

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL



***Evaluación del potencial antifúngico de los aceites
esenciales comerciales de Canela (*Cinnamomum
verum* J. Presl) y Laurel (*Laurus nobilis* L.) En el
control de *Botryotinia fuckeliana* (de Bary)
Whetzel, *Epicoccum nigrum* Link, *Curvularia
hawaiiensis* Manamgoda, L. Cai, K.D. Hyde y
Aspergillus niger van Tieghem.***

TRABAJO FIN DE GRADO EN INGENIERÍA AGROALIMENTARIA Y DEL MEDIO RURAL

ALUMNO: DAVID LIBERAL AMEZQUETA

TUTORA: Dña. M. Pilar Santamarina Siurana

COTUTORA: Dña. Josefa Roselló Caselles

Curso Académico 2016/2017

VALENCIA, NOVIEMBRE DEL 2016

TÍTULO DEL TRABAJO: Evaluación del potencial antifúngico de los aceites esenciales comerciales de Canela (*Cinnamomum verum* J. Presl) y Laurel (*Laurus nobilis* L.) En el control de *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel, *Epicoccum nigrum* Link, *Curvularia hawaiiensis* Manamgoda, L. Cai, K.D. Hyde y *Aspergillus niger* van Tieghem..

RESUMEN: Los problemas causados por las enfermedades fúngicas provocan la disminución en cantidad y calidad de las cosechas y por tanto de los alimentos. Solo los hongos fitopatógenos provocan una pérdida de cerca del 20% de los principales alimentos y cultivos de mayor importancia económica. Debido a la prohibición de numerosas sustancias, así como al aumento en la resistencia a antifungicos, tratar estos problemas requiere de nuevas alternativas.

Las sustancias químicas producidas por diversas plantas aromáticas, como mecanismo de autoprotección, son fuentes potenciales que cumplen la misma función que los fungicidas, con la ventaja de que son respetuosos con el medio ambiente y que presentan baja toxicidad. En el presente trabajo se estudia la capacidad antifúngica “*in vitro*” de los aceites esenciales de Laurel (*Laurus nobilis*) y de Canela (*Cinnamomum verum*) frente a *Botrytis fuckeliana* y los hongos *Epicoccum nigrum*, *Curvularia hawaiiensis* y *Aspergillus niger*. Y el efecto del aceite de canela en la conservación de la uva de mesa, frente a *Botryotinia fuckeliana*.

Se ha estudiado la respuesta de los hongos, frente a ambos aceites esenciales. Primero, se realizaron distintos bioensayos a concentraciones de 300 µg/mL con los aceites esenciales comerciales de laurel y canela, en medio de cultivo PDA. Se midió y comparó con el testigo, el crecimiento radial diario (mm) hasta el día 14 y se calculó la velocidad de crecimiento. La adición de aceite de laurel al medio de cultivo, llegó a inhibir el crecimiento de los hongos alrededor del 15%. Mientras que con la adición de canela se llegó a inhibir porcentajes entre el 70-80% en las especies *Epicoccum* y *Curvularia*, además de modificar la forma de crecimiento, el color, la esporulación y la textura de las colonias.

Viendo los resultados satisfactorios obtenidos con el aceite esencial de canela a 300 µg/mL, se calculó la inhibición del crecimiento micelar (MGI) a 100, 200 y 300 µg/mL, con la intención de comprobar si se obtenían resultados similares a menor dosis. Con estos ensayos se pudo observar que a 200 µg/mL sí que se obtenía un resultado similar, provocando prácticamente el mismo efecto inhibitorio que a 300 µg/mL. Sin embargo, a una concentración de 100 µg/mL, la canela redujo drásticamente su potencial inhibitorio, perdiendo efectividad.

El aceite de canela demostró la efectividad en la conservación de la uva de mesa frente a *Botryotinia fuckeliana*. Redujo notablemente el porcentaje de uvas desprendidas y manchadas, y mejoro la turgencia y el aspecto visual de las uvas.

Como conclusión decir que, viendo el potencial inhibitorio del aceite esencial de canela, tratar cultivos y alimentos almacenados con este aceite esencial, podría ser una buena alternativa que sustituya el uso de productos químicos de síntesis. Siendo más respetuoso con el medio ambiente, más seguros para el consumidor y aumentando la vida post cosecha de los alimentos.

PALABRAS CLAVE: actividad antifúngica, canela, laurel, aceite esencial.

TITLE: Evaluation of the antifungal potential of commercial essential oils of (*Cinnamomum verum* J. Presl) and Laurel (*Laurus nobilis* L.) controlling *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel, *Epicoccum nigrum* Link, *Curvularia hawaiiensis*, Manamgoda, L. Cai, K.D. Hyde y *Aspergillus niger* van Tieghem.

ABSTRACT: The problems brought by fungal diseases in agriculture decrease the quantity and quality of the crop and so the food products. Close to 20% of the main crops and products of higher economic importance is lost only due to phytopathogenic fungi. After the prohibition of numerous substances and increasing the resistance to antifungal agents treating these problems requires new alternatives

Some aromatic plants produce chemicals as a mechanism of self-protection; these chemicals are potential sources that serve the same function as fungicides, with the advantage that they are environmentally friendly and have low toxicity. In this work we study the antifungal activity "in vitro" of essential oils Laurel (*Laurus nobilis*) and Cinnamon (*Cinnamomum verum*) against *Botrytis fuckeliana* and *Epicoccum nigrum*, *Curvularia hawaiiensis* and *Aspergillus niger*. And the effect of cinnamon oil on the conservation of table grapes versus *Botryotinia fuckeliana*.

We have studied the response of fungi, against both essential oils. First, were performed different bioassays with a concentration of 300 µg/mL with commercial essential oils of laurel and cinnamon on PDA growth media. It was measured and compared with the control, the daily radial growth (mm) until day 14, and the growth rate was calculated. Adding laurel oil into the growth media the inhibition growth were about 15%. While the addition of cinnamon reached inhibit percentages between 70-80% in *Epicoccum* and *Curvularia* species, it also modified the growth form, color, sporulation and texture of the colonies.

Observing the positive results obtained with the essential oil of cinnamon with 300 µg/mL, it was calculated the mycelial growth inhibition (MGI) with 100, 200 and 300 µg/mL, with the intention of checking similar results at lower doses. With these tests it was observed that with 200 µg/mL we obtained similar results, practically the same inhibitory effect than with 300 µg/mL. However, at a concentration of 100 µg/mL, cinnamon drastically reduced their inhibitory potential, losing effectivity.

The cinnamon oil demonstrated the effectiveness in the conservation of the table grape against *Botryotinia fuckeliana*. It reduced the percentage of grapes separated and stained, and improved the turgor and visual appearance of the grapes.

In conclusion, seeing the inhibitory potential of the essential oil of cinnamon, treating crops and stored food with this essential oil, could be a good alternative to replace the use of agrochemicals. Being more environmentally friendly, safer for the consumer and increasing food products self-life after harvesting.

KEYWORDS: antifungal activity, cinnamon, laurel, essential oil.

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a Pilar y Pepa, por mostrarme su pasión, por abrirme las puertas e incluirme en el marco de este proyecto. Muchas gracias por guiarme durante todo el trabajo, por vuestra paciencia, por vuestra confianza y por compartir vuestra experiencia y sabiduría conmigo.

A Lola y Silvina, gracias por ayudarme en la realización de este trabajo.

A mis compañeros de viaje Javi y Jaume, a todos mis amigos y a todos mis compañeros de clase, a toda mi familia, a mis hermanos y en especial a mis padres, por siempre estar ahí, mostrándome su incondicional apoyo y por ser un gran ejemplo a seguir.

ÍNDICE

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	
1.1.	LA CONTAMINACIÓN POR HONGOS EN LOS PRODUCTOS DE ORIGEN VEGETAL	1
1.2.	LOS ACEITES ESENCIALES Y SUS PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS Y ANTIFÚNGICAS	1
1.3.	EL LAUREL (<i>Laurus nobilis</i> L.). DESCRIPCIÓN Y ACEITE ESENCIAL	4
1.4.	LA CANELA (<i>Cinnamomum verum</i> J. Presl). DESCRIPCIÓN Y ACEITE ESENCIAL	6
1.5.	LOS HONGOS	8
1.5.1.	CARACTERÍSTICAS GENERALES	8
1.5.2.	<i>Botryotinia fuckeliana</i> (De Bary) Whetzel	9
1.5.3.	<i>Epicoccum nigrum</i> Link	10
1.5.4.	<i>Curvularia hawaiiensis</i> (Bugnic. Ex M.B. Ellis) Manamgoda, L. Cai & K.D. Hyde	12
1.5.5.	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh	13
2.	OBJETIVOS	16
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	
3.1.	CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES	17
3.1.1.	ACEITES ESENCIALES	17
3.1.2.	IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS MAYORITARIOS DE LOS ACEITES ESENCIALES POR CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC) Y CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC-MS)	17
3.1.3.	ANÁLISIS CUANTITATIVO	18
3.1.4.	ANÁLISIS CUALITATIVO	19
3.2.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS ACEITES ESENCIALES	19
3.2.1.	HONGOS	19
3.2.2.	ENSAYOS <i>in vitro</i> DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS ACEITES	19
3.3.	ENSAYOS <i>in vivo</i> EN UVA DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL ACEITE ESENCIAL DE CANELA FRENTE A <i>Botryotinia fuckeliana</i>	20
3.4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	21
4.	RESULTADOS	
4.1.	CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES	22
4.2.	RESULTADOS <i>in vitro</i> DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS ACEITES ESENCIALES	24
4.2.1.	ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS ACEITES ESENCIALES SOBRE EL CRECIMIENTO MICELIAR. VELOCIDAD DE CRECIMIENTO	24
4.2.2.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	32
4.2.3.	CÁLCULO DE LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO MICELIAR (MGI)	34

ÍNDICE

4.2.4. CÁLCULO DE LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO MICELIAR (MGI) DEL ACEITE ESENCIAL DE CANELA A DIFERENTES DOSIS	36
4.2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO MGI CANELA A TRES CONCENTRACIONES	37
4.3. ENSAYOS <i>in vivo</i> EN UVA DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL ACEITE ESENCIAL DE CANELA FRENTE A <i>Botryotinia fuckeliana</i>	38
5. CONCLUSIONES	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol del laurel (<i>Laurus nobilis</i> L.) (Figura tomada de Flora Ibérica).....	5
Figura 2. Detalle de rama, hojas, flores y frutos de la canela (Figura tomada de PURDUE UNIVERSITY, 2012)	7
Figura 3. <i>Botryotinia fuckeliana</i> en medio PDA.....	9
Figura 4. Conidioforos y conidios de <i>Botryotinia fuckeliana</i>	9
Figura 5. Conidios de <i>Epicoccum nigrum</i> en colonias jóvenes (fuente: discoverlife.org).....	11
Figura 6. <i>Epicoccum nigrum</i> en medio PDA.	11
Figura 7. <i>Curvularia hawaiiensis</i> en medio PDA.	13
Figura 8. Conidios de <i>Curvularia hawaiiensis</i>	13
Figura 9. <i>Aspergillus niger</i> en medio PDA.	14
Figura 10. <i>Aspergillus niger</i> en cebolla (S. K. Mohan, 2008).....	14
Figura 11. Conidios de <i>Aspergillus niger</i>	14
Figura 12. Diagrama de un cromatógrafo de gases.....	17
Figura 13. Gráfico del crecimiento radial (mm) de <i>Botryotinia fuckeliana</i> en los distintos medios ensayados: PDA, PDA-Laurel-300 µg/mL y PDA-Canela- 300 µg/mL.	24
Figura 14. Gráfico del crecimiento radial (mm) de <i>Epicoccum nigrum</i> en los distintos medios ensayados: PDA, PDA-Laurel-300 µg/mL y PDA-Canela-300 µg/mL.	26
Figura 15. Gráfico del crecimiento radial (mm) de <i>Curvularia hawaiiensis</i> en los distintos medios ensayados: PDA, PDA-Laurel-300 µg/mL y PDA-Canela-300 µg/mL.....	28
Figura 16. Gráfico del crecimiento radial (mm) de <i>Aspergillus niger</i> en los distintos medios ensayados: PDA, PDA-Laurel 300µg/mL y PDA-Canela-300 µg/mL.	30
Figura 17. Representación gráfica de los valores medios e intervalos LSD del efecto de los tratamientos Canela y Laurel sobre el crecimiento de <i>Botryotinia fuckeliana</i> , <i>Epicoccum nigrum</i> , <i>Curvularia hawaiiensis</i> y <i>Aspergillus niger</i>	33
Figura 18. Representación gráfica del MGI (%) de los aceites de canela y laurel a 300 µg/mL en las distintas especies ensayadas.....	35
Figura 19. Representación gráfica del MGI (%) en cada especie para distintas concentraciones de aceite esencial de canela 100-200-300 µg/mL.	36
Figura 20. Representación gráfica medias de Fisher LSD para canela a tres concentraciones...37	
Figura 21. Representación gráfica intervalos Tukey HSD para canela a tres concentraciones...37	
Figura 22. Uvas sin aceite (arriba) y uvas con aceite (debajo) en bandejas.....	39
Figura 23. Uvas colgadas con aceite (izquierda) y sin aceite (derecha).....	39
Figura 24. Uvas con aceite.	39
Figura 25. Uvas sin aceite.....	39
Figura 26. Racimo de uva sin aceite infectado de <i>Botryotinia fuckeliana</i>	39

ÍNDICE DE TABLAS

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química de los aceites de <i>Laurus nobilis</i> (Laurel) y <i>Cinnamomum verum</i> (Canela). Compuestos en orden de elución en columna HP-1.	23
Tabla 2. Crecimiento micelial de <i>Botryotinia fuckeliana</i> en los distintos medios ensayados a los 7 y a los 14 días de inoculación.	25
Tabla 3. Crecimiento micelial de <i>Epicoccum nigrum</i> en los distintos medios ensayados a los 7 y a los 14 días de inoculación.	27
Tabla 4. Crecimiento micelial de <i>Curvularia hawaiiensis</i> en los distintos medios ensayados a los 7 y a los 14 días de inoculación.	29
Tabla 5. Crecimiento micelial de <i>Aspergillus niger</i> en los distintos medios ensayados a los 7 y a los 14 días de inoculación.....	31
Tabla 6. Crecimiento medio (mm) de los distintos hongos ensayados para cada medio a los 7 días de incubación.	34
Tabla 7. Crecimiento medio (mm) de los distintos hongos ensayados en PDA-Canela a 100-200-300 µg/mL a los 7 días de incubación.	36
Tabla 8. Porcentajes de uvas manchadas, turgentes y desprendidas, con aceite y sin aceite.	38

1.INTRODUCCIÓN

1.1. LA CONTAMINACIÓN POR HONGOS EN LOS PRODUCTOS DE ORIGEN VEGETAL

Los hongos constituyen el grupo más importante de agentes fitopatógenos en razón del número y diversidad de enfermedades que causan (Agrios, 2005). La contaminación por hongos es un problema crónico en productos alimenticios, ya que tienen un efecto negativo sobre la calidad y la cantidad de alimentos producidos. Sólo los hongos fitopatógenos provocan una pérdida de cerca del 20% de los principales alimentos y cultivos de mayor importancia económica (Agrios, 2005; Roselló y col., 2015).

Aparentemente, no hay cultivo económicamente importante que no sea susceptible a uno o más hongos, y existen hongos patogénicamente especializados sobre una sola especie vegetal o sobre las especies de un solo género. A ello hay que unir su extrema versatilidad parasítica, indicada por la variedad de especies y órganos vegetales que pueden atacar, la diversidad de síntomas y enfermedades que pueden inducir (abolladuras, agallas, chancros, enanismos, enrollados, manchas,...), y las estrategias de hábitos ecológicos, formas de nutrición y especificidad de las interacciones que utilizan para ello. Por tanto, el desarrollo de estrategias para el control de los hongos en los vegetales ha constituido un continuo reto.

Salvo contadas excepciones, las estrategias para la protección de los rendimientos de los cultivos que han prevalecido hasta ahora se han basado en gran parte en la utilización de productos químicos de síntesis. Sin embargo, la preocupación social por la eventual repercusión que estos pueden tener sobre la salubridad alimentaria y la calidad y preservación del medio ambiente han generado cautelas, y producido legislación, para minimizar su utilización. La Comisión Europea recientemente realizó una revisión de cerca de 1.000 materias activas que existían en el mercado en 1993, de las que sólo el 26%, incluyendo 71 materias activas fungicidas y 16 agentes microbianos de biocontrol (pero ningún fumigante) han superado el proceso de armonización y están autorizadas para su uso fitosanitario.

Recientemente, se han aprobado diferentes medidas legislativas como la Directiva 2009/128/CE por la que se establece el marco de actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas (Díaz & Seguí, 2010).

En esta línea se están investigando nuevos métodos para el control de hongos patógenos de los cultivos y que ocasionan problemas en post-cosecha. Siguiendo las demandas de la población, es necesario estudiar soluciones más ecológicas. En los últimos años, se han realizado numerosos estudios que han documentado los efectos antifúngicos de los aceites esenciales de distintas plantas, estos aceites han conseguido reducir e inhibir el desarrollo de diferentes hongos (Corato y col., 2010; Marei y col., 2012; Santamarina y col., 2015).

1.2. LOS ACEITES ESENCIALES Y SUS PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS Y ANTIFÚNGICAS.

Los aceites esenciales han adquirido en las últimas décadas un renovado interés al tratarse de productos naturales con unas características físico-químicas de mucha utilidad y que respetan

INTRODUCCIÓN

el medio ambiente (Asbahani y col., 2015). Se utilizan en medicina por sus propiedades bactericidas, fungicidas y antiviricas. Numerosos estudios destacan que los aceites esenciales son efectivos incluso en bacterias resistentes a antibióticos (Burt, 2004; Mayaud y col., 2008). Debido a su compleja estructura química (100 compuestos terpénicos o más), los aceites esenciales tienen potencial para una amplia gama de usos en el control biológico y microbiano, como antibacterianos, antifúngicos, antivirales, insecticidas, herbicidas y control de plagas.

La industria alimentaria también está interesada en las propiedades de los AE, y les están dando usos como conservantes, en el desarrollo de nuevos envases y en la lucha contra patógenos responsables de las intoxicaciones alimentarias como *Listeria mono-cytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas putida* y *staphylococcus aureus* (Asbahani y col., 2015).

El uso de estos aceites parece prometedor en la agricultura orgánica, pero su actuación es muy rápida y poco persistente, debido a su fácil volatilización. Además, son degradados fácilmente por oxidación, calentamiento o exposición a luz, lo que representa un problema en su utilización (Dayan y col., 2009). Para corregir este defecto, se están desarrollando formulaciones alternativas que estabilicen el producto, como son la microencapsulación o nanoencapsulación, con el fin de aumentar la duración de su efecto, reducir su volatilización, simplificar su manejo, y ralentizar su degradación en el medio ambiente (Sancho, 2011; Armendáriz, 2016).

Los AE representan una fracción muy pequeña del total de la planta (menos del 5% del total de materia seca). Están compuestos principalmente por terpenoides, en especial monoterpenos (C10) y sesquiterpenos (C15), y otras sustancias tales como compuestos aromáticos, óxidos, alcoholes, éteres, ésteres, aldehídos y cetonas. Debido a su naturaleza hidrófoba y su densidad, generalmente menor que la del agua, son compuestos lipófilos, solubles en disolventes orgánicos e inmiscibles en agua (Asbahani y col., 2015; Sancho, 2011).

Los aceites esenciales son líquidos oleosos aromáticos, son compuestos naturales complejos, volátiles, sintetizados por plantas aromáticas. Se pueden obtener de forma fácil y económica a partir de material vegetal: brotes, flores, semillas, hojas, ramas, corteza, madera, frutos y raíces. Fundamentalmente de las partes no leñosas de la planta, especialmente de las hojas. Pueden ser obtenidos por presión, fermentación, o extracción, pero el método más común para la producción comercial es el de destilación por vapor. Sus componentes individuales pueden ser extraídos del material vegetal o fabricados sintéticamente.

En la naturaleza juegan un papel ecológico importante, ya que están envueltos en las interacciones entre las plantas, inhiben o estimulan la germinación de otras especies vegetales, de manera que actúan como aleloquímicos. También representan una defensa contra herbívoros, insectos, hongos y patógenos. Pueden atraer a los insectos polinizadores, o incluso ser secretados como respuesta a situaciones de estrés (Sancho, 2011).

Respecto a su composición existen numerosas publicaciones. Pueden contener más de 60 componentes individuales. Los componentes mayoritarios pueden suponer un 85% del aceite, mientras que otros componentes se encuentran sólo en trazas. Parece ser que los compuestos

INTRODUCCIÓN

fenólicos son los principales responsables de la actividad antibacteriana y antifúngica de estos aceites, hay evidencias de que los componentes minoritarios tienen un papel importante en su actividad, produciendo un efecto sinérgico con otros componentes. El análisis de su composición detallada se ha conseguido mediante Cromatografía de Gases y Espectrómetro de Masas.

La composición de los aceites de algunos tipos de plantas puede variar según la época de la cosecha y la situación geográfica. Generalmente, los procedentes de las plantas cosechadas durante o inmediatamente después de la floración, poseen una mayor actividad antimicrobiana. La composición de los aceites de diferentes partes de una misma planta, también puede variar ampliamente (Burt, 2004; Santamarina y col., 2015).

Es sabido, desde hace ya mucho tiempo, que gran parte de los aceites esenciales tienen propiedades antibacterianas. La primera medida experimental de las propiedades bactericidas de los vapores de aceites esenciales se dice que fue llevada a cabo por De La Croix en 1881 (Boyle, 1955). Los aceites o sus componentes tienen, además de propiedades antimicrobianas, propiedades antivíricas, antifúngicas, herbicidas y propiedades insecticidas.

Diversos autores han tratado la actividad antifúngica de los aceites y sus compuestos. Mueller-Riebau & Berger (1995) evaluaron 9 aceites esenciales contra 4 especies de hongos fitopatógenos, mientras que Wilson y col., (1997) evaluaron 49 aceites contra *Botrytis cinerea*. Daferera y col., (2003) probaron 8 aceites contra 2 especies de hongos. La actividad antifúngica en estos trabajos estuvo fuertemente asociada con fenoles monoterpénicos, especialmente el timol, carvacrol y eugenol. Se ha encontrado que otros componentes de los aceites, como el aldehído cinámico de la canela, el mentol de la hierbabuena y el eugenol del clavo, presentan actividad antifúngica. En otro estudio (Velluti y col., 2003) probaron los aceites de clavo, canela y orégano sobre *Fusarium proliferatum*, consiguiendo inhibir el crecimiento de este hongo. Otros autores han determinado la capacidad de los AE en la inhibición del desarrollo de los hongos de post-cosecha en condiciones *in vitro* e *in vivo* (Barrera y col., 2009; da Silveira y col., 2014; Knaak y col., 2013).

También se han estudiado los posibles efectos antagonistas, sinérgicos y aditivos que ejercían la combinación de diferentes aceites esenciales (Goni y col., 2009; Gutierrez y col., 2008).

Además, se han estudiado los cambios morfológicos que los aceites esenciales producen sobre los microorganismos. Así, Rasooli y col., (2006), estudiaron los cambios morfológicos de *Listeria monocytogenes* mediante microscopía electrónica como resultado a la exposición de 2 aceites esenciales procedentes de la hidrodestilación de las hojas de 2 variedades de tomillo. El TEM mostró que las células de *Listeria monocytogenes* no tratadas con los aceites esenciales presentaban una pared celular continua, delgada y lisa. A medida que la concentración del aceite esencial se incrementó, la pared celular bacteriana perdió lisura y uniformidad. La interrupción de la membrana celular y la falta de citoplasma fueron evidentes en una fase temprana del tratamiento de las células a concentraciones bajas de aceite esencial de tomillo. El citoplasma perdió incluso su distribución y mostró aglutinación de los materiales intracelulares. Además, mostraron una falta de citoplasma como resultado de la disminución de la funcionalidad de las propiedades barrera de la membrana celular. Por otro lado, Lambert

INTRODUCCIÓN

y col., (2001), observaron que la adición de aceite esencial de orégano o sus componentes (timol y carvacrol) produjeron una alteración en membrana de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Asimismo, la adición del aceite esencial de orégano, implicó la pérdida de iones en comparación al control y cambios en el pH de las células estudiadas.

La actividad antifúngica de los AE no puede ser fácilmente correlacionada con un componente individual, sino con una mezcla de los compuestos presentes en ellos (Tzortzakis, 2009). La interacción de compuestos antimicrobianos cuando se aplican en una mezcla no se comprende todavía del todo y necesita de más investigación. Así, si un par de compuestos antimicrobianos con diferentes mecanismos de inactivación, son aplicados juntos, se podría conseguir un mejor control microbiano, si tienen lugar los efectos sinérgicos o aditivos (Davidson y col., 2005).

No sólo se han realizado estudios de la actividad microbiana *in vitro*, sino también *in vivo*, aplicándolos en alimentos, como ensaladas de frutas (Belletti, Lanciotti, & Patrignani, 2008), en pimientos (Bagamboula, Uyttendaele, & Debevere, 2004), en lechugas y zanahorias (Singh y col., 2002), en cerezas (Serrano y col., 2005), uvas de mesa (Valero y col., 2006) y en melocotones (Montero y col., 2011). En estos tres últimos casos se aplicaron en fase vapor. En estos estudios se consiguió reducir el grado de contaminación microbiológica a partir de aceites esenciales. Montero y col., (2011) al aplicar aceite esencial de canela en una etiqueta de un envase activo, observaron que un 12,5% de la fruta estaba infectada frente a un 86,1% correspondiente al control a los 12 días de almacenamiento. Estos resultados ponen de manifiesto el alto poder antimicrobiano del aceite esencial de canela.

1.3. EL LAUREL (*Laurus nobilis* L.). DESCRIPCIÓN Y ACEITE ESENCIAL

El Laurel (*Laurus nobilis* L.) pertenece a la familia de las *Lauráceas*. Es un árbol perenne de porte arbustivo que suele medir de 2 a 6 metros de altura (puede llegar a 10 m), crece espontáneamente en los países de la cuenca mediterránea hasta unos 1200 m de altitud. Es originario del Mediterráneo y de Asia menor, a orillas del Mar Negro. Además, es el único laurel que no es tóxico; se distingue de los demás por el delicioso y potente aroma de sus hojas al cortarlas o frotarlas (Ubillos & Montalbán, 2009).

Es un árbol de crecimiento muy lento y muy sensible a las heladas, de tronco recto y corteza grisácea, con la copa densa. Las ramas son erguidas y recubiertas por una corteza lisa. Las hojas son alternas, aromáticas, coriáceas, de 5-10 cm de largo, oblongas-lanceoladas, puntiagudas en los dos extremos, con el haz verde oscuro brillante y el envés algo más claro (Figura 1). Sus hojas, ricas en aceites esenciales que le otorgan su característico aroma, pueden recolectarse durante todo el año. Hay que tener presente que cuanto más jóvenes sean las hojas, más alto es su contenido en principios activos. Las flores son dioicas o hermafroditas, de color amarillo verdoso, en grupos de 4-6 en inflorescencias paniculadas en las axilas foliares; flores sin pétalos, con 4 sépalos concrecentes en la base, por lo general 12 estambres. Florece en marzo-abril (Bärtels, 2007). El fruto es una baya ovoide globosa de 10-15 mm, negra, suavemente acuminada. Sólo contiene una semilla, madura en otoño y es muy aromático. Este fruto contiene un 3% de aceite esencial volátil. Las flores y las hojas lo contienen en un 4% (Talavera & Castroviejo, 1999).

INTRODUCCIÓN

El Laurel además de ser utilizado como especia en la cocina, se le atribuye propiedades estimulantes, diuréticas, estomacales, carminativas, expectorantes, sudoríficas y colagogas.

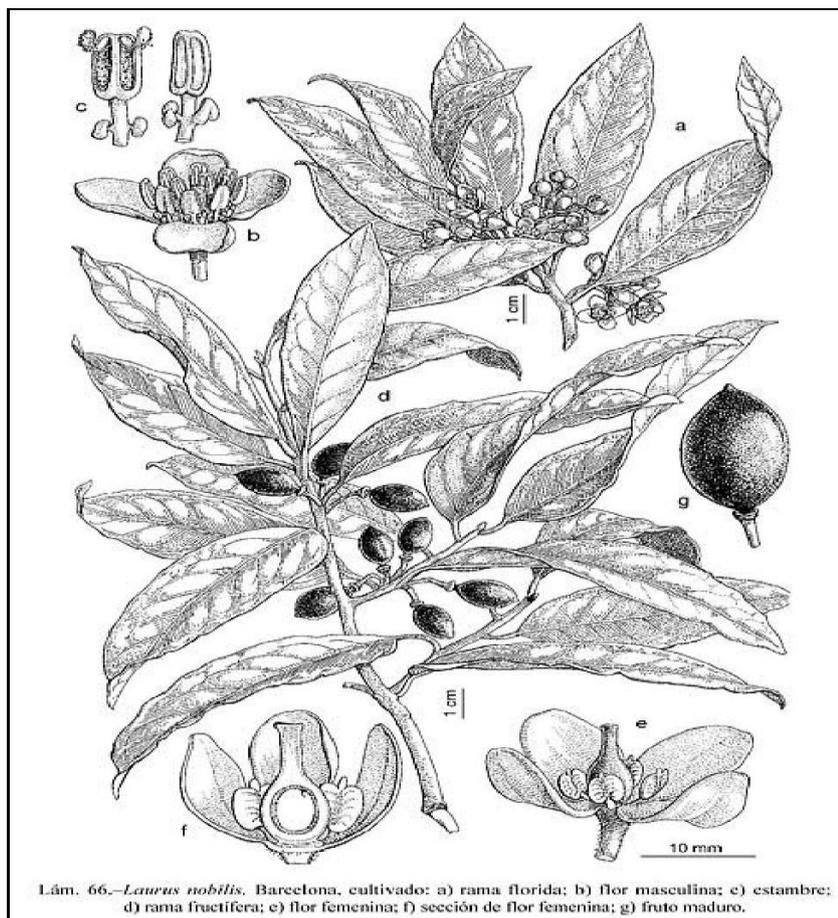


Figura 1. Árbol del laurel (*Laurus nobilis* L.) (Figura tomada de Flora Ibérica).

Del laurel se utilizan prioritariamente sus hojas y, en menor medida, sus frutos en distintas preparaciones tanto culinarias como farmacológicas. Las hojas se emplean frescas, secas u obteniendo por destilación el aceite de laurel. El aceite es el principio activo empleado en las soluciones medicinales y está compuesto por un 45% de cineol, eugenol y tanino. Por otra parte, los frutos, de los que se obtiene la manteca, contienen un 25% de materias grasas formadas por ácidos laurico, oleico, palmítico y linoleico, aplicándose en veterinaria para combatir los parásitos del ganado.

La composición del aceite de hojas de laurel ha sido ampliamente estudiada por algunos autores, siendo 1,8-cineol el componente mayoritario de los provenientes de Marruecos (Derwich & Benziane, 2009), Turquía (Dadalioglu & Evrendilek, 2004; Kilic & Altuntas, 2006; Özcan & Chalchat, 2005), China (Lin y col., 1990), Túnez (Bouzouita y col., 2001), Croacia-Serbia (Politeo y col., 2007; Simić y col., 2004) e Italia (Flamini y col., 2007). Este compuesto también ha sido el mayoritario en el aceite de laurel obtenido en el trabajo de Calle (2010) realizado en el Instituto Agroforestal Mediterráneo. Sin embargo, no sucede lo mismo con el resto de componentes mayoritarios, que varían notablemente dependiendo de la procedencia del material vegetal. Sabineno fue el segundo compuesto en importancia del aceite procedente de

INTRODUCCIÓN

Antakya, Irán (Verdian, 2009), seguido de acetato de α -terpinilo y α -terpineol, mientras que, en el aceite esencial proveniente de Marruecos, los mayores porcentajes después de 1,8-cineol fueron acetato de α -terpinilo y limoneno. Los componentes mayoritarios que siguieron al 1,8-cineol en el estudio de Calle (2010), material vegetal procedente de Moncada, Valencia, fueron acetato de α -terpinilo y metil eugenol.

1.4. LA CANELA (*Cinnamomum verum* J. Presl). DESCRIPCIÓN Y ACEITE ESENCIAL

La canela o canelo cuyo nombre científico es *Cinnamomum verum* pertenece a la familia de las *Laureáceas*. Es originario de Celián, Sri Lanka, país con la mayor producción mundial, de ahí la denominación de *Cinnamomum zeylanicum* utilizada durante muchos años. También se cultiva en Brasil, Birmania, India, Indonesia, Indias occidentales e islas del océano Pacífico. El canelo habita en climas cálidos, carentes de inviernos fríos, está asociada a la selva tropical y a los bosques de encinas y pinos. El árbol o arbusto es pequeño y perennifolio, puede alcanzar 10-12 m de altura en su estado silvestre, pero se poda formando arboles más pequeños y densos, facilitando su cultivo.

Sus hojas son brillantes, casi opuestas, con 3 venas prominentes, simples, coriáceas, largas y aromáticas (Figura 2). Las flores son hermafroditas, aparecen agrupadas y florecen de mayo a junio. Da frutos de color morado. La corteza es gruesa, papirácea, de color pálido.

La canela de buena calidad es la segunda corteza del árbol que se enrolla a mano, prensando juntos sus bordes, lo que le da aspecto de pequeña caña. La operación se repite cada día hasta que la corteza está bien seca, momento en que se vuelve más oscura, suave y quebradiza. El elevado precio que alcanza se debe a la lentitud del proceso de fabricación. Se procura recoger dos o tres ramas de cada árbol para permitir que crezcan nuevos retoños. La calidad aumenta en podas sucesivas y la corteza más fina procede de los brotes más delgados del centro de la planta.

La canela se usa en rama y molida. Es aromática, antiséptica, carminativa, digestiva, actúa como vasodilatador y sudorífico. Hoy en día se sabe algo más del por qué era tan apreciada como especia, ya que su aceite esencial rico en eugenol inhibe las bacterias responsables de la putrefacción de la carne (Torres, 2009). El aceite esencial de las ramas de la canela puede contener un alto porcentaje de cinamaldehído (López y col., 2007), o mezclas de cinamaldehído y cantidades considerables de eugenol (Ito, 2008) y grandes cantidades de benzoato de bencilo, tanto en hojas como ramas (Nath y col., 1996).

La canela es rica en cinamaldehído y en b-cariofileno, linalol y otros terpenos. El cinamaldehído es el componente mayoritario del aceite de las hojas de canela y produce ese aroma y sabor asociado con la canela (Cheng y col., 2004). Una formulación usando estos componentes puede ser aplicada como pesticida, pero sin los efectos nocivos para la salud de muchos insecticidas, con el añadido de su agradable aroma. Además, cuatro componentes de la hoja de canela, cinamaldehído, cinamil-acetato, eugenol y anetol, mostraron una gran actividad frente a mosquitos.

INTRODUCCIÓN

El aceite de canela, con eugenol como principal componente, mostró mayor actividad que el eugenol puro, lo que sugiere que otros componentes pueden interactuar de un modo sinérgico o aditivo acelerando sus efectos antifúngicos (Assisy col., 2011).

Debido al polimorfismo químico de los aceites de diferentes procedencias, así como la variabilidad observada dentro de y entre las especies de hongos del arroz, maíz y de la caña de azúcar (Hsuan y col., 2010), es fundamental conocer la composición química de las muestras utilizadas y realizar el aislamiento de las cepas fitopatógenas.

1.5. LOS HONGOS

1.5.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

Los hongos son pequeños organismos productores de esporas, generalmente microscópicos, eucarióticos, ramificados y a menudos filamentosos que carecen de clorofila y que tienen paredes celulares que contienen quitina, celulosa, o ambos componentes. La mayoría de las 100.000 especies de hongos conocidas son estrictamente saprofitas y viven sobre la materia orgánica muerta, a la que descomponen. Alrededor de 50 especies de hongos producen enfermedades en el hombre y casi el mismo número ocasiona enfermedades en los animales, la mayoría de las cuales son enfermedades superficiales de la piel o de sus apéndices. Sin embargo, más de las 8.000 especies de hongos producen enfermedades en las plantas. Todas las plantas son atacadas por algún tipo de hongo, y cada uno de los hongos parásitos ataca a uno o más tipos de plantas. Algunos hongos crecen y se reproducen solo cuando establecen una cierta asociación con las plantas que les sirven de hospedante, durante todo su ciclo de vida estos hongos se conocen como parásitos obligados o biótrofos. Otros requieren de una planta hospedante durante una cierta etapa de su ciclo de vida, el cual lo pueden concluir desarrollándose en materia orgánica muerta o bien creciendo y reproduciéndose tanto en materia orgánica muerta como en plantas vivas (como por ejemplo los parásitos no obligados) (Agrios, 2005).

Los hongos son a la vez destructivos y beneficiosos para la agricultura. Por una parte, son los descomponedores primarios de materiales orgánicos, contribuyendo de forma significativa a la descomposición de la materia orgánica y al reciclado de nutrientes, pero por otro lado son responsables de los daños que afectan a las cosechas a través de las enfermedades que provocan en plantas. La contaminación fúngica de los productos agrícolas es un problema crónico y conlleva la disminución en cantidad y calidad de las cosechas y por tanto de los alimentos. También los hongos pueden degradar productos que son útiles para la economía humana, por ejemplo, los productos alimentarios cuando se almacenan mal, frecuentemente están expuestos al biodeterioro por hongos, con el resultado de que sus cualidades como alimentos se ven disminuidas. Además, los hongos con frecuencia producen compuestos tóxicos cuando crecen sobre alimentos almacenados.

En los últimos años se viene integrando la sistemática tradicional (morfológica principalmente) con los recientes avances en filogenia molecular. Desde esta perspectiva, Hibbert y col., (2009) establecen cuatro grandes grupos fúngicos: Ascomycota (5.674 géneros y 64.056 especies

INTRODUCCIÓN

conocidas), Basidiomycota (1.586 géneros y 31.503 especies), Chytridiomycota (105 géneros y 706 especies) y Zygomycota (168 géneros y 1.065 especies).

1.5.2. *Botryotinia fuckeliana* (De Bary) Whetzel

Botryotinia fuckeliana es un patógeno vegetal, y agente causal de la enfermedad conocida como moho gris. El epíteto específico fue nombrado por el micólogo Heinrich Anton de Bary en honor de otro micólogo, Karl Wilhelm Gottlieb Leopold Fuckel. Esta especie es más conocida por su anamorfo, *Botrytis cinerea* Pers.

El género *Botrytis* constituye un grupo de hongos fitopatógenos de gran importancia ya que se encuentran ampliamente distribuidos. Este género cuenta con más de 20 especies, dentro de las cuales se encuentran *B. tulipae*, *B. squamosa* y *B. fabae*, que afectan al tulipán, cebolla y haba respectivamente. Otra especie conocida es *B. cinerea*, la cual es capaz de infectar a innumerables especies de plantas (polífago), causando la enfermedad conocida como podredumbre gris (Bustamante, 2012).

B. cinerea es uno de los fitopatógenos fúngicos más importantes, debido a su naturaleza patogénica que le permite realizar su ciclo infectivo sobre las plantas y su naturaleza saprófita que le permite vivir sobre material vegetal senescente, muerto o previamente infectado por otros patógenos (Cardinale y col., 2016).

Las colonias del hongo tienen un crecimiento moderado en medio artificial, pueden ser blancas o grises dependiendo del medio de cultivo y, además, estas pueden ser de tipo micelial o esporulante. El crecimiento micelial es abundante, algodonoso y de color pardo. El crecimiento esclerocial es lento, posee un micelio escaso de color blanco que luego se torna de color gris pardo con abundantes esclerocios de color negro distribuidos irregularmente en el medio. Sobre los órganos afectados de las plantas también se observa el micelio gris (Walker y col., 2015).



Figura 4. Conidioforos y conidios de *Botryotinia fuckeliana*.



Figura 3. *Botryotinia fuckeliana* en medio PDA.

TAXONOMÍA

Sclerotiniaceae, Helotiales, Leotiomyetidae, Leotiomyetes, Pezizomycotina, Ascomycota, Fungi (Index Fungorum, 2016).

INTRODUCCIÓN

FISIOLOGÍA

Se ha registrado crecimiento a 0,93 y a 0,90 a_w y crece a una amplia gama de temperaturas, como mínimas 2-8°C, máximas 28-35°C, y óptimas de 22-25°C. Crece en pH entre 2-8 y a concentraciones de O₂ menores al 1%.

PATOLOGIAS Y MICOTOXINAS PRODUCIDAS

No hay estudios que hayan registrado la producción de micotoxinas para esta especie.

ECOLOGÍA

Botrytis cinerea es un patógeno virulento, causa de la pudrición en muchos tipos de frutas frescas. A su vez ocasiona grandes pérdidas en uva, tanto en el campo como después de la cosecha, así como en otros frutos como frambuesas, arándanos, moras y fresas. También causa el deterioro de manzanas, peras, tomates, frutas de hueso y kiwis (Pitt & Hocking, 2009). Los síntomas provocados por este patógeno, incluyen: pudrición en frutos y tubérculos, necrosis de tejido, manchas foliares, caída de plántulas, canchros en los tallos, y tizones en inflorescencias. En el caso de la uva, el micelio del hongo produce numerosos conidios que ocasionan más infecciones, pero el micelio también se desarrolla, penetra e invade al resto de la inflorescencia, la cual se llena y cubre con moho intrincado de color gris blanquizco o café claro. En caso de que algún fruto llegue a desarrollarse, el hongo se propaga desde los pétalos hacia los frutos verdes o maduros y ocasiona la pudrición basal del fruto, la cual puede destruir todo el fruto o bien se puede propagar hacia otros frutos que están en contacto con él (Agrios, 2005).

USOS

En algunos países, especialmente en Francia y Alemania, se producen a partir de uvas infectadas por este hongo, vinos botritizados, muy apreciados por los consumidores.

1.5.3. *Epicoccum nigrum* Link

Epicoccum nigrum es un hongo saprofito, endófito, epifito o invasor secundario de plantas. Está ampliamente distribuido en el aire, en el suelo, y está asociado a la descomposición primaria de los vegetales. Su ubicuidad en el medio ambiente significa que se encuentra comúnmente en los alimentos, pero es una causa poco frecuente de su deterioro.

Las colonias de *E. nigrum* crecen rápidamente alcanzando unos 6 cm de diámetro en 2 días a temperatura ambiente. El micelio tiene una coloración brillante, produce pigmentos con tonos amarillo, naranja, rojo en los cultivos jóvenes y a menudo marrón y negro en las colonias maduras.

Epicoccum nigrum forma blastoconidios de color oscuro, verrugosos y esféricos, llegando a medir de 15 a 25 micras de diámetro (Samson y col., 2004).

INTRODUCCIÓN

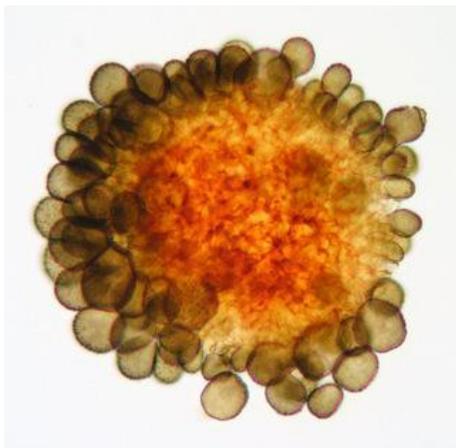


Figura 5. Conidios de *Epicoccum nigrum* en colonias jóvenes (fuente: discoverlife.org)



Figura 6. *Epicoccum nigrum* en medio PDA.

TAXONOMÍA

Didymellaceae, Pleosporales, Pleosporomycetidae, Dothideomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota, Fungi (Index Fungorum, 2016).

FISIOLOGÍA

Las esporas de *E. nigrum* se activan dependiendo de las condiciones de luz, temperatura y humedad relativa en el ambiente. Se transportan fácilmente por acción del viento. Las temperaturas óptimas para el crecimiento son por lo general de 20-25°C, máximas de 30-35°C y mínima de 5°C. El potencial hídrico óptimo para su crecimiento es de 0.98 a_w y mínimo de 0.91 a_w . El pH ideal de crecimiento varía de 5 a 6 (Pitt & Hocking, 2009).

PATOLOGÍA

Epicoccum nigrum se asocia con alergias respiratorias por hongos. En esta especie no se ha detectado la producción de micotoxinas.

ECOLOGÍA

Es un hongo muy robusto y ubicuo, *E. nigrum* tiene una extensión casi mundial. Sus esporas pueden hallarse en una gran variedad de entornos, sobretodo, predominan en el suelo (es decir, turba, suelo del bosque, humus) y la arena (por ejemplo, dunas, arenas salinas). Es un hongo saprofito, que forma en las plantas muertas y moribundas. Esta especie se encuentra comúnmente en semillas y cereales, así como en otros cultivos, incluyendo maíz, habas, patatas, guisantes y melocotones. También se ha informado que causa deterioro en melones, pepinos, tomates, manzanas, peras y nuez pecán (Pitt & Hocking, 2009).

USOS

Epicoccum nigrum tiene una amplia gama de aplicaciones médicas, industriales, y agrícolas. Produce diferentes compuestos con actividad antifúngica y antibacteriana. Estos compuestos antimicrobianos son eficaces contra otros hongos y bacterias presentes en el suelo. Industrialmente, *E. nigrum* se ha utilizado para biosintetizar nanopartículas de plata y oro (Qian y col., 2013).

INTRODUCCIÓN

En agricultura, *E.nigrum* se utiliza para apoyar el crecimiento de la raíz y controlar los patógenos de caña de azúcar. Es un agente de biocontrol antifúngico activo frente a la podredumbre parda en fruta de hueso, causadas por las especies *Monilinia laxa* y *fructigena Monilinia*. Se ha visto que el hongo es bastante sensible a los aceites esenciales de plantas como la lavanda y el romero (Fávaro y col., 2012).

1.5.4. *Curvularia hawaiiensis* (Bugnic. Ex M.B. Ellis) Manamgoda, L. Cai & K.D. Hyde

Las especies dentro del género *Curvularia* se caracterizan por presentar conidios largos y elipsoidales, con tres o cuatro septos transversales. Como su nombre indica, los conidios están a menudo curvados debido a una célula central hinchada y asimétrica. La mayoría de las especies son patógenas de plantas. Siendo la especie más común en los alimentos es *Curvularia lunata*.

Las colonias, en Agar Patata Dextrosa (PDA) presentan un crecimiento moderadamente rápido, alcanzando un diámetro de 3-4 cm en una semana a 25°C, de coloración negro pardusco, aterciopeladas, llegando a ser, a veces, ligeramente algodonosas. El reverso es de color marrón. Los conidióforos son erectos, septados, pigmentados cada vez más cerca de la punta, a veces geniculados, hasta 600 µm de largo. Los conidios generalmente septados en 4, sobre todo más curvados unilateralmente en la célula central más amplia y más pigmentada, la célula adyacente menos pigmentada y hialino en las células finales, 18-35(37) x 8-14 µm. Rango de temperatura de crecimiento óptima 24-30°C. La esporulación se produce por la incubación bajo luz cerca de la UV (Samson y col., 2004).

Los generos *Bipolaris* y *Curvularia* están estrechamente relacionados por su patogenicidad en plantas, y también como patógenos oportunistas en humanos

Algunas de las especies del género *Curvularia* fueron clasificadas anteriormente como miembros del género *Bipolaris*, como por ejemplo *C. australiensis*, *C. hawaiiensis*, *C. spicifera*. Sin embargo, los estudios filogenéticos y moleculares recientes han demostrado que estas especies que previamente habían sido colocadas en este último género, además son patógenos humanos oportunistas y ahora se sitúan dentro del género *Curvularia*. Este es el caso de *C. hawaiiensis* especie que estudiamos en el presente trabajo (Manamgoda y col., 2014).

Bipolaris y *Curvularia* son causantes de enfermedades de gran importancia económica en cereales como trigo, maíz y cebada. Causan enfermedades tales como manchas foliares, pudriciones de corona y pudriciones de raíz (Pitt & Hocking, 2009).

EL género *Curvularia* se caracteriza porque sus colonias cuando se desarrollan en Agar Patata Dextrosa (PDA) presentan un crecimiento moderadamente rápido, alcanzando un diámetro de 3-4 cm en una semana a 25°C, de color negro pardusco, aterciopeladas, llegando a ser, a veces, ligeramente algodonosas. El reverso es de color marrón. Los conidióforos son erectos, septados, pigmentados cada vez más cerca de la punta, a veces geniculados. Los conidios generalmente septados en 4, sobre todo más curvados unilateralmente en la célula central

INTRODUCCIÓN

más amplia y más pigmentada, la célula adyacente menos pigmentada e hialina en las células finales, 18-35(37) x 8-14 μm . Su rango de temperatura de crecimiento óptima 24-30°C. La esporulación se induce con longitudes de onda próximas a las del ultravioleta (Samson y col., 2004).

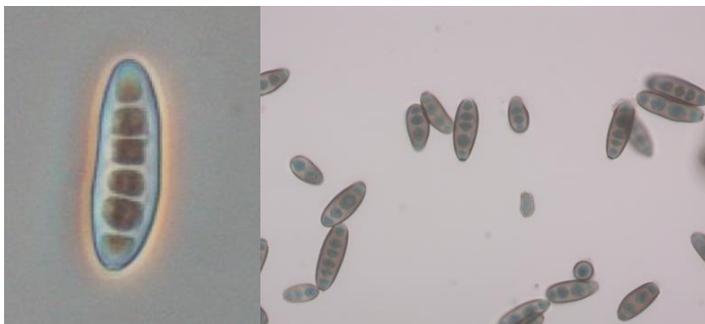


Figura 8. Conidios de *Curvularia hawaiiensis*



Figura 7. *Curvularia hawaiiensis* en medio PDA.

Es principalmente invasor de plantas monocotiledóneas. Los alimentos más comunes dónde podemos encontrar éste género son los cereales, entre los que se encuentran el arroz, la cebada, el trigo, el maíz y el sorgo (Pitt & Hocking, 2009).

TAXONOMÍA

Pleosporaceae, Pleosporales, Pleosporomycetidae, Dothideomycetes, Ascomycota, Fungi (Index Fungorum, 2016).

1.5.5. *Aspergillus niger* Tiegh

Aspergillus niger es un hongo que pertenece a género *Aspergillus*. Dentro de este género se incluyen diferentes especies, que se caracterizan por presentar un rápido crecimiento, con colonias de color de color blanco, amarillo, café, negro o verde, que consisten en un denso conjunto de conidios con conidióforos y vesículas. En la estructura morfológica de los conidios se puede observar que éstos pueden acomodarse de forma columnar o radial.

Las especies de *Aspergillus* son contaminantes comunes de varios sustratos orgánicos, normalmente en regiones tropicales, subtropicales y templadas. El interés en el estudio de *Apergillus* se debe a que ciertas especies son patógenas de vegetales y tienen la habilidad de producir metabolitos tóxicos o micotoxinas (aflotoxinas), principalmente en los cereales. Además, especies de este género son causantes de alergias en el hombre, mientras que otras especies son importantes en la fermentación para la obtención de productos alimenticios o, a nivel industrial, en la producción de ácidos orgánicos o enzimas (Samson y col., 2004).

Las colonias de *Aspergillus niger* (*A. niger*) en agar Czapek incubadas a 25°C llegan a tener un diámetro de 4-5 cm en 7 días, formando una capa blanca o amarilla con conidióforos color café oscuro a negro. Las cabezas de las conidias son negras y radiales, y tienden a separarse en columnas sueltas con el tiempo, estas características son las que le diferencian (Figura 9).

Esta especie de moho produce ácidos orgánicos (como el cítrico, málico y glucónico; lo que disminuye el pH del sustrato provocando sabores y olores indeseables). Además, este hongo

INTRODUCCIÓN

produce ennegrecimiento en muchas frutas y órganos de almacenamiento como los bulbos y tubérculos (Figura 11).

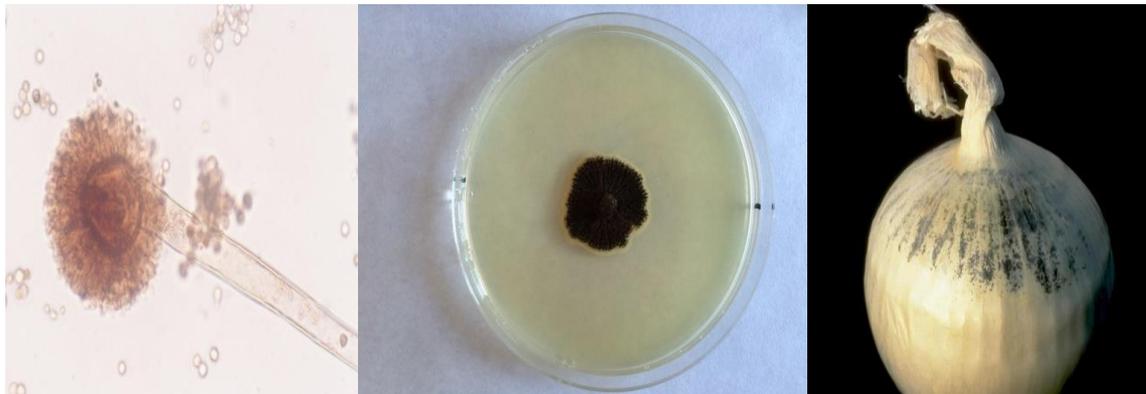


Figura 11. Conidios de *Aspergillus niger*.

Figura 9. *Aspergillus niger* en medio PDA.

Figura 10. *Aspergillus niger* en cebolla (S. K. Mohan, 2008)

TAXONOMÍA

Trichocomaceae, Eurotiales, Eurotiomycetidae, Eurotiomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota, Fungi (Index Fungorum, 2016).

FISIOLOGÍA

Las temperaturas de crecimiento para *Aspergillus niger* mínimas son 6-8°C, las máximas 45-47°C y 35-37°C, las óptimas. *A. niger* es xerófito: se comprobó la germinación a 0.77 a_w a 35°C. *A. niger* es capaz de crecer por debajo de pH 2 con alta a_w .

PATOLOGIAS Y MICOTOXINAS PRODUCIDAS

Aspergillus niger por lo general ha sido considerado como un hongo beneficios, ya que no causa enfermedades como otras especies de *Aspergillus*, pero en altas concentraciones puede producir aspergilosis, enfermedad que provoca alteraciones pulmonares al inhalar las esporas que crecen en el alimento. Esta enfermedad aparece con más frecuencia en horticultores, ya que inhalan el polvo del hongo con más facilidad. Además, numerosos estudios han demostrado que puede producir ocratoxinas de tipo A (Soares y col., 2013).

ECOLOGÍA

Es uno de los hongos más comúnmente encontrado en los alimentos, más frecuente en regiones de climas cálidos, está presente tanto en situaciones de campo, como en post-cosecha en almacenes de alimentos. Las esporas negras le protegen de la luz solar y de la radiación UV, proporcionándole una ventaja competitiva en estos hábitats (Valero y col., 2007).

Aspergillus niger, es con diferencia, la especie de *Aspergillus* que mayor deterioro de fruta fresca y hortalizas provoca, incluyendo manzanas, peras, melocotones, cítricos, uvas, higos, fresas, mangos, melones, tomates, cebollas, ajos, coles y boniatos. También es uno de los hongos más comúnmente aislados en frutos secos, en particular cacahuetes, pistachos,

INTRODUCCIÓN

almendras y anacardos. Los cereales y oleaginosas son también fuentes frecuentes, especialmente el maíz y sus derivados, así como la cebada, soja, colza, sorgo, semillas de girasol, garbanzos y arroz (Pitt & Hocking, 2009).

USOS

Aspergillus niger se cultiva para la obtención de varios productos químicos: ácido cítrico, ácido glucónico, enzimas: glucoamilasa, galactosidasa, fitasa, etc. Existen antecedentes que han demostrado se aumentó el crecimiento a plantas de tomate al ser inoculadas con *A. niger* (Khan y col., 2013).

2. OBJETIVOS

OBJETIVOS

En el Departamento de Ecosistemas Agroforestales de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural (UPV) se llevan a cabo una serie de trabajos relacionados con la capacidad antifúngica de los aceites esenciales frente a distintos hongos patógenos de cultivos o de almacén. Este trabajo forma parte de un proyecto financiado por el Programa de Apoyo a la Investigación y Desarrollo (PAID-05-10) de la UPV.

En el presente trabajo se estudia:

- La composición química de los aceites esenciales de Laurel (*Laurus nobilis*) y Canela (*Cinnamomum verum*).
- La capacidad antifúngica “*in vitro*” de los aceites esenciales de Laurel y de Canela frente a *Botrytis fuckeliana* (cedido por la CECT) y los hongos *Epicoccum nigrum*, *Curvularia hawaiiensis* y *Aspergillus niger* (aislados de las carióspsides de arroz de Valencia).
- La efectividad del aceite esencial de canela a distintas concentraciones.
- El efecto del aceite de canela en la conservación de la uva de mesa, frente a *Botryotinia fuckeliana*.

El objetivo final es conocer si los aceites esenciales de canela y laurel podrían ser una alternativa para el control de los hongos anteriormente mencionados, con el fin último de obtener biofungicidas ecológicos que pudieran ser utilizados en cultivos en campo, productos almacenados, y en la conservación de alimentos y granos, ya que cada vez hay más productos químicos sintéticos prohibidos para el control de hongos patógenos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES

3.1.1. ACEITES ESENCIALES

Respecto a los aceites esenciales comerciales fueron suministrados por la casa comercial “Esencial aroms”, Diuréticos Intersa S.A. y con número de lote 719 en el caso de la *Laurus nobilis* y lote 842 en el caso del *Cinammon verum*. Todos ellos fueron extraídos de manera natural a través de la primera presión en frío, siendo la recolección en el momento óptimo y la extracción por destilación al vapor de agua, obteniéndose un aceite 100% natural. Para el caso del laurel, el aceite esencial fue extraído de sus hojas y para el caso de la canela, fue extraído de la corteza.

3.1.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS MAYORITARIOS DE LOS ACEITES ESENCIALES POR CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC) Y CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC-MS)

La cromatografía de gases es una de las técnicas más versátiles y ubicuas en los laboratorios, y se usa mucho en la determinación de compuestos orgánicos. Con esta técnica se pueden separar mezclas muy complejas; cuando se acopla con la espectrometría de masas como sistema de detección, es posible la identificación virtualmente positiva de los eluados con una muy alta sensibilidad, creando un sistema analítico muy poderoso.

En cromatografía de gases, la muestra pasa al estado de vapor inyectándola a un puerto calentado, y el eluyente es un gas. El factor más importante en la cromatografía de gases es la selección de la columna adecuada (fase estacionaria) para la separación particular sobre la que se desea experimentar.

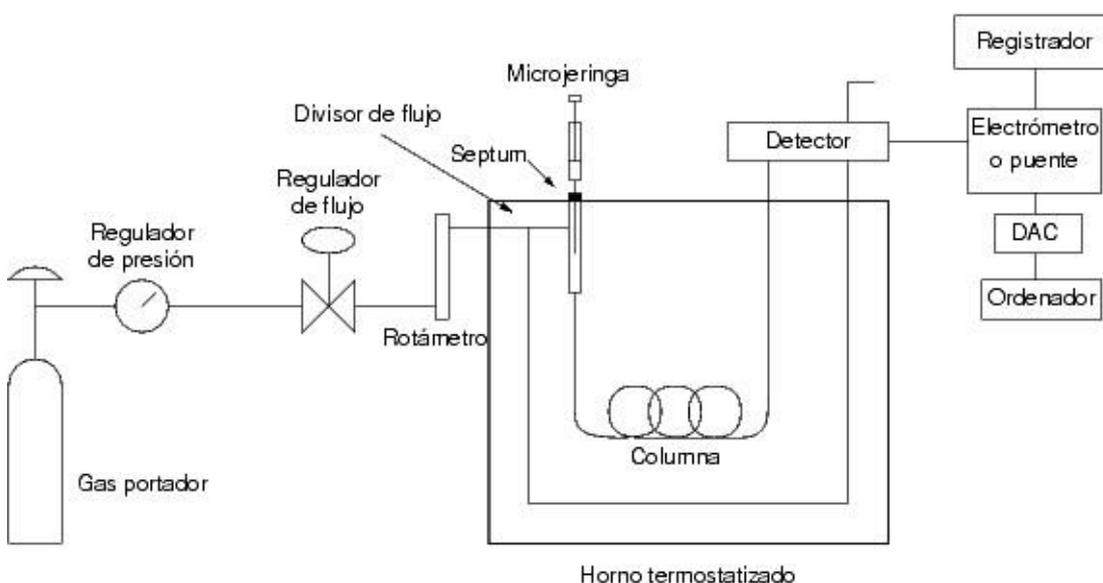


Figura 12. Diagrama de un cromatógrafo de gases.

MATERIAL Y MÉTODOS

La muestra se inyecta rápidamente con una microjeringa hipodérmica a través de un tapón septum de goma de silicona y pasa a la columna. El puerto de inyección de muestra, la columna y el detector se calientan a temperaturas a las que la muestra tenga una presión de vapor mínima de 10 torr, usualmente a unos 50°C por arriba del punto en el que hierve el soluto con mayor alto punto de ebullición. El puerto de inyección y el detector se suelen mantener un poco más calientes que la columna para evaporar rápidamente la muestra líquida y evitar que ésta se condense en el detector.

La separación se efectúa a medida que los componentes del vapor se equilibran con el gas acarreador y la fase estacionaria. El gas acarreador es un gas químicamente inerte que debe encontrarse en forma pura, como argón, helio o nitrógeno. Un gas muy denso tiene mayor eficacia porque su difusividad es menor, pero un gas de baja densidad permite mayores velocidades.

3.1.3. ANÁLISIS CUANTITATIVO

La cromatografía de gases fue realizada utilizando un cromatógrafo modelo Clarus 500GC Perkin-Elmer, equipado con un detector de ionización de llama (FID), una columna capilar Hewlett-Packard HP-1 (metil silicona) de 30 m de longitud, 0,2 mm de diámetro interno y 0,33 µm de espesor de película.

El programa de temperatura de la columna utilizado fue 60°C durante cinco minutos, con un gradiente de 3°C/min hasta llegar a 180°C, a continuación, se empleó un gradiente de 20°C/min hasta llegar a 280°C, manteniendo esta temperatura durante diez minutos.

El gas portador, fue helio a un flujo de 1 ml/min. El FID fue mantenido a una temperatura de 250°C y el inyector a 220°C.

Los índices de retención de Kovats, empleados para identificar los compuestos, fueron calculados usando una mezcla de hidrocarburos C₈-C₃₂, que se cromatografió cuando se analizaron las muestras. Una vez obtenidos los tiempos de retención, expresados en minutos, de cada uno de los componentes del aceite esencial, se determinó el índice de Kovats a partir de la siguiente fórmula:

$$IK=100*(n^{\circ} C HC_{n-1}+[(\log TR X-\log TR HC_{n-1})/(\log TR HC_{n+1}-\log TR HC_{n-1})]).$$

Siendo:

$n^{\circ} C HC_{n-1}$: número de carbonos del hidrocarburo anterior al compuesto

TRX: tiempo de retención del compuesto

TR HC_{n-1} : tiempo de retención del hidrocarburo anterior al compuesto

TR HC_{n+1} : tiempo de retención del hidrocarburo posterior al compuesto

3.1.4. ANÁLISIS CUALITATIVO

La cromatografía de gases-espectrometría de masas se realizó con un aparato Varian Saturn 2000 equipado con una columna capilar Varian C.S. VA-5MS de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 μm de espesor de película. El modo de inyección empleado fue en Split con una ratio de 1:25.

Los espectros de masas fueron obtenidos dentro de un rango de masas (m/z) de 28-400 u.m.a., con un voltaje de ionización de 70 eV.

Se usaron las mismas condiciones de trabajo que para el cromatógrafo de gases.

Junto con las muestras se cromatografió una mezcla de hidrocarburos C_8 - C_{32} para calcular posteriormente los índices de retención de Kovats, de la forma descrita en el apartado anterior.

Los compuestos fueron identificados por su espectro de masas, confirmando su identidad con los índices de Kovats y comparando sus espectros de masas y sus tiempos de retención con otros de muestras patrón o con datos disponibles en la librería NIST 98 y en la literatura (Adams, 2007).

3.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS ACEITES ESENCIALES

3.2.1. HONGOS

Los hongos utilizados en el presente trabajo fueron los siguientes: *Botryotinia fuckeliana* suministrado por la CECT 2100, y los hongos *Epicoccum nigrum* CECT 20945, *Curvularia hawaiiensis* CECT 20934, *Aspergillus niger* LBEA 2300. Estos últimos fueron aislados en el Laboratorio de Botánica del Departamento de Ecosistemas Agroforestales a partir de cariósides de arroz de la variedad Bomba, procedente de la albufera de Valencia. Los hongos se identificaron mediante métodos morfológicos y moleculares, y posteriormente se depositaron en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

3.2.2. ENSAYOS *in vitro* DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DE LOS ACEITES

Estudio de la actividad antifúngica de los aceites esenciales sobre el crecimiento miceliar. Velocidad de crecimiento.

Los aceites esenciales fueron disueltos, mezclados y homogeneizados por agitación en matraces con medio de cultivo PDA/Tween 20 (0.1%), previamente esterilizado, cuando aún está líquido, se adicionaron a distintas concentraciones 300 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$ o 100 $\mu\text{g/mL}$ según el estudio a realizar, y se repartió en cápsulas Petri de 90x15 mm y 150x15 mm.

El hongo se sembró a modo de explantes discoidales de 8 mm de diámetro tomados con un sacabocados de una colonia de siete días de desarrollo, y se colocaron en el centro de las cápsulas Petri conteniendo el aceite esencial. El experimento se incubó a 25°C durante 14 días.

MATERIAL Y MÉTODOS

El crecimiento miceliar se evaluó midiendo diariamente dos diámetros perpendiculares de la colonia, y se calculó la velocidad de crecimiento. Se realizaron veinte repeticiones por tratamiento. Las cápsulas Petri control contenían únicamente PDA/Tween 20 (0.1%) y el hongo analizado.

Cálculo del índice MGI.

La inhibición del crecimiento miceliar se calculó el día 7 utilizando la siguiente fórmula (Albuquerque y col., 2006).

$$\text{MGI} = [(DC-DO) / DC] \times 100$$

Donde DC es la media del diámetro de las colonias en placas no tratadas con aceite y DO es la media del diámetro de las colonias en placas tratadas con aceite esencial, ambos a día 7.

Este índice se calculó para los aceites de laurel y canela a la dosis de 300 $\mu\text{m}/\text{mL}$ para las cuatro especies fúngicas. Posteriormente se seleccionó el aceite de canela y se realizó un estudio del MGI a las dosis de 100-200-300 $\mu\text{m}/\text{mL}$.

3.3. ENSAYOS *in vivo* EN UVA DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DEL ACEITE ESENCIAL DE CANELA FRENTE A *Botryotinia fuckeliana*

Preparación de la solución del aceite esencial para el recubrimiento de los racimos.

La solución del aceite esencial de canela para el baño de los racimos de uva se preparó a la concentración de 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El aceite fue homogeneizado por agitación durante 10 min a 170 rpm en agitación orbital, en matraces conteniendo agua /Tween 20 (0.1%) / agar 0.25%.

Preparación del inóculo fúngico.

Para el recubrimiento de los granos de uva con *Botryotinia* se preparó un baño conteniendo los propágulos del hongo. Para ello, por cada 90 mL de agua /Tween 20 (0.1%) / agar 0.25% se adicionó 10 mL de una suspensión de 1×10^8 ufc/mL del hongo. La mezcla fue homogeneizada por agitación durante 10 min a 170 rpm en agitación orbital, obteniendo una suspensión homogénea.

Recubrimiento de la uva con el aceite y el inóculo fúngico.

Los racimos de uva de la variedad moscatel se sumergieron primero en la solución conteniendo el aceite esencial de canela durante 4 min, luego se colgaron y dejaron escurrir durante 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente estos racimos se bañaron en el inóculo fúngico durante 2 min, los racimos de uva cubiertos con la suspensión de *Botryotinia fuckeliana* se colgaron y dejaron secar durante una noche. A continuación, se estudió la evolución de los mismos durante 14 días y fueron mantenidos con una humedad del 85% y temperatura de 21°C. En el ensayo control los racimos de uva únicamente se bañaron con el inóculo fúngico.

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de crecimiento micelial de los hongos ensayados se sometieron al análisis de la varianza (ANOVA). También se representaron los intervalos LSD Fisher y HSD Tukey de comparación de medias de los factores simples, especie y tratamiento, y su interacción, con valores de significación de $P \leq 0,05$. El programa estadístico utilizado fue Statgraphics Centurion XVI.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES

En la tabla 1 se muestran los compuestos identificados en los aceites de Laurel y Canela procedentes de muestras comerciales.

En el Laurel, los compuestos oxigenados representan el 78.8% del total de su composición, los que se encuentran en mayor proporción son el epoxide 1.8-cineole (52%) y el ester α -terpinenyl acetate (13%), seguidos por los esters bornyl acetate (0.5%) y linalyl acetate (0.25%). Los hidrocarburos (monoterpenos and sesquiterpenos) representan el 18% de su composición.

En el aceite esencial de canela el porcentaje de compuestos oxigenados es del 92%, el eugenol es el mayoritario aproximadamente 60%, seguido de los esteres eugenyl acetate (18.5%) and cinnamyl acetate (5%), mientras que los hidrocarburos (monoterpenos and sesquiterpenos) representan solamente el 5%, β -caryophyllene (1.9%), limonene (1%), α -pinene (0.8%), p-cymene (0.7) and α -caryophyllene (0.5%). La composición que hemos obtenido están de acuerdo con los obtenidos por Roselló y col., 2015.

RESULTADOS

Tabla 1. Composición química de los aceites de *Laurus nobilis* (Laurel) y *Cinnamomum verum* (Canela).
Compuestos en orden de elución en columna HP-1.

RI	Compuesto	Área (%) Laurel	Área (%) Canela
853	3-hexen-1-ol	0.06	-
918	butanoic acid,2-methylpropyl ester	0.06	-
932	α -thujene	0.17	0.08
939	α -pinene	3.95	0.83
954	camphene	-	0.36
979	sabinene	7,48	-
980	β -pinene	3.6	0.27
983	1-octen-3-ol	-	-
994	β -myrcene	0.65	0.08
995	3-octanone	-	-
1005	phellandrene	-	0.53
1013	δ -3-carene	-	-
1020	α -terpinene	0.47	0.16
1029	p-cymene	-	0.71
1033	limonene	-	1.00
1035	1,8-cineole (eucaliptol)	51.80	0.07
1063	γ -terpinene	1.20	-
1071	sabinene hydrate	0.12	-
1091	terpinolene	-	-
1001	linalool	3.66	0.41
1168	acetic acid,phenylmethylester	-	0.13
1168	borneol	0.12	-
1180	terpinen-4-ol	2.17	-
1192	linalyl propionate	-	0.11
1193	α -terpineol	2.301	-
1199	estragole	0.38	-
1201	dihydrocarvone	-	-
1232	nerol	0.30	-
1261	linalyl acetate	0.25	-
1273	2-propenal, 3-phenyl-	-	1.99
1288	bornyl acetate	0.55	-
1290	thymol	-	-
1296	2-undecanone	0.14	-
1298	carvacrol	-	-
1328	myrtenyl acetate	0.06	-
1357	α -terpinenyl acetate	13.10	-
1362	eugenol	1.40	59.80
1380	copaene	-	0.36
1409	methyl eugenol	3.80	-
1420	β -caryophyllene	0.18	1.90
1447	cinnamyl acetate	0.09	4.78
1453	α -caryophyllene	-	0.50
1519	δ -cadinene	0.08	-
1538	eugenyl acetate	-	18.48
1582	caryophyllene oxide	0.10	0.71
1731	4-hydroxy-2-	-	-

RI: Índice de retención relativo a C8-C32 n-alkanos en Hewlett-Packard HP-1 columna.

4.2. RESULTADOS *in vitro* DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DE LOS ACEITES ESENCIALES

4.2.1. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DE LOS ACEITES ESENCIALES SOBRE EL CRECIMIENTO MICELIAR. VELOCIDAD DE CRECIMIENTO

Botryotinia fuckeliana

En la figura 13 se muestra el crecimiento radial en mm de *Botryotinia fuckeliana* en los distintos medios ensayados.

Se observa que el crecimiento del hongo en el medio PDA es superior que en los medios PDA-Laurel-300 µg/mL y PDA-Canela-300 µg/mL.

BF es un hongo de crecimiento rápido que llega a ocupar la placa Petri de 150 mm, como se puede observar la velocidad de crecimiento en medio PDA fue de 6 mm/día.

En el medio PDA-Laurel el hongo creció a 4,9 mm/día provocando una reducción en la velocidad de crecimiento del 18,3%.

En PDA-Canela el hongo creció a 4,4 mm/día provocando una reducción en la velocidad del crecimiento del 26,7%.

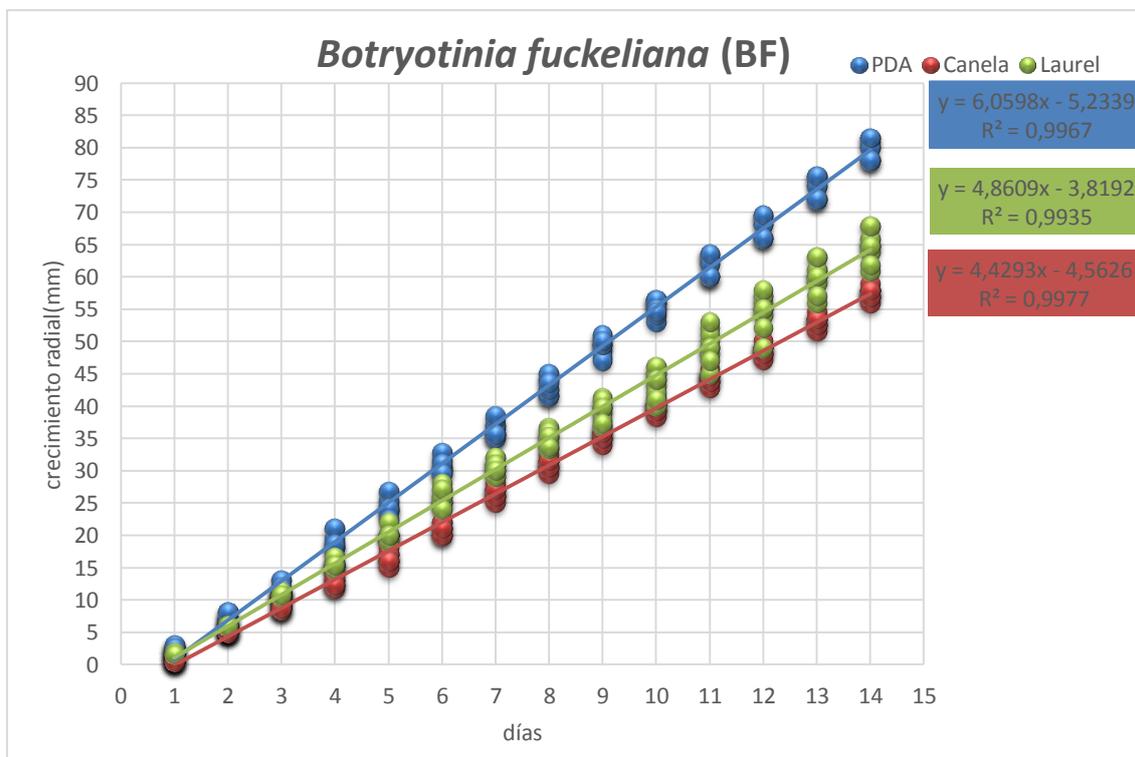
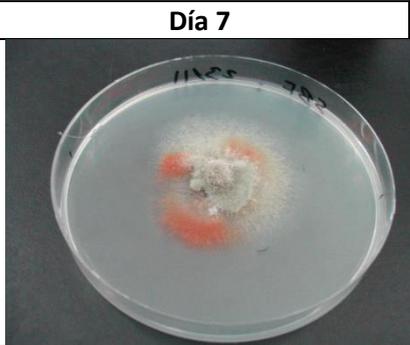
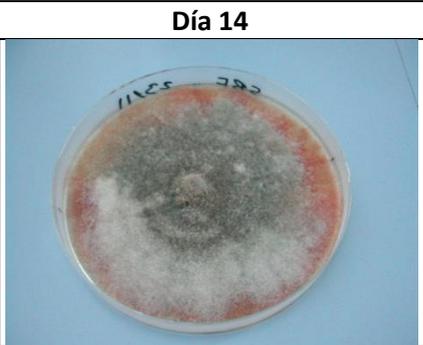
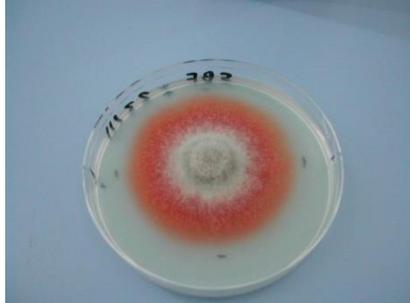


Figura 13. Gráfico del crecimiento radial (mm) de *Botryotinia fuckeliana* en los distintos medios ensayados: PDA, PDA-Laurel-300 µg/mL y PDA-Canela- 300 µg/mL.

RESULTADOS

El tamaño, la textura y el color de las colonias aparecen diferentes según el medio de cultivo (Tabla 2). En medio PDA las colonias presentan una coloración grisácea y roja. En los medios de cultivo que contienen aceite, además de presentar un menor tamaño la colonia también presento una coloración distinta, el séptimo día en el medio PDA-Canela la coloración tiende hacia tonos rojo intenso, mientras que en el medio de cultivo PDA-Laurel la coloración tiende hacia tonos grises.

Tabla 2. Crecimiento micelial de *Botryotinia fuckeliana* en los distintos medios ensayados a los 7 y a los 14 días de inoculación.

	Día 7	Día 14
PDA (Control) Placas Petri de 150 mm de diámetro		
PDA-Canela-300 µg/mL Placas Petri de 90 mm de diámetro		
PDA-Laurel-300 µg/mL Placas Petri de 90 mm de diámetro		

RESULTADOS

Epicoccum nigrum

En la figura 14 se muestra el crecimiento radial en mm de *Epicoccum nigrum* en los distintos medios ensayados.

El hongo el día 14 en medio PDA tiene un tamaño medio de 37 mm de radio. Siendo la velocidad de crecimiento 2,6 mm/día.

En PDA-Laurel 300 µg/mL el crecimiento fue muy similar, creció 2,2 mm/día, provocando una reducción de la velocidad de crecimiento del 15%.

Por otro lado, en PDA-Canela-300 µg/mL se inhibió totalmente su crecimiento hasta el quinto día, luego creció una media de 0,43 mm/día, provocando una inhibición del 84% de la velocidad de crecimiento.

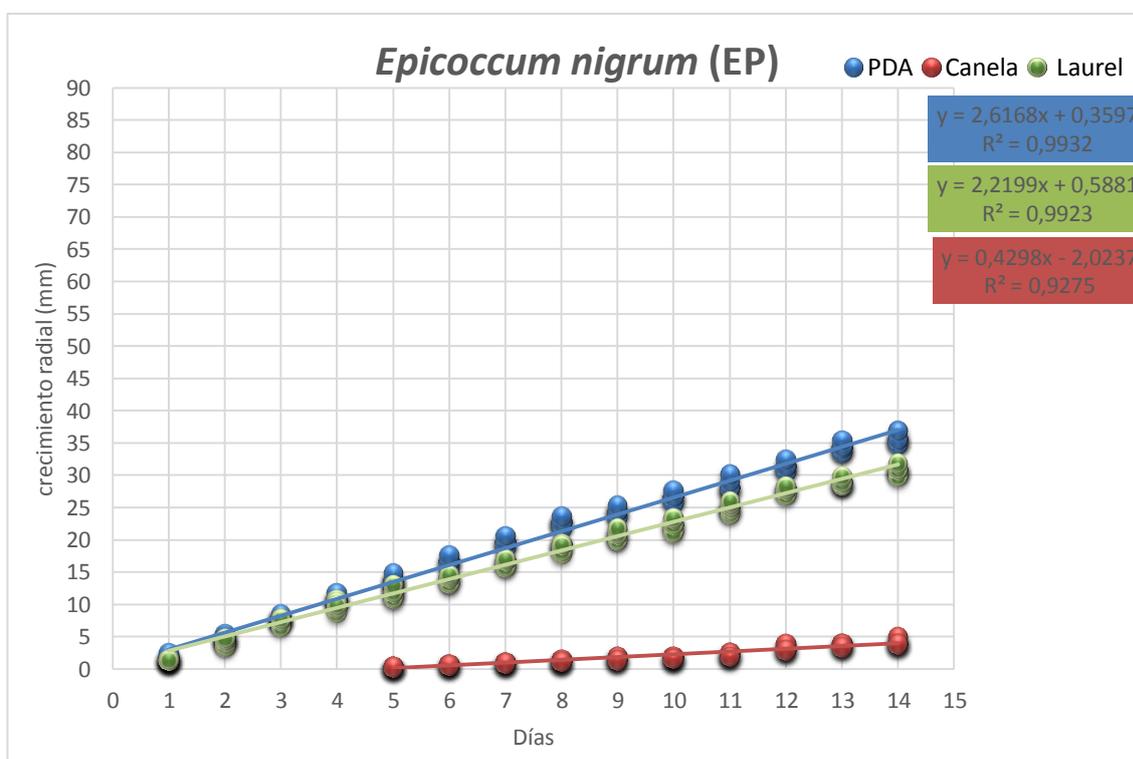
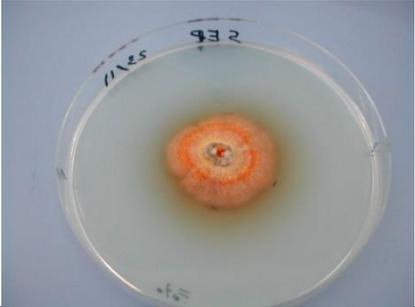


Figura 14. Gráfico del crecimiento radial (mm) de *Epicoccum nigrum* en los distintos medios ensayados: PDA, PDA-Laurel-300 µg/mL y PDA-Canela-300 µg/mL.

RESULTADOS

Nuevamente se aprecia que el tamaño, la textura y el color de las colonias varía según el medio donde se hayan cultivado (Tabla 3). En medio PDA las colonias presentan una coloración naranja-marrón. En medio PDA-Laurel el micelio adquirió tonos amarillos y el medio de cultivo se pigmento de rojo oscuro. En medio PDA-Canela se observó que el micelio queda pegado al sustrato, que no hay crecimiento aéreo, y que tanto el micelio como el medio de cultivo muestran una coloración menos intensa.

Tabla 3. Crecimiento micelar de *Epicoccum nigrum* en los distintos medios ensayados a los 7 y a los 14 días de inoculación.

	Día 7	Día 14
PDA (Control) Placas Petri de 150 mm de diámetro		
PDA-Canela- 300 µg/mL Placas Petri de 90 mm de diámetro		
PDA-Laurel- 300 µg/mL Placas Petri de 90 mm de diámetro		

RESULTADOS

Curvularia hawaiiensis

En la figura 15 se muestra el crecimiento radial en mm de *Curvularia hawaiiensis* en los distintos medios ensayados.

Al día 14 en medio PDA tiene un tamaño medio de 52 mm de radio. Siendo la velocidad de crecimiento 3,7 mm/día.

En PDA-Laurel-300 µg/mL el crecimiento fue ligeramente inferior, creció 2,9 mm/día, provocando una reducción de la velocidad de crecimiento del 21,6%.

Por otro lado, en PDA-Canela-300 µg/mL se inhibió drásticamente el crecimiento radial del hongo, ya que, no se registró crecimiento hasta el tercer día, creciendo a 1,3 mm/día y alcanzando una reducción del 65% en la velocidad de crecimiento.

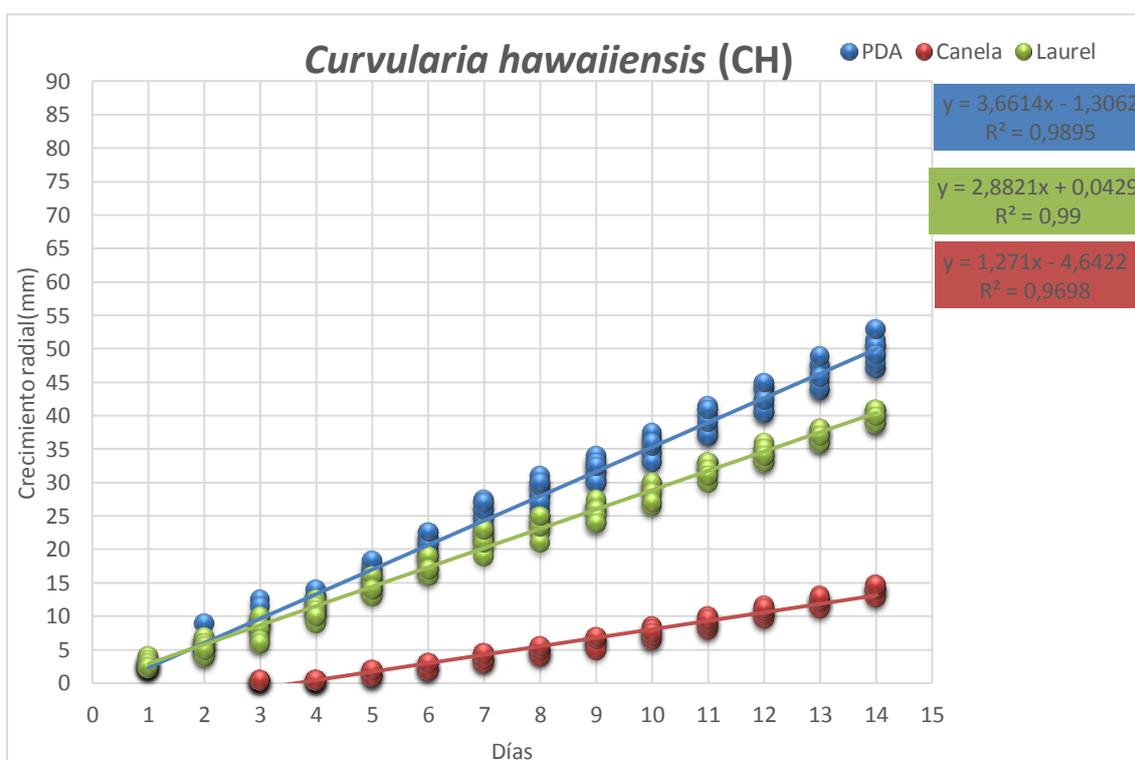
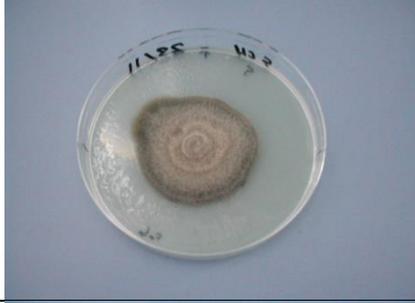


Figura 15. Gráfico del crecimiento radial (mm) de *Curvularia hawaiiensis* en los distintos medios ensayados: PDA, PDA-Laurel-300 µg/mL y PDA-Canela-300 µg/mL.

RESULTADOS

En CH también se observa que el tamaño de la colonia, la textura y la intensidad de la coloración del hongo varía según el medio en el que se haya cultivado (Tabla 4). En PDA-Canela el tamaño de la colonia es mucho menor, el hongo se mantiene muy pegado al sustrato y no hay crecimiento aéreo. Mientras que en medio PDA-Laurel se observa una coloración más oscura del micelio y una reducción de su tamaño.

Tabla 4. Crecimiento micelial de *Curvularia hawaiiensis* en los distintos medios ensayados a los 7 y a los 14 días de inoculación.

	Día 7	Día 14
<p>PDA (Control)</p> <p>Placas Petri de 150 mm de diámetro</p>		
<p>PDA-Canela-300 µg/mL</p> <p>Placas Petri de 90 mm de diámetro</p>		
<p>PDA-Laurel-300 µg/mL</p> <p>Placas Petri de 90 mm de diámetro</p>		

RESULTADOS

Aspergillus niger

En la figura 16 se muestra el crecimiento radial en mm de *Aspergillus niger* en los distintos medios ensayados.

El hongo el día 14 en medio PDA tiene un tamaño medio de 36 mm de radio. Siendo la velocidad de crecimiento 2,5 mm/día.

En PDA-Laurel-300 µg/mL el crecimiento fue inferior, creció 2,2 mm/día, provocando una reducción de la velocidad de crecimiento del 15%.

Por otro lado, en PDA-Canela-300 µg/mL se redujo el crecimiento del hongo durante los cinco primeros días, pero en los siguientes días, este aceite esencial potenció el crecimiento, llegando a alcanzar valores similares o incluso superiores, con una velocidad de 2,87 mm/día frente a 2,52 mm/día en el medio PDA control, siendo los valores de velocidad de crecimiento más bajos cuando el hongo crece en PDA-Laurel.

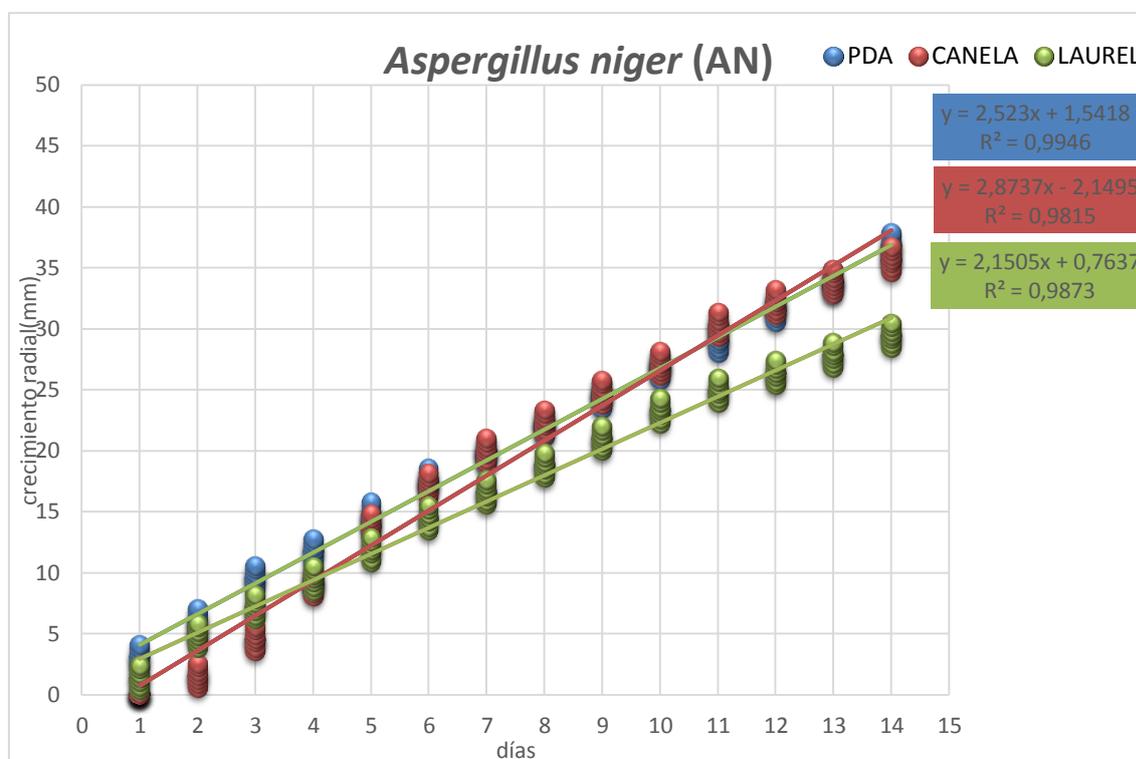


Figura 16. Gráfico del crecimiento radial (mm) de *Aspergillus niger* en los distintos medios ensayados: PDA, PDA-Laurel 300 µg/mL y PDA-Canela-300 µg/mL.

RESULTADOS

En la tabla 5 se observa el crecimiento de las colonias de *A. niger* en los diferentes medios y la facilidad de esporulación y dispersión de sus conidios, se aprecia que en el medio PDA-Canela el hongo alcanza la mayor velocidad de crecimiento.

Tabla 5. Crecimiento micelial de *Aspergillus niger* en los distintos medios ensayados a los 7 y a los 14 días de inoculación.

	Día 7	Día 14
PDA (Control) Placas Petri de 150 mm de diámetro		
PDA-Canela-300 µg/mL Placas Petri de 90 mm de diámetro		
PDA-Laurel-300 µg/mL Placas Petri de 90 mm de diámetro		

4.2.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En la figura 17 se muestran los resultados estadísticos de las distintas condiciones estudiadas.

En el caso de *Botryotinia fuckeliana* vemos que existe diferencias significativas en el crecimiento radial del hongo entre el medio PDA y los medios PDA-Canela y PDA-Laurel, pero no existe diferencias significativas en el hongo crecido en los medios PDA-Canela y PDA-Laurel.

Para *Epicoccum nigrum* vemos que existen diferencias significativas entre los tres medios de cultivo ensayados, entre PDA y PDA-Laurel la diferencia de crecimiento no es muy grande, pero es significativa. Entre PDA y PDA-Canela la diferencia entre las medias de crecimiento es muy grande, 19.9 cm en PDA frente a 1.47 cm en PDA-Canela.

La especie *Curvularia hawaiiensis* se comporta de forma similar a *Epicoccum nigrum*. Vemos diferencias significativas entre los tres medios de cultivo ensayados. Los medios de crecimiento PDA y PDA-Laurel presentan unas medias de crecimiento más próximas entre sí, pero con diferencias significativas, mientras que, la media de crecimiento en PDA-Canela es muy inferior a las anteriores.

En la especie *Aspergillus niger* existen diferencias significativas entre el crecimiento en medio PDA-Laurel con el medio PDA y con el medio PDA-Canela. Sin embargo, no existen diferencias significativas entre PDA y PDA-Canela.

RESULTADOS

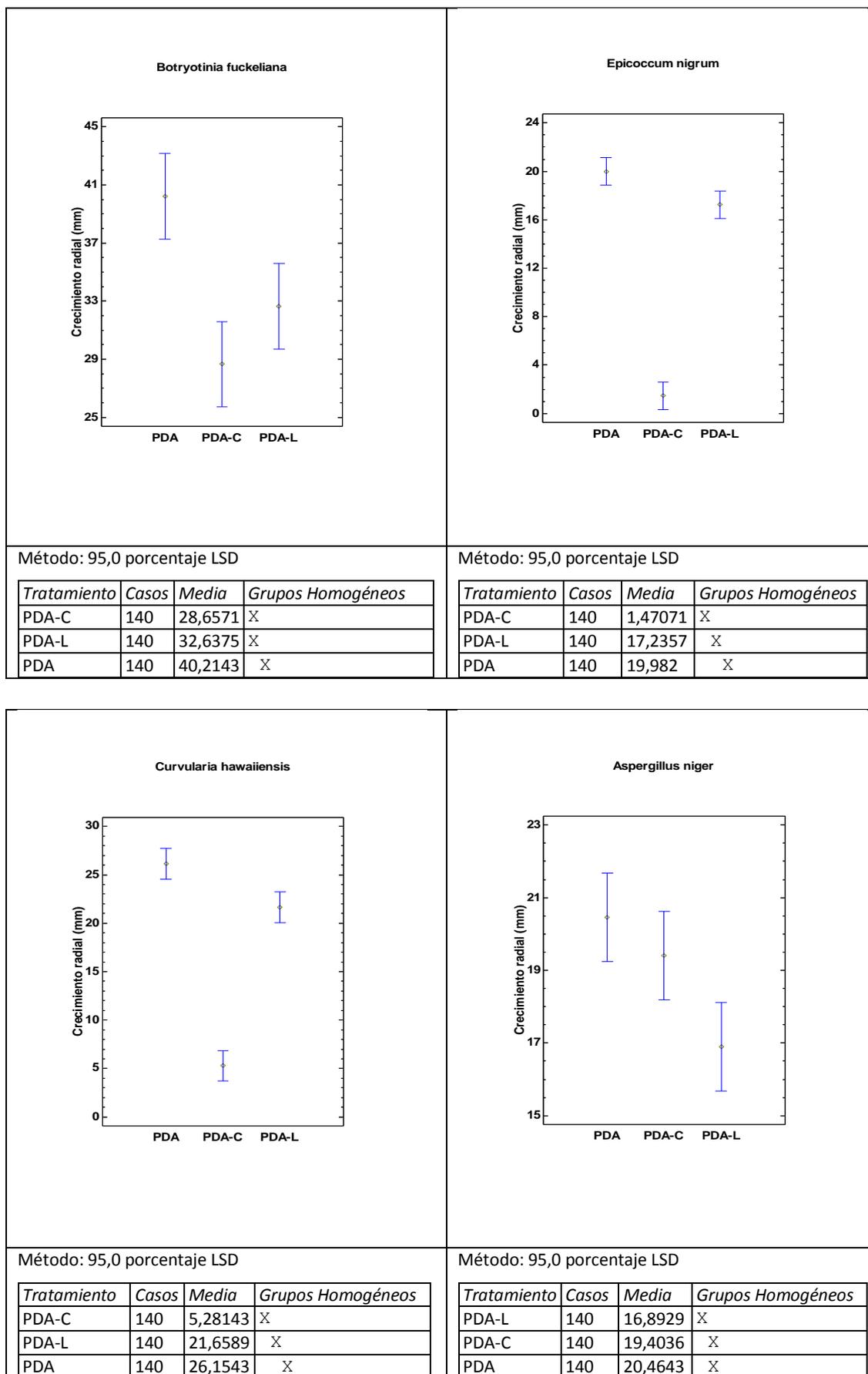


Figura 17. Representación gráfica de los valores medios e intervalos LSD del efecto de los tratamientos Canela y Laurel sobre el crecimiento de *Botryotinia fuckeliana*, *Epicoccum nigrum*, *Curvularia hawaiiensis* y *Aspergillus niger*.

RESULTADOS

4.2.3. CÁLCULO DE LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO MICELIAR (MGI)

En la tabla 6 se muestra la media del diámetro micelar (mm) del día siete, de *Botryotinia fuckeliana* (BF), *Epicoccum nigrum* (EN), *Curvularia hawaiiensis* (CH) y *Aspergillus niger* (AN) en los distintos medios de cultivo: PDA (control), PDA-Laurel-300 µg/mL, PDA-Canela-300 µg/mL.

Tabla 6. . Crecimiento medio (mm) de los distintos hongos ensayados para cada medio a los 7 días de incubación.

HONGO	Diámetro de la colonia (mm)		
	PDA-Control	PDA-Laurel-300 µg/mL(DO)	PDA-Canela-300 µg/mL(DO)
BF	80,8	69,2	61,2
EN	47,3	41,2	10,0
CH	58,7	50,9	15,7
AN	42,3	41,0	47,8

A continuación, se calcula y se representa la inhibición del crecimiento micelar (MGI) para los medios de cultivo ensayados.

El aceite esencial de canela, como se puede observar, provocó inhibiciones muy satisfactorias en *Epicoccum nigrum* y *Curvularia hawaiiensis* (78,9 y 73,3% respectivamente), en *Botryotinia fuckeliana* consiguió una buena inhibición (24,3%) y en el caso del *Aspergillus niger* dio un resultado de inhibición negativo (-0,8%), potenciando ligeramente su crecimiento.

En el caso del aceite esencial de laurel, la inhibición fue modesta y regular en las cuatro especies, provocando una inhibición del crecimiento micelar del 14,4% en *Botryotinia fuckeliana*, 12,8% en *Epicoccum nigrum*, 13,3% en *Curvularia hawaiiensis* y 13,5% en *Aspergillus niger*.

RESULTADOS

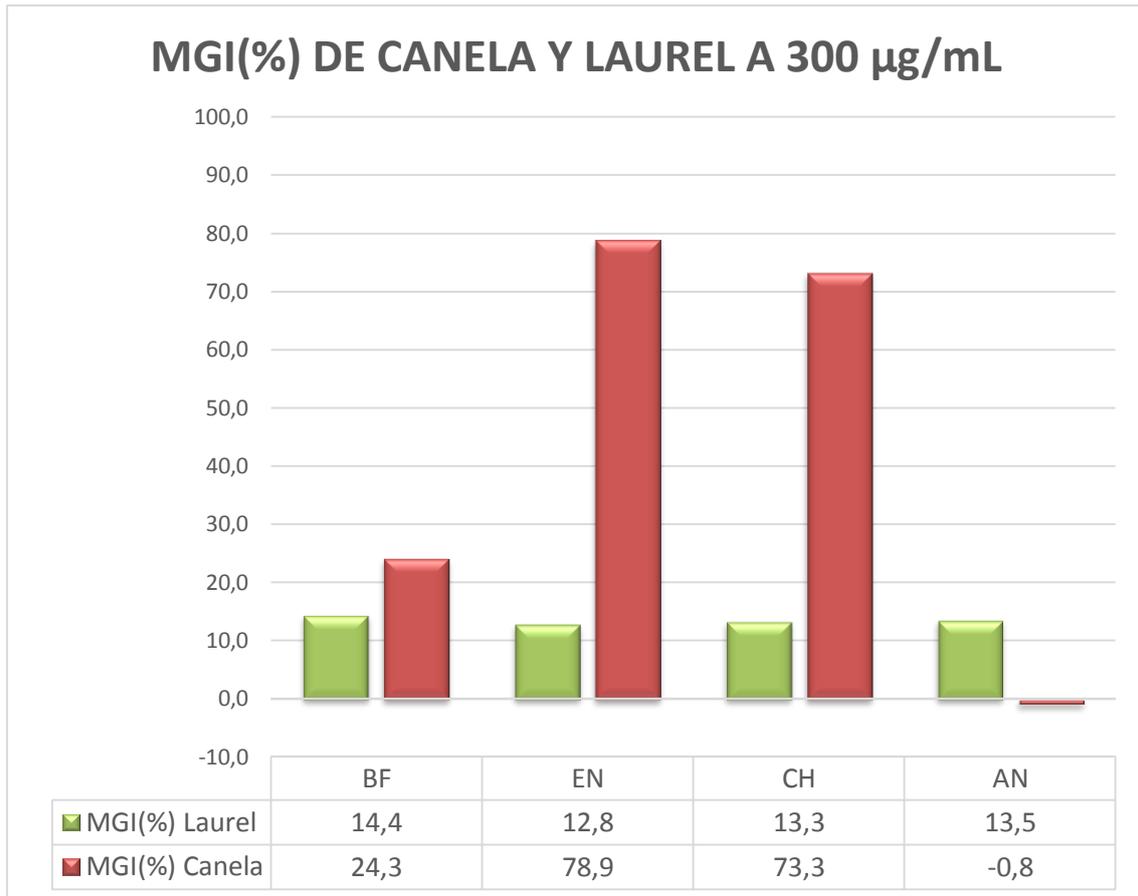


Figura 18. Representación gráfica del MGI (%) de los aceites de canela y laurel a 300 µg/mL en las distintas especies ensayadas.

Dada la escasa efectividad como antifúngico del aceite de laurel se descartó para los ensayos posteriores. Del mismo modo también se descartó el hongo *Aspergillus niger* por los bajos resultados obtenidos.

RESULTADOS

4.2.4. CÁLCULO DE LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO MICELIAR (MGI) DEL ACEITE ESENCIAL DE CANELA A DIFERENTES DOSIS

En la tabla 7 se muestra la media del diámetro micelar (mm) del día siete, de *Botryotinia fuckeliana*(BF), *Epicoccum nigrum*(EN), *Curvularia hawaiiensis*(CH) y *Aspergillus niger*(AN) en los distintos medios de cultivo: PDA (control), PDA-Canela-100 µg/mL, PDA-Canela-200 µg/mL, PDA-Canela-300 µg/mL.

Tabla 7. Crecimiento medio (mm) de los distintos hongos ensayados en PDA-Canela a 100-200-300 µg/mL a los 7 días de incubación.

HONGO	Diámetro de la colonia (mm)			
	PDA-Control	PDA-Canela-100 µg/mL	PDA-Canela-200 µg/mL	PDA-Canela-300 µg/mL
BF	80,8	72,3	63,4	61,2
EN	47,3	33,8	10,6	10,0
CH	58,7	42,0	15,3	15,7

A continuación, se calcula y se representa la inhibición del crecimiento micelar (MGI) para los medios de cultivo ensayados.

Como se observa en la figura 19, para las tres primeras especies fúngicas, *Botryotinia fuckeliana*, *Epicoccum nigrum* y *Curvularia hawaiiensis*, los resultados fueron muy satisfactorios, la inhibición micelar a las concentraciones de 200 y 300 µg/mL fue prácticamente la misma, no se observan diferencias significativas, los resultados no varían más de un tres por ciento en ninguna de estas tres especies. Sin embargo, en el ensayo a una concentración de 100 µg/mL el poder inhibitorio sí que disminuyó significativamente.

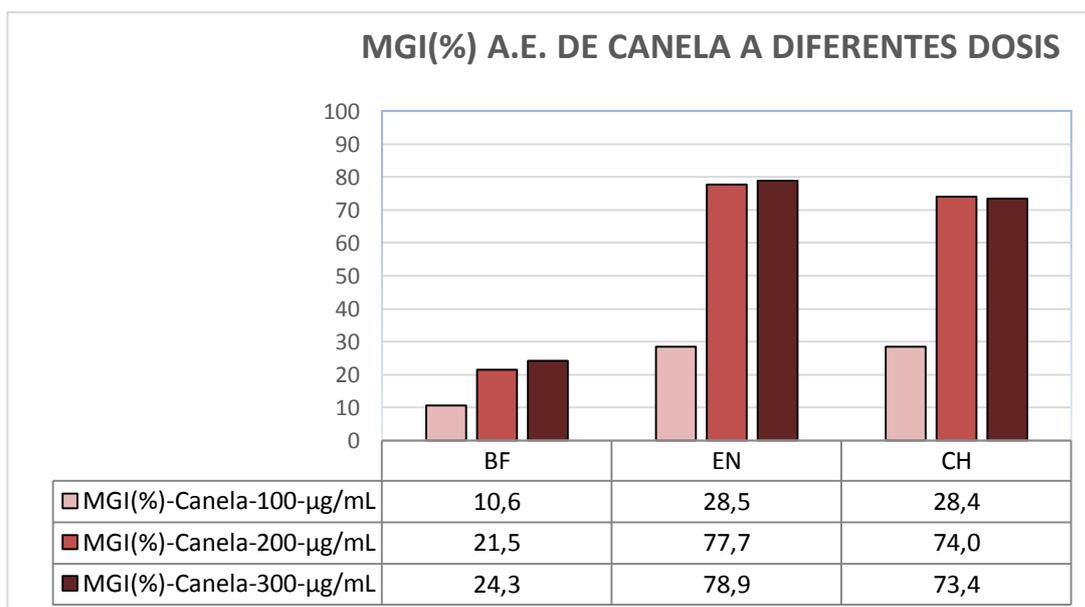


Figura 19. Representación gráfica del MGI (%) en cada especie para distintas concentraciones de aceite esencial de canela 100-200-300 µg/mL.

RESULTADOS

4.2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO MGI CANELA A TRES CONCENTRACIONES

Como puede observarse en las figuras 20 y 21, no existen diferencias significativas entre los ensayos a 300 $\mu\text{g/mL}$ y los ensayos a 200 $\mu\text{g/mL}$ para ninguna de las tres especies, las dimensiones de los diámetros se mantienen muy similares a ambas concentraciones. Mientras que, a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$, la medida de los diámetros sí que aumenta significativamente.

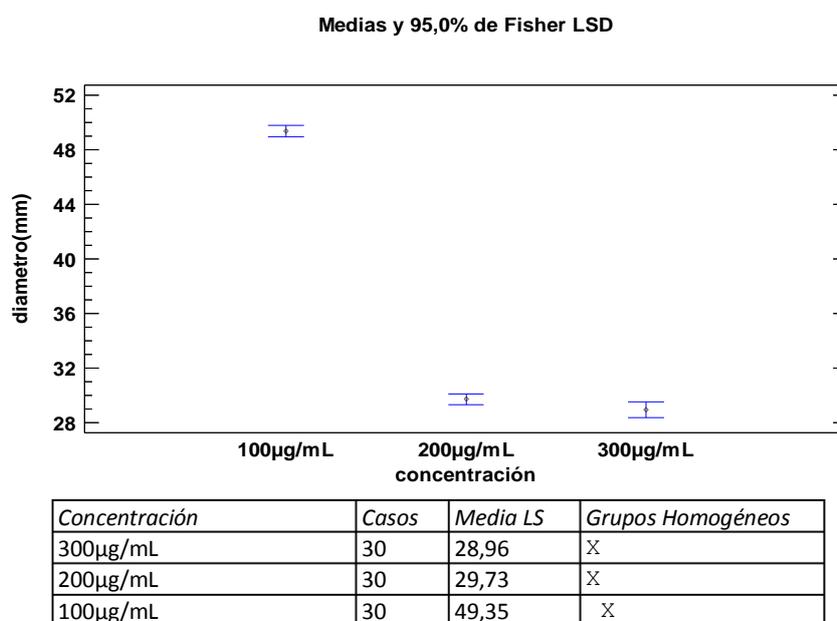


Figura 20. Representación gráfica medias de Fisher LSD para canela a tres concentraciones.

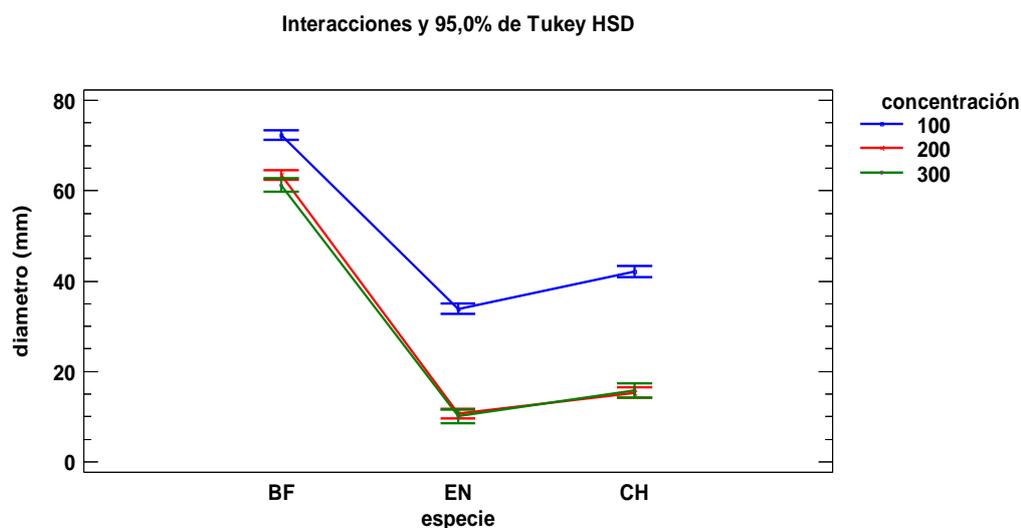


Figura 21. Representación gráfica intervalos Tukey HSD para canela a tres concentraciones.

4.3. ENSAYOS *in vivo* EN UVA DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL ACEITE ESENCIAL DE CANELA FRENTE A *Botryotinia fuckeliana*

Tabla 8. Porcentajes de uvas manchadas, turgentes y desprendidas, con aceite y sin aceite.

	Uvas manchadas (%)		Uvas turgentes (%)		Uvas desprendidas (%)	
	día 7	día 14	día 7	día 14	día 7	día 14
sin aceite	43	76	10	5	22	22
con aceite	5	43	98	55	0	0

Ensayos en uva de la variedad moscatel sobre la actividad antifúngica del aceite esencial de canela frente a *Botryotinia fuckeliana* a 21°C y 85% HR.

En este ensayo se realizaron dos mediciones, una a día 7 y otra a día 14. El porcentaje de uvas manchadas sin aceite esencial de canela, es mucho mayor que el de las uvas que sí que fueron bañadas en el aceite esencial. A día siete, en las uvas con aceite, el porcentaje de frutos manchados fue prácticamente nulo, solo en un 5% de uvas se apreció manchas producidas por el hongo. Sin embargo, para ese mismo día, gran parte de las uvas que no habían sido tratadas con el aceite mostraban manchas o síntomas del hongo *Botryotinia fuckeliana*. A día 14 el porcentaje de uva manchada en aquellas uvas tratadas con aceite aumento, pero continuó siendo muy inferior al de las uvas sin aceite.

La turgencia de las uvas también se vio afectada de forma similar, las uvas tratadas con aceite mantuvieron mucho más el tiempo turgencia. Mientras que, a día 7, solamente un diez por ciento de las uvas sin aceite mantenían la turgencia.

También se compara el número de uvas desprendidas entre las uvas tratadas con aceite y las uvas sin aceite. En las uvas sin tratamiento, a día 7, se habían desprendido un 22%, mientras que, en las uvas con tratamiento, no se había desprendido ninguna. A partir del día 7 no se desprendió ninguna uva en ninguno de los dos ensayos, esto suponemos que es debido a la pérdida de peso que sufrieron por deshidratación, pero al realizar el recuento, aquellas uvas no tratadas con el aceite se desprendían rápida, solo al tocar los racimos, lo que no ocurrió en el caso de las uvas tratadas con el aceite esencial de canela.

También se observó que las uvas con aceite mantuvieron un color verde brillante, mientras que, las uvas sin aceite adquirieron una coloración marronacea.

RESULTADOS



Figura 23. Uvas colgadas con aceite (izquierda) y sin aceite (derecha).



Figura 22. Uvas sin aceite (arriba) y uvas con aceite (debajo) en bandejas.



Figura 24. Uvas con aceite.



Figura 25. Uvas sin aceite



Figura 26. Racimo de uva sin aceite infectado de Botryotinia fuckeliana.

5. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- El aceite esencial de canela contiene un 92% de compuestos oxigenados, siendo el eugenol el mayoritario con un 60% aproximadamente, seguido del éster eugenyl acetate (18,3%). Los hidrocarburos suponen el 5% de su composición.
- El aceite esencial de laurel presenta un 78,8% de compuestos oxigenados, siendo los mayoritarios el eucaliptol (51%) y el éster α -terpinenyl acetate (13%). Los hidrocarburos se encuentran en un 18%.
- El aceite esencial de Laurel (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en los ensayos *in vitro* se mostró poco efectivo en la reducción de la velocidad de crecimiento en las cuatro especies estudiadas.
- El aceite esencial de Canela (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en los ensayos *in vitro* produjo la reducción de la velocidad de crecimiento en tres de las cuatro especies estudiadas; en *Botryotinia fuckeliana* fue de 4,4 mm/día vs 6,0 mm/día, en *Epicoccum nigrum* 0,43 mm/día vs 2,6 mm/día, y en *Curvularia hawaiiensis* 1,3 mm/día vs 3,7 mm/día. Por el contrario, en *Aspergillus niger* potenció ligeramente la velocidad de crecimiento.
- Estos ensayos ponen de manifiesto la eficacia del aceite de canela en el control de los hongos *Epicoccum nigrum* y *Curvularia hawaiiensis*, así como en la reducción en la velocidad de crecimiento de *Botryotinia fuckeliana*.
- El cálculo del MGI mostró que el aceite esencial de canela provocó inhibiciones muy satisfactorias en *Epicoccum nigrum* y *Curvularia hawaiiensis* (78,9 y 73,3% respectivamente), y en *Botryotinia fuckeliana* el 24,3%. En *Aspergillus niger* el resultado fue negativo, lo que significa que potencia su crecimiento. En el caso del aceite esencial de laurel, la inhibición fue modesta y regular en las cuatro especies. Resultados que coinciden con los obtenidos en la velocidad de crecimiento.
- El aceite de canela es igualmente efectivo a la dosis de 200 y 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en la inhibición del crecimiento de los hongos *Botryotinia fuckeliana*, *Epicoccum nigrum*, *Curvularia hawaiiensis*. No existen diferencias significativas entre las dosis ensayadas.
- El aceite de canela demostró la efectividad en la conservación de la uva de mesa frente a *Botryotinia fuckeliana*. Redujo notablemente el porcentaje de uvas desprendidas y manchadas, y mejoro la turgencia y el aspecto visual de las uvas.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- ADAMS, R. P. (2001). Quadrupole mass spectra of compounds listed in order of their retention time on DB-5. Identification of essential oils components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. *Quadruple mass spectroscopy*.
- AGRIOS, G. N. (2005). Plant diseases caused by fungi. *Plant Pathology*. Elsevier Academic Press, California, 385-614.
- ALBUQUERQUE, C. C. D., CAMARA, T. R., MARIANO, R. D. L. R., WILLADINO, L., MARCELINO JÚNIOR, C., & ULISSES, C. (2006). Antimicrobial action of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49(4), 527-535.
- ARMENDÁRIZ-BARRAGÁN, B., ÁLVAREZ-ROMÁN, R., & GALINDO-RODRÍGUEZ, S. A. (2016). Formulación de productos naturales en sistemas de liberación micro-y nanoparticulados. *OmniaScience Monographs*.
- ASBAHANI, A., MILADI, K., BADRI, W., SALA, M., ADDI, E. A., CASABIANCA, H., ... & ELAISSARI, A. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International journal of pharmaceutics*, 483(1), 220-243.
- ASSIS, C. P., GONDIM, M. G., DE SIQUEIRA, H. A., & DA CÂMARA, C. A. (2011). Toxicity of essential oils from plants towards *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) and *Suidasia pontifica* Oudemans (Acari: Astigmata). *Journal of stored products research*, 47(4), 311-315.
- BAGAMBOULA, C. F., UYTENDAELE, M., & DEBEVERE, J. (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food microbiology*, 21(1), 33-42.
- BARRERA-NECHA, L. L., GARDUNO-PIZANA, C., & GARCIA-BARRERA, L. J. (2009). In vitro antifungal activity of essential oils and their compounds on mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (Massey) Snyder and Hansen. *Plant Pathology Journal*, 8(1), 17-21.
- BARUAH, P., SHARMA, R. K., SINGH, R. S., & GHOSH, A. C. (1996). Fungicidal activity of some naturally occurring essential oils against *Fusarium moniliforme*. *Journal of Essential Oil Research*, 8(4), 411-412.
- BELLETTI, N., LANCIOTTI, R., PATRIGNANI, F., & GARDINI, F. (2008). Antimicrobial Efficacy of Citron Essential Oil on Spoilage and Pathogenic Microorganisms in Fruit-Based Salads. *Journal of Food Science*, 73(7), M331-M338.
- BOUZOUITA, N., NAFTI, A., CHAABOUNI, M. M., LOGNAY, G. C., MARLIER, M., ZGHOULLI, S., & THONART, P. (2001). Chemical composition of *Laurus nobilis* oil from Tunisia. *Journal of Essential Oil Research*, 13(2), 116-117.
- BOYLE, W. (1955). Spices and essential oils as preservatives. *Pharm. J. Spices (EBBD, 190317544)*.
- BURT, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.

BIBLIOGRAFÍA

- BUSTAMANTE, J. B. (2012). Estandarización y optimización de técnicas moleculares para la detección de *Botrytis cinerea*, *Ralstonia solanacearum* y cmv (cucumber mosaic cucumovirus) en rubros agrícolas de interés para el INIAP.
- CALLE, M. (2010). Control de la germinación in vitro de *Araujia sericifera* con aceites esenciales de *Laurus nobilis*, *Myrtus communis*, *Citrus sinensis* y *Citrus limon*. Tesis de Máster en Ciencias Biológicas. Universidad Politécnica de Valencia.
- CARDINALE, M., BERG, G., COMPANT, S., & MATHIEU, F. (2016). Ecology and function of grape-associated microorganisms with a special focus on biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Biocontrol of Major Grapevine Diseases: Leading Research*, 52.
- CHENG, S. S., LIU, J. Y., TSAI, K. H., CHEN, W. J., & CHANG, S. T. (2004). Chemical composition and mosquito larvicidal activity of essential oils from leaves of different *Cinnamomum osmophloeum* provenances. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(14), 4395-4400.
- CORATO, U. DE, MACCIONI, O., TRUPO, M., & DI SANZO, G. (2010). Use of essential oil of *Laurus nobilis* obtained by means of a supercritical carbon dioxide technique against post harvest spoilage fungi. *Crop protection*, 29(2), 142-147.
- DA SILVEIRA, S. M., LUCIANO, F. B., FRONZA, N., CUNHA, A., SCHEUERMANN, G. N., & VIEIRA, C. R. W. (2014). Chemical composition and antibacterial activity of *Laurus nobilis* essential oil towards foodborne pathogens and its application in fresh Tuscan sausage stored at 7° C. *LWT-Food Science and Technology*, 59(1), 86-93.
- DADALIOGLU, I., & EVRENDILEK, G. A. (2004). Chemical compositions and antibacterial effects of essential oils of Turkish oregano (*Origanum minutiflorum*), bay laurel (*Laurus nobilis*), Spanish lavender (*Lavandula stoechas* L.), and fennel (*Foeniculum vulgare*) on common foodborne pathogens. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(26), 8255-8260.
- DAFERERA, D. J., ZIOGAS, B. N., & POLISSIOU, M. G. (2003). The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop protection*, 22(1), 39-44.
- DAYAN, F. E., CANTRELL, C. L., & DUKE, S. O. (2009). Natural products in crop protection. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(12), 4022-4034.
- DERWICH, E., BENZIANE, Z., & BOUKIR, A. (2009). Chemical composition and antibacterial activity of leaves essential oil of *Laurus nobilis* from Morocco. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(4), 3818-3824.
- DÍAZ, R. M. J., & SEGUÍ, E. M. (2010). *Enfermedades de las plantas causadas por hongos y oomicetos: naturaleza y control integrado*. Phytoma España.
- FAVARO, L. C., DE SOUZA SEBASTIANES, F. L., & ARAÚJO, W. L. (2012). *Epicoccum nigrum* P16, a sugarcane endophyte, produces antifungal compounds and induces root growth. *PLoS One*, 7(6), e36826.
- FLAMINI, G., TEBANO, M., CIONI, P. L., CECCARINI, L., RICCI, A. S., & LONGO, I. (2007). Comparison between the conventional method of extraction of essential oil of *Laurus*

BIBLIOGRAFÍA

- nobilis L. and a novel method which uses microwaves applied in situ, without resorting to an oven. *Journal of Chromatography A*, 1143(1), 36-40.
- FUNGORUM, I. (2006). Index Fungorum.
- GONI, P., LOPEZ, P., SÁNCHEZ, C., GÓMEZ-LUS, R., BECERRIL, R., & NERÍN, C. (2009). Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*, 116(4), 982-989.
- GOUBRAN, F. H., & HOLMES, R. J. (1993). The development of alternative fungicides from essential oils. *Victoria, Australia: Institute for Horticultural Development, Knoxfield, Department of Agriculture*, 1-45.
- GUTIERREZ, J., BARRY-RYAN, C., & BOURKE, P. (2008). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International journal of food microbiology*, 124(1), 91-97.
- HELANDER, I. M., ALAKOMI, H. L., LATVA-KALA, K., MATTILA-SANDHOLM, T., POL, I., SMID, E. J., ... & VON WRIGHT, A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(9), 3590-3595.
- HIBBETT, D. S., OHMAN, A., & KIRK, P. M. (2009). Fungal ecology catches fire. *New Phytologist*, 184(2), 279-282.
- HSUAN, H., ZAKARIA, L., & SALLEH, B. (2010). Characterization of Fusarium isolates from rice, sugarcane and maize using RFLP-IGS. *Journal of Plant Protection Research*, 50(4), 409-415.
- ITO, M. (2008). Studies on perilla, agarwood, and cinnamon through a combination of fieldwork and laboratory work. *Journal of natural medicines*, 62(4), 387-395.
- KHAN, M. S., AHMAD, E., ZAIDI, A., & OVES, M. (2013). Functional aspect of phosphate-solubilizing bacteria: importance in crop production. In *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Productivity* (pp. 237-263). Springer Berlin Heidelberg.
- KILIC, A., & ALTUNTAS, E. (2006). Wood and bark volatile compounds of Laurus nobilis L. *Holz als Roh-und Werkstoff*, 64(4), 317-320.
- KNAAK, N., DA SILVA, L. D., ANDREIS, T. F., & FIUZA, L. M. (2013). Chemical characterization and anti-fungal activity of plant extracts and essential oils on the Bipolaris oryzae and Gerlachia oryzae phytopathogens. *Australasian Plant Pathology*, 42(4), 469-475.
- LAMBERT, R. J. W., SKANDAMIS, P. N., COOTE, P. J., & NYCHAS, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of applied microbiology*, 91(3), 453-462.
- LEE, H. C., CHENG, S. S., & CHANG, S. T. (2005). Antifungal property of the essential oils and their constituents from Cinnamomum osmophloeum leaf against tree pathogenic fungi. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(12), 2047-2053.

BIBLIOGRAFÍA

- LIN, Z. K., HUA, Y. F., GONG, G. P., & GU, Y. H. (1990). Chemical constituents of the essential oils from the leaves of *Laurus nobilis* and tendency in changes of the constituents month by month. *Acta. Botanica. Sinica*, 32, 878-882.
- LÓPEZ, P., SANCHEZ, C., BATLLE, R., & NERÍN, C. (2007). Vapor-phase activities of cinnamon, thyme, and oregano essential oils and key constituents against foodborne microorganisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(11), 4348-4356.
- MANAMGODA, D. S., ROSSMAN, A. Y., CASTLEBURY, L. A., CROUS, P. W., MADRID, H., CHUKATEIROTE, E., & HYDE, K. D. (2014). The genus *bipolaris*. *Studies in mycology*, 79, 221-288.
- MAREI, G. I. K., RASOUL, M. A. A., & ABDELGALEIL, S. A. (2012). Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. *Pesticide biochemistry and physiology*, 103(1), 56-61.
- MAYAUD, L., CARRICAJÓ, A., ZHIRI, A., & AUBERT, G. (2008). Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. *Letters in applied microbiology*, 47(3), 167-173.
- MICHAEL DAVIDSON, P., PALOU, E., PARISH, M. E., & LOPEZ-MALO VIGIL, A. (2005). Methods for activity assay and evaluation of results. In P. Michael Davidson, J. N. Sofos, & A. L. Branen (Eds.), *Antimicrobials in Food, Third Edition* (pp. 659-680). CRC Press.
- MONTERO-PRADO, P., RODRIGUEZ-LAFUENTE, A., & NERIN, C. (2011). Active label-based packaging to extend the shelf-life of "Calanda" peach fruit: Changes in fruit quality and enzymatic activity. *Postharvest Biology and Technology*, 60(3), 211-219.
- MUELLER-RIEBAU, F., BERGER, B., & YEGEN, O. (1995). Chemical composition and fungitoxic properties to phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(8), 2262-2266.
- NATH, S. C., PATHAK, M. G., & BARUAH, A. (1996). Benzyl benzoate, the major component of the leaf and stem bark oil of *Cinnamomum zeylanicum* Blume. *Journal of Essential Oil Research*, 8(3), 327-328.
- ÖZCAN, M., & CHALCHAT, J. C. (2005). Effect of different locations on the chemical composition of essential oils of laurel (*Laurus nobilis* L.) leaves growing wild in Turkey. *Journal of medicinal food*, 8(3), 408-411.
- PITT, J. I., & HOCKING, A. D. (2009). *Fungi and food spoilage* (Vol. 519). New York: Springer.
- POLITEO, O., JUKIĆ, M., & MILOŠ, M. (2007). Chemical composition and antioxidant activity of free volatile aglycones from laurel (*Laurus nobilis* L.) compared to its essential oil. *Croatia chemica acta*, 80(1), 121-126.
- QIAN, Y., YU, H., HE, D., YANG, H., WANG, W., WAN, X., & WANG, L. (2013). Biosynthesis of silver nanoparticles by the endophytic fungus *Epicoccum nigrum* and their activity against pathogenic fungi. *Bioprocess and biosystems engineering*, 36(11), 1613-1619.

BIBLIOGRAFÍA

- RASOOLI, I., REZAEI, M. B., & ALLAMEH, A. (2006). Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. *International journal of infectious diseases*, 10(3), 236-241.
- ROSELLÓ, J., SEMPERE, F., SANZ-BERZOSA, I., CHIRALT, A., & SANTAMARINA, M. P. (2015). Antifungal activity and potential use of essential oils against *Fusarium culmorum* and *Fusarium verticillioides*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18(2), 359-367.
- SAMSON, R. A., HOEKSTRA, E. S., & FRISVAD, J. C. (2004). *Introduction to food-and airborne fungi* (No. Ed. 7). Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS).
- VERDEGUER SANCHO, M. M. (2011). *Fitotoxicidad de aceites esenciales y extractos acuosos de plantas mediterráneas para el control de arvenses*(Doctoral dissertation).
- SANTAMARINA, M. P., ROSELLÓ, J., SEMPERE, F., GIMÉNEZ, S., & BLÁZQUEZ, M. A. (2015). Commercial *Origanum compactum* Benth. and *Cinnamomum zeylanicum* Blume essential oils against natural mycoflora in Valencia rice. *Natural product research*, 29(23), 2215-2218.
- SERRANO, M., MARTINEZ-ROMERO, D., CASTILLO, S., GUILLÉN, F., & VALERO, D. (2005). The use of natural antifungal compounds improves the beneficial effect of MAP in sweet cherry storage. *Innovative food science & emerging technologies*, 6(1), 115-123.
- SIMIĆ, A., SOKOVIĆ, M. D., RISTIĆ, M., GRUJIĆ-JOVANOVIĆ, S., VUKOJEVIĆ, J., & MARIN, P. D. (2004). The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. *Phytotherapy Research*, 18(9), 713-717.
- SINGH, N., SINGH, R. K., BHUNIA, A. K., & STROSHINE, R. L. (2002). Efficacy of chlorine dioxide, ozone, and thyme essential oil or a sequential washing in killing *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce and baby carrots. *LWT-Food Science and Technology*, 35(8), 720-729.
- SOARES, C., CALADO, T., & VENÂNCIO, A. (2013). Mycotoxin production by *Aspergillus niger* aggregate strains isolated from harvested maize in three Portuguese regions. *Revista Iberoamericana de Micología*, 30(1), 9-13.
- SPADARO, D., & GULLINO, M. L. (2005). Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens. *Crop Protection*, 24(7), 601-613.
- SUMALAN, R. M., ALEXA, E., & POIANA, M. A. (2013). Assessment of inhibitory potential of essential oils on natural mycoflora and *Fusarium* mycotoxins production in wheat. *Chemistry Central Journal*, 7(1), 1.
- TORRES, L. (2009). *Hierbas aromáticas y especias: albahaca, perejil, canela, azafrán--*. Océano Ambar.
- TZORTZAKIS, N. G. (2007). Maintaining postharvest quality of fresh produce with volatile compounds. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(1), 111-116.
- TZORTZAKIS, N. G. (2009). Impact of cinnamon oil-enrichment on microbial spoilage of fresh produce. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(1), 97-102.
- UBILLOS, M. Á. M. (2009). *Plantas aromáticas gastronómicas*. Mundi-Prensa Libros.

BIBLIOGRAFÍA

- VALERO, A., MARÍN, S., RAMOS, A. J., & SANCHIS, V. (2007). Effect of preharvest fungicides and interacting fungi on *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A synthesis in dehydrating grapes. *Letters in applied microbiology*, 45(2), 194-199.
- VALERO, D., VALVERDE, J. M., MARTÍNEZ-ROMERO, D., GUILLÉN, F., CASTILLO, S., & SERRANO, M. (2006). The combination of modified atmosphere packaging with eugenol or thymol to maintain quality, safety and functional properties of table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 41(3), 317-327.
- VELLUTI, A., SANCHIS, V., RAMOS, A. J., EGIDO, J., & MARÍ, S. (2003). Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B 1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. *International journal of food microbiology*, 89(2), 145-154.
- VERDIAN-RIZI, M. (2009). Variation in the essential oil composition of *Laurus nobilis* L. of different growth stages cultivated in Iran. *Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(1), 33-36.
- WALKER, A. S., GLADIEUX, P., DECOGNET, V., FERMAUD, M., CONFAIS, J., ROUDET, J.,... & FOURNIER, E. (2015). Population structure and temporal maintenance of the multihost fungal pathogen *Botrytis cinerea*: causes and implications for disease management. *Environmental microbiology*, 17(4), 1261-1274.
- WILSON, C. L., SOLAR, J. M., EL GHAOUTH, A., & WISNIEWSKI, M. E. (1997). Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant disease*, 81(2), 204-210.