001

## CONSTANCIA

EL DIRECTOR DE LA ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS, UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO – PUNO.

**HACE CONSTAR:**

Que, la Srta. **KATHERINE KARINA QUISPE FLORES**, identificado con DNI N° 48040957, egresada de la Escuela Profesional de **BIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**, ha realizado la extracción de **ACEITE ESENCIAL** de la planta de Muña (*Minthostachys mollis*), realizado en el Destilador de Aceites del Taller de Frutas y Hortalizas de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Facultad de Ciencias Agrarias.

Se le expide la presente constancia, a solicitud de la interesada para los fines que estime por conveniente.

Puno, 25 de abril de 2018.



Dr. Alejandro Goloma Paqui  
DIRECTOR DE LA ESCUELA PROFESIONAL  
INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL  
UNA-PUNO

C.c.  
Arch.  
ACPI

E-mail: [direccion.epiai@unap.edu.pe](mailto:direccion.epiai@unap.edu.pe)

**Anexo 02.** Constancia de ejecución en el laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Biológicas.



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO PUNO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS**



**CONSTANCIA**

**LA JEFE DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO (UNA) PUNO HACE CONSTAR :**

Que la Srta. **BACHILLER KATHERINE KARINA QUISPE FLORES**, egresada de la Facultad de Ciencias Biológicas, Especialidad Microbiología y Laboratorio Clínico ha realizado su trabajo de investigación motivo de tesis, intitulado: **EFFECTO ANTIMICÓTICO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis* (Muña) EN CEPAS DE FUSARIUM SP. PUNO 2017**, ejecutando el trabajo experimental en el laboratorio, desempeñándose con responsabilidad, dedicación y puntualidad.

Se expide el presente a solicitud del interesado y para los fines convenientes.

Puno, 29 de Marzo del 2019.

  
M.Sc. Eva Laura Chauca  
DOCENTE PRINCIPAL D.E. FCCBB - UNA  
COLBIOP N° 905  
**JEFE DE LABORATORIO**





Universidad Nacional del Altiplano - Puno  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

Ciudad Universitaria, Av. Sesquicentenario N° 1150, Telf.: (051)599430 / IP. 10301 / (051) 366080



N° 001

## CONSTANCIA

EL DIRECTOR DE LA ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS, UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO – PUNO.

**HACE CONSTAR:**

Que, la Srta. **KATHERINE KARINA QUISPE FLORES**, identificado con DNI N° 48040957, egresada de la Escuela Profesional de **BIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**, ha realizado la extracción de ACEITE ESENCIAL de la planta de Muña (*Minthostachys mollis*), realizado en el Destilador de Aceites del Taller de Frutas y Hortalizas de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Facultad de Ciencias Agrarias.

Se le expide la presente constancia, a solicitud de la interesada para los fines que estime por conveniente.

Puno, 25 de abril de 2018.



  
Dr. Alejandro Coloma Paxi  
DIRECTOR DE LA ESCUELA PROFESIONAL  
INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL  
UNA-PUNO

C.c.  
Arch.  
ACPI.



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO PUNO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS**



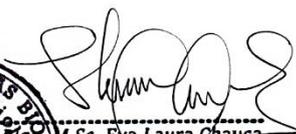
## CONSTANCIA

**LA JEFE DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO (UNA) PUNO HACE CONSTAR :**

Que la Srta. **BACHILLER KATHERINE KARINA QUISPE FLORES**, egresada de la Facultad de Ciencias Biológicas, Especialidad Microbiología y Laboratorio Clínico ha realizado su trabajo de investigación motivo de tesis, intitulado: **EFFECTO ANTIMICÓTICO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis* (Muña) EN CEPAS DE FUSARIUM SP. PUNO 2017**, ejecutando el trabajo experimental en el laboratorio, desempeñándose con responsabilidad, dedicación y puntualidad.

Se expide el presente a solicitud del interesado y para los fines convenientes.

Puno, 29 de Marzo del 2019.

  
M.Sc. Eva Laura Chauca  
DECENTE PRINCIPAL DE FCCBB - UNA  
COLBIOP N° 905  
JEFE DE LABORATORIO

