



---

**Universidad de Valladolid**  
**Campus de Palencia**

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR  
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

## **Máster en Ingeniería Agronómica**

*“Evaluación de aceites esenciales de citronela, melisa y sándalo como agentes de biocontrol de hongos necrotrofos in vitro e in vivo”.*

Alumno: Ana M<sup>a</sup> Arribas Fernández

Tutor: Fernando Manuel Alves Santos

Octubre 2018



Copia para el tutor

## **Agradecimientos:**

A mi tutor, Dr. Fernando Manuel Alves Santos, por la idea del Trabajo Fin de Máster, que ha cambiado mi perspectiva y mi entendimiento sobre la Agricultura, por su apoyo, por su incondicionalidad, por su disposición, por su tiempo, por su sabiduría y por su trato tan amable y comprensivo hacia mi persona.

A D. Manuel García Zumel, por permitirme disponer del laboratorio de Fitopatología para realizar todos los ensayos del estudio, por sus enseñanzas y por su manera de transmitir sus conocimientos a sus estudiantes... un verdadero placer escucharte.

A mis abuelos, a mis padres, por enseñarme lo que es el campo, el amor a las plantas, a la tierra y al pueblo.

A Sergio Arribas y Diana Castilla, por estar siempre presentes y a Bruno Wermuth por su apoyo y confianza.

<b>ÍNDICE:</b> .....	<b>Pág.</b>
Índice de tablas .....	5
Índice de figuras .....	6
<b>1. RESUMEN .....</b>	<b>8</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN: .....</b>	<b>9</b>
2.1. Hongos necrotrofos .....	10
2.1.1. <i>Alternaria</i> .....	11
2.1.2. <i>Botrytis cinerea</i> .....	13
2.1.3. <i>Penicillium</i> .....	15
2.1.4. <i>Aspergillus</i> .....	17
2.1.5. <i>Fusarium</i> .....	18
2.2. Aceites Esenciales (A.E.): .....	19
2.2.1. Origen/ Composición/ Extracción de A.E.:.....	21
2.2.2. Usos en agricultura .....	27
2.2.3. Efectos biológicos y modo de acción de los metabolitos: .....	34
2.2.4. Toxicología de los metabolitos: .....	35
2.2.5. Aceite esencial de melisa .....	36
2.2.6. Aceite esencial de citronela.....	37
2.2.7. Aceite esencial de sándalo.....	40
2.3. Control biológico .....	41
2.3.1. Situación actual: Consecuencias del uso de pesticidas y perspectivas de cambio.....	43
<b>3. OBJETIVO DEL ESTUDIO .....</b>	<b>44</b>
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>45</b>
4.1. Obtención de aislados .....	45
4.2. Ensayos <i>in vitro</i> en PDA .....	45
4.3. Ensayos <i>in vivo</i> sobre material vegetal (naranja) .....	47
4.4. Ensayos germinación de esporas in vitro .....	49
4.5. Análisis estadístico .....	49
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>50</b>
5.1. Ensayos <i>in vitro</i> : crecimiento en PDA.....	50
5.1.1. Crecimiento con A.E. citronela .....	51
5.1.2. Crecimiento con A.E. sándalo .....	63
5.1.3. Crecimiento con A.E. melisa .....	74

5.2.	Ensayos <b><i>in vivo</i></b> en materia vegetal: naranjas .....	79
5.2.1.	Valoración del daño en naranjas .....	79
5.3.	Ensayos <b><i>in vitro</i></b> : germinación de esporas en PDA.....	94
5.3.1	Valoración germinación con A.E. citronela, melisa y sándalo .....	94
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>99</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>100</b>

<b>Índice de Tablas:</b> .....	<b>Pág.</b>
Tabla 1: Partes de plantas donde se encuentran aceites esenciales .....	24
Tabla 2: Antimicrobianos utilizados en sistemas modelo a base de frutas .....	31
Tabla 3: Toxicidad en mamíferos de componentes de aceites esenciales .....	36
Tabla 4: Bioactividadesdel aceite esencial de Cymbopogon .....	38
Tabla 5: Aislados fúngicos utilizados en el estudio.....	45
Tabla 6: Resumen hongo/dosis aplicadas en placa PDA .....	46
Tabla 7: Resumen de las dosis efectivas de los A.E. ....	98

<b>Índice de Figuras:</b> .....	<b>Pág.</b>
Figura 1 y 2: Conidios <i>Alternaria spp</i> .....	11
Figura 3 y 4: <i>Alternaria</i> en tomate .....	12
Figura 5 y 6: Conidióforos <i>Botrytis cinerea</i> .....	14
Figura 7: Apotecio de <i>Botryotinia</i> .....	14
Figura 8: Botrytis en frambuesa .....	14
Figura 9 y 10: Conidióforos pincelados .....	16
Figura 11: Colonias de <i>Penicillium</i> .....	16
Figura 12 y 13: Conidióforos <i>Aspergillus niger</i> en tomate y cebolla .....	17
Figura 14 y 15: Hifas hialinas y conidióforos <i>Aspergillus</i> .....	18
Figura 16: Conidios <i>Fusarium</i> .....	19
Figura 17: Raíz de tomate afectada por <i>Fusarium oxysporum</i> .....	19
Figura 18: Destilación por arrastre de vapor .....	25
Figura 19: Hidrodestilación .....	25
Figura 20 y 21: Hifas y conidios sanos .....	35
Figura 22: Lisis celular .....	35
Figura 23: Hifas con degeneraciones morfológicas .....	35
Figura 24: Placas con medio PDA con tratamiento de A.E. ....	47
Figura 25: Tubos Falcon con solución de esporas .....	48
Figura 26: Naranjas inoculadas .....	48
Figura 27: Naranjas inoculadas con <i>Alternaria</i> y T30 Sándalo .....	48
Figura 28: Crioviales con esporas .....	49
Figura 29: Cultivo en PDA: <i>Botrytis</i> y <i>Aspergillus</i> con A.E. sándalo y citronela .....	50
Figura 30: Evolución semanal <i>Alternaria spp.</i> , con A.E. citronela .....	51
Figura 31: Crecimiento <i>Alternaria spp.</i> , con citronela in vitro .....	52
Figura 32: Crecimiento <i>Alternaria</i> con aceite de citronela .....	53
Figura 33: Evolución semanal <i>Aspergillus spp.</i> , con A.E. citronela .....	54
Figura 34: Crecimiento <i>Aspergillus spp.</i> , con citronela .....	55
Figura 35: Evolución semanal <i>Botrytis cinerea.</i> , con A.E. citronela .....	56
Figura 36: Crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> , con citronela in vitro .....	57
Figura 37: <i>Botrytis cinerea</i> en PDA con citronela .....	57
Figura 38: Evolución <i>Fusarium oxysporum</i> , con A.E. citronela .....	58
Figura 39: Crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i> , con citronela in vitro .....	59
Figura 40: Crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i> con citronela. ....	59
Figura 41: Evolución semanal <i>Penicillium spp.</i> , en placa frente a A.E. citronela .....	60
Figura 42: Crecimiento de <i>Penicillium spp.</i> , con citronela in vitro .....	61
Figura 43: Crecimiento de <i>Penicillium spp.</i> , con aceite de citronela. ....	61
Figura 44: Efecto de citronela sobre los hongos fitopatógenos .....	62
Figura 45: Evolución semanal <i>Alternaria spp.</i> , en placa con A.E. sándalo. ....	63
Figura 46: Crecimiento de <i>Alternaria spp.</i> , con sándalo in vitro .....	64
Figura 47: Crecimiento de <i>Alternaria spp.</i> , con aceite de sándalo. ....	64
Figura 48: Evolución semanal <i>Aspergillus spp.</i> , en placa con A.E. sándalo .....	65
Figura 49: Crecimiento de <i>Aspergillus spp.</i> , con sándalo in vitro .....	66
Figura 50: Crecimiento de <i>Aspergillus</i> frente a sándalo .....	66
Figura 51: Evolución semanal <i>Botrytis cinerea.</i> , en placa con A.E. sándalo .....	67
Figura 52: Crecimiento de <i>Botrytis cinerea.</i> , con sándalo in vitro. ....	68
Figura 53: Crecimiento de <i>Botrytis cinerea.</i> , con aceite de sándalo. ....	69
Figura 54: Evolución semanal <i>Fusarium oxysporum</i> en placa con A.E. sándalo .....	69
Figura 55: Evolución semanal <i>Fusarium oxysporum</i> frente a sándalo .....	69
Figura 56: Crecimiento <i>Fusarium oxysporum</i> , con sándalo in vitro. ....	70
Figura 57: Crecimiento de <i>Fusarium</i> en sándalo. ....	70
Figura 58: Evolución semanal <i>Penicillium spp.</i> , en placa con A.E. sándalo. ....	71
Figura 59: Crecimiento <i>Penicillium spp.</i> , con sándalo in vitro. ....	72

Figura 60: Crecimiento de <i>Penicillium</i> en sándalo.....	72
Figura 61: Efecto de sándalo sobre los hongos fitopatógenos .....	73
Figura 62: Evolución semanal <i>Alternaria spp.</i> , en placa con A.E. melisa.....	74
Figura 63: Crecimiento <i>Alternaria spp.</i> , con melisa in vitro. ....	75
Figura 64: Evolución semanal <i>Aspergillus spp.</i> , en placa con A.E. melisa. ....	75
Figura 65: Evolución semanal <i>Botrytis cinerea.</i> , en placa con A.E. melisa. ....	76
Figura 66: Evolución semanal <i>Fusarium oxysporum</i> , en placa con A.E. melisa. ....	76
Figura 67: Evolución semanal <i>Penicillium spp.</i> , en placa con A.E. melisa.....	77
Figura 68: Efecto A.E. de melisa sobre los hongos fitopatógenos.....	77
Figura 69: Evolución semanal <i>Alternaria spp.</i> , con citronela .....	79
Figura 70: Evolución semanal <i>Alternaria spp.</i> , frente a melisa. ....	80
Figura 71: Evolución semanal <i>Alternaria spp.</i> , frente a sándalo. ....	80
Figura 72: Valores medios de lesión en naranjas por <i>Alternaria spp.</i> .....	81
Figura 73: Evolución semanal <i>Aspergillus spp.</i> , frente a citronela.....	82
Figura 74: Evolución semanal <i>Aspergillus spp.</i> , frente a melisa. ....	82
Figura 75: Evolución semanal <i>Aspergillus spp.</i> , frente a sándalo.....	83
Figura 76: Valores medios de lesión en naranjas por <i>Aspergillus spp.</i> .....	84
Figura 77: Evolución semanal <i>Botrytis cinerea.</i> , frente a citronela.....	84
Figura 78: Evolución semanal <i>Botrytis cinerea.</i> , frente a melisa.....	85
Figura 79: Evolución semanal <i>Botrytis cinerea</i> , frente a sándalo. ....	85
Figura 80: Valores medios de lesión en naranjas por <i>Botrytis cinerea</i> .....	86
Figura 81: Evolución semanal <i>Fusarium oxysporum</i> , frente citronela.....	87
Figura 82: Evolución semanal <i>Fusarium oxysporum</i> , frente a melisa. ....	88
Figura 83: Evolución semanal <i>Fusarium oxysporum</i> , frente a sándalo.....	88
Figura 84: Valores medios de lesión en naranjas por <i>Fusarium oxysporum</i> .....	89
Figura 85: Evolución semanal <i>Penicillium spp.</i> , frente a citronela. ....	90
Figura 86: Evolución semanal <i>Penicillium spp.</i> , frente a melisa.....	91
Figura 87: Evolución semanal <i>Penicillium spp.</i> , frente a sándalo .....	91
Figura 88: Valores medios de lesión en naranjas por <i>Fusarium oxysporum</i> .....	92
Figura 89: Porcentaje de germinación de esporas de <i>Alternaria spp.</i> .....	94
Figura 90: Porcentaje de germinación de esporas de <i>Aspergillus spp.</i> .....	95
Figura 91: Porcentaje de germinación de esporas de <i>Botrytis cinerea</i> .....	96
Figura 92: Porcentaje de germinación de esporas de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	96
Figura 93: Porcentaje de germinación de esporas de <i>Penicillium spp.</i> .....	97

## 1. RESUMEN:

Debido a todos los los problemas de salud pública y repercusiones medioambientales generados por el uso de agroquímicos durante todo el desarrollo del cultivo, y a la adición de conservantes químicos a los productos alimenticios, se necesita el desarrollo de productos naturales altamente eficaces en el control biológico de enfermedades en vegetales, frutas y producto seco (grano), que no provoquen efectos secundarios en los seres vivos, ni en el entorno, que garanticen la seguridad alimentaria y que provengan de fuentes renovables como son las plantas.

Los aceites esenciales son sustancias naturales que contienen los vegetales, con fuerte bioactividad debido a los componentes aromáticos que continen y que les proporcionan diversas y variadas funciones como atraer (polinizadores) o repeler insectos, protegerse del calor o el frío, incluyendo la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos como bacterias, virus y fúngicos vegetales.

En este trabajo se decidió probar la actividad antifúngica de tres aceites esenciales siendo estos citronela, melisa y sándalo, contra cinco hongos descomponedores de los alimentos como son *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Penicillium* como posible herramienta de control biológico en postcosecha.

Para ello se realizaron pruebas in vitro donde se probó la capacidad de los aceites esenciales para reducir el crecimiento micelial en medio artificial PDA y los resultados fueron positivos para citronela y sándalo a partir de dosis de 300 ppm o 1500 ppm, mientras que el aceite esencial de melisa solo funcionó frente a *Alternaria* a partir de 1500 ppm.

Las pruebas realizadas en naranjas no fueron concluyentes, no se pudo demostrar su eficacia como protectores postcosecha, aunque si hubo algún leve efecto inhibitorio con aceite de sándalo en *Botrytis cinerea* y *Penicillium*. Se debe seguir trabajando en el método de aplicación y en el establecimiento de un protocolo común generalista a seguir, para posteriores comparaciones entre trabajos.

Respecto a la capacidad germinativa de las esporas y por ende, la capacidad natural de infectar nuevas plantas, nuevos frutos, también se ve reducida por el efecto de los aceites esenciales principalmente con *Penicillium*.

La novedad de este trabajo ha sido utilizar aceite esencial de sándalo y observarlo por primera vez frente a patógenos descomponedores de alimentos, tanto in vitro, en placa PDA, como en naranjas, siendo el único aceite de los tres ensayados que presentó un control efectivo en *Botrytis cinerea* y *Penicillium* en postcosecha. Se deben hacer ensayos sobre la bioactividad de este aceite en los microorganismos vegetales ya que no hay bibliografía disponible al respecto y los resultados preliminares obtenidos con fúngicos son muy alentadores.

Los aceites esenciales de citronela, melisa y sándalo presentan posibilidades como compuestos bioactivos para el control eficiente de patógenos fúngicos vegetales.

Se pretende con este estudio, apoyar, contribuir con los datos obtenidos, al uso de sustancias naturales como protectores alimentarios y conservadores de productos perecederos o almacenados contra los hongos necrotrofos como una herramienta eficaz y sostenible, contribuyendo con ella a un beneficio ecosistémico

## 2. INTRODUCCIÓN:

En agricultura, los hongos fitopatógenos entre otros microorganismos patológicos, son causantes de enfermedades pre y postcosecha en cultivos de cereales, leguminosas, hortalizas y frutas principalmente, siendo responsables de cuantiosas pérdidas económicas a lo largo de todo el proceso productivo, impactando en la disponibilidad de alimentos, en la seguridad alimentaria debido a la producción y acumulación de micotoxinas, en la calidad de vida de los productores y en el medio ambiente, entre otros.

Los hongos más comunes causantes del deterioro y pudrición en los productos frescos y almacenados, como frutas y hortalizas, pertenecen a las especies *Alternaria*, *Botrytis*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Phomopsis*, *Rhizopus* y *Mucor* (FHIA, 2007), debido a su carácter necrotrófico y a que los frutos recién cosechados o almacenados, donde ellos esperan quiescentes o activos, contienen el medio nutritivo idóneo y las condiciones necesarias (temperatura, humedad), para desarrollarse y esporular.

Aunque en la actualidad se cuenta con herramientas “químicas efectivas” para combatirlos, (fungicidas sintéticos), su uso y aplicación, apareja numerosos problemas medioambientales y de salud pública, debido a su elevada toxicidad, a sus largos periodos de degradación, al continuo envenenamiento por restos de residuos en la comida, en el agua, en el aire, por su acumulación en la cadena trófica, por el desarrollo de nuevas razas de resistencia más virulentas y por su afección a la fauna auxiliar, sin contar que no provienen de fuentes renovables y que su producción acrecienta el efecto invernadero.

El Real Decreto 1311/2012, por el que se establece el uso sostenible de los productos fitosanitarios, indica que los métodos biológicos deben primar sobre otras alternativas químicas y por esta razón se trabaja en esta línea de investigación como una aproximación al desarrollo de productos potencialmente aplicables en control biológico.

Por todos estos problemas generados y desencadenados por el uso de plaguicidas de síntesis, se necesita indiscutiblemente el desarrollo de otro tipo de formulaciones no dañinas y efectivas para el control de enfermedades en los cultivos y en la conservación de materias primas frescas/almacenadas, siendo éstas respetuosas con el medioambiente, con los seres vivos y que su síntesis provenga de fuentes renovables.

Se debe tener muy en cuenta como factores determinantes de la salud del cultivo y calidad del producto final, las labores de manejo realizadas, la observación continua durante su desarrollo fisiológico (evitando posibles fisiopatías por mala nutrición con lo que se minimizarán los posibles daños por plagas y enfermedades), perfeccionar las actividades postcosecha (recogida del fruto en condiciones climáticas adecuadas), su correcto procesamiento, su embalaje, y las condiciones de transporte requeridas hasta el punto de venta o depósito.

La FAO (2015), calculó que cada año se pierden y se desperdician globalmente alimentos de primera necesidad en porcentajes elevadísimos: alrededor de un 30% de la producción total de cereales y un 40–50% de la producción de tubérculos, frutas y hortalizas frescas, debido a enfermedades y al pésimo manejo postcosecha, tanto en países en vías de desarrollo como en los ya desarrollados.

El uso de plantas como medio de conservación de alimentos y de curación se inicia en la Prehistoria. Los Neandertales, 60.000 años atrás, utilizaban la *malvaloca* como hierba curativa. En la Biblia, se hace mención a plantas como la mirra y el incienso, de las que ya se tenía consciencia de sus virtudes antisépticas, (Cowan, 1999).

Desde el inicio de las civilizaciones, los egipcios, persas, griegos, romanos, utilizaban las plantas para alimentarse, curar, conservar y proteger los alimentos. Los romanos, para conservar su vino, utilizaban aceite de semillas de mostaza para prevenir el desarrollo y fermentaciones no deseadas de levaduras, y mantener en un estado idóneo los vinos terminados, (Hammer, Carson & Riley, 1999). Por ello, partes de plantas, extractos, fermentaciones y aceites esenciales de éstas, han sido utilizados por el hombre desde hace miles de años como agentes terapéuticos, como perfumes, cosméticos, como materia prima para rituales religioso-espirituales y como conservadores/protectores de alimentos principalmente.

Las moléculas responsables de todos estos beneficios, son especies moleculares de muy diversa composición química denominados metabolitos secundarios, producidos endógenamente con infinidad de propiedades, siendo parte del mecanismo de defensa generado y desencadenado en la planta para protegerse del ataque de sus depredadores, ya que son organismos sésiles y necesitan herramientas eficientes, muy específicas y precisas para defenderse.

Entonces... ¿Por qué no fijarse y utilizar estas sustancias creadas y usadas por ellas mismas como herramienta eficiente para combatir y controlar a sus predadores ya que son ellas las que llevan co-evolucionando con los hongos desde hace miles de años?

Son ellas quién mejor los conoce...

*"Que el alimento sea tu medicina, que tu medicina sea el alimento"... Hipócrates.*

## **2.1. Generalidades de los hongos**

Los hongos son organismos eucariotas, carentes de cloroplastos y heterótrofos, con paredes de quitina que almacenan glucógeno en sus células como compuesto de reserva. Se han descrito unas 80.000 especies pero se estima que el número real supere el millón. Los hongos no ingieren la materia elaborada y la digieren en sus cuerpos, sino que segregan enzimas al medio exterior que la transforman en moléculas más pequeñas y éstas son absorbidas por su pared celular como resultado de una digestión externa, (Luztoni et al., 2004).

Los hongos se clasifican por su modo de nutrición en función de la relación que establece con su célula hospedera en varios tipos:

- **Saprótrofos**: hongos que obtienen nutrientes a partir de materia orgánica muerta o en descomposición.
- **Biotrófos**: hongos que mantienen una relación muy específica y estrecha con la planta hospedera de la que se alimenta, desplegando complejas y co-evolucionadas estrategias para explotar a sus anfitriones, siempre manteniéndolos vivos para completar su ciclo de vida. Generalmente los hongos biotrofos segregan compuestos químicos que modifican la permeabilidad de las membranas celulares de los hospederos provocando la salida de azúcares o aminoácidos que son absorbidos por el hongo.
- **Simbiontes**: hongos del suelo (ecto-endomicorrizas y líquenes) que se asocian con células de las raíces de la planta. El hongo le proporciona minerales no disponibles o accesibles para ellas entre otros muchos beneficios como protección de defensa contra microorganismos patógenos, mientras que la planta le provee de materia orgánica ya elaborada.
- **Oportunistas/Necrótrofos**: hongos que se alimentan del contenido intracelular de la célula hospedera destruyéndola por completo gracias a la secreción de

factores o sustancias específicas de patogenicidad y virulencia como toxinas, enzimas de degradación de pared celular u otro tipo de enzimas extracelulares, produciendo una infección primaria con resultado tejido necrosado (Alfano & Collmer, 1996). Si el hospedero falla en delimitar y contener esa necrosis inicial mediante su respuesta de defensa, la enfermedad se desarrollará por toda la planta hasta morir. El ciclo de la infección comprende los estados de deposición del conidio, germinación, penetración en el hospedero, formación de la primera lesión, expansión de ésta y ablandamiento de los tejidos seguido de esporulación.

Los patógenos necrotrofos varían desde los que son muy específicos y que infectan sólo a una especie de planta o a un número limitado de especies relacionadas, hasta los que son capaces de infectar y causar enfermedad en cientos de ellas. Son varias familias de hongos necrotrofos los que causan las principales enfermedades en pre y postcosecha en numerosos cultivos de importancia agronómica provocando pérdidas económicas significativas. Entre los géneros necrotrofos más importantes en el deterioro de los alimentos frescos se encuentran la que se estudian en el presente trabajo: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Fusarium* y *Penicillium*.

### 2.1.1. Alternaria:

*Alternaria* es un género fúngico muy común, donde se incluyen numerosas especies patógenas y saprofitas ampliamente distribuidas en el suelo y en la materia orgánica en descomposición. Se clasifica en la División Eumycota, Subdivisión Deuteromycotina, Orden Moniliales. Como saprofito, *Alternaria* spp., persiste en forma de micelio durante los inviernos, y bajo condiciones adecuadas de humedad y temperatura produce abundantes conidios. Los conidios de *Alternaria* que colonizan las plantas, germinan e infectan las hojas, tallos o frutos, donde provocan lesiones de diversa consideración según la intensidad de la infección.

El género *Alternaria* fue descrito por Nees en 1817, con *A. alternata* (originariamente *A. tenuis*) como especie tipo. Debido a la ausencia de un ciclo de reproducción sexual, este género se clasificó dentro del filo de hongos imperfectos o mitospóricos. *Alternaria* spp., se caracteriza por la producción de conidióforos simples y erectos, en cuyo extremo se forman cadenas simples o ramificadas de conidios (Figura 1 y 2). Los conidios son multicelulares, de color pardo y con septos tanto transversales como longitudinales, permitiendo estas características una fácil identificación morfológica a nivel de género, (Pavón, 2013, en Arroyo, 2015).



Figura 1 y 2: Conidios de *Alternaria* spp (400 x). (Cruz et al., 2016)

Se han identificado alrededor de 300 especies en el género *Alternaria*, que se clasifican en grandes grupos atendiendo a las características de los conidios, (Pavón, 2013, en Arroyo, 2015).

1. Conidios grandes: en este grupo se incluyen especies productoras de conidios alargados, generalmente solitarios, caracterizados por la presencia de un apéndice terminal de tamaño heterogéneo, en ocasiones ramificado y/o filamentoso. En este grupo se engloban especies como *A. cucumerina*, *A. brassicae*, *A. dauci*, *A. limicola*, *A. macrospora*, *A. porri*, *A. solani* y *A. sonchi*.
2. Conidios pequeños: en este grupo se incluyen especies productoras de conidios esféricos, ovoides o elipsoides, sin apéndices terminales, solitarios o formando cadenas (simples o ramificadas). La identificación morfológica de este grupo, basada en la formación de los conidios, es muy compleja. Por este motivo, para facilitar la identificación, las especies de *Alternaria* se han clasificado en cinco grandes grupos atendiendo a su modelo de esporulación: *A. radicina*, *A. tenuissima*, *A. alternata*, *A. arborescens* y *A. infectoria*.

El hongo sobrevive en el suelo, en residuos de cultivos infestados, en malezas y en las semillas, dispersándose con la ayuda del viento, agua, insectos, trabajadores y maquinaria agrícola.

Las esporas pueden penetrar las hojas, tallos o frutos. El hongo es más activo cuando se dan temperaturas moderadas o calientes y el ambiente está húmedo. En las hojas se presentan pequeñas manchas circulares de color café frecuentemente rodeadas de un halo amarillo. Estas suelen presentar un aspecto característico de anillos concéntricos de color oscuro. Normalmente las manchas aparecen en las hojas más viejas y desde ahí la lesión asciende al resto de la planta y a medida que la enfermedad progresa, el hongo puede atacar a los tallos y a las frutas (Figura 3 y 4).



**Figura 3 y 4:** *Alternaria* en tomate (fruto y hoja).  
(<http://nexciencia.exactas.uba.ar/hongos-toxicogenicos>)

Las manchas en las frutas son similares a las de las hojas con color café y anillos concéntricos oscuros. En los anillos concéntricos se producen esporas pulverulentas y oscuras (Pavón, 2013, en Arroyo, 2015). Este hongo también puede ahogar a las plántulas en semillero causando el llamado mal del talluelo (damping-off).

Entre los cultivos más susceptibles a este hongo están el tomate, patata, berenjena, pimiento y otras plantas de la familia solanáceas, así como también plantas de la familia de las cucurbitáceas como el pepino, sandía, melón, calabaza y calabacín.

Uno de los problemas alimentarios a tener en cuenta con *Alternaria* es que productora de micotoxinas. Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos y secretados durante el proceso de degradación de la materia orgánica y como mecanismo de defensa frente a otros microorganismos. Las principales micotoxinas de *Alternaria* son de carácter genotóxico como alternariol y alternariol-monometiléter (se las considera de riesgo para el hombre) y no genotóxicas como tentoxin y ácido tenuazonico (pueden provocar problemas en el ganado). Esta contaminación es frecuente principalmente en trigo, sorgo y cebada así como semillas oleaginosas como pipas de girasol, así como las frutas y vegetales antes mencionados (**Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2011**).

### **2.1.2. *Botrytis cinerea* (telemorfo: *Botryotinia fuckeliana*)**

División Eumycota, Subdivisión Ascomycotina, Clase Discomycetes.

*Botrytis cinerea* Pers.Fr. es un hongo filamentoso responsable de la enfermedad conocida como podredumbre gris. La enfermedad ha recibido este nombre por el aspecto aterciopelado y la coloración grisácea que adquieren los tejidos a los que afecta y sobre los cuales esporula abundantemente (Santander, 2014, en Arroyo, 2015).

Es un hongo que puede vivir como saprofito sobre tejidos muertos pero también tiene un carácter polífago sobre plantas vivas. Se sabe que infecta a más de 200 especies de plantas y es considerado un organismo necrotrofo "modelo" (Van Kan, 2006 en Arroyo, 2015), es decir que primero mata a las células de la planta huésped para luego colonizar el tejido muerto.

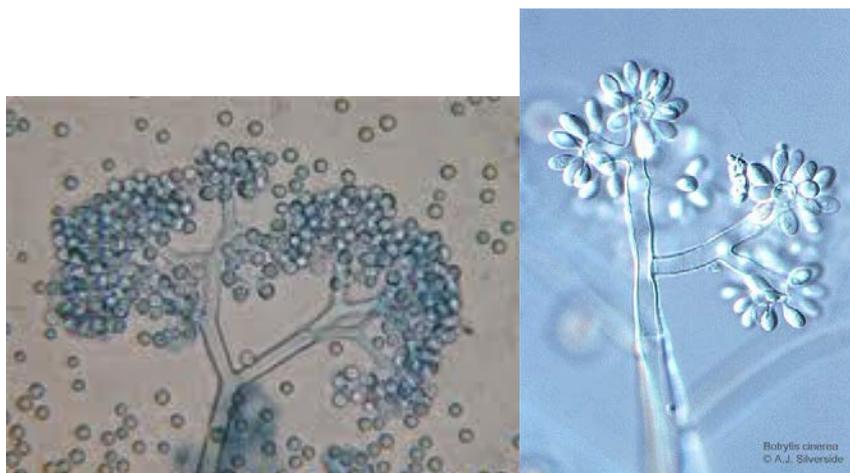
Dentro del amplísimo rango de especies a las cuales *B. cinerea* infecta, encontramos cultivos de dicotiledóneas (hortícolas, frutales y plantas ornamentales) de gran interés económico a nivel mundial, donde *B. cinerea* ha sido considerado el segundo hongo fitopatógeno más importante en la patología molecular de plantas (Dean et al., 2012 en Arroyo, 2015).

Los cultivos que son afectados por *Botrytis* son muy diversos, desde productos hortícolas como pimiento, calabacín, berenjena, lechuga, a frutícolas como fresa, frambuesa, arándano, pera, a plantas ornamentales.

*B. cinerea* es un hongo complicado de controlar ya que posee una amplia variedad de factores y mecanismos de patogenicidad que le permiten atacar a la planta huésped de formas diferentes. Por otra parte, pudiendo infectar a tantos huéspedes diferentes, las fuentes de inóculo pueden ser muy diversas.

Sobrevive tanto en estadio de espora, como de micelio, como en forma de esclerocios, en restos de cultivos por largos periodos de tiempo. Puede desarrollarse en casi todos los climas, por lo cual es considerado un hongo ubicuo en todos los ambientes (Santander, 2014, en Arroyo, 2015).

*B. cinerea* fue descrito por Anton de Bary en 1886 y clasificado como ascomiceto debido a que exhibe la estructura típica descrita para este taxón. Los conidióforos (Figura 5 y 6) miden de 1 a 3 mm de largo y se dividen en numerosas ramas para terminar en una célula apical alargada donde se producen los conidios, estructuras con forma redondeada pero ligeramente elíptica que presentan un cuello corto y miden 10x8,5 µm (Pezel & Pont, 1990; Santander, 2014, en Arroyo, 2015). El micelio que se forma es de color marrón grisáceo.



**Figura 5 y 6:** Conidióforos ramificados de *Botrytis cinerea*. (A.J. Silverside, 2008)

Los esclerocios (órganos de resistencia duros), son estructuras que se forman a partir de micelio en condiciones ambientales o climáticas desfavorables. Tienen forma discoidal o esférica y son estructuras melanizadas de color negro formada por hifas fuertemente entrelazadas que pueden medir entre 2-4 ×1-3 mm. Son generalmente consideradas como un medio fundamental para la supervivencia de *B. cinérea* (Santander, 2014, en Arroyo, 2015).

La capacidad de *B. cinerea* para infectar diferentes tipos de plantas y tejidos bajo diversas condiciones ambientales, así como su habilidad para sobrevivir en el suelo durante mucho tiempo mediante la formación de esclerocios, contribuyen a su amplia y persistente presencia en la naturaleza. El hongo libera conidios con facilidad en condiciones de humedad favorable y éstos son dispersados por corrientes de viento.

*B. cinerea* es un hongo cuyo ciclo de vida posee dos fases: una sexual, representada por el teleomorfo *Botryotinia fuckeliana* y cuya presencia en la mayoría de los cultivos ha sido muy raramente reportada, en la que presenta ascas formadas por un apotecio (Figura 7) y se la encuentra invernando en el suelo en forma de esclerocio o micelio sobre restos vegetales, y una fase asexual que es la que se manifiesta en la naturaleza generalmente y que es la que se utiliza de manera regular en los experimentos de laboratorio.



**Figura 7:** Apotecio de *Botryotinia* (anam. *Botrytis cinera*)

**Figura 8:** *Botrytis* en frambuesa. (<http://fitoagro.blogspot.com/2015/09/fitopatologia-general-estructuras.html>)

Comúnmente, el ciclo de infección de *B. cinerea* sobre la planta huésped comienza cuando los conidios alcanzan su superficie. Si las condiciones son las adecuadas, éstos germinan adhiriéndose fuertemente a la superficie de las células vegetales mediante apresorios (Santander, 2014 en Arroyo, 2015).

El control del hongo *B. cinerea* es una tarea difícil por diversas razones entre las que se pueden mencionar la gran variedad de modos de ataque, el gran número de huéspedes que puede infectar y su enorme capacidad para sobrevivir y dispersarse eficientemente en forma de micelio, conidio o esclerocio (caso de que las condiciones climáticas no sean óptimas para su desarrollo).

Hasta el momento las estrategias utilizadas para el control de la podredumbre gris se pueden agrupar en cinco categorías: control químico, control biológico, prácticas y métodos culturales, métodos de estimulación de las respuestas de defensa de la planta y la mejora genética de resistencia a la enfermedad aunque el control químico es el más estudiado y aplicado en los cultivos de mayor importancia económica.

### **2.1.3. *Penicillium***

División Eumycota, Subdivisión Deuteromycota, Orden Moniliales

Patógeno que vive como saprofito en la naturaleza. Es un género de hongos conocidos como mohos verdes o azules, de los que en determinadas especies, se obtiene la penicilina. El micelio del hongo se desarrolla rápidamente, creciendo en la superficie de las frutas, pan, quesos y otros alimentos y produciendo gran cantidad de esporas. Mediante reproducción asexual, *Penicillium* forma conidios en el extremo de las hifas especializadas (conidióforos). Éstos son ramificados en forma de pincel donde nacen conidios lisos, elipsoidales (de 2,5-4 µm) azules o verde-azulados en cadenas, sin ramificar, como un penacho o pincel característico (Figura 9 y 10). Las colonias son de crecimiento rápido, vellosas, aterciopeladas, verdosas con una corona radial ancha y blanca (Figura 11).

Las esporas de pequeño tamaño son fácilmente dispersadas por el aire y constituyen una de las más frecuentes y mayores fuentes de contaminación para todo tipo de frutos. La mayoría de las veces la contaminación es postcosecha y son los mayores descomponedores de los frutos durante su transporte, almacenamiento y en el mercado. El patógeno aprovecha las aberturas naturales o heridas para la penetración siendo la forma frecuente de propagación por contacto con frutos infectados. Factores como la humedad en la recolección, la tardanza en el enfriamiento y sobre todo daños mecánicos en la manipulación, favorecen el desarrollo de este hongo.

Las pudriciones de *Penicillium* son en un principio de aspecto acuoso (pudiendo contener alguna gota de exudado sobre la superficie de la colonia), blandas y ligeramente descoloridas, se desarrollan hacia el interior con rapidez y contienen un olor aromático, especiado o afrutado como, por ejemplo, a manzana o a piña.

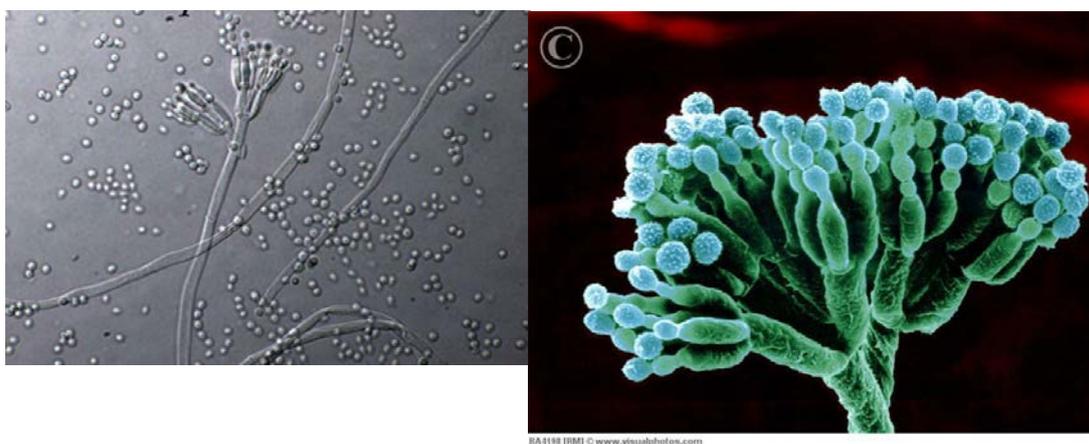
La fácil proliferación de *Penicillium* en alimentos es un serio problema ya que algunas especies producen micotoxinas (patulina, citrinina, ocratoxina A, citreoviridina, griseofulvina,...) y pueden hacer al alimento no comestible e incluso peligroso debido a que éstas no se eliminan deshaciéndose de la parte afectada o podrida del alimento. No se eliminan ni siquiera mediante altas temperaturas (cocción), por lo que es una buena práctica desechar los alimentos que contienen el desarrollo de este tipo de moho.

*Penicillium* también es un agente alergénico al igual que *Aspergillus* y no muestra una notable variación estacional. Las máximas concentraciones de conidios en el aire se alcanzan en invierno y primavera (mayores en las áreas urbanas que en las rurales). Su temperatura óptima de crecimiento es de 23 C°, aunque crece bien entre 5 y 37 C°.

Es un género ubicuo, siendo comúnmente el género de hongos más abundante en los suelos por lo que está presente de forma natural en hortalizas, frutas y en cualquier época del año se puede producir la infección. Algunas especies de *Penicillium* producen etileno que acelera la maduración del fruto y desencadena el desarrollo de otros que están en estado de quiescencia.

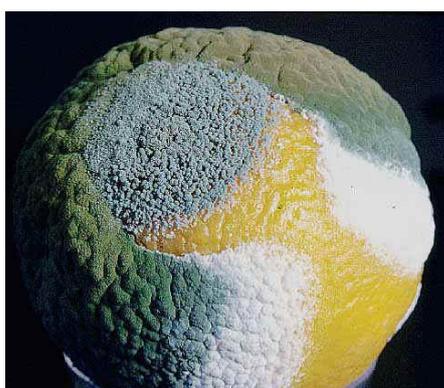
La utilización de productos químicos de síntesis es el sistema más usado para su control, pero actualmente cada vez son mayores las objeciones de orden higiénicosanitarias que éstos plantean cuando son aplicados en las frutas y verduras.

(Departamento de Protección Vegetal, Universidad de la República de Uruguay, recurso web).



**Figura 9 y 10:** Conidióforos pincelados.

(<http://www.tecnicoagricola.es/penicillium-digitatum-moho-verde-y-penicillium-italicum-moho-azul/>)



**Figura 11:** Colonias de *Penicillium spp.*

(<http://www.tecnicoagricola.es/penicillium-digitatum-moho-verde-y-penicillium-italicum-moho-azul/>)

#### 2.1.4. Aspergillus

*Aspergillus* es un hongo filamentoso hialino, saprofito, perteneciente a la subdivisión Ascomycotina.

Crece en cualquier tipo de sustrato, especialmente en suelos y materiales en descomposición siendo termotolerante ya que puede vivir entre los 12°C y los 57°C.

Se encuentra formado por hifas hialinas septadas (Figuras 14 y 15) y puede tener reproducción sexual (con formación de ascosporas en el interior de ascas) aunque lo habitual es que se multiplique de forma asexual (conidios).

Las especies se diferencian morfológicamente en tamaño, crecimiento, textura y color de la colonia: amarillo-verdoso, negro o marrón. La coloración aparece casi siempre en todas las estructuras aéreas, tanto en el micelio como en las cabezas conidiales. (Arroyo, 2015)

La especie *A. flavus* es de color verde-amarillo. La textura de las colonias es pulverulenta con surcos radiales, rugosas o granuladas, ocasionalmente algodonosas en el centro o margen de la colonia. El reverso de la colonia es incoloro.

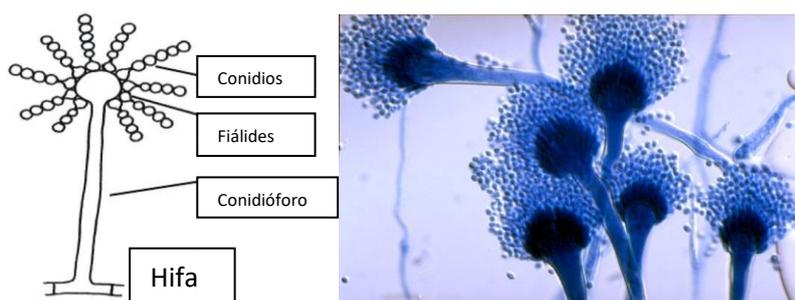
La especie *A. niger* presenta el color de las colonias de blanco a amarillo y evoluciona al madurar hacia el negro. La textura de las colonias es granular y el reverso de la colonia es incoloro o crema.

*Aspergillus* es junto a *Penicillium* uno de los principales hongos productores de micotoxinas en los alimentos entre las que se encuentran algunas de las más peligrosas como las aflatoxinas y ocratoxina A. Asimismo, es frecuentemente alérgico y aparece como contaminante habitual de los conductos de climatización/ventilación, penetrando en el organismo por vía respiratoria por medio de esporas o conidios que se encuentran presentes en el ambiente de trabajo en forma de bioaerosoles siendo productores de patologías graves respiratorias. (Ministerio de Salud de Perú, 2010 en Arroyo, 2015).

Los cultivos susceptibles a este tipo de hongos son muy variados, yendo desde hortícolas (Figuras 12 y 13), a frutas y pasando por todo tipo de productos almacenados como granos de cereales y leguminosas, cacahuets, semillas de algodón, harinas de pescado, nueces de Brasil y copra.



**Figura 12 y 13:** Conidióforos de *Aspergillus niger* en tomate y cebolla (<http://lavozdelauci.blogspot.com/2013/04/dia-12-aspergillus.html>)



**Figura 14 y 15:** Hifas hialinas y conidióforos de *Aspergillus* (<http://lavozdelauci.blogspot.com/2013/04/dia-12-aspergillus.html>)

### 2.1.5. *Fusarium*

Hongo clasificado en la División Eumycota, Subdivisión Deuteromycotina y Orden Moliniales. Las especies con estado teleomorfo se clasifican por su fase sexual en la Subdivisión Ascomycotina.

El patógeno produce abundante micelio de aspecto algodonoso de color variable entre amarillento y rosado dependiendo de especies. Los conidióforos pueden ser cortos como *F. oxysporum*, largos y ramificados como *F. solani* y las esporas (Figura 16) pueden ser microconidios, macroconidios (multicelulares y alargados) o clamidosporas (forma de resistencia). En ocasiones los conidios forman cadenas como en *F. verticillioides* (antes *F. moniliforme*).

Los conidios son dispersados por el aire y el agua pero la contaminación por *Fusarium* se produce en general, en el campo antes o durante la cosecha, aunque la infección se desarrolle durante el almacenamiento. Algunas especies causan marchitamiento vascular; pudrición de raíz (Figura 17b), corona, tallo, fruto, y semillas; damping-off. Los tejidos afectados por la descomposición aparecen húmedos y presentan un color claro que va oscureciéndose y secándose. Conforme se extiende la infección, se producen grietas y en ésta, se observan masas algodonosas de color blanco, rosa o amarillo.

Es un hongo productor de micotoxinas (zearalenona, deoxinivalenol, tricotecenos, fumonisina), pudiendo afectar al tracto intestinal, producir desequilibrios hormonales, tumores, infertilidad, infecciones cutáneas y en las córneas, alergias tanto en humanos como en el ganado. Son de especial relevancia aquellas asociadas a la contaminación de grano destinado a alimentación animal.

Los factores que favorecen aparición de la enfermedad son suelos con mal drenaje ya que favorecen la supervivencia y distribución del inóculo, suelos compactados, períodos de estrés hídrico, falta de nitrógeno (debilita las plantas y las predispone a la enfermedad) y la acidificación de los suelos.

*Fusarium oxysporum* Schlechtend. Fr, es una especie que sólo presenta su forma anamórfica (asexual). La enfermedad específica de *F. oxysporum* se produce cuando coloniza los conductos xilemáticos de la planta, bloqueando y tapando los vasos, lo que determina la aparición de síntomas de marchitamiento de hoja, amarilleo y posteriormente necrosis y muerte total de la misma. Aunque *F. oxysporum* tiene un amplio rango de hospedadores, las estirpes individuales son parásitos especializados de un número limitado de especies hospedadoras y esto ha sido usado para subdividir a esta especie en grupos de patógenos específicos, designados como formas especiales (Alves-Santos, 1999).

Por otro lado todas las estirpes pueden actuar como oportunistas si las condiciones para ello son muy favorables dando lugar a pudriciones inespecíficas en frutos y verduras y en ocasiones en podredumbre radicular asociadas a otros hongos y oomicetos necrótrofos como *F. solani*, *F. verticillioides*, *Rhizoctonia*, *Pythium* y *Phytophthora* (Arroyo, 2015).

Se encuentra ampliamente distribuido por todo el mundo y es una especie que se adapta a cualquier tipo de suelo. En ausencia del huésped durante períodos largos y al tratarse de un saprófito facultativo, puede desarrollarse sobre materia orgánica. En condiciones adversas, forma estructuras (clamidosporas) que le permiten resistir los períodos de sequedad, frío o falta de alimento. Esta capacidad hace que pueda cultivarse fácilmente en el laboratorio en medios artificiales donde crece rápidamente.



**Figura 16:** Conidios de *Fusarium*

(<https://www.alamy.com/computer-illustration-of-conidia-asexual-spores-from-a-fusarium-sp-fungus-some-fusarium-fungi-are-pathogens-of-plants-and-humans-image282107889.html>)

**Figura 17:** Raíz de tomate afectada por *Fusarium oxysporum* (a: sana, b: enferma)

(<http://www.canna.es/fusarium-plagas-enfermedades>)

## **2.2. Generalidades de los aceites esenciales:**

Los aceites esenciales son compuestos característicos de las plantas de carácter generalmente lipídico con fuertes componentes aromáticos que proporcionan un olor, color y un sabor distintivo de la planta de la que proceden. Los aceites esenciales se encuentran principalmente en las plantas aromáticas, las cuales se distribuyen a lo largo del Mediterráneo, sur de Asia y en países tropicales de todo el mundo.

Se encuentran ampliamente presentes en unas 60 familias de plantas que incluyen las Compuestas, Labiadas, Lauráceas, Mirtáceas, Pináceas, Rosáceas, Rutáceas, Umbelíferas, etc. La familia de las Lamiáceas que comprende unos 245 géneros y alrededor de 7.900 especies taxonómicamente admitidas, es bien conocida por sus propiedades medicinales siendo utilizadas desde tiempos remotos con este fin. Tienen asimismo, una larga historia como especias culinarias como el orégano, romero, salvia y el tomillo, que son condimentos típicos de la zona mediterránea, siendo especialmente el orégano y el tomillo, los se consumen en grandes cantidades en todo el mundo como parte de mezcla de condimentos y sazónadores.

Su utilización también viene siendo conocida desde tiempos antiguos como protectores de materias primas almacenadas y su aplicación en perfumería y en cosmética se remonta a la civilización egipcia.

Los aceites esenciales de estas plantas, se encuentran en los pelos glandulares o en las cavidades secretoras de la pared de la célula vegetal, y están presentes en forma de gotitas de líquido en las hojas, los tallos, la corteza, las flores, las raíces y en los frutos de la planta. Su abundancia en las partes de la planta varía según la especie, por ejemplo: en las hojas (ajenjo, albahaca, buchú, cidrón, eucalipto, hierbabuena, limoncillo, mejorana, menta, pachulí, quenopodio, romero, salvia, toronjil, etc.), en las raíces (angélica, asaro, azafrán, cálamo, cúrcuma, galanga, jengibre, sándalo, sasafrás, valeriana, vetiver, etc.), en el pericarpio del fruto (limón, mandarina, naranja, etc.), en las semillas (anís, cardamomo, eneldo, hinojo, comino, etc.), en el tallo (canela, etc.), en las flores (arnica, lavanda, manzanilla, piretro, tomillo, clavo de olor, rosa, etc.) y en los frutos (alcaravea, cilantro, laurel, nuez moscada, perejil, pimienta, etc.).

Las características aromáticas de los aceites esenciales proporcionan varias y muy diversas funciones, incluyendo atraer (polinizadores) o repeler insectos, protegerse del calor o el frío, como material de defensa contra predadores como insectos (acciones insecticidas de contacto, antialimentarias, repelentes, disuasorios de oviposición, reguladores del crecimiento) y nematodos, inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos como bacterias, virus y fúngicos vegetales, expresado como actividad antimicrobiana, o actuando como agentes bacteriostáticos o antifúngicos, como reflejan numerosos estudios científicos realizados tanto in vitro como in vivo en varias partes del mundo. Otra propiedad funcional de éstos es la de actuar como antioxidantes, retrasando o inhibiendo la oxidación de aceites y lípidos en general, como ocurre con el romero, tomillo y salvia (Hirasa & Takemasa, 2002).

Los aceites esenciales se clasifican en base a diferentes criterios como consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios:

- De acuerdo a su consistencia los aceites esenciales se clasifican en esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas. Las esencias fluidas son líquidos volátiles a temperatura ambiente (aceites esenciales). Los bálsamos son de consistencia más espesa, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización, y las oleorresinas tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas (caucho).
- De acuerdo a su origen, los aceites esenciales se clasifican como naturales, artificiales y sintéticos. Los naturales se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores, y debido a su rendimiento tan bajo son muy costosos. Los artificiales se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes, por ejemplo, la mezcla de esencias o aceites de rosa, geranio y jazmín, enriquecida con linalool, o la esencia de anís enriquecida con anetol. Los aceites esenciales sintéticos son los producidos por la combinación de sus componentes los cuales son la mayoría de las veces producidos por procesos de síntesis química. Estos son más económicos y por lo tanto son mucho más utilizados como aromatizantes y saborizantes (esencias de vainilla, limón, fresa, etc.).
- Desde el punto de vista químico y a pesar de su composición compleja con diferentes tipos de compuestos, los aceites esenciales se pueden clasificar de acuerdo al tipo de sustancias que son los componentes mayoritarios. Según esto, los aceites esenciales ricos en monoterpenos se denominan aceites esenciales monoterpenoides (hierbabuena, albahaca, salvia, etc.), los ricos en sesquiterpenos son los aceites esenciales sesquiterpenoides (p.ej. pino, junípero, etc.). Los ricos en

fenilpropanos son los aceites esenciales fenilpropanoides (p.ej. clavo, canela, anís, etc.).

También éstos se pueden definir por sus propiedades físicas como un tipo de "compuesto de aspecto oleaginoso con densidad menor que la del agua" generalmente, (excepto los aceites de almendras amargas, mostaza, canela, perejil o clavo), por su viscosidad, índice de refracción (una propiedad característica de cada aceite esencial y cambia cuando éste se diluye o mezcla con otras sustancias) y actividad óptica (Ortuño, 2006).

Gracias a su fácil modo de extracción, la obtención de una gran variedad de moléculas volátiles con fuertes componentes aromáticos como terpenos y terpenoides, derivados fenólicos, componentes alifáticos entre otros, hacen de estos "aceites", el foco de atracción para el desarrollo de biopesticidas y de conservantes alimentarios orgánicos debido a sus propiedades conservativas y protectoras.

Investigaciones recientes indican que algunos de los componentes químicos de estos aceites interfieren en el sistema nervioso octopaminérgico de los insectos, sitio objetivo no compartido con los mamíferos, pájaros y peces, por lo que la mayoría de los compuestos químicos de los aceites esenciales no son tóxicos para éstos (pruebas toxicológicas realizadas), pudiendo cumplir así con los criterios establecidos para su regulación como plaguicidas de "riesgo reducido". (Stroh, Wan, Isman & Moul, 1998).

Este tipo de "pesticidas verdes" o biopesticidas, resultan muy efectivos en producciones agrícolas y aunque el desarrollo de resistencias por parte de insectos y microorganismos a determinadas y concretas sustancias de síntesis en pesticidas convencionales sigue su evolución generando cada vez mayores problemas para la salud pública en particular y para el medio ambiente en general, es probable que con este tipo de biopesticidas las resistencias se desarrollen más lentamente o ni se desarrollen, debido a las complejas mezclas de componentes que caracterizan a estos aceites esenciales.

Añadir que, gracias a la gran volatilidad de sus componentes constitutivos, la persistencia de éstos en condiciones de campo es limitada, por lo que fauna auxiliar y consecutivos predadores y parásitos, no parecen ser envenenados por residuos permanentes tóxicos que quedan en el cultivo, en la tierra y en el agua, como contrariamente ocurre con los pesticidas de síntesis siendo éstos, altamente tóxicos y acumulativos en toda la cadena trófica, (Koul, Walia, & Dhaliwal, 2008).

### **2.2.1. Origen/Composición/Métodos de extracción de A.E.:**

#### Origen:

Todas las células vegetales realizan procesos metabólicos comunes que conducen a la formación de compuestos como azúcares simples, aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos y polímeros derivados de ellos (polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, entre otros), esenciales para la vida celular y en general, para el correcto desarrollo de la planta. El conjunto de estos metabolitos es el llamado metabolismo primario, y los compuestos indicados anteriormente son los denominados metabolitos primarios.

Aparte de este proceso metabólico primario, en las plantas se desarrolla otro tipo de proceso que conduce a la formación de otros compuestos peculiares que derivan biosintéticamente de las moléculas primarias, siendo lo que se conoce como el

metabolismo secundario, y los compuestos creados, metabolitos secundarios. La biosíntesis de los metabolitos secundarios suele encontrarse restringida a fases específicas del desarrollo, tanto de la propia planta como de las células especializadas en su producción, y a periodos de estrés causados como por ejemplo, la deficiencia de nutrientes, factores ambientales adversos o por el ataque de microorganismos, teniendo una significación en todo el organismo.

Muchos metabolitos secundarios están implicados en relaciones ecológicas, es decir, de la planta productora con los otros organismos de su medio natural como puede ser el color de las flores que atraen a los polinizadores, los compuestos que inhiben el crecimiento de otros organismos vegetales (sustancias alelopáticas), o que protegen a la planta productora de infecciones (fitoalexinas) o de los depredadores (disuasorios nutritivos o alimentarios). Los grupos taxonómicos a los que pertenecen estos metabolitos son muy variados como variadas son las razones por los que son creados, de hecho, las plantas medicinales deben sus propiedades curativas a su capacidad para sintetizar y acumular algunos de estos compuestos. En general puede afirmarse que los metabolitos secundarios constituyen el mundo de sustancias químicas a través del cual, las plantas se relacionan con su entorno. (Fisiología vegetal. Introducción al metabolismo secundario, 2012, recurso web).

Todos estos compuestos contenidos en un líquido aceitoso tras su extracción, denominado aceite esencial, han tenido y siguen teniendo para el humano varios usos. Ejemplo de ello es el uso como aditivos alimentarios y conservantes, aromatizantes, potenciadores de sabor, componentes de cosméticos, jabones, perfumes, plásticos y como resinas.

Típicamente estos aceites son líquidos a temperatura ambiente y se transforman fácilmente de un estado líquido a un estado gaseoso a temperatura ambiente o ligeramente superior, sin sufrir descomposición en sus propiedades. La cantidad de aceite esencial que se encuentra en la mayoría de las plantas es de 1 a 2%, pero puede contener cantidades que van desde 0.01 a 10%.

### Composición:

Los componentes de los aceites esenciales que se pueden encontrar en diferentes partes de la misma planta, varían en su composición química y éstos varían de una planta a otra aún siendo idénticas, pero desarrolladas en ecotipos diferentes.

En ciertas plantas, es un componente principal del aceite esencial el que puede predominar, mientras que en otras, es un cóctel de decenas de compuestos variando en porcentajes.

En este cóctel de compuestos orgánicos naturales predominan generalmente los terpenos (monoterpenos y sesquiterpenos), compuestos aromáticos (aldehídos, alcoholes, fenoles, etc) y terpenoides, por lo que se podría decir que sus compuestos y aromas se dividen en dos grupos principales: terpenos (hidrocarburos) y compuestos oxigenados.

Los terpenos o hidrocarburos terpénicos son moléculas constituidas por hidrógeno y carbonos unidos en cadena, mientras que los terpenoides son terpenos que contienen oxígeno. Ambos constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (más de 40.000 moléculas diferentes). Los terpenos suelen ser insolubles en agua y derivan todos ellos de la unión de unidades de isopreno ( $C_5$ ):  $CH_2=C(CH_3)-CH=CH_2$ ; de esta forma, los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno que contienen: los terpenos de  $C_{10}$  contienen dos unidades  $C_5$  y se llaman monoterpenos; los de  $C_{15}$  tienen tres unidades de isopreno y se denominan sesquiterpenos, los de  $C_{20}$  tienen

cuatro unidades  $C_5$  siendo los diterpenos, los triterpenos tienen  $C_{30}$  por lo tanto 6 unidades de isopreno, los tetraterpenos tienen  $C_{40}$  y se habla de politerpenos cuando contienen más de 8 unidades de isopreno.

Los aceites esenciales contienen principalmente monoterpenos y sesquiterpenos respectivamente, mientras que los diterpenos, triterpenos, y tetraterpenos, si están presentes, lo están a niveles muy bajos. Ejemplos de terpenos en los aceites pueden ser: mireceno, pineno, terpineno, limoneno, p-cimen,  $\alpha$ - y  $\beta$ - felandreno, entre otros. (Bakkali, Averbeck, Averbeck & Idaomar, 2008, en Tongnuanchan & Benjakul, 2014). Con respecto a los compuestos oxigenados, éstos pueden derivar de los terpenos, y denominarse terpenoides. Algunos compuestos oxigenados prevalentes en los aceites esenciales vegetales se muestran a continuación:

- Fenoles: timol, eugenol, carvacrol, chavicol, timol, etc.
- Alcoholes:
  - ✚ Alcohol monoterpénico: borneol, isopulegol, lavanduol,  $\alpha$ -terpineol, etc.
  - ✚ Alcohol sesquiterpénico: elemol, nerolidol, santalol,  $\alpha$ -santalol, etc.
- Aldehídos: citral, mirrenal, cuminaldehído, citronellal, cinamaldehído, benzaldehído, etc.
- Cetonas: carvona, mentona, pulegona, fenchona, alcanfor, tuyona, verbenona, etc.
- Ésteres: acetato de bomilo, acetato de linalilo, acetato de citronililo, acetato de geranilo, etc.
- Óxidos: 1,8-cineole, óxido de bisabolona, óxido de linalool, óxido esclareol, etc.
- Lactonas: bergapteno, nepetalactona, psoraleno, esculatina, citropteno, etc.
- Éteres: 1,8-cineol, anetol, elemicina, miristicina, etc. (Tongnuanchan & Benjakul, 2014).

Gracias a todos estos componentes y a muchos otros que aquí no se citan, los aceites esenciales son bien conocidos por sus propiedades antioxidantes y por su actividad antimicrobiana e insecticida entre otras. Esto permite utilizarlos como pesticidas verdes durante el desarrollo del cultivo, aditivos alternativos o coadyuvantes de elaboración de aditivos/conservadores naturales en alimentos frescos y productos alimenticios manufacturados. También pueden ser utilizados como compuestos activos en los materiales de envasado, en los que las propiedades de estos materiales como "la propiedad de barrera de vapor de agua", asociado con la hidrofobia de los aceites esenciales, podría ser mejorada para una mejor conservación de las propiedades organolépticas/físicas del alimento en cuestión, repercutiendo en un incremento de la sanidad y calidad global de éste, (Tongnuanchan & Benjakul, 2014).

#### Métodos de extracción:

Los métodos utilizados para la extracción de los aceites esenciales se enumeran a continuación y la elección de éste dependerá del material botánico utilizado (Tabla 1), del estado de conservación y forma de la materia prima, y de la calidad buscada en el aceite esencial.

El método de extracción es uno de los primeros factores que determinarán la calidad del aceite esencial ya que un procedimiento de extracción inadecuado puede dar lugar a daños o alteraciones en la composición química del aceite, resultando en la pérdida de bioactividad y de características naturales como decoloración, olor y sabores desagradables, así como cambios físicos (aumento de la viscosidad).

**Tabla 1:** Partes de plantas donde se encuentran aceites esenciales. (Tongnuanchan & Benjakul, 2014).

Parts	Plants
Leaves	Basil, bay leaf, cinnamon, common sage, eucalyptus, lemon grass, citronella, melaleuca, mint, oregano, patchouli, peppermint, pine, rosemary, spearmint, tea tree, thyme, wintergreen, kaffir lime, laurel, savory, tarragon, cajuput, lantana, lemon myrtle, lemon teatree, niaouli, may chang, petitgrain, laurel, cypress
Seeds	Almond, anise, cardamom, caraway, carrot celery, coriander, cumin, nutmeg, parsley, fennel
Wood	Amyris, atlas cedarwood, himalayan cedarwood, camphor, rosewood, sandalwood, myrtle, guaiac wood
Bark	Cassia, cinnamon, sassafras, katrafay
Berries	Allspice, juniper
Resin	Frankincense, myrrh
Flowers	Blue tansy, chamomile, clary sage, clove, cumin, geranium, helichrysum hyssop, jasmine, lavender, manuka, marjoram, orange, rose, baccharises, palmarosa, patchouli, rhododendron anthopogon, rosalina, ajowan, ylang-ylang, marjoram sylvestris, tarragon, immortelle, neroli
Peel	Bergamot, grapefruit, kaffir lime, lemon, lime, orange, tangerine, mandarin
Root	Ginger, plai, turmeric, valerian, vetiver, spikenard, angelica
Fruits	Xanthoxylum, nutmeg, black pepper

Los aceites esenciales se pueden extraer de las muestras vegetales mediante varios métodos como son: presión, destilación con vapor de agua, extracción con solventes volátiles, enfleurage y con fluidos supercríticos.

A continuación se describen brevemente:

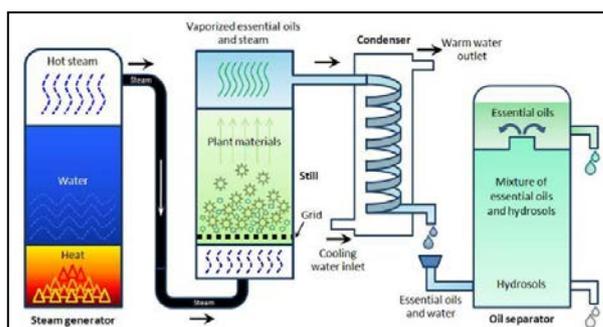
1. Mediante presión:

El material vegetal es exprimido para liberar el aceite y este es recolectado y filtrado. Este método es utilizado para el caso de las esencia de cítricos y olivares.

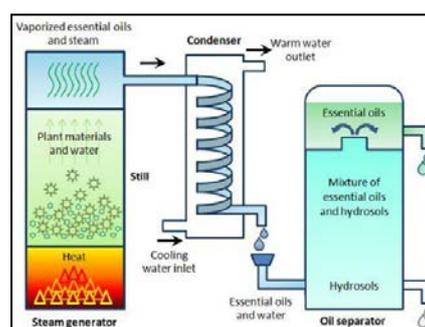
2. Destilación por arrastre de vapor:

La destilación por arrastre con vapor, es una técnica usada para separar sustancias orgánicas volátiles inmiscibles o parcialmente insolubles en agua, de otras no volátiles que se encuentran en la materia vegetal, como resinas, sales inorgánicas u otros compuestos orgánicos no arrastrables mediante vapor. Lo que se consigue con este método es la vaporización selectiva del componente orgánico volátil de la mezcla vegetal. (Masango, 2015, en Tongnuanchan & Benjakul, 2014).

El sistema consiste en un lecho compacto de materia vegetal bien desmenuzada que se encuentra encima de la fuente inyectora de vapor de agua. Sólo pasa vapor de agua a través de este lecho, por lo que el proceso requiere la mínima cantidad de vapor y la cantidad de agua en el destilado final (hidrolato) se reduce (Figura 18). Otra manera también de obtener aceites esenciales por destilación de vapor es sumergir el material vegetal con el agua destilada en el mismo recipiente y llevar la mezcla a la ebullición para que se desprendan los aromáticos. Este método protege a los aceites esenciales extraídos en cierta medida ya que en los alrededores el agua actúa como una barrera para evitar el sobrecalentamiento de éstos. El vapor de agua y los vapores de aceites esenciales se condensan en una fracción acuosa inmiscible que se separan por decantación. La ventaja de esta técnica es que se requiere una temperatura inferior a 100 °C., para obtener los vapores aromáticos. Este proceso se denomina Hidrodestilación, siendo el hidrolato obtenido mayor. (Figura 19).



**Figura 18:** Destilación por arrastre de vapor (Tongnuanchan & Benjakul, 2014).



**Figura 19:** Hidrodestilación

Este tipo de método de extracción de aceites esenciales vegetales es el más utilizado (Reverchon & Senatore, 1992, en Tongnuanchan & Benjakul, 2014), y la proporción de aceites esenciales extraídos de la mezcla alcanza el 93% y el 7% restante, puede ser extraído por otros métodos (Masango, 2005 en Tongnuanchan & Benjakul, 2014).

### 3. Extracción mediante disolventes orgánicos.

El método de extracción con disolventes orgánicos, se utiliza para partes de la planta frágiles o delicadas, como las flores, las cuales no toleran las altas temperaturas.

En este método, la muestra se pone en contacto con disolventes orgánicos como alcohol o cloroformo entre otros. Estos disolventes solubilizan la esencia pero también solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasas y ceras, obteniéndose al final una oleorresina o un extracto impuro. Algunos disolventes utilizados en este método de extracción tienen restricciones en cuanto a los residuos máximos que pueden dejarse cuando los aceites esenciales son la materia prima en las industrias de perfumes o alimentos (límites varían de acuerdo a las diferentes legislaciones). Los extractos obtenidos con este tipo de disolventes suelen ser más oscuros, ya que llegan a arrastrar algunos pigmentos.

Este procedimiento se utiliza a escala de laboratorio porque a nivel industrial resulta costoso por el valor comercial de los disolventes, porque se obtienen esencias contaminadas con otras sustancias y además, por el riesgo de explosión e incendio característicos de muchos disolventes orgánicos volátiles.

Otro tipo de extracción por disolventes, mayormente usada también a nivel de laboratorio, es la maceración o extracción alcohólica, en la cual la materia orgánica reposa en soluciones de alcohol por periodos de tiempo definidos. Los aceites esenciales son recuperados evaporando el alcohol, generalmente en rotavapores (Chua et al., 2008)

### 4. Extracción por fluidos supercríticos.

La extracción por fluidos supercríticos es una operación unitaria que explota el poder disolvente de fluidos supercríticos en condiciones por encima de su temperatura y presión críticas. Es posible obtener extractos libres de disolvente usando fluidos supercríticos y la extracción es más rápida que con la utilización de disolventes orgánicos convencionales.

Usando dióxido de carbono en particular, a una temperatura moderada, es posible lograr una alta selectividad de microcomponentes valiosos en los productos vegetales como aceites esenciales, pigmentos, carotenoides antioxidantes, antimicrobianos y sustancias relacionadas, que son usadas como ingredientes para alimentos, medicinas y productos de perfumería.

El material vegetal cortado en trozos pequeños, licuado o molido, se empaca en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra un líquido supercrítico (por ejemplo dióxido de carbono líquido). Las esencias son así solubilizadas y arrastradas y el líquido supercrítico que actúa como solvente extractor, se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente, y finalmente se obtiene una esencia pura.

Presenta varias ventajas como un alto rendimiento, que es ecológicamente compatible (el solvente se elimina fácilmente e inclusive se puede reciclar), que las bajas temperaturas utilizadas para la extracción no cambian químicamente los componentes de la esencia, que los tiempos de extracción se reducen y existe la posibilidad de selección de sustancias y la composición de lo extraído, modificando los parámetros de extracción.

En cuanto a las desventajas, se podría mencionar que las ceras cuticulares y los compuestos de alto peso molecular son extraídos junto con el aceite esencial y que el equipo requerido para este proceso es relativamente costoso, ya que se requieren bombas de alta presión y sistemas de extracción también resistentes a las altas presiones. (Deng, Yao, Wang & Zhang, 2005, en Tongnuanchan & Benjakul, 2014).

#### 5. Método de enflorado o enfleurage

El material vegetal (generalmente flores) es puesto en contacto con un aceite vegetal.

La esencia es solubilizada en el aceite vegetal que actúa como vehículo extractor. Se obtiene inicialmente una mezcla de aceite esencial y aceite vegetal, el cual es separado posteriormente por otros medios físico-químicos. Esta técnica es empleada para la obtención de esencias florales (rosa, jazmín, azahar, etc.), pero su bajo rendimiento y la difícil separación del aceite extractor la hacen costosa. Se suele tratar con alcohol para eliminar el solvente.

#### 6. Extracción por microondas (SFME)

Es una extracción rápida de aceites esenciales de hierbas aromáticas, especias y semillas secas. La SFME presenta varias ventajas, entre ellas mayor rendimiento y selectividad, menor tiempo de extracción, menores pérdidas de compuestos volátiles, menor cantidad de residuos de disolventes orgánicos arrastrados y menor impacto ambiental. Es una combinación de calentamiento por microondas y destilación en seco (calentamiento de materiales sólidos en seco para obtener los volátiles gaseosos y su condensación), realizada a presión atmosférica sin ningún tipo de disolvente o agua. El aislamiento y la concentración de compuestos volátiles se realizan en una sola etapa. (Bayramoglu et al., 2008, en Peredo, Palou & López, (2009).

## 2.2.2. Usos en agricultura/Industria agroalimentaria:

- Aceites esenciales: fuente biofungicida postcosecha:

En los países desarrollados y en desarrollo, las mayores pérdidas durante el almacenamiento de cereales y otros productos duraderos como legumbres o semillas y productos perecederos, son causadas por hongos y bacterias. Los deterioros por hongos son debidos a la carga fúngica que hay en la materia prima en sí, a las condiciones antihigiénicas de las instalaciones de almacenamiento, y esto a su vez, puede ser asociado con un alto contenido de humedad inicial del producto almacenado (mal secado) o a la absorción de humedad durante el almacenamiento debido a un mal manejo en las variantes del sistema (Stinson et al., 1980, en Shukla, (2013).

Hay varios tipos de hongos que causan deterioro y pudrición de las materias primas almacenadas y frescas siendo los más comunes *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. clavatus*, *A. terreus*, *A. versicolor*, *A. candidus*, *Alternaria alternata*, *Curvularia lunata*, *Cladosporium cladosporoides*, *C. herbarum*, *Epicoccum nigrum*, *Emericella nidulans*, *Emericella rugulosa*, *Fusarium acuminatum*, *F. moniliforme*, *Mucor hiemalis*, *Penicillium citrinum*, *P. chrysogenum*, *P. expansum*, *P. funiculosum*, *P. italicum*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus nigricans*, *Syncephalastrum racemosum* (Shukla, 1997; Shukla et al., 2000; Pandey, 2008; Shukla, 2010, en Shukla, (2013).

Varios de éstos como las especies de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* y *Cladosporium* etc., no sólo alteran la calidad y la cantidad, sino que también crean peligros para la salud de animales domésticos (vacas, cerdos, ovejas, gallinas...), y humanos, debido a la producción de metabolitos tóxicos en forma de micotoxinas en las materias primas pudiendo transferirse a la cadena alimentaria. (Samson et al., 1995; Shaaya et al. al. 1997; Pandey, 2008 en Shukla, (2013). Estos organismos fúngicos son capaces de crecer bajo diversas condiciones de humedad, pH y temperatura. Si se produce desarrollo de moho, siempre existe la posibilidad concomitante de producción de micotoxinas (Zohri y Abdel-Gawad, 1993, en Shukla, (2013).

Las micotoxinas son químicos peligrosos que causan varias complicaciones en el cuerpo y son acumulativas. Son cancerígenas, hepatóxicas, nefrotóxicas y teratogénicas. La toxicidad extrema de las micotoxinas radica en el hecho de que son extremadamente estables y muy peligrosas en cantidades mínimas. Además, una vez formadas, no pueden ser retiradas de la mercancía mediante la eliminación externa del moho visible. Son muy estables al calor, por lo que no son destruidas por la cocción. (Samson et al., 1995; Pandey, 2008 en Shukla, (2013).

Debido a todos estos problemas alimentarios, sanitarios, ecológicos y a la pérdida de producción que se traduce en una menor ganancia económica para el agricultor, es necesario establecer medidas de control sostenibles para el desarrollo fúngico en los productos alimentarios (almacenados o frescos), ya que hasta ahora se han venido utilizando fungicidas sintéticos con muchos inconvenientes asociados.

El uso de muchos de éstos, han sido restringidos o prohibidos, debido a sus efectos indeseables como una alta y aguda toxicidad, largos períodos de degradación, su concentración en la cadena alimentaria, y la sospecha de peligros de envenenamiento crónico a través de la ingesta continua de pequeñas cantidades (Samson et al., 1995; Kumar et al., 2007, en Shukla, (2013). Además, debido al desarrollo de nuevas razas de patógenos más agresivas, la gran mayoría de estos fungicidas han perdido su efectividad (Dikshit, 1980 en Shukla, (2013).

Este tipo de fungicidas sintéticos son en gran parte procedentes de la industria petroquímica, siendo un recurso agotable y muy contaminante, por lo tanto, la

utilización y el estudio de otras fuentes inagotables de tales quimioterapéuticos es muy deseable y este es el punto, donde las plantas, juegan un papel crucial.

Como se ha venido comentando en anteriores epígrafes, ellas proporcionan una fuente rica en metabolitos secundarios que presentan interesantes propiedades antimicrobianas. Son una vasta cornucopia de químicos de defensa. Recientes informes sobre el uso de plantas superiores y sus constituyentes, han indicado su utilidad como fungicidas que en su mayoría no son fitotóxicos, son mucho más sistémicos y fácilmente biodegradables (Fawcett & Spencer, 1969; Beye, 1978, en Shukla, (2013).

- Aceites esenciales como protectores de enfermedades postcosecha en productos almacenados

Las plantas se han venido utilizando como protectores de materias primas almacenadas, y éstas se han usado para controlar las plagas de insectos de almacén. Esto se refleja en cientos de artículos de investigación dirigidos a identificar plantas insecticidas o repelentes de insectos. No obstante, se han emprendido tareas para determinar si las plantas pueden controlar a los hongos en dichos productos almacenados y las conclusiones tanto in vitro como in vivo, demuestran que sí.

En la mayoría de los trabajos se ha investigado las propiedades de las especias (pimienta de Jamaica, albahaca, laurel, bardana, canela, pimentón, guindilla, clavo, eucalipto, eneldo, gotu kola, extracto de semilla de uvas, rábano picante, verbena de limón, orégano, papaya, menta, romero, estragón, tomillo, cúrcuma, valeriana y sauce) como protectoras ante el desarrollo de hongos debido a sus compuestos terpénicos (Duke, 1985; Cate, 2000, en Shukla, (2013) y a la presencia de sulfóxidos/isotiocianatos, que incluye la cebolla, el ajo, la mostaza y los miembros de la familia brassicaceae.

Aproximadamente 30% de los aceites esenciales que han sido examinados son inhibidores de bacterias, y más del 60% de los derivados de los aceites esenciales, han demostrado ser inhibidores de hongos (Cowan, 1999; Chaurasi & Vyas, 1977; Shaaya et al., 1997; Shukla et al., 2000; Kumar & otros, 2007; Pandey, 2008, en Shukla, (2013).

Se ha encontrado también que el *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) es particularmente eficaz, inhibiendo por completo tanto crecimiento de hongos y como la producción de micotoxinas (Hitokoto et al., 1980; Mabrouk & El-Shayeb, 1980, en Shukla, (2013). Muchas especias como la cúrcuma (*Curcuma spp*), albahaca (*Ocimum basilicum L.*), mejorana (*Marjorana hortensis Moench.*), anís (*Pimpinella anisum L.*), comino (*Cuminum cyminum L.*) y cilantro (*Coriandrum sativum L.*), son capaces de inhibir completamente la producción de toxinas, pero sólo inhiben parcialmente el crecimiento micelial fúngico (Hitokoto et al., 1980, en Shukla, (2013). Extractos acuosos de hierbas medicinales (*Ricinus communis*, *Arnebia nobilis*, *Nicotiana plumbaginifolia*), también han demostrado que inhiben la producción de toxinas de *Aspergillus flavus*. (Bigrani et al., 1980, en Shukla, (2013). Otros hongos, como, *Fusarium solani*, *F. phaseoli* y *Verticillium albo-atrum*, han demostrado ser sensibles a los taninos extraídos de la corteza de varios árboles, incluidos los castaños (Lewis & Papavizas, 1967, en Shukla, (2013).

Otro estudio confirma la inhibición del crecimiento de hongos en semillas de cilantro e hinojo vestidas con una concentración de aceite de cedro del 0,5%. (Dikshit, 1980 en Shukla, (2013).

Durante el cribado de los aceites esenciales estudiados por su actividad antifúngica contra el *Aspergillus flavus*, el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* presentaba fungitoxicidad. Se encontró que el MIC (mínima concentración inhibitoria), del aceite era de 1,000 ppm, en el cual mostró su naturaleza fungistática, amplio espectro fungitóxico, naturaleza no fitotóxica y superioridad sobre los fungicidas sintéticos. La potencia fungitóxico del aceite permaneció inalterada durante 7 meses de almacenamiento y tras la introducción de altas dosis de inóculo del hongo de ensayo. Estos hallazgos indican así la posibilidad de explotación del aceite esencial de *C. citratus* como un eficaz inhibidor de hongos de almacenamiento para productos alimenticios, (Mishra & Dubey, 1994).

Otro estudio de aceite y polvo de hojas de *Cymbopogon citratus* redujo significativamente el deterioro y la producción de aflatoxinas en las semillas de melón sin cáscara, inoculado con *Aspergillus flavus* toxigénico, *A. niger*, *A. tamarii* y *Penicillium citrinum*, (Bankole & Joda, 2004).

Velásquez, Alvarez, Tamayo & Carvalho (2014), evaluaron y compararon in vitro la actividad antifúngica del aceite comercial de mandarina, (timol y carvacrol), a concentraciones de 40 y 50 ppm, contra los hongos *Penicillium digitatum* y *P. italicum*, usando el método de difusión en agar. Todos los compuestos y aceites evaluados presentaron un porcentaje de inhibición entre 50% y 100%, para ambos hongos, siendo mayor la inhibición en dosis de 50 ppm.

Se demuestra mediante estudios *in vitro* y después *in vivo*, la efectividad de estos compuestos como inhibidores del crecimiento y desarrollo de varios hongos patógenos en productos alimentarios almacenados. Con ello se confirma científicamente y mediante ensayos rigurosos, que los hongos son muy susceptibles a los aceites esenciales extraídos de plantas superiores (angiospermas y gimnospermas) ya que la fracción de aceite esencial de los productos botánicos es la fracción química más inhibidora del crecimiento y la supervivencia de microorganismos.

- Aceites esenciales como controladores de enfermedades postcosecha en productos frescos (frutas y verduras)

Una vez que el producto hortofrutícola se cosecha, comienza la senescencia de éste haciéndolo más sensible al deterioro microbiano. El grado y la velocidad del incremento de la población de microorganismos depende de la composición del producto (pH, agua...), de las condiciones de su desarrollo en el campo, de las condiciones climáticas de la recogida del material y de las condiciones de manejo postcosecha como almacenamiento, envasado y transporte principalmente.

Los factores que influyen sobre la microbiota dominante y determinan la clase de deterioro, son el tipo de contaminación microbiológica inicial, las propiedades del sustrato vegetal y las condiciones ambientales, ya que de por sí, todos los vegetales poseen una microbiota residente en sus pieles que subsiste con pequeñas cantidades de carbohidratos, proteínas y sales inorgánicas disueltas en el agua exudada o condensada sobre la superficie del hospedante. Las levaduras y mohos deteriorativos proliferan más comúnmente en frutas y vegetales debido a sus características inherentes como su bajo pH y baja capacidad reguladora, (Mazzuz, 1996).

Otros factores importantes a tener muy en cuenta, son el manejo de la sanidad del cultivo durante su desarrollo, la contaminación de éste por contacto con el suelo, el

agua utilizada, los animales domésticos y salvajes, el modo de recolección del producto y sus trabajos postcosecha (herramientas desinfectadas, hora de recogida del producto, tipo de contenedor utilizado, condiciones de almacenamiento...).

Los hongos filamentosos aislados de las hortalizas con más frecuencia son *Aureobasidium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Epicoccum*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Phoma*, *Chaetomium* y en menor proporción *Aspergillus*, *Acremonium*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Sclerotium*, *Trichoderma*, *Ulocladium*, etc. Algunos de estos hongos son patógenos oportunistas, mientras que otros son patógenos verdaderos que invaden el tejido sano.

En el campo y a lo largo de la cadena de procesamiento, los puntos de contaminación son diversos: la microbiota saprobia epífita y del suelo, los frutos, ramas u hojas/frutos enfermos, envases cosecheros contaminados, la planta de envasado, el agua de reciclado, las cámaras de almacenamiento, desverdización o frío, el transporte y la venta.

La alteración de las frutas y hortalizas frescas se denomina enfermedad post-cosecha debido a que son partes vivas de las plantas y aunque éstas suelen poseer defensas naturales contra la infección microbiana en su piel y ésta funciona como barrera protectora, no son capaces de regular la población fúngica por sí solas. También poseen diferentes ácidos orgánicos, como el ácido benzoico o el ácido cítrico que las ayuda en su defensa.

Es posible que existan también patógenos "vivos" en los tejidos internos no dañados del fruto y que éstos se desarrollen y se inicie la infección. Este tipo de infección es denominada "inactivas" o "latentes", y son aquellas en las que el patógeno inicia la infección del huésped en algún momento del ciclo (generalmente antes de la cosecha), pero entra en un período de inactividad o de latencia hasta que el estado fisiológico del tejido del huésped cambia de tal manera que la infección se retoma. Los cambios fisiológicos que se producen durante la maduración de los frutos (producción de etileno), son a menudo los desencadenantes o los estimulantes de la reactivación de las infecciones inactivas. Ejemplos de enfermedades postcosecha que surgen de infecciones quiescentes incluyen la antracnosis en varias frutas tropicales causadas por *Colletotrichum* spp., en mango y aguacate, y moho gris en fresa causado por *Botrytis cinerea*.

Entonces, ya se cuenta con una carga microbiológica inicial en el producto y hasta ahora se ha venido controlando mediante productos químicos de síntesis, los cuales han demostrado su corta eficacia y todos sus problemas medioambientales y de salud asociados debido a los daños producidos por los agentes químicos.

La consciencia de los efectos perjudiciales de químicos en la comida, han hecho que la tendencia del consumidor haya cambiado, por lo que ahora demanda productos más frescos y sin conservantes químicos.

Esto es debido a que se ha asociado el consumo de conservadores químicos con intoxicaciones, con alergias, con reacciones en la piel, con precursores de cáncer y otras enfermedades degenerativas, gracias a sustancias como son los benzoatos, nitritos y nitratos, anhídrido sulfuroso (SO<sub>2</sub>), entre otros. Esto es lo que ha generado la necesidad de buscar alternativas de conservación que cubran las mismas propiedades antimicrobianas y compatibilidad con el alimento (Álvarez-Parrilla, 2005, en Rodríguez, (2011).

En esta búsqueda se han encontrado nuevos agentes antimicrobianos de origen natural, como sustitutos de los tradicionalmente utilizados; los aceites esenciales. Lo más difícil es extraer, purificar, estabilizar e incorporar dicho antimicrobiano al alimento

sin afectar su calidad sensorial y seguridad (Beuchat & Golden, 1989, en Rodríguez, (2011).

Los antimicrobianos continúan estando entre los aditivos alimentarios más importantes y mayormente utilizados. Actualmente, debido a la demanda por parte del consumidor de productos frescos mínimamente tratados como son las frutas y hortalizas frescas, cortadas y envasadas bajo diferentes atmósferas y refrigeradas, está aumentando el interés por los antimicrobianos de origen natural para ser utilizados con el fin de prolongar la vida útil y la seguridad para el consumidor (Blanchard, 2000, en Rodríguez, (2011).

Las tendencias de los consumidores indican su preferencia por alimentos de fácil preparación, de calidad, seguros, y naturales, que estén poco procesados pero a la vez tengan una mayor vida útil. Las tecnologías de conservación de alimentos tienen como reto, obtener productos más duraderos sacrificando al mínimo sus características nutricionales y sensoriales iniciales (Del Valle, 2003, en Rodríguez, (2011).

La actividad antimicrobiana de estos aditivos se debe a que atacan la pared celular, membrana celular, enzimas metabólicas, la síntesis de proteína y el sistema génico. Cada uno de estos puntos, son esenciales para el desarrollo celular, por lo tanto si uno es atacado o inactivado, la velocidad de crecimiento del microorganismo se ve minimizada (Davidson y Branen, 1993, en Rodríguez, (2011).

El principal objetivo del procesamiento de alimentos es proveer bienestar al ser humano por medio de alimentos seguros, nutricionalmente adecuados y cubrir las expectativas de sabor, aroma, apariencia y mayor comodidad.

En la industria alimentaria existe un considerable interés en los extractos y aceites esenciales derivados de las plantas debido a su capacidad de controlar el crecimiento de microorganismos patógenos tales como *Fusarium spp.*, *Alternaria spp.*, *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp* y *Rhizopus spp.*, que han sido reportados como agentes causantes de enfermedades producidas en los alimentos y/o descomposición de los mismos (Soliman y Badeea, 2002; Tepe, et. al., 2005; Viuda, 2007, en Rodríguez, (2011).

Para abordar esto, y obtener productos naturales que provean de estos objetivos buscados, en los alimentos frescos, se han llevado a cabo, en frutas específicamente (Tabla 2), numerosos ensayos para probar y demostrar la eficacia de los aceites esenciales como reguladores y conservadores alimenticios.

**Tabla 2:** Antimicrobianos utilizados en sistemas modelo a base de frutas. (Raibaudi, et.al, 2006, en Rodríguez, 2011).

Antimicrobiano	Sustrato	Efecto	CMI (ppm)/CU	Referencia
Vainillina	Sistemas modelo de agar a base de frutas	Inhibición del la tasa de crecimiento radial de colonias de especies de <i>Aspergillus</i>	1000-2000	López, et. al., 1995.
Eugenol, timol, mentol y eucaliptol	Cerezas	Inhibición del crecimiento de bacterias aerobias mesófilas, mohos y levaduras	/1 ml en forma de vapor (aplicado en gasas humedecidas con el aceite esencial)	Serrano, et. al., 2005.
Carvacrol y ácido Cinnámico	Melón fresco cortado y kiwi	Reducción de los recuentos de microorganismos viables en kiwi y extensión de la fase lag de la flora microbiana natural en melón	1mM	Roller y Seedhar, 2002
Aceite de mandarina, sidra, limón y lima	Ensalada de frutas	Aumento de la vida de anaquel y reducción del crecimiento microbiano		Lanciotti, et. al., 2004
Metil Jasmonato	Guayaba	Incremento de la tolerancia contra el ataque de patógenos		González, et. al., 2004.
Metil Jasmonato y etanol	Fresa fresca	Deterioro del deterioro fúngico y aumento de la capacidad antioxidante		Ayala, et. al., 2005.

Roller & Seedhar, (2002) llevaron a cabo ensayos de diferentes aceites esenciales sobre el nivel de la población de la flora naturalmente presente en melón y kiwi. Lanciotti et al., (2004) vieron que la aplicación de aceites esenciales de mandarina, cidra, limón y lima, aumentaron la vida útil en las ensaladas de frutas y redujeron la carga microbiana, sin alterar las características sensoriales del producto.

Por otro lado se ha observado variaciones del efecto de los aceites esenciales de dos clones de tomillo en el control de *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer* tanto en medio PDA como en fresas. La diferencia de inhibición y de control del desarrollo en la pudrición de la fresa entre ambos clones, se debió a la diferente composición química de los aceites. (Bhaskara-Reddy, Angers, Gosselint & Arul, 1997).

Se han visto resultados interesantes sobre la actividad antifúngica del aceite de laurel, obtenido por un proceso semi-industrial (SFE-CO<sub>2</sub>), contra tres hongos fitopatógenos como *Botrytis cinerea*, *Monilinia laxa* y *Penicillium digitatum* in vitro e in vivo, sobre frutas de kiwi, melocotón, naranjas y limones, mostrando inhibición del crecimiento micelial en los tres hongos, completa en *M. laxa* y *B. cinerea* y parcial en *P. digitatum*. Se encontró muy buena actividad antifúngica en kiwis y melocotones cuando se colocó el aceite antes de la inoculación del patógeno en las heridas creadas artificialmente en su piel. La aplicación del aceite no causó ningún efecto fitotóxico y mantuvo el sabor de la fruta, fragancia y sabor. (De Corato, Maccioni, Trupo & Di Sanzo, 2010).

Los aceites esenciales del orégano (*Origanum syriacum* L. var. *bevanii*), lavanda (*Lavandula stoechas* L. var. *stoechas*) y romero (*Rosmarinus officinalis* L.), fueron investigados frente a *B. cinerea* en placas de PDA, y se evaluaron los efectos de contacto y de fase volátil de los aceites esenciales, siendo los efectos de fase volátil de los aceites más efectivos. Los ensayos en vivo en invernadero sobre plantas de tomate con aceite esencial de orégano mediante rociamiento, dieron como resultado una buena protección, especialmente como tratamiento curativo cuando se aplica dentro de las 24 horas posteriores a la inoculación. Este estudio demuestra que los aceites esenciales son agentes antifúngicos potenciales y más eficientes que los tratamientos químicos usados como control. (Soylu, Kurt & Soylu, 2010).

Estos estudios con aceites esenciales aplicados a frutas y verduras y muchos otros que no se citan, son los que respaldan su posible uso como agentes conservadores. Aparte de estos efectos en los hongos, y bacterias, también ejercen otro tipo de protección frente a plagas de insectos mediante varias acciones como repelentes, insecticidas, inhibidores de crecimiento, antialimentarios... y ayudan a la planta a un mejor desarrollo fisiológico.

- Aplicación de aceites esenciales en envases inteligentes.

En la actualidad debido al modo y ritmo de vida, de las necesidades diarias, del cambio en el número de la unidad familiar, e incluso del despertar consciente de los riesgos que acarrea para la salud el uso de químicos ingeridos en los productos alimenticios, los envases tienen un rol muy importante en la conservación, protección y comercialización de los alimentos como último eslabón de la cadena.

Es por ello que se han desarrollado y se siguen desarrollando nuevas tecnologías que puedan cubrir ciertas funciones que antes no se consideraban en el envase.

Un ejemplo de esto son los envases activos, los cuales son capaces de establecer una serie de interacciones con el producto, proporcionando inocuidad, extendiendo la vida de éste, manteniendo la calidad y mejorando la seguridad y atributos organolépticos

Este tipo específico de envases cuyo componente principal es plástico, son los envases por emisión, en los cuales, la tecnología (agentes antimicrobianos), añade los compuestos deseados y este caso concreto aceites esenciales dentro del envase para proteger y mejorar la calidad del producto. Los sistemas de emisión de antimicrobianos se usan en envases para cereales, frutas y hortalizas, entre otros productos alimentarios.

Se han desarrollado (Ávila-Sosa et al., 2010, en Martínez-Tenorio & López-Malo, (2011), películas comestibles de amaranto, almidón y quitosano adicionadas con aceite esencial de orégano para inhibir el crecimiento de *Aspergillus niger* y *Penicillium spp.* En otro trabajo, (Nielsen y Ríos, 2000, en Martínez-Tenorio & López-Malo, 2011), investigaron el efecto de los componentes volátiles de diversas especias y hierbas como la canela, ajo, mostaza, orégano en películas comestibles sobre la inhibición de *Penicillium comuna*, *P. roqueforti*, *Aspergillus flavus* y *Endomyces fibuliger*, en productos de panificación. Otro ensayo con buenos resultados se ha realizado con fresas y con aceite esencial de tomillo frente a *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer*, en envases plásticos con disco embebido y sellados para evitar pérdidas de compuestos volátiles. (Bhaskara-Reddy et al., 1997).

Se podría afirmar que el uso de los aceites esenciales en forma de vapor en el contenido del envase, cumplen con la actividad necesaria antimicrobiana requerida para el control de la carga, su inhibición y que éstos no alteran el sabor ni las propiedades del alimento en cuestión, aunque se ha de seguir investigando.

- Aplicación de Aceites Esenciales como antioxidantes alimentarios

Los antioxidantes sintéticos se añaden a los alimentos para inhibir la oxidación de lípidos y de otros compuestos como vitaminas. Cada vez, más consumidores están preocupados por la seguridad de los alimentos y por los efectos potenciales que los aditivos sintéticos provocan en la salud. La sospecha de que los antioxidantes sintéticos pueden dar lugar a carcinogenicidad ha dado lugar a una disminución de su uso.

Una tendencia hacia el uso de "aditivos alimentarios naturales" en la industria alimentaria ha sido evidente desde hace bastante tiempo como resultado de la demanda del consumidor. Los aceites esenciales pueden servir como antioxidantes naturales potenciales, ya que puede utilizarse para prevenir la oxidación de lípidos en los alimentos al igual que otros compuestos.

Los fenoles contenidos en ellos, son compuestos orgánicos, que están formados por un grupo hidroxilo que puede ser donado a los radicales libres, previniendo así que otros compuestos se oxiden.

La actividad antioxidante está generalmente relacionada con el principal compuesto activo en el aceite esencial como eugenol en clavo de olor, carvacrol en orégano, timol en el tomillo y  $\beta$ -citronellol o  $\beta$ -citronellal en citronela.

Otros compuestos antioxidantes en los aceites esenciales como terpineno, camforo, acetato de bornilo, eucaliptol, y metilchavicol han sido reportados por mostrar actividad antioxidante, pero sus cantidades eran probablemente demasiado bajas para exhibir propiamente esta actividad.

La actividad antioxidante del aceite esencial, varía en función del tipo de aceite del que se trate. El ácido ascórbico (Vitamina C), tocoferoles (Vitamina E) y ácido cítrico son los antioxidantes naturales comerciales más importantes y que más usan en la industria alimentaria, (Halliwell, Murcia, Chirico & Aruoma, 1995).

### **2.2.3. Efectos biológicos de los metabolitos en los patógenos fúngicos:**

Los aceites esenciales son una fuente muy rica y muy diversa de diferentes compuestos químicos con diferente bioactividad y amplia sinergia entre sus componentes, lo que produce un mayor control sobre el desarrollo fúngico y magnifica sus propiedades.

Se sabe que el mecanismo de ataque de los antimicrobianos dentro de una célula se lleva a cabo en partes y/o en funciones importantes para la supervivencia de ésta; puede llevarse a cabo en la pared celular, membrana celular, en la síntesis de proteína, en su genética.

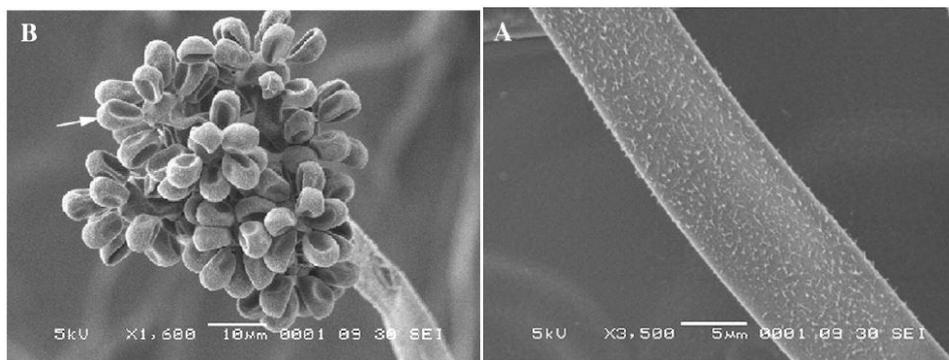
De varios de los antimicrobianos no se conoce aún su modo de acción, pero al actuar de forma diferente, las combinaciones de éstos pueden resultar en sinergias.

Existen pocos estudios enfocados a comprender el mecanismo involucrado en la inhibición microbiana por aceites esenciales, sin embargo, se sabe que los terpenoides ejercen su acción inhibitoria debido a la alteración de las funciones membrana en sus células. Cumarinas y alcaloides se cree que inhiben el crecimiento de microorganismos afectando a su nivel genético. (Hoult & Paya, 1996; Rahman & Chaudhary, 1995; Shukla, 2010 en Shukla, (2013).

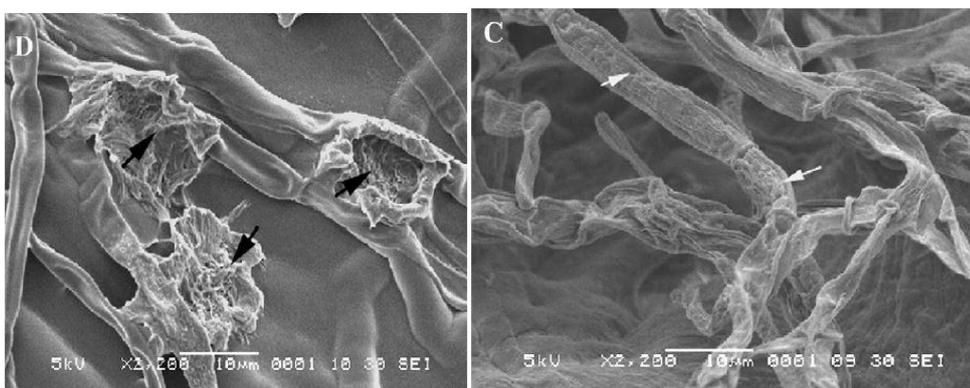
Los componentes activos de los aceites esenciales pueden variar en su composición, ya que ésta puede verse afectada por ciertas variables como el genotipo de la planta, las diferentes metodologías de extracción, localización geográfica, así como las condiciones ambientales y agronómicas (Smid y Gorris, 1999).

En muchos casos los antimicrobianos pueden no tener ningún efecto hasta que se rebasa una concentración crítica. Juven et al., (1994) utilizaron extractos de tomillo a diferentes concentraciones para tratar de inhibir *Salmonella typhimurinum*, y encontraron que había una concentración crítica donde el extracto tenía efecto, y a concentraciones menores no había actividad antimicrobiana. La interpretación de estos investigadores a este fenómeno fue que los compuestos fenólicos sensibilizan la membrana celular, y al saturarse los sitios de acción, la célula sufre un daño grave, provocando que se colapse la membrana (Raibaudi, et, al., 2006).

Un estudio llevado a cabo in vitro e in vivo sobre las actividades antifúngicas de varias plantas sobre *Botrytis cinerea* en plantas de tomate, muestra bajo observación con microscopio electrónico de barrido en placas PDA que la germinación de esporas y el alargamiento del tubo germinal fueron inhibidos por los aceites esenciales probados, causando degeneraciones morfológicas (Figuras 22y 23) considerables de las hifas fúngicas como la coagulación citoplasmática, vacuolaciones, marchitamiento de hifas, fugas de protoplasto y pérdida de conidiación.



**Figura 20 y Figura 21:** Hifas y conidios sanos. (Soylu, et al., 2010).



**Figura 22:** Lisis celular que produce la salida del material intracelular. (Soylu, et al., 2010).

**Figura 23:** Hifas completamente arrugadas y secas, merma de orgánulos en su citoplasma. (Soylu, et al., 2010).

Otro estudio donde se demuestran los efectos biológicos del aceite esencial de *Asarum heterotropoides* (variedad *mandshuricum*) contra *Phytophthora cactorum*, se concluye que el aceite tiene un amplio espectro antifitopatogénico, y que el metileugenol es el responsable principal de la bioactividad del aceite gracias a los cambios que produce en la ultraestructura micelial, (Yang, Hai-Yan, Wei-Wei & Shi-Lin, 2010).

#### **2.2.4. Toxicología de los metabolitos:**

La rápida acción de los aceites esenciales contra algunas plagas de insectos es indicativa de un modo de acción neurotóxico, y hay evidencia de interferencia con el neuromodulador octopaminérgico en los insectos por parte de algunos aceites.

Los componentes terpenoides purificados de los aceites esenciales son moderadamente tóxicos para los mamíferos en contadas excepciones. Se adjunta una tabla en la que se presentan los datos (Tabla 3). Los aceites en sí o los productos basados en aceites son en su mayoría no tóxicos para los mamíferos, las aves y los peces (Stroh, Wan, Isman & Moul, 1998), por lo tanto, se justifica su denominación bajo "pesticidas verdes" o "biopesticidas".

Gracias a la gran volatilidad de sus componentes constitutivos, la persistencia de éstos en condiciones de campo es limitada. Por ello, la fauna auxiliar no es afectada por

residuos permanentes tóxicos que quedan en el cultivo, en la tierra y en el agua, como ocurre con los pesticidas de síntesis, siendo éstos, altamente perjudiciales para los seres vivos sin excepción, acumulativos en toda la cadena trófica, residuales, no renovables y creadores de resistencias en los microorganismos.

**Tabla 3:** Toxicidad en mamíferos de componentes de aceites esenciales. (Stroh et al., 1998)

Compound	Animal tested	Route	LD <sub>50</sub> (mg/kg)
2-Acetonaphthone	Mice	Oral	599
Apiol	Dogs	Intravenous	500
Anisaldehyde	Rats	Oral	1510
trans-Anethole	Rats	Oral	2090
(+) Carvone	Rats	Oral	1640
1,8-Cineole	Rats	Oral	2480
Cinnamaldehyde	Guinea pigs	Oral	1160
	Rats	Oral	2220
Citral	Rats	Oral	4960
Dillapiol	Rats	Oral	1000-1500
Eugenol	Rats	Oral	2680
3-Isothujone	Mice	Subcutaneous	442.2
d-Limonene	Rats	Oral	4600
Linalool	Rats	Oral	> 1000
Maltol	Rats	Oral	2330
Menthol	Rats	Oral	3180
2-Methoxyphenol	Rats	Oral	725
Methyl chavicol	Rats	Oral	1820
Methyl eugenol	Rats	Oral	1179
Myrcene	Rats	Oral	5000
Pulegone	Mice	Intraperitoneal	150
γ-terpinene	Rats	Oral	1680
Terpinen-4-ol	Rats	Oral	4300
Thujone	Mice	Subcutaneous	87.5
Thymol	Mice	Oral	1800
	Rats	Oral	980

La utilización de aceites esenciales, con pleno conocimiento de su uso y objetivo concreto a alcanzar, elección del tipo de aceite en función de sus propiedades, su modo de acción más efectivo (protector o curativo), época de aplicación en el cultivo, modo de aplicación (contacto directo o mediante vapores del aceite), en el momento preciso y en sus concentraciones adecuadas, proporciona datos más que alentadores sobre el uso de este tipo de productos naturales para el control de enfermedades y plagas en los cultivos, como protectores alimentarios e incluso mejoradores de las propiedades nutritivas de los alimentos como adicionadores de antioxidantes.

### **2.2.5. Aceite esencial Melisa: Propiedades, composición y aplicaciones**

*Melissa officinalis L.*, miembro de la familia de las Lamiáceas, es una de las especies más importantes dentro de las plantas medicinales.

El Bálsamo de limón o toronjil, como coloquialmente se denomina, es una planta perteneciente a la flora endémica de la región mediterránea, Europa y África septentrional, que se extiende hacia el este hasta El Cáucaso y el norte de Irán. Sus tipos salvajes se dan en todos países mediterráneos y en la parte sur de los Alpes. Esta planta se ha utilizado en la medicina tradicional desde la antigüedad hasta nuestros tiempos. Paracelso, médico y químico suizo, (1493-1541), preparó tónicos llamados "elixir de la vida"; el escritor inglés John Evelyn (1620-1706), describió esta planta como la "gobernante del cerebro, fortalecedora mental y liberadora de melancolía" aparte de mejorante del corazón. Su aceite esencial era llamado el "líder de los aceites" en hebreo.

El aceite esencial de toronjil, obtenido a partir de las flores secas, hojas y ramas de esta planta por destilación de vapor de agua o mediante extracción química, ofrece un olor

característico a limón fresco y color amarillo claro, siendo la viscosidad de su aceite más ligera que la del agua.

Los principales componentes del aceite esencial son: 39% citronellal, 33% citral (geranial, neral) y 2% de geraniol. Además, este aceite contiene variados compuestos en baja proporción y todos ellos pueden variar en porcentajes y en formulación, en función del ecotipo de la planta, ya que son muchos parámetros los que influyen en la composición y el rendimiento de los aceites esenciales, como la intensidad de la luz y los nutrientes, la temperatura, la práctica cultural, genotipo, edad parcial de la planta, época de cosecha y número de cortes.

Se utiliza tradicionalmente como sedante suave, agente espasmolítico y antimicrobiano. Los resultados de muchas investigaciones clínicas han demostrado que el aceite esencial del bálsamo de limón, se puede utilizar en el tratamiento de la enfermedad de alzheimer, como antioxidante contra los efectos negativos de los radicales libres, como agente antitumoral y tiene un efecto positivo sobre el sistema inmunológico y el estrés.

Está muy presente en la industria de perfumería y cosmética, debido al hidrolato de su aceite esencial, (Bahtiyarca-Bağdat & Coşge, 2010).

En lo que se refiere al sector alimenticio, el aceite esencial de melisa y sus extractos (*M. officinalis subsp. officinalis* y de *M. officinalis subsp. inodora*) pueden ser utilizados como antioxidantes alimenticios (Marangui et al., 2004; Mimica et al., 2003; en Bahtiyarca-Bağdat & Coşge, 2010), ya que se han descrito capacidad antimicrobiana y de eliminación de radicales libres (RSC). La actividad antimicrobiana se probó contra 13 cepas bacterianas y seis hongos. El aceite esencial examinado presentaba una gran fuerza RSC; los compuestos más potentes fueron aldehídos monoterpénicos y cetonas (neral/geránico, citronellal, isomenthone, y menthone) y mono- y sesquiterpeno (E-cariofileno). La actividad antibacteriana más efectiva se expresó en un cepa multiresistente de *Shigella sonnei*. Se exhibió actividad antifúngica en especies de *Trichophyton*. También gracias a su actividad antimicrobiana, se encontró ser eficaz en la inhibición del crecimiento de los hongos descomponedores de los alimentos.

### **2.2.6. Aceite esencial de Citronela: Propiedades, composición y aplicaciones**

El género *Cymbopogon* (Familia Poaceae) es conocido por sus aceites esenciales de inmensa importancia comercial en aromas, fragancias, cosméticos, perfumería, jabones, detergentes y productos farmacéuticos. El género comprende alrededor de 140 especies de las cuales la mayoría son aromáticas y producen un aceite esencial a partir de la destilación por vapor de sus partes aéreas entre otras.

Algunas de las especies más importantes de este género son:

- *Cymbopogon flexuosus* Stapf. (*Lemongrass de las Indias Orientales*)
- *Cymbopogon citratus* DC Stapf. (*Limoncillo de las Indias Occidentales*)
- *Cymbopogon nardus* (L)
- *Cymbopogon winterianus* Jowitt (*citronela*)
- *Cymbopogon martinii* Roxb. (*palmarosa*)
- *C. nardus* x *C. jwarancusa* (*jamarosa híbrido*)

Los aceites esenciales de las especies de *Cymbopogon* se componen principalmente de fracciones de monoterpenos; varios informes revelan la presencia de citral (mezcla de geranial y neral), geraniol, citronellol, citronellal, linalool, elemol, 1,8-cineole, limoneno,  $\beta$ -caryophyllene, metil heptenona, acetato de geranilo y formiato de geranilo, en los aceites esenciales de diferentes especies con variaciones marcadas.

Además, los componentes de los aceites esenciales están muy influenciados por las condiciones genéticas, ambientales y geográficas. Los aceites esenciales de las especies de *Cymbopogon* se biosintetizan en las hojas de crecimiento rápido y se almacenan en células oleosas específicas en los tejidos del parénquima, (Kumar, Srivastava & Dubey, 2007).

Los aceites esenciales de los miembros del género *Cymbopogon* se extraen generalmente por vapor o hidrodestilación de las partes aéreas, tales como hojas e inflorescencias en el aparato Clevenger.

Producen un aceite esencial con un aroma característico debido a la presencia de importantes fracciones de monoterpenos. El aceite de *Cymbopogon flexuosus* (hierba limón de las Indias Orientales) es de color amarillo a marrón rojizo y el olor es potente como el del limón, mientras que el de *C. martinii* (palmarosa) y *C. flexuosus mutant*, tiene un aroma a rosas debido a la mayor proporción de geraniol.

En los últimos años se han investigado las composiciones químicas de *C. flexuosus*, *C. citratus*, *C. martinii*, *C. winterianus*, *C. nardus*, *C. giganteus*, *C. schoenanthus* y *C. parkeri* y se han evaluado sus actividades biológicas, (Kumar et al., 2008).

Una serie de informes publicados en los últimos años han descrito varias bioactividades novedosas, como alelopáticos, antihelmínticos, antiinflamatorios, anticancerosos, antioxidantes y repelencia a los insectos y mosquitos por parte del género *Cymbopogon*; entre las diversas especies, *C. citratus* ha sido reconocida como la más prometedora ya que el aceite esencial de esta especie ha exhibido una gran variedad de bioactividades interesantes y novedosas. Esta información se presenta en la tabla a continuación (Tabla 4).

**Tabla 4:** Bioactividades del aceite esencial de *Cymbopogon*, constituyentes y extractos. (Ganjewala, 2009).

<i>Cymbopogon</i> species	essential oil	MIC/IC <sub>50</sub> value	biological activity
<i>Cymbopogon citratus</i> Stapf.	Essential oil	126.5 and 15.5 µg/ml	Anti-proliferative
<i>Cymbopogon citratus</i>	Essential oil and components	N.D.	Allelopathic
<i>Cymbopogon citratus</i>	Essential oil	1.0 - 1.5 µl/ml	Antifungal
<i>Cymbopogon citratus</i>	Essential oil	1.0- 3.0 µl/ml	Antiyeast
<i>Cymbopogon citratus</i>	Essential oil, citral	100 µg/ml	Antifungal
<i>Cymbopogon citratus</i>	Essential oil	1.0 - 1.5 µl/ml	Antifungal
<i>Cymbopogon citratus</i>	Essential oil and powder	1-10 g/100 g seeds and 0.1 to 1.0 ml/100 g seeds	Antifungal
<i>Cymbopogon citratus</i>	Lemon grass extract	100 mg/kg body weight	Anticancer
<i>Cymbopogon citratus</i>	Citral	22.25 µM	Inducer of caspase-3 in tumor cell lines
<i>Cymbopogon citratus</i>	Methanol, water infusion & decoction	50-100 µg/ml	Free radical scavenging and antioxidant
<i>Cymbopogon citratus</i>	Essential oil	50-200 mg/kg	Antinociceptive effect
<i>Cymbopogon citratus</i>	Essential oil	N.D.	Anxiolytic
<i>Cymbopogon citratus</i>	Essential oil	0.5 - 1.0 g/kg	Neurobehavioral effect
<i>Cymbopogon citratus</i>	Fresh leaf aqueous extract	125-500 mg/kg	Hypoglycemic and hypolipidemic

Continuación Tabla 4.

<b>Cymbopogon species</b>	<b>essential oil</b>	<b>MIC/IC<sub>50</sub> value</b>	<b>biological activity</b>
<i>Cymbopogon citratus</i>	Citral	60 mg/kg body weight	Anti-clastogenic
<i>Cymbopogon citratus</i>	Lemongrass infusion	N.D.	In the treatment of oral thrush in HIV/AIDS
<i>Cymbopogon flexuosus</i> (Nees ex Steud) Wats	Essential oil	4.2 to 79 µg/ml	Anticancer
<i>Cymbopogon flexuosus</i>	Essential oil, isointermedeol	30 and 20 µg/ml	Anticancer
<i>Cymbopogon martini</i> Roxb.	Essential oil	0.1%	Antimicrobial
<i>Cymbopogon martini</i>	Essential oil, geraniol	66.7 µg/ml	Anthelmintic
<i>Cymbopogon martini</i>	Oil extract	N.D.	Insecticidal
<i>Cymbopogon martini</i>	Essential oils	150 and 500 ppm	Antifungal activity dermatophytes
<i>Cymbopogon martini</i>	Essential oil	150 and 500 ppm	Antifungal activity dermatophytes
<i>Cymbopogon martini</i>	Essential oil	N.D.	Anthelmintic activity
<i>Cymbopogon martini</i> var. <i>sofia</i>	Essential oil	1 ml	Repellent
<i>Cymbopogon schoenanthus</i> (L.) Spreng.	Essential oil	0.47 mg/ml	Antioxidant Antiacetylcholineesterase
<i>Cymbopogon schoenanthus</i>	Essential oil, piperitone	1.6 µl/l and 2.7 µl/l	Insecticidal
<i>Cymbopogon schoenanthus</i>	Essential oil	33.3 µl/l	Insecticidal
<i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt	Essential oil	100- 400 mg/kg	Anticonvulsant
<i>Cymbopogon winterianus</i>	Essential oil	N.D.	Insecticidal/ repellent
<i>Cymbopogon winterianus</i>	Essential oil	1-10 µl/ml	Antimicrobial
<i>Cymbopogon winterianus</i>	Citronella extract	0.2 g/m <sup>2</sup> of carton board	Insect repellent
<i>Cymbopogon winterianus</i>	Citronellal	2.5 mM	Phytotoxicity
<i>Cymbopogon nardus</i>	Essential oil	800 mg/l	Antifungal
<i>Cymbopogon densiflorus</i> Steud.	Essential oil	N.D.	Antibacterial activity
<i>Cymbopogon nervatus</i> Stapf.	Essential oil	N.D.	Antibacterial

N.D. = not detected

De Billerbeck et al., 2001, en Ganjewala, 2009, estudiaron el efecto del aceite esencial de *C. nardus* sobre el crecimiento de *Aspergillus niger* con resultados positivos en control. Posteriormente, Helal et al., 2006, en Ganjewala, 2009, describieron una propiedad antimicótica del aceite esencial de *C. citratus* que generaba el bloqueo de la producción de aflatoxina B en *A. niger*. También ha mostrado actividades inhibitorias significativas contra varios hongos filamentosos, como *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* y *Penicillium roquefortii*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. tamarii* y *Penicillium citrinum*, (Irkin & Korukluoglu, 2009, en Ganjewala, 2009). El aceite esencial de *C. parkeri* ha mostrado una actividad sustancial contra los hongos fitopatógenos, como *Rhizoctonia solani*, *Pyricularia oryzae* y *Fusarium oxysporum*, (Hajjehghrari, Mohmmasdi MR & Hadian, 2006, en Ganjewala, 2009).

### **Actividades antioxidantes**

Los antioxidantes son sustancias con la capacidad de eliminar los radicales libres y los aceites esenciales de las especies de *Cymbopogon* han demostrado esta capacidad aunque aún no han sido suficientemente evaluadas. El aceite esencial de *C. schoenanthus* L. (Spreng.) ha demostrado la capacidad de eliminar los radicales libres y

también la actividad anti-acetilcolinesterasa, por lo que se cree que es un antioxidante fuerte. *Cymbopogon schoenanthus* se consume en ensaladas y se utiliza para preparar recetas tradicionales de carne en Túnez por ejemplo.

### **Actividades alelopáticas, repelentes y antihelmínticas**

Estudios científicos han revelado muchas actividades biológicas útiles tales como actividades antiinflamatorias, anticancerígenas y alelopáticas. Por otra parte hay varios estudios que confirman el control sobre insectos de almacén como por ejemplo, el aceite esencial de *C. martinii* (palmarosa) se utiliza como fumigante para controlar escarabajos como *Callosobruchus chinensis* y *Tribolium castaneum*, que crecen en el grano almacenado. Del mismo modo, las propiedades repelentes de insectos de *C. winterianus* (citronella) se utilizan para proteger de los escarabajos las cajas de cartón que contienen muesli y germen de trigo, (Wong, Signal, Champion, & Motion, 2005). El aceite esencial de *Cymbopogon schoenanthus* funciona como un aleloquímico y se utiliza para controlar el desarrollo de *Callosobruchus macula* en el ganado vacuno. La piperitona, uno de los principales componentes químicos del aceite esencial, ha demostrado ser más eficaz que el propio aceite, para las larvas neonatales.

El aceite de palmarosa es seguro para el uso humano y por lo tanto se recomienda para la protección contra la malaria debido a su potente acción repelente contra los mosquitos. También demostró una actividad antihelmíntica significativa contra el nematodo *Caenorhabditis elegans*, y contra el gusano de tierra indio *Pheretima posthuma* que causa parálisis y muerte en poco tiempo.

El aceite esencial de Citronela mostró efectos inhibitorios significativos sobre el crecimiento de varias especies de malezas como *Ageratum conyzoides*, *Chenopodium album*, *Parthenium hysterophorus*, *Malvastrum coromendelianum*, *Cassia accidentalis* y *Phalaris minor*. La aplicación post-emergencia de citronela ha sido igualmente eficaz y causa clorosis, necrosis, marchitez y finalmente la muerte de las malas hierbas, (Singh, Batish, Kaur, Kohli & Arora, 2006, en Ganjewala, 2009).

### **2.2.7. Aceite esencial de Sándalo: Propiedades, composición y aplicaciones**

La especie *Santalum álbum* es un **árbol semiperenne, hemiparásito**, y es conocido generalmente como sándalo. Es originario de la zona húmeda del sur de la India, donde los bosques de sándalo son explotados para su utilización en perfumes, jabones y medicina tradicional. . En la actualidad se planta en China, Sri Lanka, Indonesia, Malasia, Filipinas y el norte de Australia. Es un árbol de hoja perenne que alcanza un tamaño de 4 a 9 metros de altura y puede vivir hasta los cien años de edad.

La planta parasita las raíces de otras especies de árboles, con un haustorio adaptado en sus propias raíces, pero sin gran perjuicio para sus anfitriones. Un ejemplar no forma una obligada relación con determinados árboles, ya que hasta 300 especies (incluyendo la suya propia) pueden albergar el desarrollo del sándalo suministrándole macronutrientes como fósforo, nitrógeno, potasio, y sombra especialmente, durante las primeras fases de desarrollo.

El aceite de sándalo se acumula en el duramen sólo tras 30 años de crecimiento en condiciones naturales. El rendimiento y la composición del aceite esencial está fuertemente influenciado por la edad del árbol, el color del duramen, la maduración del órgano, el árbol individual, la ubicación dentro del árbol y las señales ambientales y los factores genéticos de las plantas.

Además de su uso en perfumería, cosmética y aromaterapia, el sándalo y su aceite han demostrado una amplia gama de actividades farmacológicas.

*S. album* ha sido extensamente estudiado y su aceite han mostrado varios efectos biológicos que van desde antibacterianos hasta anticancerígenos. A continuación se enumeran algunas de las actividades farmacológicas del sándalo y de su aceite esencial:

- Actividad hepatoprotectora
  - Efectos en el Sistema Nervioso Central: potenciador de la memoria, reductor del estrés, depresión, miedo, agotamiento nervioso, ansiedad, incomodidad, e insomnio por su efecto calmante y relajante.
  - Actividad antiulcerosa al inhibir efectivamente la ulceración gástrica inducida física (estrés) y químicamente.
  - Actividad antibacteriana eficaz contra *Staphylococcus aureus* y especies de *Candida*, *Helicobacter pylori*, *Bacillus mycoides* y *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* y altamente activa contra *Candida albicans*.
  - Actividad antifúngica: Se ha reportado que el aceite de sándalo posee actividad antifúngica contra el *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* y *T. rubrum*.
  - Actividad insecticida: El aceite de sándalo actúa como repelente contra *Varroa jacobsoni* en las colonias de abejas melíferas por lo que es usado como acaricida. También es activo contra *Tetranychus urticae*.
  - Actividad antivírica
  - Actividad antioxidante
  - Actividad anticancerígena
  - Actividad antipirética
  - Actividad antiinflamatoria
- (Kumar, Anjum & Tripathi, 2017).

### 2.3. Control Biológico

Actualmente se admite de forma generalizada la definición de control biológico enunciada por Baker y Cook (1974) hace más de 30 años como “la reducción de la densidad o de las actividades productoras de enfermedades de un patógeno o parásito, en su estado activo o durmiente, lograda de manera natural o a través de la manipulación del ambiente, del hospedante o de antagonistas del patógeno o plaga que se quiere controlar”. Se trata de una definición muy amplia que abarca prácticamente todo tipo de control aparte del químico.

Una definición más concreta dado por los mismos autores, para control biológico es “la disminución de inóculo o de la gravedad de la enfermedad provocada por un patógeno, mediante la utilización de uno o varios organismos vivos” (Baker & Cook, 1974).

Los mecanismos mediante los cuales los organismos vivos pueden ejercer un antagonismo frente a hongos patógenos son variados, pudiendo estos actuar individual, simultánea o sinérgicamente. Estos mecanismos, pueden resumirse en antibiosis, protección física, competición, hiperparasitismo y resistencia inducida.

- **Antibiosis** se entiende es el antagonismo ejercido por metabolitos antimicrobianos que pueden ser producidos tanto por el antagonista como por la planta hospedante. En general la antibiosis no ha sido explotada con demasiado éxito en el control de

hongos patógenos del suelo debido a la falta de conocimientos sobre la aplicación de la fungistasis (inhibición del crecimiento de hongos, esporulación o germinación de la spora pero no la muerte), a las prácticas de cultivo y en algunos casos como *Fusarium*, los patógenos evolucionan superando estos obstáculos químicos (Van Etten et al., 1989)

- **Protección física**, la originan los hongos ectomicorrícicos (micorrizas), y otros habitantes de la rizosfera, proporcionan protección a las plantas mediante el efecto de una barrera física entre la raíz de la planta y los patógenos como consecuencia de la presencia de un manto fúngico alrededor de las raíces (Marx, 1972, 1973).
- **Competencia** es otro mecanismo en el que se basa el control biológico. Se define como el desigual comportamiento de dos o más organismos ante un mismo recurso, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible por los demás (Jarvis, 1998). Un factor esencial para que exista competencia es que haya escasez de un elemento, si hay exceso no hay competencia. La competencia más común es por nutrientes, oxígeno o espacio (Vero y Mondino, 1999).
- **Hiperparasitismo** consiste en el parasitismo de un parásito por otro organismo. La explotación del hiperparasitismo para el control biológico supone la alteración de las condiciones ambientales a favor del hiperparásito o la aplicación de inóculo como pesticida biológico. Por todo ello, es imprescindible conocer tanto la ecología del hiperparásito como la de sus antagonistas presentes de manera natural (Jarvis, 1998). Generalmente se ven implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas,  $\beta$ -1-3-glucanasas y proteasas que lisan o digieren las paredes del hongo (Melgarejo, 1989; Ulhoa 1996, en Arroyo, 2015).
- **Resistencia Inducida** en las plantas mediante aislados no patogénicos o patógenos poco virulentos incluso micorrizas. El método consiste en que plantas que han sido inoculadas previamente con estos microorganismos, desarrollen defensas que frenen un posterior ataque del patógeno (Larkin et al., 1996, en Arroyo, 2015).

Ninguno de estos mecanismos puede considerarse como una técnica general de protección sino que varios mecanismos actúan simultáneamente en la eliminación de la enfermedad (Alves-Santos & Díez, 2011).

El futuro el uso de control biológico como parte del Manejo de plagas debe ir en ascenso debido al incremento en el número de plagas resistentes a los insecticidas, contaminación del medio ambiente y el incremento de las regulaciones que prohíben el uso de productos químicos debido a los residuos en los alimentos.

Esto anima a la industria de control biológico para continuar el trabajo con el apoyo de muchos grupos de la sociedad tanto del mundo de los negocios y la empresa, como del mundo académico y de la comunidad científica. El futuro de la gestión de plagas y enfermedades tanto desde un punto de vista agronómico como forestal debería convertirse en un programa integrado, en el que el control biológico tendrá un papel destacado. Este enfoque requiere de la colaboración de muchos investigadores y profesionales así como del apoyo de la sociedad con el fin de lograr la calidad de los productos que los consumidores demandan; la rentabilidad que necesitan los productores agrícolas y forestales; y los agentes de control biológico que reporten beneficios a la industria que los fabrica.

### **2.3.1 Situación actual: Consecuencias del uso de pesticidas químicos y perspectivas de cambio.**

Los problemas ambientales causados por el uso excesivo de plaguicidas han sido y son motivo de preocupación tanto para los científicos como para el público en general en los últimos años.

Se calcula que cada año se utilizan alrededor de 2,5 millones de toneladas de plaguicidas en los cultivos y que los daños causados por el uso de éstos ascienden a 100.000 millones de dólares anuales. Las razones de esto son dos: la elevada toxicidad y las propiedades no biodegradables de los plaguicidas y los residuos en el suelo, en los recursos hídricos y en los cultivos, afectando a la salud pública.

Así, por un lado, hay que buscar los nuevos plaguicidas altamente selectivos y biodegradables para resolver el problema de la toxicidad a largo plazo, y, por otro, hay que estudiar los plaguicidas respetuosos con el medio ambiente y desarrollar técnicas que puedan utilizarse para reducir el uso de plaguicidas manteniendo al mismo tiempo el rendimiento de los cultivos.

Los productos naturales son una excelente alternativa a los pesticidas sintéticos como medio para reducir los impactos negativos sobre la salud humana y el medio ambiente. El paso a los procesos de química verde y la continua necesidad de desarrollar nuevas herramientas de protección de cultivos con nuevos modos de acción hacen que el descubrimiento y la comercialización de productos naturales como los plaguicidas verdes sea una actividad atractiva y rentable que llama la atención. El concepto de "Plaguicidas Verdes" se refiere a todo tipo de materiales beneficiosos que pueden contribuir a reducir la población de plagas y enfermedades y aumentar la producción de alimentos. (Isman & Machial, 2006 en Koul, Walia & Dhaliwal, 2008).

El uso de productos naturales como protectores o conservantes postcosecha de materiales suculentos como frutas y verduras y material seco como el el grano, es otra de las aplicaciones importantes a desarrollar ya que se utilizan aditivos químicos y conservantes químicos que inciden negativamente en la salud del consumidor no aportando mejores resultados en la conservación de las frutas a nivel microbiológico.

### 3. OBJETIVO DEL ESTUDIO:

El objetivo y la motivación de este estudio Fin de Máster es el deseo de plasmar mediante estudio riguroso, objetivo y comparativo con anteriores investigaciones, la existencia de sustancias naturales altamente eficaces en el control biológico de enfermedades fúngicas en los vegetales y frutas.

Se pretende con este estudio, apoyar, contribuir con los datos obtenidos, al uso de sustancias naturales como protectores alimentarios y conservadores de productos perecederos o almacenados contra los hongos necrotrofos como una herramienta eficaz y sostenible, contribuyendo con ella a un beneficio ecosistémico.

Por ello se han planteado el siguiente objetivo general:

-Evaluar la capacidad de los aceites esenciales de citronela, melisa y sándalo para controlar el desarrollo de los hongos necrotrofos *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium* y *Aspergillus*.

Y este podemos desglosarlo en los siguientes objetivos específicos:

-Evaluar in vitro la capacidad de los aceites esenciales de reducir el crecimiento micelial en medio artificial PDA.

-Evaluar in vitro la capacidad de los aceites esenciales de inhibir la germinación de las esporas fúngicas.

-Evaluar in vivo la capacidad de los aceites esenciales como conservadores postcosecha sobre naranja envasada.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS:

### 4.1. Obtención de aislados

En el presente estudio se han utilizado cinco especies fúngicas (Tabla 5): cuatro aislados necrotrofos obtenidos en el laboratorio de Fitopatología de la E.T.S.II.AA. de Palencia (Universidad de Valladolid) a partir de diversas muestras vegetales procedentes de los campos e invernaderos de la escuela. Por otro lado se ha usado un aislado no patogénico de *Fusarium oxysporum* obtenido de plantas de judías de la comarca de El Barco de Ávila en el Área de Genética de la Universidad de Salamanca (Alves-Santos *et al.* 2002). Este aislado denominado AB92 no ha mostrado capacidad de producir fusariosis vascular pero si se ha comportado como oportunista en otros trabajos realizados en nuestro laboratorio.

Todos los aislados usados en el estudio proceden de cultivos monospóricos (aislados y cultivados a partir de una única espora), por lo que está asegurada la homogeneidad de cada uno de ellos. Se han mantenido congelados en glicerol al 25% hasta su uso. Para ello se han sembrado en placas de PDA (Potato Dextrose Agar) y se han incubado en oscuridad a 22-24°C. En la preparación de este medio, se han añadido 39 gramos de PDA (Potato Dextrose Agar, Difco) en un litro de agua destilada, agitándose hasta su completa disolución para posteriormente ser esterilizada en autoclave durante 20 minutos a 121 grados. Tras el autoclavado se reparte en placas Petri estériles de 90 mm de diámetro en cabina de flujo laminar (Telstar Mini-V/PCR).

**Tabla 5:** Aislados fúngicos utilizados en el estudio

Aislado	Año	Origen (Aislamiento)*
<i>Alternaria spp</i>	2014	E.T.S.II.AA de Palencia
<i>Botrytis cinerea</i>	2014	E.T.S.II.AA de Palencia
<i>Penicillium spp</i>	2014	E.T.S.II.AA de Palencia
<i>Aspergillus spp</i>	2014	E.T.S.II.AA de Palencia
<i>Fusarium oxysporum</i> (aislado AB92)	1994	El Barco de Ávila

\*Aislados de ETSIIAA de Palencia provenientes de las plantaciones de la Escuela. Aislados de El Barco de Ávila procedentes de planta de judía (Alves-Santos *et al.* 2002)

### 4.2. Análisis del crecimiento de los hongos en placa con PDA

El ensayo de control biológico in vitro ha sido llevado a cabo en placa Petri con medio de cultivo PDA para evaluar el crecimiento micelial de los cinco hongos patógenos en estudio.

Los aceites esenciales empleados son productos comerciales de herbolario: aceite esencial de Citronela (Manuel Riesgo S.A.); aceite esencial de Melisa (VincaMinor Aromaterapia) y aceite esencial de Sándalo (A.E.B.B.D. Aceites esenciales botánica y bioquímicamente definidos. Dietéticos Intersa S.A.).

Para la realización de los tratamientos se ha preparado el medio PDA tal y como se describe previamente pero antes de su reparto en las placas se ha añadido el aceite

esencial correspondiente (Figura 24). Teniendo en cuenta la insolubilidad de los aceites esenciales en agua, se han preparado las dosis de aceite esencial diluyéndolas previamente en etanol absoluto; para ello se ha tomado 1 ml de aceite esencial puro al cual se añaden 9 ml de etanol, obteniendo un preparado concentrado al 10 % ó 100.000 ppm de aceite esencial.

De esta solución se toma 1 ml y se vuelve a disolver en 9 ml de agua estéril (queda el aceite al 1%=10000 ppm) y se repite el proceso hasta obtener concentraciones de trabajo apropiadas.

De estas soluciones se toman 9 ml y se diluyen en 300 y 600 ml de medio PDA esterilizado en el autoclave, una vez que baja su temperatura a unos 50°C y mientras aún está líquido, para obtener las diferentes concentraciones deseadas de aceite esencial para el estudio de los fúngicos.

Se hacen cuatro tratamientos experimentales para cada aceite y un control con sólo alcohol.

Los tratamientos son:

- T3000: 9 ml al 10%/300 ml = 9 ml a 100.000 ppm /300ml = 3000 ppm
- T1500: 9 ml al 10%/600 ml = 9 ml a 10.0000 ppm /600ml = 1500 ppm
- T300: 9ml al 1%/300 ml = 9 ml a 10.000 ppm /300ml = 300 ppm
- T30: 9ml al 0,1%/300 ml = 9 ml a 1.000 ppm /300ml = 30 ppm
- T0: 9 ml de alcohol en 300 ml

**Tabla 6:** Resumen hongo/dosis aplicadas en placa PDA

	<i>Alternaria</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Botrytis</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Penicillium</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Citronela</li> <li>• Melisa</li> <li>• Sándalo</li> </ul>	3000 ppm	3000 ppm	3000 ppm	3000 ppm	3000 ppm
	1500 ppm	1500 ppm	1500 ppm	1500 ppm	1500 ppm
	300 ppm	300 ppm	300 ppm	300 ppm	300 ppm
	30 ppm	30 ppm	30 ppm	30 ppm	30 ppm
Control: Etanol	0 ppm	0 ppm	0 ppm	0 ppm	0 ppm

Las dosis aplicadas fueron las mismas para todos los hongos estudio.

Se realizaron todas las combinaciones (Tabla 6) y se puesieton tres repeticiones para la estadística. Los tratamiento se denominaron usando un código que indicaba el aceite y el tratamiento: “CiT3000”= citronela 3000 ppm; Ci=citronela, Me=melisa y Sa=sándalo.

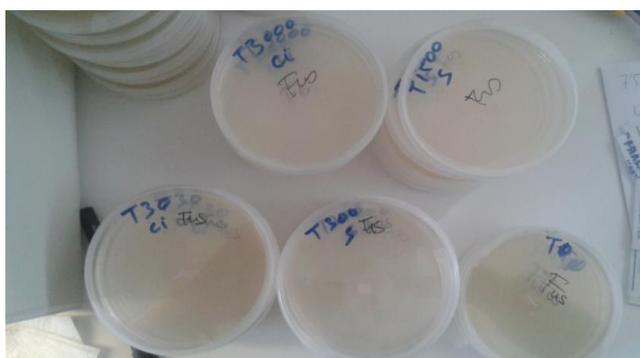
Una vez obtenidas las diluciones deseadas, se distribuye el medio en placas Petri de 90mm de diámetro (25 ml/placa). El total de placas utilizadas son: 3 aceites esenciales (Citronela, Melisa y Sándalo) x 5 tratamientos (T0, T3000, T1500, T300, T30) x 5 patógenos (*Alternaria*, *Botrytis*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*) x 3 repeticiones = 225 placas.

En cada placa se colocó en primer lugar, con la ayuda de un bisturí y en cabina de flujo laminar, un trozo de micelio de cada hongo (5x5 mm aproximadamente) (Figura 24), extraído de la periferia de la colonia de partida (en los bordes presenta crecimiento activo mientras que en el centro el micelio es más viejo).

En el lugar de contacto del micelio con el medio, se marca un punto y se trazan dos rectas perpendiculares respecto al punto con ayuda de una regla para poder hacer las mediciones de crecimiento del hongo en las semanas siguientes. Después de esto, las placas son selladas con parafilm e incubadas en oscuridad en cámara de crecimiento a 23-24°C.

Se realizaron mediciones semanales de los dos diámetros de la colonia y se estimó su superficie utilizando como radio la mitad de la media de los dos diámetros:  $\text{radio } (r) = \text{media diámetros}/2$ ;  $\text{superficie} = \pi r^2$ .

Aunque los datos utilizados se registraron semanalmente para el estudio estadístico posterior solo se emplearon lo que corresponden a la cuarta semana de crecimiento.



**Figura 24:** placas con medio PDA con sus correspondientes concentraciones de A.E.

### **4.3. Ensayos in vivo sobre material vegetal (naranjas)**

El objetivo es analizar el control biológico proporcionado por los aceites esenciales elegidos sobre los hongos oportunistas en estudio, en el material vegetal seleccionado que en este caso han sido naranjas frescas cosechadas.

Para la realización de este estudio in vivo, las naranjas seleccionadas totalmente sanas, sin ningún tipo de herida, golpe o fisiopatía previa, se lavaron, se secaron, se inocularon dentro del laboratorio de Fitopatología de la E.T.S.II.AA., de Palencia a temperatura ambiente y se introdujeron de dos en dos, en envases de plástico convencionales sellados para conservar y mantener los volátiles de los aceites que fueron impregnados en un trozo de papel y depositado en medio de las naranjas a observar. Los ensayos que se han realizado se basan en la inoculación directa de propágulos fúngicos mediante dos cortes paralelos en la superficie de cada una de las naranjas. La inoculación se ha realizado inmediatamente seguida al corte, sin ningún tiempo de espera.

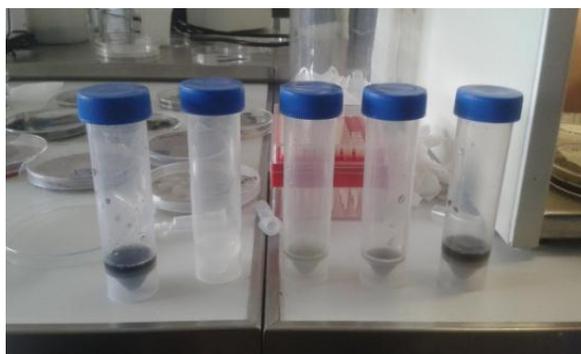
Los aceites esenciales se han aplicado en las concentraciones correspondientes (iguales que en el ensayo de placa. Los aislados fúngicos con los que se han trabajado son los mismos que los usado in vitro: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Fusarium* y *Penicillium*.

Para la inoculación de los patógenos, se procede a la recogida de esporas de los aislados fúngicos a partir de cultivo en placa Petri con medio PDA que se había incubado en oscuridad a 23°C, durante una semana. La recolección se realiza mediante

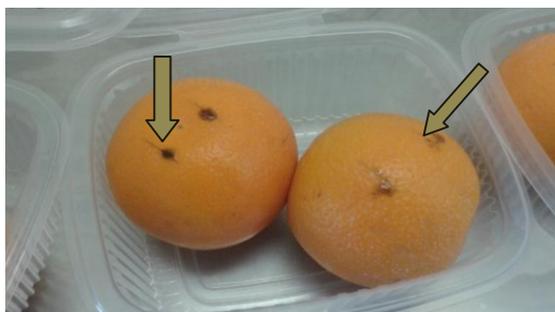
arrastre con agua destilada estéril y las muestras son recogidas en tubos Falcón 50 ml (Figura 25).

Una vez que se tiene la suspensión de esporas, se procede al conteo de ellas en cada aislado mediante cámara Thoma. Hecho el recuento de esporas, se infectan las naranjas. Para ello, con la ayuda de micropipetas se depositan 125.000 esporas en 100 microlitros de agua destilada, sobre los cortes superficiales que se hicieron anteriormente en cada naranja (Figura 26 y 27).

Tras la inoculación de las naranjas, se tomaron los datos del daño producido semanalmente. Para comprobar los daños que presentaban las naranjas, se midió con una regla el diámetro de micelio o de la mancha que presentaba cada una de ellas. El análisis estadístico se llevó a cabo con los datos de la cuarta semana tras la infección.



**Figura 25:** Tubos Falcon con solución de esporas, inoculación en naranjas.



**Figura 26:** Naranjas recién inoculadas, dos inoculaciones por naranja.



**Figura 27:** Naranjas recién inoculadas con *Alternaria* y T30 de aceite esencial de Sándalo impregnado en el filtro.

#### 4.4. Ensayos de germinación de esporas en placa de PDA

Para ver el efecto que los aceites esenciales de citronela, sándalo y melisa tienen sobre la germinación de esporas, se procede a la recogida de éstas de los aislados fúngicos a partir de cultivo en placa Petri con medio PDA que se había incubado en oscuridad a 23°C, durante una semana.

Las esporas recogidas y los tratamientos con aceite se juntaron a partes iguales (v/v) en crioviales de 2 ml (Figura 28). Se puso un volumen de 750 microlitros de la suspensión de esporas y un volumen equivalente del aceite esencial diluido. Se ensayaron solamente las dos dosis más elevadas de cada aceite (3000 ppm y 1500 ppm). Tras la incubación durante toda la noche se realizó el conteo de esporas germinadas en relación a las esporas totales para establecer un porcentaje de germinación. El recuento de esporas se llevó a cabo mediante microscopio óptico y se repitió tres veces en diferente campo visual del portaobjetos.



**Figura 28:** Crioviales con esporas, evaluación de germinación.

#### 4.5. Análisis estadístico.

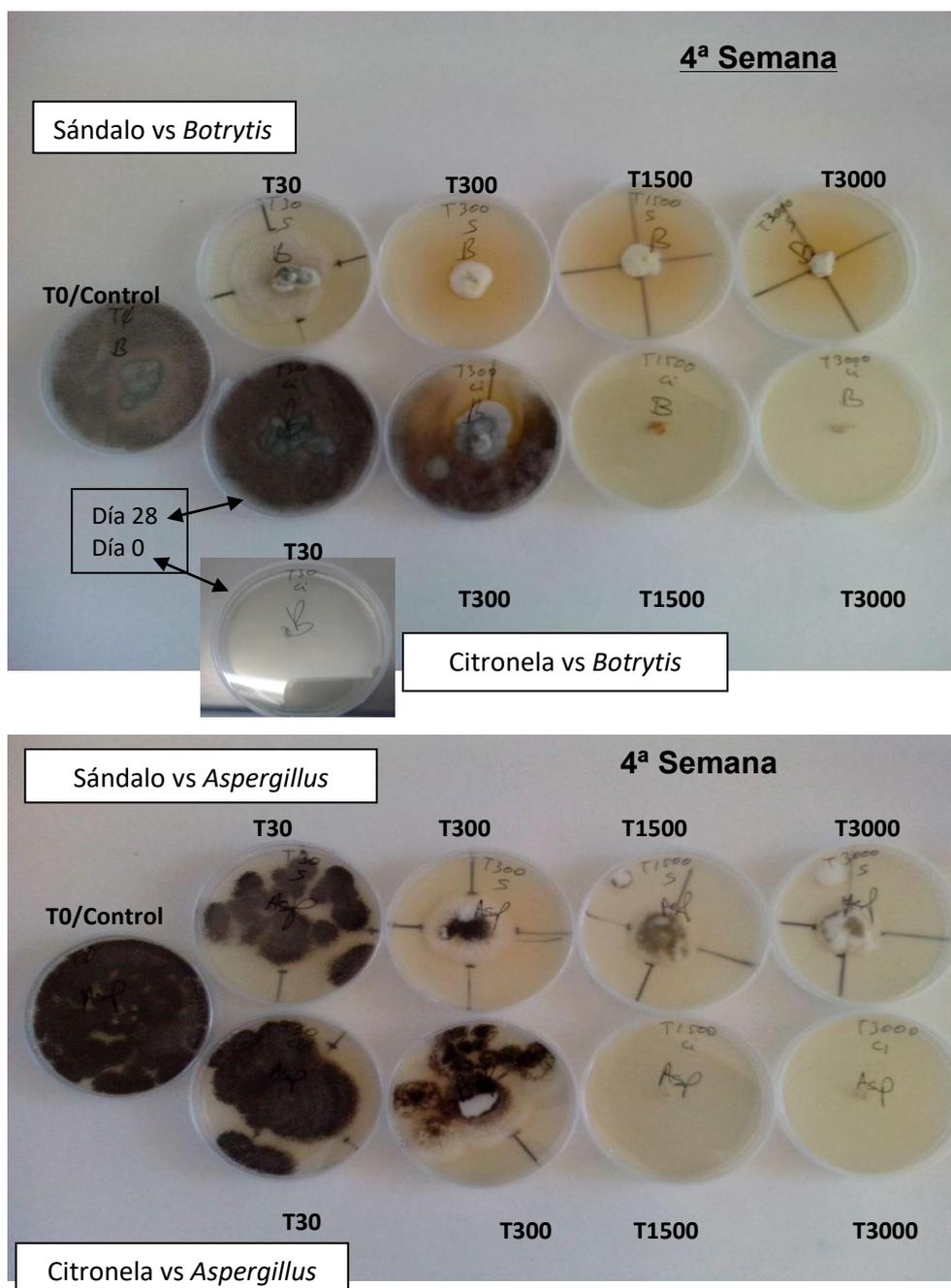
Los análisis estadísticos preliminares se realizaron con el software STATGRAPHICS Centurión XVI Versión 16.1.17 32-bits. Los resultados indicaron falta de normalidad y homoscedasticidad de los datos y por ello se realizaron los test no paramétricos Kruskal-Wallis (análisis de factor para la evaluación de las variables a estudiar) y U de Mann-Whitney (para las comparaciones por pares posteriores cuando el test de Kruskal-Wallis indicaba diferencias estadísticamente significativas) con el software STATISTICA v.9.

La descriptiva y gráficas fueron construidas con el software habitual de Microsoft.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Ensayos in vitro en PDA

Tal y como se describe en Material y Métodos, los ensayos fueron realizados en placas con PDA (Figura 29) conteniendo diferentes dosis del aceite esencial correspondiente (citronela, sándalo o melisa), a 30, 300, 1500 y 3000 ppm (T30, T300, T1500 y T3000), y un control (T0) que no contenía aceite esencial, sólo el vehículo alcohólico, repitiéndose cada combinación aceite-patógeno, tres veces.



**Figura 29:** Cultivo en PDA: desarrollo de *Botrytis* (arriba) y *Aspergillus* (abajo) a diferentes concentraciones de A.E. sándalo y citronela; 4ª semana de cultivo. En la imagen: B: *Botrytis*, ASP: *Aspergillus*, S: sándalo, Ci: citronela, T(): Tratamiento (ppm).

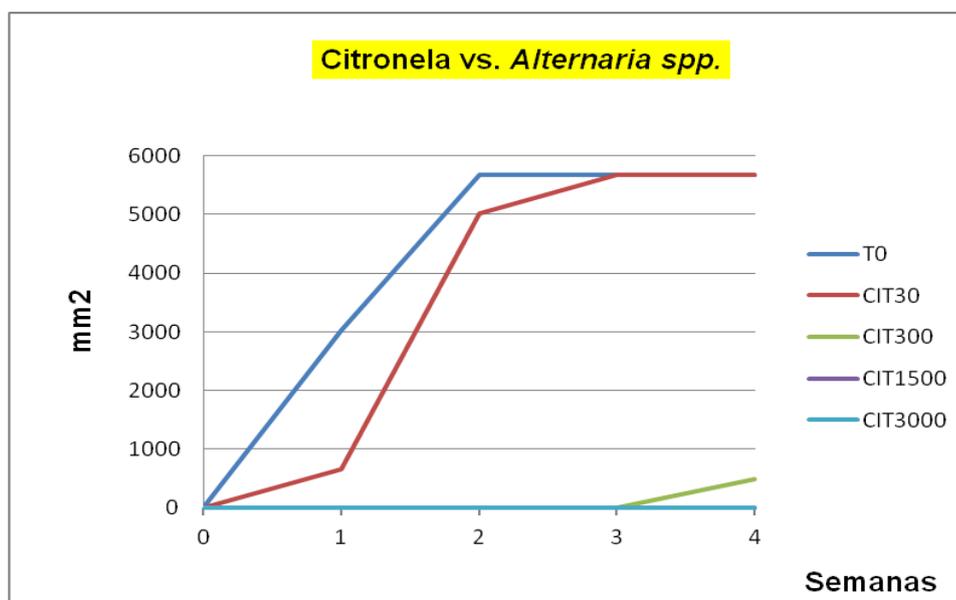
Los resultados obtenidos de cada combinación, durante las cuatro semanas del estudio, son representados en este apartado de Resultados y Discusión, en diagramas lineales, junto con los comentarios explicativos pertinentes para su evaluación.

Se decidió evaluar los datos estadísticamente a la 4ª semana del ensayo en todas sus variantes ya que el crecimiento de los hongos en ese punto se estabilizaba (El valor máximo alcanzable es de 5675mm<sup>2</sup> correspondiendo al 100% de la placa cubierta).

### 5.1.1. Desarrollo fúngico con A.E. citronela

Las gráficas siguientes son un resumen de cómo actúa el aceite esencial de citronela en función de su concentración, con cada uno de los patógenos a lo largo de las cuatro semanas de crecimiento en placa Petri con medio PDA y la efectividad de cada concentración durante las diferentes semanas sobre los hongos de estudio.

#### ❖ Citronela vs. *Alternaria spp.*



**Figura 30:** Evolución semanal del crecimiento de *Alternaria spp.*, en placa frente a tratamientos con A.E. citronela. Tratamientos: T0 (control), CITxxx (tratamientos con citronela, xxx: dosis (ppm)).

Lo que se puede apreciar en esta gráfica (Figura 30) a primera vista, es que efectivamente, el aceite esencial de citronela, ejerce un control sobre el crecimiento normal del hongo. Inhibe el crecimiento del patógeno a estudiar incluso veintiocho días después del inicio de los ensayos, eso sí, en función de la concentración suministrada de aceite, que en este caso es a 3000 ppm (CIT3000).

Se podría decir que el comportamiento de *Alternaria spp.*, frente a citronela en la gráfica anterior, es revelador; se produce un control superior al 90% del hongo con dosis de 300 ppm (CIT300), donde el hongo se mantiene paralizado o inactivo durante las tres primeras semanas del estudio.

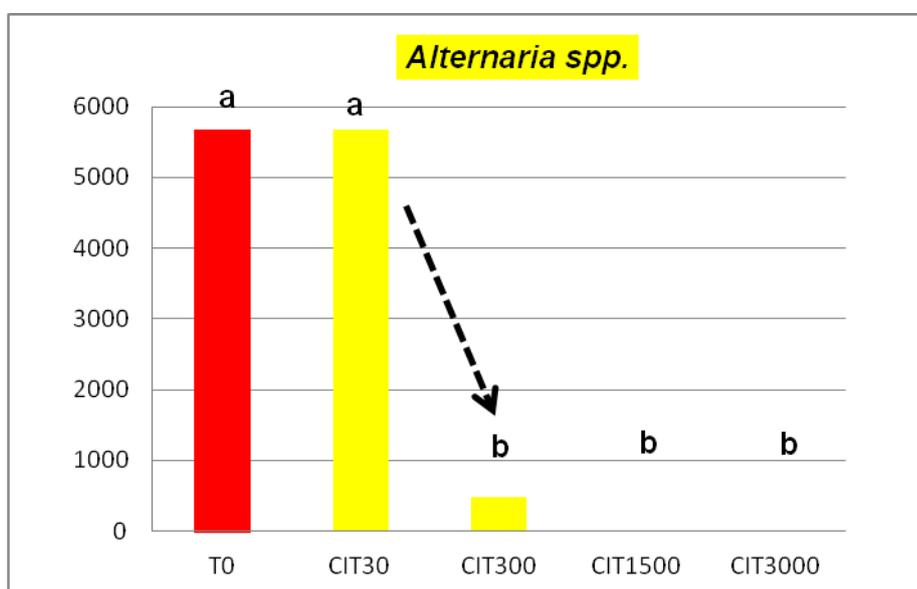
A partir de los 21 días, la eficacia de los volátiles va decayendo y el hongo empieza a crecer levemente como se puede ver a la 4ª semana donde su desarrollo es de un 8,6% en placa (Figura 30), y éste se mantiene estático incluso hasta los 35 días de su incubación.

Decir que el tratamiento CIT300 (300 ppm de citronela), es una dosis efectiva para el control de este fúngico en este ensayo.

En este estudio se han testado mayores concentraciones como 1500 y 3000 ppm de citronela, donde *Alternaria spp.*, no muestra crecimiento en ningún momento del ensayo, ni a la 5ª semana de incubación en placa, pero el objetivo de este ensayo es buscar las dosis que reduzcan o que provoquen un cambio en el patrón de crecimiento del patógeno y citronela lo consigue a una concentración de 300 ppm.

Para dar validez a las tendencias observadas en la estadística descriptiva y expresar con rigor estadístico si existen diferencias entre tratamientos se analizan los datos obtenidos en la cuarta semana estadísticamente para ver si realmente hay diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

El resultado de los análisis estadísticos cuyos datos son representados en el diagrama siguiente (Figura 31) muestran en el Test Kruskal-Wallis para la variable independiente "tratamiento" valores de:  $H(4, N=15)=13,14286$ , con una probabilidad de  $p=0,0106$ , que indica que existen diferencias significativas entre los tratamientos utilizados. El test U Mann-Whitney en la comparación por pares indica que hay diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,05$ ) entre los distintos tratamientos representadas con diferentes letras.



**Figura 31:** Crecimiento de *Alternaria spp.*, con citronela a la 4ª semana *in vitro*. En rojo el control (T0); en amarillo los resultados respecto a los diferentes tratamientos con citronela (ppm): (CIT30, CIT300, CIT1500 y CIT3000). Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney  $p>0,05$ ).

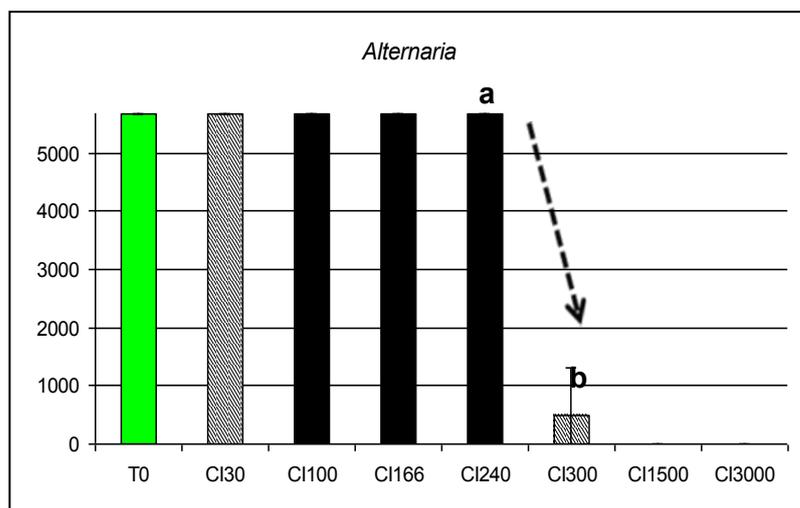
Interpretando los resultados de los test no paramétricos anteriores, se observa que hay diferencias significativas entre tratamientos con citronela. En concreto se producen

entre los tratamientos CIT30 y CIT300 primeramente, produciéndose a esa concentración de 300 ppm, el cambio en el crecimiento del hongo, y es la mínima dosis que ejerce un control sobre el patógeno. También hay diferencias significativas entre CIT30 con CIT1500 y CIT3000, pero no se tienen en cuenta como dosis mínima.

A la vista de estos resultados se ha realizado un estudio simultaneo (Novoa, 2017) en el que se ensayan dosis intermedias de citronela entre 30 y 300 ppm, como son 100, 166 y 240 ppm, los resultados muestran que dichas concentraciones no fueron efectivas, es decir, que no ejercieron ningún cambio en la dinámica de crecimiento del hongo, ya que con las tres dosis anteriores testadas, el desarrollo del hongo era del 100% de la placa (Figura 32).

Este dato confirma entonces, que 300 ppm de citronela, se puede tomar como valor significativo de reducción en el crecimiento del hongo, que aunque no es completa al 100%, sí ejerce un control sobre éste, que debilita o desacelera su desarrollo.

Todo lo anterior comentado se presenta en la gráfica siguiente (Figura 32), realizada por Novoa, (2017), en la que aparecen sus propios datos junto a las concentraciones testadas en este ensayo y que le fueron facilitadas en su momento mediante comunicación personal por el Tutor de este proyecto.

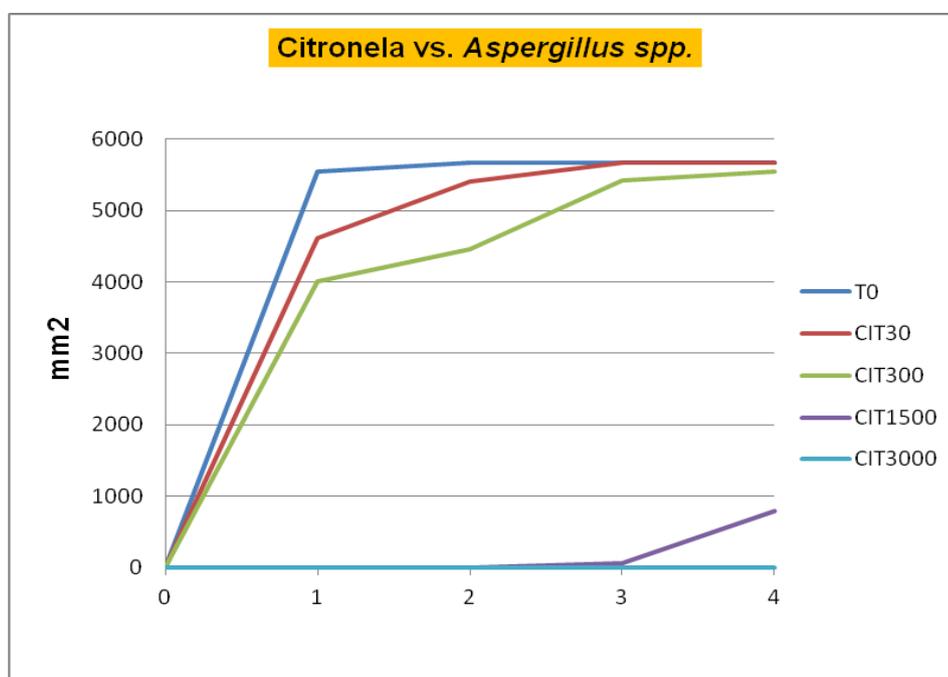


**Figura 32:** Crecimiento de *Alternaria* con aceite de citronela. Control (T0); en negro citronela a diferentes concentraciones (CI100, CI166 y CI240); en rayas (CI30, CI300, CI1500 y CI3000), resultados del presente trabajo. (Novoa, (2017)).

Revisando otros artículos científicos en la bibliografía disponible, se encuentra que para *Alternaria alternata*, *A. solani*, *A. tinuissima*, la concentración mínima inhibitoria (C.M.I. en la que el control sobre los hongos es del 100%), se alcanza con 500 ppm de aceite esencial de citronela, y su efectividad se mantiene hasta 210 días. También en este mismo estudio, se evaluaron dosis mayores (1000 ppm y 1500 ppm), obteniéndose los mismos resultados que con 500 ppm (Mishra & Dubey, 1994). En India, se realizó otro ensayo con citronela (*Cymbopogon flexuosus*) a diferentes concentraciones para comprobar qué efecto tiene este aceite contra los hongos postcosecha como *Alternaria alternata* y otros, donde los resultados obtenidos muestran que el aceite de citronela en función de la concentración tiene efecto fungistático o fungicida y las concentraciones mínimas inhibitorias del crecimiento micelial se pueden establecer a partir de 200ppm, (Shahi, Patra, Shukla & Dikshit, 2003).

### ❖ Citronela vs. *Aspergillus spp.*

En la gráfica (Figura 33) que se presenta a continuación, se refleja la evolución del desarrollo de *Aspergillus spp.*, respecto a diferentes tratamientos con A.E. de citronela durante las cuatro semanas de incubación en placa.



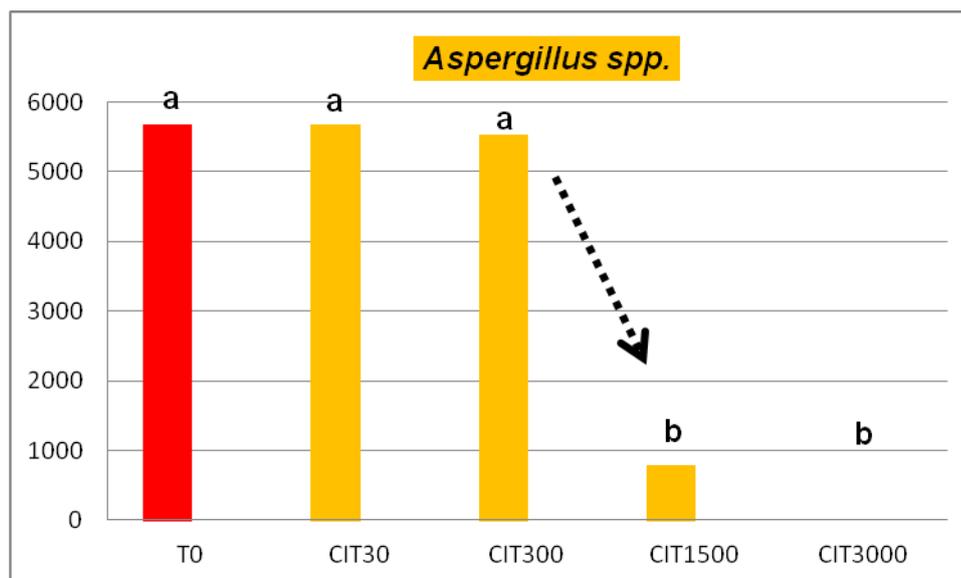
**Figura 33:** Evolución semanal del crecimiento de *Aspergillus spp.*, en placa frente a tratamientos con A.E. citronela. Tratamientos: T0 (control), CITxxx (tratamientos con citronela, xxx: dosis (ppm)).

Con *Aspergillus spp.*, las dosis efectivas de citronela para su control, son mayores, como se puede apreciar en la figura 33, que con respecto a *Alternaria spp.*, (CIT300 ppm).

Se observa que la dosis que aparentemente inhibe al hongo a lo largo del periodo establecido, según este estudio, es el tratamiento CIT1500, ya que dosis inmediatamente menores estudiadas como la de 300 ppm (CIT300), no controla al hongo ni en la primera semana de cultivo; no modificando en ningún momento su comportamiento.

Con la concentración de 1500 ppm (CIT1500), se ve cómo el hongo está completamente inhibido hasta los 21 días, sin embargo, con CIT3000, no hay evidencia del hongo en 35 días de estudio. Se podría pensar que las dosis efectivas están entre 300 y 1500 ppm.

Los datos analizados estadísticamente se representan en la gráfica siguiente (Figura 34), donde se muestran las diferencias significativas entre los tratamientos CIT300 y CIT1500, tal y como se esperaba, según los resultados obtenidos mediante los tests de Kruskal-Wallis test:  $H(4, N=15) = 12,84298$   $p = 0,0121$ , (revela que existen diferencias significativas en el conjunto de los tratamientos utilizados) y el test U Mann-Whitney indica que hay diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos.



**Figura 34:** Crecimiento de *Aspergillus spp.*, con aceite esencial de citronela a la 4ª semana *in vitro*. En rojo el control (T0); en naranja los resultados respecto a los diferentes tratamientos con citronela (ppm): (CIT30, CIT300, CIT1500 y CIT3000). Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney  $p > 0,05$ ).

Observamos en el diagrama (Figura 34) que la dosis efectiva o el valor significativo de reducción, que merma el crecimiento del *Aspergillus spp.*, en este trabajo se podría establecer en CIT1500, pero se deberían hacer futuros estudios entre tratamientos intermedios (CIT300 y CIT1500), para obtener concentraciones mínimas efectivas más ajustadas (lo que representa una economía en la aplicación de tratamientos).

Mishra & Dubey, (1994), en un trabajo llevado a cabo en la India sobre el control de *Aspergillus flavus* en productos almacenados de arroz y trigo con aceite esencial de citronela, revela el control de este hongo en un 100% a una concentración de 1000 ppm de aceite, sin mermar la capacidad germinativa de las semillas y el vigor de la plántula tras su emergencia y desarrollo. Encontraron que para concentraciones de 500ppm la inhibición de *Aspergillus flavus* alcanzaba un 52%. Las dosis superiores de 1000 ppm exhibían un comportamiento fungistático (inhibición crecimiento 100%), mientras que a 2000 y a 3000 ppm, presentaban fungitoxicidad (muerte del hongo). También estudiaron *in vitro*, otras especies de *Aspergillus* como *Aspergillus niger* y *Aspergillus parasiticus*, cuya inhibición completa se alcanzaba con 500 ppm de aceite, mientras que *A. candidus*, *A. koningi*, *A. luchuensis*, *A. nidulans* y *Aspergillus terreus*, su C.M.I., se establecía en 1000 ppm, y por último, *Aspergillus sulphureus*, *A. okazakii* y *A. fumigatus*, su inhibición del 100% se ejercía con 1500 ppm de citronela. En este trabajo se probaron previamente sobre *Aspergillus flavus*, otros 11 aceites esenciales de plantas superiores como *Pinus sp.*, *Mentha viridis*, *Juniperus comminis*, *Curcuma longa*, *Citrus sinensis*, *Citrus reticulata*, entre otras, resultando el más efectivo el de *Cymbopogon citratus*. Asimismo, el aceite de citronela fue comparado a diez tratamientos de síntesis química, siendo varias veces superior a todos ellos.

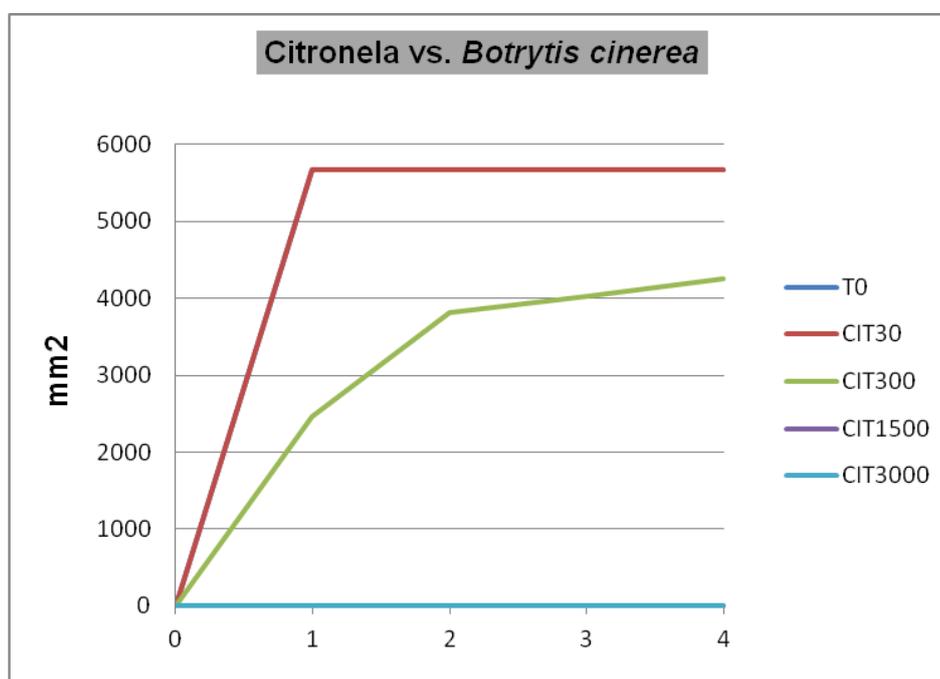
La actividad antifúngica de *Cymbopogon citratus* probada frente a cuatro especies de *Aspergillus* (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus ochraceus* y *Aspergillus niger*) fue eficiente contra todas ellas y en este ensayo el 100% del control en los hongos se alcanzó con 5000ppm. (Shaaban, Ramadan, Amer, El-Sideek &

Osman, 2013). Otro ensayo realizado con citronela (*Cymbopogon flexuosus*) contra los hongos postcosecha *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. parasiticus*, *Cladosporium cladosporioides*, *Colletotrichum capsici*, *C. falcatum*, *Curvularia lunata*, *Fusarium cerealis*, *F. culmorum*, *F. oxysporum*, *F. udum*, *Gloeosporium fructigenum*, *Penicillium expansum*, *P. italicum*, *P. implicatum*, *P. digitatum*, *P. minio-luteum*, *P. variable*, *Botrytis cinerea*, *Helminthosporium oryzae*, *H. maydis*, *Phoma violacea*, y *Rhizopus nigricans*, muestran que el aceite en función de la concentración tiene efecto fungistático o fungicida pero que controla en todos los casos el desarrollo micelial de todos ellos.

En relación con las especies coincidentes con las usadas en el presente estudio se vio que las concentraciones mínimas inhibitorias son de 200 ppm para *Alternaria spp*, 400 para *Aspergillus spp*, *Fusarium spp* y *Penicillium spp.*; y 500ppm para *Botrytis cinerea*, (Shahi et al., 2003).

#### ❖ Citronela vs. *Botrytis cinerea*

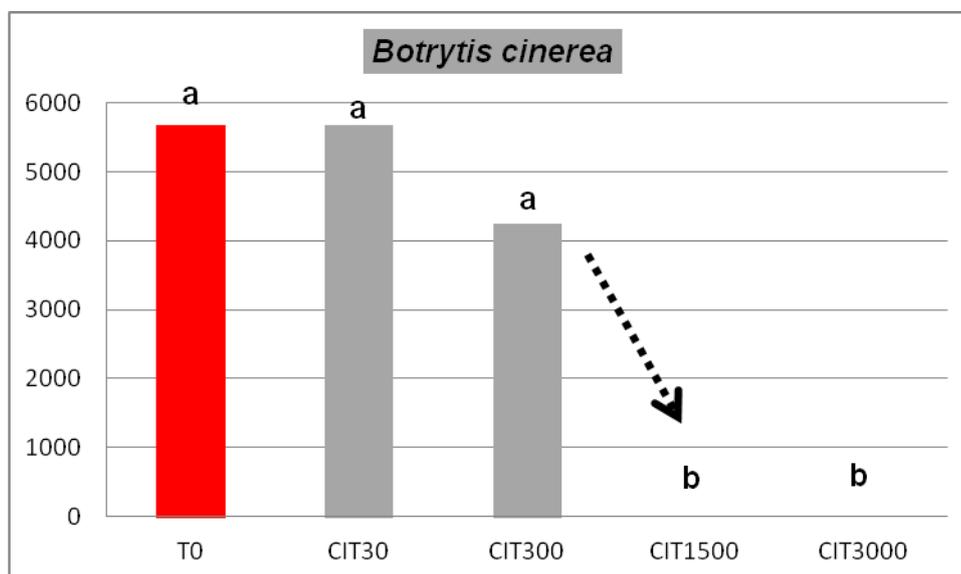
Los resultados de este ensayo (Figura 35) muestran que la dosis efectiva en la que se produce un control para *Botrytis* se encuentra entre CIT300 y CIT1500, ya que a la dosis de 1500ppm, el hongo es inhibido completamente. Con la concentración de 300ppm (CIT300), el desarrollo de *Botrytis* a la 4ª semana es del 75% y en la 5ª semana es del 100%, pero es a partir de esta dosis donde el hongo presenta cambios en su desarrollo de crecimiento.



**Figura 35:** Evolución semanal del crecimiento de *Botrytis cinerea*, en placa frente a tratamientos con A.E. citronela. Tratamientos: T0 (control), CITxxx (tratamientos con citronela, xxx: dosis (ppm)).

Analizando los datos estadísticamente y representándolos, se obtiene la gráfica que se muestra a continuación (Figura 36) donde se indican los valores estadísticamente

significativos. El análisis de conjunto indica diferencias significativas (Kruskal-Wallis test:  $H(4, N=15) = 13,16418$   $p = 0,0105$ ) y el test U Mann-Whitney indica que hay diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos.



**Figura 36:** Crecimiento de *Botrytis cinerea*, con citronela a la 4ª semana *in vitro*. En rojo el control (T0); en gris los resultados respecto a los diferentes tratamientos con citronela (ppm): (CIT30, CIT300, CIT1500 y CIT3000). Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney  $p > 0,05$ ).

La comparación por pares (test U de Mann-Whitney) indica que la dosis que ejerce un cambio o inhibición en el crecimiento del hongo, se establece entre los tratamientos CIT300 y CIT1500.

Si comparamos con resultados de otros autores (Shahi *et al.*, 2003), se ve como *Botrytis* es inhibida con una concentración en placa de 500 ppm, por lo que deberíamos probar tratamientos intermedios entre 300 y 1500 ppm de citronela para obtener concentraciones efectivas y mínimas, ya que el salto entre 300 y 1500 es demasiado amplio y quizás 500 ppm podría ser una dosis efectiva como se ve en el citado artículo.

En la fotografía siguiente (Figura 37), propia del ensayo, se aprecia el crecimiento de *Botrytis* en la 4ª semana de incubación con los respectivos tratamientos de citronela.

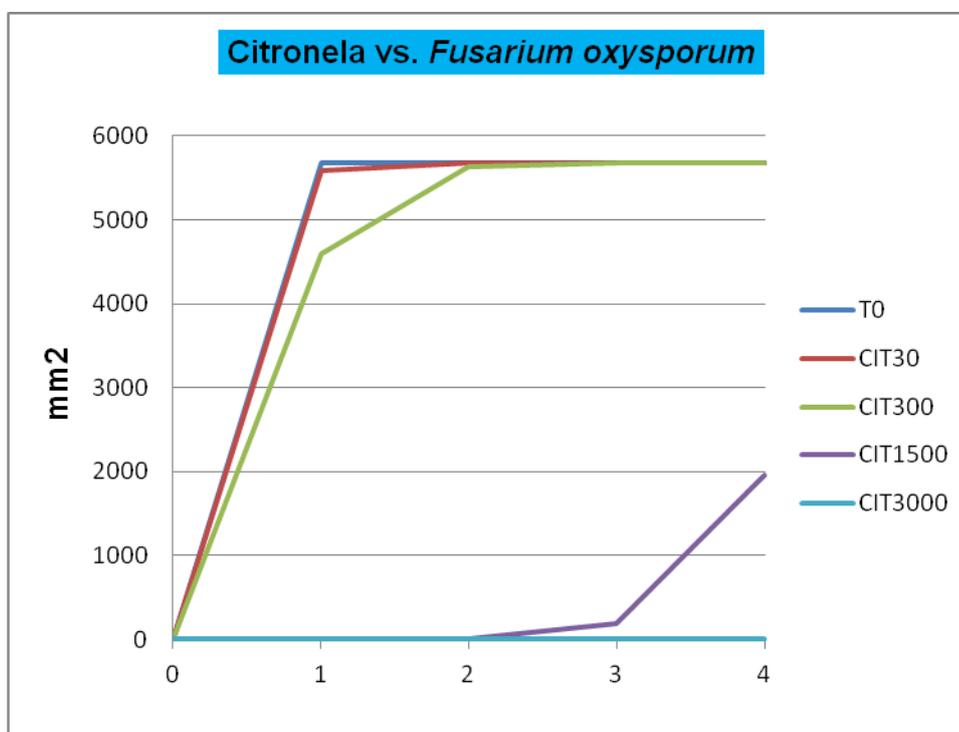


**Figura 37:** *Botrytis cinerea* en cuarta semana de desarrollo en placa PDA con diferentes tratamientos citronela. Txxx: Tratamiento (ppm); Ci: citronela; B: *Botrytis cinerea*.

En un ensayo llevado por los investigadores Abd-Alla, Abd-El-Kader, Abd-El-Kareem & El-Mohamedy, (2011), tanto *in vitro* como *in vivo* (en fresa), se observa la eficacia del aceite de citronela frente a *Bortrytis cinerea* tanto en su fase de vapor como líquida. Los resultados *in vitro* indicaron que los tratamientos de aceite en forma de vapor redujeron significativamente el crecimiento y la germinación de esporas de *B. cinerea*. La inhibición completa del crecimiento y germinación con vapores se alcanzó a la dosis de 100 ppm, mientras que el ensayo llevado a cabo en PDA, para una inhibición del 100%, se necesitó 5 veces dicha concentración (500ppm).

#### ❖ Citronela vs. *Fusarium oxysporum*

*Fusarium spp*, otro hongo muy común en enfermedades pre y postcosecha y difícil de controlar con productos químicos de síntesis, ve modificado su crecimiento tal y como se ve representado en la gráfica siguiente (Figura 38).

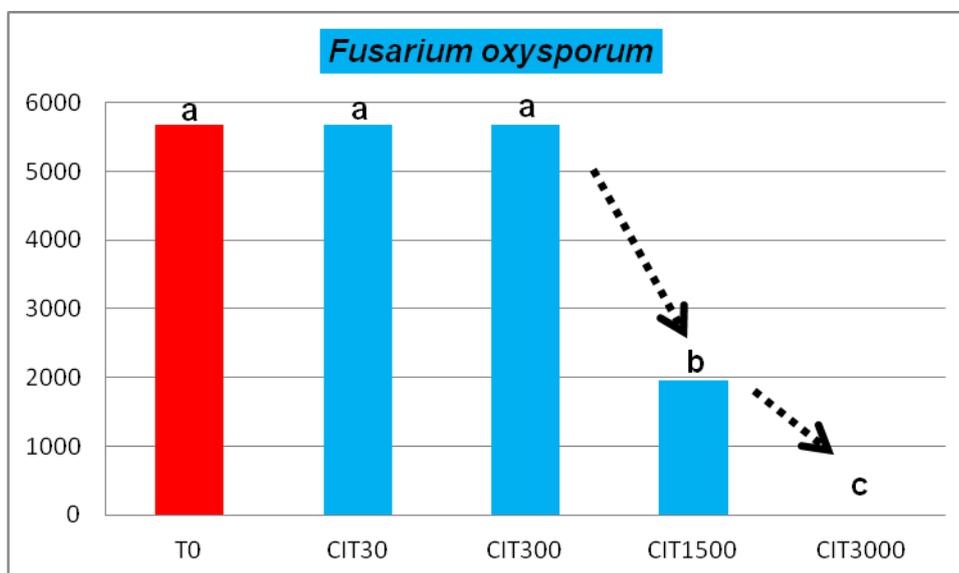


**Figura 38:** Evolución semanal del crecimiento de *Fusarium oxysporum*, en placa frente a tratamientos con A.E. citronela. Tratamientos: T0 (control), CITxxx (tratamientos con citronela, xxx: dosis (ppm)).

Se aprecia reducción con concentraciones de citronela de 1500 ppm. A menores concentraciones (300 ppm) su crecimiento en placa es casi del 100% incluso en la primera semana, mientras que con dosis de 1500 ppm se mantiene casi inactivo durante tres semanas y es a partir de ahí cuando empieza un leve desarrollo llegando a un 35% en la cuarta semana. Para la dosis más alta (3000 ppm) el hongo permanece totalmente inactivo durante las 4 semanas de evaluación en placa.

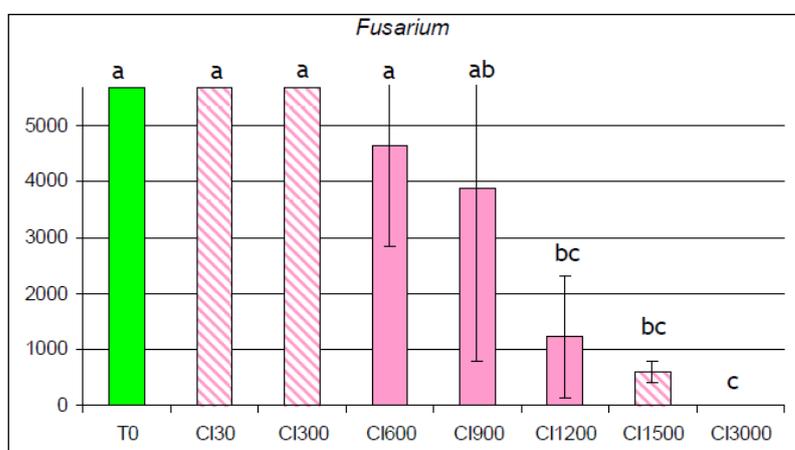
Para certificar las observaciones y poder tener más información acerca de los valores o dosis que podrían ser estadísticamente significativas se analizan los datos de la cuarta

semana (Kruskal-Wallis test:  $H(4, N=15) = 13,87156$   $p = 0,0077$ ). En vista de la significación se hacen las comparaciones por pares de los datos recogidos (U de Mann-Whitney), y se observan diferencias significativas entre 300 ppm, 1500 ppm y 3000 ppm (Figura 39).



**Figura 39:** Crecimiento de *Fusarium oxysporum*, con citronela a la 4ª semana *in vitro*. En rojo el control (T0); en azul los resultados respecto a los diferentes tratamientos con citronela (ppm): (CIT30, CIT300, CIT1500 y CIT3000). Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney  $p > 0,05$ ).

En este caso concreto de *Fusarium oxysporum*, se tienen dos dosis que presentan diferentes efectividades en el control del desarrollo del hongo. Hay un cambio en la dinámica de crecimiento entre tratamientos CIT300 y CIT1500, y entre CIT1500 y CIT3000. La dosis de 1500 ppm produce una reducción significativa y la segunda reducción significativa producida por 3000 ppm inhibe completamente el crecimiento. Novoa (2017) ensayó dosis intermedias entre 300 y 1500 ppm, como son 600 ppm, 900 ppm y 1200 ppm correspondientes a los tratamientos CI600, CI900 y CI900 (Figura 40). En ella se representan en color plano los resultados de Novoa y con rayas los correspondientes a este trabajo.

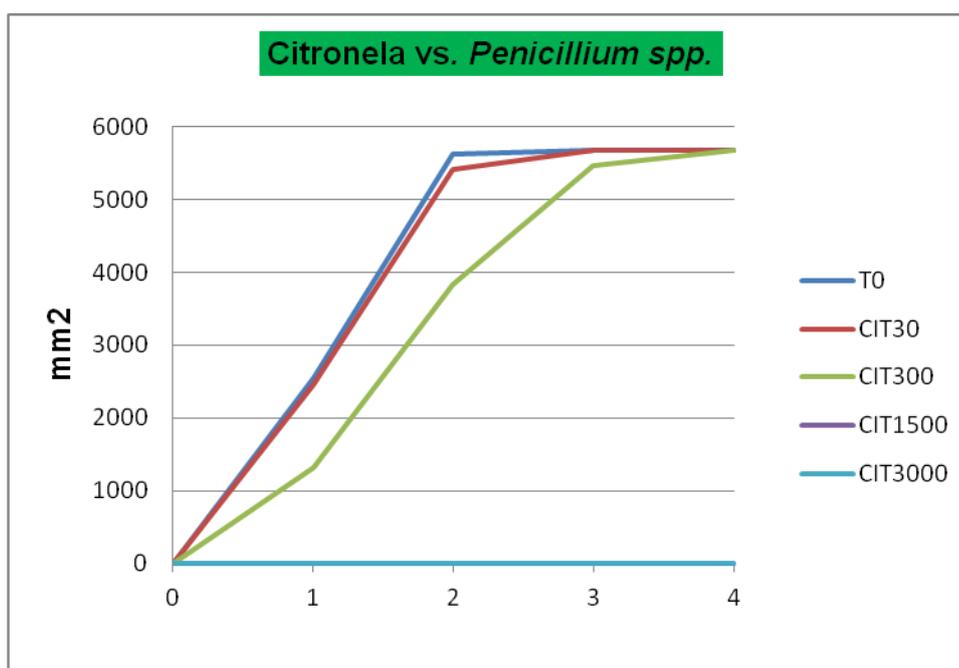


**Figura 40:** Crecimiento de *Fusarium oxysporum* con aceite de citronela. Control (T0); en rosa citronela a diferentes concentraciones (CI100, CI166 y CI240); en rayas (CI30, CI300, CI1500 y CI3000), resultados propios del presente trabajo. (Novoa, 2017).

Según vemos en este gráfico (Figura 40), las diferencias significativas con los valores de control frente a *Fusarium* se establecen en 1200 ppm. Si se tiene esto en cuenta y trabajos anteriores en los que se ha estudiado el *Fusarium spp*, se puede decir que su C.M.I. podría estar en torno 500-1000 ppm, (Mishra & Dubey, 1994; Sessou *et al.*, 2012), dependiendo de las características propias del aceite esencial de citronela (ecotipo y variedad de citronela), de la especie de *Fusarium* y en concreto para *Fusarium oxysporum* según Mishra & Dubey (1994), se establece en 500 ppm. Shahi *et al.*, (2003), establece que las concentraciones mínimas inhibitorias de aceite de citronella para *Fusarium spp* se encuentran a partir de 400 ppm variando en función de la especie de *Fusarium*. Igualmente Gawai (2015), encuentra efectividad con dosis desde 100 ppm a 1500 ppm aunque el aceite esencial mostró un mayor efecto inhibitor contra *F. moniliforme* y *F. oxysporum*, *F. udum*, y *F. solani*, y registró un menor efecto controlador con *F. roseum*, *F. semitectum* y *F. equiseti*.

#### ❖ Citronela vs. *Penicillium*

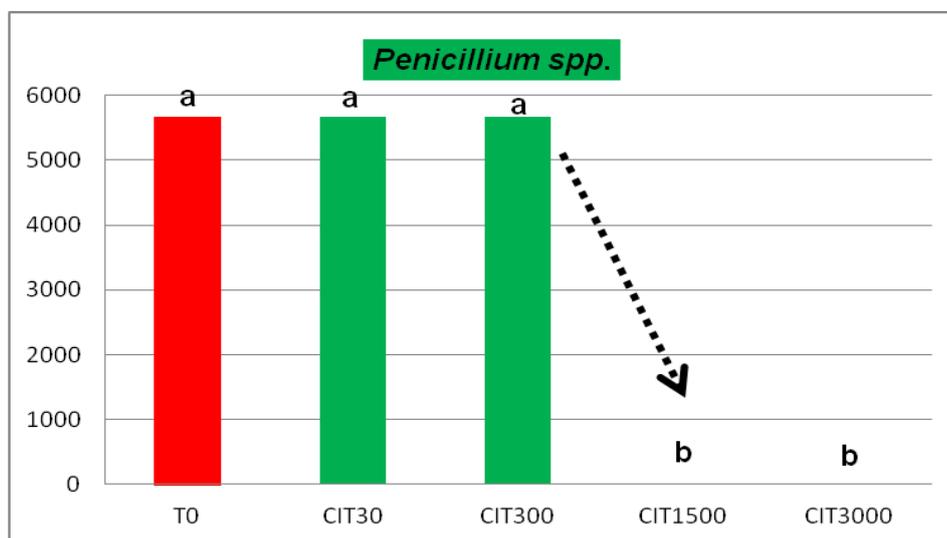
Con respecto a *Penicillium spp.*, las dosis ensayadas en este trabajo y que no presentan efectividad en el control del crecimiento del patógeno, se establecen en 30 ppm y 300 ppm, según apreciamos en la gráfica siguiente (Figura 41), mientras que con el tratamiento de citronela igual o superior a 1500 ppm (CIT1500), no hay rastro del hongo en las 4 semanas de observación.



**Figura 41:** Evolución semanal del crecimiento de *Penicillium spp.*, en placa frente a tratamientos con A.E. citronela. Tratamientos: T0 (control), CITxxx (tratamientos con citronela, xxx: dosis (ppm)).

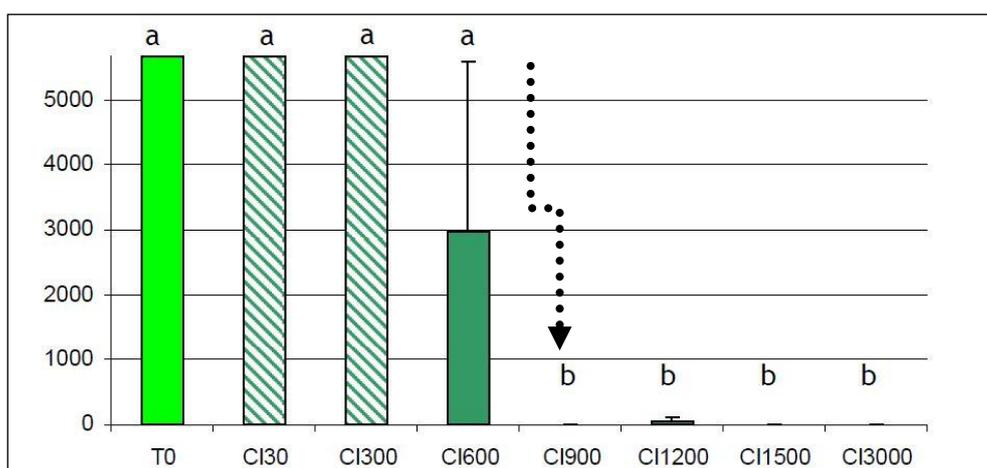
Por lo tanto, para establecer dosis que produzcan cambios en el crecimiento del hongo y haya una efectividad en el control con el aceite de estudio, se podría decir que estas dosis se encontrarían entre el intervalo de tratamientos CIT300 y CIT1500. Para comprobar dicha afirmación hacemos el análisis estadístico representado en la grafica

siguiente (Figura 42). El Test de Kruskal-Wallis test:  $H(4, N=15) = 14,00000$   $p = 0,0073$ , muestra diferencias altamente significativas, y el Test de Mann-Whitney, muestra que las diferencias se hallan entre tratamientos a 300 ppm y 1500 ppm.



**Figura 42:** Crecimiento de *Penicillium spp.*, con citronela a la 4ª semana *in vitro*. En rojo el control (T0); en verde los resultados respecto a los diferentes tratamientos con citronela (ppm): (CIT30, CIT300, CIT1500 y CIT3000). Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney  $p > 0,05$ ).

Como ocurre con *Fusarium oxysporum*, se han analizado dosis intermedias en nuestro laboratorio. Novoa (2017), cuenta con dosis testadas a 600, 900 y 1200 ppm (CI600, CI900 y CI1200), en las que se produce una modificación o cambio en el crecimiento del hongo a 900 ppm (CI900) (Figura 43). La dosis efectiva estaría entre 600 y 900 ppm (100% inhibición) y posteriores análisis podrían afinar aun más esta dosis efectiva.

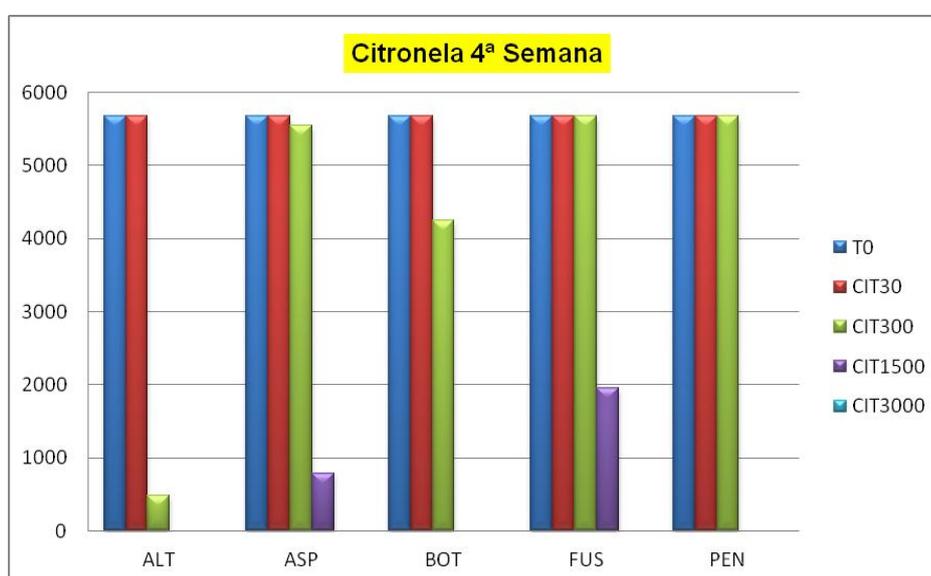


**Figura 43:** Crecimiento de *Penicillium spp.*, con aceite de citronela. Control (T0); en verde, citronela 600 ppm (CI600); en rayas (CI30, CI300), resultados propios del presente trabajo. (Novoa, 2017).

Sessou *et al.*, (2012), establece en su estudio que las C.M.I., para *Penicillium citrinum* se establecen en 600 ppm para un control del hongo del 80% y 800 ppm para un control del 100%, mientras que para *Penicillium brevicompactum* a 400 ppm la reducción en el desarrollo del hongo se reduce al 80%.

Teniendo en cuenta una visión global del ensayo de citronela se puede concluir que es un potente agente antifúngico que controla el crecimiento y desarrollo de hongos patógenos. El aceite de citronela se podría perfectamente utilizar como biopesticida en el control y manejo de enfermedades fúngicas postcosecha ya que se comprueba mediante este ensayo y muchos otros artículos científicos, su gran efectividad, muy superior a fungicidas químicos y a menores concentraciones.

En la última gráfica que se presenta en este apartado de estudio del aceite de citronela versus hongos fitopatógenos (Figura 44), se compara el efecto que tienen los distintos tratamientos frente a los distintos hongos de estudio.



**Figura 44:** Efecto de los diferentes tratamientos de citronela sobre los hongos fitopatógenos de estudio. T0: control, CITxxx: tratamiento con citronela a diferentes dosis en ppm. ALT: *Alternaria spp*, ASP: *Aspergillus spp*, BOT: *Botrytis cinerea*, Fus: *Fusarium oxysporum*, PEN: *Penicillium spp*.

Se observa en el diagram de barras, cómo el aceite de citronella ejerce un control sobre el patron de crecimiento del hongo, reduciendo su desarrollo en función de la concentración aplicada y de la susceptibilidad del hongo al aceite.

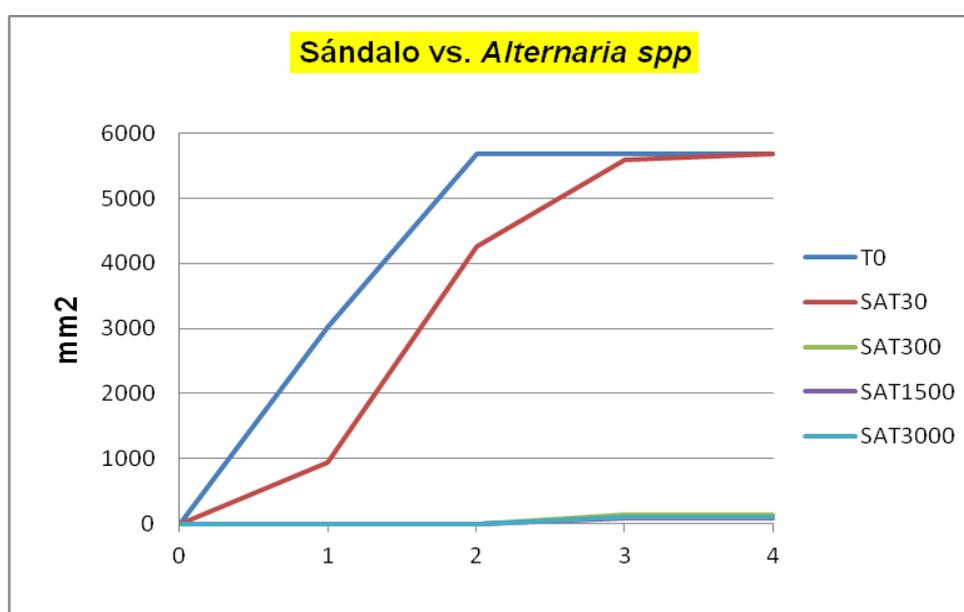
### 5.1.2. Desarrollo fúngico con A. E. sándalo.

#### ❖ Sándalo vs. *Alternaria*

El sándalo es un aceite esencial muy peculiar, poco conocido en occidente ya que su cultivo y uso, se dan principalmente en Asia. En el ensayo realizado frente a *Alternaria spp.*, el aceite esencial muestra un control bastante efectivo durante el periodo de estudio, según muestra la gráfica siguiente (Figura 45).

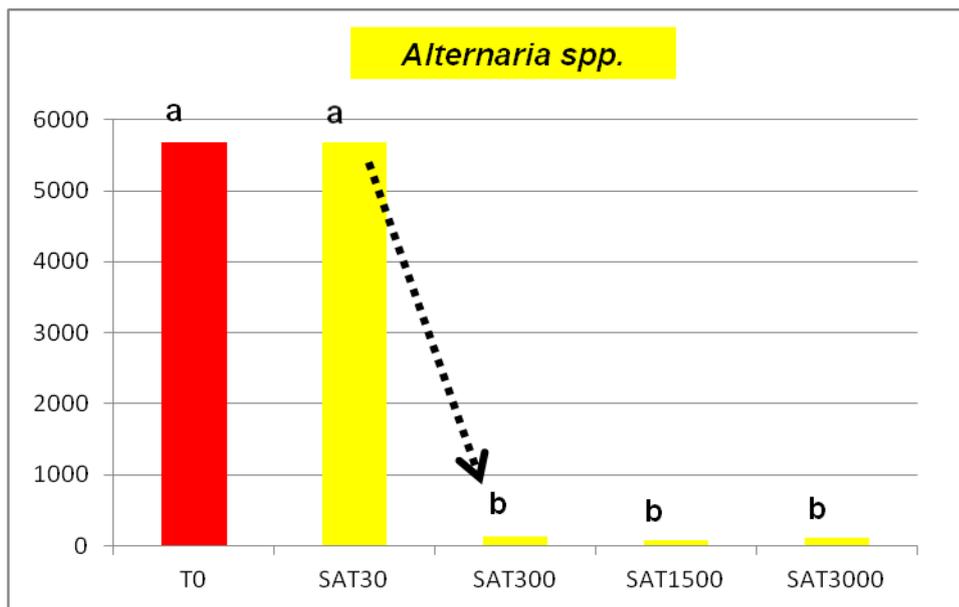
A dosis de 300 ppm de sándalo, incluso en la cuarta semana de incubación, el hongo presenta un desarrollo en placa del 2,3%. El tratamiento de 30 ppm (SAT30), ejerce un control muy leve en el hongo, mientras que a concentraciones mayores como 300 ppm, el control del hongo es del 95%, igual que ocurre con dosis superiores de 1500 ppm y 3000 ppm (98% y 99% de inhibición).

La dosis que ejerce un control en el crecimiento del hongo, se alcanza con 300 ppm.



**Figura 45:** Evolución semanal del crecimiento de *Alternaria spp.*, en placa frente a tratamientos con A.E. sándalo. Tratamientos: T0 (control), SATxxx (tratamientos con sándalo, xxx: dosis (ppm)).

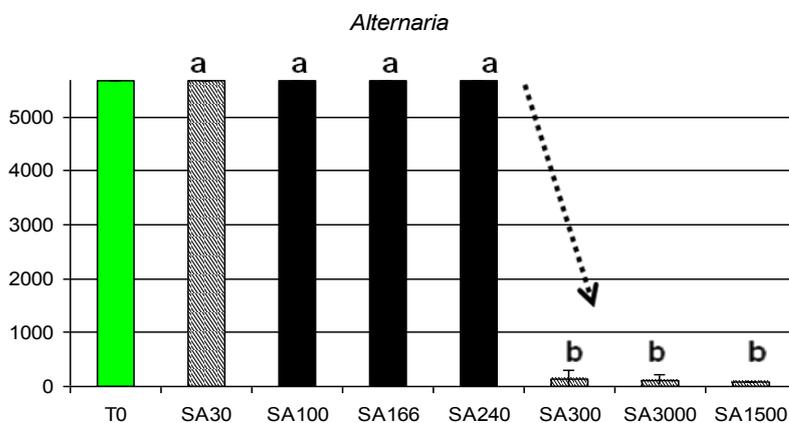
El resultado de los análisis estadísticos cuyos datos son representados en el diagrama siguiente (Figura 46) muestran en el Test Kruskal-Wallis para la variable independiente "tratamiento" valores de:  $H(4, N=15)=11,07314$ , con una probabilidad de  $p=0,0258$ , que indica que existen diferencias significativas entre los tratamientos utilizados.



**Figura 46:** Crecimiento de *Alternaria spp.*, con sándalo a la 4ª semana *in vitro*. En rojo el control (T0); en amarillo los resultados respecto a los diferentes tratamientos con sándalo (ppm): (SAT30, SAT300, SAT1500 y SAT3000). Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney  $p > 0,05$ ).

El test U Mann-Whitney en la comparación por pares indica que hay diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos. Los resultados estadísticamente significativos que se muestran en la gráfica anterior, se encuentran entre las dosis 30 ppm y 300 ppm. La concentración que ejerce un control en la reducción del desarrollo de *Aspergillus spp.*, se alcanza a 300 ppm, no existiendo más diferencias significativas con las dosis superiores.

Novoa (2017), ensayó concentraciones inferiores a 300 ppm, como 100 ppm, 166 ppm y 240 ppm, cuyos resultados estadísticos se representan en el diagrama a continuación (Figura 47), mostrando que no hay diferencias significativas entre ellos, ni con 30 ppm, ni el control (T0). Las diferencias significativas aparecen con la dosis de 300 ppm.



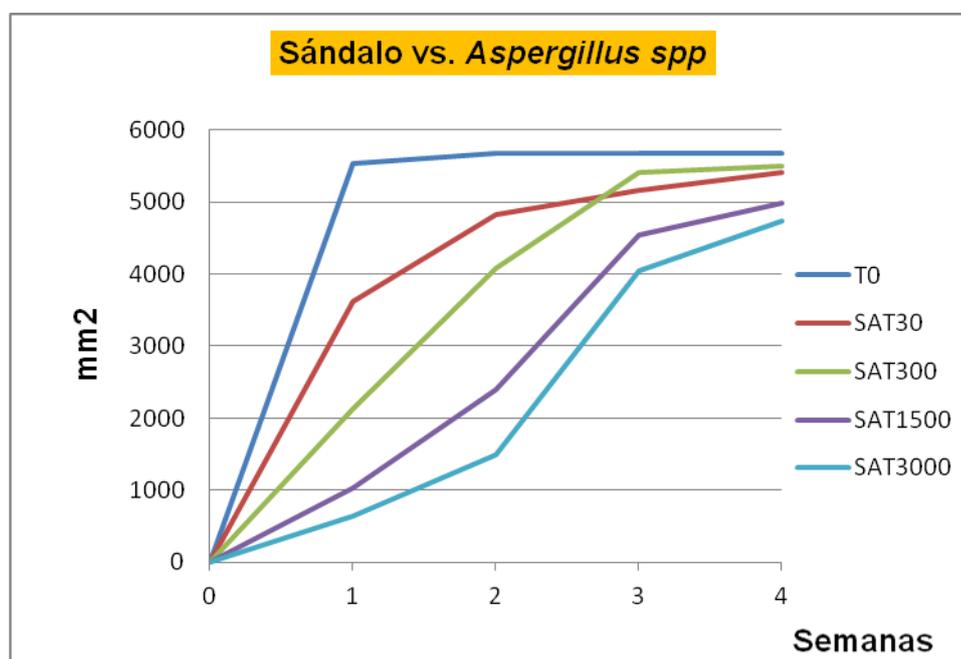
**Figura 47:** Crecimiento de *Alternaria spp.*, con aceite de sándalo. Control (T0); en negro, SAxxx : sándalo a diferentes concentraciones (ppm); en rayas: SA30, SA300, SA1500 y SA3000, resultados propios del presente trabajo. (Novoa, 2017).

Con los datos de Novoa (2017), y los de este estudio, se concluye que la dosis mínima efectiva para producir un efecto de control de *Alternaria spp.*, con aceite de sándalo, se establece en concentración mínima de 300 ppm, ya que dosis inferiores y superiores, no presentan diferencias significativas.

#### ❖ Sándalo vs. *Aspergillus spp.*

Con *Aspergillus spp.*, los tratamientos con sándalo no producen ningún control, o un control leve, tanto si se ensayan a dosis bajas, 30 ppm o a dosis elevadas, 3000 ppm, como se observa en la gráfica siguiente (Figura 48), en la cuarta semana del tratamiento. *Aspergillus spp.*, parece ser un hongo bastante tolerante o poco susceptible al aceite esencial de sándalo ya que sólo hay un leve control con dosis altas y en las dos primeras semanas según se representa en la gráfica de evolución.

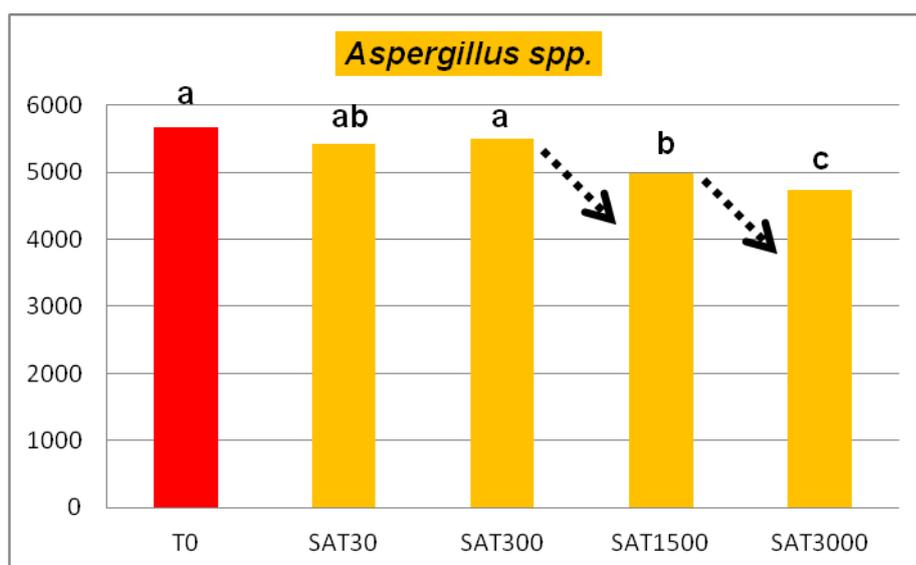
En la revisión bibliográfica no se ha encontrado ningún trabajo en el que se haya ensayado la combinación de este hongo con este aceite por lo que no tenemos referencias al respecto.



**Figura 48:** Evolución semanal del crecimiento de *Aspergillus spp.*, en placa frente a tratamientos con A.E. sándalo. Tratamientos: T0 (control), SATxxx (tratamientos con sándalo, xxx: dosis (ppm)).

Observando la gráfica anterior (Figura 48), no se pueden obtener más conclusiones, por lo que procede al análisis estadístico de los datos, para ver si hay diferencias significativas entre alguno de los tratamientos, que indique cambio en el crecimiento del hongo.

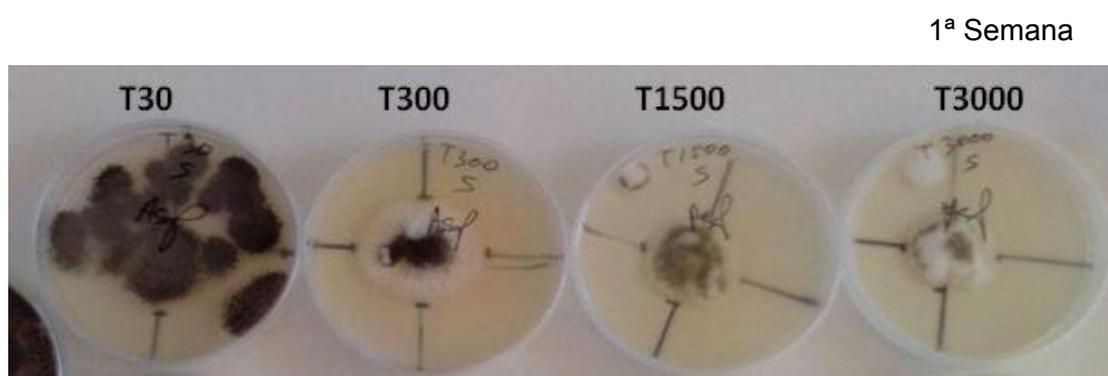
Se analizan los datos mediante el Test de Kruskal-Wallis test:  $H(4, N=15) = 11,80649$   $p = 0,0189$ . Se hacen las comparaciones por pares de los datos recogidos (U de Mann-Whitney), y se observan diferencias significativas entre 300 ppm, 1500 ppm y 3000 ppm, según muestra el diagrama de barras siguiente (Figura 49).



**Figura 49:** Crecimiento de *Aspergillus spp.*, con sándalo a la 4ª semana *in vitro*. En rojo el control (T0); en naranja los resultados respecto a los diferentes tratamientos con sándalo (ppm): (SAT30, SAT300, SAT1500 y SAT3000). Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney  $p > 0,05$ ).

Observando los resultados para el control de *Aspergillus spp* el sándalo no es buen aceite, ya que aunque aparezcan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, éstas no ejercen una reducción que pueda considerarse importante en control del crecimiento del hongo. Se deberían ensayar dosis mayores de 3000 ppm, para ver si hay algún cambio notable en la reducción del crecimiento del patógeno.

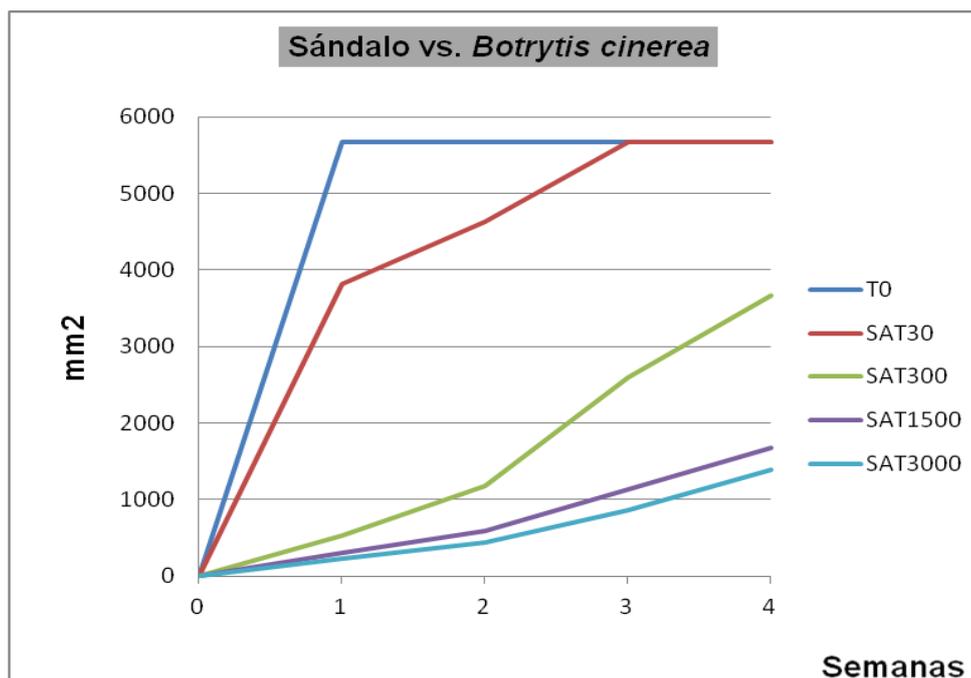
En la fotografía siguiente (Figura 50), se muestra el desarrollo en placa de *Aspergillus spp*, en la primera semana de incubación frente a los diferentes tratamientos con sándalo donde todas las placas presentan desarrollo del hongo.



**Figura 50:** Crecimiento de *Aspergillus* frente a sandalo, 1ª semana

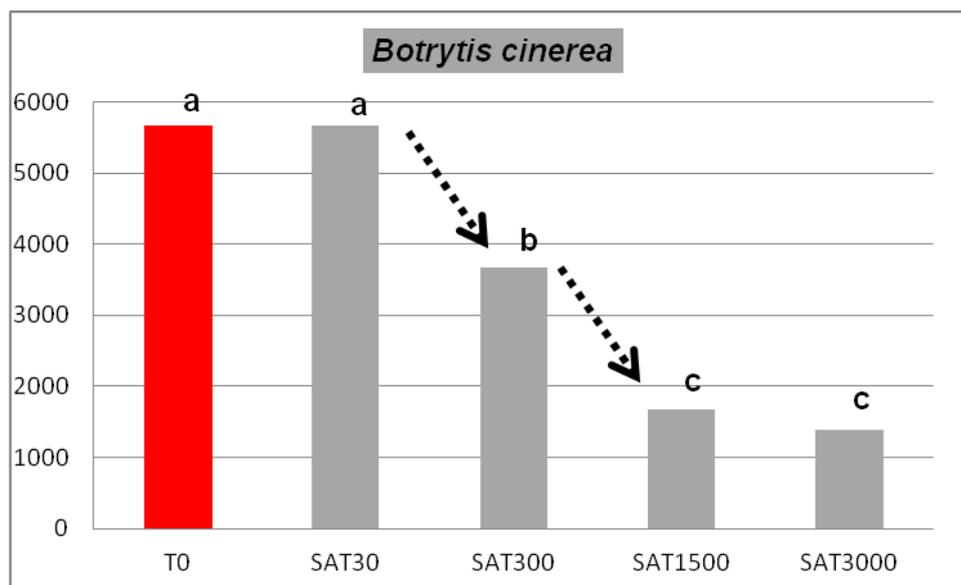
❖ **Sándalo vs. *Botrytis cinerea*.**

La gráfica que se presenta a continuación (Figura 51), refleja la evolución del desarrollo de *Botrytis cinerea* respecto a diferentes tratamientos de sándalo durante las cuatro semanas de incubación en placa. El control que ejerce es bastante importante como se puede ver en la gráfica, aunque según se va avanzando en el tiempo, las dosis más altas son las más efectivas. Las dosis que provocan un cambio en el crecimiento del hongo están entre los 300 ppm y 1500 ppm (SAT300 y SAT1500), ya que dosis anteriores como 30 ppm, no presenta un control en el desarrollo.



**Figura 51:** Evolución semanal del crecimiento de *Botrytis cinerea*, en placa frente a tratamientos con A.E. sándalo. Tratamientos: T0 (control), SATxxx (tratamientos con sándalo, xxx: dosis (ppm)).

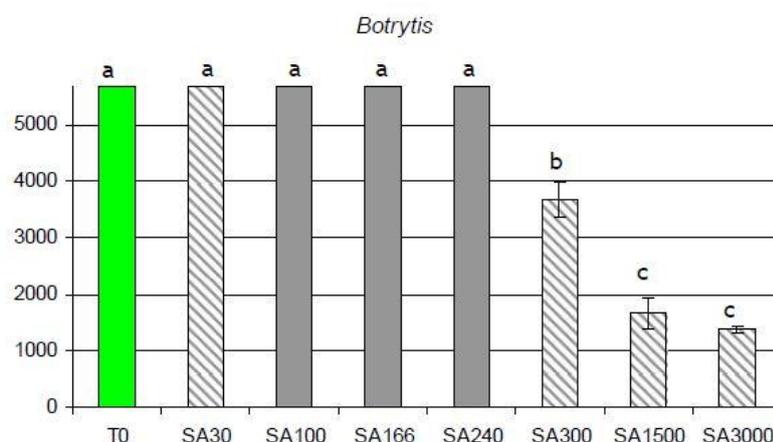
Para dar validez a las tendencias observadas en la estadística descriptiva y expresar con rigor estadístico si existen diferencias entre tratamientos, se analizan los datos obtenidos en la cuarta semana. El resultado de los análisis cuyos datos son representados en el diagrama siguiente (Figura 52) muestran en el Test Kruskal-Wallis para la variable independiente "tratamiento" valores de:  $H(4, N=15)=13,58062$ , con una probabilidad de  $p=0,0088$ , que indica que existen diferencias significativas entre los tratamientos utilizados.



**Figura 52:** Crecimiento de *Botrytis cinerea*., con sándalo a la 4ª semana *in vitro*. En rojo el control (T0); en gris los resultados respecto a los diferentes tratamientos con sándalo (ppm): (SAT30, SAT300, SAT1500 y SAT3000). Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney  $p > 0,05$ ).

El test U Mann-Whitney en la comparación por pares indica que hay diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos y se confirma que las dosis efectivas que producen un cambio de comportamiento en el crecimiento fúngico se establecen entre 300 ppm y en 1500 ppm.

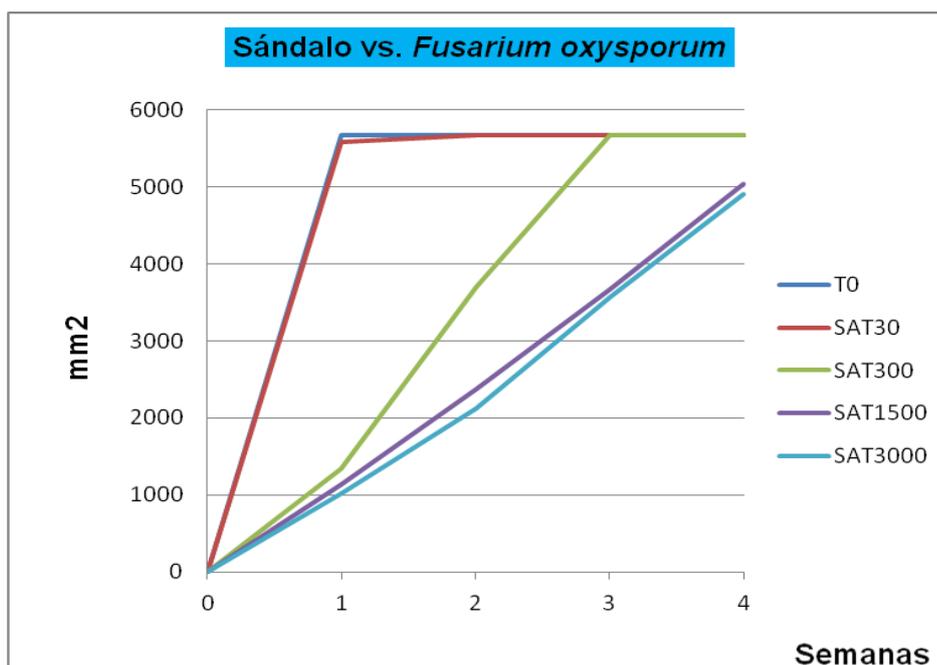
Novoa (2017), estudia dosis intermedias entre 30 y 300 ppm, como son 100, 166 y 240 ppm, representadas en el diagrama de barras siguiente (Figura 53), en el que los datos no muestran diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, por lo que la dosis mínima efectiva se establece en la encontrada en el presente estudio de 300 ppm.



**Figura 53:** Crecimiento de *Botrytis cinerea*., con aceite de sándalo. Control (T0); en gris, SAxxx : sándalo a diferentes concentraciones (ppm); en rayas: SA30, SA300, SA1500 y SA3000, resultados propios del presente trabajo. (Novoa, 2017).

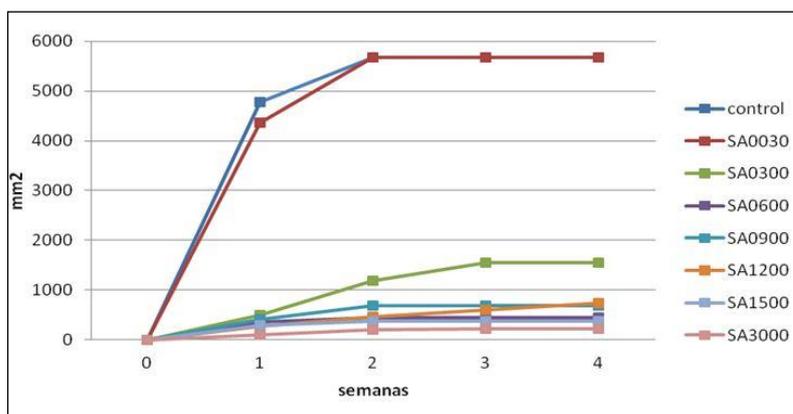
### ❖ Sándalo vs. *Fusarium oxysporum*.

En la gráfica siguiente (Figura 54), se representa la evolución del crecimiento de *Fusarium oxysporum*, frente a diferentes concentraciones de aceite esencial de sándalo. El aceite de sándalo no ejerce un control eficiente según se observa en la gráfica ya que en la cuarta semana, a la dosis máxima ensayada, el crecimiento del hongo alcanza el 86,4% de la superficie de la placa. La dosis que se puede establecer visualmente como eficiente ya que produce un cambio o un receso en el crecimiento del hongo, es la de 1500 ppm.



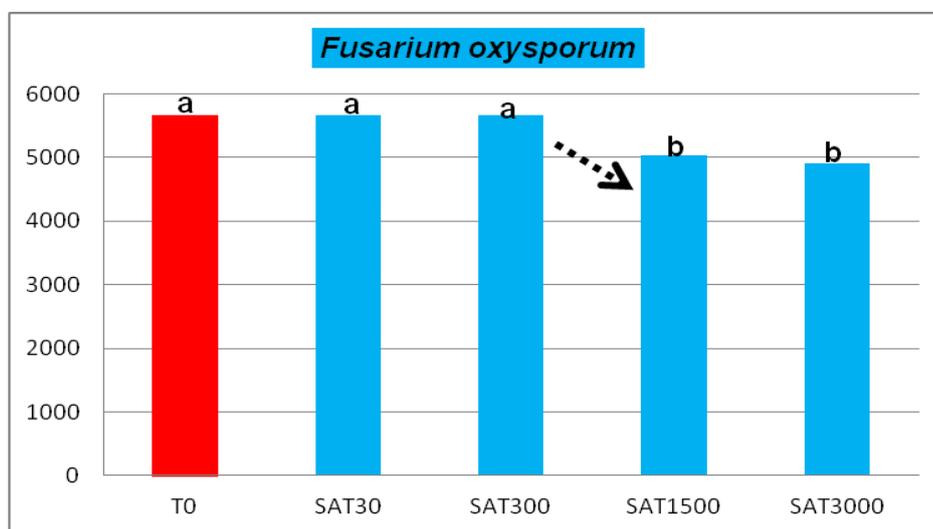
**Figura 54:** Evolución semanal del crecimiento *Fusarium oxysporum* en placa frente a tratamientos con A.E. sándalo. Tratamientos: T0 (control), SATxxx (tratamientos con sándalo, xxx: dosis (ppm)).

Valdeolmillos (2018), estudia dosis intermedias entre 300 ppm de sándalo y 1500 ppm, representadas en el gráfico siguiente (Figura 55), donde se observa que a dosis de 300 ppm (SA300), se produce un control efectivo en el desarrollo del hongo, y que las dosis nuevas estudiadas, 600 ppm, 900 ppm, 1200 ppm, se comportan más o menos igual que la dosis de 1500 ppm.



**Figura 55:** Evolución semanal del crecimiento superficial (mm<sup>2</sup>) de *Fusarium oxysporum* frente a sándalo (SA=sándalo). (Valdeolmillos, 2018).

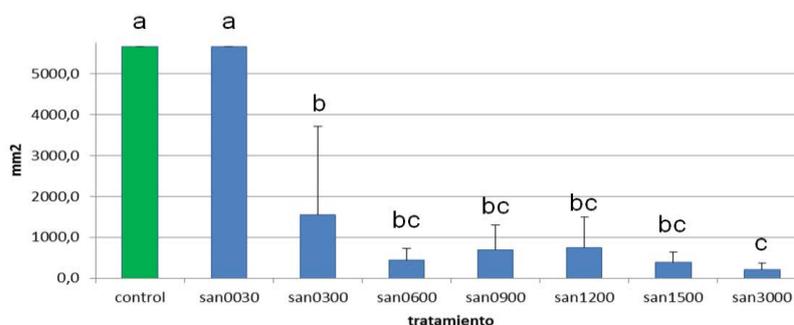
Analizando los datos estadísticamente para obtener mayor información y representándolos en la gráfica que se muestra a continuación (Figura 56), éstos indican que hay valores estadísticamente significativos. El análisis de conjunto indica diferencias significativas (Kruskal-Wallis test:  $H(4, N=15) = 12,95824$   $p = 0,0115$ ) y el test U Mann-Whitney en la comparación por pares, indica que hay diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos.



**Figura 56:** Crecimiento *Fusarium oxysporum*, con sándalo a la 4ª semana *in vitro*. En rojo el control (T0); en azul los resultados respecto a los diferentes tratamientos con sándalo (ppm): (SAT30, SAT300, SAT1500 y SAT3000). Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney  $p > 0,05$ ).

El aceite de sándalo según la estadística, presenta diferencias significativas respecto al control en el crecimiento de *Fusarium* entre dosis de 300 ppm y 1500 ppm, siendo el tratamiento SAT1500, el único que controla levemente el desarrollo del hongo.

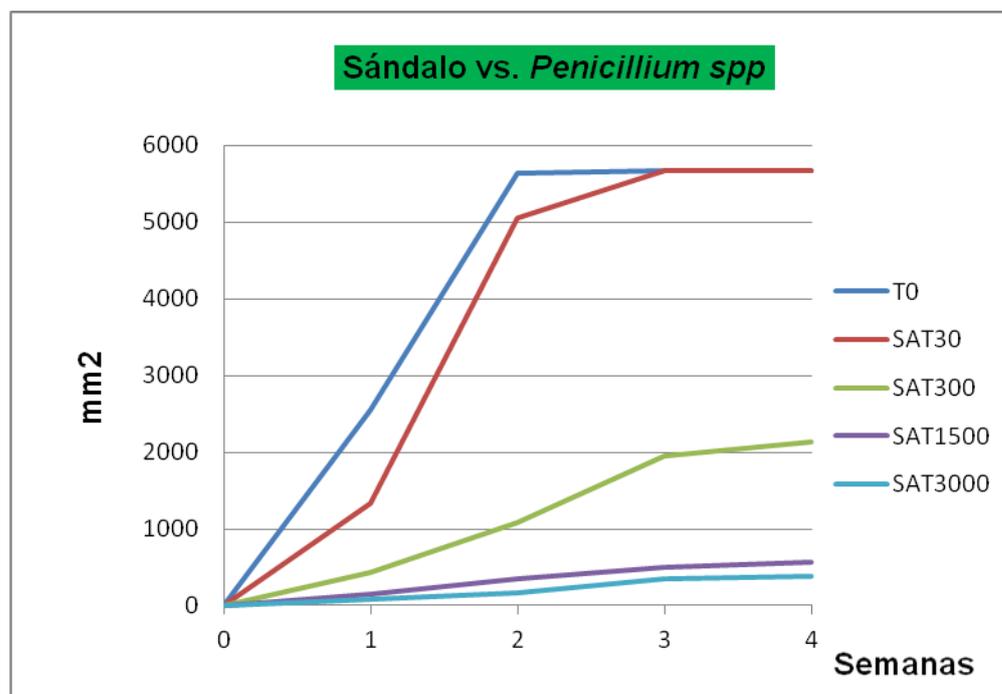
En trabajos simultáneos en nuestro laboratorio realizados por Nova (2017) y Valdeolmillos (2018) se encuentran dosis efectivas inferiores a 1500 ppm. Al hacer el análisis estadístico de los datos obtenidos en el trabajo de Valdeolmillos (2018), y que se representan en la gráfica siguiente (Figura 57), se muestran diferencias significativas entre tratamientos desde 300 ppm hasta 3000 ppm, encontrando reducción significativa desde 300 ppm.



**Figura 57:** Crecimiento de *Fusarium* en sándalo. En verde (T0), el control. En azul, las distintas dosis utilizadas de sándalo. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias significativas (test U Mann-Whitney  $p > 0,05$ ). Valdeolmillos (2018).

❖ **Sándalo vs. *Penicillium spp.***

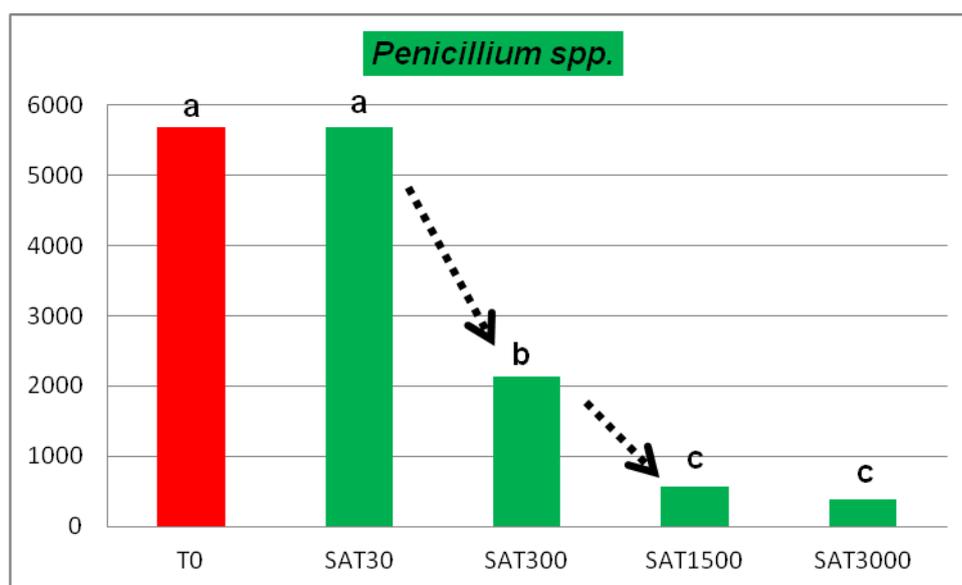
*Penicillium spp.*, un hongo extremadamente común en la putrefacción de los productos perecederos, y tal como vemos en la gráfica siguiente (Figura 58) muestra susceptibilidad al aceite de sándalo. Como se observa en la gráfica, tras cuatro semanas de incubación, el crecimiento del hongo se ve limitado a una concentración de 300 ppm de aceite esencial y su crecimiento se observa casi totalmente frenado a la dosis de 1500 ppm.



**Figura 58:** Evolución semanal del crecimiento *Penicillium spp.*, en placa frente a tratamientos con A.E. sándalo. Tratamientos: T0 (control), SATxxx (tratamientos con sándalo, xxx: dosis (ppm)).

Podemos apreciar que con el tratamiento SAT300 (300 ppm de sándalo) se logra un cambio en el desarrollo del hongo, y con 1500 ppm, el desarrollo del hongo se ve muy comprometido y apenas crece durante las cuatro semanas de estudio.

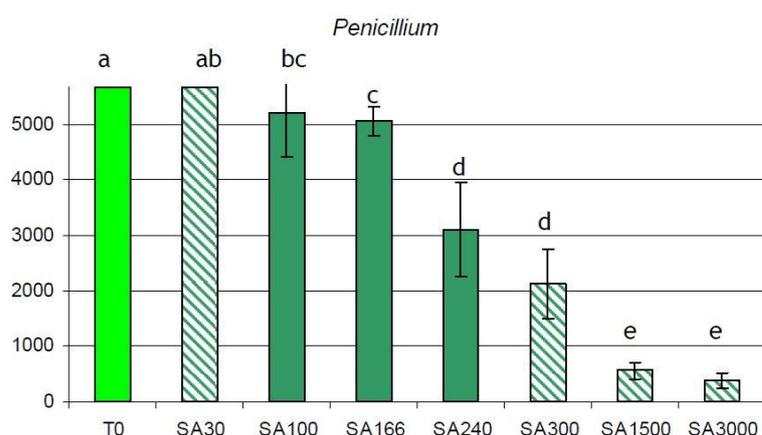
Se hacen los test no paramétricos para el tratamiento donde aparecen diferencias significativas entre ellos, (Kruskal-Wallis test:  $H(4, N=15) = 13,30534$ ,  $p = 0,0099$ ). Se hace la comparación por pares y los resultados se muestran en el diagrama de barras de continuación (Figura 59).



**Figura 59:** Crecimiento *Penicillium spp.*, con sándalo a la 4ª semana *in vitro*. En rojo el control (T0); en verde los resultados respecto a los diferentes tratamientos con sándalo (ppm): (SAT30, SAT300, SAT1500 y SAT3000). Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney  $p > 0,05$ ).

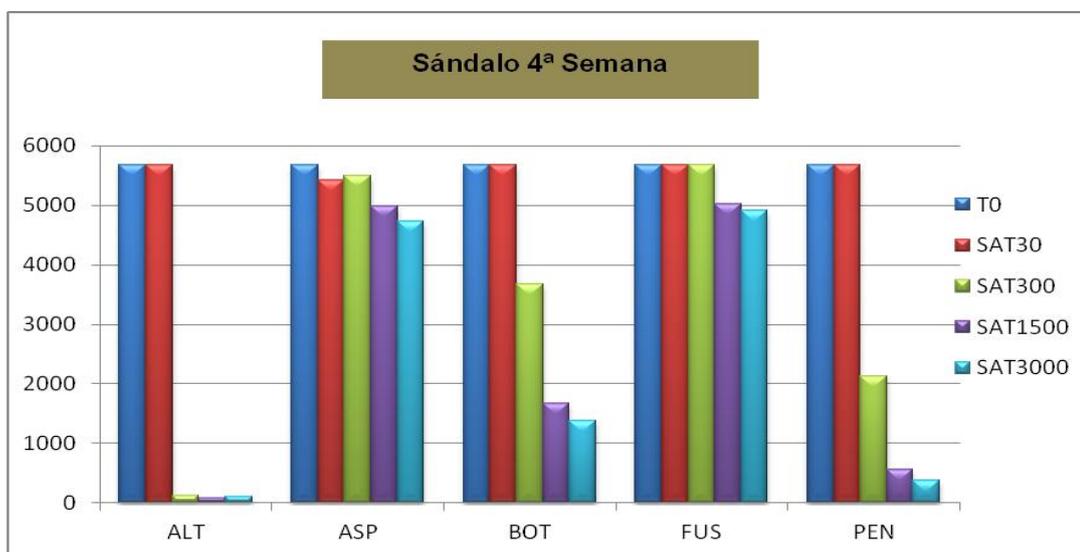
Se observan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ensayados, y se concluye que la dosis efectiva en el control del *Penicillium spp.*, bajo los diferentes tratamientos con sándalo se establece en 300 ppm.

Novoa (2017), en su trabajo de investigación, estudió dosis intermedias de aceite de sándalo entre tratamientos de 30 y 300 ppm, estableciéndose la dosis mínima efectiva de control en 240 ppm como muestra el diagrama de barras de a continuación (Figura 60).



**Figura 60:** Crecimiento de *Penicillium* en sándalo. En verde (T0), resultados del presente trabajo en rayas (SA30, SA300, SA1500 y SA3000), verde oscuro datos de trabajo anterior. Novoa (2017).

En la última gráfica de este bloque (Figura 61) se presenta el control fúngico del aceite de sándalo y se compara el efecto que tienen los distintos tratamientos frente a los distintos hongos del ensayo.



**Figura 61:** Efecto de los diferentes tratamientos de sándalo sobre los hongos fitopatógenos de estudio. T0: control, SATxxx: tratamiento con sándalo a diferentes dosis en ppm. ALT: *Alternaria spp*, ASP: *Aspergillus spp*, BOT: *Botrytis cinerea*, Fus: *Fusarium Oxysporum*, PEN: *Penicillium spp*.

Los resultados obtenidos con el aceite esencial de sándalo sobre el control que produce este aceite sobre los hongos estudio, es mucho menor que el control ejercido con citronela. A dosis bastante menores, citronela es capaz de controlar e inhibir 100% del desarrollo de los patógenos, mientras que con sándalo no ocurre.

Si hay una cierta efectividad en el control en *Alternaria spp*, *Botrytis cinerea* y *Penicillium spp*.

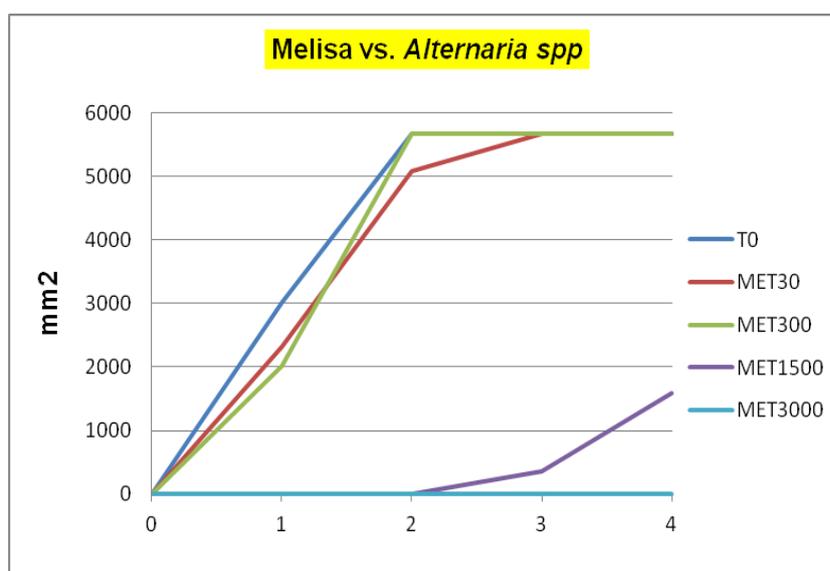
Quizás los componentes del aceite de sándalo sean menos bioactivos que los de citronela, que se presenten en concentraciones no suficientes para ejercer alguna acción sobre el hongo, o los hongos sean más tolerantes a ellos.

En la revisión bibliográfica no se encuentran estudios de sándalo frente a hongos necrotrofos y las referencias de las que disponemos son los otros trabajos que se han realizado en nuestro laboratorio. Por ello consideramos que es un aceite que aún tiene mucho campo por investigar.

### 5.1.3. Desarrollo fúngico con melisa

#### ❖ Melisa vs. *Alternaria spp.*

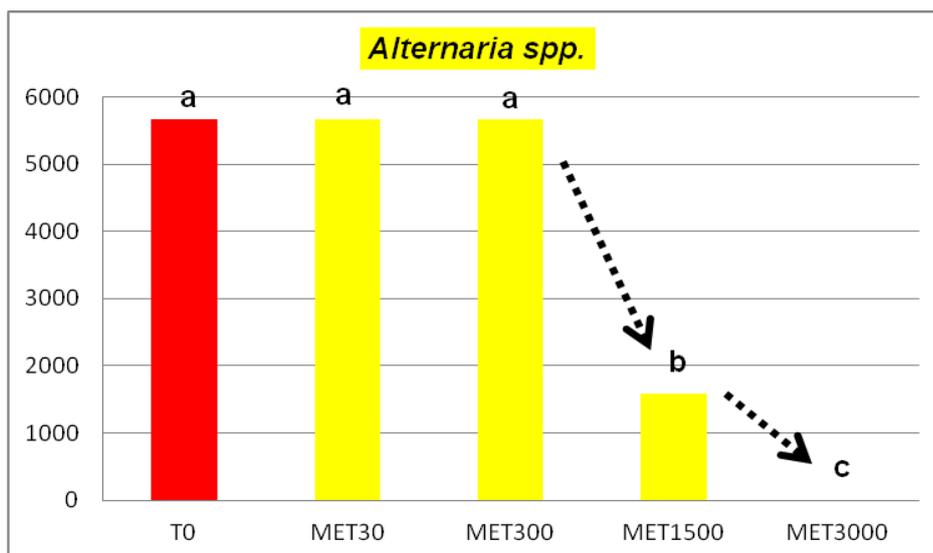
Se presentan a continuación los datos que se han obtenido en este ensayo con aceite esencial de melisa sobre los cinco hongos patogénicos de estudio a lo largo de cuatro semanas. La gráfica siguiente (Figura 62), muestra la evolución semanal del crecimiento de *Alternaria spp.*, frente al aceite de melisa.



**Figura 62:** Evolución semanal del crecimiento *Alternaria spp.*, en placa frente a tratamientos con A.E. melisa. Tratamientos: T0 (control), METxxx (tratamientos con melisa, xxx: dosis (ppm)).

La estadística descriptiva muestra que la dosis que ejerce un cambio en el crecimiento de *Alternaria spp.*, está entre 300 ppm y 1500 ppm de aceite esencial. Con 3000 ppm de aceite, *Alternaria* no se desarrolla en ningún momento del ensayo.

Para dar validez a las tendencias observadas y expresar con rigor estadístico si existen diferencias entre tratamientos como se piensa, se analizan los datos obtenidos en la cuarta semana. El resultado de los análisis estadísticos cuyos datos son representados en el diagrama siguiente (Figura 63) muestran en el Test Kruskal-Wallis para la variable independiente “tratamiento” valores de:  $H(4, N=15)=14,00000$  dando una probabilidad de  $p=0,0073$ , que indica que existen diferencias significativas entre los tratamientos utilizados. El test U Mann-Whitney en la comparación por pares muestra las diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos.

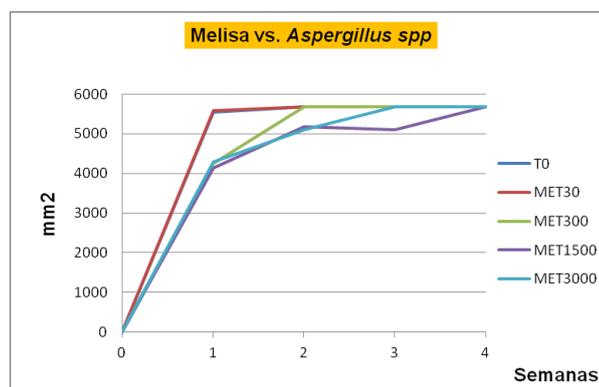


**Figura 63:** Crecimiento *Alternaria spp.*, con melisa a la 4<sup>a</sup> semana *in vitro*. En rojo el control (T0); en amarillo resultados respecto a los diferentes tratamientos con melisa (ppm): MET30, MET300, MET1500 y MET3000). Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney  $p > 0,05$ ).

Analizando los resultados de la estadística, se confirma que la dosis mínima efectiva para el control de *Alternaria spp.*, en este ensayo se establece a un a concentración de 1500 ppm de aceite esencial. Y una segunda diferencia significativa se establece con 3000 ppm donde la reducción de crecimiento es completa.

❖ **Melisa vs. *Aspergillus spp.***

La gráfica siguiente (Figura 64), muestra la evolución semanal del crecimiento de *Aspergillus spp.*, frente al aceite de melisa. Se observa inmediatamente en la figura, que el aceite no ejerce ningún tipo de control sobre el patógeno en ningún momento del ensayo. Melisa no es efectiva en las dosis estudiadas sobre *Aspergillus spp.*



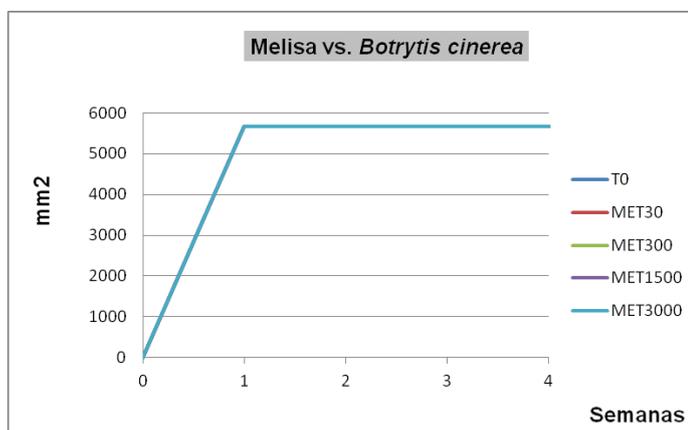
**Figura 64:** Evolución semanal del crecimiento *Aspergillus spp.*, en placa frente a tratamientos con A.E. melisa. Tratamientos: T0 (control), METxxx (tratamientos con melisa, xxx: dosis (ppm)).

En vista de que en todas las dosis el crecimiento es el 100% y por tanto no hay ningún control, no realiza el análisis estadístico.

❖ **Melisa vs. *Botrytis cinerea*.**

El tratamiento de melisa frente a *Botrytis* de se representa en la gráfica siguiente (Figura 65). No se observa ningún efecto del aceite sobre el control del hongo y por tanto ninguna dosis probada de melisa en este ensayo es efectiva.

Melisa no controla a *Botrytis cinerea* en las dosis ensayas en este trabajo.

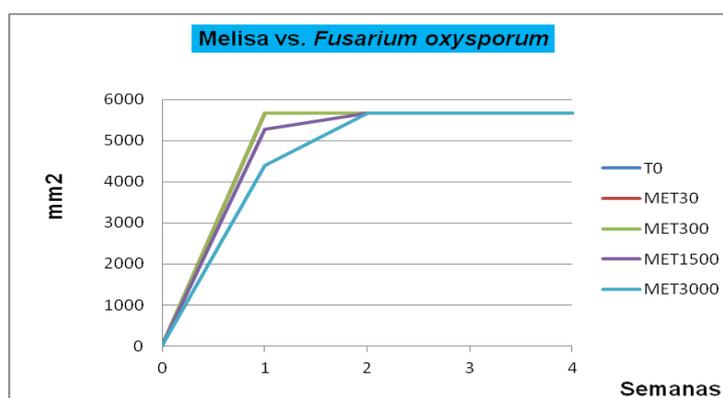


**Figura 65:** Evolución semanal del crecimiento *Botrytis cinerea*, en placa frente a tratamientos con A.E. melisa. Tratamientos: T0 (control), METxxx (tratamientos con melisa, xxx: dosis (ppm)).

Igual que en el caso anterior no se realiza el análisis estadístico ya que es innecesario.

❖ **Melisa vs. *Fusarium oxysporum***

Los datos representados a continuación en la gráfica siguiente (Figura 66), recogen la información relativa al comportamiento de *Fusarium oxysporum* frente a la actividad del aceite esencial. Como se observa en la figura, no hay control efectivo en el desarrollo del hongo con este aceite de melisa en las dosis probadas.



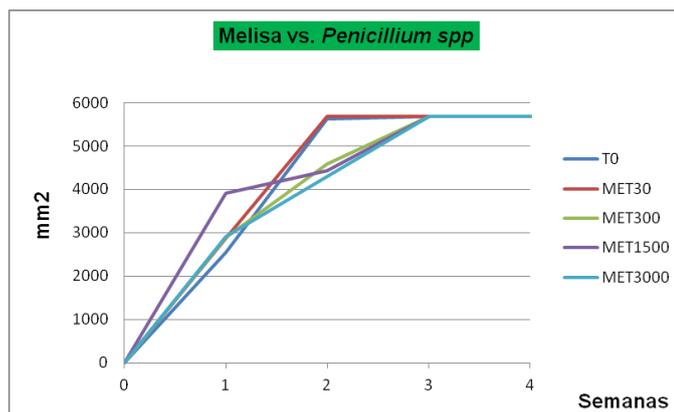
**Figura 66:** Evolución semanal del crecimiento *Fusarium oxysporum*, en placa frente a tratamientos con A.E. melisa. Tratamientos: T0 (control), METxxx (tratamientos con melisa, xxx: dosis (ppm)).

De nuevo y al igual que con los patógenos anteriores no se realiza el análisis estadístico puesto que no hay control a las dosis ensayadas.

### ❖ Melisa vs. *Penicillium spp.*

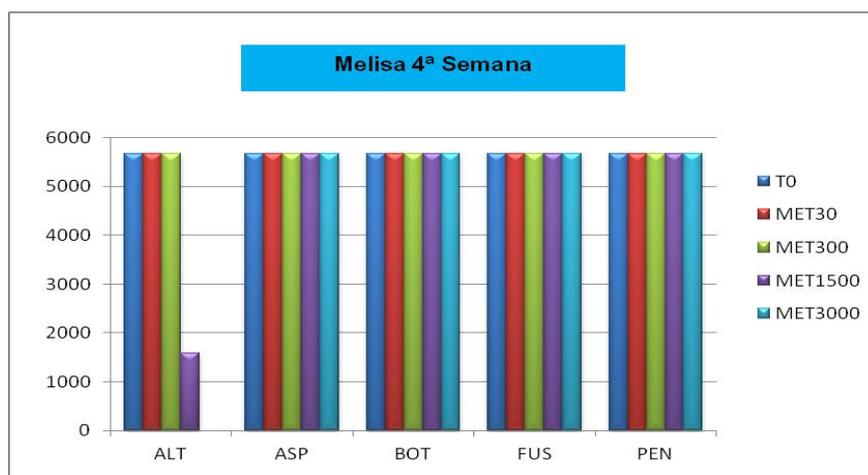
*Penicillium spp.*, el último hongo de estudio, cuyos resultados en función de la afección que el aceite de melisa ha tenido sobre su crecimiento en las cuatro semanas de estudio, se representan en la gráfica posterior (Figura 67), muestran de nuevo que no produce ningún control sobre el crecimiento del hongo a ninguna dosis probada.

El aceite de melisa no controla al patógeno con ninguna de las dosis ensayadas y quizás, se debería probar dosis superiores para valorar un posible efecto. De nuevo obviamos los análisis estadísticos que son innecesarios con estos datos



**Figura 67:** Evolución semanal del crecimiento *Penicillium spp.*, en placa frente a tratamientos con A.E. melisa. Tratamientos: T0 (control), METxxx (tratamientos con melisa, xxx: dosis (ppm)).

A continuación, en la última gráfica que se presenta en este apartado (Figura 68), sobre el control fúngico que presenta el aceite de melisa versus hongos fitopatógenos, se compara el efecto que tienen los distintos tratamientos frente a los distintos hongos del ensayo.



**Figura 68:** Efecto de los diferentes tratamientos de melisa sobre los hongos fitopatógenos de estudio. T0: control, SATxxx: tratamiento con sándalo a diferentes dosis en ppm. ALT: *Alternaria spp.*, ASP: *Aspergillus spp.*, BOT: *Botrytis cinerea*, Fus: *Fusarium oxysporum*, PEN: *Penicillium spp.*

El desarrollo tan rápido que presentan los hongos ya en la primera semana frente a melisa, como *Aspergillus*, *Botrytis*, *Fusarium* y *Penicillium*, muestra un control nulo del aceite sobre dichos hongos en las concentraciones probadas.

El único hongo que presenta una reducción en su desarrollo es *Alternaria spp*, hongo bastante susceptible a los aceites esenciales según los datos obtenidos de este ensayo. Con el resto de los patógenos, el crecimiento es tan rápido que ya en la primera semana todas las placas Petri resultan invadidas, no teniéndose en cuenta ni siquiera, los tratamientos con melisa a concentraciones de 3000 ppm.

Revisando la bibliografía disponible, se encuentra un trabajo llevado a cabo en Marruecos por El Ouadi, *et al.*, (2017), donde se utiliza el aceite de melisa con PDA in vitro para control fúngico de *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* y *Rhizopus stolonifer* y los resultados muestran que *Penicillium expansum* muestra un alto nivel de susceptibilidad a concentraciones de 1000 ppm e incluso mas bajas. *Rhizopus stolonifer* y *Botrytis cinerea* se muestran un poco menos sensibles y requieren concentración de 2000 ppm. En el mismo trabajo se observa que se alcanzan valores efectivos más bajos mediante la aplicación de vapores del aceite.

Otro ensayo llevado a cabo por Abdellatif, Boudjella, Zitouni & Hssani, (2014) con melisa sobre el control de *Fusarium spp*, aunque con una orientación mas aplicada a la medicina muestra control de *Fusarium oxysporum albedinis* y *Fusarium oxysporum lini*, entre 1000 ppm y 2000 ppm.

Cada patógeno se comportó de forma diferente con cada aceite; aunque en casi todos ellos, cuanto mayor es la concentración de aceite esencial, menor es el crecimiento del hongo en placa.

El objetivo de este trabajo *in vitro* es comprobar si existe efecto de los aceites esenciales elegidos y en que dosis son efectivos en el control de patógenos fúngicos vegetales para poder hacer de ellos un uso como bioprotectores de cultivos (entre otros posibles empleos), sin efectos secundarios. Con este ensayo, se confirma que realmente existe una actividad controladora, inhibitoria por parte de los componentes de los aceites esenciales en el crecimiento y desarrollo de los hongos patógenos aunque en este trabajo aparecen coincidencias y discrepancias con trabajos anteriores. Las dosis referenciadas en otros trabajos son bastante similares mientras que otros efectos (o la falta de ellos como con el aceite de melisa) pueden achacarse a cambios de composición de los aceites o variabilidad de los patógenos estudiados.

En cualquier caso, el análisis *in vitro*, controla todos los factores externos, siendo un primer paso para comprobar el potencial de los aceites en los hongos en el control biológico.

Algunas otras reflexiones de este ensayo in vitro son que efectivamente sí hay un control fúngico por parte de los aceites. Sin embargo, teniendo en cuenta los resultados y la revisión bibliográfica parece que el método de aplicación puede ser un factor muy importante ya que los vapores de los aceites son inmensamente más tóxicos contra los hongos que en la fase líquida. Las dosis efectivas son muchísimo más bajas gracias a su naturaleza lipofílica ya que estos presentan mejor penetrabilidad por parte de las células del micelio que disueltas en agua. Y por ello, su aplicación supondría una reducción en las dosis aplicadas y por tanto en los costes de los tratamientos.

## 5.2. Ensayos in vivo en material vegetal: naranjas.

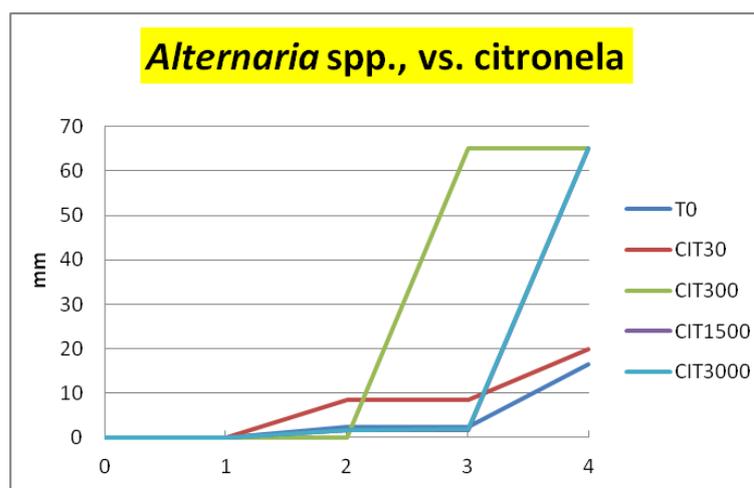
Tras comprobar *in vitro* la eficacia de control o la actividad antifúngica de los aceites esenciales ensayados sobre el crecimiento de patógenos fúngicos, en este caso *Alternaria spp*, *Aspergillus spp*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Penicillium spp*, se continuó el ensayo testándolos en frutas, en este caso naranjas, para evaluar su comportamiento.

Como se ha explicado en el apartado de Material y Métodos, las naranjas son inoculadas con cada uno de los aislados patogénicos seleccionados e introducidas inmediatamente en el envase plástico con los aceites esenciales impregnados en un filtro absorbente en medio de las dos naranjas y el envase se sella con Parafilm.

### 5.2.1. Valoración de las lesiones en naranjas

#### ❖ *Alternaria spp.*, vs. Citronela

Los datos obtenidos corresponden a las medias de las mediciones de las lesiones producidas en las naranjas a lo largo de las cuatro semanas de estudio, con los diferentes tratamientos de aceites esenciales y patógenos. En este caso de *Alternaria*, se representa en los gráficos siguientes (Figuras 69, 70 y 71, citronela, melisa y sándalo respectivamente), para evaluar su evolución y comportamiento.



**Figura 69:** Evolución semanal del crecimiento *Alternaria spp.*, *in vivo*, frente a tratamientos con citronela. Tratamientos: T0 (control), CITxxx (tratamientos con citronela, xxx: dosis (ppm)).

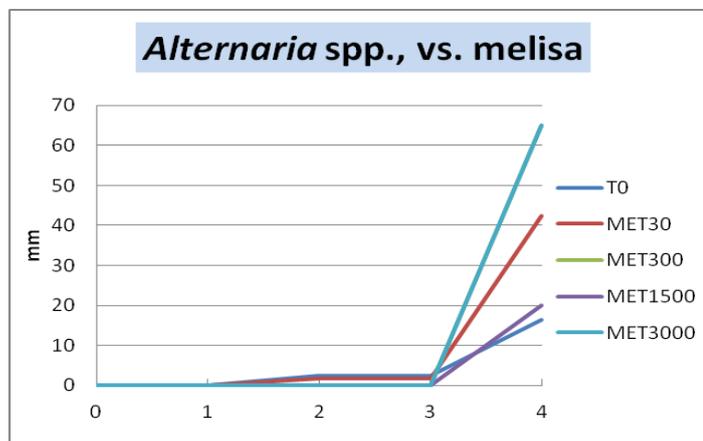
Las mayores lesiones por *Alternaria spp.*, se producen en las naranjas sometidas a mayor concentración de volátiles del aceite, por lo que el efecto inhibitor de los volátiles presenta datos contradictorios frente a la dinámica dada en el ensayo *in vitro*, ya que a mayores concentraciones de aceite esencial *in vivo*, se produce un desarrollo mayor del patógeno que con dosis menores.

Los datos son confusos, las lesiones producidas en el control no llegan a 2 cm a los 28 días de ensayo y en todos los tratamientos con citronela, a excepción del T30, invaden a la naranja en su totalidad en la cuarta semana.

En vista de los resultados parece que citronela no ejerce ningún control postcosecha sobre *Alternaria spp.*

### ❖ Alternaria spp., vs. Melisa

La gráfica siguiente (Figura 70), en la que *Alternaria spp.*, es ensayada con melisa a diferentes dosis, muestra que el aceite de melisa no ejerce ningún control postcosecha en la fruta, independientemente de la concentración aplicada.



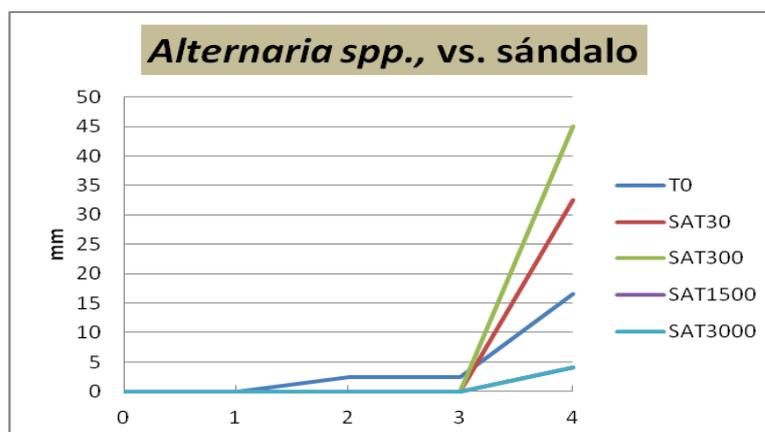
**Figura 70:** Evolución semanal del crecimiento *Alternaria spp.*, *in vivo*, frente a tratamientos con melisa. Tratamientos: T0 (control), METxxx (tratamientos con melisa, xxx: dosis (ppm)).

Las lesiones producidas en el control T0, son menores que todas las lesiones generadas por el hongo con los otros tratamientos de aceite esencial de melisa.

A la máxima dosis aplicada en el ensayo, 3000 ppm (MET3000), la invasión de *Alternaria spp.*, en naranja es del 100%. El aceite de melisa sobre *Alternaria spp.*, en este caso concreto *in vivo* sobre naranjas, no ejerce ningún control sobre el patógeno.

### ❖ Alternaria spp vs. Sándalo

En el ensayo de *Alternaria spp.*, frente al aceite esencial de sándalo, los resultados de las mediciones se muestran en la gráfica siguiente (Figura 71).



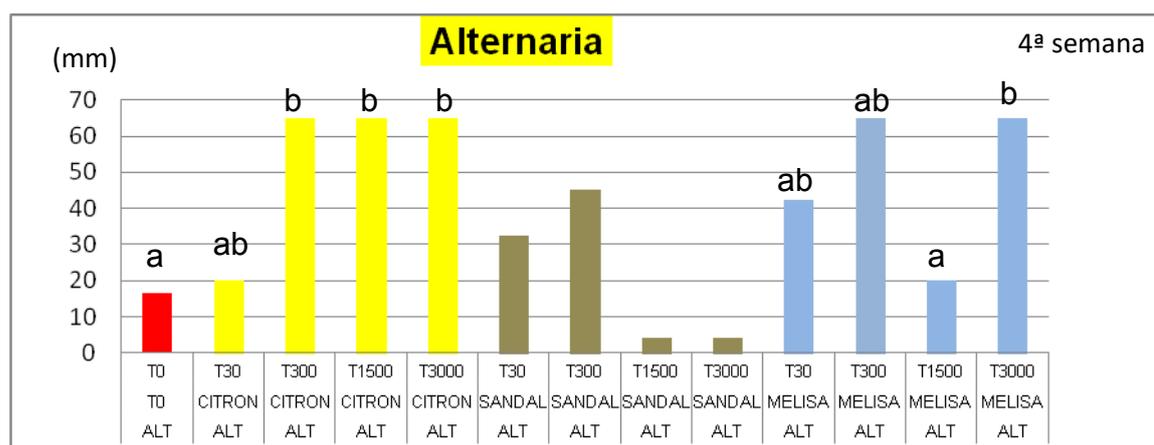
**Figura 71:** Evolución semanal del crecimiento *Alternaria spp.*, *in vivo*, frente a tratamientos con sándalo. Tratamientos: T0 (control), SATxxx (tratamientos con sándalo, xxx: dosis (ppm)).

Con respecto al aceite de sándalo, los datos obtenidos son también confusos ya que con dosis de 30 ppm y de 300 ppm, las lesiones en naranjas son mayores que en las naranjas control a la cuarta semana, y los únicos resultados que se obtuvieron donde se frena el desarrollo de la invasión de *Alternaria* spp., es con dosis de 1500 y 3000 ppm, donde el crecimiento del hongo es muy leve. La dosis de aceite esencial de sándalo que ejerce un control fúngico postcosecha en naranja, parece ser según los datos de este ensayo a 3000 ppm.

Para dar validez a las tendencias observadas en las gráficas anteriores y a las conclusiones preliminares expuestas, se analizan los datos estadísticamente para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos de aceites esenciales aplicados.

El resultado de los análisis estadísticos son representados en el diagrama de barras siguiente (Figura 72) en el que el Test Kruskal-Wallis resultados estadísticamente significativos para citronela ( $p = 0,0009$ ) y melisa ( $p = 0,0439$ ) pero no para sándalo ( $p = 0,7684$ ).

El test U Mann-Whitney en la comparación por pares indica que hay diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.



**Figura 72:** Valores medios de la lesión producida en naranjas por *Alternaria* spp en la 4ª semana. T0: Control; T(X): Tratamiento con aceite esencial (ppm), citronela (CITRON), melisa (MELISA) y sándalo (SANDAL). Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney  $p > 0,05$ ).

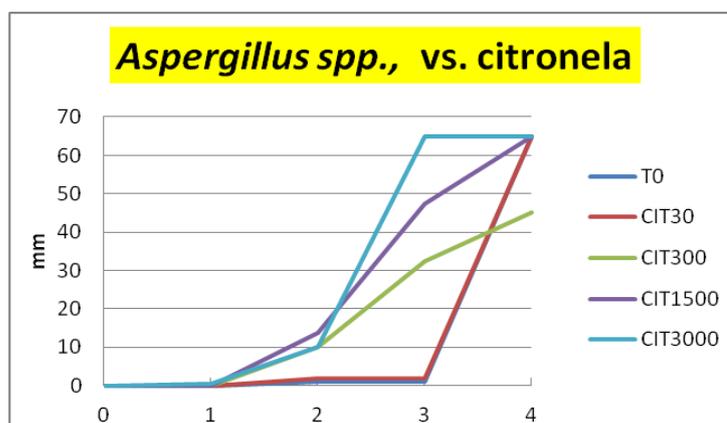
Tras representar los resultados estadísticos en el diagrama de barras de la gráfica anterior (Figura 72), y ver en forma conjunta los resultados de las lesiones en la cuarta semana en función del aceite esencial y su concentración, se concluye que el análisis estadístico aporta diferencias significativas desde el punto de vista matemático pero no aporta ninguna conclusión desde el punto de vista del control biológico ya que el tratamiento control (T0), no permite hacer comparaciones.

El problema de este ensayo con *Alternaria* spp., ha sido que en los tratamientos control (T0), el hongo se ha desarrollado levemente, mientras que en el resto de tratamientos con aceites esenciales, el desarrollo fúngico ha sido bastante considerable. El efecto de los aceites esenciales sobre el control fúngico en postcosecha ha sido el contrario del esperado incrementando las lesiones en lugar de reducirlas.

### ❖ Aspergillus spp., vs. Citronela

*Aspergillus spp.*, otro hongo dentro del estudio, presenta la evolución de las lesiones que éste produce en naranja en las figuras 73, 74 y 75 frente a tratamientos con citronela, melisa y sándalo respectivamente).

En la gráfica siguiente (Figura 73), se representan las progresiones de las lesiones en función del tratamiento con citronela en las cuatro semanas de estudio.

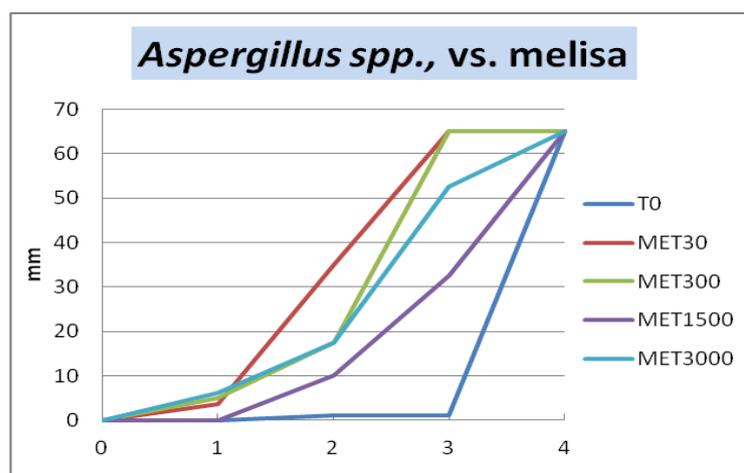


**Figura 73:** Evolución semanal del crecimiento *Aspergillus spp.*, *in vivo*, frente a tratamientos con citronela. Tratamientos: T0 (control), CITxxx (tratamientos con citronela, xxx: dosis (ppm)).

El único tratamiento que aparentemente ejerce un control sobre el *Aspergillus spp.*, según la gráfica anterior es el CIT300, es decir, 300 ppm de citronela, ya que en la cuarta semana, el desarrollo con 300 ppm de aceite presenta el 60,7% de invasión fúngica, frente al 100% del resto de tratamientos.

### ❖ Aspergillus spp., vs. Melisa

El efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Aspergillus spp.*, con melisa a lo largo de las semanas de estudio se presenta en la gráfica siguiente (Figura 74).

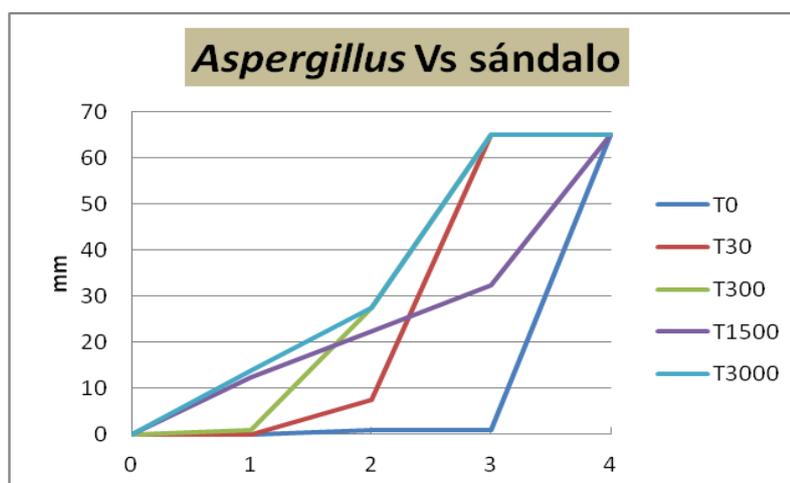


**Figura 74:** Evolución semanal del crecimiento *Aspergillus spp.*, *in vivo*, frente a tratamientos con melisa. Tratamientos: T0 (control), METxxx (tratamientos con melisa, xxx: dosis (ppm)).

En el control de *Aspergillus spp.*, con melisa, el resultado es totalmente contrario al esperado. El tratamiento control (T0), permanece inalterado por tres semanas, cuando a la dosis máxima (T3000) en ese mismo momento, el desarrollo de la lesión es del 82%. Sin embargo, al final de este ensayo, melisa no ejerce ningún tipo de reducción o control en el desarrollo del hongo en la fruta, ya que a la cuarta semana, todas las naranjas están invadidas al 100%.

#### ❖ *Aspergillus spp.*, vs. Sándalo

En la gráfica siguiente (Figura 75), se presenta la evolución de las lesiones frente al aceite de sándalo.

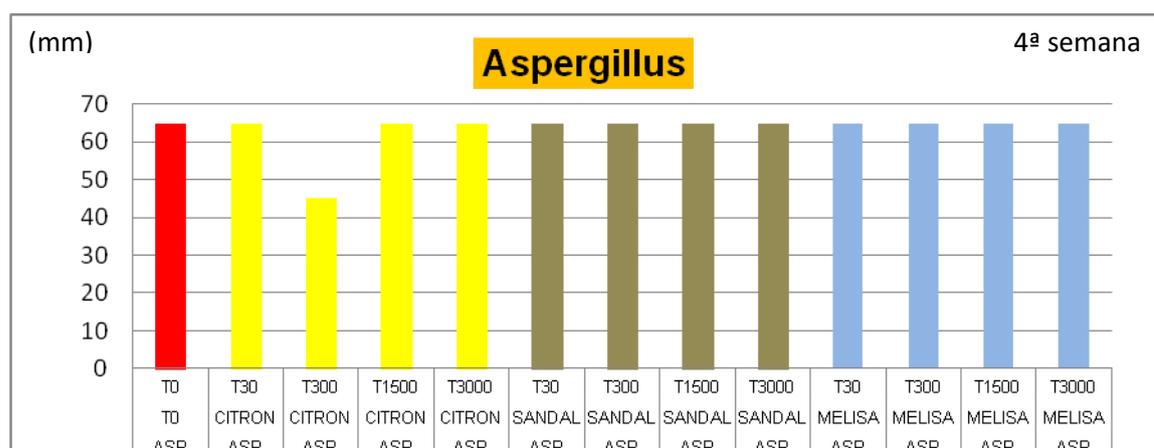


**Figura 75:** Evolución semanal del crecimiento *Aspergillus spp.*, *in vivo*, frente a tratamientos con sándalo. Tratamientos: T0 (control), SATxxx (tratamientos con sándalo, xxx: dosis (ppm)).

Se observa el mismo caso que con melisa y citronela, el tratamiento control presenta los menores crecimientos del patógeno, por lo que no se pueden hacer comparaciones entre tratamientos.

Se han analizado los datos estadísticamente solo en el caso de citronela donde había alguna diferencia en la cuarta semana pero esta diferencia es aparente y no estadísticamente significativa.

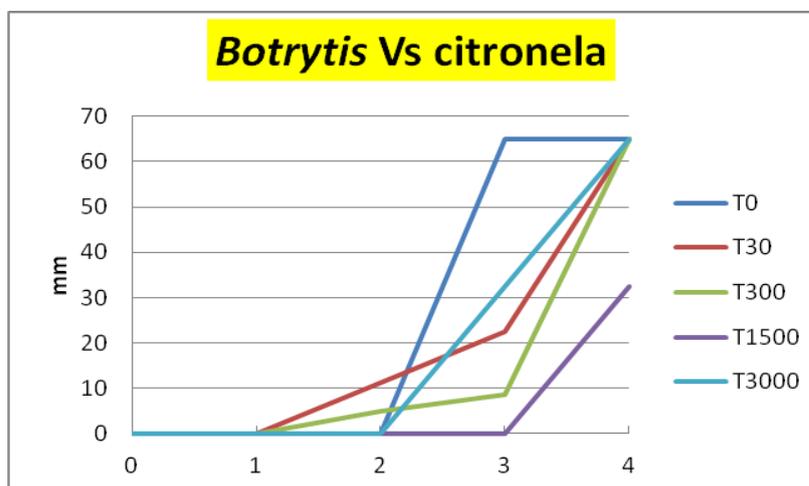
En la gráfica que aparece a continuación, (figura 76), se muestra el alcance de las lesiones producidas por *Aspergillus spp.*, en naranjas frente a diferentes tratamientos de aceite esencial de citronela, melisa y sándalo a las cuatro semanas del ensayo, donde se ve que ninguno de los aceites ensayados ejerce ningún control sobre el patógeno, ya que no existen diferencias estadísticas significativas entre el control y tratamientos y tampoco con citronela 300 ppm, donde en un primer momento se pensó que podría ejercer algún control.



**Figura 76:** Valores medios de la lesión producida en naranjas por *Aspergillus spp* en la 4ª semana. T0: Control; T(X): Tratamiento con aceite esencial (ppm), citronela (CITRON), melisa (MELISA) y sándalo (SANDAL). Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney  $p > 0,05$ ).

❖ **Botrytis cinerea vs. Citronela**

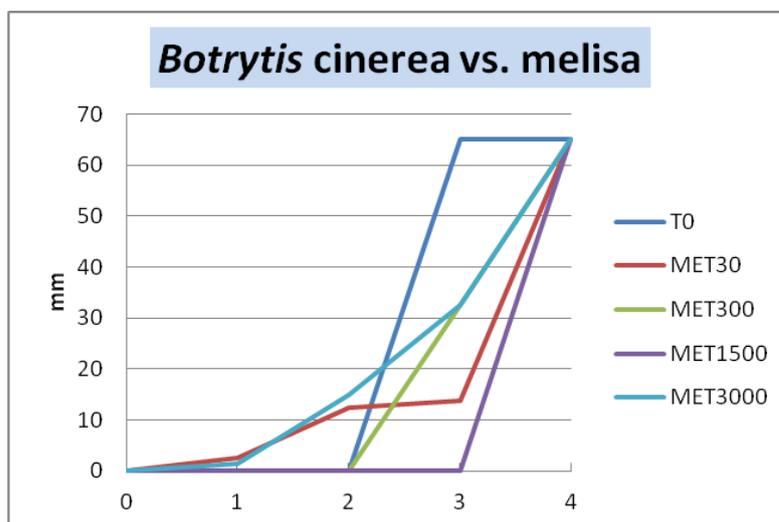
En la gráfica siguiente (Figura 77) de la evolución de *Botrytis* frente a citronela, se aprecia que el tratamiento que mejor controla al hongo es la concentración de 1500 ppm de citronela ya que a las cuatro semanas presenta una lesión de 3,2 cm, mientras que el resto de las naranjas presentan una invasión del 100%.



**Figura 77:** Evolución semanal del crecimiento *Botrytis cinerea.*, in vivo, frente a tratamientos con citronela. Tratamientos: T0 (control), CITxxx (tratamientos con citronela, xxx: dosis (ppm)).

### ❖ Botrytis cinerea vs. Melisa

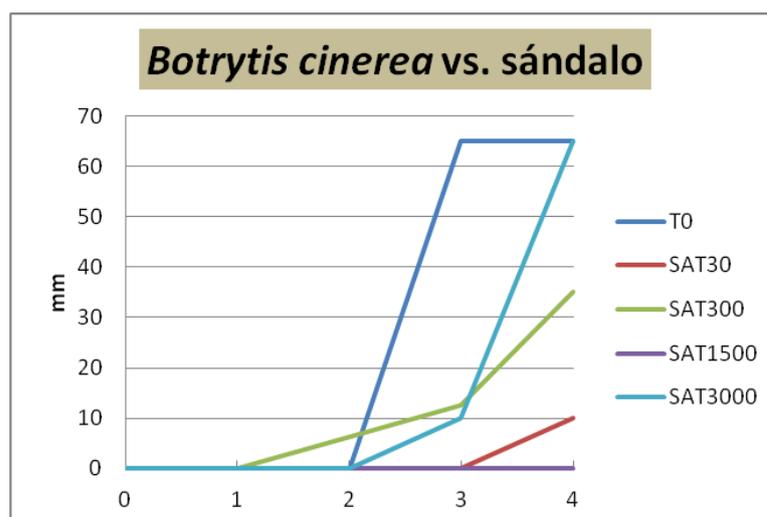
En la gráfica siguiente (Figura 78), se presenta la evolución del efecto del aceite de melisa sobre *Botrytis cinerea*. Como se puede observar, el control ejercido de este aceite sobre el hongo, es nulo, no pudiéndose establecer ninguna dosis de control.



**Figura 78:** Evolución semanal del crecimiento *Botrytis cinerea*, in vivo, frente a tratamientos con melisa. Tratamientos: T0 (control), METxxx (tratamientos con citronela, xxx: dosis (ppm)).

### ❖ Botrytis cinerea vs. Sándalo

A continuación la gráfica siguiente (Figura 79), muestra la evolución de las lesiones en naranja frente al aceite de sándalo.

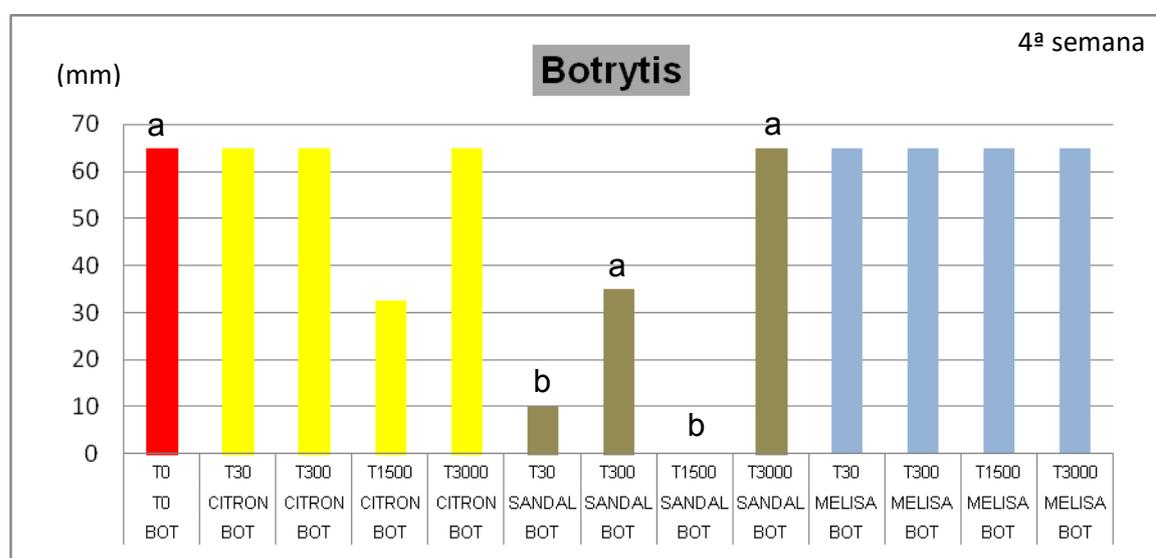


**Figura 79:** Evolución semanal del crecimiento *Botrytis cinerea*, in vivo, frente a tratamientos con sándalo. Tratamientos: T0 (control), SATxxx (tratamientos con sándalo, xxx: dosis (ppm)).

Evaluando al sándalo como controlador fúngico sobre *Botrytis*, en función de la gráfica presentada, se observa que este aceite parece tener efecto controlador sobre el hongo, ya que en la cuarta semana, a dosis de 1500 ppm ejerce un control del hongo del 100%.

Cuando se analizan todos datos estadísticamente para validar lo comentado (Figura 80) solamente el aceite de sándalo muestra diferencias significativas (Test Kruskal-Wallis:  $H(4, N=20)=15,15518, p=0,0044$ ). *Botrytis* frente a citronela no es significativo ( $p=0,1266$ ) y para melisa todos los resultados son 100% de crecimiento fúngico.

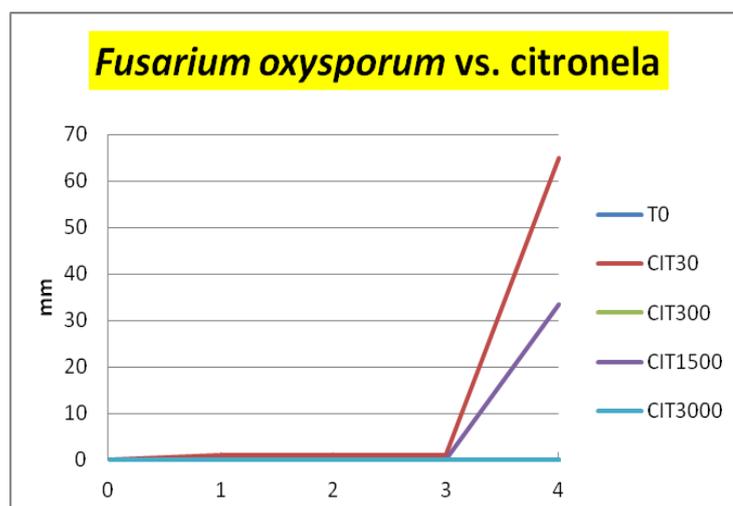
En la gráfica vemos que hay diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney) entre tratamientos con sándalo, ya que a concentraciones de 30 ppm y 1500 ppm, se produce una notable reducción de las lesiones o incluso ni aparecen como es el caso con el tratamiento de 1500 ppm. Sin embargo, la dosis superior de 3000 ppm no difiere del control.



**Figura 80:** Valores medios de la lesión producida en naranjas por *Botrytis cinerea* en la 4ª semana. T0: Control; T(X): Tratamiento con aceite esencial (ppm), citronela (CITRON), melisa (MELISA) y sándalo (SANDAL). Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney  $p>0,05$ )

### ❖ *Fusarium oxysporum* vs. Citronela

El siguiente patógeno necrotrofo que se la estudiado in vivo en este ensayo es *Fusarium oxysporum* también en naranjas, donde los resultados se presentan en las siguientes gráficas (figura 81, 82 y 83, citronela, sándalo y melisa respectivamente), mostrando la evolución de las lesiones en la fruta durante las cuatro semanas de ensayo en función del tratamiento del aceite esencial elegido.



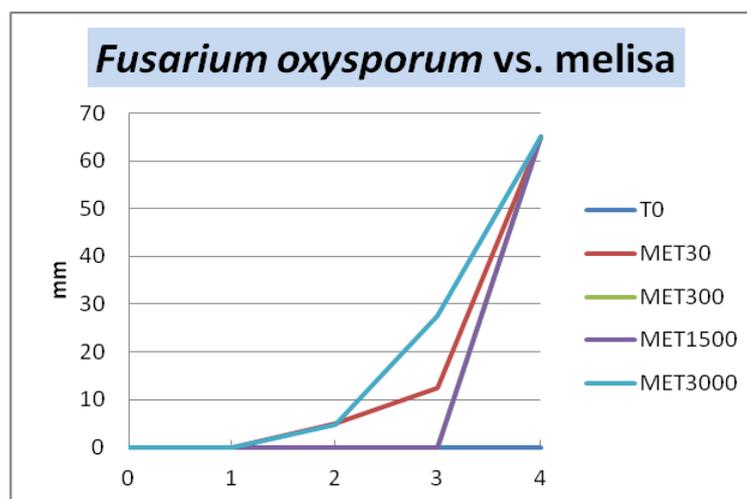
**Figura 81:** Evolución semanal del crecimiento de *Fusarium oxysporum*., in vivo, frente a tratamientos con citronela. Tratamientos: T0 (control), CITxxx (tratamientos con citronela, xxx: dosis (ppm)).

Los resultados obtenidos en las naranjas durante estas cuatro semanas con los diferentes aceites frente a *Fusarium oxysporum*, no aportan ningún dato claro. El tratamiento control, es decir naranjas inoculadas con *Fusarium*, y sin ninguna concentración de aceite esencial, no se desarrolla por lo que no se expresa en forma de lesión a lo largo del ensayo.

No se puede concluir con datos concretos sobre el desarrollo de este hongo en frutas y su control con aceite esencial de citronela ya que al no haberse desarrollado en el tratamiento control, no se pueden hacer comparaciones válidas.

### ❖ *Fusarium oxysporum* vs. Melisa

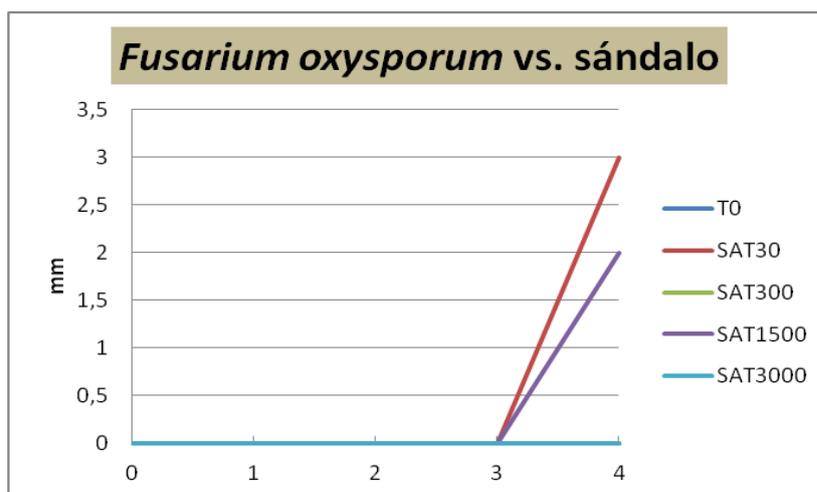
Con respecto a melisa, la gráfica que se presenta a continuación (Figura 82), describe también la evolución del patógeno frente a los diferentes tratamientos con este aceite esencial. Los resultados son confusos como en las anteriores gráficas debido a que en el control, el hongo no se manifiesta durante las cuatro semanas de ensayo y tratamientos como el T3000, que es el tratamiento con mayor concentración de aceite esencial, es el que menor control ejerce sobre el hongo y en el que más deprisa se desarrolla en las cuatro semanas del ensayo.



**Figura 82:** Evolución semanal del crecimiento de *Fusarium oxysporum*, *in vivo*, frente a tratamientos con melisa. Tratamientos: T0 (control), METxxx (tratamientos con melisa, xxx: dosis (ppm)).

### ❖ *Fusarium oxysporum* vs. Sándalo

En la gráfica siguiente (Figura 83), se representan las lesiones producidas por *Fusarium oxysporum* en las naranjas, respecto a diferentes tratamientos con sándalo como agente de control fúngico.



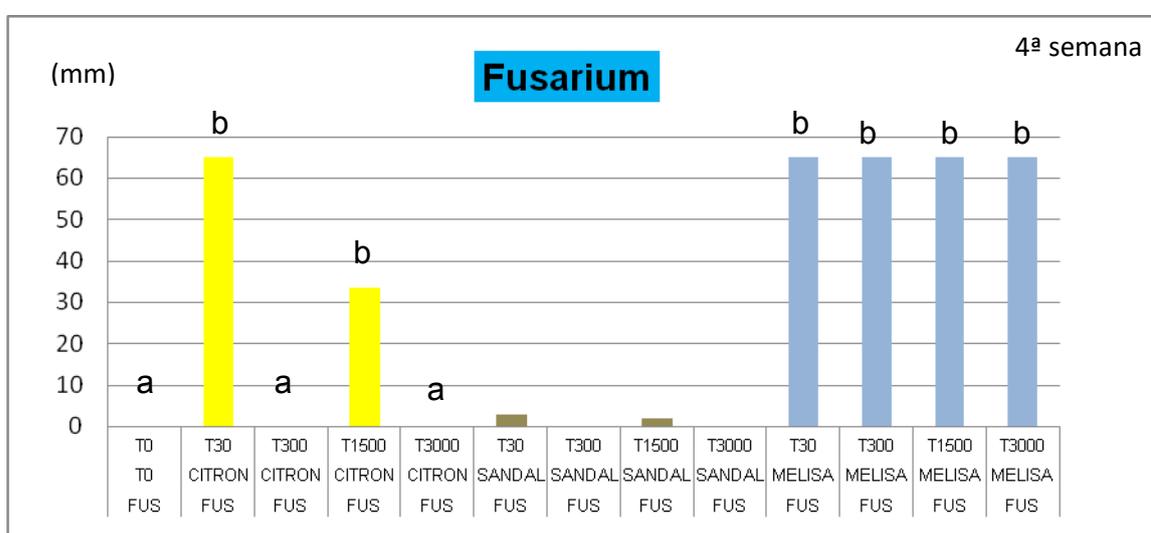
**Figura 83:** Evolución semanal del crecimiento de *Fusarium oxysporum*, *in vivo*, frente a tratamientos con sándalo. Tratamientos: T0 (control), SATxxx (tratamientos con sándalo, xxx: dosis (ppm)).

Observando el gráfico se ve que el tratamiento control no se ha desarrollado por lo que no se pueden hacer comparaciones entre tratamientos.

Se analizan los datos estadísticamente para ver si hay alguna diferencia significativa entre tratamientos y los resultados de los análisis estadísticos son representados en el diagrama de barras (Figura 84).

El Test Kruskal-Wallis da una probabilidad de  $p = 0,0569$ , para citronela y de  $p = 0,0009$  para melisa. Sin embargo las diferencias se deben al crecimiento nulo en los controles positivos.

A continuación, en la siguiente gráfica (Figura 86), como se ha venido haciendo con los patógenos y aceites anteriores, se presentan en conjunto las mediciones de las lesiones producidas por *Fusarium oxysporum* a la cuarta semana de envasado con cada aceite esencial en las concentraciones establecidas en el ensayo y los resultados de la estadística anterior.



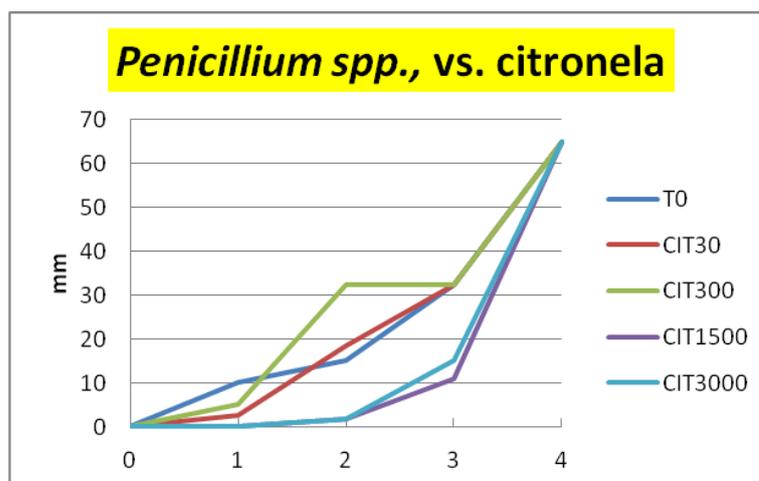
**Figura 84:** Valores medios de la lesión producida en naranjas por *Fusarium oxysporum* en la 4ª semana. T0: Control; T(X): Tratamiento con aceite esencial (ppm), citronela (CITRON), melisa (MELISA) y sándalo (SANDAL). Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney  $p > 0,05$ ).

La interpretación de los datos de esta gráfica, no aporta ningún dato interesante para proponer dosis de control efectivas que inhiban el crecimiento del hongo frente a los diferentes tratamientos con aceite esencial de citronela, sándalo o melisa.

### ❖ *Penicillium spp.*, vs. Citronela

El último hongo que se ha ensayado ha sido *Penicillium spp.* Como en casos anteriores, los datos recogidos durante las cuatro semanas de crecimiento se representan en la gráfica siguiente y se evalúa su comportamiento a lo largo de ellas frente a los diferentes tratamientos con aceites aplicados en el envase.

En la gráfica siguiente (Figura 85), se evalúa el control de citronela sobre *Penicillium spp.*, y se observa que con los tratamientos de 1500 y 3000 ppm, el hongo se mantiene inactivo durante las dos primeras semanas y a partir de aquí crece levemente hasta la tercera y es a partir de ella, donde el crecimiento es vertiginoso hasta la cuarta semana mientras que los tratamientos de 30 y 300 ppm, no han controlado al hongo.



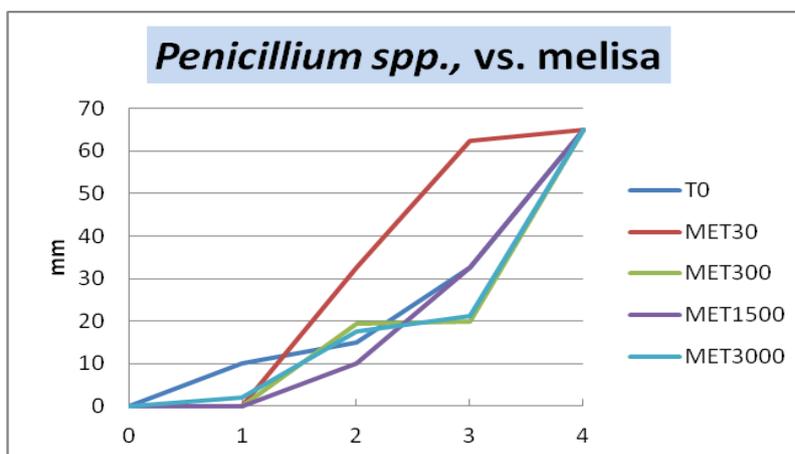
**Figura 85:** Evolución semanal del crecimiento de *Penicillium spp.*, *in vivo*, frente a tratamientos con citronela. Tratamientos: T0 (control), CITxxx (tratamientos con citronela, xxx: dosis (ppm)).

El tratamiento control en este ensayo ha prosperado, *Penicillium* es un hongo muy asociado a los cítricos y quizás sea esta la causa de su rápido desarrollo. El tratamiento por encima de 1500 ppm, produce cierto efecto control en el desarrollo del hongo, aunque en la cuarta semana del ensayo su desarrollo sea del 100%.

### ❖ *Penicillium spp.*, vs. Melisa

El comportamiento de *Penicillium spp.*, frente a las distintas dosis de melisa ensayadas, se representan en la gráfica (Figura 86) siguiente.

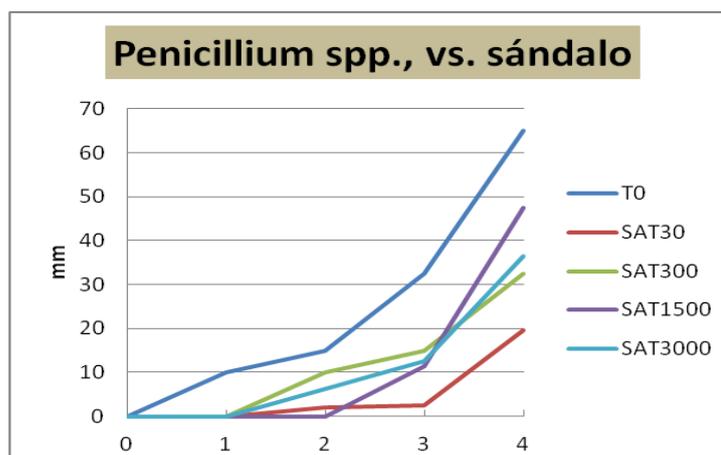
El desarrollo del hongo en función de la concentración del aceite, es arbitrario. No hay una concentración de aceite esencial de melisa que controle al hongo de una manera efectiva según podemos interpretar visualmente de los datos.



**Figura 86:** Evolución semanal del crecimiento de *Penicillium spp.*, *in vivo*, frente a tratamientos con melisa. Tratamientos: T0 (control), METxxx (tratamientos con citronela, xxx: dosis (ppm)).

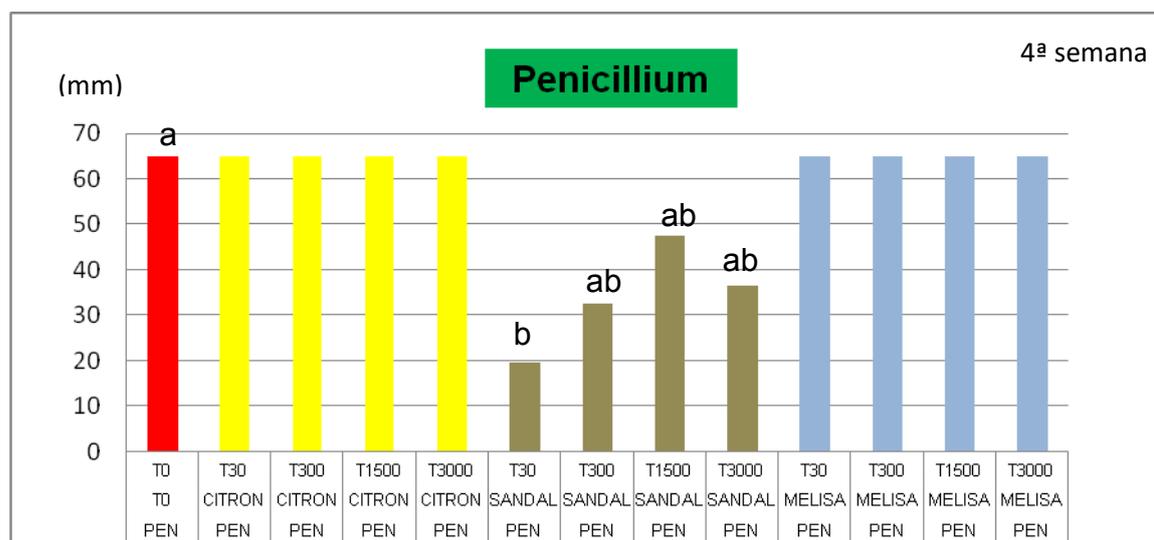
### ❖ *Penicillium spp.*, vs. Sándalo

A continuación se muestran los datos relativos al comportamiento de *Penicillium spp.*, frente a distintos tratamientos de aceite esencial de sándalo. Los resultados obtenidos de las mediciones en naranjas se representan en la gráfica siguiente (Figura 87). Como se observa en el gráfico, sándalo sí ejerce un control inhibitorio en el crecimiento del hongo. La concentración que mejor controla a *Penicillium spp.*, es 30 ppm de aceite según la gráfica. El resto de los tratamientos con dosis mucho mayores (300 ppm, 1500 ppm y 3000 ppm), también ejercen un control en el desarrollo del hongo, pero a mayores concentraciones de aceite, mayor es su desarrollo.



**Figura 87:** Evolución semanal del crecimiento de *Penicillium spp.*, *in vivo*, frente a tratamientos con sándalo. Tratamientos: T0 (control), SATxxx (tratamientos con sándalo, xxx: dosis (ppm)).

Se analizan los datos estadísticamente para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos de aceites esenciales aplicados. El resultado de los análisis estadísticos son representados en el diagrama de barras siguiente (Figura 88). El Test Kruskal-Wallis solo dio diferencias significativas en sándalo ( $H(4, N=20)=4,879663, p=0,047222$ ) y el test U Mann-Whitney en la comparación por pares indica las diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos.



**Figura 88:** Valores medios de la lesión producida en naranjas por *Fusarium oxysporum* en la 4ª semana. T0: Control; T(X): Tratamiento con aceite esencial (ppm), citronela (CITRON), melisa (MELISA) y sándalo (SANDAL). Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney  $p>0,05$ )

Observando los datos, el único valor que presenta diferencia significativa con el control es el sándalo en el tratamiento T30, mientras que en el resto de dosificaciones no muestran diferencias significativas.

Tras el análisis de los resultados del ensayo *in vivo* con naranjas, los datos obtenidos son confusos ya que los diferentes hongos no reaccionan a las concentraciones de los aceites esenciales de una manera "normal o esperada" como ocurre por ejemplo en los ensayos *in vitro*, donde a mayores concentraciones de aceite esencial, mayor es el control producido en el patógeno. Los patógenos de los tratamiento control en los ensayos, T0, no se desarrollan o se desarrollan mucho menos que con las diferentes dosis de aceites esenciales aplicadas.

Pueden haber incidido muchas circunstancias en este ensayo *in vivo*, para que los datos obtenidos sean poco aclaratorios y no muestren los resultados esperados de inhibición en las naranjas: el envase plástico utilizado para su envasado que quizás no cumpla con las necesidades químico-físicas de los volátiles y los deje escapar, la cepa concreta de hongo utilizado en el ensayo y las características químicas específicas y porcentaje de sustancias activas fúngicas de los aceites esenciales probados, entre otras.

En todos los ensayos revisados, hay un factor común en la inhibición del desarrollo de los patógenos y es que a mayor concentración de aceite esencial, mayor dominio y control sobre el necrotrofo. Abd-Alla, Abd-El-Kader, Abd-El-Kareem, & El-Mohamedy. (2011) evalúan los aceites esenciales de citronela, tomillo y ácido paracético en fresas para el control de *Botrytis cinerea* y en fase de vapor a 200 ppm se produce una reducción en las lesiones mientras que con fase líquida la dosis efectiva es diez veces mayor. Otro ensayo llevado a cabo en la India por Shahi, S.K., Patra, M., Shukla, A.C., & Dikshit, A. (2003), sobre el control de patógenos postcosecha como *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* y *Phoma violacea* con citronela en manzana, demostró que se alcanzaba la inhibición completa de los tres patógenos a concentraciones de 20.000 ppm mediante tratamiento de preinoculación mientras que con el tratamiento postinoculación necesitaba 30.000 ppm de aceite de citronela (*Cymbopogon flexuosus*), para un control del 100% de la pudrición. En este caso vemos que las dosis son muy superiores a las usadas en el presente estudio.

Bhaskara-Reddy, Angers, Gosselint & Arul, (1997), ensayan con aceite esencial de dos clones de tomillo (*Thymus vulgaris*) en fresa (*fragaria ananassa*), para el control de *Botrytis cinerea*. Se obtuvieron datos positivos a una concentración de 200 ppm de aceite esencial cuando la fresa es inoculada mediante esporas y las fresas se depositan en envases plásticos y en medio de ellas, se asienta una esponja impregnada de aceite de tomillo. Un trabajo realizado sobre control de la pudrición de *Alternaria alternata* en tomate recién cosechado y almacenado, con aceite esencial de *Cassia angustifolia*, muestra que a 500 ppm de este aceite, *Alternaria alternata* reduce considerablemente las pudriciones Feng, W. & Zheng, X. (2006).

Se dispone de abundante bibliografía sobre el control fúngico *in vivo* en material vegetal, siendo el denominador común en todos los ensayos, que los aceites esenciales sí ejercen un control efectivo en la conservación postcosecha de los productos perecederos, tanto suculentos o como en grano. Las diferencias entre dosificaciones varían mucho en función del protocolo a seguir en el ensayo (inoculación del patógeno, modo de aplicación del aceite esencial, tipo de envasado), material vegetal a estudiar, del tipo de hongo específico y característica específicas químicas del aceite esencial a utilizar.

### 5.3. Ensayos in vitro: germinación de esporas en PDA

#### 5.3.1. Valoración de la germinación de esporas de patógenos con aceites esenciales de citronela, melisa y sándalo.

En este ensayo se ha evaluado la capacidad de germinar y desarrollar el tubo germinativo en presencia del aceite esencial. En este ensayo, sólo se han testado los tratamientos con mayores dosis de aceite esencial como son T1500 (1500 ppm) y T3000 (3000 ppm) ya que se ha comprobado mediante los estudios *in vitro* que a dichas dosis se ejerce un control inhibitorio sobre todos los hongos de estudio.

Según la bibliografía revisada (Shaaban, Ramadan, Amer, El-Sideek, & Osman, 2013), hay una relación proporcional entre las concentraciones aplicadas de aceite esencial y la producción de esporas; a mayor concentración de aceite, menor es la producción de propágulo y menor porcentaje de germinación presenta las esporas formadas.

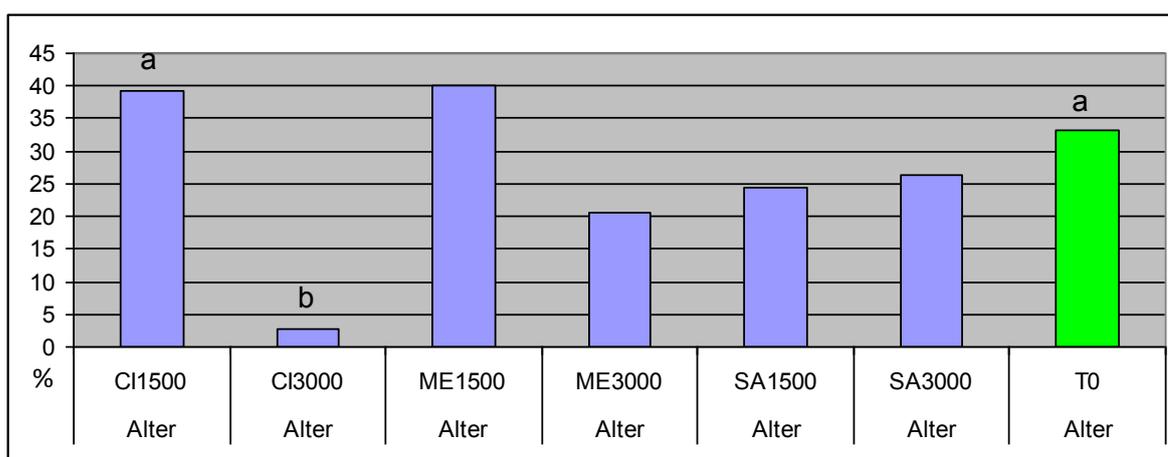
#### ❖ Alternaria spp., vs. Citronela, melisa y sándalo

En la gráfica siguiente (Figura 89), se representa el porcentaje de germinación de esporas de *Alternaria spp.*, frente al aceite de citronela, sándalo y melisa con sus respectivos tratamientos de 1500 ppm y 3000 ppm.

Si se analizan los datos estadísticamente mediante los tests no paramétricos, (Kruskal-Wallis test:  $H(6, N=21) = 7,396042$   $p = 0,046302$ ), indica que hay diferencias significativas en el conjunto y test U Mann-Whitney en la comparación por pares indica que hay diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos.

Se observa que éstas sólo se producen entre el control y el tratamiento con citronela a una concentración de 3000 ppm, donde la germinación de las esporas alcanza un 3,5% respecto al control que obtiene valores de 33%.

El resto de los tratamientos a excepción de melisa T1500 y citronela T1500, la germinación se ve mermada por la acción de los aceites pero no presentan diferencias significativas con respecto al control y resto de tratamientos.

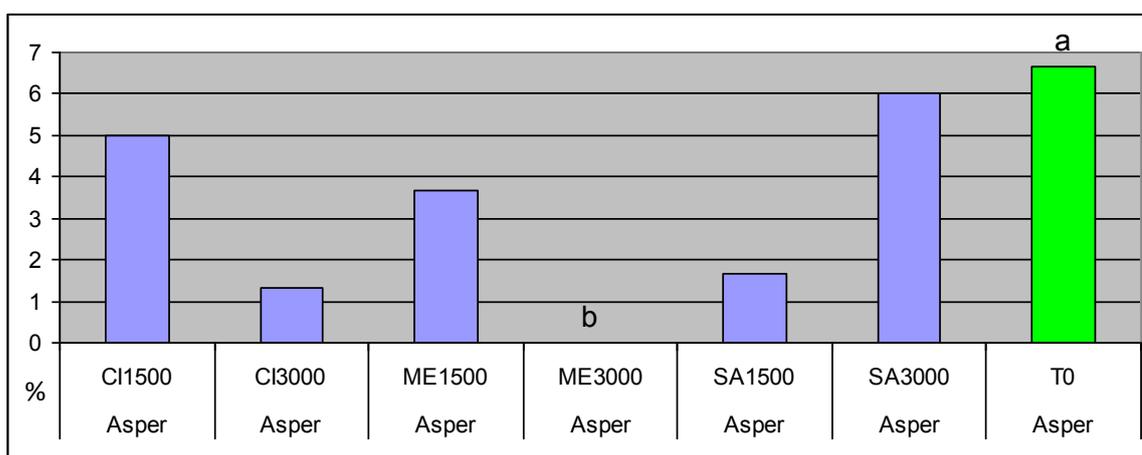


**Figura 89:** Porcentaje de germinación de esporas de *Alternaria spp.* en función del tratamiento y aceite esencial. CI: citronela, ME: melisa, SA: sándalo. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney  $p > 0,05$ )

Se podría concluir como resultado general que solo la dosis de citronela a 3000 ppm, produce un control efectivo en la germinación de esporas de *Alternaria*.

#### ❖ *Aspergillus spp.*, vs. Citronela, melisa y sándalo

En la gráfica siguiente (Figura 90), se representa la germinación de las esporas de *Aspergillus spp.*, otro hongo de estudio y productor de micotoxinas, frente a las distintas dosis de los aceites esenciales a estudiar.



**Figura 90:** Porcentaje de germinación de esporas de *Aspergillus spp.* en función del tratamiento y aceite esencial. CI: citronela, ME: melisa, SA: sándalo. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney  $p > 0,05$ ).

*Aspergillus spp.* ve limitada la germinación de sus esporas los aceites esenciales del estudio a las concentraciones a ensayar (Kruskal-Wallis test:  $H(6, N=21) = 7,493275$   $p = 0,042146$ ). Sin embargo, sólo se presentan diferencias estadísticamente significativas (test U Mann-Whitney) en la comparación por pares entre melisa a 3000 ppm y el control.

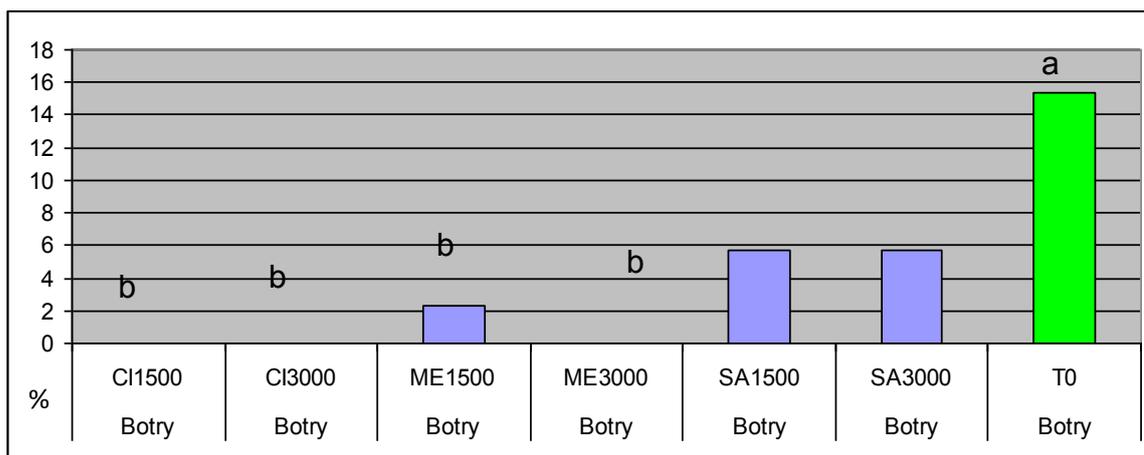
Ha de señalar que el porcentaje de germinación del control sólo alcanzó el 7%. Se podría entonces establecer como dosis efectiva para el control de la germinación de esporas de *Aspergillus*, el aceite esencial de melisa a 3000 ppm.

#### ❖ *Botrytis cinerea.*, vs. Citronela, melisa y sándalo

Respecto a *Botrytis cinerea*, los resultados obtenidos que se representan en la gráfica siguiente (Figura 91), muestran mejores valores a primera vista, ya que el porcentaje de germinación de esporas es mayor en el control y en todas las variantes de tratamiento-aceite, se observa una reducción en la germinación.

Para comprobar estas afirmaciones visuales y ver que realmente hay diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, se analizan los datos mediante los test no paramétricos ( $p = 0,049535$  en el test U Mann-Whitney), indicando que hay diferencias significativas en el conjunto y por lo tanto diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos.

Se concluye entonces, que los tratamientos de citronela y melisa, ejercen un control efectivo en la germinación de *Botrytis cinerea* en las dosis probadas. El aceite de sándalo también inhibe la germinación pero no es estadísticamente significativo.



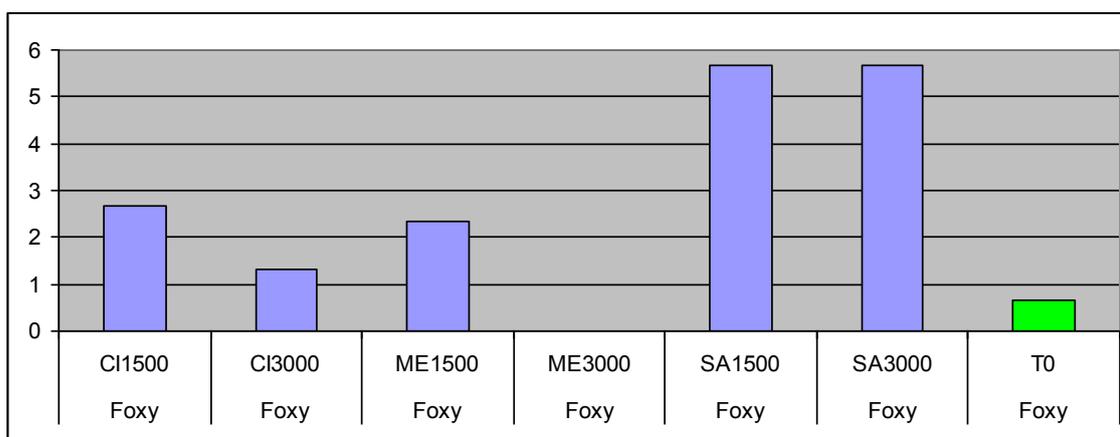
**Figura 91:** Porcentaje de germinación de esporas de *Botrytis cinerea* en función del tratamiento y aceite esencial. CI: citronela, ME: melisa, SA: sándalo. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney  $p > 0,05$ )

❖ **Fusarium oxysporum., vs. Citronela, melisa y sándalo**

Los datos de los porcentajes de germinación de esporas de *Fusarium oxysporum* frente a los tratamientos con aceites esenciales, se recogen en la gráfica siguiente (Figura 92), donde los resultados son poco concluyentes ya que las esporas del tratamiento control, las cuales no contienen ningún aceite esencial, germinan sólo un 3% del total.

No contando con un tratamiento control (T0), para hacer las sucesivas comparaciones entre tratamientos, no se puede emitir ninguna conclusión sobre el efecto bioactivo de los aceites sobre las esporas.

Se analizan los datos estadísticamente, (Kruskal-Wallis test:  $H(6, N=21) = 3,863830$   $p = 0,6951$ ), y los resultados confirman que no hay diferencias significativas en el conjunto de datos.



**Figura 92:** Porcentaje de germinación de esporas de *Fusarium oxysporum* en función del tratamiento y aceite esencial. CI: citronela, ME: melisa, SA: sándalo. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney  $p > 0,05$ )

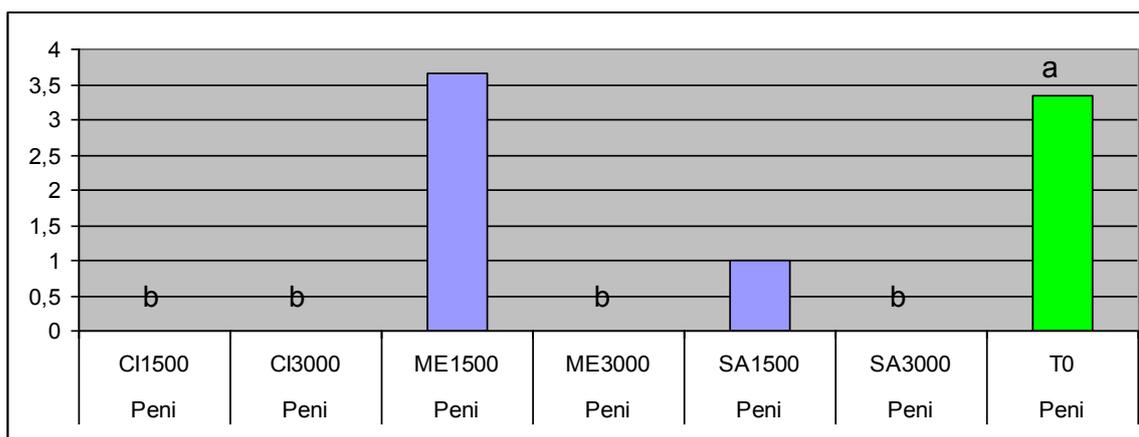
### ❖ Penicillium spp., vs. Citronela, melisa y sándalo

En el diagrama de barras siguiente (Figura 93), se presentan los porcentajes de germinación de las esporas de *Penicillium spp.*, frente a los diferentes tratamientos con citronela, melisa y sándalo. En este caso, los porcentajes de germinación, incluso en el control son bastante bajos, sólo un 3,3% de las esporas han germinado.

La observación del gráfico muestra que tanto el aceite de citronela como el aceite de sándalo producen un efecto inhibitorio en la germinación de esporas. Melisa también inhibe la germinación a 3000 ppm.

Para validar estos datos y confirmar que las diferencias halladas sí presentan valores de significación estadísticos, se analizan los datos mediante los test no paramétricos (Kruskal-Wallis test:  $H(6, N=21) = 12,93837$   $p = 0,0440$  y test U Mann-Whitney en la comparación por pares), indicando que hay diferencias significativas en el conjunto y por lo tanto, diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos, por lo que anunciado anteriormente se confirma.

El aceite de citronela en todas sus dosis probadas, melisa a 3000 ppm y sándalo también a concentración máxima reducen la germinación de esporas de forma estadísticamente significativa. El tratamiento de sándalo a la concentración de 1500 ppm, presenta reducción en la germinación de esporas aunque no presenta diferencias significativas con el resto.



**Figura 93:** Porcentaje de germinación de esporas de *Penicillium spp.*, en función del tratamiento y aceite esencial. CI: citronela, ME: melisa, SA: sándalo. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann-Whitney  $p > 0,05$ )

Muchos de los ensayos científicos que estudian el comportamiento inhibitorio que los aceites esenciales tienen sobre los hongos *in vitro*, estudian también la producción y la germinación de esporas. En el ensayo realizado por Shaaban, Ramadan, Amer, El-Sideek, & Osman, (2013), los resultados mostraron que la producción de esporas fue significativamente inhibida por las diferentes concentraciones de aceite esencial de citronela, con una reducción de la producción de esporas del 23.2% para *Aspergillus flavus*, 39.2% para *A. parasiticus*, 38.9% para *A. niger*, y 45.6% para *A. ochraceus* a una concentración de 1000 ppm y la reducción más pronunciada en la germinación de esporas de todos los hongos analizados se produjo en la concentración más alta de aceites esenciales 4000 ppm. El aceite de citronela también mostró una notable

reducción del desarrollo del micelio y de la síntesis de aflatoxina B1, por *A. flavus*, inhibiendo completamente la producción de éstas en 4000 ppm.

Otro trabajo realizado en fresa por Abd-Alla, *et al.* (2011), sobre la producción y germinación de esporas de *Botrytis cinerea*, mostró que los tratamientos de vapor a 100 ppm y en líquido a 500 ppm redujeron significativamente la germinación. Feng, W., & Zheng, X. (2006), estudian el efecto inhibitorio que tiene el aceite esencial de cassia sobre la germinación de esporas de *Alternaria alternata*, y afirman que con dosis de 500 ppm de aceite esencial, la germinación se reduce a un 4,9%.

Muchos otros ensayos apoyan que los aceites esenciales influyen directamente en la producción y germinación de esporas y que se produce una correlación o proporción directa entre la inhibición y la concentración de aceite esencial empleado. Se confirma también gracias a la bibliografía revisada, que el aceite esencial en forma de vapor, ejerce un control más efectivo sobre la producción y germinación de esporas que en fase líquida.

En las siguiente tabla (Tabla 7) se resumen las dosis efectivas de los diferentes aceites esenciales frente a los hongos oportunistas ensayados en el ensayo de crecimiento in vitro en PDA (Tabla 7A), in vivo sobre naranja (Tabla 7B) y germinación de espora in vitro (Tabla 7C).

**Tabla 7:** Resumen de las dosis efectivas de los aceites esenciales (A) crecimiento in vitro en PDA, (B) in vivo sobre naranja, (C) germinación esporas in vitro

(A) PDA	<i>Alternaria</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Botrytis</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Penicillium</i>
Citronela	300 ppm	1500 ppm	1500 ppm	1500 ppm	1500 ppm
Melisa	1500 ppm	-	-	-	-
Sándalo	300 ppm	1500 ppm	300 ppm	1500 ppm	300 ppm

(B) Naranja	<i>Alternaria</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Botrytis</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Penicillium</i>
Citronela	-	-	-	-	-
Melisa	-	-	-	-	-
Sándalo	-	-	30 y 1500 ppm	-	30 ppm

(C) Esporas	<i>Alternaria</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Botrytis</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Penicillium</i>
Citronela	3000 ppm	-	1500 ppm	-	1500 ppm
Melisa	-	3000 ppm	1500 ppm	-	3000 ppm
Sándalo	-	-	-	-	3000 ppm

## 6. CONCLUSIONES:

- 1- El crecimiento micelial in vitro en medio PDA de todos los hongos fue reducido por los aceites esenciales de citronela y sándalo a partir de dosis de 300 ppm o 1500 ppm mientras que el aceite esencial de melisa solo funcionó frente a *Alternaria* a partir de 1500 ppm.
- 2- Los ensayos sobre naranja recolectada son confusos y caóticos, no pudiéndose establecer ninguna conclusión clara en el control fúngico postcosecha y aunque en casos puntuales si haya habido "efecto inhibitorio" como ha ocurrido con el aceite de sándalo en *Botrytis cinerea* y *Penicillium spp.* ha sido en dosis intermedias.
- 3- El ensayo de germinación de esporas *in vitro*, presenta buenos resultados en diferentes combinaciones funcionando todos los aceites en *Penicillium* y ninguno en *Fusarium*.
- 4- Los aceites esenciales de citronela, melisa y sándalo presentan posibilidades en el control de los cinco hongos ensayados y las pruebas in vitro han sido positivas sin embargo el proceso de aplicación sobre sustrato vegetal debe refinarse para alcanzar resultados más consistentes.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abd-Alla, M.A., Abd-El-Kader, M.M., Abd-El-Kareem, F., y El-Mohamedy, R.S.S.** (2011). Evaluation of lemongrass, thyme and paracetic acid against gray mold of strawberry fruits. *Journal of Agricultural Technology*, 7(6), 1775-1787.
- Abdellatif, F., Boudjella, H., Zitouni, A., y Hassani A.** (2014). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from leaves of algerian *Melissa Officinalis*. *EXCLI Journal*, 13, 772-781.
- Alfano, J.R., y Collmer, A.** (1996). Bacterial Pathogens in Plants: Life up against the wall. *Plant Cell*, 8, 1683-1698.
- ALVES-SANTOS, F.M. & DÍEZ, J.J. Eds** (2011). Control of Fusarium diseases. *Research Signpost*.
- Alves-Santos, F.M.** (1999). La Fusariosis de la Judía en Castilla y león: Caracterización Molecular y Diagnóstico de los Patógenos. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.
- Arroyo Gallardo, V.** (2015). Estudio de aislados no patogénicos de *Fusarium oxysporum* para el control biológico de patógenos fúngicos oportunistas. Trabajo Fin de Máster. E.T.S.I.I.A.A. Palencia.
- Bahtiyarca-Bağdat, R., y Coşge, B.** (2010). The essential oil of lemon balm (*melissa officinalis* L.), its components and using fields. *Journal of Agriculture*, 21(1), 116-121.
- BAKER, K.F., y COOK, R.J.** (1974). Biological control of plant pathogens. W. H.
- Bankole, S.A., y Joda, A.O.** (2004). Effect of lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) powder and essential oil on mould deterioration and aflatoxin contamination of melon seeds (*Colocynthis citrullus* L.). *African Journal of Biotechnology*, 3(1), 52-59.
- Bhaskara-Reddy, M.V., Angers, P., Gosselint, A., y Arul, J.** (1997). Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. *Phytochemistry*, 47(8), 15515-1520.
- Cowan, M.M.** (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564-582.
- Cruz, R. M., Piontelli, E., Vieille, P., y Carvajal, L.** (2016). Identification of *Alternaria botrytis* (Preuss) Woudenberg & Crous. *Revista Argentina de Microbiología*, 48(2), 182-183.
- De Corato, U., Maccioni, O., Trupo, M., & Di Sanzo, G.** (2010). Use essential oil of *Laurus nobilis* obtained by means of a supercritical carbon dioxide technique against post harvest spoilage fungi. *Crop Protection*, 29, 142-147.
- El Ouadi, Y., Manssouri, M., Bouyanzer, A., Majidi, L., Bendaif, H., Elmsellem, H.,...Hammouti, B.** (2017). Essential oil composition and antifungal activity of *Melissa officinalis* originating from North-Est Morocco, against postharvest phytopathogenic fungi in apples. *Microbial Pathogenesis*.
- Feng, W., y Zheng, X.** (2006). Essential oils to control *Alternaria alternata* in vitro and in vivo. *Food Control*, 18, 1126-1130.
- Ganjewala, D.** (2009). *Cymbopogon* essential oils: Chemical compositions and bioactivities. *International Journal of Essential Oil Therapeutics*, 3, 56-65.
- Gordon, T.R., y Martyn, R.D.** (1997). The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annual Review of Phytopathology*, 35, 111-128.

- Halliwell, B., Murcia, M.A., Chirico, S., y Aruoma, O.I.** (1995). Free radicals and antioxidants in vivo: what they do and how they work. *Food science and Nutrition*, 35, 7-20.
- Hammer, K.A., Carson C.F., y Riley T.V.** (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86(6), 985-90.
- Koul, P., Walia, S. y Dhaliwal, G.S.** (2008). Essential Oils as Green Pesticides: Potential and Constraints. *Insect Biopesticide Research Centre*, 4(1), 63–84.
- Kumar, A., Malika, F., Bhushana, S., Sethia, V.K., Shahia, A.K.,...Kaurb, J.** (2008). An essential oil and its major constituent isointermedeol induce apoptosis by increased expression of mitochondrial cytochrome c and apical death receptors in human leukaemia HL-60 cells. *Chemical Biology Interactions*, 171, 332-47.
- Kumar, R., Anjum, N., y Tripathi, Y.C.** (2017). Phytochemistry and pharmacology of *santalum album* L.: a review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 9(11), 117-124.
- Kumar, R., Srivastava, M., y Dubey, N.K.** (2007). Evaluation of *Cymbopogon martinii* oil extract for control of postharvest insect deterioration in cereals and legumes. *Journal of Food Protection*, 70, 172-78.
- Luztoni, F., Kauff, F., Cymon, J. C., McLaughlin, D., Celio, G., Dentinger, B.,...Vilgalys, R.** (2004). Assembling the fungal tree of life progress classification and evolution of subcellular traits. *American Journal of Botany*, 91(10), 1446–1480.
- Martínez-Tenorio, Y., y López-Malo, V.** (2011). Envases activos con agentes microbianos y su aplicación e los alimentos. *Temas selectos de Ingeniería de los alimentos*, 5(2), 1-12.
- Mishra, A.K., y Dubey, N.K.** (1994). Evaluation of Some Essential Oils for Their Toxicity against Fungi Causing Deterioration of Stored Food Commodities. *Applied and Environmental Microbiology*, 1101-1105.
- Novoa, M.** (2017). Control biológico de patógenos vegetales. Proyecto de Investigación del Bachillerato de Investigación y Excelencia. Universidad de Valladolid.
- Peredo, H.A., Palou, E., y López, A.** (2009). Aceites esenciales: métodos de extracción. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 3(1), 24-32.
- Rodríguez, E.N.** (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*, 7(1), 153-170.
- Roller, S.P., Seedhar** (2002). Carvacrol and cinnamic acid inhibit microbial growth in fresh-cut melon and kiwifruit at 4° and 8°C. *Letters Applied Microbiology*, 35, 390-394.
- Sessou, P., Farougou, S., Kaneho, S., Djenontin, S., Alitonou G.A., Azokpota, P., Youssao, I., y Sohounloué, D.** (2012). Bioefficacy of *Cymbopogon citratus* essential oil against foodborne pathogens in culture medium and in traditional cheese wagashi produced in Benin. *International Research Journal of Microbiology*, 3(12), 406-415.
- Shaaban, H.A., Ramadan, M.M., Amer, M.M., El-Sideek, L., y Osman, F.** (2013). Chemical Composition of *Cymbopogon Citratus* Essential Oil and Antifungal Activity Against Some Species of Mycotoxigenic *Aspergillus Fungi*. *Journal of Applied Sciences Research*, 9(11), 5770-5779.
- Shahi, S.K., Patra, M., Shukla, A.C., y Dikshit, A.** ( 2003). Use of essentia oil as botanical-pesticide against post harvest spoilage in *Malus pumilo* fruits. *Bio Control*, 48, 223-232.

**Shukla, A.C.** (2013). Plant secondary metabolites as source of postharvest disease management: An overview. *Journal of Stored Products and Postharvest Research*, 4(1).

**Soylu, E.M., Kurt, S., y Soylu, S.** (2010). In vitro e invivo antigungal activities of the essential oils of various plants, against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *International Journal of Food Microbiology*, 143, 183-189.

**Stroh, J., Wan, M.T., Isman, M.B. y Moul, D.J.** (1998). Evaluation of the acute toxicity to juvenile Pacific coho salmon and rainbow trout of some plant essential oils, a formulated product, and the carrier. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 60(6), 923-930.

**Tongnuanchan, P., y Benjakul, S.** (2014). Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and their Uses for Food preservation. *Journal of Food Science*, 79(7).

**Valdeolmillos, C.** (2018). Control biológico de patógenos mediante el uso de aceites esenciales. Proyecto de Investigación del Bachillerato de Investigación y Excelencia. Universidad de Valladolid.

**Velásquez, M.A., Alvarez, R.M., Tamayo, P., y Carvalho, C.P.** (2014). Evaluación *in vitro* de la actividad fungistática del aceite esencial de mandarina sobre el crecimiento de *Penicillium* sp. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 15(1) 7-14.

**Wong, K.K., Signal, F.A., Campion, S.H., y Motion, R.L.** (2005). Citronella as an insect repellent in food packaging. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53, 4633-4636.

**Yang, D., Hai-Yan, L., Wei-Wei G., y Shi-Lin C.** (2010). *Activities of essential oils from Asarum heterotropoides var. mandshuricum* against five phytopathogens. *Crop Protection*, 29(3), 295-299.

### **Libros consultados.**

**Ortuño, M.F.** (2006). *Manual práctico de Aceites Esenciales, Aromas y Perfumes*. España. Editorial Aiyana.

**Hirasa, K y Takemasa, M.** (2002). *Ciencia y Tecnología de las especias*. Zaragoza, España. Editorial Acribia.

**Mazzuz, C.** (1996). *Calidad de Frutos Cítricos*. Madrid, Editorial Mundi-Prensa.

### **Bibliografía Web.**

**FAO** (2015). Iniciativa mundial sobre la reducción de la pérdida y el desperdicio de alimentos.

<http://www.fao.org/3/a-i4068s.pdf>

**FHIA** (2007). Deterioro de las frutas y hortalizas frescas en el periodo de poscosecha. Departamento de producción vegetal.

<http://www.horticom.com/pd/imagenes/68/700/68700.pdf>

**Departamento de Protección Vegetal. Facultad de Agronomía. Universidad de la República de Uruguay.**

<http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/cursos/fitopato/practicas/cbiologico>

**Neyoy, S.** (2012). Apuntes de Fisiología Vegetal. Introducción al metabolismo secundario.

<http://fisiolvegetal.blogspot.com/2012/11/introduccion-al-metabolismo-secundario.html>

**Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición.**

[http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad\\_alimentaria/evaluacion\\_riesgos/informes\\_comite/AFLATOXINAS\\_ALIMENTOS.pdf](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/evaluacion_riesgos/informes_comite/AFLATOXINAS_ALIMENTOS.pdf)

**A.J. Silverside's scientific contributions**

[https://www.researchgate.net/scientific-contributions/28085560\\_AJ\\_Silverside](https://www.researchgate.net/scientific-contributions/28085560_AJ_Silverside)

**Fitoagro**

<http://fitoagro.blogspot.com/2015/09/fitopatologia-general-estructuras.html>

**www.tecnicoagricola.es**

<http://www.tecnicoagricola.es/penicillium-digitatum-moho-verde-y-penicillium-italicum-moho-azul/>

**La voz de la UCI**

<http://lavozdelauci.blogspot.com/2013/04/dia-12-aspergillus.html>

**Alamy**

<https://www.alamy.com/computer-illustration-of-conidia-asexual-spores-from-a-fusarium-sp-fungus-some-fusarium-fungi-are-pathogens-of-plants-and-humans-image282107889.html>

**Canna**

<http://www.canna.es/fusarium-plagas-enfermedades>