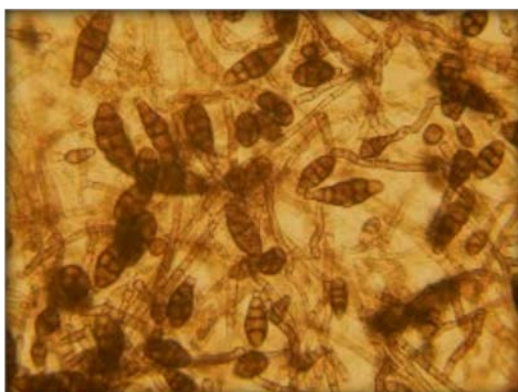


UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA



MASTER UNIVERSITARIO DE PRODUCCIÓN VEGETAL Y ECOSISTEMAS AGROFORESTALES



TITULO:

ESTUDIOS *in vitro* DE ACEITES ESENCIALES PARA EL CONTROL DE *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler AISLADA DEL ARROZ

PRESENTADO: Ramón José Cortina Badía

TUTORA ACADÉMICA: M^a PILAR SANTAMARINA SIURANA

COTUTORA: FRANCISCA SEMPERE FERRE

Septiembre 2014

Estudios *in vitro* de aceites esenciales para el control de *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler aislada del arroz

RESUMEN

Alternaria es un género frecuente en frutas y hortalizas, cereales, piensos y otros productos agrícolas. Puede producir fitotoxinas y/o micotoxinas, en el campo y en el almacén. Los frutos frescos y los vegetales son muy susceptibles del ataque por hongos en condiciones de elevada temperatura y humedad. Los aceites esenciales han mostrado en diversos trabajos propiedades antibacterianas y antifúngicas. La necesidad de reducir el uso de productos químicos sintéticos ha incrementado el interés por la aplicación de aceites esenciales y sus compuestos.

Los aceites se identificaron mediante cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas y la comparación del índice de Kovats. La actividad antifúngica *in vitro* de los aceites se evaluó siguiendo la metodología de SINGH y col. (2008) modificada. Los bioensayos se realizaron a la dosis de 300 µg/mL.

El crecimiento de *Alternaria* fue similar en PDA, y en PDA-laurel. El aceite de canela redujo cerca del 40% la velocidad de crecimiento del hongo con respecto al testigo, el de clavo la redujo algo más del 50% y el de orégano produjo un efecto inhibitorio total del crecimiento hasta el décimo día de lectura, posteriormente su velocidad de crecimiento 1,6 mmd-1 hasta el día 14 de lectura, lo que representa una reducción del 70% respecto al testigo.

La adición de los aceites de orégano, clavo y canela podrían ser una alternativa para el control de *Alternaria alternata* en frutos frescos y vegetales, en productos almacenados, así como en granos y semillas.

Palabras clave: Aceites esenciales, capacidad antifúngica, *Alternaria alternata*, laurel, canela, clavo, orégano.

INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales son líquidos aromáticos que se volatilizan al contacto con el aire. Pueden ser sintetizados por diferentes órganos de la planta: brotes, flores, hojas, tallos, semillas, frutos, etc.

Los aceites esenciales se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas con flores, especialmente en las Asteráceas, Lamiáceas, Myrtáceas, Rutáceas, y Apiáceas (ALONSO, 1998; MASCARELL, 2013). Actúan principalmente como una señal de comunicación química entre las plantas y la biota asociada, formando parte del sistema de defensa de las plantas.

Numerosos trabajos han puesto de manifiesto las propiedades antibacterianas, antifúngicas, antiparasitarias e insecticidas (BURT, 2004; SAHIN y col., 2004; GUTIERREZ y col., 2008; PONCE y col., 2008; BAKKALI y col., 2008; BENDAHOU y col., 2008; MAREY y col., 2012).

Por otra parte, *Alternaria* es un género fúngico cuyas diferentes especies crecen en un amplio rango de plantas como saprófitos o como patógenos, y además frecuentemente contaminan frutas y otros productos agrícolas. *A. alternata* se ha aislado de tomate, pimiento, manzanas y bananas almacenadas y a partir de muchos cereales (SEMPERE y SANTAMARINA, 2007).

A. alternata puede producir metabolitos tóxicos tanto en el campo como en el almacén. Muchos de estos metabolitos son fitotoxinas, que causan enfermedades a las plantas (LOGRIECO y col., 1990). Otros de estos metabolitos son micotoxinas, sustancias tóxicas para el hombre y los animales, de las cuales el más importante es el ácido tenuazónico; otros compuestos menos tóxicos incluyen alternariol (AOH), alternariol monometil éter (AME), altenueno (AE), etc (MOTTA y col., 2000; SEMPERE, 2009).

El objetivo del presente trabajo es evaluar la capacidad antifúngica de los aceites esenciales comerciales de laurel, canela, clavo y orégano frente a *Alternaria alternata* aislada del arroz. Muchos estudios ponen de manifiesto que los aceites esenciales son un potencial prometedor como agente antifúngico que puede ser utilizado como biofungicida.

MATERIALES Y MÉTODOS

Hongo

El hongo utilizado *Alternaria alternata* LBEA 2010 fue aislado de cariósides de arroz procedente de la zona de producción arrocera de la Albufera de Valencia. El hongo se identificó en nuestro laboratorio y confirmada su identificación por Centraalbureau voor Schimmelcultures, Fungal Biodiversity Centre, Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences.

Aceites esenciales

Los aceites esenciales utilizados: aceite esencial de laurel salvaje (*Laurus nobilis*) extraído de hojas (Lote: 719B032807); aceite esencial de orégano salvaje (*Origanum compactum*) de la planta en flor (Lote: 760A091905) y el aceite esencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) de las ramas (Lote: 842A052810); fueron suministrados por la casa comercial ESENTIAL'ARÔMS y extraídos de manera natural a través de la primera presión en frío, por destilación al vapor de agua y obteniéndose un aceite 100% natural.

El aceite esencial de clavo (*Syzygium aromaticum*), se extrajo de las hojas (Lote: 9449600032) y con un porcentaje superior al 85% de eugenol, y fue suministrado por la casa comercial GUINAMA.

Identificación de los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales de las muestras comerciales.

La identificación de los compuestos presentes en los aceites esenciales se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas mediante la comparación de su espectro de masas con la base de datos disponible en el cromatógrafo gases-masas y la comparación del índice de Kovats de cada compuesto con el descrito en la bibliografía. Asimismo se ha comprobado la identidad de algunos compuestos comparando sus espectros de masas y sus índices de Kovats con los de muestras patrón.

Las condiciones del Cromatógrafo de Gases acoplada al Espectrómetro de Masas son:

Volumen de inyección: 1 µL. Split, Split-ratio- 30:1. Flujo del gas portador: 1 mL/min. Columna: HP-5MS UI (agilent); 30 m x 250 µm x 0.25 µm; T^a max. Column: 350°C. Rampa: 60°C 5 min; 3°C/min a 180°C ; 20°C/min hasta 280°C (10 min). Rango de masas: 30-500 m/z. Modo de adquisición: scan.

Bioensayos de la actividad antifúngica de los aceites esenciales *in vitro*.

El aceite esencial fue disuelto, mezclado y homogeneizado por agitación en matraces con medio de cultivo PDA, previamente esterilizado, cuando aún está líquido, se adicionó a la concentración de 300 µg/mL (Tween 20, 0.1%), y se repartió en cápsulas Petri de 90x15 mm, siguiendo la metodología de SINGH y *col.* (2008) modificada.

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, se colocaron en el centro de las cápsulas Petri conteniendo el aceite esencial. El experimento se incubó a 25°C durante 7 y 14 días. El crecimiento miceliar se evaluó midiendo diariamente dos diámetros perpendiculares de la colonia, y se calculó la velocidad de crecimiento. Se realizaron seis repeticiones por tratamiento. Las cápsulas Petri control contenían solamente PDA, agua /Tween 20 (0.1%).

Análisis estadístico

Los resultados de crecimiento miceliar se sometieron al análisis de la varianza (ANOVA) con valores de significación de P<0.01. El programa utilizado fue STATGRAPHICS Plus 5.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización química de los aceites esenciales

La composición de los aceites esenciales (Tabla 1) se caracteriza por un alto porcentaje de componentes oxigenados que incluyen epóxidos, ésteres, alcoholes y cetonas.

En el laurel los componentes oxigenados suponen un 78,8% del total de su composición siendo los mayoritarios el epóxido 1,8 cineole (eucaliptol) que se encuentra en un porcentaje de cerca del 51% y el ester alpha-terpinenyl acetate en un 12,9%. Los hidrocarburos (monoterpenos y sesquiterpenos) forman el 18% de su composición.

El aceite esencial de clavo, presenta un 90,3% de compuestos oxigenados, siendo el eugenol el que aparece en mayor proporción (89,8%). Los hidrocarburos (monoterpenos y sesquiterpenos) suponen solo el 9%.

En el aceite esencial de canela el porcentaje de componentes oxigenados es del 92%. El mayor porcentaje corresponde a eugenol aproximadamente un 60%, seguido de los esteres eugenyl acetate (18,3%) y cinnamyl acetate (5,6%), mientras que los hidrocarburos (monoterpenos y sesquiterpenos) representan solo el 5%.

El aceite esencial de orégano contiene un 71,8% de compuestos oxigenados y la mayor proporción corresponde a los fenoles carvacrol (49,6%) y thymol (21,2%). Los monoterpenos y sesquiterpenos que no tiene oxígeno suponen el 25,1%, y de ellos destacar el p-cymene (11%), el gamma-terpinene (9,2%).

Actividad antifúngica de los aceites esenciales

El aceite esencial de laurel mostró un crecimiento similar al del hongo crecido en PDA, los aceites de canela y clavo disminuyeron significativamente el crecimiento micelial de *Alternaria alternata* a la dosis ensayada, mientras que el aceite de orégano inhibió totalmente el crecimiento de *A. alternata* hasta el décimo día del ensayo (Figuras 1 y 2).

La tasa de crecimiento de *Alternaria* fue de 5,3 mmd⁻¹ cuando creció en el medio de cultivo PDA, en laurel de 4,6 mmd⁻¹, mientras que cuando se adicionaron los aceites de canela y clavo la velocidad de crecimiento se redujo a 3,26 y 2,5 mmd⁻¹ respectivamente, el crecimiento del hongo en medio PDA adicionado del aceite esencial de orégano a la dosis de 300 µg/mL comenzó trascurridos 10 días, a partir de este momento se alcanzó la velocidad de 1,6 mmd⁻¹ hasta el día 14 de lectura, lo que representa una reducción del 70% respecto al testigo (Figura 3).

El análisis de la varianza del factor esencia, indica que dicho factor tiene influencia significativa ($P < 0.01$) sobre el crecimiento medio de *Alternaria alternata* (Tabla 2). Además, el estudio de los intervalos LSD de comparación de medias (Figura 4) nos pone de manifiesto que existen diferencias significativas ($P < 0.01$) entre las medias de crecimiento de los distintos niveles/aceites excepto entre el PDA y el laurel.

La bibliografía consultada sobre la actividad fungicida del aceite esencial de laurel hemos podido apreciar que en algunos trabajos este aceite activa el crecimiento fúngico (ATANDA y col., 2007), mientras que otros trabajos apuntan a su efectividad como fungicida, fungistático e incluso a la reducción de la producción de toxinas fúngicas, (DE CORATO y col., 2010) que demostraron su capacidad, *in vitro* e *in vivo*, como potencial agente antifúngico frente a *Monilia laxa* y *Botrytis cinérea*. Son muy numerosos los autores que han evidenciado la actividad antifúngica e inhibitoria de la producción de toxinas de los hongos al utilizar los aceites de canela, clavo y orégano (ALVAREZ CASTELLANOS y col., 2001; GARCÍA-CAMARILLO y col., 2006; LÓPEZ-MALO y col., 2007; TZORTZAKIS, 2009; AVILA-SOSA y col., 2012).

Del estudio de la composición de los aceites esenciales del presente trabajo y de la actividad antifúngica de los mismos frente *Alternaria alternata* y frente a *Fusarium culmorum* (SANTAMARINA y ROSELLÓ, 2011; SANTAMARINA y col., 2012) se observa, que los aceites con mayor actividad son aquellos que contienen un alto porcentaje de los fenoles eugenol, carvacrol y thymol. El eugenol es abundante en el clavo (90%) y en la canela (60%), mientras que en el orégano, que provoca una alta inhibición del crecimiento, no se detecta; sin embargo en este aceite encontramos otros fenoles como carvacrol (50%) y thymol (21%). Resultados que están en concordancia con los obtenidos por otros autores (YENJIT y col., 2010; DAMBOLENA y col., 2012).

Los aceites esenciales pueden ser una alternativa de aplicación práctica en frutas y otros productos agrícolas almacenados, así como en granos y semillas.

FINANCIACIÓN

El presente estudio ha sido financiado por el Vicerrectorado de Investigación de la Universitat Politècnica de València, en su programa de Apoyo a la Investigación y Desarrollo, Nuevas Líneas de Investigación Multidisciplinares (PAID-05-10), número de referencia 2644.

BIBLIOGRAFÍA

- ALONSO, J.R. (1998).** Tratado de fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas. ISIS, Buenos Aires, pp 786-792.
- ALVAREZ-CASTELLANOS, P.; BISHOP, C.D.; PASCUAL-VILLALOBOS, J.P. (2001).** Antifungal activity of the essentials oil of *Crysantemun coronarium* against agricultural pathogens. *Phytochemistry*. 57, 99-102.
- ATANDA, O. O.; AKPAN, I.; OLUWAFEMI, F. (2007).** The potential of some spice essential oils in the control of *A. parasiticus* CFR 223 and aflatoxin production. *Food Control*. 18, 601-607.
- AVILA-SOSA, R.; PALOU, E.; JIMÉNEZ, M.T.; NERVÁEZ-MOORILLÓN, G.; NAVARRO, A.D.; LÓPEZ-MALO, A. (2012).** Antifungal activity by vapor contact essential oils added to amaranth, chitosa, or tarch edible films. *International Journal of Food Microbiology* 153, 66-72.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. (2008).** Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem toxicol*. 46, 446-475.
- BENDAHO, M.; MUSELLI, A.; GRIGNON-DUBOIS, M.; BENYOUCEF, M.; DESJOBERT, J. M.; BERNERDINI, A. F.; COSTA, J. (2008).** Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. Essential oil and extract obtained by microwave extraction: comparison with hydrodistillation. *Food Chem*. 106, 132-139.
- BURT, S. (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods, a review. *International Journal of Food Microbiology*. 94, 223-253.
- DAMBOLENA, J. S.; LÓPEZ, A. G.; MERILES J. M.; RUBINSTEIN, H. R., ZYGALDO, J. A. (2012).** Inhibitory effect of 10 natural phenolic compounds on *Fusarium verticillioides*. A structure-property-activity relationship study. *Food Control* 28, 163-170.
- DE CORATO, U.; MACCIONI, O.; TRUPO, M.; DI SANZO, G. (2010).** Use of essential oil of *Laurus nobilis* obtained by means of supercritical carbon dioxide technique against post harvest spoilage fungi. *Crop Protection*. 29, 142-147.
- GARCÍA-CAMARILLO, E. A.; QUEZADA-VIAY, J.; MORENO-LARA, J.; SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, G.; MORENO- MARTÍNEZ, E.; PÉREZ-REYES, C. (2006).** Actividad antifúngica de aceites esenciales de canela y orégano y su efecto sobre la producción de aflatoxinas en nuez pecanera (*Carya illinoensis* Koch). *Revista Mexicana de Fitopatología*. 24, 8-12.
- 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, 91-97.

LOGRIECO, A.; BOTTALICO, A.; SOLFRIZZO, M.; MULE, G. (1990). . Incidence of *Alternaria* species in grains from Mediterranean countries and their ability to produce mycotoxins. *Mycologia*. 82,501-505.

LÓPEZ-MALO, A.; BARRETO-VALDIVIESO, J.; PALOU, E.; SAN MARTÍN, F. (2007). *Aspergillus flavus* growth response to Cinnamon extract and sodium benzoate mixtures. *Food Control*. 18, 1358-1362.

MAREY, G. I.; ABDEL RASUL, M. A.; ABDELGALELI, A. M. (2012). Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. *Pest Biochem Physiol*. 103, 56-61.

MASCARELL, L. (2013). Activitat herbicida de l'oli essencial i l'extracte aquós de *Thymus capitatus*. Trabajo Fin de Carrera. Universitat Politècnica de València.

MOTTA, S.; SOARES, L.; VALENTE, M. (2000). A method for the determination of two *Alternaria* toxins, alternariol and alternariol monomethyl ether, in tomato products. *Brazilian Journal of Microbiology*. 31, 315-320.

PONCE, A.; ROURA, S.; DEL VALLE, C.; MOREIRA, M. (2008). Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: *in vitro* and *in vivo* Studies. *Postharvest Biology and Technology*. 49, 294-300.

SAHIN, F.; GÜLLÜCE, M.; DAFERERA, D.; SÖKMEN, A.; SÖKMEN, M.; POLISSIOU, M.; AGAR, G.; ÖZER, H. (2004). Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*. 15, 549-557.

SANTAMARINA, M. P.; ROSELLÓ, J. (2011). Estudio *in vitro* de la capacidad antifúngica del aceite esencial de clavo *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. and Perry frente a *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler. *Phytoma España* 234:82-84.

SANTAMARINA, M. P.; GIMÉNEZ, S.; ROSELLÓ, J. (2012). Estudio de la capacidad antifúngica del aceite esencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) frente a *Fusarium culmorum* (W.G.Smith) Saccardo. *Phytoma España* 243:82-84.

SEMPERE, F.; SANTAMARINA, M. P. (2007). In vitro biocontrol analysis of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler under different environmental conditions. *Mycopathologia* 163, 183-190.

SEMPERE, F. (2009). Estudios sobre la Micobiota del Arroz de Valencia. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de València.

SINGH, P.; BHAWANA, A. K.; RAJESH, K.; NAWAL, D.; RAJESH G. (2008). Assessment of *Pelargonium graveolens* oil as plant-based antimicrobial and aflatoxin suppressor in food preservation. *Journal of Science of Food and Agriculture*. 88, 2421-2425.

TZORTZAKIS, N. G. (2009). Impact of cinnamon oil-enrichment on microbial spoilage of fresh produce. *Inn. Food Sci. Emer. Technol.* 10, 97-102.

YENJIT, P.; ISSARAKRAISILA, M.; INTANA, W.; CHANTRAPROMMA, K. (2010). Fungicidal activity of compounds extracted from the pericarp of Areca catechu against *Colletotrichum gloeosporioides in vitro* and in mango fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 55, 129-132.

Tabla 1: Compuestos mayoritarios presentes en los aceites esenciales de canela, clavo, laurel y orégano.

COMPUESTO	CANELA (%)	CLAVO (%)	LAUREL (%)	ORÉGANO (%)
2-propenal, 3-phenyl-	1,999			
eugenol	60,403	89,757		
beta-caryophyllene	1,913	6,715		1,513
alpha-caryophyllene		1,917		
cinnamyl acetate	5,567			
eugenyl acetate	18,33			
benzyl benzoate	4,139			
sabinene			7,474	
beta pinene			3,255	
eucaliptol			50,654	
gamma terpinene			1,203	
Linalool			3,655	
terpinen-4-ol			2,165	
alpha-terpineol			2,301	
alpha-terpinenyl acetate			12,917	
methyl eugenol			3,803	
alpha-terpinene				1,405
p-cymene				11,03
gamma-terpinene				9,216
thymol				21,174
carvacrol				49,548

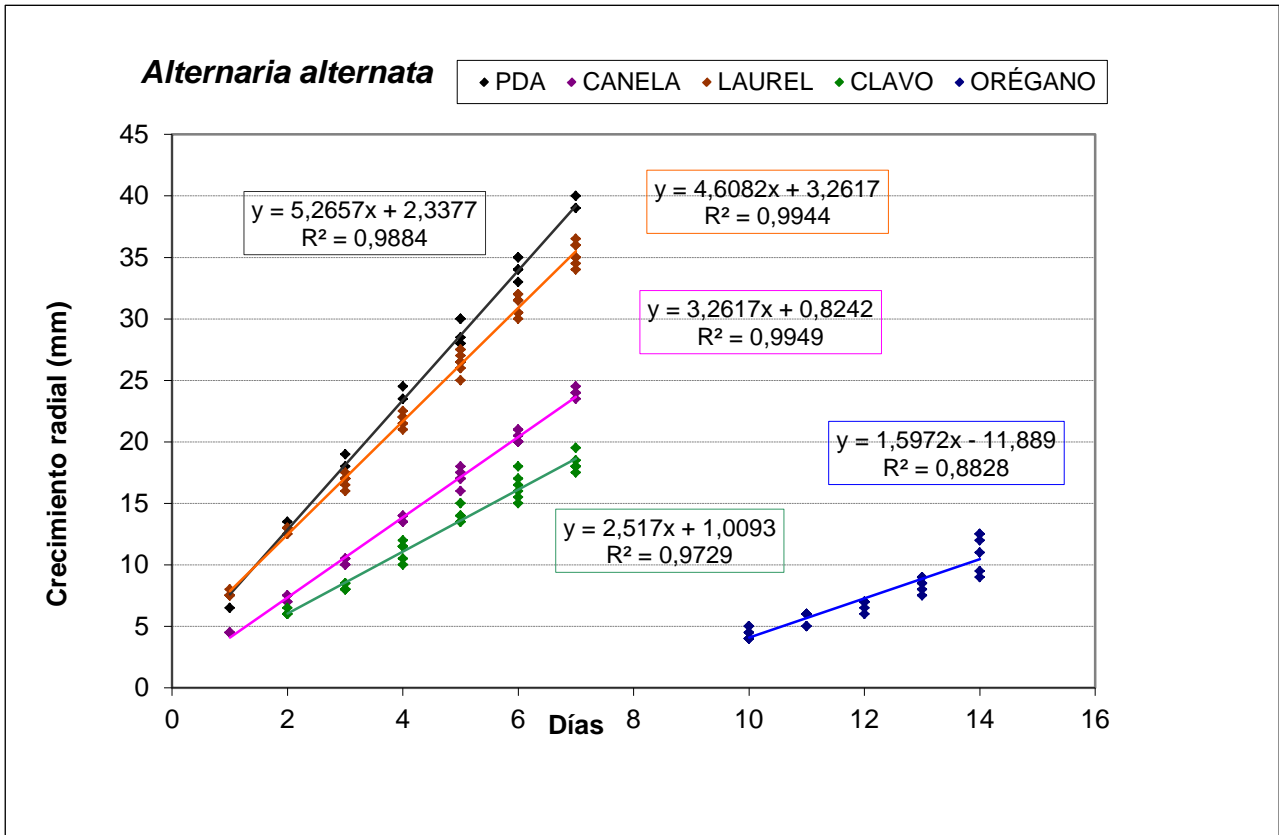


Figura 1: Crecimiento radial (mm) de *A. alternata* en los distintos medios ensayados: PDA, PDA-Canela, PDA-Clavo, PDA-Laurel y PDA- Orégano.

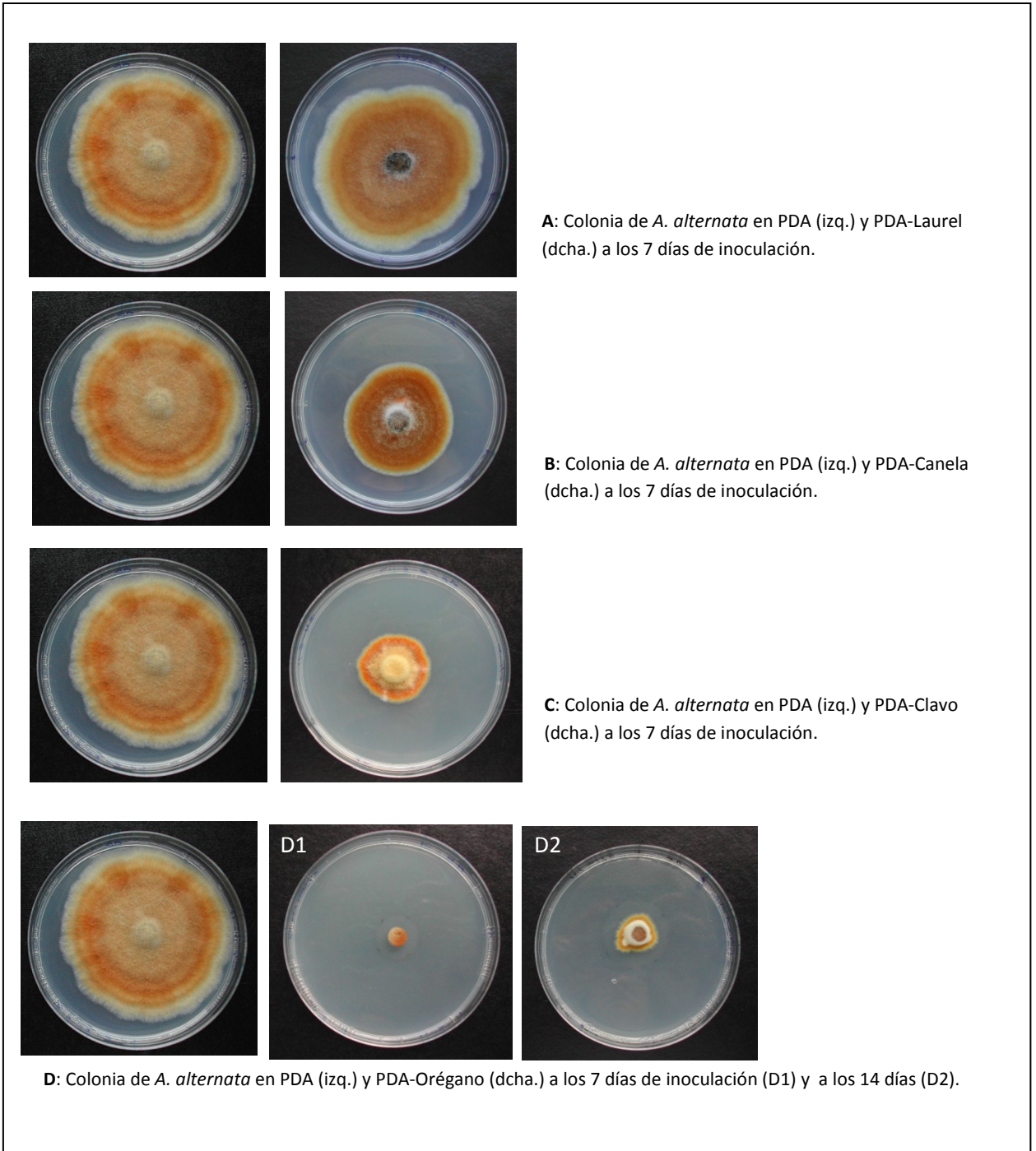


Figura 2: Comparación del crecimiento micelial de *A. alternata* en los distintos medios ensayados a los 7 días de inoculación: A) Colonia de *A. alternata* en PDA (izq.) y PDA-Laurel (dcha.); B) Colonia de *A. alternata* en PDA (izq.) y PDA-Canela (dcha.); C) Colonia de *A. alternata* en PDA (izq.) y PDA-Clavo (dcha.); D) Colonia de *A. alternata* en PDA (izq.) y PDA-Orégano (dcha.) a los 7 días de inoculación (D1) y a los 14 días (D2).

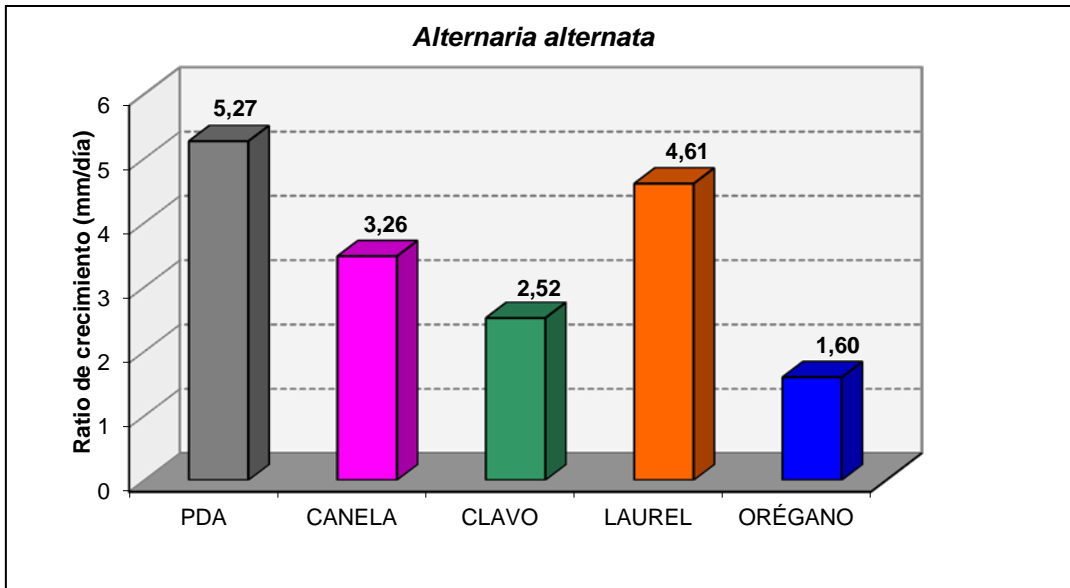


Figura 3: Velocidad de crecimiento (mm/día) de *A. alternata* en los distintos medios ensayados: PDA, PDA-Canela, PDA-Clavo, PDA-Laurel y PDA- Orégano.

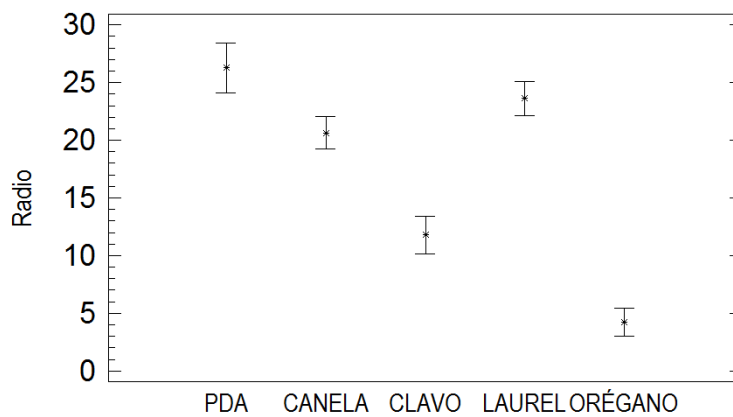


Figura 4: Intervalos LSD de comparación de medias para los distintos niveles del factor esencia en *A. alternata*.

Tabla 2: Análisis de la varianza del crecimiento de *A. alternata* frente al factor esencia (e).

Factor	GL	CM	F-Ratio	P-Value *
e	4	4114,03	78,89	0,000

GL: Grados de libertad; CM: Cuadrado medio; F-Ratio: F-Snedecor

* Significativo $p < 0,01$

ANEXO:

TRABAJOS DE SOPORTE