



---

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

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR  
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

**Grado en Ingeniería Agraria y del Medio Rural**

*“Evaluación de aceites esenciales de coníferas  
como posibles agentes de biocontrol en post-  
cosecha de hongos necrotrofos in vitro e in  
vivo “*

Estudiante: Daniel Santos Blázquez

Tutor: Fernando Manuel Alves Santos

Junio 2025

<b>ÍNDICE .....</b>	<b>Pág</b>
Índice de tablas.....	4
Índice de figuras.....	4
<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>10</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>12</b>
2.1. Hongos necrotrofos .....	13
2.1.1. <i>Alternaria</i> spp. ....	13
2.1.2. <i>Aspergillus</i> spp. ....	14
2.1.3. <i>Cladosporium</i> spp. ....	15
2.1.4. <i>Fusarium oxysporum</i> .....	16
2.1.5. <i>Penicillium</i> spp. ....	17
2.2. Aceites esenciales .....	17
2.2.1. Aceite esencial de abeto .....	19
2.2.2. Aceite esencial de canela .....	19
2.2.3. Aceite esencial de cedro.....	19
2.2.4. Aceite esencial de pino .....	20
2.2.5. Principios activos .....	21
<b>3. OBJETO DEL ESTUDIO .....</b>	<b>22</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
4.1. Obtención de los aislados.....	23
4.2. Procedencia e identificación de los aceites esenciales utilizados.....	24
4.3. Primer estudio <i>in vitro</i> : Análisis del crecimiento del hongo en medio PDA + aceite esencial correspondiente .....	24
4.4. Primer estudio <i>in vivo</i> : Análisis del crecimiento del hongo en lesiones en naranja ( <i>Citrus x sinensis</i> ) tras la acción del aceite esencial .....	27
4.5. Segundo estudio <i>in vitro</i> . Análisis de crecimiento de la segunda cepa de <i>Penicillium</i> spp. en medio PDA con los aceites correspondientes .....	29
4.6. Segundo estudio <i>in vivo</i> . Análisis del crecimiento del segundo aislado de <i>Penicillium</i> spp. en lesiones en naranja ( <i>Citrus x sinensis</i> ) tras la acción de los aceites esenciales.....	29
4.7. Análisis estadístico.....	30

<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>31</b>
5.1. Resultados del Primer estudio <i>in vitro</i> .....	31
5.1.1. Evolución fúngica de <i>Alternaria</i> spp. ....	31
5.1.2. Evolución fúngica de <i>Aspergillus</i> spp. ....	32
5.1.2.1. <i>Aspergillus</i> spp. y A.E. de Abeto .....	32
5.1.2.2. <i>Aspergillus</i> spp. y A.E. de Canela .....	33
5.1.2.3. <i>Aspergillus</i> spp. y A.E. de Cedro .....	35
5.1.2.4. <i>Aspergillus</i> spp. y A.E. de Pino .....	36
5.1.2.5. Discusión sobre <i>Aspergillus</i> spp. ....	38
5.1.3...Evolución fúngica de <i>Cladosporium</i> spp. ....	39
5.1.3.1. <i>Cladosporium</i> spp. y A.E. de Abeto .....	39
5.1.3.2. <i>Cladosporium</i> spp. y A.E. de Canela .....	41
5.1.3.3. <i>Cladosporium</i> spp. y A.E. de Cedro .....	42
5.1.3.4. <i>Cladosporium</i> spp. y A.E. de Pino .....	44
5.1.3.5. Discusión sobre <i>Cladosporium</i> spp. ....	45
5.1.4...Evolución fúngica de <i>Fusarium oxysporum</i> (FOP SP1) .....	46
5.1.4.1. <i>Fusarium oxysporum</i> y A.E. de Abeto .....	46
5.1.4.2. <i>Fusarium oxysporum</i> . y A.E. de Canela .....	48
5.1.4.3. <i>Fusarium oxysporum</i> . y A.E. de Cedro .....	49
5.1.4.4. <i>Fusarium oxysporum</i> . y A.E. de Pino .....	51
5.1.4.5. Discusión sobre <i>Fusarium oxysporum</i> .....	52
5.1.5...Evolución fúngica de <i>Penicillium</i> spp. ....	53
5.1.5.1. <i>Penicillium</i> spp. y A.E. de Abeto .....	53
5.1.5.2. <i>Penicillium</i> spp. y A.E. de Canela .....	54
5.1.5.3. <i>Penicillium</i> spp. y A.E. de Cedro .....	56
5.1.5.4. <i>Penicillium</i> spp. y A.E. de Pino .....	58
5.1.5.5. Discusión sobre <i>Penicillium</i> spp. ....	59
5.2. Resultados del Primer estudio <i>in vivo</i> .....	60
5.3. Resultados del Segundo estudio <i>in vitro</i> .....	60
5.3.1. Segunda cepa de <i>Penicillium</i> spp. y A.E. de Canela .....	61
5.3.2. Segunda cepa de <i>Penicillium</i> spp. y los demás aceites .....	63
5.3.3. Discusión sobre los aceites esenciales usados .....	65
5.4. Resultados del Segundo estudio <i>in vivo</i> .....	66
5.5. Estudio económico .....	67
5.6. Discusiones finales .....	68
5.7. Conclusiones .....	71
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>72</b>

## Índice de tablas

- **Tabla 1:** Relación entre los aceites esenciales utilizados y las principales materias activas presentes en ellos ..... 21
- **Tabla 2:** Procedencia y año de obtención de los aislados usados en el estudio ..... 23
- **Tabla 3:** Origen comercial, zona de obtención de la planta y especies de los diferentes aceites esenciales utilizados en el estudio ..... 24
- **Tabla 4:** Concentraciones y volúmenes de diluciones de esporas usadas para el estudio *in vivo* ..... 28
- **Tabla 5:** Dosis (en ppm) del aceite de abeto a partir de las cuales se han encontrado diferencias estadísticas significativas y diferencias importantes (superficie del hongo mayor o menor que 1500 mm<sup>2</sup>) en el crecimiento de los diferentes hongos del estudio. 68
- **Tabla 6:** Dosis (en ppm) del aceite de canela a partir de las cuales se han encontrado diferencias estadísticas significativas y diferencias importantes (superficie del hongo mayor o menor que 1500 mm<sup>2</sup>) en el crecimiento de los diferentes hongos del estudio. 69
- **Tabla 7:** Dosis (en ppm) del aceite de cedro a partir de las cuales se han encontrado diferencias estadísticas significativas y diferencias importantes (superficie del hongo mayor o menor que 1500 mm<sup>2</sup>) en el crecimiento de los diferentes hongos del estudio. 70
- **Tabla 8:** Dosis (en ppm) del aceite de pino a partir de las cuales se han encontrado diferencias estadísticas significativas y diferencias importantes (superficie del hongo mayor o menor que 1500 mm<sup>2</sup>) en el crecimiento de los diferentes hongos del estudio. 70

## Índice de figuras

- **Figura 1:** Placas de PDA en la cámara de flujo tras haber sembrado las muestra de hongo en ellas ..... 26
- **Figura 2:** Placas de FOP SP1 con PDA mezclado con aceite de canela en la semana 2 del estudio (dosis 3000, 300 y control de izq. a drcha.) ..... 26
- **Figura 3:** Evolución, en semanas, del crecimiento del hongo del género *Aspergillus* spp. ante el A.E. de abeto en la placa PDA en diferentes tratamientos (control, 30 ppm, 300 ppm y 3000 ppm) ..... 32

- **Figura 4:** Crecimiento del hongo del género *Aspergillus* spp. con A.E. de abeto a las 4 semanas del comienzo del estudio. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney  $p > 0,05$ ). ... 33
- **Figura 5:** Evolución, en semanas, del crecimiento del hongo del género *Aspergillus* spp. ante el A.E. de canela en la placa PDA en diferentes tratamientos (control, 30 ppm, 300 ppm y 3000 ppm)..... 34
- **Figura 6:** Crecimiento del hongo del género *Aspergillus* spp. con A.E. de canela a las 4 semanas del comienzo del estudio. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney  $p > 0,05$ ). ... 34
- **Figura 7:** Evolución, en semanas, del crecimiento del hongo del género *Aspergillus* spp. ante el A.E. de cedro en la placa PDA en diferentes tratamientos (control, 30 ppm, 300 ppm y 3000 ppm)..... 35
- **Figura 8:** Crecimiento del hongo del género *Aspergillus* spp. con A.E. de cedro a las 4 semanas del comienzo del estudio. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney  $p > 0,05$ ). ... 36
- **Figura 9:** Evolución, en semanas, del crecimiento del hongo del género *Aspergillus* spp. ante el A.E. de pino en la placa PDA en diferentes tratamientos (control, 30 ppm, 300 ppm y 3000 ppm)..... 37
- **Figura 10:** Crecimiento del hongo del género *Aspergillus* spp. con A.E. de pino a las 4 semanas del comienzo del estudio. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney  $p > 0,05$ ). ... 38
- **Figura 11:** Evolución, en semanas, del crecimiento del hongo del género *Cladosporium* spp. ante el A.E. de abeto en la placa PDA en diferentes tratamientos (control, 30 ppm, 300 ppm y 3000 ppm)..... 39
- **Figura 12:** Crecimiento del hongo del género *Cladosporium* spp. con A.E. de abeto a las 4 semanas del comienzo del estudio. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney  $p > 0,05$ ). ... 40
- **Figura 13:** Evolución, en semanas, del crecimiento del hongo del género *Cladosporium* spp. ante el A.E. de canela en la placa PDA en diferentes tratamientos (control, 30 ppm, 300 ppm y 3000 ppm)..... 41

- **Figura 14:** Crecimiento del hongo del género *Cladosporium* spp. con A.E. de canela a las 4 semanas del comienzo del estudio. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney  $p>0,05$ ). ... 42
- **Figura 15:** Evolución, en semanas, del crecimiento del hongo del género *Cladosporium* spp. ante el A.E. de cedro en la placa PDA en diferentes tratamientos (control, 30 ppm, 300 ppm y 3000 ppm)..... 43
- **Figura 16:** Crecimiento del hongo del género *Cladosporium* spp. con A.E. de canela a las 4 semanas del comienzo del estudio. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney  $p>0,05$ ). ... 43
- **Figura 17:** Evolución, en semanas, del crecimiento del hongo del género *Cladosporium* spp. ante el A.E. de pino en la placa PDA en diferentes tratamientos (control, 30 ppm, 300 ppm y 3000 ppm)..... 44
- **Figura 18:** Crecimiento del hongo del género *Cladosporium* spp. con A.E. de pino a las 4 semanas del comienzo del estudio. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney  $p>0,05$ ). ... 45
- **Figura 19:** Evolución, en semanas, del crecimiento del hongo *Fusarium oxysporum* (FOP SP1) ante el AE de abeto en la placa PDA en diferentes tratamientos (control, 30 ppm, 300 ppm y 3000 ppm)..... 46
- **Figura 20:** Crecimiento del hongo FOP SP1 con A.E. de abeto a las 4 semanas del comienzo del estudio. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney  $p>0,05$ ). ..... 47
- **Figura 21:** Evolución, en semanas, del crecimiento del hongo *Fusarium oxysporum* (FOP SP1) ante el AE de canela en la placa PDA en diferentes tratamientos (control, 30 ppm, 300 ppm y 3000 ppm)..... 48
- **Figura 22:** Crecimiento del hongo *Fusarium oxysporum* (FOP SP1) con A.E. de canela a las 4 semanas del comienzo del estudio. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney  $p>0,05$ ). ... 49
- **Figura 23:** Evolución, en semanas, del crecimiento del hongo *Fusarium oxysporum* (FOP SP1) ante el AE de cedro en la placa PDA en diferentes tratamientos (control, 30 ppm, 300 ppm y 3000 ppm)..... 50

- **Figura 24:** Crecimiento del hongo *Fusarium oxysporum* (FOP SP1) con A.E. de cedro a las 4 semanas del comienzo del estudio. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney  $p > 0,05$ ). ... 50
- **Figura 25:** Evolución, en semanas, del crecimiento del hongo *Fusarium oxysporum* (FOP SP1) ante el AE de pino en la placa PDA en diferentes tratamientos (control, 30 ppm, 300 ppm y 3000 ppm)..... 51
- **Figura 26:** Crecimiento del hongo *Fusarium oxysporum* (FOP SP1) con A.E. de pino a las 4 semanas del comienzo del estudio. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney  $p > 0,05$ ). ... 52
- **Figura 27:** Evolución, en semanas, del crecimiento del hongo del género *Penicillium* spp. ante el A.E. de abeto en la placa PDA en diferentes tratamientos (control, 30 ppm, 300 ppm y 3000 ppm)..... 53
- **Figura 28:** Crecimiento del hongo del género *Penicillium* spp. con A.E. de abeto a las 4 semanas del comienzo del estudio. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney  $p > 0,05$ ). ... 54
- **Figura 29:** Evolución, en semanas, del crecimiento del hongo del género *Penicillium* spp. ante el A.E. de canela en la placa PDA en diferentes tratamientos (control, 30 ppm, 300 ppm y 3000 ppm)..... 55
- **Figura 30:** Crecimiento del hongo del género *Penicillium* spp. con A.E. de canela a las 4 semanas del comienzo del estudio. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney  $p > 0,05$ ). ... 55
- **Figura 31:** Evolución, en semanas, del crecimiento del hongo del género *Penicillium* spp. ante el A.E. de cedro en la placa PDA en diferentes tratamientos (control, 30 ppm, 300 ppm y 3000 ppm)..... 56
- **Figura 32:** Crecimiento del hongo del género *Penicillium* spp. con A.E. de cedro a las 4 semanas del comienzo del estudio. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney  $p > 0,05$ ). ... 57
- **Figura 33:** Evolución, en semanas, del crecimiento del hongo del género *Penicillium* spp. ante el A.E. de pino en la placa PDA en diferentes tratamientos (control, 30 ppm, 300 ppm y 3000 ppm)..... 58

- **Figura 34:** Crecimiento del hongo del género *Penicillium* spp. con A.E. de pino a las 4 semanas del comienzo del estudio. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney  $p>0,05$ ). ... 59
- **Figura 35:** Naranjas del Primer Estudio *in vivo* con *Aspergillus* spp. contaminadas completamente por el hongo del género *Penicillium* spp. que se usó en el segundo estudio ..... 60
- **Figura 36:** Evolución, en semanas, del crecimiento del segundo hongo del estudio del género *Penicillium* spp. ante el A.E. de canela en la placa PDA en diferentes tratamientos (control, 30 ppm, 300 ppm y 3000 ppm) ..... 61
- **Figura 37:** Crecimiento del segundo hongo del género *Penicillium* spp. con A.E. de canela a las 4 semanas del comienzo del segundo estudio. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney  $p>0,05$ ). ..... 62
- **Figura 38:** Evolución, en semanas, del crecimiento del segundo hongo del estudio del género *Penicillium* spp. ante los A.E. de abeto, canela, cedro y pino en las placas PDA a 3000 ppm. .... 63
- **Figura 39:** Crecimiento del segundo hongo del género *Penicillium* spp. con todos los aceites esenciales del estudio a la dosis de 3000 ppm a las 4 semanas del comienzo del segundo estudio. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney  $p>0,05$ ). ..... 64
- **Figura 40:** Placas de PDA + A.E. de canela a 3000 ppm con una porción de naranja (*Citrus x sinensis*) contaminadas completamente por la segunda cepa de *Penicillium* spp. del estudio. .... 66

## Agradecimientos

A la Universidad de Valladolid, a todos los profesores que me han acompañado durante estos años de formación en la Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias de Palencia y en especial a mi tutor, Fernando Manuel Alves Santos por la idea del presente Trabajo Fin de Grado, por ayudarme y guiarme en todo momento a lo largo de este proceso y por su tiempo.

A mi familia por acercarme al campo y darme el amor por el medio rural, la tierra y el pueblo. Por creer en mí y por alentarme en los momentos que necesitaba, en especial a mis padres, Ángel José y Francisca de la Vega.

A todos los amigos que desde Palencia o desde mi natal Salamanca me han apoyado y han compartido conmigo tanto los buenos momentos como los retos del camino, el cual nos ha forjado para ser hoy quien somos.

## **1. RESUMEN**

En la agricultura, los hongos han supuesto un problema desde los comienzos de la actividad, generando pérdidas en las cosechas durante el periodo de siembra, desarrollo de la planta o el fruto, recolección o almacenamiento. Según la Food and Agriculture Organization (FAO), el 6 % de las pérdidas en la agricultura se deben a hongos y diversas enfermedades. Los hongos que más problemas producen en la agricultura pertenecen a los siguientes géneros: *Alternaria*, *Mucor*, *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Phoma*, *Rhizopus* y *Penicillium*, estos hongos causan alteraciones de manera frecuente en diferentes cultivos, alteraciones que afectan al aspecto natural, nutricional, características organolépticas y dificultad de conservación, además pueden afectar al consumidor produciéndole alergias e intoxicaciones, ya producen estructuras especializadas que se depositan sobre el cultivo, penetrando e invadiendo y eventualmente colonizando masivamente el tejido para causar daño y segregar sustancias, como consecuencia de su metabolismo secundario. Los dos momentos clave en que estos agentes actúan y producen mayores pérdidas son en campo y en almacenamiento, nosotros nos centraremos en este estudio en el almacenamiento, más concretamente en el sector frutícola, puesto que es en el momento donde se producen las mayores pérdidas tras su cosecha, llegando a alcanzar valores de hasta el 5 %. En algunos países productores de fruta, el porcentaje de pérdidas que representan las pérdidas en postcosecha pueden llegar a suponer un 50 % de la producción.

Estos hongos son combatidos actualmente con productos químicos junto con diversas técnicas como la frigoconservación o el uso de atmósferas controladas, aunque lo que se está buscando es encontrar productos de origen natural que hagan la misma función que los fungicidas químicos. En el presente estudio se pretende hacer una primera prueba de la eficiencia de diferentes aceites esenciales en el control *in vitro* e *in vivo* de estos hongos. En este estudio se analizan distintas concentraciones de aceites esenciales obtenidos de las plantas de cedro (*Cedrus deodara*), pino (*Pinus sylvestris*), abeto (*Abies sibirica*) y canela (*Cinnamomum verum*) con el objetivo de buscar un posible tratamiento ante las pudriciones y daños producidos por hongos necrotrofos como *Fusarium oxysporum*, *Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Cladosporium spp.* y *Alternaria spp.*

Tras realizar nuestro estudio y comprobar la eficacia de cada aceite esencial vemos que su eficacia *in vitro* ha sido bastante dispar, teniendo resultados bastante buenos en la inhibición de la mayoría de hongos con los aceites de cedro y canela a dosis de 3000 ppm, mientras que otros como el aceite esencial de pino o el de abeto han mostrado menor capacidad de inhibición de los hongos necrotrofos probados. En cuanto a los estudios *in vivo* estos no han sido satisfactorios ya que en el primero aparecieron contaminaciones que impidieron la obtención de datos y en el segundo el crecimiento del *Penicillium* spp. probado no se vio afectado por los aceites esenciales, impidiendo su comprobación como alternativas a los fungicidas químicos actuales.

## **2. INTRODUCCIÓN**

La producción de frutas y hortalizas en la Unión Europea llegó a alcanzar un valor de 82.880 millones de euros en 2022, un 16% más de la media de los años anteriores (2017- 2021), manteniendo el aumento de dichos años. España con 15.861 millones de euros en 2022, supone el 19% del valor total, siendo el país europeo con mayor producción.

En España, la producción de fruta y hortalizas suponen el 43 % de producción vegetal y el 25% de la Producción de la Rama Agraria. El sector de los cítricos (material de estudio del presente trabajo) cuenta con la segunda mayor superficie de las distintas producciones de frutas o hortalizas, 292.000 ha a nivel nacional. Además, es el sector frutícola que más cantidad produce, llegando en el año 2022 a los 5.848.222 toneladas de fruta (Ministerio de Agricultura, 2023).

El sector de los cítricos es bastante importante a nivel nacional, ya que es uno de los sectores agronómicos que más dinero genera y cantidad de producto genera. Aun así, uno de los grandes problemas a los que se enfrenta este sector son a las pérdidas debidas a plagas o enfermedades causadas por hongos, bacterias u otros patógenos, las cuales pueden suponer pérdidas millonarias. El momento donde se producen mayores pérdidas por dichos patógenos es en la conservación del producto. Para evitarlo, los productores usan distintas técnicas de conservación como la frigoconservación junto con el uso de productos químicos. Actualmente, lo que se busca, es una alternativa natural a esos productos químicos que no presente posibles efectos tóxicos a corto o a largo plazo para la planta o el consumidor.

Los productos químicos más utilizados actualmente para postcosecha de cítricos contienen los siguientes materias activas: tiabendazol, imazalil, orto-fenilfenol, miclobutanil y procloraz. Aun teniendo todas estas materias activas, el producto químico que mejores resultados ha dado es el tiabendazol. El tiabendazol es un benzimidazol (hidrocarburo aromático caracterizado por la fusión sistémico con actividad antifúngica preventiva y curativa por contacto, de amplio campo de acción. La fórmula química del tiabendazol es C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>S, en la industria alimentaria es identificado como E-233. Es utilizado en protección preventiva de podredumbres presentes en almacenaje producidas por., *Diaporthe citri* (Phomosis), *Botryosphaeria rhodina* (diplodiosis), *Botrytis* spp, *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum*, etc.; también actúa sobre *Aspergillus* spp., *Gloeosporium* spp., *Fusarium* spp. y otros

hongos. Este producto no afecta a *Alternaria* spp., *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Pythium* spp. ni *Rhizopus* spp. (Palou, 2007)

En cuanto a las alternativas naturales para este producto no existe ninguna opción probada y utilizada a nivel industrial de manera eficaz. Aun así, un primer paso puede ser el uso de los aceites esenciales provenientes de las plantas, productos naturales que ya se están estudiando e incluso utilizando como fungicidas o insecticidas registrados (aceite de clavo, de menta o de naranja). El caso más próximo a nuestra situación es el aceite de clavo, este producto fue inscrito en el año 2013 como un fungicida natural que combatía la gloeosporiosis (*Neofabrea* spp.) en frutas como la manzana, melocotón o pera. La manera de aplicación de este producto es directamente sobre la fruta mediante ducha "sistema drencher" durante 2 minutos a 48° C, utilizando aproximadamente 1 L. de caldo por cada 3 toneladas de fruta (este método de actuación es el que intentaremos replicar en los estudios *in vivo* más adelante).

## 2.1. Hongos necrotrofos

Estos hongos, en ocasiones llamados oportunistas, son un tipo de hongo fitopatógeno con una forma particular de afectar a las plantas. La diferencia entre los necrotrofos y otros tipos de hongos fitopatógenos es que estos extraen nutrientes de los diferentes tejidos vegetales mediante el uso de enzimas y toxinas que degradan los tejidos y producen la muerte de los mismos para alimentarse del producto resultante (Villajos, 2024). En esta categoría entrarían los hongos que vamos a estudiar junto con otros conocidos, como *Botrytis*, *Septoria* o *Phytophthora* (oomyceto). En el lado opuesto están los biotrofos (como las royas) que se alimentan de las células, pero sin una destrucción de estas, aunque a largo plazo también las plantas mueren.

### 2.1.1. *Alternaria* spp.

*Alternaria* es un género de hongos ascomicetos presente en numerosos cultivos, hay un total de 45 especies que, en humanos, pueden causar alergias o rinitis. Es una especie de hongo bastante agresiva y de crecimiento rápido, llegando a causar un gran número de pérdidas agronómicas, por ejemplo, en el cultivo de patata, donde es responsable de hasta un 20 % de las pérdidas. Es un patógeno que puede observarse en campo y en producto recolectado, y que

presenta las características propias de los hongos oportunistas que aprovechan las condiciones de humedad y temperatura favorables.

Microscópicamente se observan conidios grandes, multicelulares, tabicados en varios sentidos, de forma alargada u ovoide (en forma de pera) de color oscuro y que suelen formar cadenas. Macroscópicamente presentan un aspecto veloso cambiando de una coloración grisácea a tonos negros oliváceos en el centro y borde gris (INSST, 2022a).

En las hojas de los cítricos al inicio de la infección produce puntos de color oscuro rodeados de un halo amarillo que van creciendo hasta un centímetro de diámetro aproximadamente y que más adelante genera una defoliación del árbol significativa. En frutos produce lesiones deprimidas e irregulares, pudiéndose observar igualmente, un halo amarillento si el fruto no ha madurado, produciendo la caída del fruto (de Andalucía, 2024).

### 2.1.2. *Aspergillus* spp.

*Aspergillus* es un hongo filamentoso saprófito, perteneciente al filo Ascomycota. Se encuentra formado por hifas translucidas septadas, pudiendo presentar (aun siendo poco frecuente) reproducción sexual formando ascosporas en el interior de ascas y asexual (con formación de conidios). En total existen unas 180 especies aproximadamente de las cuales 40 causan infecciones a humanos y animales. Dependiendo de la especie concreta el hongo presenta diferentes características, pudiendo ser diferente en cuanto al color, textura, tamaño o tasa de crecimiento

Este hongo es saprófito (se alimenta de materia orgánica) pero actúa como patógeno oportunista afectando a material vegetal cuando las condiciones son de alta humedad y temperaturas suaves.

Tiene la particularidad de producir componentes tóxicos conocidos como aflatoxinas, los cuales se desarrollan durante las etapas de cultivo, cosecha, almacenamiento y comercialización de los cultivos. Los alimentos considerados como más susceptibles a la contaminación de este hongo son el maíz, cebolla, ajo y semillas de algodón. Un estudio proyectó un aumento en el riesgo de la presencia de aflatoxinas entre los años 2031-2040 debido

al aumento de temperatura que puedan sufrir las regiones productoras de maíz durante esos años (Martínez, 2013). En Europa causa problemas de moho negro en los cultivos.

Este hongo emplea diversas estrategias de infección, empleando agentes como los insectos o el aire para dispersar sus conidios hacia las partes florales y hojas de los cultivos, siendo las segundas fuentes de inóculo menos importantes. La infección de los frutos ocurre principalmente sobre semillas y frutos dañados, fundamentalmente por insectos que transportan los conidios. (Martínez, 2013)

La manipulación de productos vegetales que contengan una gran cantidad de conidios del hongo puede producir diferentes efectos alérgicos en los humanos como aspergilosis, asma o rinitis. Además, también puede producir efectos tóxicos debido a las micotoxinas secretadas de las que hablamos antes (INSST, 2021).

### 2.1.3. *Cladosporium spp.*

*Cladosporium* es un hongo filamentosos, clasificado en el filo Ascomycota y en el grupo de los hongos negros o feoides, caracterizados por su pigmentación oscura. Microscópicamente presenta hifas delgadas, septadas y ramificadas de color transparente a marrón. Estas hifas sostienen cadenas ramificadas de conidios que pueden presentar diferentes formas: unicelulares, elipsoides o cilíndricos, llegando a formar en algunos casos forma de escudo debido a las cicatrices de unión entre ellos. Macroscópicamente forma colonias de aspecto aterciopelado, veloso y pulverulento, con pliegues radiales, inicialmente de color blanco o crema que tienden a oscurecerse llegando a adquirir tonos verde oliva, gris verdoso o marrón.

Es un hongo común que afecta a una gran variedad de plantas, entre ellas los cítricos. Este fitopatógeno causa manchas oscuras o marrones en la piel de las frutas, lo que puede afectar la calidad visual y comercial del producto. Y se desarrolla principalmente en condiciones de alta humedad y temperaturas moderadas, siendo común en climas tropicales y subtropicales, pero también en invernaderos o huertos con un manejo de humedad inadecuado. (Bensch, 2018)

Resulta bastante raro encontrarnos con un caso de ingesta de alimentos contaminados por este hongo, siendo los problemas más comunes asociados a este hongo los efectos alérgicos y tóxicos que puede producir al estar presentes en cereales o paja que pueda producir polvo.

También es un hongo capaz de producir micotoxinas como ácido epicladospórico (INSST, 2022b).

#### 2.1.4. *Fusarium oxysporum*

*Fusarium oxysporum* es un patógeno que provoca la marchitez de distintos cultivos. Puede sobrevivir durante mucho tiempo, incluso a profundidades importantes. Desde el micelio o las esporas el hongo infecta las partes subterráneas de la planta, a través de heridas o donde la raíz lateral emerge de la raíz primaria. Una vez dentro crece entre las células de la raíz hasta llegar al tallo. En la planta infectada se conforman numerosos microconidios, que se reparten de forma pasiva hacia las zonas superiores de la planta a través del xilema. Cuando el hongo alcanza los vasos conductores, se establece en ellos y, como consecuencia de la acumulación de micelio, esporas y compuestos resinosos secretados por la planta como mecanismo de defensa, el tejido vascular se obstruye, lo que finalmente desencadena la marchitez. (Syngenta NL, 2025).

*Fusarium oxysporum* presenta unos macroconidios con forma semicurva, casi recta con forma de medialuna y septados. Mientras tanto, los microconidios tienen una forma ovalada y no presentan septos. En laboratorio presenta una coloración roja, protegida por una pilosidad de color blanco o ligeramente grisácea.

*Fusarium oxysporum* es otro de los hongos que pueden llegar a producir micotoxinas. Estas se pueden dividir en 2 grupos. El primer grupo son las zearalenonas, micotoxinas que se acumulan en las semillas que, si son consumidas por el ganado más adelante, pueden producir malformaciones o incluso la muerte en algunos casos. El segundo grupo son los tricotecenos; que inhiben la síntesis de proteínas de las células eucariotas, este grupo puede afectar tanto a personas como animales, ya que dichas toxinas contaminan alimentos como el arroz, maíz, trigo, cebada o centeno entre otros (Alves-Santos, 1999).

Este hongo hace que las hojas tomen tonos amarillos produciendo su marchitez, comúnmente solo en un lado del tallo. Si se corta la parte inferior del tallo es común que se note una tonalidad marrón alrededor de los haces vasculares.

Además, este hongo puede actuar como un hongo oportunista en situaciones con mucha humedad y buena temperatura, pudiendo generar enfermedad en humanos y animales.

### 2.1.5. *Penicillium* spp.

*Penicillium* es un género de hongos necrotrofos causantes de la podredumbre verde en cítricos, denominado de manera común como moho verde. Dicho hongo es considerado la principal enfermedad en postcosecha, pues genera grandes pérdidas económicas a nivel mundial.

Más concretamente en cítricos (ya que es el material sobre el que trabajaremos), el hongo que afecta es el *Penicillium digitatum*, Su reproducción es de tipo asexual. Los conidióforos y conidios son irregulares y excepcionalmente grandes para el género *Penicillium*, generalmente biverticiladas.

El principal signo del desarrollo del patógeno es la presencia del micelio blanquecino sobre la lesión, el cual posteriormente cambia al color verdoso por la esporulación del hongo. Además, los frutos pierden su solidez, se ablandan y adquieren, antes de la aparición del micelio, un aspecto húmedo. Las esporas son secas y se desprenden fácilmente de las estructuras que las portan formando una nube pulverulenta. (Intagri, 2023) Los hongos pertenecientes a este género se consideran los más peligrosos en postcosecha, puesto que pueden suponer pérdidas en cítricos de entre un 10 y 90 % (Costa, J.H. et al., 2019).

En humanos, *Penicillium* es uno de los principales patógenos causantes de las alergias relacionadas con el moho presente en los edificios. Bastantes especies de este hongo pueden llegar a producir problemas respiratorios por la exposición a polvo contaminado con *Penicillium*. Además, algunas especies de *Penicillium* también pueden llegar a producir micotoxinas como la patulina, la citrinina, la ocratoxina A (OTA) o la citreoviridina entre otras (INSST, 2022c).

## 2.2. Aceites esenciales

Las plantas pueden crear sustancias aromáticas, llamadas aceites esenciales (abreviaremos como A.E.), para combatir el daño producido por diferentes organismos, como saliva de herbívoros, hongos o demás microorganismos (Biere, 2004), también pueden crear estos compuestos al estar en contacto con factores abióticos como las rachas de viento, el estrés hídrico o la congelación (Ward, 1986) o para atraer a los polinizadores.

Los aceites se extraen de todas las partes de las plantas: hojas, pétalos, tallos, semillas e incluso de las raíces, cada uno es único y depende de muchos factores como la especie, el periodo de cosecha, el clima o la parte de la planta de la que se extrae (Butnariu, 2018).

Se obtienen de diferentes maneras: destilando en la corriente de vapor de agua, prensando los órganos secretores o mediante el uso de disolventes como el éter, el petróleo o el tolueno entre otros.

La biosíntesis de las sustancias olorosas tiene lugar en las hojas, donde se encuentran la mayor parte y permanecen hasta la floración. En la floración, los aceites esenciales migran a las flores, y parte se consume en el proceso de fecundación. Después de la fecundación, se acumula en frutos y semillas o hay una migración a hojas, corteza y raíz (Bakari, 2018). Los aceites esenciales van cambiando con la maduración de las plantas, en las plantas jóvenes contienen principalmente hidrocarburos terpénicos y moléculas más simples, mientras que los órganos reproductores contienen aceites esenciales más ricos en compuestos oxigenados.

La estructura química de los aceites esenciales es muy heterogénea y los componentes principales pueden formar parte de las series alifática, aromática y terpénica. Generalmente, los aceites esenciales contienen sustancias ternarias, raramente cuaternarias. Los productos volátiles están constituidos por terpenos, aromáticos, ácidos volátiles, cetonas, fenoles, aldehídos, ésteres, *etc.* (Zerkaoui, 2018)

Estos aceites se usan en diversos campos de investigación, cosmética, fitopatología, medicina alternativa o aromática. En el uso contra los hongos, que es el tema que nos concibe en este estudio, hay aceites que llevan siendo probados desde finales del siglo pasado como el de citronela o el de canela, de donde se han evaluado compuestos muy efectivos como el acetato de geranilo, geraniol, el cinamaldehído o el eugenol (Van de Vel, 2019) pero hay otros aceites esenciales donde apenas hay estudios hechos con ellos, como el aceite de pino, el de abeto o el de cedro (Mirasierra, 2021; Cuadrado, 2022).

### 2.2.1. Aceite esencial de abeto

El aceite esencial de abeto siberiano (*Abies sibirica* L.) es obtenido por destilación de las ramas y agujas del propio árbol. Aunque la composición del aceite es diferente de uno a otro debido a aspectos como el lugar de la extracción de la planta, la edad de la planta o el tiempo de destilación, estudios han demostrado que el aceite esencial de abeto puede llegar a estar formado de hasta 31 principios activos, siendo los más importantes el acetato de bornilo (34,21 %), el canfeno (17,47 %) o el  $\alpha$ -terpeno (6,72 %) (N.A. Polyakov et al., 2014). Este aceite es incoloro e insoluble en agua.

### 2.2.2. Aceite esencial de canela

Este aceite se obtiene por destilación de las cáscaras secas de la corteza de tres especies de canela: *Cinnamomum zeylanicum*; J.Presl, 1825, *Cinnamomum cassia*; (L.) J.Presl, 1825 y *Cinnamomum verum*; J.Presl, 1825. Este aceite destaca por el principio activo predominante que contiene, el cinamaldehído, compuesto orgánico responsable del sabor y del olor de la canela. Es un líquido viscoso y de color amarillo, que constituye hasta un 90 % del aceite esencial (Alizadeh Behbahani, 2020).

### 2.2.3. Aceite esencial de cedro

El aceite esencial de cedro (*Cedrus deodara*; (Roxb.) G.Don) es uno de los aceites esenciales más importantes actualmente, pues tiene múltiples aplicaciones en actividades antimicrobianas, insecticidas, germicidas y antituberculosas en farmacología (Kumar S et al., 2019). Se obtiene mediante destilación de la madera de este árbol.

Hay que tener en cuenta que este cedro, el cedro del Himalaya, no es la especie autóctona que tenemos aquí en Europa, sino que es una especie procedente de los actuales países de Pakistán, el este de Afganistán y el norte de India. El cedro existente de manera natural en España es el cedro del Atlas, *Cedrus atlantica* (Endl.) Manetti ex Carrière, una especie proveniente de las montañas del norte de África, en la zona de Marruecos y Argelia.

Este aceite contiene cerca de 23 componentes, que representan el 95,79 % del aceite. Los componentes principales incluyen  $\alpha$ -terpineol (30,2%), linalool (24,47%), limoneno (17,01%), anetol (14,57%) (Zeng, W.C., 2012), muchos de estos compuestos que se encuentran

en gran proporción en el aceite esencial de cedro están presentes en otras plantas, como el limoneno (sustancia presente en la cascara de los cítricos) o el anetol (compuesto aromático al cual se le debe el sabor distintivo a regaliz del anís, el hinojo y el anís estrellado).

El aceite esencial tiene una fuerte función antimicrobiana contra microorganismos típicos transmitidos por alimentos, con valores mínimos de concentración inhibitoria y de concentración bactericida de 200 a 1560 y de 390 a 6250 ppm, respectivamente (Zeng, W.C et al., 2012).

#### 2.2.4. Aceite esencial de pino

El aceite esencial de pino se obtiene de la destilación por arrastre de vapor de las agujas, ramas de pequeño calibre y conos de pino de especies como el *Pinus sylvestris* L. Químicamente, está compuesto principalmente de alcoholes terpénicos cíclicos. También puede contener, aunque en menor proporción, hidrocarburos terpénicos, ésteres y éteres. La estructura exacta del aceite depende de diversos factores, entre ellos la especie de pino de la que procede, su edad, y las partes del árbol utilizadas para su extracción (CAS Common Chemistry, 2015).

El aceite de pino es un óptimo solvente de aceites, ceras, grasas y resinas, que le permite ser usado en pinturas y barnices. Es una sustancia incolora o de color amarillo pálido, con una densidad cercana a 950 kg/m<sup>3</sup> e insoluble en el agua. El aceite de pino tiene diversos principios activos con los que podemos probar la creación de diferentes fármacos o fitosanitarios, estos son el  $\alpha$ -pineno, el  $\beta$ -pineno y el D-3-careno.

### 2.2.5. Principios activos

Como hemos visto en los anteriores apartados cada aceite está formado por sus correspondientes principios activos. Un principio activo (o sustancia activa) es cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a la fabricación de una sustancia para el control fitopatológico y que, al ser utilizadas en su producción, se transforman en un componente activo de dicho producto destinado a ejercer una acción fungicida, insecticida o herbicida (Johnson, 1987). Vamos a destacar los más importantes de cada aceite del estudio en una tabla (Tabla 1).

**Tabla 1:** Relación entre los aceites esenciales utilizados y las principales materias activas presentes en ellos

<b>Aceite esencial</b>	<b>Principios activos más importantes</b>
Aceite esencial de abeto	Acetato de bornilo
	Canfeno
	$\alpha$ -terpeno
Aceite esencial de canela	Cinamaldehido
Aceite esencial de cedro	$\alpha$ -terpineol
	Linalool
	Limoneno
	Anetol
Aceite esencial de pino	$\alpha$ -pineno
	$\beta$ -pineno
	D-3-careno

### **3. OBJETO DEL ESTUDIO**

El objetivo de este estudio es, mediante diversos análisis, comprobar la posible función antifúngica de diversos aceites esenciales de coníferas (abeto, cedro y pino) y de canela para su posible uso en postcosecha, estudiándolas como una posible alternativa ecológica a los fungicidas químicos actuales a nivel industrial, buscando un beneficio económico y un futuro ecosistémico. El Real Decreto 1311/2012, por el que se establece el uso sostenible de los productos fitosanitarios, indica la prioridad de los métodos biológicos sobre otras alternativas químicas, siendo la razón por la que se trabaja en esta línea de investigación como una aproximación al desarrollo de productos potencialmente aplicables en control biológico.

Para ello se ha planteado el siguiente objetivo general:

- Evaluar la eficiencia de distintos aceites esenciales de coníferas y de canela como productos de biocontrol en la conservación de material vegetal ante hongos necrotrofos, como *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium oxysporum* y *Penicillium*.

Objetivo que podemos desglosar en los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar la capacidad de inhibición de crecimiento de patógenos *in vitro* en medio artificial mediante los productos naturales utilizados (aceites esenciales).
- Evaluar la capacidad de inhibición de crecimiento de patógenos *in vivo* en material vegetal (naranjas) mediante los productos naturales seleccionados.
- Evaluar desde un punto de vista económico, el potencial de estos aceites esenciales como alternativa a otros métodos de control en post cosecha.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Obtención de los aislados**

En este estudio se han utilizado un total de 5 aislados (Tabla 2), cuatro de ellos aislados en el Laboratorio de Fitopatología de la ETSIIAA de Palencia (Universidad de Valladolid) a partir de material vegetal obtenido en los campos y laboratorios de la escuela. El aislado de *Fusarium oxysporum* es un aislado patogénico de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* obtenido de plantas de judías (*Phaseolus vulgaris* L) en la población de La Carrera (Ávila), perteneciente a la comarca de El Barco de Ávila, en el Área de Genética de la Universidad de Salamanca (Alves-Santos, 2002). Este patógeno fue catalogado como FOP SP 1 en 1993 y ha sido aportado por el Dr. Fernando Manuel Alves Santos.

Los aislados provienen de cultivos axénicos, conservados en una de las cámaras frigoríficas del Laboratorio de Fitopatología de la ETSIIAA de Palencia. Para iniciar este estudio se han sembrado en placas de PDA (Potato Dextrose Agar) y se han incubado en oscuridad a 25° C. El medio se ha preparado disolviendo 15,6 gramos de PDA en 400 mL de agua destilada agitándolo hasta que se disuelve completamente, todo ello para cada uno de los 13 matraces utilizados (con todas las dosis y A.E.) y se esteriliza en el autoclave durante 20 minutos a 121° C. Más adelante se distribuye en placas Petri de 85 mm de diámetro (unos 25mL por placa) en una cabina de flujo laminar (Telstar Mini-V/PCR) para evitar posibles contaminaciones.

**Tabla 2:** Procedencia y año de obtención de los aislados usados en el estudio

<b>Aislado</b>	<b>Año</b>	<b>Origen (Aislamiento)</b>
<i>Alternaria</i> spp.	2024	ETSIIAA de Palencia
<i>Aspergillus</i> spp.	2024	ETSIIAA de Palencia
<i>Cladosporium</i> spp.	2024	ETSIIAA de Palencia
<i>Fusarium oxysporum</i> (FOP SP1)	1993	La Carrera (Ávila)
<i>Penicilium</i> spp.	2024	ETSIIAA de Palencia

#### 4.2. Procedencia e identificación de los aceites esenciales utilizados

Los aceites esenciales usados provienen de diferentes casas comerciales, todos provenientes de herbolario y obtenidos mediante destilación de distintas partes de la planta (Tabla 3):

**Tabla 3:** Origen comercial, zona de obtención de la planta y especies de los diferentes aceites esenciales utilizados en el estudio

<b>Aceite esencial</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Parte de la planta de la que se obtiene</b>	<b>Especie</b>
Aceite de abeto	Aromatika	Agujas y ramas	<i>Abies sibirica</i>
Aceite de canela	Phatoil	Corteza	<i>Cinnamomum verum</i>
Aceite de cedro	Mystic Moments UK	Madera	<i>Cedrus deodara</i>
Aceite de pino	Aromatika	Agujas, ramas y conos	<i>Pinus sylvestris</i>

#### 4.3. Primer estudio *in vitro*: Análisis del crecimiento del hongo en medio PDA + aceite esencial correspondiente

Este ensayo se ha realizado en placas Petri con medio PDA mezclado con los aceites esenciales, analizando el crecimiento del micelio de estos hongos en las placas y viendo las posibles variaciones debidas a la acción de los aceites esenciales.

Como dijimos antes, los medios de PDA los hemos preparado disolviendo 15,6 g de PDA en 400 mL de agua destilada y repitiendo el proceso 13 veces para las combinaciones necesarias.

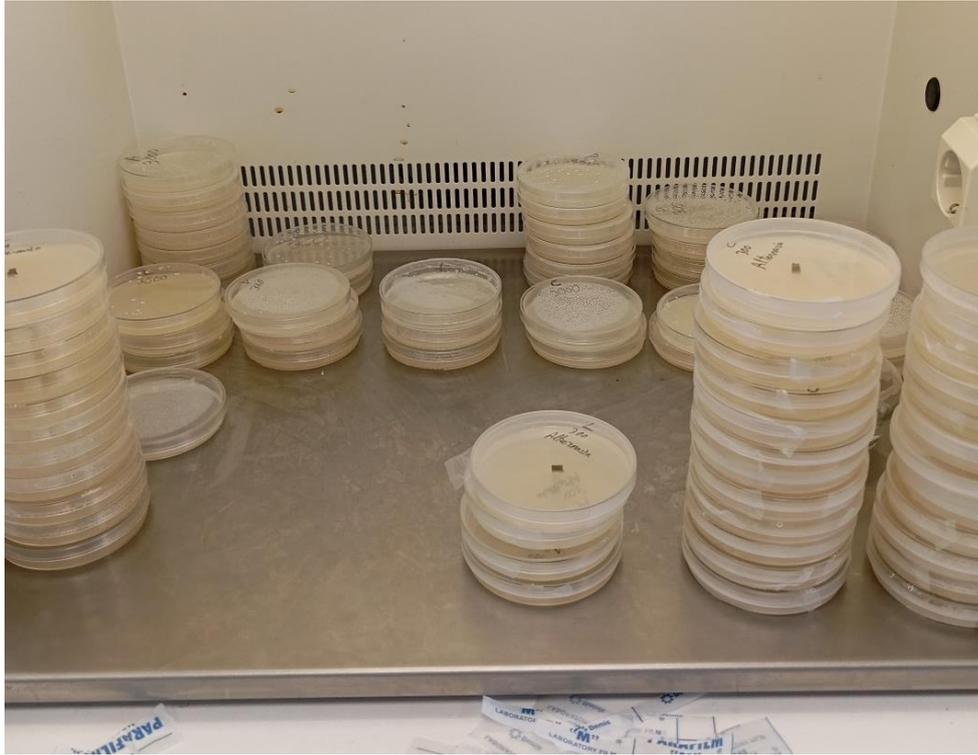
Hemos usado 3 dosis diferentes para cada aceite, estas dosis son 30 ppm (partes por millón), 300 ppm y 3000 ppm, estas dosis han sido seleccionadas ya que son dosis cercanas a usadas en otros trabajos previos con aceites esenciales en este centro (Mirasierra, 2021; Arribas, 2018). Para conocer cuánto aceite hay que incluir en cada matraz simplemente haremos la siguiente equivalencia:

- Dosis 3000 ppm:  $3000 \text{ ppm de } 400 \text{ mL} = 1,2 \text{ mL de aceite esencial}$
- Dosis 300 ppm:  $300 \text{ ppm de } 400 \text{ mL} = 0,12 \text{ mL de aceite esencial}$
- Dosis 30 ppm:  $30 \text{ ppm de } 400 \text{ mL} = 0,012 \text{ mL de aceite esencial}$

Debemos tener en cuenta que estas sustancias son insolubles en agua, por lo que primero lo diluiremos en alcohol antes de añadirlo. Introduciremos en un tubo Falcon 12 mL de alcohol con 1,2 mL del aceite esencial correspondiente (tubo con la dosis de 3000 ppm) y prepararemos otros dos tubos Falcon con otros 12 mL de alcohol, a los que le introduciremos 1,2 mL del primer Falcon (para hacer la dosis de 300 ppm) y 1,2 mL del segundo Falcon tras añadirle la mezcla del primero (para hacer la dosis de 30 ppm), básicamente estamos diluyendo diez veces la dosis de cada Falcon, este proceso lo haremos con cada aceite esencial, hasta el punto de tener 13 tubos con las mezclas correspondientes, 12 con las dosis de los 4 aceites y otro de control (sin ningún aceite).

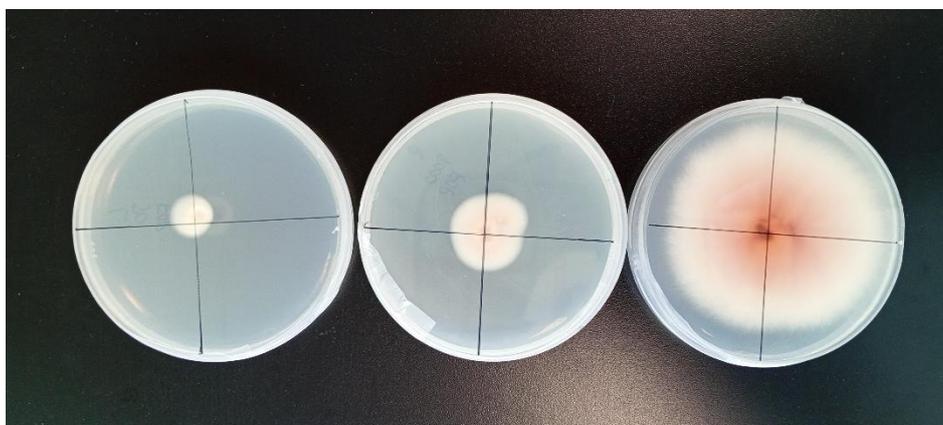
Una vez tenemos los aceites en sus dosis correspondientes y los matraces con el PDA autoclavado y ligeramente enfriado, pero sin solidificar aun, se vierte un tubo Falcon en cada matraz, se agita y se reparte la mezcla en placas equitativamente para el posterior cultivo. El total de placas utilizadas serían el siguiente:  $4 \text{ aceites} \times 3 \text{ dosis} \times 5 \text{ patógenos} \times 3 \text{ repeticiones} = 180 \text{ placas}$ , más 15 de control, 195 placas en total.

Con las placas preparadas, transferimos con el bisturí trozos de micelio de los distintos aislados de medidas parecidas (los fragmentos son cuadrados de unos 5 mm de lado) y lo colocaremos en el centro de cada placa correspondiente. Una vez preparada las sellamos con Parafilm, marcamos dos ejes perpendiculares desde el lugar donde hemos depositado la muestra del patógeno (nos servirán para las posteriores mediciones) y las dejamos en una cámara de cultivo para permitir el crecimiento de los hongos en oscuridad constante a 22°C.



**Figura 1:** Placas de PDA en la cámara de flujo tras haber sembrado las muestra de hongo en ellas

Una vez tengamos todas las placas en la cámara las iremos revisando cada semana hasta un total de 4, anotando la distancia que ocupa el hongo en la placa a lo largo de cada eje trazado. Con esta información más tarde obtendremos una media de ambos diámetros (en mm) y calcularemos la superficie que ocupa aproximadamente el hongo en la placa, tomándolo como medida para ver diferencias estadísticas en el crecimiento.



**Figura 2:** Placas de FOP SP1 con PDA mezclado con aceite de canela en la semana 2 del estudio (dosis 3000, 300 y control de izq. a drcha.)

#### 4.4. Primer estudio *in vivo*: Análisis del crecimiento del hongo en lesiones en naranja (*Citrus x sinensis*) tras la acción del aceite esencial

Simultáneamente al ensayo *in vitro* anteriormente detallado también hemos realizado otro estudio sobre naranjas, para ver cómo actúan estos hongos necrotrofos sobre el material vegetal del que trata en estudio. Con este estudio vemos como se comportarán los aceites en una situación real, analizando si pueden ser la alternativa buscada para el almacenamiento de este producto.

En la actualidad, las naranjas se someten a una ducha durante su procesamiento antes de ser almacenadas, donde son mojadas por un producto químico (tiabendazol, imazalil, etc.) disuelto en agua, siendo el proceso idéntico al usado con el aceite esencial de clavo en manzanas y peras para combatir gloeosporiosis (*Neofabraea* spp.) descrito en la ficha del aceite de clavo en el Registro de Productos Fitosanitarios. En el estudio hemos intentado replicar este proceso mediante el método descrito a continuación:

Para el ensayo *in vivo*, hacemos dos cortes en cada naranja; para simular una posible herida, luego las bañamos en una mezcla de agua y aceite esencial; para simular el proceso de ducha que se usa actualmente en la industria (similar al aceite esencial de clavo) y por último añadiremos con una pipeta esporas de cada hongo a las heridas para ver el crecimiento de estos en la fruta. Las naranjas han sido lavadas previamente para eliminar la capa de ceras y tratamientos que puedan llevar.

Para la obtención de esporas se han recogido en agua a partir de placas de PDA con los patógenos. La concentración de la suspensión de esporas se calcula con ayuda de una Cámara de conteo Thoma, evaluando 16 cuadros (superficie 0,0025 mm<sup>2</sup> y 0,1 mm alto). Una vez conocida la concentración de esporas, hemos ajustado para aplicar 100.000 esporas a cada herida (para mantener el mismo número de esporas de cada hongo).

**Tabla 4:** Concentraciones y volúmenes de diluciones de esporas usadas para el estudio *in vivo*

Hongo	Conteo en 16 cuadros	Concentración (esporas / mL)	100.000 esporas
<i>Alternaria</i>	6	1.500.000	66 $\mu$ L
<i>Aspergillus</i>	224	56.000.000	1,78 $\mu$ L
<i>Cladosporium</i>	70	17.500.000	6 $\mu$ L
<i>Penicillium</i>	240	60.000.000	1,66 $\mu$ L
<i>Fusarium</i>	24	6.000.000	17 $\mu$ L

Para el baño de las naranjas debemos hacer distintas diluciones con los aceites. El baño usado contará con una concentración de 1600 ppm del aceite correspondiente, una dosis intermedia a las usadas en el ensayo *in vitro* pero que es la concentración que usan las casas comerciales con el aceite esencial de clavo. Además, en el mismo protocolo se indica que el baño con agua y aceite se realizará dos minutos a 48° C. Una vez tenemos el baño y las esporas preparadas podemos empezar el ensayo.

Primero hacemos dos cortes en las naranjas y marcamos su ubicación (con un rotulador permanente), después sumergimos las naranjas. Las agrupamos de 2 en 2 en bandejas de aluminio, donde inoculamos cantidades idénticas de esporas de patógeno y cerramos las bandejas (no herméticamente) con una tapa de cartón, manteniéndolas en oscuridad y a temperatura ambiente. Al igual que en el ensayo *in vitro*, tomamos medidas cada semana hasta llegar a la cuarta, en este caso mediremos el grosor de la herida originada por el desarrollo del hongo, midiendo el progreso de este en la naranja.

Durante el proceso de este estudio, apareció una contaminación de una cepa de *Penicillium* spp. diferente al aislado usado, que decidimos usar más adelante para un segundo estudio. Esta variedad tiene una esporulación mucho mayor que el primer aislado, además de contar con una coloración verde-grisácea diferente de nuestro inóculo (Figura 35).

En el laboratorio donde realizamos el estudio no teníamos esta variedad del hongo, por lo que hemos supuesto que vendría con las naranjas del estudio en un estado latente, haciendo el estudio de su respuesta a los aceites esenciales de cierta importancia.

#### 4.5. Segundo estudio *in vitro*. Análisis de crecimiento de la segunda cepa de *Penicillium* spp. en medio PDA con los aceites correspondientes

En este estudio seguiremos el mismo proceso que en el primer estudio *in vitro*, solo que esta vez comprobaremos el crecimiento de la nueva cepa de *Penicillium* (una vez aislado adecuadamente) frente a los distintos aceites esenciales y que denominamos *Penicillium 2*.

Para este estudio hemos usado las mismas placas de PDA junto con aceite esencial del primer estudio, pero la diferencia es que en vez de las 3 dosis usadas (30, 300 y 3000 ppm) de todos los aceites hemos utilizado únicamente todas las dosis del aceite de canela y las dosis de 3000 ppm de los demás aceites. Esto debido a que como veremos en los resultados del primer estudio, el aceite que mejor funcionó fue el de canela y los demás aceites (exceptuando las dosis de 3000 ppm, donde se notan diferencias, aunque sean menores) no han inhibido de manera satisfactoria los hongos cultivados.

Al igual que en el primer estudio, las placas se miden las 4 primeras semanas desde su cultivo, haciendo uso de dos ejes en los que medimos la longitud que abarcan, permitiéndonos calcular de manera aproximada el área que ocupan en la placa. Además de las placas mencionadas se pondrán otras placas PDA sin aceite esencial, que nos servirán como control para conocer el crecimiento del hongo de manera natural.

#### 4.6. Segundo estudio *in vivo*. Análisis del crecimiento del segundo aislado de *Penicillium* spp. en lesiones en naranja (*Citrus x sinensis*) tras la acción de los aceites esenciales

Al igual que el estudio *in vitro*, también realizamos una segunda prueba. Esta vez probando, al igual que en el estudio *in vitro*, el nuevo aislado de *Penicillium* spp.

A diferencia del primero, en este estudio no usamos la naranja entera, sino que cortamos un trozo de naranja, con corteza y pulpa, y en él hacemos la simulación de una herida en la zona exterior con ayuda de un bisturí. Además, solo probamos la reacción frente aceite esencial de canela, al ser este el que mejor resultados a dado, en cuanto a la dosis utilizada se subió a 3000 ppm, al ser la que mejor resultados ha dado.

El resto del proceso es igual, pero a diferencia del estudio anterior, dejamos cada trozo de naranja en una placa Petri sellada con Parafilm. De este modo nos aseguraremos de que las muestras de naranja con hongo no sufren contaminación desde el exterior.

Se han puesto placas de las dos cepas de *Penicillium* spp., para comparar el crecimiento de uno frente al otro de una manera equitativa, y además se han probado los demás. La medición del ancho de la herida producida se evaluó semanalmente. Se incluyen también otras placas de control, las cuales se bañarán con agua sin aceite esencial para ver el crecimiento del hongo de manera natural.

#### 4.7. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico seguiremos el proceso seguido en otros estudios de la misma índole (Mirasierra, 2017; Arribas; 2018). Los datos son registrados semanalmente, pero se toma el valor de la cuarta semana como definitivo y sobre estos datos se realiza el análisis estadístico.

Los análisis estadísticos se han realizado con el software STATGRAPHICS 19-X64 y STATISTICA v.9. Se realizó la prueba de Levene, que nos indicó que no existía igualdad de varianzas y por tanto los contrastes deben realizarse con pruebas no paramétricas, estos fueron la prueba de Kruskal-Wallis para la evaluación de las variables a estudiar y test U de Mann-Whitney para las comparaciones por pares posteriores cuando la prueba de Kruskal-Wallis indicaba diferencias estadísticamente significativas.

Además de los resultados estadísticos se ha incluido un parámetro que es “diferencia o inhibición importante” cuando la reducción de crecimiento es estadísticamente significativa y la superficie ocupada por el micelio es inferior a 1500 mm<sup>2</sup> y que parece más apropiada desde el punto de vista de su aplicabilidad.

## **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **5.1. Resultados del Primer estudio *in vitro***

Vamos a comenzar analizando los resultados del primer estudio *in vitro* realizado en placas de PDA con aceites esenciales diluidos. Las figuras presentan la evolución de las superficies que abarcan los hongos en las placas, medidas cada semana, suponiendo que su crecimiento es cercano a un crecimiento circular. El crecimiento de los hongos está medido en mm<sup>2</sup>, y se expone para cada uno de los patógenos usados.

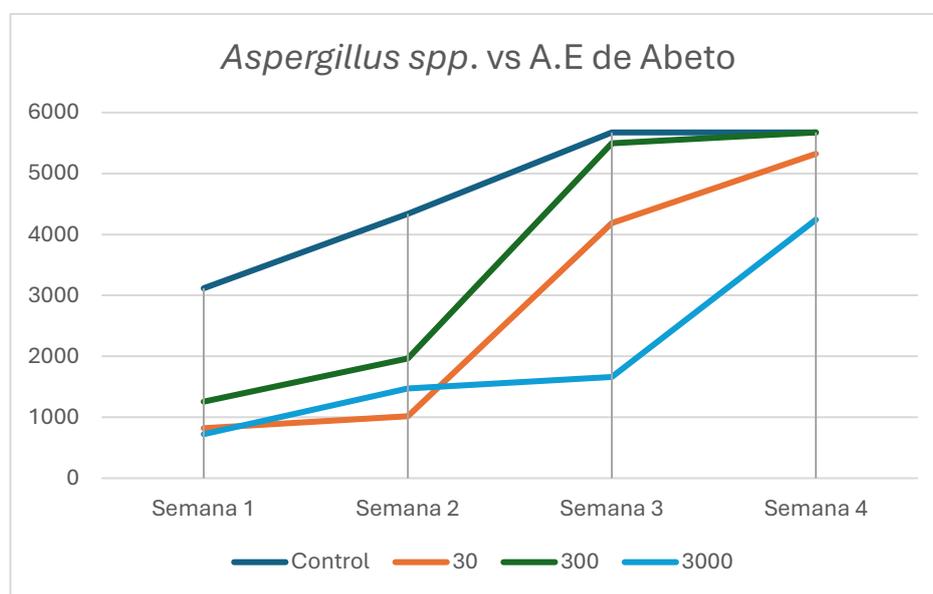
#### **5.1.1. Evolución fúngica de *Alternaria* spp.**

El estudio de *Alternaria* spp. frente a los distintos aceites no ha sido posible medirlo ni sacar conclusiones, ya que todas las placas del hongo han presentado una contaminación de color amarillo (probablemente procedente de alguna bacteria del género *Xanthomonas*) que ha inhibido su crecimiento y los resultados no serían útiles al no ser el crecimiento real del hongo ante la acción del aceite esencial, por lo que hemos decidido no incluirlos.

## 5.1.2. Evolución fúngica de *Aspergillus* spp.

### 5.1.2.1. *Aspergillus* spp. y A.E. de Abeto

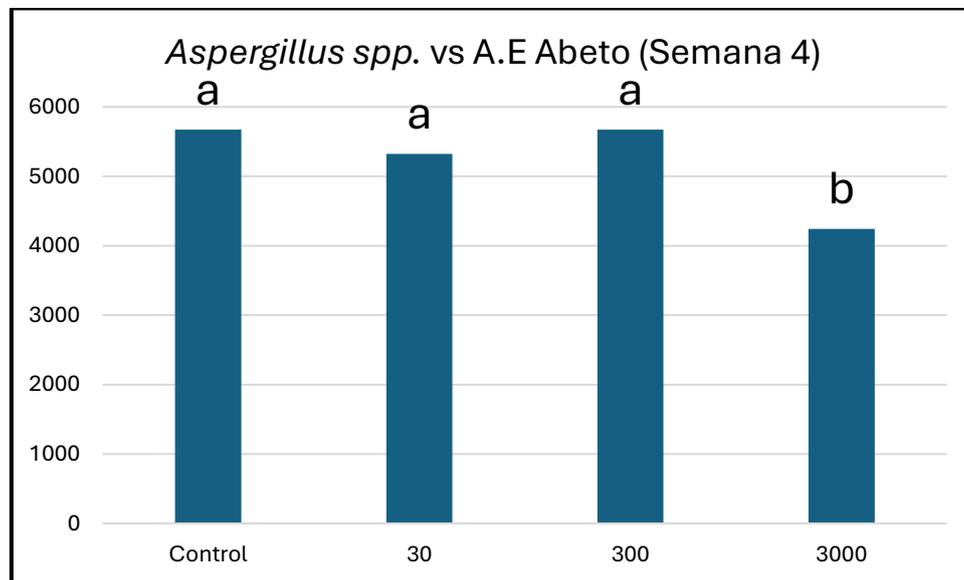
En la siguiente figura (Figura 3) observamos en el desarrollo semanal que el A.E. de abeto disminuye el crecimiento del hongo en las primeras semanas. Luego más adelante, a partir de la tercera semana vemos que las dosis más bajas (30 y 300 ppm) van perdiendo su efecto hasta casi no diferenciarse con el control. Mientras tanto, la dosis de 3000 sí que mantiene su efecto inhibitorio, aunque en la cuarta semana, seguramente debido a la volatilización de los compuestos activos del aceite esencial, sufre un repunte hacia los valores de las demás dosis.



**Figura 3:** Evolución, en semanas, del crecimiento del hongo del género *Aspergillus* spp. ante el A.E. de abeto en la placa PDA en diferentes tratamientos (control, 30 ppm, 300 ppm y 3000 ppm)

En la cuarta semana damos los datos como definitivos y realizamos su análisis estadístico. Realizamos el test de Kruskal-Wallis (Kruskal-Wallis test:  $H(3, N=12) = 9,311881$  con una probabilidad de  $p=0,0254$ , asegurando que existen diferencias significativas entre los tratamientos ( $p<0,05$ ). En la gráfica de barras (Figura 4) vemos los valores alcanzados en la cuarta semana por cada placa junto con sus diferencias estadísticas en el test U de Mann-Whitney. Vemos que no hay ninguna diferencia significativa entre las dosis de 30 y 300 ppm con el control, pero la dosis de 3000 ppm sí que presenta un poder de inhibición estadísticamente significativo al reducir en mayor medida el crecimiento del hongo.

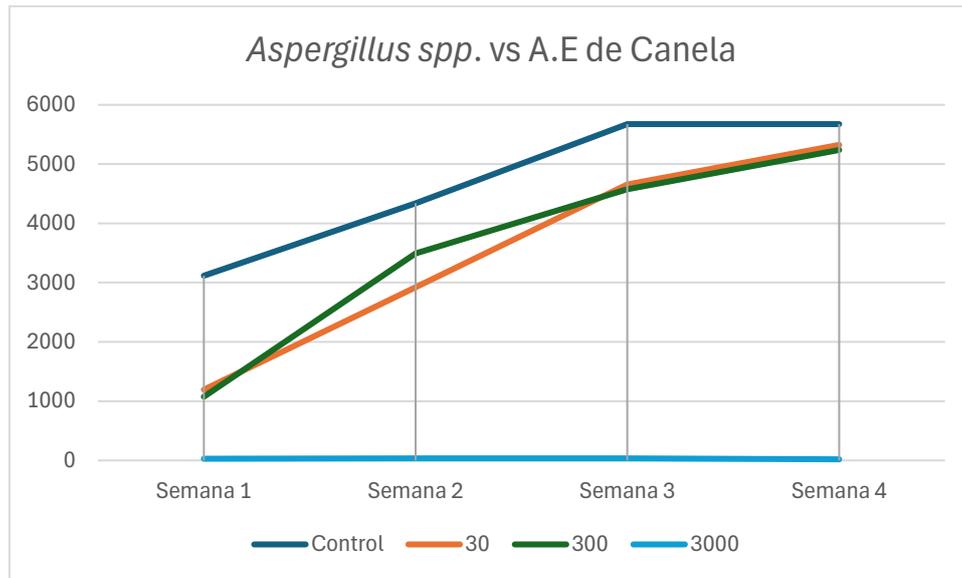
Resultados similares en un trabajo previo frente a patógenos de la vid muestra que el aceite de abeto es eficiente en dosis altas (Mirasierra, 2021) pero en nuestro caso la reducción es significativa pero no importante ocupando una superficie de 4242 mm<sup>2</sup> (75% de la placa).



**Figura 4:** Crecimiento del hongo del género *Aspergillus* spp. con A.E. de abeto a las 4 semanas del comienzo del estudio. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney  $p > 0,05$ ).

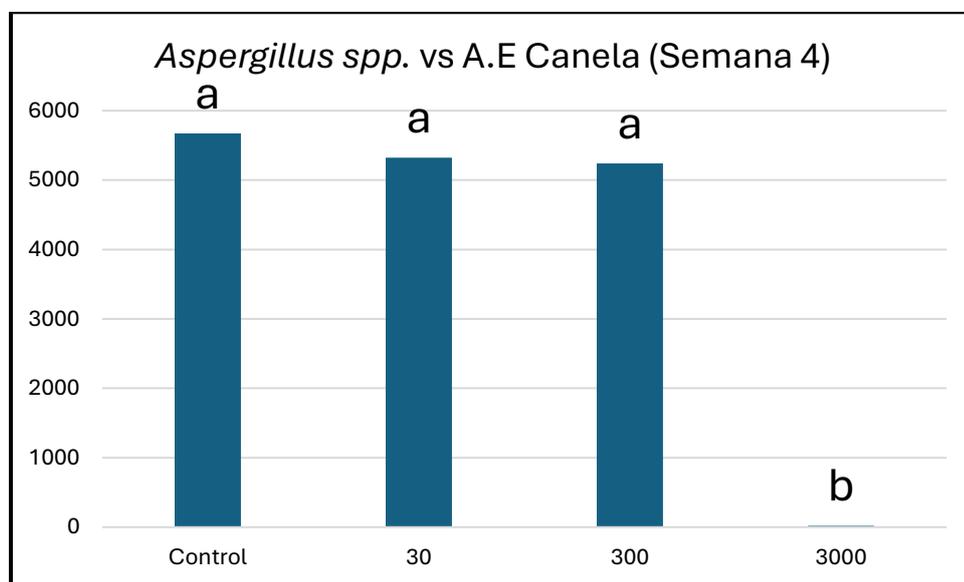
#### 5.1.2.2. *Aspergillus* spp. y A.E. de Canela

En la siguiente figura (Figura 5) vemos como el aceite esencial de canela a altas concentraciones (3000 ppm) sí que supone una gran diferencia en el crecimiento del hongo, no dejando que éste llegue a crecer en la placa, teniendo resultados muy cercanos a cero. Mientras tanto, los valores de las dosis de 30 y 300 ppm se mantienen muy parecidos durante las cuatro semanas, a un término medio entre la dosis de 3000 ppm y el control, llegando a alcanzar en la cuarta semana valores muy parecidos al valor de control.



**Figura 5:** Evolución, en semanas, del crecimiento del hongo del género *Aspergillus* spp. ante el A.E. de canela en la placa PDA en diferentes tratamientos (control, 30 ppm, 300 ppm y 3000 ppm)

Realizamos el test de Kruskal-Wallis (Kruskal-Wallis test:  $H(3, N=12) = 8,684211$ ) y obtenemos el dato de:  $p = 0,0338$ , por lo que afirmamos que existen diferencias significativas entre los tratamientos. En la gráfica de la cuarta semana (Figura 6) observamos los valores y sus diferentes estadísticas en el test U de Mann-Whitney.

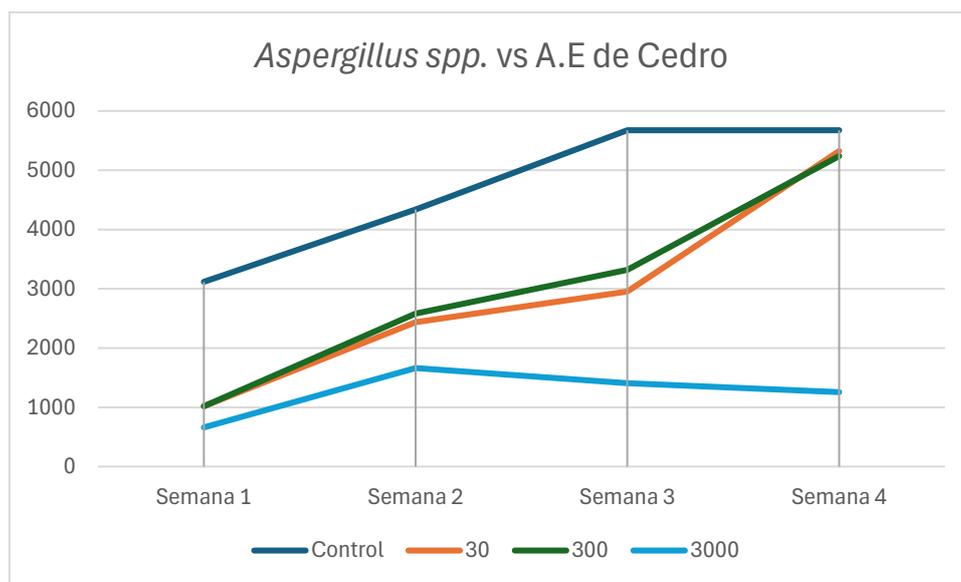


**Figura 6:** Crecimiento del hongo del género *Aspergillus* spp. con A.E. de canela a las 4 semanas del comienzo del estudio. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney  $p > 0,05$ ).

Vemos que con la única dosis con la que hay diferencias estadísticamente significativas es con la dosis de 3000 ppm, las demás no presentan diferencias con el control. Resultados previos muestran la eficiencia del aceite esencial de canela (Mirasierra, 2021; Sánchez, 2016). Además, es una reducción importante ya que la dosis de 3000 ppm inhibe completamente el crecimiento.

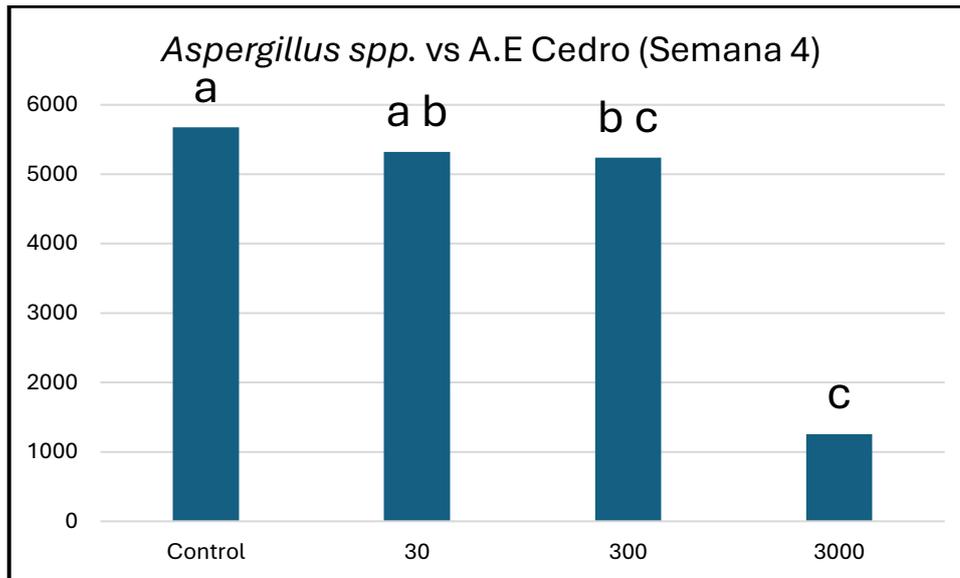
### 5.1.2.3. *Aspergillus* spp. y A.E. de Cedro

Con el aceite de cedro (Figura 7), vemos que ocurre algo muy parecido al aceite de canela (Figura 5) en cuanto a las dosis de 30 y 300 ppm, las dos ofrecen valores muy parecidos las cuatro semanas y en la última presentan un repunte que acerca los valores a los obtenidos en las placas de control. Mientras tanto, la dosis de 3000 ppm sí que presenta cierta propiedad inhibitoria importante, he incluso, a partir de la segunda semana, combate el crecimiento del hongo haciendo que éste disminuya.



**Figura 7:** Evolución, en semanas, del crecimiento del hongo del género *Aspergillus* spp. ante el A.E. de cedro en la placa PDA en diferentes tratamientos (control, 30 ppm, 300 ppm y 3000 ppm)

Tras hacer el test de Kruskal-Wallis (Kruskal-Wallis test:  $H(3, N=12) = 8,684211$ ) obtenemos que  $p = 0,0338$ , por lo que existen diferencias estadísticas significativas. En la Figura 8, mostrada posteriormente, vemos los resultados:

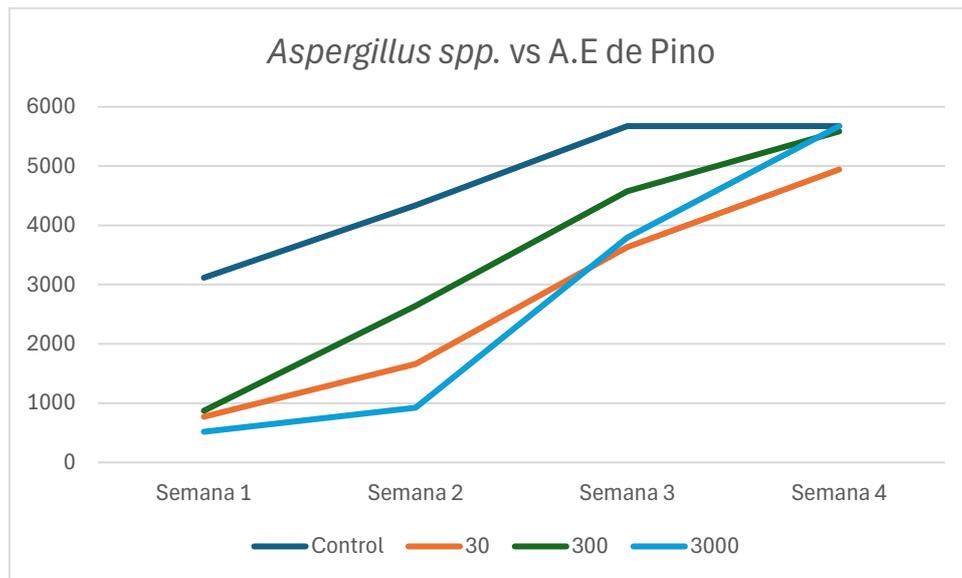


**Figura 8:** Crecimiento del hongo del género *Aspergillus* spp. con A.E. de cedro a las 4 semanas del comienzo del estudio. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney  $p > 0,05$ ).

Vemos que la dosis más cercana estadísticamente al control es la dosis de 30 ppm, la cual se encontraría a un término medio entre el control y la dosis de 300 ppm estadísticamente. Además, aunque la dosis de 300 y la de 3000 ppm sean estadísticamente diferentes al control observamos que la dosis de 300 ppm no presenta diferencias significativas con la dosis de 30 ppm o 3000 ppm, encontrándose en un punto medio de las dos. Por último, la dosis de 3000 ppm es en la que más diferencia estadística existe, comparado con las demás, llegando incluso a estar por debajo del valor límite que pusimos de diferencia importante.

#### 5.1.2.4. *Aspergillus* spp. y A.E. de Pino

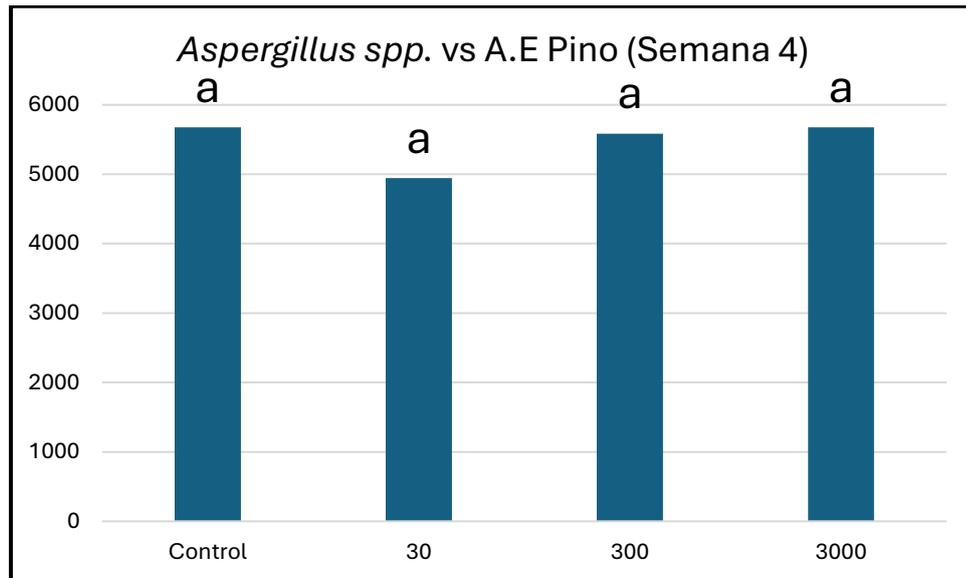
Como vemos en la anterior figura (Figura 9), la acción del aceite esencial es bastante diferente a la de otros aceites. En la primera semana la inhibición es bastante clara en cualquiera de las tres dosis. Luego en la segunda semana la dosis de 300 ppm se acerca más a los valores del control que la de 30 o 3000 ppm, después en la tercera semana los valores de todas las dosis se acercan al control para que, en la cuarta semana, los valores del control, la dosis de 300 y la de 3000 ppm se igualen mientras que la dosis de 30 ppm se mantenga ligeramente por debajo de las demás.



**Figura 9:** Evolución, en semanas, del crecimiento del hongo del género *Aspergillus* spp. ante el A.E. de pino en la placa PDA en diferentes tratamientos (control, 30 ppm, 300 ppm y 3000 ppm)

Como vemos en la anterior figura (Figura 9), la acción del aceite esencial es bastante diferente a la de otros aceites. En la primera semana la inhibición es bastante clara en cualquiera de las 3 dosis. Luego en la segunda semana la dosis de 300 ppm se acerca más a los valores del control que la de 30 o 3000 ppm, después en la tercera semana los valores de todas las dosis se acercan al control para que, en la cuarta semana, los valores del control, la dosis de 300 y la de 3000 ppm se igualen mientras que la dosis de 30 ppm se mantenga ligeramente por debajo de las demás.

En este caso, al hacer el test de Kruskal-Wallis (Kruskal-Wallis test:  $H(3, N=12) = 2,212121$ ), el resultado de “p” es 0,5296, un valor superior a 0,05. Por lo que podemos decir que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las dosis y el control y por ende podríamos afirmar con una confianza del 95 % que no existen diferencias entre el crecimiento del hongo con o sin aceite esencial de pino (en la Figura 10 todos presentan la misma letra para indicar esta ausencia de diferencias estadísticas).



**Figura 10:** Crecimiento del hongo del género *Aspergillus* spp. con A.E. de pino a las 4 semanas del comienzo del estudio. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney  $p > 0,05$ ).

#### 5.1.2.5. Discusión sobre *Aspergillus* spp.

Viendo los resultados anteriores vemos que *Aspergillus* spp. ha sido inhibido de manera importante por solamente dos aceites: cedro y canela a una dosis de 3000 ppm. Esta dosis es bastante alta si lo comparamos con otros trabajos de la misma temática en la que se haya intentado combatir dicho hongo con otros aceites.

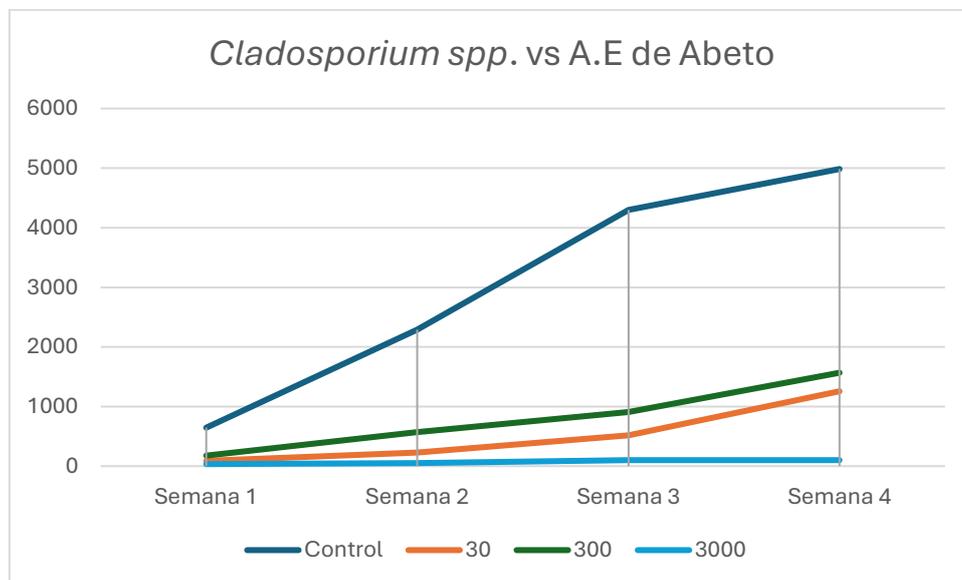
Un ejemplo es el aceite de citronela (Arribas, 2018) el cual con una dosis de 1500 ppm ya reducía de manera considerable el crecimiento del hongo e incluso a 3000 ppm (dosis más alta usada en este trabajo) el crecimiento era inhibido completamente, impidiendo al hongo crecer. En otro estudio (Mishra & Dubey, 1994) se probó aceite de citronela sobre el control de *Aspergillus flavus* en productos almacenados de arroz y trigo, se demostró que la concentración de 1000 ppm se controlaba el hongo al 100% sin causar daños a las semillas.

Otros aceites que se han probado y han tenido función inhibidora frente a este patógeno has sido el aceite esencial de ajowan (*Trachyspermum ammi*) (Gemeda, 2014), aceite esencial de geranio (*P. graveolens*) o clavo (*S. aromaticum*) a dosis de 2250 ppm (Allizond, 2023).

### 5.1.3. Evolución fúngica de *Cladosporium* spp.

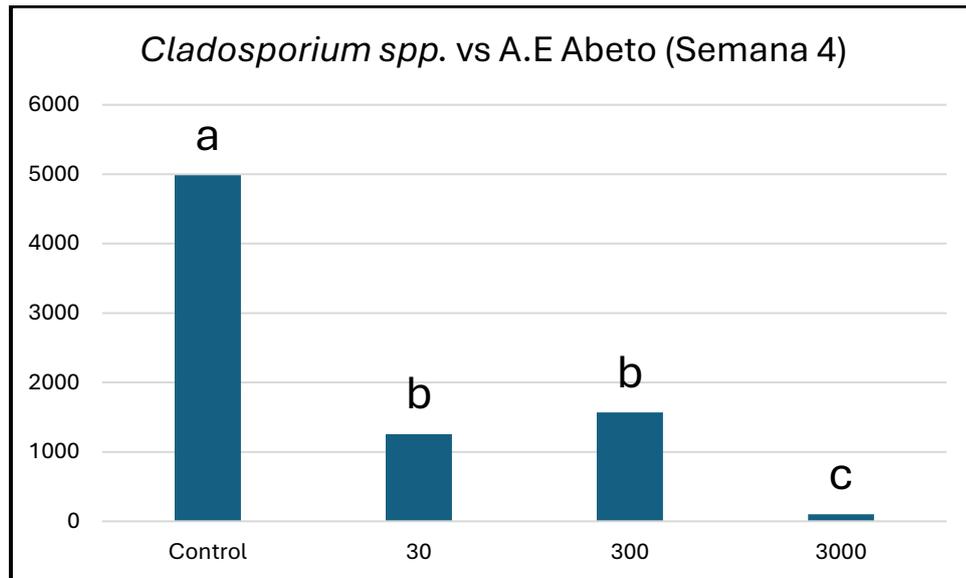
#### 5.1.3.1. *Cladosporium* spp. y A.E. de Abeto

En el siguiente gráfico (Figura 11) vemos que el aceite de abeto ha hecho un efecto bastante importante en el crecimiento de *Cladosporium* spp., vemos que las 3 dosis inhiben de manera importante el crecimiento durante las 4 semanas, dejándolo por valores bastante bajos (los valores a la cuarta semana de las dosis de 30, 300 y 3000 ppm no superan el valor del control en la segunda semana).



**Figura 11:** Evolución, en semanas, del crecimiento del hongo del género *Cladosporium* spp. ante el A.E. de abeto en la placa PDA en diferentes tratamientos (control, 30 ppm, 300 ppm y 3000 ppm)

Al hacer el test de Kruskal-Wallis para este caso (Kruskal-Wallis test:  $H(3, N=12) = 9,528169$ ), vemos que  $p = 0,0230$  por lo que existen diferencias estadísticamente significativas en los datos de esta combinación. Ahora veremos los resultados en la Figura 12:



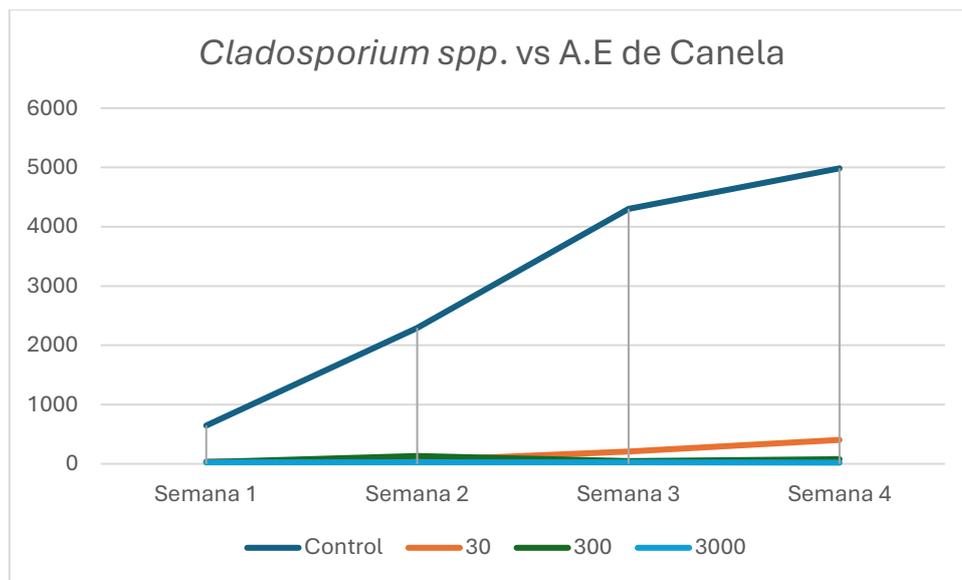
**Figura 12:** Crecimiento del hongo del género *Cladosporium* spp. con A.E. de abeto a las 4 semanas del comienzo del estudio. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney  $p > 0,05$ ).

Vemos que todas las dosis presentan diferencias con el control (Figura 12), indicando que el aceite esencial hace un efecto inhibitor al hongo. Las dosis de 30 y 300 ppm aun presentando diferencias en los datos alcanzados en la cuarta semana no son datos estadísticamente significativos. Mientras tanto, la dosis de 3000 ppm, que corresponde a la dosis con mayor poder inhibitor de las tres dosis probadas, no presenta similitudes estadísticas con ninguna de las anteriores dosis ni con el control.

Las dosis de 30 y 3000 ppm se encuentran en los valores de “diferencia importante” ( $< 1500 \text{ mm}^2$ ), aun así, la dosis de 3000 ppm por su parte inhibe completamente el crecimiento del hongo, siendo la dosis de mayor interés de este apartado.

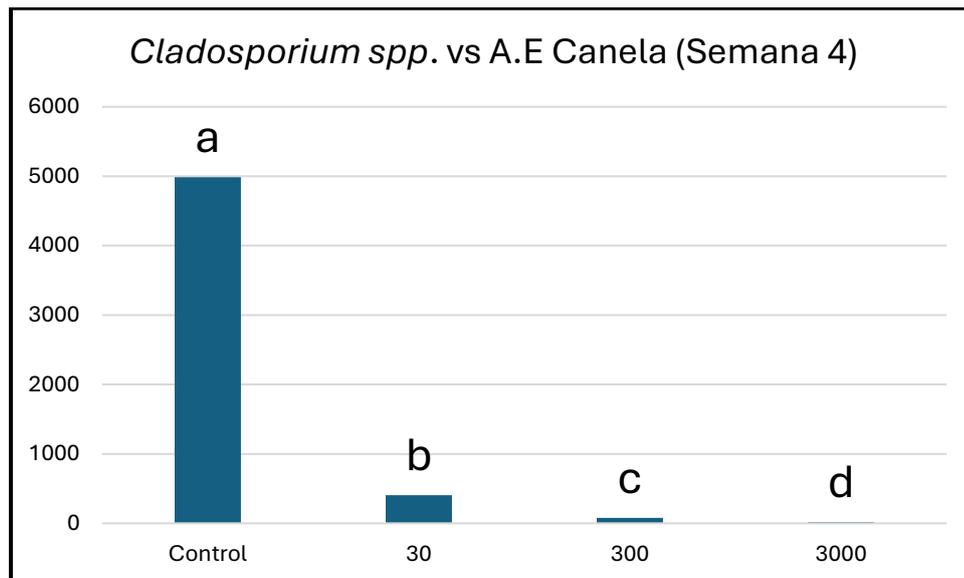
### 5.1.3.2. *Cladosporium* spp. y A.E. de Canela

En este caso, vemos que el aceite de canela (Figura 13) funciona incluso mejor que el aceite de abeto (Figura 11) inhibiendo el crecimiento. Todas las dosis presentan un efecto excelente y, aunque la dosis de 30 ppm se separe un poco la cuarta semana, no permiten que el hongo se desarrolle de manera correcta.



**Figura 13:** Evolución, en semanas, del crecimiento del hongo del género *Cladosporium* spp. ante el A.E. de canela en la placa PDA en diferentes tratamientos (control, 30 ppm, 300 ppm y 3000 ppm)

El test de Kruskal-Wallis (Kruskal-Wallis test:  $H(3, N=12) = 10,53191$ ) nos da un resultado de  $p = 0,0145$ , por lo que existen diferencias significativas en los datos del aceite esencial de canela en este caso.

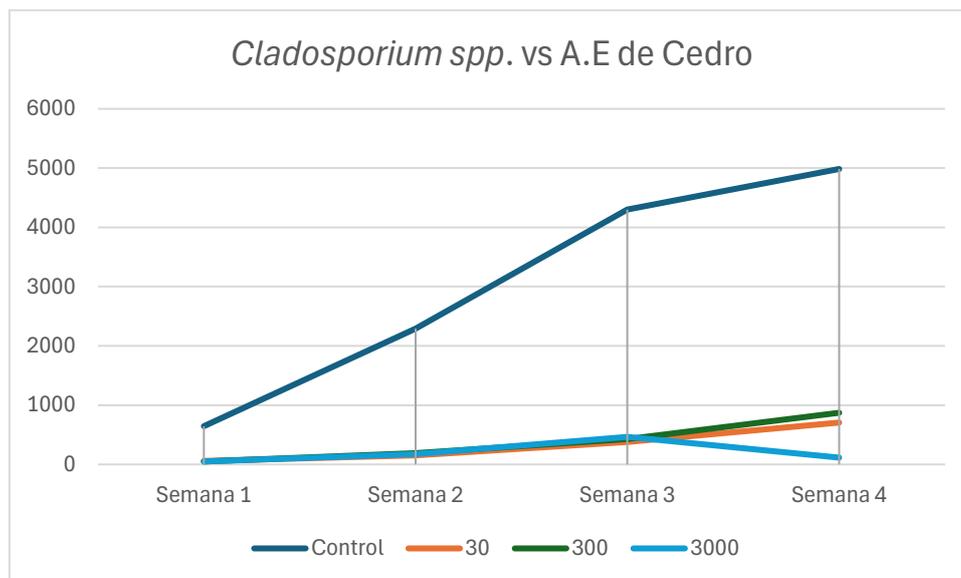


**Figura 14:** Crecimiento del hongo del género *Cladosporium* spp. con A.E. de canela a las 4 semanas del comienzo del estudio. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney  $p > 0,05$ ).

Vemos (Figura 14) que todos los datos son estadísticamente diferentes entre sí (y producen diferencias importantes respecto al crecimiento), indicando que el aceite esencial de canela tiene un poder inhibitorio del crecimiento de *Cladosporium* spp. en las placas, siendo la dosis de 3000 ppm la que menor crecimiento del hongo ha permitido. Las 3 pueden ser consideradas que hacen una diferencia importante, pudiendo considerarse ya la dosis de 300 ppm como una dosis buena para la inhibición.

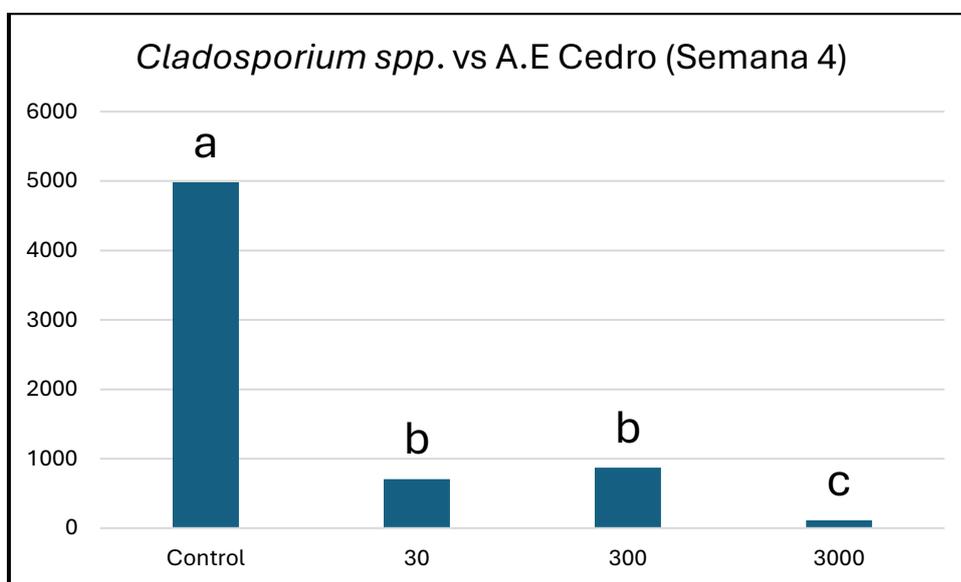
#### 5.1.3.3. *Cladosporium* spp. y A.E de Cedro

En la siguiente figura (Figura 15) vemos que la acción del aceite esencial de cedro también inhibe el crecimiento del hongo de manera exitosa a lo largo de las 4 semanas. Si nos fijamos en las figuras de los anteriores aceites (Figura 13 y 11) vemos que su acción es muy parecida a los otros aceites, encontrándose éste en un punto intermedio entre el aceite de abeto y el de canela.



**Figura 15:** Evolución, en semanas, del crecimiento del hongo del género *Cladosporium* spp. ante el A.E. de cedro en la placa PDA en diferentes tratamientos (control, 30 ppm, 300 ppm y 3000 ppm)

En este caso, el test de Kruskal-Wallis (Kruskal-Wallis test:  $H(3, N=12) = 8,069249$ ) nos indica un valor de  $p = 0,0446$  por lo que, al igual que en la mayoría de los demás casos, existen diferencias significativas.

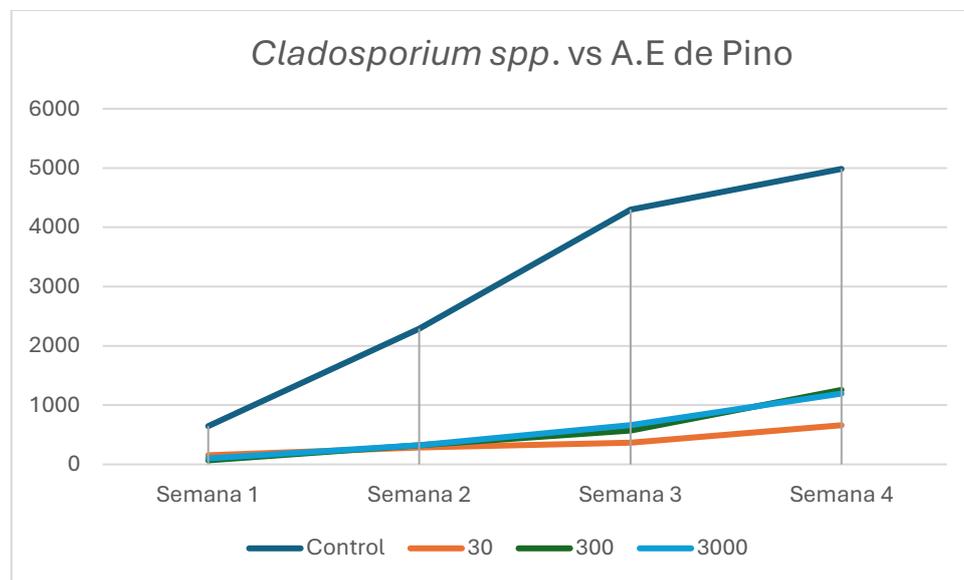


**Figura 16:** Crecimiento del hongo del género *Cladosporium* spp. con A.E. de canela a las 4 semanas del comienzo del estudio. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney  $p > 0,05$ ).

Como podemos observar en el gráfico (Figura 16), las dosis presentan diferencias estadísticas respecto al control. Aun así, la acción de las dosis de 30 y 300 ppm no presentan diferencias estadísticas significativas entre sí, pero sí que las presentan con la dosis de 3000 ppm la cual es diferente estadísticamente a todas las demás, indicando que, al aumentar a esas dosis, el crecimiento del hongo se ve alterado por el aceite esencial de cedro de manera diferente (menor crecimiento). Todas las dosis del aceite de cedro inhiben el hongo haciendo que su crecimiento esté por debajo de 1500 mm<sup>2</sup> y, por ende, produciendo una diferencia importante en el crecimiento.

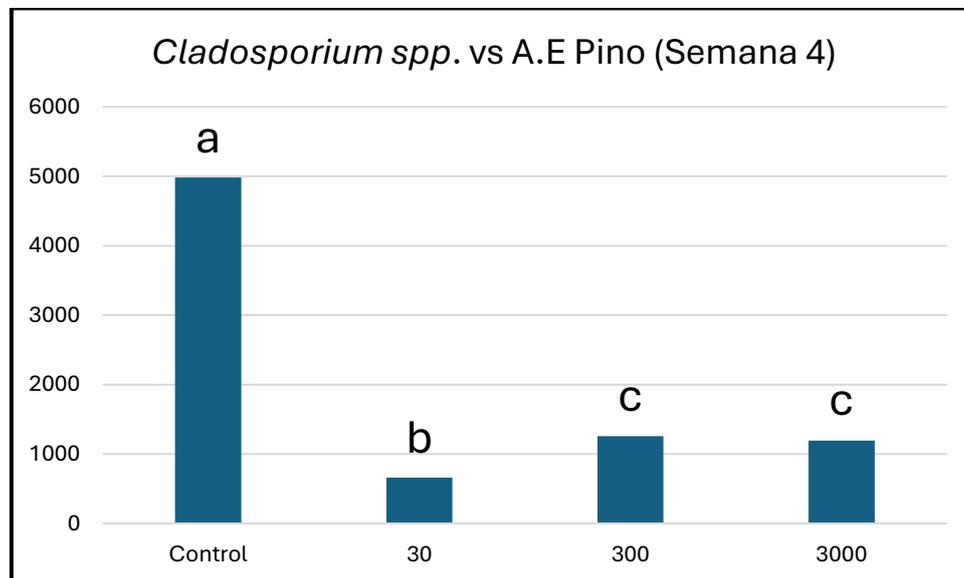
#### 5.1.3.4. *Cladosporium* spp. y A.E. de Pino

Al igual que los demás aceites, vemos que el aceite esencial de pino también inhibe correctamente el crecimiento del hongo a lo largo de las 4 semanas. Un aspecto a destacar de esta figura (Figura 17) es que la dosis más baja (30 ppm) es la que mayor inhibición presenta, mientras que las dosis de 300 y 3000 ppm mantienen unos valores muy homogéneos a lo largo de las semanas.



**Figura 17:** Evolución, en semanas, del crecimiento del hongo del género *Cladosporium* spp. ante el A.E. de pino en la placa PDA en diferentes tratamientos (control, 30 ppm, 300 ppm y 3000 ppm)

Tras realizar el test de Kruskal-Wallis (Kruskal-Wallis test:  $H(3, N=12) = 9,430409$ ) el resultado obtenido es  $p = 0,0241$ , lo que nos indica que existen diferencias estadísticas significativas, como vemos en el siguiente gráfico (Figura 18):



**Figura 18:** Crecimiento del hongo del género *Cladosporium* spp. con A.E. de pino a las 4 semanas del comienzo del estudio. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney  $p > 0,05$ ).

Como vemos en la Figura 18, todas las dosis presentan diferencias frente al control indicando que el aceite de pino tiene efecto sobre el crecimiento del hongo. Ahora, en este caso ocurre un fenómeno curioso, la dosis de 30 ppm (diferente estadísticamente de las dosis de 300 y 3000 ppm) inhibe mejor el crecimiento de *Cladosporium* spp. que las dosis de 300 y 3000 ppm, las cuales no presentan diferencias estadísticas significativas entre sí, es decir, hacen el mismo efecto. El A.E. de pino es uno de los que peores resultados ha presentado en otros estudios (Ibañez, 2019; Mirasierra, 2021), pero en este caso hasta las dosis más bajas inhiben el hongo por debajo del valor límite establecido anteriormente para considerarlo importante.

#### 5.1.3.5. Discusión sobre *Cladosporium* spp.

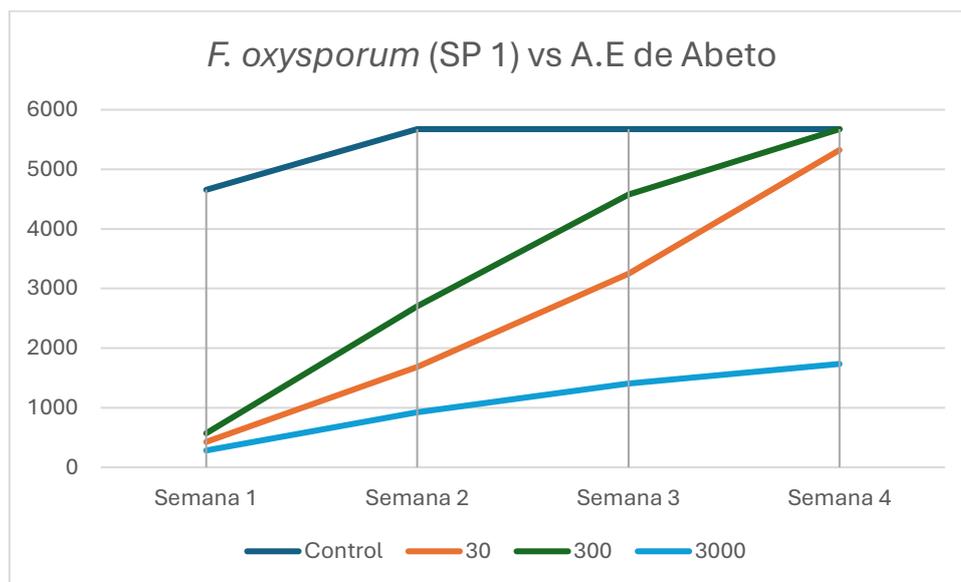
En el caso de *Cladosporium* spp., todos los aceites han funcionado de manera satisfactoria consiguiendo una inhibición importante (crecimiento por debajo de 1500 mm<sup>2</sup> en la cuarta semana) a 30 ppm, e inhibiendo en algunos casos todo el crecimiento a 300 ppm (canela) o 3000 ppm.

Dosis parecidas a las nuestras han sido probadas con otros aceites en otros trabajos, el aceite de clavo inhibe el crecimiento a 400 ppm, el de orégano y tomillo a 200 ppm, el aceite de albahaca a 600 ppm y el de romero a 800 ppm, siendo el que menor inhibición presentó (Maritza, 2024).

#### 5.1.4. Evolución fúngica de *Fusarium oxysporum* (FOP SP1)

##### 5.1.4.1. *Fusarium oxysporum* y A.E. de Abeto

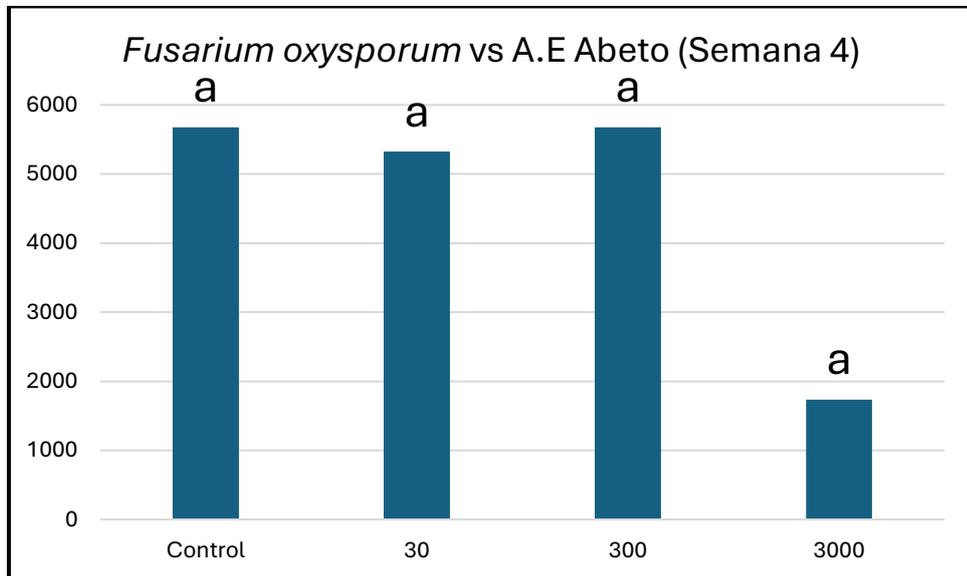
En el caso del aceite de abeto (Figura 19), vemos que a dosis bajas y medias como 30 o 300 ppm al principio sí que existe inhibición, pero con el paso de las semanas el FOP SP1 consigue crecer hasta valores cercanos al control. En cambio, la dosis de 3000 ppm consigue frenar el crecimiento bastante, dejando los valores de crecimiento muy por debajo de los valores de las demás dosis.



**Figura 19:** Evolución, en semanas, del crecimiento del hongo *Fusarium oxysporum* (FOP SP1) ante el A.E. de abeto en la placa PDA en diferentes tratamientos (control, 30 ppm, 300 ppm y 3000 ppm)

Al hacer el test de Kruskal-Wallis (Kruskal-Wallis test:  $H(3, N=12) = 7,173913$ ) en este caso, obtenemos el dato de  $p = 0,0666$ , lo que nos indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las dosis y el control, al estar este valor por encima de 0,05. Aunque vimos anteriormente (Figura 19) que la dosis de 3000 ppm hacía un efecto inhibitorio bastante superior a las demás dosis, estadísticamente no se presentan diferencias con las demás

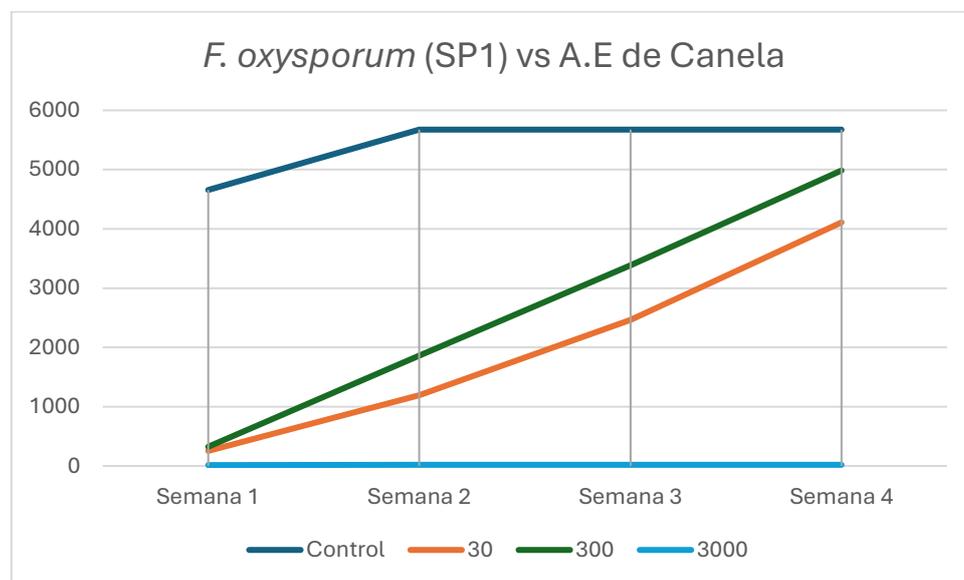
dosis (Figura 20), esto es debido a la desviación de los datos (media  $1735 \pm 2384 \text{ mm}^2$ ) obtenidos en el estudio (en algunas placas no creció mucho el hongo, pero en otras creció ocupando toda la placa).



**Figura 20:** Crecimiento del hongo FOP SP1 con A.E. de abeto a las 4 semanas del comienzo del estudio. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney  $p > 0,05$ )

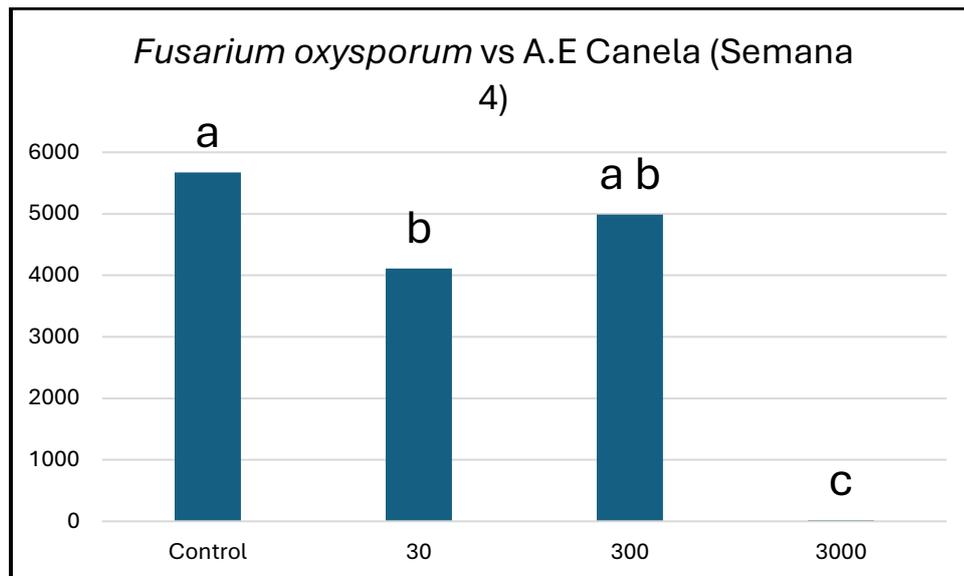
#### 5.1.4.2. *Fusarium oxysporum* y A.E de Canela

Esta figura (Figura 21) es bastante similar a la figura del aceite de abeto (Figura 19), con la peculiaridad de que la dosis de 300 ppm se encuentra por encima de la dosis de 30 ppm (es decir, el hongo crece de manera más rápida) en cada una de las semanas del estudio. También, se puede apreciar que el aceite de canela a una dosis alta, 3000 ppm, inhibe completamente el crecimiento del hongo a cada momento, como ya vimos en otros casos (Figura 5 y 13).



**Figura 21:** Evolución, en semanas, del crecimiento del hongo *Fusarium oxysporum* (FOP SP1) ante el A.E. de canela en la placa PDA en diferentes tratamientos (control, 30 ppm, 300 ppm y 3000 ppm)

Al contrario que el caso anterior (Figura 20), tras realizar el test de Kruskal-Wallis (Kruskal-Wallis test:  $H(3, N=12) = 10,11728$ ) obtenemos un valor de  $p = 0,0176$ , indicando que hay diferencias estadísticamente significativas. Una vez realizado el test U de Mann-Whitney obtenemos los siguientes datos (Figura 22):

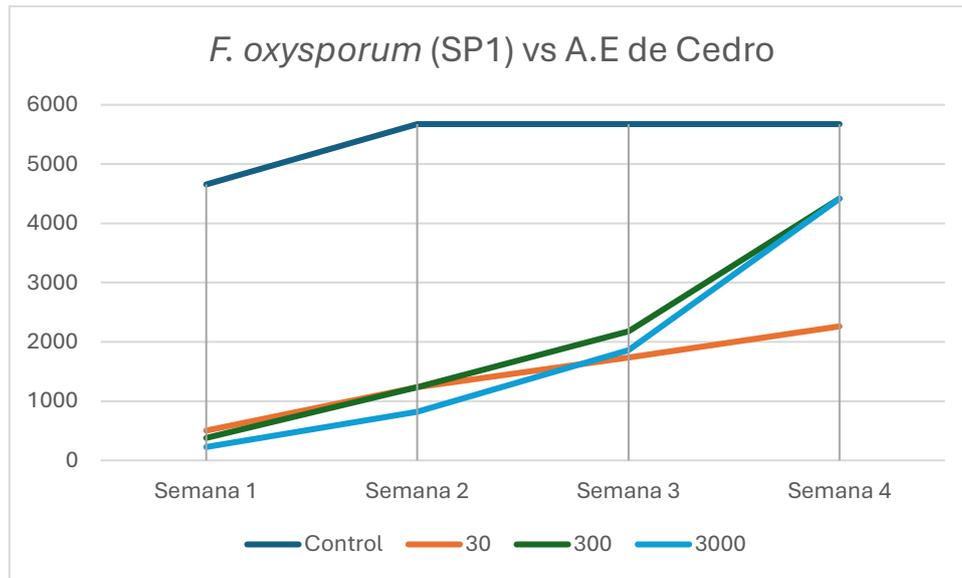


**Figura 22:** Crecimiento del hongo *Fusarium oxysporum* (FOP SP1) con A.E. de canela a las 4 semanas del comienzo del estudio. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney  $p > 0,05$ ).

Vemos (Figura 22) que la dosis de 3000 ppm no es que presente una inhibición importante, sino que inhibe completamente el crecimiento del hongo, diferenciándose estadísticamente también de las demás dosis y el control. Mientras, la dosis de 30 (que inhibe en mayor cantidad que la dosis de 300 ppm) también se diferencia estadísticamente del control, pero no funciona de manera tan eficaz como funciona la dosis de 3000 ppm. Por último, la dosis de 300 ppm no presenta diferencias significativas con la dosis de 30 ppm o con el control, encontrándose en un punto medio entre los dos datos.

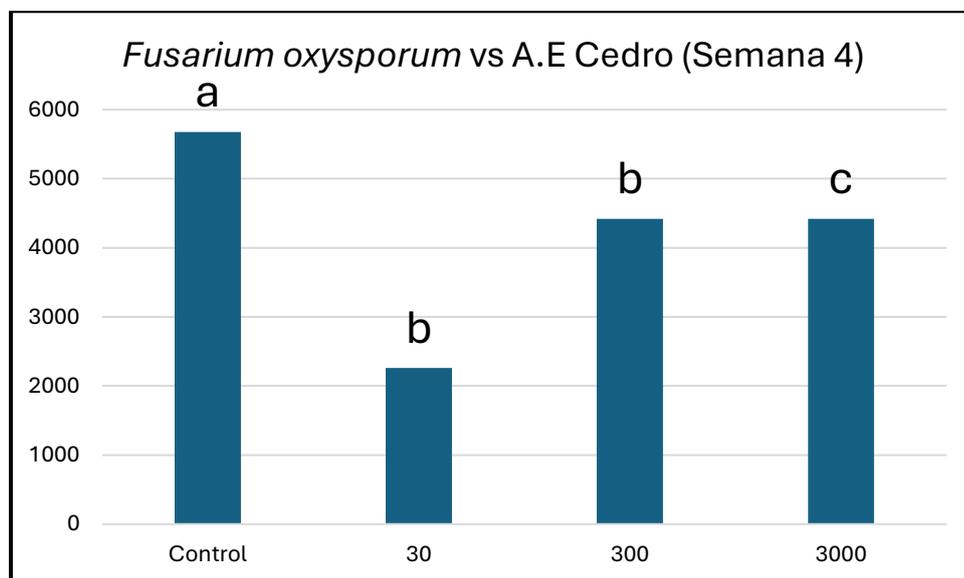
#### 5.1.4.3. *Fusarium oxysporum* y A.E. de Cedro

En este caso (Figura 23) el aceite de cedro frena en gran cantidad a cualquier dosis el crecimiento de *Fusarium oxysporum* en las tres primeras semanas, la inhibición es bastante parecida entre una y otra dosis durante este periodo de tiempo. La diferencia viene en la cuarta semana, donde las dosis de 300 y 3000 disminuyen su poder inhibidor y tienen un repunte hacia los valores del control, mientras que la dosis de 30 ppm mantiene su efecto, dándonos valores por debajo de las demás dosis más altas.



**Figura 23:** Evolución, en semanas, del crecimiento del hongo *Fusarium oxysporum* (FOP SP1) ante el AE de cedro en la placa PDA en diferentes tratamientos (control, 30 ppm, 300 ppm y 3000 ppm)

El resultado en este caso del test de Kruskal-Wallis (Kruskal-Wallis test:  $H(3, N=12) = 9,023641$ ) es  $p = 0,0290$  por lo que otra vez tenemos datos con diferencias estadísticamente significativas. Veamos la Figura 24:

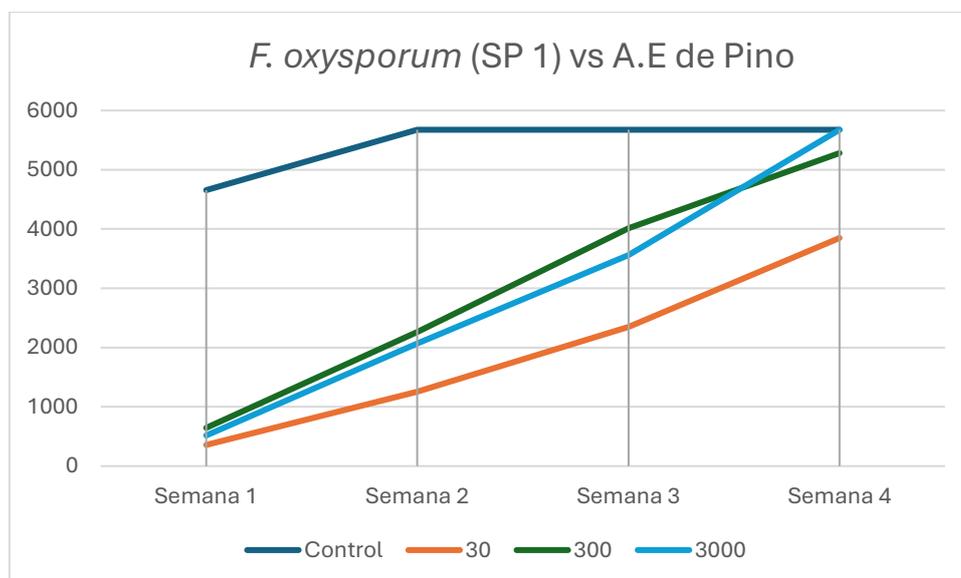


**Figura 24:** Crecimiento del hongo *Fusarium oxysporum* (FOP SP1) con A.E. de cedro a las 4 semanas del comienzo del estudio. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney  $p > 0,05$ ).

Como podemos observar en el gráfico, todas las dosis presentan diferencias significativas con el control. Las dosis de 30 y 300 ppm aun presentando valores tan dispares no presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí, mientras que la dosis de 3000 ppm aun teniendo un valor muy parecido en la cuarta semana a la dosis de 300 ppm presenta diferencias con todas las demás dosis y el control.

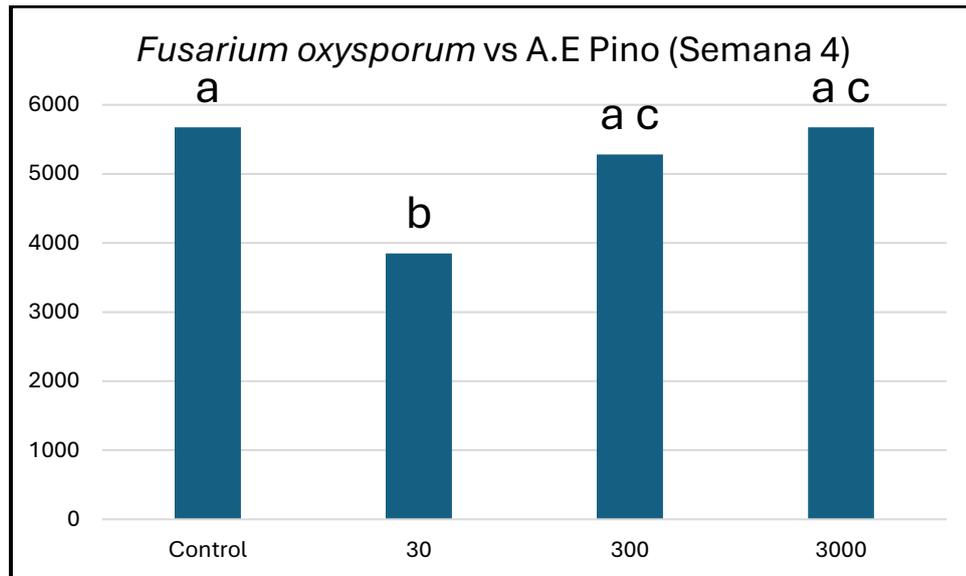
#### 5.1.4.4. *Fusarium oxysporum* y A.E. de Pino

En las primeras semanas de este caso (Figura 25) podemos observar que todas las dosis hacen un efecto de inhibición que lentamente va desapareciendo a medida que el hongo crece hasta alcanzar superficies muy parecidas al control en las dosis de 300 y 3000 ppm. La dosis de 30 ppm sigue esta tendencia, pero se mantiene ligeramente por debajo de las demás dosis.



**Figura 25:** Evolución, en semanas, del crecimiento del hongo *Fusarium oxysporum* (FOP SP1) ante el A.E. de pino en la placa PDA en diferentes tratamientos (control, 30 ppm, 300 ppm y 3000 ppm)

En el caso del aceite de pino, el test de Kruskal-Wallis (Kruskal-Wallis test:  $H(3, N=12) = 9,510917$ ) nos da un valor de  $p = 0,0232$  por lo que también existen diferencias estadísticamente significativas. En la Figura 26 observamos los valores y sus diferentes estadísticas en el test U de Mann-Whitney.



**Figura 26:** Crecimiento del hongo *Fusarium oxysporum* (SP1) con A.E. de pino a las 4 semanas del comienzo del estudio. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney  $p > 0,05$ ).

En la Figura 26 podemos observar algo curioso, las dosis altas, que se supone que deben tener mayor poder inhibitor, no presentan diferencias estadísticamente significativas con el control o entre ellas (300 y 3000 ppm) mientras que la dosis de 30 ppm, que inhibió en mayor medida el crecimiento del hongo en el estudio, no presenta similitudes estadísticas con ninguna de las demás dosis ni con el control.

#### 5.1.4.5. Discusión sobre *Fusarium oxysporum*

El único aceite que ha podido frenar de manera importante el crecimiento de *Fusarium oxysporum* ha sido el aceite de canela a 3000 ppm (Figura 22), además, vemos como tiene un comportamiento anormal con otros aceites como el de pino y el de cedro, en los que se observa una mayor inhibición a dosis bajas (30 ppm) que a dosis mayores (300 y 3000 ppm), este efecto ya ha sido observado en otros estudios con diferentes aceites como por ejemplo el de clavo (Sánchez, 2016) o el de sándalo (Arribas, 2018; Novoa, 2017; Valdeolmillos, 2018).

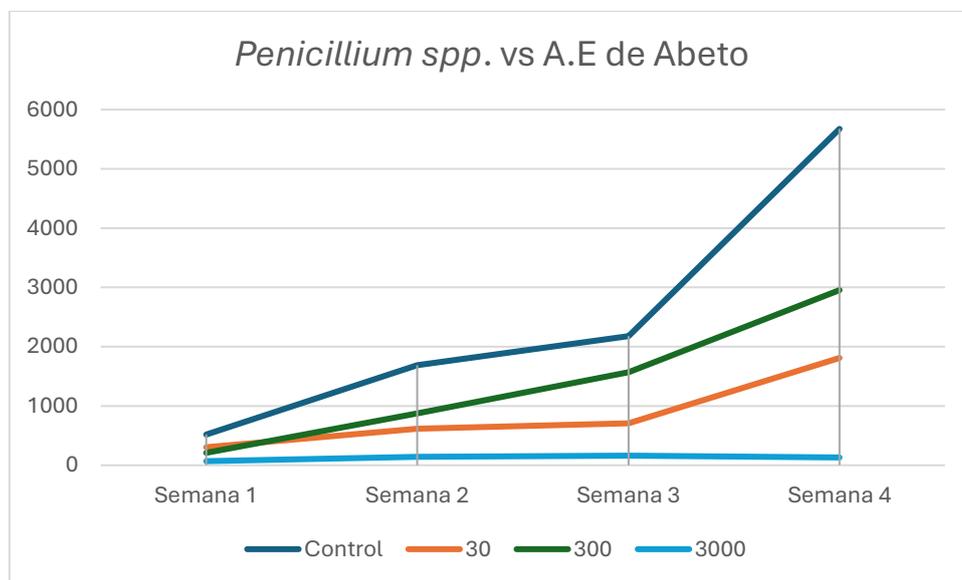
Además de los aceites usados en este estudio, *Fusarium oxysporum* ha sido sometido a otros aceites en estudios realizados en la misma entidad; siendo estos: clavo, el cual inhibía completamente el crecimiento a 300 ppm (Sánchez, 2016), el de citronela, que lo inhibía a 300 ppm, sándalo a 300 ppm también o melisa que no tuvo efecto aun con una dosis alta como la

de 3000 ppm (Arribas, 2018). Otros aceites que se probaron en estudios fueron los de orégano (inhibición a partir de 800 ppm), romero (no inhibió incluida la dosis de 1000 ppm), tomillo (200 ppm) y albahaca (al igual que el romero no presentó inhibición) entre otros aceites (Maritza, 2024).

### 5.1.5. Evolución fúngica de *Penicillium* spp.

#### 5.1.5.1. *Penicillium* spp. y A.E. de Abeto

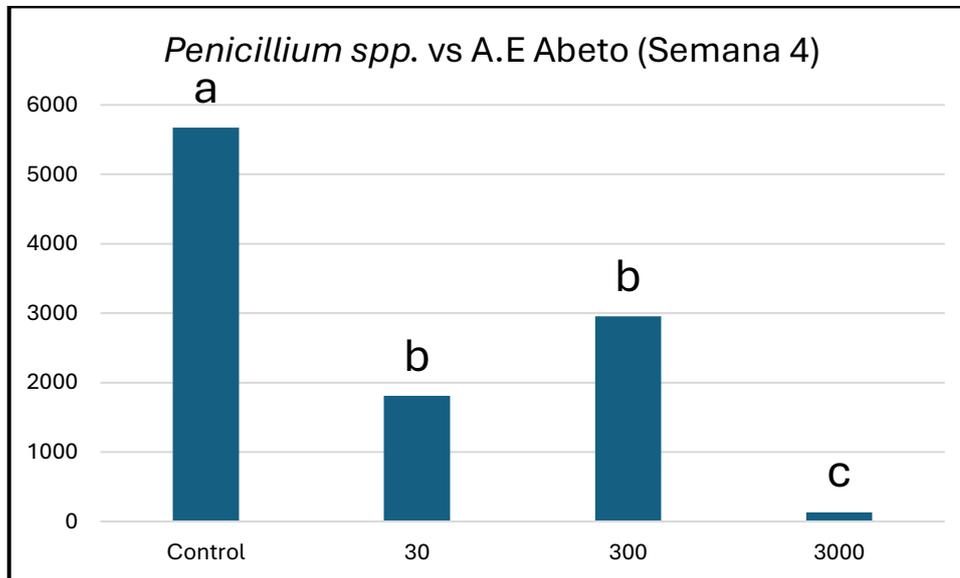
El hongo del estudio perteneciente al género *Penicillium* presenta un menor crecimiento inicialmente que los demás hongos como podemos observar en la anterior figura (Figura 27), aun así, las dosis inhiben este lento crecimiento de manera diferente según una u otra dosis.



**Figura 27:** Evolución, en semanas, del crecimiento del hongo del género *Penicillium* spp. ante el A.E. de abeto en la placa PDA en diferentes tratamientos (control, 30 ppm, 300 ppm y 3000 ppm)

La dosis de 300 ppm es la que presenta los valores más cercanos al control, estando ligeramente por debajo, la siguiente es la dosis de 30 ppm, que aun teniendo valores inicialmente iguales que la dosis de 300 ppm (y la de 3000 ppm) después presenta valores de crecimiento menores que la dosis de 300 ppm. Por último, la dosis de 3000 ppm inhibe completamente el crecimiento a lo largo de las 4 semanas.

El test de Kruskal-Wallis (Kruskal-Wallis test:  $H(3, N=12) = 9,595745$ ) nos da como resultado  $p = 0,0223$  por lo que en este caso también existen diferencias estadísticamente significativas.

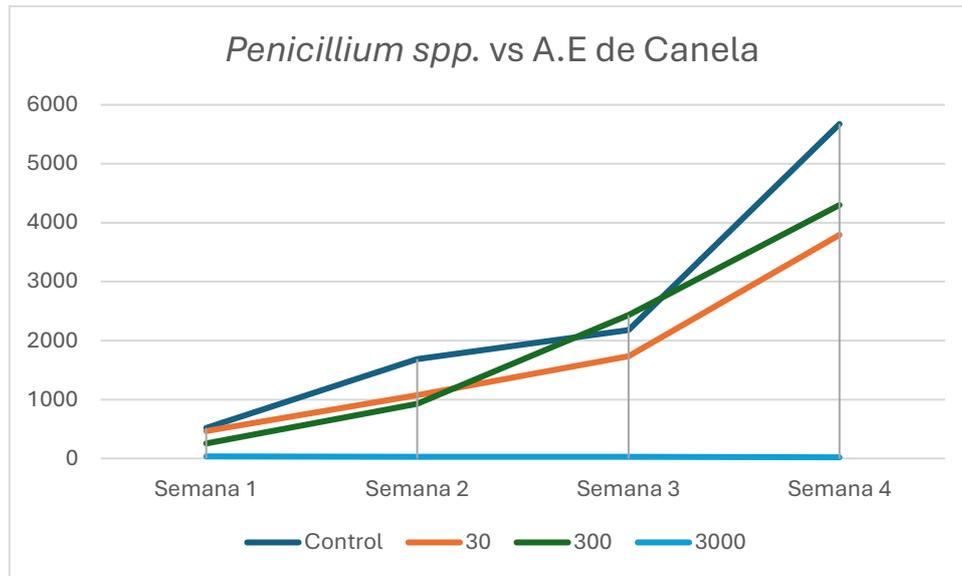


**Figura 28:** Crecimiento del hongo del género *Penicillium* spp. con A.E. de abeto a las 4 semanas del comienzo del estudio. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney  $p > 0,05$ ).

Tras realizar el test U de Mann-Whitney (Figura 28) vemos que todas las dosis presentan diferencias estadísticas con el control. Las dosis de 30 y 300 ppm, que inhiben de manera importante el crecimiento de *Penicillium* spp. (menos que la dosis de 3000 ppm), no presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellas, pero sí con el control. Mientras, la dosis de 3000 ppm, que inhibe completamente el crecimiento de *Penicillium* spp., presenta diferencias estadísticas con todas las demás dosis y el control. Además, también existe una diferencia importante en el crecimiento del hongo con esta última dosis.

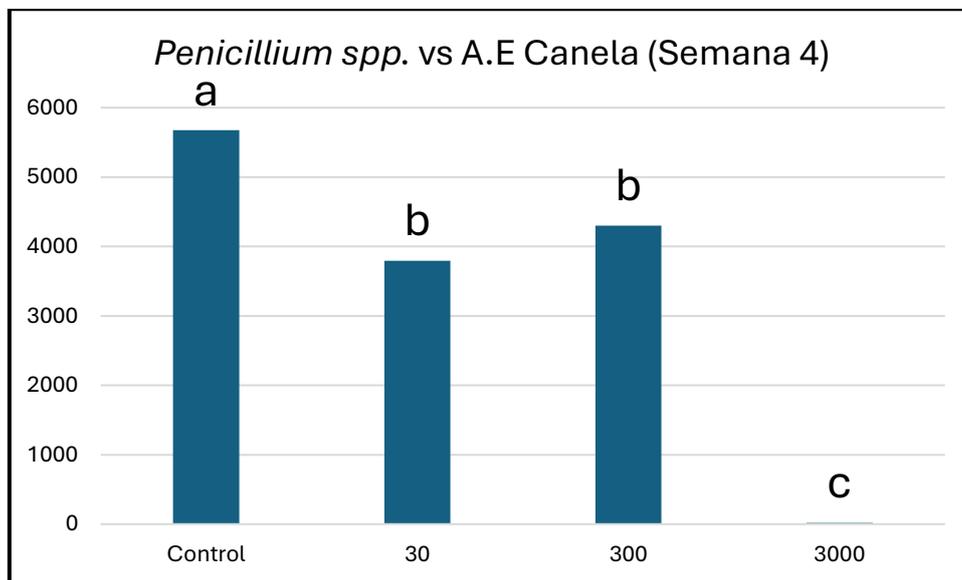
#### 5.1.5.2. *Penicillium* spp. y A.E. de Canela

En este caso (Figura 29), vemos que las dosis de 30 y 300 ppm no presentan un efecto importante sobre el crecimiento del hongo, pues a lo largo de las 4 semanas los valores de crecimiento se presentan muy parecidos a los valores de control, solamente la dosis de 3000 ppm es la que presenta una completa contención del crecimiento del hongo.



**Figura 29:** Evolución, en semanas, del crecimiento del hongo del género *Penicillium* spp. ante el A.E. de canela en la placa PDA en diferentes tratamientos (control, 30 ppm, 300 ppm y 3000 ppm)

El test de Kruskal-Wallis (Kruskal-Wallis test:  $H(3, N=12) = 10,12635$ ) indica, al igual que en los anteriores casos ( $p = 0,0175$ ), que existen diferencias significativas en los datos del aceite esencial de canela como veremos en la Figura 30:

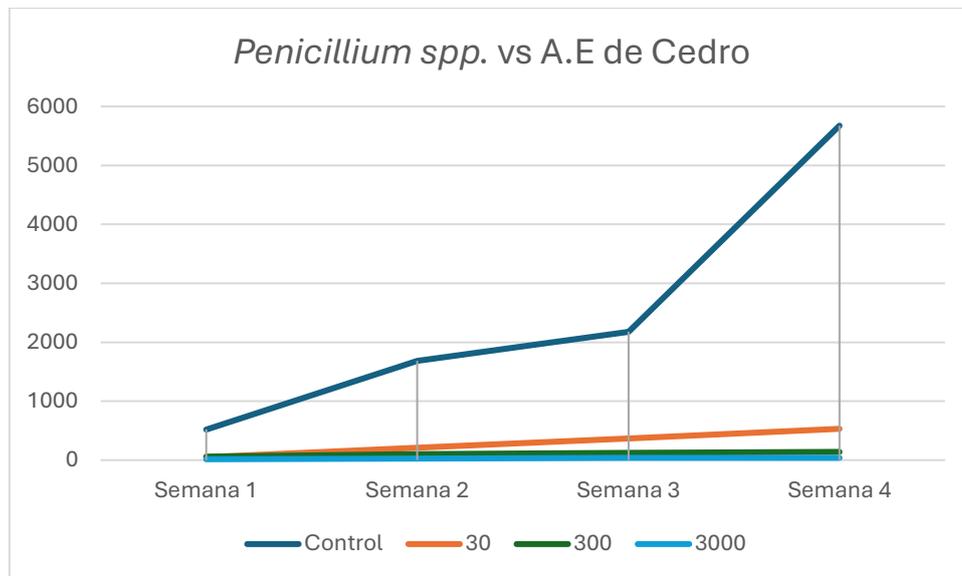


**Figura 30:** Crecimiento del hongo del género *Penicillium* spp. con A.E. de canela a las 4 semanas del comienzo del estudio. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney  $p > 0,05$ ).

En el gráfico (Figura 30) vemos que todas las dosis presentan diferencias significativas con el control, las dosis de 30 y 300 ppm son similares entre sí, aunque inhiben levemente el crecimiento del hongo. Mientras, la dosis de 3000 ppm es diferente a todas las demás (letra c) e inhibe completamente (diferencia importante) el crecimiento del hongo hasta la cuarta semana.

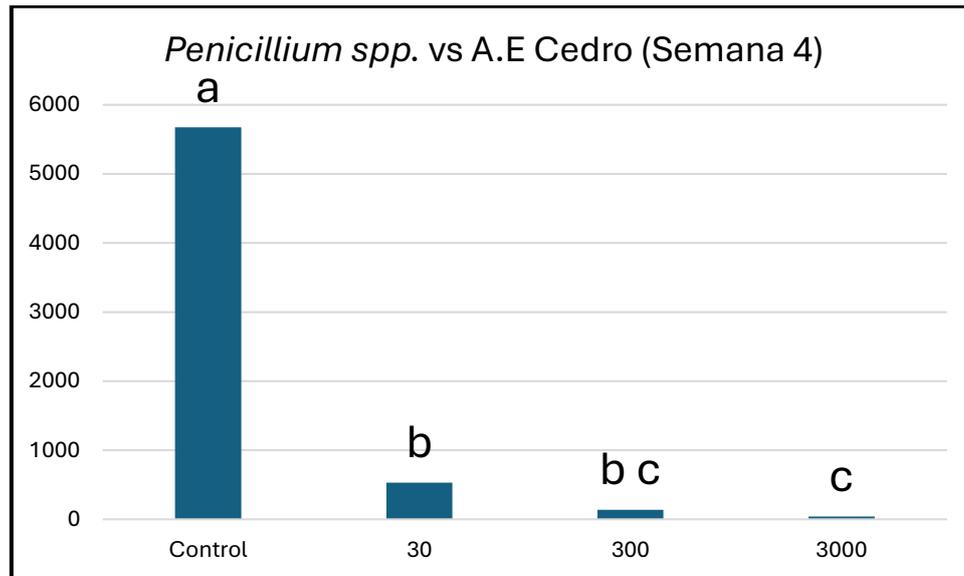
### 5.1.5.3. *Penicillium spp.* y A.E de Cedro

El aceite de cedro (Figura 31) presenta un comportamiento diferente a los dos aceites anteriores respecto a la cohibición del crecimiento del hongo de *Penicillium spp.* Como se aprecia en la figura desde la dosis más pequeña hasta la mayor inhiben de manera casi completa el crecimiento del hongo.



**Figura 31:** Evolución, en semanas, del crecimiento del hongo del género *Penicillium spp.* ante el A.E. de cedro en la placa PDA en diferentes tratamientos (control, 30 ppm, 300 ppm y 3000 ppm)

En el caso del cedro obtenemos el valor de  $p = 0,0307$  en el test de Kruskal-Wallis (Kruskal-Wallis test:  $H(3, N= 12) = 8,899170$ ), por lo que también existen diferencias significativas en estos datos.

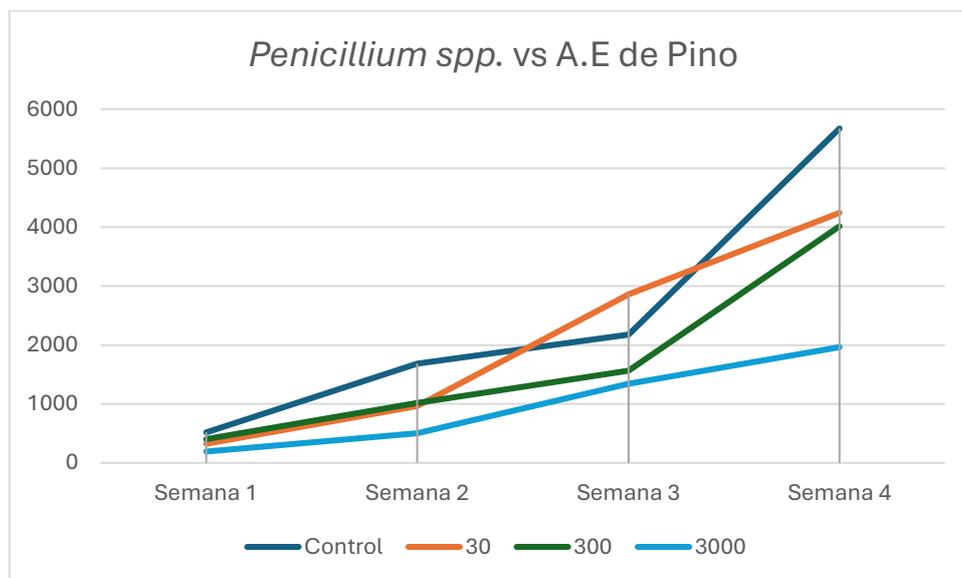


**Figura 32:** Crecimiento del hongo del género *Penicillium* spp. con A.E. de cedro a las 4 semanas del comienzo del estudio. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney  $p > 0,05$ ).

El test U de Mann-Whitney (Figura 32) nos indica que todas las dosis presentan diferencias estadísticamente significativas con el control. Todas las dosis inhiben correctamente el crecimiento del hongo, pero vemos que existen diferencias entre ellas. La dosis de 30 ppm y la de 3000 ppm son diferentes estadísticamente, como podemos ver representado por las letras “b” y “c”, indicando que a mayor dosis el efecto de inhibición es diferente. Mientras tanto, la dosis de 300 ppm no presenta diferencias significativas con ninguna de las dos dosis, estableciéndose en un término medio entre las dos. Igualmente, todas estas dosis, siendo o no diferentes estadísticamente entre sí, hacen que las diferencias de crecimiento entre el control y ellas sean importantes, no permitiendo casi el crecimiento del hongo.

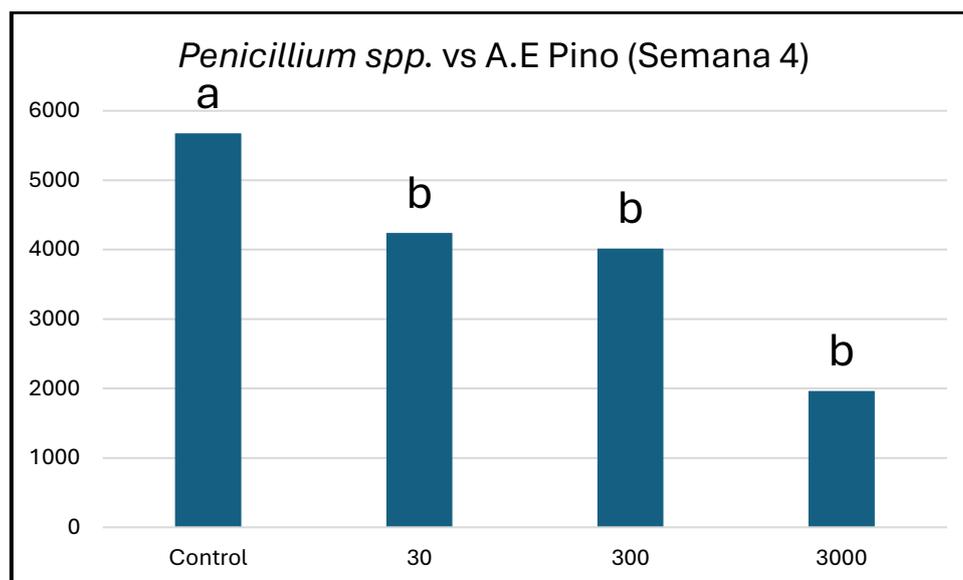
#### 5.1.5.4. *Penicillium* spp. y A.E. de Pino

En este caso (Figura 33), ninguna de las concentraciones obtiene unos valores de crecimiento del hongo satisfactorios, incluso en algún momento supera al control (dosis de 30 ppm, tercera semana), la única diferencia importante se presenta en la cuarta semana entre la dosis de 3000 ppm y el control, pero el crecimiento que ya presenta el hongo en esa semana ya es importante.



**Figura 33:** Evolución, en semanas, del crecimiento del hongo del género *Penicillium* spp. ante el A.E. de pino en la placa PDA en diferentes tratamientos (control, 30 ppm, 300 ppm y 3000 ppm)

En el caso del pino el test de Kruskal-Wallis (Kruskal-Wallis test:  $H(3, N=12) = 8,243499$ ) el dato de “p” es igual a 0,0412, por lo que también hay diferencias significativas en los datos. Tras realizar el test U de Mann-Whitney obtenemos el siguiente gráfico (Figura 34):



**Figura 34:** Crecimiento del hongo del género *Penicillium* spp. con A.E. de pino a las 4 semanas del comienzo del estudio. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney  $p > 0,05$ ).

En el gráfico (Figura 34) observamos como todas las dosis son diferentes al control de manera significativa. Aun así, no presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí a pesar de las diferencias en los datos obtenidos en la cuarta semana.

#### 5.1.5.5. Discusión sobre *Penicillium* spp.

Los aceites han tenido unos efectos muy adversos frente al *Penicillium* spp., algunos no han funcionado como el de pino, otros han inhibido de manera satisfactoria el crecimiento del hongo, pero sin llegar a eliminar totalmente su crecimiento como es el caso del abeto y otros lo han inhibido completamente como la canela y el cedro a 3000 ppm.

Anteriormente, este hongo había sido probado con otros como la melisa o la citronela y no habían hecho efecto alguno (Arribas, 2018), con el sándalo la inhibición había sido muy pequeña (Arribas, 2018), con el aceite de clavo a 300 ppm se obtenía una disminución importante y a 3000 ppm completa (Sánchez, 2016).

Otros aceites que también se han probado y muestran inhibición del *Penicillium* spp. han sido los de eneldo (92 % de inhibición), manzanilla, orégano (96 % inhibición) o pachulí (*Pogostemon cablin*) que logró una inhibición del 98 % del hongo, probados en dosis entre 313 y 5000 ppm (Zulu, 2023).

## 5.2. Resultados del Primer estudio *in vivo*

En este estudio lo que valoraríamos es la acción de los hongos en las naranjas, midiendo la anchura del crecimiento de los hongos en las heridas que les hicimos en la cáscara. Pero no ha sido posible debido a que, desde la segunda semana, la mayoría de las naranjas han sufrido una contaminación (Figura 5.33) de *Penicillium* spp. (la cepa usada en el segundo estudio) no obteniendo resultados válidos para poder valorar los efectos de los aceites esenciales en las naranjas (motivo por el que hicimos el segundo estudio *in vivo*).



**Figura 35:** Naranjas del Primer Estudio *in vivo* con *Aspergillus* spp. contaminadas completamente por el hongo del género *Penicillium* spp. que se usó en el segundo estudio

Al final de las cuatro semanas si que hubo alguna de las naranjas que no tuvo ningún hongo ni contaminación presente (aceite de canela con *Fusarium oxysporum* y cedro con *Cladosporium* spp.), pero al tener todos los controles con contaminaciones no podemos compararlos con ellos, no pudiendo sacar resultados de él.

## 5.3. Resultados del Segundo estudio *in vitro*

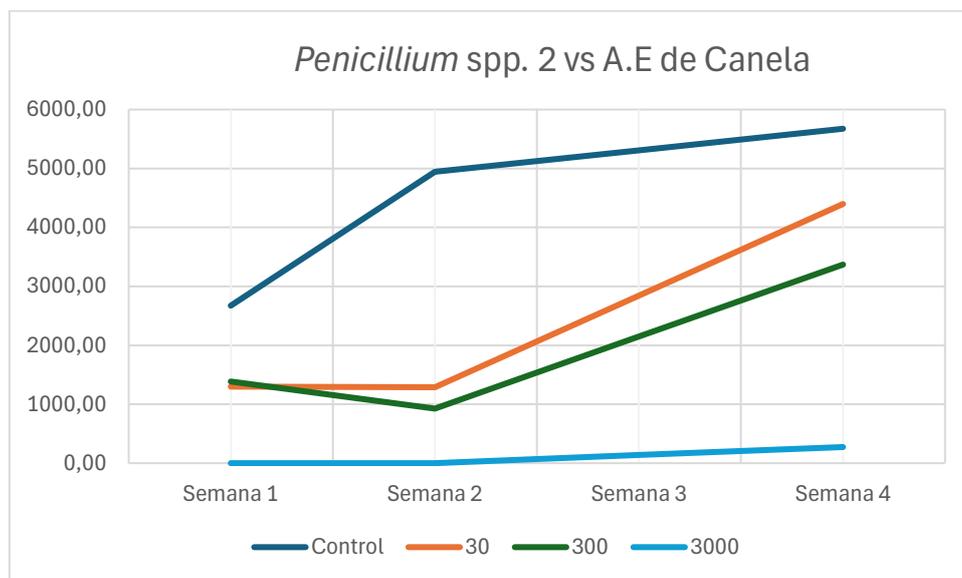
A diferencia del otro estudio *in vitro* (Apartado 4.3), en este solo hemos usado de hongo la nueva cepa de *Penicillium* spp. que ya venía presente en las naranjas. En cuanto al proceso ha sido igual que en el otro caso, solo que, a diferencia del primer estudio, se ha optado por utilizar únicamente el aceite de canela a sus 3 dosis (30, 300 y 3000 ppm) y todos los demás

aceites a una dosis única, 3000 ppm, al ser la que mejor resultados nos ha ofrecido a lo largo del trabajo para los distintos hongos.

Viendo esto vamos a comparar estadísticamente por un lado el aceite de canela (a sus 3 dosis) y por otro todos los demás aceites (incluyendo el de canela como comparación) a 3000 ppm. Cada línea de los gráficos (que vendrán medidos en mm<sup>2</sup>, como el primer estudio) representará una dosis o aceite, dependiendo del caso.

### 5.3.1. Segunda cepa de *Penicillium* spp. y A.E. de Canela

Como podemos ver en este caso (Figura 36), el aceite de canela se comporta de manera diferente según su dosis. Las dosis de 30 y 300 ppm se comportan de manera idéntica, aun manteniéndose ligeramente por debajo la dosis mayor, las 2 primeras semanas la inhibición es bastante buena, aunque a partir de ahí surge un repunte donde el aceite deja de actuar de manera tan eficaz y el crecimiento del hongo se acerca a valores más próximos a los del control.

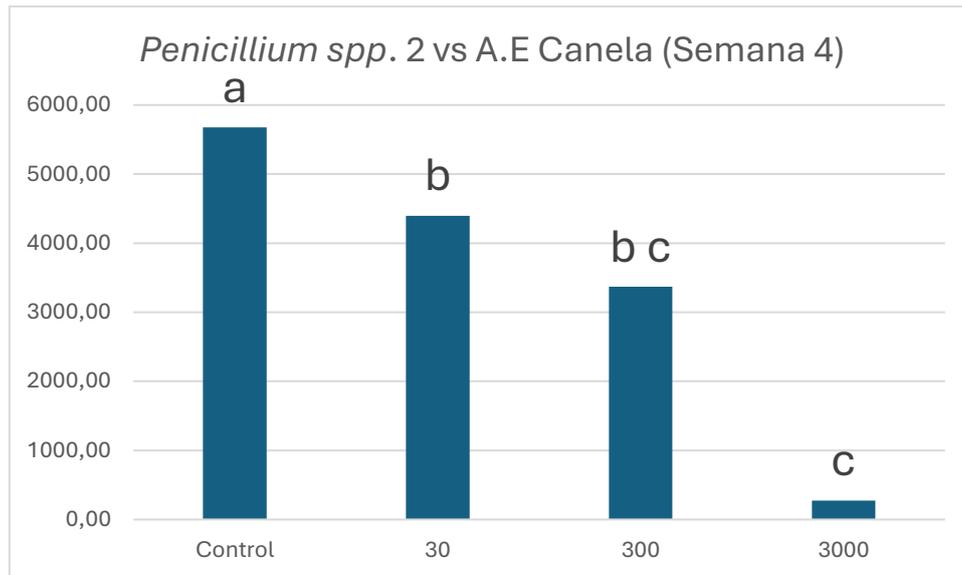


**Figura 36:** Evolución, en semanas, del crecimiento del segundo hongo del estudio del género *Penicillium* spp. ante el A.E. de canela en la placa PDA en diferentes tratamientos (control, 30 ppm, 300 ppm y 3000 ppm)

En cambio, la dosis de 3000 ppm funciona de manera eficaz impidiendo el crecimiento del hongo durante las 4 semanas que duró este segundo estudio, al igual que pasó en el primero

con la otra variedad de *Penicillium* spp. (Figura 29) y manteniendo los valores de crecimiento por debajo del valor de 1500 mm<sup>2</sup> en todo momento (inhibición importante).

Tras hacer el test de Kruskal-Wallis (Kruskal-Wallis test:  $H(3, N=12) = 8,846975$ ) el resultado obtenido es  $p = 0,0314$ , un dato que nos indica que existen diferencias estadísticamente significativas en nuestro experimento.



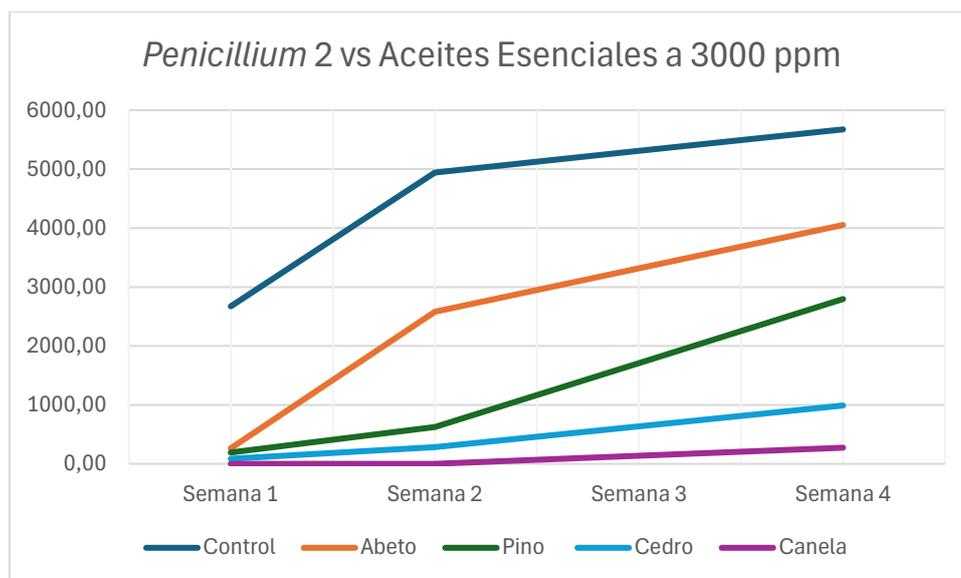
**Figura 37:** Crecimiento del segundo hongo del género *Penicillium* spp. con A.E. de canela a las 4 semanas del comienzo del segundo estudio. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney  $p > 0,05$ ).

En el anterior gráfico (Figura 37) podemos observar los resultados del test U de Mann-Whitney, donde observamos que todas las dosis presentan diferencias estadísticamente significativas con el control. Vemos que las dosis de 30 y 3000 ppm también presentan diferencias entre sí, encontrándose la dosis de 300 ppm en un intermedio entre ellos (no presenta diferencias estadísticas con ninguna de las otras dos dosis).

Estas diferencias indican que el aceite esencial de canela sí que presenta una inhibición importante para esta cepa de *Penicillium* spp. (más a dosis altas, como vemos en las Figuras 36, 37) por debajo de 1500 mm<sup>2</sup>.

### 5.3.2. Segunda cepa de *Penicillium* spp. y los demás aceites

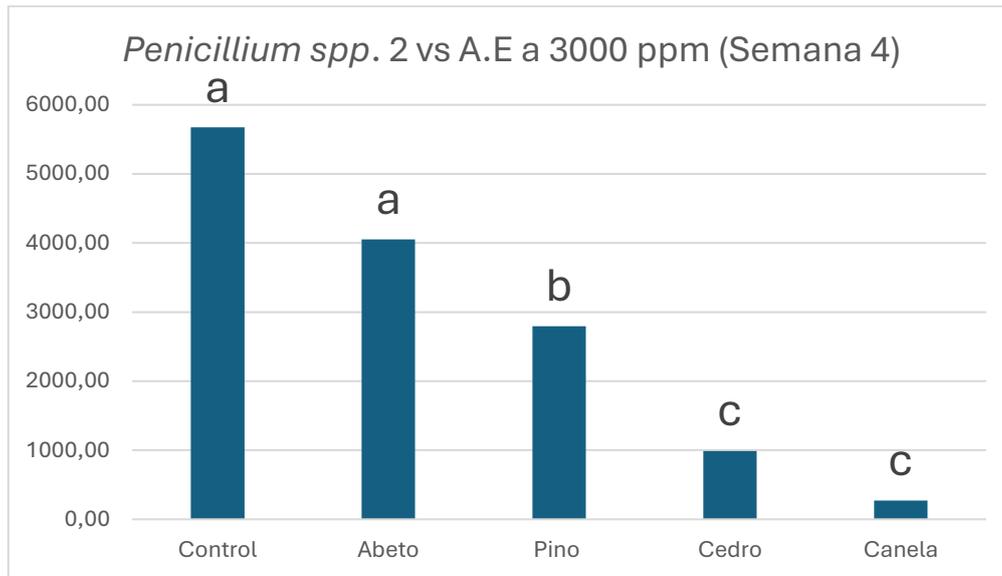
En este caso (Figura 38), cada aceite se comporta de manera distinta. La línea del aceite de abeto sigue una tendencia muy parecida al control, aunque con una diferencia importante debido a la inhibición que sugiere su uso, aun así, si lo comparamos con los demás aceites es el que peor funciona para combatir el hongo.



**Figura 38:** Evolución, en semanas, del crecimiento del segundo hongo del estudio del género *Penicillium* spp. ante los A.E. de abeto, canela, cedro y pino en las placas PDA a 3000 ppm.

El cedro y la canela son los que mejor funcionan, inhibiendo casi completamente el crecimiento del hongo; vemos que, aun separándose con el paso de las semanas los datos de los dos aceites, son bastante eficaces. Por último, el aceite de pino se encuentra en un punto intermedio entre el aceite de abeto y los de canela y cedro, durante las dos primeras semanas más cercano a los resultados del cedro y la canela (más inhibidor) y durante la tercera y cuarta a los resultados del aceite de abeto (menos inhibidor).

El test de Kruskal-Wallis (Kruskal-Wallis test:  $H(4, N= 15) = 12,77596$ ) nos da el resultado de  $p = 0,0124$ , indicando que en el caso de los demás aceites también existen diferencias estadísticas significativas.



**Figura 39:** Crecimiento del segundo hongo del género *Penicillium* spp. con todos los aceites esenciales del estudio a la dosis de 3000 ppm a las 4 semanas del comienzo del segundo estudio. Las barras que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney  $p > 0,05$ ).

Como vemos en la Figura 39, tras realizar el test U de Mann-Whitney, vemos que hay aceites que presentan diferencias significativas con el control y otros que no. Comenzando con el aceite de abeto, no presenta diferencias estadísticas con el control aun teniendo unos datos de crecimiento del hongo más bajos que él por lo que no podemos afirmar que haga una función inhibitoria satisfactoria. Después, en segundo plano, se encuentra el aceite de pino, el cual presenta diferencias con el control (y el aceite de abeto) pero la capacidad de inhibición es escasa, disminuyendo el crecimiento del hongo de manera leve. Por último, los aceites de cedro y canela (el de canela ya fue estudiado en el apartado 5.3.1) presentan diferencias estadísticamente significativas con el control, pero además la capacidad de inhibición que presentan es muy (diferencia importante) satisfactoria pues no dejan crecer al hongo en las placas de manera importante (no superan los 1000 mm<sup>2</sup> de media ninguno de los dos aceites).

Solo dos aceites a dosis de 3000 ppm presentan diferencias importantes con el control, estos son los aceites de cedro y canela, los dos aceites que mejor han funcionado durante todo el estudio.

### 5.3.3. Discusión sobre los aceites esenciales usados

Analizando los resultados de los dos estudios *in vitro*, vemos que los dos aceites que mejor función inhibitoria presentan en general para todos los hongos son el de cedro y el de canela, aunque para algunos hongos como el *Cladosporium* spp. también puede funcionar el de abeto.

Estos aceites esenciales han sido probados para otros aspectos como por ejemplo hongos de la madera de la vid (*Phaemoniella chlamydospora* y *Neofusicoccum parvum*) (Mirasierra, 2021) o control de malas hierbas como *Lolium multiflorum* Lam., *Sinapis arvensis* L. o *Nicotiana tabacum* L. entre otros (Cuadrado, 2022). Pero vamos a verlos más individualmente:

El aceite de abeto ha sido probado con pocos organismos aparte de este trabajo y los anteriormente comentados. Se ha probado con algunos patógenos humanos como el hongo *Candida albicans* (Ayupova, 2014) y con bacterias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (Truchan, 2019) entre otros.

El aceite esencial de pino se ha probado en otros estudios, en algunos funcionando bien como fungicida contra especies como *Cryptococcus neoformans* (Scalas, 2018) o insecticida para la mosca blanca (Mitić, 2018) y en otros sin acción alguna contra especies de malas hierbas y cultivos (Ibañez, 2019) u hongos, como por ejemplo los hongos de la madera de la vid (Mirasierra, 2021).

El aceite esencial de cedro (*Cedrus deodara*) se ha probado contra diferentes hongos como *Candida albicans* (Parveen, 2010) o *Curvularia lunata* (Kumar, 2020), en diferentes organismos parásitos como *Leishmania donovani* (Narayan, 2017) o como herbicida como vimos anteriormente (Cuadrado, 2022).

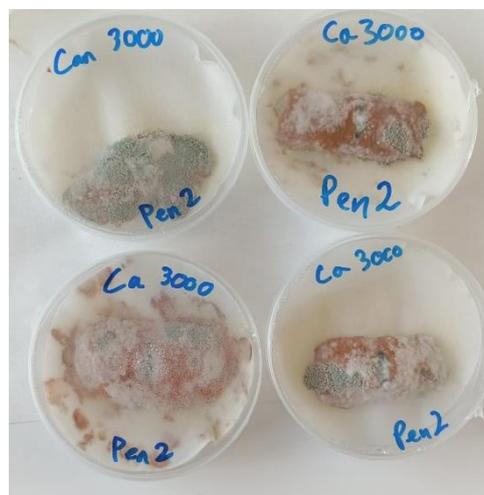
El aceite de canela es el que mejor funcionó en nuestro estudio, pero no solamente en este, hubo en otros en los que fue sometido a inhibir el crecimiento de hongos como *Botrytis cinerea* (Valdeolmillos, 2018) o *Alternaria* spp. (Sánchez, 2016) con buenos resultados. También se ha demostrado que es un buen antimicrobiano y acaricida, consiguiendo el control de especies parásitas como las pulgas (Nwanade, 2021) o de individuos de la familia Bruchinae (Jumbo, 2014).

#### 5.4. Resultados del Segundo estudio *in vivo*

A diferencia del primer estudio *in vivo* realizado (Apartado 4.4), en este hemos realizado la prueba en una porción bastante menor de la naranja que incluya pulpa y corteza. Este estudio se realizó con dos objetivos: probar la reacción de la nueva cepa de *Penicillium* spp. y conseguir un nuevo estudio *in vivo* sin contaminaciones que nos pueda proporcionar resultados concluyentes con los que trabajar. En este estudio solo se trabajó con el aceite de canela a una dosis de 3000 ppm, ya que, como hemos visto anteriormente, es el que mejores resultados a ofrecido para todos los hongos en los ensayos *in vitro* y además en el primer ensayo *in vivo* la dosis de 1600 ppm no parecía suficiente, por lo que usamos una dosis mayor en este ensayo.

El resultado, al igual que en el primer estudio (Apartado 5.2) ha sido infructuoso, aun habiendo cultivado todos los hongos de los que disponíamos, además de los pertenecientes al género *Penicillium* spp. Esto ha sido debido a que en la gran mayoría de placas no han aparecido el hongo correspondiente y este ha sido acaparado por la segunda cepa de *Penicillium* spp. que creemos que contenían las naranjas previamente. Además, aquellas en las que el hongo correspondiente ha crecido de manera exitosa y sin contaminaciones (la mayoría han sido trozos de naranja con cualquiera de las dos cepas de *Penicillium* spp.) el aceite esencial de canela no ha hecho efecto, cubriéndose así completamente los trozos de naranja a lo largo de la primera semana, sin tener necesidad de seguir midiendo la expansión del hongo.

Por lo expuesto anteriormente catalogamos este estudio como ineficaz y no profundizaremos sobre sus resultados.



**Figura 40:** Placas de PDA + A.E. de canela a 3000 ppm con una porción de naranja (*Citrus x sinensis*) contaminadas completamente por la segunda cepa de *Penicillium* spp. del estudio.

---

## 5.5. Estudio económico

Una vez visto los resultados de los distintos estudios debemos responder a uno de los objetivos (apartado 3) por los que se realizó este trabajo, ¿puede suponer alguno de los aceites esenciales una alternativa rentable a los fungicidas químicos actuales? Tras ver los resultados de los cuatro estudios (*in vitro* e *in vivo*) vemos que los aceites con mayor poder inhibidor son el de cedro y el de canela. Pero aun así hay varios problemas.

Comenzando con el aceite de cedro, aun presentando una gran inhibición *in vitro* ante la mayoría de hongos hay alguno frente el que su acción es menor, permitiendo el crecimiento del hongo hasta niveles no recomendables, estos hongos son *Aspergillus* spp. y FOP SP1 (Figuras 8 y 24, respectivamente). Otro problema es que al existir una alternativa mejor para el control de dichos hongos como es el aceite de canela no hay necesidad de usar el aceite esencial de cedro, puesto que el precio de ambos en el mercado es bastante parecido.

En cuanto al aceite de canela, es el aceite que mayor inhibición ha presentado frente al crecimiento de todos los demás hongos. El problema es que, al igual que los demás aceites esenciales, no ha podido frenar el crecimiento en los estudios *in vivo*, es decir que no podemos afirmar que pueda ser usado en el ámbito industrial ni a la misma dosis que otros aceites esenciales usados en otras frutas u hongos (1600 ppm como el de clavo para *Neofabrea* spp. en manzanas) ni a dosis más altas (3000 ppm) al no poder frenar los distintos patógenos en las naranjas con el mismo modo de acción en el que se usan los productos químicos actuales (ducha o baño de las naranjas con el producto mediante “sistema drencher”). Hemos cambiado el aceite esencial, la fruta a proteger y los patógenos utilizados lo que resulta innovador. Quizás aplicándolo en otras frutas o patógenos podría ser viable con este procedimiento o cambiando el modo de aplicación. Sin embargo, el cambio en el protocolo de aplicación del aceite supondría una gran inversión para las empresas al tener que cambiar la maquinaria en las líneas de procesado que podría no llegar a ser económicamente viable.

Por todo esto no desarrollamos un estudio económico detallado, al no tener resultados concluyentes en los estudios *in vivo*, aun obteniendo buenos resultados en los estudios *in vitro* (los cuales pueden suponer un comienzo para considerar los aceites esenciales como alternativas).

## 5.6. Discusiones finales

Tras presentar los resultados de los cuatro estudios vamos a analizarlos desde un punto de vista agronómico, en el sentido de que no toda disminución nos interesa, sino que lo buscado son disminuciones importantes que nos permitan reducir o minimizar la pérdida generada por estos hongos (obviamente nos basaremos en los estudios *in vitro*, pues no podemos sacar resultados positivos de los estudios *in vivo*) en nuestro producto (naranjas).

Para ello vamos a resumir la acción de cada aceite en cada hongo en una tabla (Tabla 5, 6, 7 y 8) en la que incluiremos la primera dosis a la que existen diferencias estadísticamente significativas (test de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney) y la dosis a partir de la cual ya se encuentra una reducción importante del crecimiento del hongo, un dato que supondremos como un dato aceptable desde el punto de vista del empresario, almacenista o agricultor. Para diferenciar lo que es una “reducción importante” y lo que no hemos fijado ese límite cuando el hongo crezca por encima o por debajo de 1500 mm<sup>2</sup> en la placa Petri a las cuatro semanas de acción del hongo:

<b>A.E. de Abeto</b>	<b>Diferencia estadística</b>	<b>Diferencia Importante (&gt;1500 mm<sup>2</sup>)</b>
<i>Aspergillus spp.</i>	3000	
<i>Cladosporium spp.</i>	30	30
FOP SP1	30	
<i>Penicillium spp.</i>	30	30
<i>Penicillium spp.</i> . 2		

**Tabla 5:** Dosis (en ppm) del aceite de abeto a partir de las cuales se han encontrado diferencias estadísticas significativas y diferencias importantes (superficie del hongo mayor o menor que 1500 mm<sup>2</sup>) en el crecimiento de los diferentes hongos del estudio.

Como podemos ver en la Tabla 5, el aceite esencial de abeto es muy dispar a la hora de controlar los distintos hongos, algunos hongos como *Cladosporium spp.* o la primera cepa de *Penicillium spp.* los controla sin problema a dosis bajas como 30 ppm y otros como *Fusarium*

*oxysporum*, *Aspergillus* spp. o la segunda cepa de *Penicillium* spp. (la que venía en las naranjas) no los llega a controlar.

<b>A.E. de Canela</b>	<b>Diferencia estadística</b>	<b>Diferencia Importante (&gt;1500 mm<sup>2</sup>)</b>
<i>Aspergillus</i> spp.	3000	3000
<i>Cladosporium</i> spp .	30	30
FOP SP1	30	3000
<i>Penicillium</i> spp.	30	3000
<i>Penicillium</i> spp . 2	30	3000

**Tabla 6:** Dosis (en ppm) del aceite de canela a partir de las cuales se han encontrado diferencias estadísticas significativas y diferencias importantes (superficie del hongo mayor o menor que 1500 mm<sup>2</sup>) en el crecimiento de los diferentes hongos del estudio.

El aceite de canela (Tabla 6), a diferencia del anterior, sí que consigue controlar los 5 hongos del estudio a un nivel aceptable desde el punto de vista agronómico, aunque en la mayoría de hongos las diferencias estadísticas comienzan en la dosis de 30 ppm los resultados aceptables se producen con la dosis de 3000 ppm, por lo que sería la dosis más recomendable para su control. Aun así, estos resultados no han sido reflejados más tarde en los estudios *in vivo*.

Desde el punto de vista agronómico, este aceite es el que más interés genera puesto que es el único que funciona con todos los hongos probados pudiendo ser una alternativa económicamente muy rentable para las industrias y agricultores por su alto espectro de actuación y su precio en el mercado (si se consiguiera aplicar eficazmente *in vivo*).

<b>A.E. de Cedro</b>	<b>Diferencia estadística</b>	<b>Diferencia Importante (&gt;1500 mm<sup>2</sup>)</b>
<i>Aspergillus spp.</i>	300	3000
<i>Cladosporium spp.</i>	30	30
FOP SP1	30	
<i>Penicillium spp.</i>	30	30
<i>Penicillium spp.</i> 2	3000	3000

**Tabla 7:** Dosis (en ppm) del aceite de cedro a partir de las cuales se han encontrado diferencias estadísticas significativas y diferencias importantes (superficie del hongo mayor o menor que 1500 mm<sup>2</sup>) en el crecimiento de los diferentes hongos del estudio.

El aceite de cedro es el segundo aceite con mejor efecto inhibidor (Tabla 7) después del de canela. La mayoría de los hongos presentan diferencias estadísticas a partir de 30 ppm (la segunda cepa de *Penicillium spp.* se probó solo con la dosis de 3000 ppm). Aun así, solo 2 hongos presentan importantes disminuciones del crecimiento a 30 ppm (*Cladosporium spp.* y *Penicillium spp.*), siendo la dosis de 3000 ppm la que nos da la mayor cantidad de datos satisfactorios por debajo del límite establecido. Aun así, los resultados para *Fusarium oxysporum* no resultan satisfactorios para ninguna dosis.

<b>A.E. de Pino</b>	<b>Diferencia estadística</b>	<b>Diferencia Importante (&gt;1500 mm<sup>2</sup>)</b>
<i>Aspergillus spp.</i>		
<i>Cladosporium spp.</i>	30	30
FOP SP1	30	
<i>Penicillium spp.</i>	30	
<i>Penicillium spp.</i> 2	3000	

**Tabla 8:** Dosis (en ppm) del aceite de pino a partir de las cuales se han encontrado diferencias estadísticas significativas y diferencias importantes (superficie del hongo mayor o menor que 1500 mm<sup>2</sup>) en el crecimiento de los diferentes hongos del estudio.

Por último, el aceite esencial de pino (Tabla 8) es el que peores resultados nos ofrece, el único hongo al que inhibe de manera importante es *Cladosporium* spp. Los demás sí que ofrece diferencias estadísticas con sus respectivos controles (menos *Aspergillus* spp.) pero no alcanza los valores buscados.

## 5.7. Conclusiones

Las conclusiones que sacamos de este trabajo son:

1. En los ensayos *in vitro* todos los aceites han demostrado inhibición estadísticamente significativas frente a la mayoría de los hongos a diferentes dosis (en algunos casos desde 30 ppm). La excepción son el aceite de abeto con el segundo *Penicillium* spp. y el aceite de pino con *Aspergillus* spp. que no han podido ser inhibido a ninguna dosis.
2. En la evaluación de la inhibición importante (crecimiento en placa < 1500 mm<sup>2</sup>) solo el aceite esencial de canela funciona en los cinco patógenos probados.
3. El efecto inhibitorio de los aceites sobre las naranjas no ha podido mostrarse en el primer estudio *in vivo* (1600 ppm) por la aparición de contaminaciones, no pudiendo verificar su poder inhibitorio contra los patógenos probados en las naranjas. En el segundo estudio *in vivo* con dosis de 3000 ppm tampoco se consiguió la inhibición de los patógenos por la aparición de la contaminación de la segunda cepa de *Penicillium* spp, que probablemente venía con las naranjas.
4. Los aceites de canela y cedro presentan resultados positivos *in vitro* con todos los hongos, inhibiéndolos de manera estadísticamente significativa, aunque luego en los ensayos *in vivo* con el método del baño no sea posible establecer datos ni resultados sobre su capacidad inhibidora en naranjas.
5. La valoración de los aceites esenciales probados para comprobar si pueden ser una alternativa económicamente viable no es posible realizarla a la vista de nuestros resultados usando las condiciones estándar de otros aceites esenciales que se usan en post-cosecha en otras frutas frente a otros patógenos.

## **6. BIBLIOGRAFÍA**

- Alizadeh Behbahani, B., Falah, F., Lavi Arab, F., Vasiee, M., & Tabatabaee Yazdi, F. (2020).** Chemical composition and antioxidant, antimicrobial, and antiproliferative activities of *Cinnamomum zeylanicum* bark essential oil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020(1), 5190603.
- Allizond, V., Cavallo, L., Roana, J., Mandras, N., Cuffini, A. M., Tullio, V., & Banche, G. (2023).** In Vitro Antifungal Activity of Selected Essential Oils against Drug-Resistant Clinical *Aspergillus* spp. Strains. *Molecules*, 28(21), 7259.
- 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.
- Arribas, Ana M<sup>a</sup>. (2018).** Evaluación de aceites esenciales de citronela, melisa y sándalo como agentes de biocontrol de hongos necrotrofos *in vitro* e *in vivo*. Tesis de Máster. Universidad de Valladolid
- Ayupova, R. B., Sakipova, Z. B., Shvaydlenka, E., Neyezhlebova, M., Ulrikh, R., Dilbarkhanov, R. D., ... & Zhemlichka, M. (2014).** Chemical composition and antifungal activity of essential oils obtained from *Abies sibirica* L., growing in the Republic of Kazakhstan. *Международный журнал экспериментального образования*, (2), 69-71.
- Bakari M, Yusuf H O. (2018).** Utilización de aglutinantes disponibles localmente para la densificación de la cáscara de arroz para la producción de biocombustibles., *Banat's Journal of Biotechnology* 9(19), 47-55.
- Bensch, K., Groenewald, J. Z., Meijer, M., Dijksterhuis, J., Jurjević, Ž., Andersen, B., ... Samson, R. A. (2018).** *Cladosporium* species in indoor environments. *Studies in Mycology*, 89, 177–301.
- Biere, A., Marak, H. B., & Van Damme, J. M. M. (2004).** Plant chemical defense against herbivores and pathogens: ¿Generalized defense or trade-offs? *Oecologia*, 140(3), 430–441. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00442-004-1603-6>

- Butnariu, M., Sarac, I. (2018).** Essential Oils from Plants. *Journal of Biotechnology and Biomedical Science*, 1(4), 35-43. Disponible en: [10.14302/issn.2576-6694.jbbs-18-2489](https://doi.org/10.14302/issn.2576-6694.jbbs-18-2489)
- CAS Common Chemistry (2015).** Pine oil. CAS, a division of the American Chemical Society, n.d. Disponible en: [https://commonchemistry.cas.org/detail?cas\\_rn=8002-09-3](https://commonchemistry.cas.org/detail?cas_rn=8002-09-3)
- Costa, J.H.; Bazioli, J.M.; de Moraes Pontes, J.G. (2019)** Mecanismos de infección por *Penicillium digitatum* en cítricos: ¿qué sabemos hasta ahora? *Biol fúngico*. 123, 584-593
- Cuadrado S. (2022).** Evaluación de aceites esenciales de cedro, abeto y pino como agentes de control biológico de malas hierbas. Tesis de Máster. Universidad de Valladolid
- de Andalucía, J (2024).** Alto riesgo de *Alternaria* en cítricos. Junta de Andalucía. Disponible en: <https://www.juntadeandalucia.es/agriculturapescaaguaydesarrollorural/raif/alto-riesgo-de-alternaria-en-citricos/>
- escAliment. (2022).** El problema del desperdicio de frutas y hortalizas y cómo podemos solucionarlo – Proyectos de divulgación del instituto agroalimentario de Aragón- ia2. Disponible en: <https://alimentandolaciencia.esciencia.es/2022/01/10/el-problema-del-desperdicio-de-frutas-y-hortalizas-y-como-podemos-solucionarlo/>
- FAO (2024).** Repercusiones de los desastres en la agricultura y la seguridad alimentaria 2023. En *FAO eBooks*: <https://doi.org/10.4060/cc7900es>
- Filténborg, O, J. C. Frisvad, U. Thrane, (1996).** Moulds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology* 33: 85–102.
- Gemeda N, Woldeamanuel Y, Asrat D, Debella A. (2014).** Effect of essential oils on *Aspergillus* spore germination, growth and mycotoxin production: a potential source of botanical food preservative. *Asian Pac J Trop Biomed*.

- Ibáñez, M. D., & Blázquez, M. A. (2019).** Phytotoxic effects of commercial Eucalyptus citriodora, Lavandula angustifolia, and Pinus sylvestris essential oils on weeds, crops, and invasive species. *Molecules*, 24(15), 2847.
- INSST. (2021).** *Aspergillus spp.* Portal INSST. Disponible en: <https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/hongos/aspergillus-spp>
- INSST. (2022a).** *Alternaria spp.* Portal INSST. Disponible en: <https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/hongos/alternaria-spp>
- INSST. (2022b).** *Cladosporium spp.* Portal INSST. Disponible en: <https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/hongos/cladosporium-spp>
- INSST. (2022c).** *Penicillium spp.* Portal INSST. Disponible en: <https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/hongos/penicillium-spp>
- Intagri. (2023).** El moho verde de los cítricos (*Penicillium digitatum*). Intagri, Disponible en: <https://www.intagri.com/articulos/frutales/el-moho-verde-de-los-citricos>
- Johnson, H. (1987).** El bosque. Fauna, flora y recursos económicos del bosque mundial. Blume, Barcelona, ISBN 84-7031-589-X
- Jumbo, L. O. V., Faroni, L. R., Oliveira, E. E., Pimentel, M. A., & Silva, G. N. (2014).** Potential use of clove and cinnamon essential oils to control the bean weevil, *Acanthoscelides obtectus* Say, in small storage units. *Industrial Crops and Products*, 56, 27-34.
- Kumar, A., Suravajhala, R., & Bhagat, M. (2020).** Bioactive potential of *Cedrus deodara* (Roxb.) Loud essential oil (bark) against *Curvularia lunata* and molecular docking studies. *SN Applied Sciences*, 2, 1-9.
- Kumar, S., Kumar, A., & Kumar, R. (2019).** Himalayan (Himachal region) cedar wood (*Cedrus deodara*: Pinaceae) essential oil, its processing, ingredients and uses: A review. *J. Pharmacogn. Phytochem*, 8(1), 2228-38.

- Maritza D., RM, y Ruales, J. (2024).** Aceites esenciales como alternativa antifúngica para el control de *Cladosporium* spp., *Lasiodiplodia* spp., *Colletotrichum* spp., *Fusarium* spp. y *Aspergillus* spp. aislados de *Musa paradisiaca*.
- Martínez, H., Hernández, S., Reyes, C., & Vázquez, G. (2013).** El Género *Aspergillus* y sus Micotoxinas en Maíz en México: Problemática y Perspectivas. *Revista mexicana de fitopatología*, 31(2), 126-146.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2023).** Cifras del sector de Frutas y Hortalizas. Información Sectorial. Gobierno de España. Disponible en: [https://www.mapa.gob.es/va/agricultura/temas/producciones-agricolas/cifrasdelsectordefrutasyhortalizasactualizadoa2022\\_tcm39-671924.pdf](https://www.mapa.gob.es/va/agricultura/temas/producciones-agricolas/cifrasdelsectordefrutasyhortalizasactualizadoa2022_tcm39-671924.pdf)
- Mirasierra Velardo, R. (2021).** Control biológico *in vitro* de hongos patógenos de madera de vid mediante el uso de aceites esenciales. Tesis de Grado. Universidad de Valladolid
- 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.
- Mitić, Z. S., Jovanović, B., Jovanović, S. Č., Mihajilov-Krstev, T., Stojanović-Radić, Z. Z., Cvetković, V. J., ... & Stojanović, G. S. (2018).** Comparative study of the essential oils of four *Pinus* species: Chemical composition, antimicrobial and insect larvicidal activity. *Industrial Crops and Products*, 111, 55-62.
- Mulkay Vitón, M. (2021).** Pérdidas postcosecha de frutas. Instituto de Investigaciones de Fruticultura Tropical
- Narayan, S., Thakur, C. P., Bahadur, S., Thakur, M., Pandey, S. N., Thakur, A. K., ... & Mukherjee, P. K. (2017).** *Cedrus deodara*: *In vitro*: antileishmanial efficacy & immunomodulatory activity. *Indian Journal of Medical Research*, 146(6), 780-787.
- Novoa, M. (2017).** Control biológico de patógenos vegetales. Proyecto de Investigación. IES Trinidad Arroyo – E.T.S.II.AA de Palencia

- Nwanade, C. F., Wang, M., Wang, T., Zhang, X., Zhai, Y., Zhang, S., ... Liu, J. (2021).** The acaricidal activity of cinnamon essential oil: current knowledge and future perspectives. *International Journal of Acarology*, 47(5), 446–450. <https://doi.org/10.1080/01647954.2021.1936632>
- Palou, L. (2007).** Evaluación de alternativas para el tratamiento antifúngico en poscosecha de cítricos de Producción Integrada. *Horticultura*, 200, 82-93. Disponible en: [Evaluación de alternativas para el tratamiento antifúngico en poscosecha](#)
- Parveen, R., Azmi, M. A., Tariq, R. M., Mahmood, S. M., Hijazi, M. A. Z. H. A. R., Mahmud, S. H. A. U. K. A. T., & Naqvi, S. N. H. (2010).** Determination of antifungal activity of Cedrus deodara root oil and its compounds against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Pak. J. Bot.*, 42(5), 3645-3649.
- Polyakov, N. A., Dubinskaya, V. A., Efremov, A. A., & Efremov, E. A. (2014).** Biological activity of *Abies sibirica* essential oil and its major constituents for several enzymes *in vitro*. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 48, 456-460.
- Real Decreto 1311/2012, de 14 de septiembre,** por el que se establece el marco de actuación para conseguir un uso sostenible de los productos fitosanitarios. Boletín Oficial del Estado, 223, de 15/09/2012. <https://www.boe.es/eli/es/rd/2012/09/14/1311/con>
- Sánchez D. (2016).** Evaluación *in vitro* e *in vivo* de control biológico de hongos patógenos. Proyecto de Investigación. IES Trinidad Arroyo – E.T.S.II.AA de Palencia
- Scalas, D., Mandras, N., Roana, J., Tardugno, R., Cuffini, A. M., Ghisetti, V., ... & Tullio, V. (2018).** Use of *Pinus sylvestris* L. (Pinaceae), *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae), and *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae) essential oils and their main components to enhance itraconazole activity against azole susceptible/not-susceptible *Cryptococcus neoformans* strains. *BMC complementary and alternative medicine*, 18, 1-13.
- Syngenta NL. (2025).** *Fusarium oxysporum*, Fusariosis, Syngenta. Disponible en: <https://www.syngenta.nl/espana/farmore/diseases/fusarium/fusarium-oxysporum>
- Truchan, M., Tkachenko, H., Buyun, L., Kurhaluk, N., Góralczyk, A., Tomin, V., & Osadowski, Z. (2019).** Antimicrobial Activities of Three Commercial Essential Oils

Derived from Plants Belonging to Family Pinaceae. *Agrobiodiversity for Improving Nutrition, Health and Life Quality*, (3).

**Valdeolmillos, C. (2018).** Control biológico de patógenos mediante el uso de aceites esenciales. IES Trinidad Arroyo – E.T.S.II. AA de Palencia

**Van de Vel, E., Sampers, I., & Raes, K. (2019).** A review on influencing factors on the minimum inhibitory concentration of essential oils. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 59, Issue 3, pp. 357–378). Taylor and Francis Inc. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1371112>

**Villajos, S. O (2024).** Hongos Fitopatógenos. Universidad Politécnica de Madrid

**Ward, E. W. B. (1986).** Biochemical Mechanisms Involved in Resistance of Plants to Fungi. In *Biology and Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions* (pp. 107– 131). Springer Berlin Heidelberg. Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-82849-2\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-642-82849-2_9)

**Zeng, W. C., Zhang, Z., Gao, H., Jia, L. R., & He, Q. (2012).** Chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities of essential oil from pine needle (*Cedrus deodara*). *Journal of food science*, 77(7), C824-C829.

**Zerkaoui L, Benslimane M, Hamimed A. (2018).** Rendimiento de purificación del proceso de lagunaje, caso de la región de Beni Chougrane en Mascara (noroeste de Argelia)., *Banat's Journal of Biotechnology* 9(19), 20-28.

**Zulu, L., Gao, H., Zhu, Y. (2023).** Antifungal effects of seven plant essential oils against *Penicillium digitatum*. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 10, 82

