

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Potencial de los aceites comerciales de Canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y Laurel (*Laurus nobilis*) en el control de *Fusarium oxysporum*

TRABAJO FIN DE GRADO EN INGENIERÍA
AGROALIMENTARIA Y DEL MEDIO RURAL

ALUMNA:

Ana M^a Gigante Esteve

TUTORA ACADÉMICA:

D^a. M^a Pilar Santamarina Siurana

COTUTORA ACADÉMICA:

D^a. Josefa Roselló Caselles

Curso Académico: 2014-2015

Valencia, Noviembre de 2014



TÍTULO DEL TRABAJO: Potencial de los aceites comerciales de Canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y Laurel (*Laurus nobilis*) en el control de *Fusarium oxysporum*.

RESUMEN

Cada vez hay más productos químicos sintéticos prohibidos para el control de hongos fitopatógenos, lo que ha provocado el aumento de estudios de los aceites esenciales y sus compuestos como agentes de biocontrol.

El principal objetivo de este trabajo es estudiar la capacidad antifúngica de los aceites esenciales de Canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y Laurel (*Laurus nobilis*) frente a *Fusarium oxysporum*, causante de la fusariosis vascular y podredumbre de cuello y raíces en distintos cultivos, con el fin de obtener sustancias potencialmente ecológicas para la gestión sostenible de productos alimenticios tanto en campo como almacenados.

Para ello, se ha estudiado la respuesta del hongo, aislado de tomate, frente a ambos aceites comerciales. Los bioensayos se realizaron a la dosis de 300 µg/mL del aceite esencial en el medio de cultivo PDA. Se calculó la velocidad de crecimiento del hongo (mm/día), el crecimiento medio radial diario (mm) y la inhibición del crecimiento miceliar (MGI).

La velocidad de crecimiento del hongo fue de 5,75 mm/día en PDA, 5,22 mm/día en laurel y de 2,44 mm/día en canela. El aceite de canela redujo alrededor del 60% la velocidad de crecimiento del hongo, resultado similar al del MGI.

La adición de estos aceites esenciales, sobre todo el aceite de canela, podría ser una alternativa de aplicación práctica, tanto en campo como en productos almacenados, para el control de *Fusarium oxysporum*.

Palabras clave: aceite esencial, capacidad antifúngica, *Fusarium oxysporum*, canela, laurel.

ALUMNA:

Ana M^a Gigante Esteve

TUTORA ACADÉMICA:

D^a. M^a Pilar Santamarina Siurana

COTUTORA ACADÉMICA:

D^a. Josefa Roselló Caselles

Valencia, Noviembre de 2014

SUMMARY

Increasingly there are more synthetic chemicals banned for the control of phytopathogenic fungi, which has caused the increase in studies of essential oils and their compounds as biocontrol agents.

The main objective of this work is to study the antifungal ability of essential oils of Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) and Bay leaf (*Laurus nobilis*) facing *Fusarium oxysporum*, cause of vascular *Fusarium* and collar and roots rot in different crops, in order to obtain potentially ecological substances for the sustainable management of foodstuff both in the field as stored.

To that end, it has been studied the response of the fungi, isolated from tomato, against both commercial oils. The bioassays were conducted over dose of 300 µg/mL from the essential oil in the PDA culture medium. It was calculated the speed of growth of the fungi (mm/day), the daily average radial growth (mm), and the micelial growth inhibition (MGI).

The speed of growth of the fungi was 5,75 mm/day in PDA, 5,22 mm/day in bay leaf and 2,44 mm/day in cinnamon. The cinnamon oil reduced by around 60% the speed of growth of the fungi, similar result to the one of the MGI.

The addition of these essential oils, especially the cinnamon oil, could be an alternative of practical application, both in the field as stored, for the control of *Fusarium oxysporum*.

Key words: essential oil, antifungal ability, *Fusarium oxysporum*, cinnamon, bay leaf.

Me gustaría expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han colaborado en la realización de este trabajo, en especial:

A mi tutora académica, M^a Pilar Santamarina Siurana, por haberme permitido realizar este trabajo en su departamento y por haber compartido tan generosamente su tiempo y conocimientos.

A mi cotutora académica, Josefa Roselló Caselles, por sus explicaciones y consejos, tan necesarios para el trabajo realizado.

A Beatriz, porque ha sido una suerte poder contar con su ayuda y ánimos.

A mi familia, en especial a mis padres y a Juan Antonio por su paciencia y cariño.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. LOS HONGOS. El género <i>Fusarium</i>.	1
1.1.1. Morfología	1
1.1.2. Ecología fúngica.	2
1.1.3. Enfermedades causadas por <i>Fusarium</i>	3
1.2. LOS ACEITES ESENCIALES	6
1.2.1. Generalidades.	6
1.2.2. El aceite esencial de Laurel.	9
1.2.3. El aceite esencial de Canela.	10
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1. MATERIALES.	15
3.1.1. Hongo.	15
3.1.2. Aceites esenciales.	15
3.1.3. Aparatos y material de laboratorio.	15
3.2. MÉTODOS.	15
3.2.1. Identificación de los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales de las muestras comerciales.	15
3.2.2. Medios de cultivo.	16
3.2.3. Bioensayos de la actividad de los aceites esenciales.	16
3.2.4. Cálculo de la Inhibición del Crecimiento Miceliar (MGI)	16
3.2.5. Análisis estadístico.	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
4.1. Composición química de los aceites esenciales de canela y laurel.	18

4.2. Efecto de los aceites esenciales de canela y laurel en el crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i>.	19
4.3. Efecto de los aceites esenciales de canela y laurel en la inhibición del crecimiento miceliar (MGI) de <i>Fusarium oxysporum</i>.	23
4.4. Análisis estadístico.	23
5. CONCLUSIONES	25
6. BIBLIOGRAFÍA	26
ANEXOS	32

Índice de figuras

Figura 1. <i>Fusarium oxysporum</i> . a. macroconidios; b. conidióforos y fiálides con microconidios; c. clamidosporas (Samson <i>et al.</i> , 2004).	1
Figura 2. Macro y microconidios de <i>F. oxysporum</i> .	2
Figura 3. Hifas conidiógenas de <i>F. oxysporum</i> con presencia de clamidosporas.	2
Figura 4. Ciclo patológico de la fusariosis del tomate (Agrios, 2008).	4
Figura 5. Detalle de rama, hojas, flores y frutos del laurel (Figura tomada de FLORA IBÉRICA, 2014)	9
Figura 6. Detalle de rama, hojas, flores y frutos de la canela (Figura tomada de PURDUE UNIVERSITY, 2012)	11
Figura 7. Crecimiento de <i>F. oxysporum</i> en medio PDA, en medio PDA-laurel y en medio PDA-Canela.	19
Figura 8. Colonia de <i>Fusarium oxysporum</i> crecida en medio PDA y PDA-aceite de Canela y colonia de <i>F. oxysporum</i> crecida en medio PDA y PDA-aceite de Laurel a los 7 días de inocular los discos.	20
Figura 9. Velocidad de crecimiento de <i>F. oxysporum</i> en medio PDA, PDA-Canela y medio PDA-Laurel.	21
Figura 10. Crecimiento medio diario de <i>F. oxysporum</i> en medio PDA, en medio PDA-Canela y en medio PDA-Laurel.	22
Figura 11. Intervalos LSD de comparación de medias para los diferentes niveles de factor esencia en <i>Fusarium oxysporum</i> .	24

Índice de tablas

Tabla 1. Compuestos mayoritarios presentes en los aceites esenciales de canela y laurel.	18
Tabla 2. Análisis de la varianza del crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i> frente al factor esencia (e).	23

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LOS HONGOS. El género *Fusarium*.

1.1.1. Morfología.

Los hongos son organismos eucarióticos que se reproducen por medio de esporas. Son heterótrofos y necesitan compuestos orgánicos como fuente de energía y de carbono. La mayoría de ellos viven como saprofitos en el suelo y el agua. Los hongos, junto con otros microorganismos contribuyen significativamente a la descomposición de la materia orgánica y al reciclado de los nutrientes, siendo por ello sus actividades tan necesarias para la vida (Wainwright, 2003).

El género *Fusarium* se agrupa dentro de la división *Ascomycota*. Muchas especies de *Fusarium* (Figura 1) tienen una extensa distribución, incluyendo fitopatógenos de cultivos ampliamente utilizados. Algunas especies producen marchitamientos vasculares, podredumbres de cuello y raíces, pudrición de frutos e infección de semillas. Algunas de las micotoxinas reguladas internacionalmente son producidas por especies de *Fusarium*, principalmente fumonisinas, tricotecenos y zearalenona (Sanchis *et al.*, 2004).

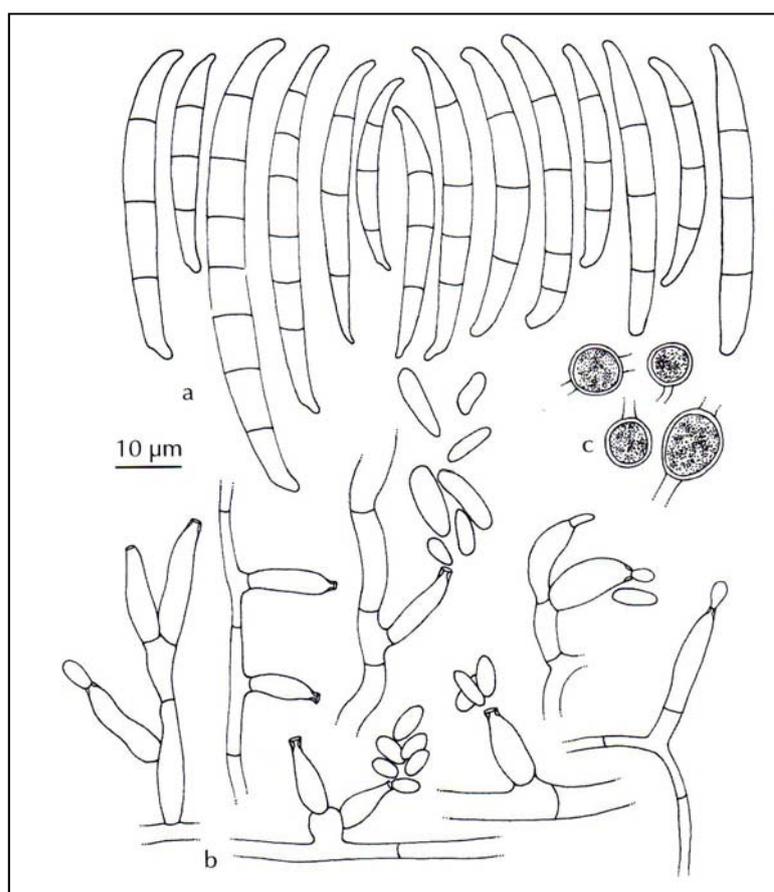


Figura 1. *Fusarium oxysporum*. a. macroconidios; b. conidióforos y fiálides con microconidios; c. clamidosporas (Samson *et al.*, 2004).

Las colonias de *Fusarium oxysporum* crecidas en PDA, alcanzan un diámetro de 30-55 mm en 4 días a 25°C, son blancas al principio. El micelio es de color salmón claro o malva claro, unas veces denso y algodonoso y otras veces escaso. El reverso de la colonia suele ser de color malva, violeta o magenta oscuro. Es frecuente la presencia de esporodoquios insertos en una masa central. Los conidióforos, ramificados o no, soportan las monofiálides.

Este patógeno produce tres tipos de esporas asexuales (Figura 1). Los microconidios, de fusiformes a arriñonados, tienen de una a dos células y son las esporas que el hongo produce con una mayor frecuencia y en mayor abundancia en todas las condiciones. Son producidos en falsas cabezas de cortas y robustas monofiálides en forma de frasco. Estas esporas (Figuras 2 y 3) son las que el hongo suele formar en el interior de los vasos de las plantas infectadas. El segundo tipo de espora son los macroconidios, que son las esporas típicas de *Fusarium*, están constituidas por tres a cinco células, son estructuras largas, de pared delgada, multiseptadas, en forma de media luna o de canoa, generalmente ubicadas en los esporodoquios. Se adelgazan gradualmente y se encorvan hacia los dos extremos. Aparecen con gran frecuencia sobre la superficie de plantas destruidas por el hongo. El último tipo de espora son las clamidosporas, constituidas por una o dos células, son de pared gruesa y son esporas redondas que se forman terminal o intercaladamente en el micelio más viejo o en los macroconidios del hongo; se disponen en cadenas, pares o individuales.

Estos tres tipos de esporas se forman en los cultivos del hongo y quizá también en el suelo, aunque sólo las clamidosporas sobreviven en este último sustrato durante más tiempo (Agrios, 2008).



Figura 2. Macro y microconidios de *F. oxysporum*.

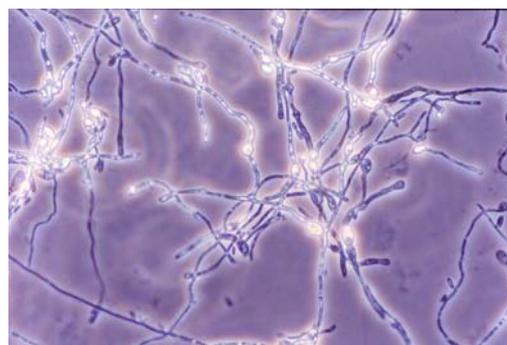


Figura 3. Hifas conidiógenas de *F. oxysporum* con presencia de clamidosporas.

1.1.2. Ecología fúngica.

Fusarium oxysporum es un hongo geográficamente muy extendido. Principalmente se trata de un saprófito del suelo, pero algunas cepas tienen una actividad patogénica en numerosos cultivos de plantas: patatas, coles, melones, tomates, semillas de soja, guisantes, algodón, bulbos de cebolla, etc.

Es posible su presencia en cereales (maíz, arroz y cebada) y frutos secos (cacahuets, pecana, avellanas y nueces). Puede crecer en condiciones bajas de O₂ (Samson *et al.*, 2004).

Para poder entender mejor la ecología de *Fusarium oxysporum*, es importante conocer la influencia de la disponibilidad de agua y la temperatura en el crecimiento fúngico de esta especie. Roselló *et al.* (2004) estudiaron la respuesta de *F. oxysporum* cuando es sometido a distintas condiciones ambientales de actividad de agua (0,85, 0,90, 0,95, 0,98, 0,995) y temperatura (15 y 25 °C). El resultado fue que la cepa creció, a 25°C, a las a_w comprendidas entre 0,90 y 0,995, y a 15°C entre 0,95 y 0,995, siendo, en las dos temperaturas, el máximo desarrollo para una a_w de 0,995, con valores de 6,28 mm/día a 25°C y de 4,63 mm/día a 15°C. En general, se observó un descenso del crecimiento fúngico al disminuir la a_w , tanto a 15°C como a 25°C, y además, que los valores obtenidos a 15°C eran siempre más bajos que a 25°C.

1.1.3. Enfermedades causadas por *Fusarium*

Las especies de *Fusarium* están referenciadas como hongos de campo, pero no es raro encontrarlos, en ocasiones, como hongos de almacén, sobre todo cuando la disponibilidad de agua es alta y las temperaturas bajas. Por ello, suelen estar involucradas en el desarrollo de distintas fisiopatologías, en concreto son las causantes de los marchitamientos vasculares (fusariosis vascular), de las podredumbres de cuello y raíces, y los mohos amarillos y rosados de las enfermedades de poscosecha (Carlile *et al.*, 2001).

Los marchitamientos vasculares son enfermedades típicas del suelo que se encuentran ampliamente distribuidas y son muy destructivas, espectaculares y alarmantes. Se manifiestan en un marchitamiento más o menos rápido, empardecimiento y muerte de hojas y vástagos, dando como resultado la muerte de la planta. Los marchitamientos se deben a la presencia y actividades del patógeno en los tejidos vasculares xilemáticos de las plantas. Comúnmente, el patógeno continúa propagándose internamente en forma de micelio o conidios a través de los vasos xilemáticos hasta que muere toda la planta. Mientras la planta infectada continúe viviendo, el hongo se limita a los tejidos vasculares y a algunas células circundantes. Sólo cuando muere la planta infectada, el hongo se propaga hacia otros tejidos y esporula sobre ella. Tres géneros son los causantes de los marchitamientos vasculares: *Ceratocystis*, *Fusarium* y *Verticillium* (Pitt y Hocking, 2009).

Fusarium produce marchitamientos vasculares principalmente en flores y hortalizas anuales, plantas herbáceas perennes ornamentales, plantas de cultivo, malezas y en la mimosa. La mayoría de los hongos de este género que producen marchitamientos vasculares pertenecen a la especie *Fusarium oxysporum* y, según el huésped que infecte se encuentran distintas formas especiales (f.sp.) dentro de

la especie. Así, el hongo que ataca al tomate se designa *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*; el del gladiolo *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli*, etc.

Fusarium es un hongo que hiberna en el suelo o entre los restos vegetales, en forma de micelio o esporas (clamidosporas). Se propaga a cortas distancias a través del agua del suelo y el equipo agrícola contaminado, y a grandes distancias por los trasplantes infectados o por el suelo que va en ellos. Usualmente, una vez se ha instalado en un área, se mantiene así por tiempo indefinido. Las marchiteces son más comunes y destructivas en las regiones templadas más cálidas y menos dañinas en climas templados fríos, excepto en los cultivos de invernadero de esas áreas (Roselló, 2003).

La mayoría de las marchiteces causadas por *Fusarium oxysporum* comparten un desarrollo y ciclo patológico similar. En la Figura 4 se describe, como modelo de la enfermedad, la fusariosis del tomate.

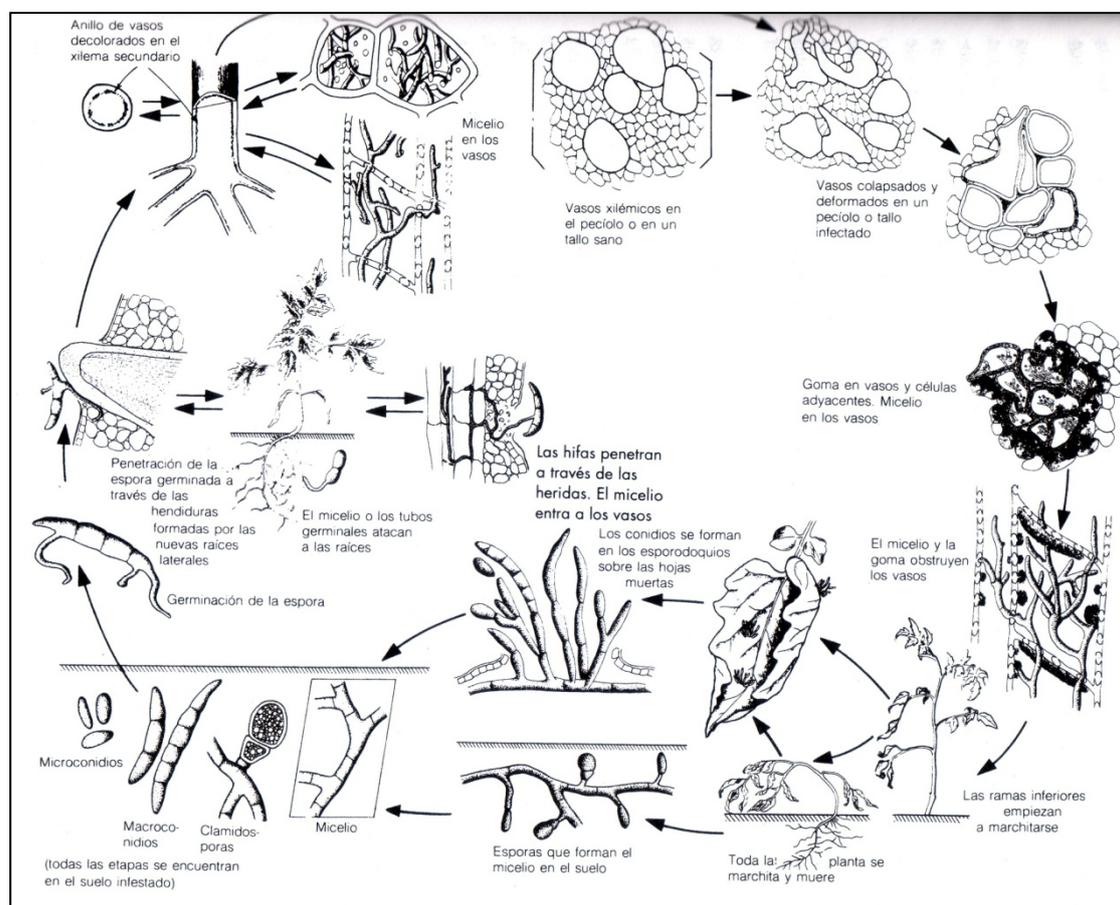


Figura 4. Ciclo patológico de la fusariosis del tomate (Agrios, 2008).

La enfermedad de la fusariosis del tomate puede ocasionar pérdidas considerables, sobre todo en las variedades más susceptibles y bajo condiciones climáticas favorables, por ello la disponibilidad de

cultivares resistentes mantiene las pérdidas a un nivel bastante bajo. Esta enfermedad se caracteriza por el achaparramiento de las plantas, que en poco tiempo se marchitan y mueren.

Los primeros síntomas de la enfermedad se manifiestan en un leve aclarado de las nervaduras de los folíolos jóvenes más externos, después ocurre la epinastia de las hojas por el debilitamiento de los peciolo. Los frutos que ocasionalmente son infectados se pudren y desprenden sin que aparezcan manchas en ellos. Las raíces también son infectadas y tras un período inicial de achaparramiento se pudren las raíces laterales más pequeñas.

Cuando las plantas sanas se desarrollan en un suelo contaminado, las esporas germinadas o el micelio penetran por la zona de elongación de la raíz, a través de heridas o donde se forman las raíces laterales. El micelio del hongo se propaga intercelularmente a través de la corteza de la raíz y cuando llega a los vasos xilemáticos, entra en ellos a través de las punteaduras.

Distintas especies de *Fusarium*, sobre todo *F. solani* y algunas f.sp. de *F. oxysporum*, producen, en lugar de fusariosis vascular, la podredumbre de semillas y plántulas (ahogamiento), podredumbre de raíces, del cuello del tallo, de bulbos, tubérculos, etc.

La podredumbre de raíces se produce en plantas jóvenes de guisantes, cacahuete, tomate, etc. Las raíces principales muestran al principio una mancha rojiza que se va volviendo más oscura y que se extiende hasta cubrir toda la raíz y la zona del tallo por debajo del suelo. En la raíz principal aparecen fisuras y las pequeñas raíces laterales son destruidas. En general, el crecimiento de la planta se retrasa y las hojas se vuelven amarillas y caen. En ocasiones, sin las condiciones climáticas son las idóneas, la planta puede llegar a recuperarse, aunque en la mayoría de los casos mueren (Agrios, 2008).

La podredumbre del cuello provoca que las plantas infectadas se marchiten y mueran, ya que la base del tallo (cuello) se pudre. Se observan manchas rosa o rojas en el tallo a nivel de la superficie del suelo o por debajo de ella. Estas lesiones se producen de fuera hacia adentro y es frecuente que no afecten a la parte interna del tallo.

El género *Fusarium* produce los “mohos amarillos o rosados” en plantas ornamentales y hortalizas. En cítricos, que se almacenan durante mucho tiempo, provoca la podredumbre café. En la mayoría de los casos la contaminación se produce en el campo antes o durante la cosecha, aunque también puede desarrollarse durante la etapa de almacenamiento. Al principio los tejidos afectados se ablandan y, a medida que se extiende la infección, las áreas putrefactas se hundén y aparece sobre ellas un penacho de pelo blanquecino, rosa o amarillento del moho. En el caso del tomate y cucurbitáceas, la infección se desarrolla con mayor rapidez.

1.2. LOS ACEITES ESENCIALES

1.2.1. Generalidades.

Los aceites esenciales son líquidos aromáticos obtenidos a partir de material vegetal (brotes, flores, semillas, hojas, ramas, corteza, madera, frutos y raíces). Son compuestos naturales complejos. Juegan un papel ecológico importante (Balandrin *et al.*, 1985), ya que están envueltos en las interacciones entre las plantas, inhiben o estimulan la germinación de otras especies vegetales, 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 stress.

El término “aceite esencial” se piensa que procede del nombre acuñado en el siglo XVI por el médico suizo Paracelsus von Hohenheim. Se estima que se conocen unos 3000 de estos aceites, de los cuales 300 son comercialmente importantes, destinados principalmente al mercado de los condimentos y de los aromas.

Aunque las especias han sido utilizadas desde la antigüedad por su perfume, sabor y propiedades conservantes, de los aceites esenciales conocidos sólo el aceite de trementina fue mencionado por los historiadores griegos y romanos (Guenther, 1948). La destilación como método de producción de estos aceites fue usada por primera vez en Egipto, India y Persia hace más de 2000 años y fue mejorado en el siglo IX por los Árabes (Bauer *et al.*, 2001). El primer escrito sobre destilación de aceites esenciales se atribuye a Villanova (ca. 1235-1311), un médico catalán. En el siglo XIII éstos se elaboraban en las farmacias y sus efectos farmacológicos se describían en las farmacopeas, pero su uso no fue generalizado en Europa hasta el siglo XVI. De acuerdo con el médico francés Du Chesne, en el siglo XVII su preparación era bien conocida y las farmacias generalmente producían de 15 á 20 aceites diferentes. El uso del aceite del árbol del té, con fines médicos, ha sido documentado desde la colonización de Australia a finales del siglo XVIII, aunque es probable que anteriormente ya fuera usado por los nativos australianos (Carson y Riley, 1993).

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 in 1881 (Boyle, 1955). Sin embargo, en el transcurso de los siglos XIX y XX su uso en medicina se volvió gradualmente secundario, para usarse sobre todo por sus sabores y aromas (Guenther, 1948).

El mayor uso de estos aceites en la Unión Europea es en alimentos (condimentos), perfumes y usos farmacéuticos (por sus propiedades funcionales). Su uso en aromaterapia constituye algo más del 2% del mercado total (Van der Braak y Leijten, 1999). Sus componentes individuales se usan también para dar sabor a los alimentos, ya sea extraídos de material vegetal o fabricados sintéticamente.

La destilación del vapor es el método más comúnmente usado para producirlos comercialmente. Son volátiles y por ese motivo, necesitan ser almacenados en recipientes herméticos en la oscuridad, con el fin de prevenir cambios en su composición.

Muchas publicaciones han ofrecido datos sobre la composición de varios de estos aceites. El análisis de su composición detallada se ha conseguido mediante Cromatografía de Gases y Espectrómetro de Masas. 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. Los compuestos fenólicos son los principales responsables de la actividad antibacteriana de estos aceites, mientras que hay algunas evidencias de que los componentes minoritarios tienen un papel importante en la actividad antibacteriana, posiblemente produciendo un efecto sinérgico con otros componentes.

Se obtienen fundamentalmente de las partes no leñosas de la planta, en especial de las hojas, mediante arrastre por vapor de agua o hidro-destilación. Son una compleja mezcla, principalmente de terpenoides, en particular monoterpenos (C10) y sesquiterpenos (C15), y una variedad de compuestos aromáticos, óxidos, éteres, alcoholes, ésteres, aldehídos y cetonas, que determinan el característico aroma y olor de la planta que lo produce (Batish *et al.*, 2008). La presencia de monoterpenos volátiles o de aceites esenciales en las plantas es una importante estrategia de defensa, especialmente contra herbívoros, insectos perjudiciales u hongos patógenos (Langenheim, 1994). Los terpenoides volátiles también juegan un importante rol en las interacciones planta-planta y actúan como atrayente de los insectos polinizadores (Tholl, 2006). Los aceites esenciales han mostrado potencial como herbicidas. Uno de los inconvenientes que presentan es que normalmente es necesario el empleo de surfactantes para su aplicación, y éstos están limitados en la agricultura orgánica.

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 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).

Hace ya tiempo que se reconoce que algunos de ellos tienen propiedades antimicrobianas, pero el auge relativamente reciente del consumo ecológico ha provocado un renovado interés científico en estas sustancias (Nychas, 1995; Tuley de Silva, 1996). Estos aceites o sus componentes tienen, además de propiedades antimicrobianas, propiedades antivíricas, antifúngicas y propiedades insecticidas. Estas características están posiblemente relacionadas con la función de estos compuestos en las plantas (Guenther, 1948; Mahmoud y Croteau, 2002). También otros autores como El Bouzidi *et al.* (2012) coincidieron en que poseen propiedades antibacterianas y antifúngicas. La diversidad estructural de los compuestos antifúngicos es enorme y sólo se conoce una pequeña parte de ellos.

Juegan un papel importante en los mecanismos de defensa del huésped contra fitopatógenos. Se ha demostrado que los aceites esenciales y sus compuestos tienen un efecto fungicida, son inocuos para el medio ambiente, para los consumidores y para el control de enfermedades poscosecha. Diversos autores han tratado la actividad antifúngica de estos aceites y sus compuestos. Muller-Riebau *et al.* (1995) evaluaron 9 aceites esenciales contra 4 especies de hongos fitopatógenos, mientras que Wilson *et al.* (1997) evaluaron 49 aceites contra *Botrytis cinerea*. Daferera *et al.* (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 *et al.* (2003) probaron los aceites de clavo, canela y orégano sobre *Fusarium proliferatum*, los cuales inhibieron el crecimiento de este hongo.

Su actividad antifúngica no puede ser fácilmente correlacionada con un componente individual, sino con una mezcla de los compuestos presentes en ellos (Tzortkakis, 2008). 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. Sin embargo, si se da un efecto antagonista, la efectividad de los compuestos antimicrobianos podría ser enormemente reducida (López-Malo *et al.*, 2005).

Se ha determinado que la mayoría de los aceites esenciales inhiben el desarrollo de los hongos de poscosecha en condiciones *in vitro* (Barrera y García, 2008).

1.2.2. El aceite esencial de Laurel.

El Laurel (*Laurus nobilis* L.) pertenece a la familia de las Lauráceas. Es una planta perenne de porte arbustivo que suele medir unos 5 metros de altura (puede llegar a 10 m), originario del Mediterráneo oriental y de Asia Menor.

Es un árbol de crecimiento muy lento y muy sensible a las heladas, de tronco recto y corteza grisácea, con la copa densa. 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 5). 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). Hay laureles macho, que no dan fruto, y hembra, que sí producen. El fruto es una drupa ovoidal pequeña, que se vuelve negro-azulado al madurar. 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%.

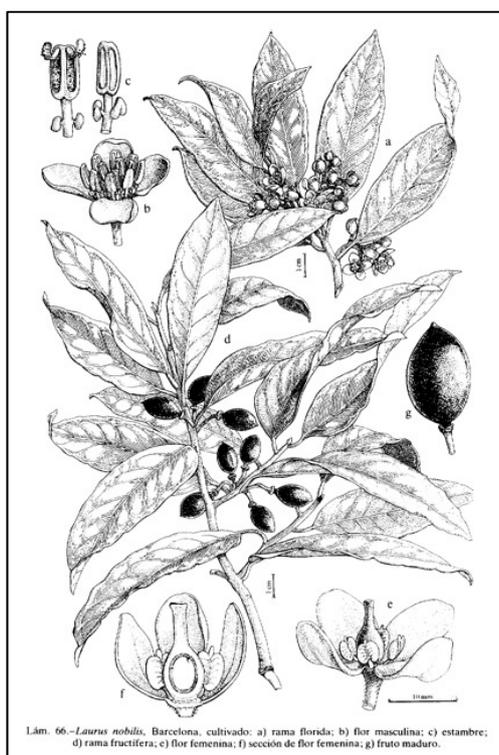


Figura 5. Detalle de rama, hojas, flores y frutos del laurel (Figura tomada de FLORA IBÉRICA, 2014)

El laurel, además de ser utilizado como especia en la cocina, tiene algunas propiedades como carminativo, tónico del aparato digestivo y diurético (Torres, 2009).

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 láurico, oleico, palmítico y linoleico, aplicándose en veterinaria para combatir los parásitos del ganado (REGIÓN DE MURCIA DIGITAL, 2014).

El aceite esencial de laurel presenta un alto porcentaje de componentes oxigenados, como 1,8 cineol (eucaliptol), alpha-terpinenylacetate, bornyl acetate y linalyl acetate. Además, los hidrocarburos también suponen una parte importante de su composición. De Corato *et al.* (2010) han demostrado la actividad de este aceite frente a *Monilia laxa* y *Botrytis cinerea*.

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 *et al.*, 2009), Turquía (Ozcan *et al.*, 2005; Dadalioglu *et al.*, 2004; Kilic *et al.*, 2005), China (Zheng-kui *et al.*, 1990), Túnez (Bouzouita *et al.*, 2001), Croacia-Serbia (Politeo *et al.*, 2007; Simic *et al.*, 2004) e Italia (Flamini *et al.*, 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 Antakya, Irán (Verdian-Rizi, 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 para acetato de α -terpinilo y limoneno. Los componente 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.

1.2.3. El aceite esencial de Canela.

La canela es una de las especias más utilizadas desde la antigüedad. Se obtiene de un árbol, el canelo, nativo de Sri Lanka y Asia tropical, de hasta 20 m de altura.

Se usan sus hojas y corteza. Es de corteza gruesa, de color pálido y de hojas brillantes, coriáceas, alargadas y aromáticas (Figura 6). Las flores son hermafroditas, aparecen agrupadas y florecen de

mayo a junio. Dan frutos de color morado. La canela habita en climas cálidos y templados, carentes de inviernos fríos. Está asociada a la selva tropical y a los bosques de encinas y pinos de las zonas cálidas, y se cultiva también en Brasil, Birmania, India, Indonesia e islas del océano Pacífico. El mayor productor continúa siendo Sri Lanka, seguido de las Islas Seychelles.



Figura 6. Detalle de rama, hojas, flores y frutos de la canela (Figura tomada de PURDUE UNIVERSITY, 2012)

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).

Es una especia ampliamente utilizada y tiene muchas aplicaciones como condimentos, en perfumería y en la industria farmacéutica (Singh *et al.*, 2007).

El aceite esencial de las ramas de la canela puede contener un alto porcentaje de cinamaldehído (López *et al.*, 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 *et al.*, 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 *et al.*, 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.

Algunos estudios han mostrado que el aceite esencial de canela tiene una elevada actividad fungicida frente a *Fusarium moniliformae* (Paran *et al.*, 1996). Los compuestos cinamaldehído, linalol, eugenol y 1,8 cineol se han comportado como componentes activos en la inhibición del crecimiento de *Monilia*, *Botrytis* y *Mucor* (Goubran y Holmes, 1993). Helander *et al.* (1995) han propuesto que cinamaldehído y eugenol inhiben la producción por parte de las bacterias de una enzima esencial y/o causan daño a las paredes de las células de las bacterias.

Más recientemente, muchos estudios han demostrado que ciertos compuestos oxigenados como citral, geraniol, eugenol y Z-cinamaldehído, tienen mejores propiedades antifúngicas que otros componentes comunes (Lee *et al.*, 2005).

Recientemente (Sumalan *et al.*, 2013) han mostrado que su actividad antifúngica frente a *Pichia*, *Saccharomyces* y *Hyphopichia* sp. en trigo puede ser atribuida además del eugenol, a grandes cantidades de acetato de eugenol, cinamaldehído y benzoato de bencilo. Así, extractos de canela podrían usarse como agentes antifúngicos en productos con un sabor compatible, como son los productos de panadería, donde los hongos son el campo de batalla más común (Tzortkakis, 2008).

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 (De Assis *et al.*, 2011).

Debido al polimorfismo químico de los aceites de diferentes procedencias, así como la variabilidad observada dentro de y entre las especies de *Fusarium* sp. del arroz, maíz y azúcar de caña

(Hsuan *et al.*, 2010), es fundamental conocer la composición química de las muestras utilizadas y realizar el aislamiento de las cepas fitopatógenas.

Además, los frutos tratados con vapor de aceite de canela (fresa y tomate), mantienen bajos los niveles de pudrición del fruto, comparados con frutos no tratados (Tzortkakis, 2007).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El presente trabajo se enmarca dentro de la Línea de investigación del Departamento de Ecosistemas Agroforestales de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural de la Universidad Politécnica de Valencia, formando parte del Programa de Apoyo a la Investigación y Desarrollo (PAID-05-10) de esta Universidad. En este amplio proyecto se llevan a cabo diversos trabajos relacionados con la capacidad antifúngica de los aceites esenciales frente a distintos patógenos de cultivos agrícolas, así como productos de poscosecha.

El objetivo principal de este trabajo es estudiar la capacidad antifúngica de los aceites esenciales de Canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y Laurel (*Laurus nobilis*) frente a *Fusarium oxysporum*, causante de la fusariosis vascular y podredumbre de cuello y raíces en distintos cultivos, con el fin de obtener sustancias potencialmente ecológicas para la gestión sostenible de productos alimenticios tanto en campo como almacenados.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES.

3.1.1. Hongo.

El hongo utilizado *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Saccardo) Snyder and Hansen fue aislado de tomate y suministrado por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT 2715). Las muestras de este hongo fueron mantenidas en el Laboratorio de Botánica del Departamento de Ecosistemas Agroforestales.

3.1.2. Aceites esenciales.

El aceite esencial de Laurel salvaje (*Laurus nobilis* L.) extraído de hojas (Lote: 719B032807) y el aceite esencial de Canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) de las ramas (Lote: 842A052810), fueron suministrados por la casa comercial ESENTIAL'ARÔMS y extraídos de manera natural a partir de la primera presión en frío. La recolección se realizó en el momento preciso y la extracción por destilación por arrastre de vapor, obteniéndose un aceite 100% natural.

3.1.3. Aparatos y material de laboratorio.

- Agitador orbital SELECTA ROTABIT
- Autoclave RAYPA AES-75
- Cabina de flujo laminar INDELAB
- Estufa de cultivo RAYPA I-288
- pH-metro CRISON GLP 21
- Balanza analítica KERN PLB 1000-2
- Camara fotográfica digital NIKON E885
- Cámaras frigoríficas
- Cromatógrafo de gases
- Material fungible usado en el laboratorio de Botánica (pipetas, placas petri, asas de siembra, sacabocados, matraz erlenmeyer, mechero gas...)

3.2. MÉTODOS.

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

La identificación de los compuestos presentes en los aceites esenciales de canela y laurel se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas, mediante la incorporación de su espectro de masas con la base de datos disponible en el cromatógrafo de gases-masas y la comparación del Índice de Kovats de cada compuesto con el descrito en la bibliografía.

Asimismo, se ha comprobado la identificación de algunos compuestos con la utilización de compuestos comerciales como patrones.

Las condiciones del Cromatógrafo de Gases son:

Volumen de inyección: 1 µL. Split, Split-ratio- 30:1. Flujo del gas portador: 1 mL/min. Column: HP-5MS UI (agilent); 30 m x 250 µm x 0,25 µm; T^a máx. 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.

3.2.2. Medios de cultivo.

Los medios de cultivo son la base fundamental para un estudio que requiera el uso de microorganismos, al permitir el crecimiento de los mismos en condiciones controladas y poder mantenerlos en estado puro.

En este estudio el medio de cultivo utilizado fue Agar Dextrosa Patata (PDA) que tiene la siguiente composición:

Infusión de patata	200,0 g/l
Dextrosa	20,0 g/l
Agar	17,0 g/l
Agua destilada	1000 ml

3.2.3. Bioensayos de la actividad de los aceites esenciales.

El aceite esencial fue disuelto, mezclado y homogeneizado por agitación en matraces con medio de cultivo PDA/Tween 20, 0,1% previamente esterilizado a 45-50°C, cuando aún está líquido, se adicionó a la concentración de 300 µg/mL, y se repartió en cápsulas Petri de 90x15 mm.

Las placas Petri fueron inoculadas con un disco de 8 mm de diámetro de una colonia de 7 días del hongo en crecimiento activo en PDA. Las placas fueron incubadas en la oscuridad a 25 °C durante 7 días. Las placas Petri control contenían las mismas cantidades de agua esterilizada/Tween 20, 0,1% en PDA. El crecimiento fúngico fue evaluado midiendo diariamente el diámetro de la colonia en dos direcciones perpendiculares y se calculó la velocidad de crecimiento. Para cada aceite esencial y hongo, se usaron seis placas Petri idénticas.

3.2.4. Cálculo de la Inhibición del Crecimiento Miceliar (MGI)

La inhibición del crecimiento miceliar se calculó el día 7, usando la siguiente fórmula (Albuquerque *et al.*, 2006):

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

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

3.2.5. Análisis estadístico.

El análisis de los datos se realizó usando el programa StatGraphics Plus 5.0 (STAT POINT, INC., HERNDON, VIRGINIA, USA). Los resultados de crecimiento micelial fueron sometidos al análisis de la varianza (ANOVA) con valores de significación de $P \leq 0,01$.

También se representan los intervalos LSD de comparación de medias para el factor esencia.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Composición química de los aceites esenciales de canela y laurel.

Los aceites esenciales de canela y laurel (Tabla 1) contienen un alto porcentaje de componentes oxigenados que incluyen epóxidos, ésteres, alcoholes y cetonas.

La identificación de la composición de estos aceites esenciales se realizó en colaboración con el Departamento de Química de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural, con la profesora Isidora Sanz-Berzosa.

En la Tabla 1 se muestran los componentes mayoritarios de los aceites de canela y laurel utilizados en el presente trabajo.

Tabla 1. Compuestos mayoritarios presentes en los aceites esenciales de canela y laurel.

KI ₍₁₎	COMPUESTO	CANELA (%)	LAUREL (%)
1273	2-propenal, 3-phenyl	1,999	
1362	eugenol	60,403	
1420	beta-caryophyllene	1,913	
1447	cinnamylacetate	5,567	
1538	eugenylacetate	18,33	
939	alpha pinene		3,95
979	sabinene		7,474
980	beta pinene		3,255
1035	eucaliptol		50,654
1063	gamma terpinene		1,203
1001	linalool		3,655
1180	terpinen-4-ol		2,165
1193	alpha-terpineol		2,301
1357	alpha-terpinenylacetate		12,917
1409	methyleugenol		3,803

(1) KI: Índice de Kovats en relación con *n*-alkanes (C₈-C₃₀).

En la composición del aceite de laurel encontramos que el 78,8% corresponde a compuestos oxigenados, siendo el eucaliptol (1,8 cineole) y el ester alpha-terpinenylacetate los mayoritarios en un porcentaje del 51% el primero y del 13% el segundo; Otros componentes minoritarios son los ésteres bornyl acetate (0,5%) y linalyl acetate (0,25%). Los hidrocarburos (monoterpenos y sesquiterpenos) suponen el 18% de su composición (Sanz-Berzosa *et al.*, 2013).

En el aceite esencial de canela los compuestos oxigenados representan el 92%. El eugenol es el mayoritario con un 60% aproximadamente, seguido de los ésteres eugenyl acetate y cinnamyl acetate con el 18,3% y 5,6% respectivamente, mientras que los hidrocarburos representan sólo el 5%. De ellos están en mayor proporción el beta-caryophyllene (1,9%) y otros compuestos minoritarios: limonene (1%), el alpha pinene (0,8%), el p-cymene (0,7%) y el alpha-caryophyllene (0,4%).

4.2. Efecto de los aceites esenciales de canela y laurel en el crecimiento de *Fusarium oxysporum*.

En la Figura 7 se muestra el crecimiento radial en mm de *Fusarium oxysporum* en los distintos medios ensayados en el presente trabajo. En este gráfico se observa que las rectas de crecimiento del hongo en medio PDA (control) y en PDA-laurel, presentan una pendiente similar. Asimismo, se observó que a los 7 días de incubación, el crecimiento de *F. oxysporum* en aceite esencial de laurel fue similar a los valores de control.

En cambio, el crecimiento del hongo en medio PDA-canela comenzó a partir del segundo día de ensayo, siendo los valores presentados a partir de ese día, inferiores respecto al crecimiento del hongo en PDA.

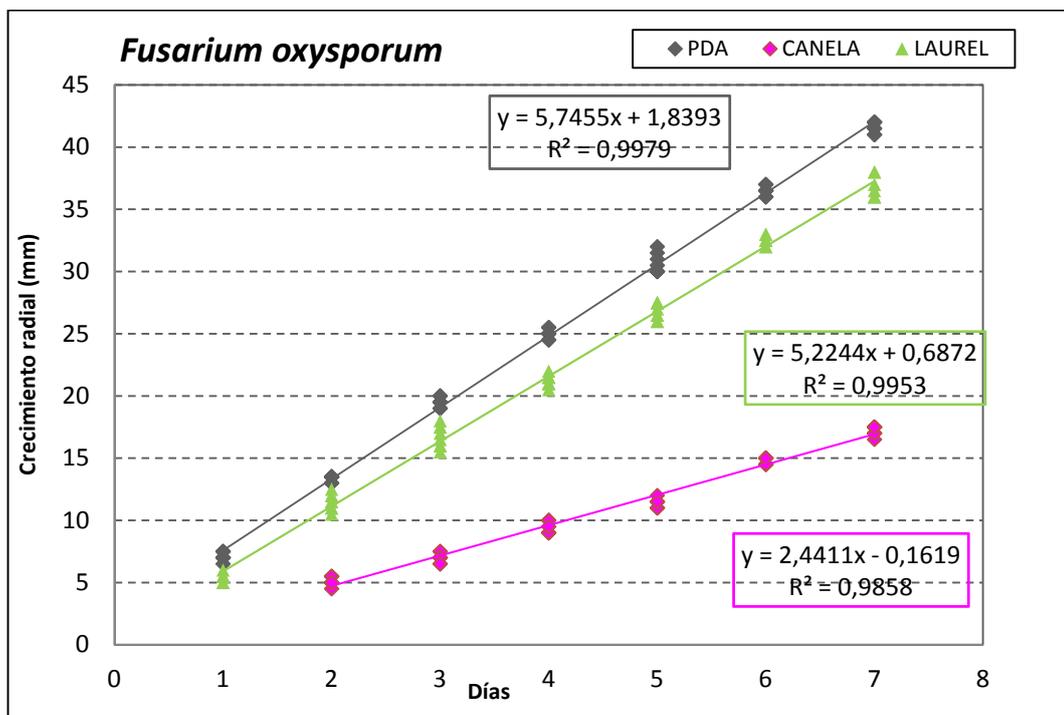


Figura 7. Crecimiento de *F. oxysporum* en medio PDA, en medio PDA-laurel y en medio PDA-Canela.

El crecimiento de *Fusarium oxysporum* en medio PDA es rápido, ocupando las colonias toda la superficie de la placa tras 7 días de incubación, presentando en este medio una coloración algo rosácea (Figuras 7 y 8).

Al añadir los aceites esenciales al medio de cultivo, se observa, además de disminuir el crecimiento del hongo (en el caso del aceite de canela), que hay un cambio en la forma, color y textura de la colonia (Figura 8).

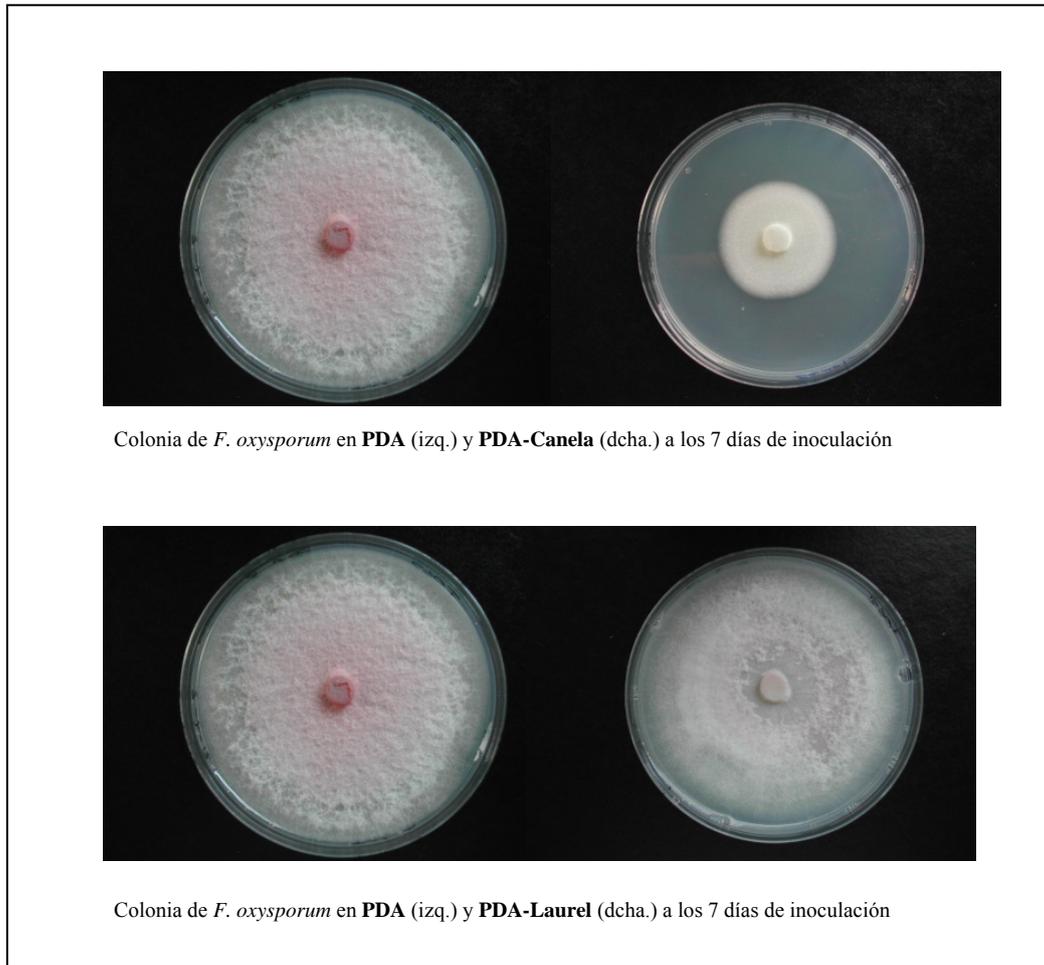


Figura 8. Colonia de *Fusarium oxysporum* crecida en medio PDA y PDA-aceite de Canela y colònia de *F. oxysporum* crecida en medio PDA y PDA-aceite de Laurel a los 7 días de inocular los discos.

La velocidad de crecimiento (Figura 9) del hongo *Fusarium oxysporum* fue de 5,75 mm/día cuando creció en PDA, y cuando se adicionó aceite esencial de laurel fue de 5,22 mm/día. Esto nos indica que este aceite a la dosis ensayada (300 µg/mL) no afecta al crecimiento del hongo.

Por otro lado, cuando se añadió aceite esencial de canela, la velocidad de crecimiento se redujo a 2,44 mm/día. Con lo anterior, vemos que el aceite esencial de canela tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento de *F. oxysporum*, puesto que fue capaz de reducir su velocidad de crecimiento hasta un 60%. Resultados similares obtuvieron Barrera y García (2008), donde el aceite esencial de canela disminuyó la tasa de crecimiento de *Fusarium* sp. de 6,75 mm/día (valor de control, en medio PDA) a 2,76 mm/día a la concentración de 300 µg/mL, es decir, logrando una reducción de la tasa de crecimiento del hongo del 59%. Por otro lado, Santamarina *et al.* (2014) observaron, al añadir los

aceites esenciales de canela, clavo y orégano, una reducción del crecimiento de *Fusarium culmorum* y *Fusarium verticillioides* de entre el 90% y casi el 100%.

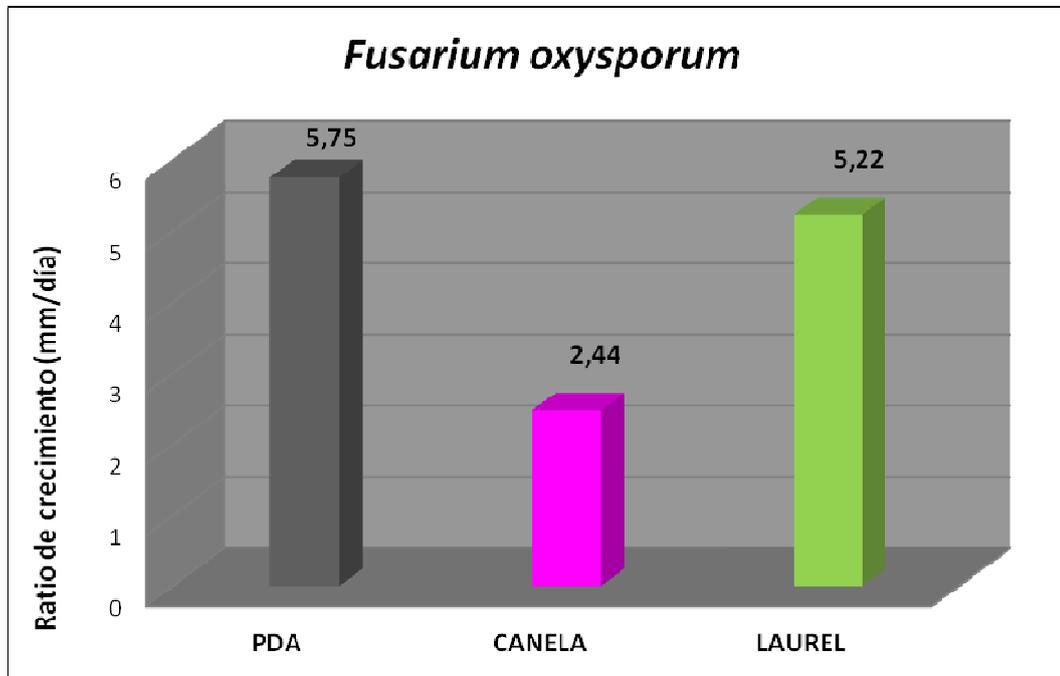


Figura 9. Velocidad de crecimiento de *F. oxysporum* en medio PDA, PDA-Canela y medio PDA-Laurel.

En el gráfico de crecimiento medio diario (Figura 10) de *Fusarium oxysporum* a lo largo de los 7 días de incubación en cada uno de los medios de cultivo, observamos que al adicionar aceite esencial de canela, la reducción del crecimiento es máxima al primer día (100%), al no mostrar el hongo desarrollo alguno. A partir del día 2, el porcentaje de reducción varía entre un 59% y un 66%, incrementándose ligeramente entre los días 2 y 4, con valores del 62% y del 66%, respectivamente. A partir del día 5 se produce una leve disminución de estos valores, día 5 un 63%, día 6 un 60% y el día 7 un 59%.

Por otro lado, en el caso del medio PDA-laurel, observamos que el porcentaje de reducción del crecimiento de *F. oxysporum* es algo más variable, ya que el día 1 alcanza el 24% (valor máximo), los días 2 y 3 baja a un 14%, subiendo de nuevo el día 4 al 24% también y bajando por último en los días 5 a 7, con valores entre el 11 y el 12%.

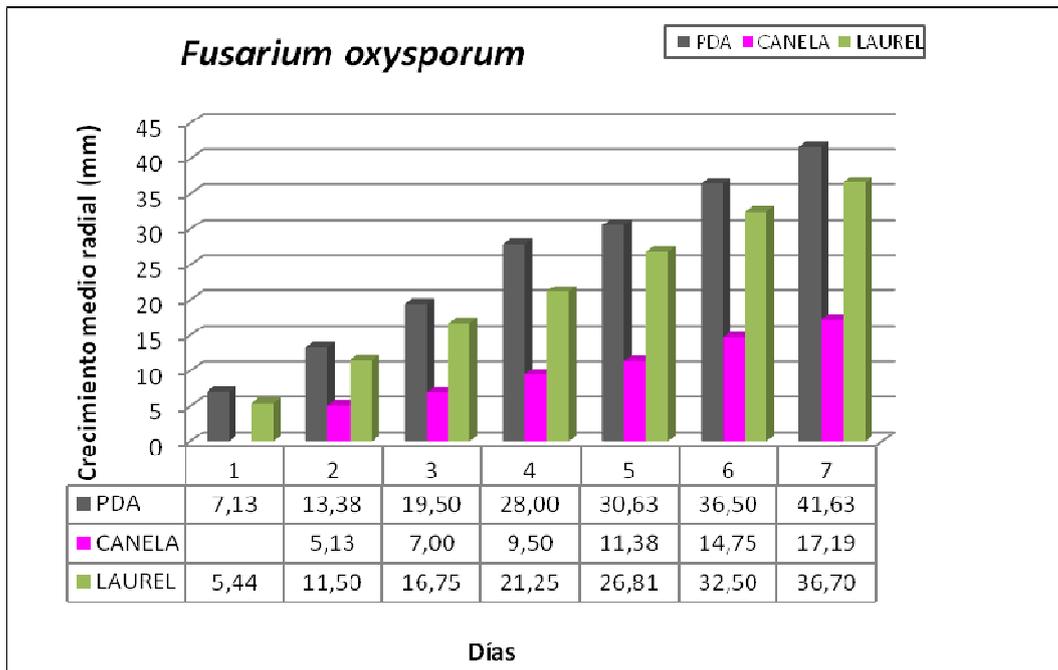


Figura 10. Crecimiento medio diario de *F. oxysporum* en medio PDA, en medio PDA-Canela y en medio PDA-Laurel.

El hongo en aceite esencial de laurel mostró un crecimiento similar al crecido en PDA, siendo el crecimiento medio radial a día 7 de 41,63 mm en medio PDA y de 36,70 mm cuando se añadió aceite de laurel (Figura 10). En cambio, De Corato *et al.* (2010) sí que observaron el efecto inhibitorio y fungistático del laurel. Concentraciones de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ inhibieron totalmente el crecimiento miceliar de *Monilinia laxa* y a dosis más elevadas, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, el de *Botrytis cinerea*.

En el caso del aceite esencial de canela, el crecimiento medio radial a día 7 fue de 17,19 mm, valor mucho menor comparado con el control (41,63 mm). Resultados similares fueron obtenidos por Barrera y García (2008), que en *Fusarium sp.*, el aceite de canela presentó un valor de crecimiento miceliar de 19 mm, valor mucho menor que el de control (50 mm) a la concentración de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Los resultados indican que la actividad antifúngica del aceite esencial de canela puede estar relacionada con el alto contenido en fenoles, concretamente eugenol, tal como indican otros autores (Yenjit *et al.*, 2010; Dambolena *et al.*, 2012). El aceite esencial de canela, con eugenol como principal componente, mostró mayor actividad que el eugenol puro, lo que sugiere que otros componentes del aceite esencial pueden interactuar de un modo sinérgico o aditivo acelerando sus efectos antifúngicos (De Assis *et al.*, 2011).

4.3. Efecto de los aceites esenciales de canela y laurel en la inhibición del crecimiento miceliar (MGI) de *Fusarium oxysporum*.

La inhibición del crecimiento miceliar (MGI), calculada según la fórmula de Albuquerque *et al.*, 2006, junto con el estudio de la velocidad de crecimiento, son dos índices que aportan similar información y ambos han sido utilizados para estudiar el efecto que produce en la evolución del hongo la adición de aceites esenciales a una determinada dosis. Así, autores como De Corato *et al.* (2010) y Tian *et al.* (2011) han utilizado en sus investigaciones el índice MGI. En este trabajo se han utilizado ambos índices, resultando valores similares. En el caso del aceite esencial de laurel, el MGI (Figura 10), calculado a día 7, ha sido del 12%, mientras que el cálculo del porcentaje de reducción de la velocidad de crecimiento es del 9%. En el aceite de canela es donde ambos índices son muy similares. Así, el MGI fue del 59% a día 7 y la velocidad de crecimiento se redujo casi el 60%.

4.4. Análisis estadístico.

El análisis de la varianza del factor esencia sobre el crecimiento del hongo, indica que este factor tiene una influencia estadísticamente significativa sobre el crecimiento medio de *Fusarium oxysporum* (Tabla 2), ya que el P-valor es menor de 0,05.

Tabla 2. Análisis de la varianza del crecimiento de *Fusarium oxysporum* frente al factor esencia (e).

Siendo: GL: grados de libertad; CM: cuadrado medio; F-ratio: F-Snedecor.

*Significativo $P < 0,05$

Factor	GL	CM	F-ratio	P-valor*
e	2	3472,39	39,03	0,0000

Se han representado los intervalos LSD de comparación de medias para los diferentes niveles del factor esencia en la Figura 11. Este gráfico nos indica que existen diferencias significativas ($P < 0,05$) en las medias de crecimiento del hongo entre el aceite esencial de canela y el PDA (control). Sin embargo, no existen diferencias significativas, a la dosis ensayada, entre el crecimiento medio en laurel y en PDA.

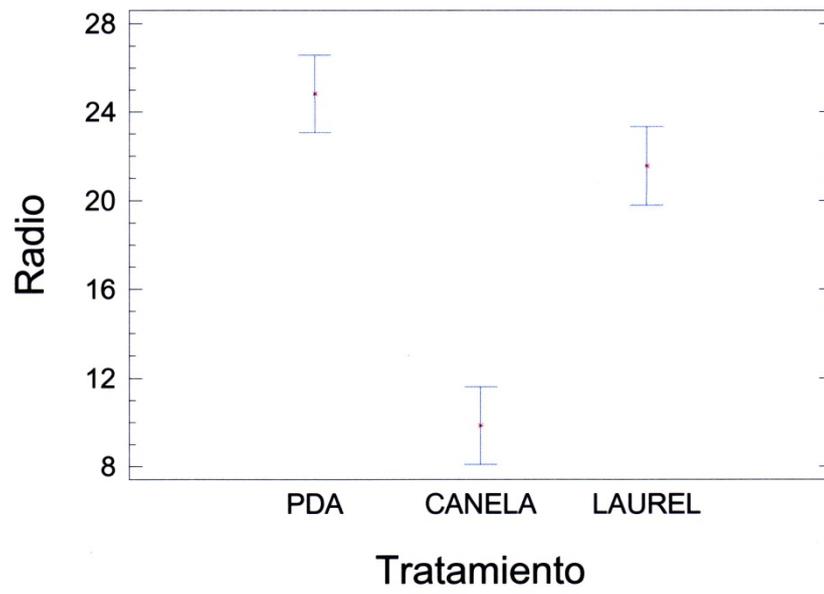


Figura 11. Intervalos LSD de comparación de medias para los diferentes niveles de factor esencia en *Fusarium oxysporum*.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

- ❖ El aceite esencial de canela contiene un 92% de compuestos oxigenados, siendo el eugenol el mayoritario con un 60% aproximadamente, seguido del éster eugenylacetate (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 alpha-terpinenylacetate (13%). Los hidrocarburos se encuentran en un 18%.
- ❖ La velocidad de crecimiento de *Fusarium oxysporum* en medio PDA (control) fue de 5,75 mm/día. Al adicionar al medio de cultivo los aceites de laurel y canela, el crecimiento del hongo fue de 5,22 mm/día en el caso del laurel y de 2,44 mm/día en el de canela.
- ❖ A la dosis ensayada (300 µg/mL), el aceite esencial de laurel reduce la velocidad de crecimiento de *F. oxysporum* un 9%. Sin embargo, con el aceite esencial de canela se logró reducir el crecimiento hasta un 60%.
- ❖ El porcentaje de inhibición del crecimiento miceliar (MGI) de *F. oxysporum*, calculado a día 7, fue del 12% cuando se añadió el aceite de laurel al medio y del 59% en el caso del aceite de canela.
- ❖ El análisis estadístico de la varianza (ANOVA) pone de manifiesto que el factor esencia tiene influencia significativa ($P < 0,05$) sobre el crecimiento medio de *Fusarium oxysporum*.
- ❖ El estudio de los intervalos LSD de comparación de medias para los diferentes niveles del factor esencia indican que existen diferencias significativas ($P < 0,05$) en las medias de crecimiento del hongo entre el aceite esencial de canela y el control (PDA). Sin embargo, no existen diferencias significativas, a la dosis ensayada, entre el crecimiento medio en laurel y el control.
- ❖ Como conclusión final podemos decir que los aceites esenciales, sobre todo el aceite de canela, podría ser una alternativa de aplicación práctica y de biocontrol, tanto en campo como en productos almacenados, para el control de *Fusarium oxysporum*.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

AGRIOS, G.N. (2008). *Fitopatología*. Editorial Limusa. México.

ALBUQUERQUE, C.C.; CAMARA, T.R.; WILADINO, R.D.R.; ULISES, C. (2006). Antimicrobial action of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49: 527-535.

BALANDRIN, M.F.; KLOCKE, J.A. (1985). Natural Plants chemicals: Sources of industrial and medicinal materials. *Science*, 228: 1154-1160.

BARRERA NECHA, L.L.; GARCÍA BARRERA, L.J. (2008). Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium* sp. aislado de papaya (*Carica papaya*). *Revista UDO Agrícola*, 8 (1): 33-41.

BÄRTELS, A. (2007). *Guía de Plantas del Mediterráneo*. Ediciones Omega. Barcelona.

BATISH, D.R.; SINGH, H.P.; KOHLI, R.K.; KAUR, S. (2008). *Eucalyptus* essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management*, 256: 2166-2174.

BAUER, K.; GARBE, D.; SURBURG, H. (2001). *Common fragrance and flavor materials: preparation, properties and uses*. Wiley-VCH. Weinheim.

BOUZOUITA, N.; NAFTI, A.; CHAABOUNI, M.; LOGNAY, G.; MARLIER, M.; ZGHOULLI, S.; THONART, P. (2001). Chemical compositions of *Laurus nobilis* oil from Tunisia. *Journal of Essential Oil Research*, 13: 116-117.

BOYLE, W. (1955). Spices and essential oils as preservatives. *The American Perfumer and Essential Oil Review*, 66:25-28.

BURT, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253.

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.

CARLILE, M.J.; WATKINSON, S.C. (2001). *The fungi*. Academic Press. London.

CARSON, C.F.; RILEY, T.V. (1993). Antimicrobial activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Letters in Applied Microbiology*, 16: 49-55.

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: 4395-4400.

DADALIOGLU, I.; EVRENDILEK, G. (2004). Chemical compositions and antibacterial effects of essential oils of Turkish Oregano (*Origanum minutiflorum*), Bay (*Laurus nobilis*), Spanish Lavender (*Lavandula stoechas* L.) and Fennel (*Foeniculum vulgare*) on Common Foodborne Pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 8255- 8260.

DAFERERA, D.J.; ZIOGAS, B.N.; POLISSIOU, M.G. (2003). The effectiveness of plant essential oils in the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop protection*, 22: 39-44.

DAMBOLENA, J.S.; LÓPEZ, A.G.; MERILES, J.M.; RUBINSTEIN, H.R.; ZYDALGO, J.A. (2012). Inhibitory effect of 10 natural phenolic compounds on *Fusarium verticilloides*. A structure-property-activity relationship study. *Food control*, 28: 163-170.

DE ASSIS, C.P.O.; GONDIM, M.G.C. JR; DE SIQUEIRA, C.; DA CÂMARA, A.G. (2011). Toxicity of essential oils from plants towards *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) and *Suidasia pontifica* Oudemans (Acari: Astigmata). *Journal of Stored Products Research*, 47: 311-315.

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 fungi. *Crop Protection*, 29: 142-147.

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.

EL BOUZIDI, L.; ABBAD, A.; HASSANI, L.; FATTARSI, K.; LEACH, D.; MARKOUK, M.; LEGENDRE, L.; BEKKOUCHE, K. (2012). Essential oil composition and antimicrobial activity of wild and cultivated moroccan *Achillea ageratum* L.: a rare and threatened medicinal species. *Chemistry & Biodiversity*, 9: 598-605.

FLAMINI, G.; TEBANO, M.; CIONI, P.; CECCARINI, L.; SIMONE, S.; LONGO, I. (2007). Comparison between the conventional method of extraction of essential oil of *Laurus nobilis* L. and a novel method which uses microwaves applied *in situ*, without resorting to an oven. *Journal Chromatography*, 1143: 36-40.

FLORA IBÉRICA, PLANTAS VASCULARES DE LA PENÍNSULA IBÉRICA E ISLAS BALEARES (2014). *Plan editorial de flora iberica, Relación de familias por volúmenes*, Madrid, visto el 26 de Noviembre de 2014.

http://www.floraiberica.es/floraiberica/texto/pdfs/01_032_01_Laurus.pdf

GOUBRAN, F.H.; HOLMES, R.J. (1993). *The development of alternative fungicides from essential oils*. Institute for Horticultural Development, Knoxfield, Department of Agriculture. Victoria, Australia.

GUENTHER, E. (1948). *The essential oils*. D. Van Nostrand Company. New York.

HELANDER, I.M.; ALAKOMI, H-L.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POL, I.; SMID, E.J. (1995). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 3590-3595.

HSUAN, H.M.; LATIFFAH, Z.; BAHARUDDIN, S. (2010). Characterization of *Fusarium* isolates from rice, sugarcane and maize using RFLP-IGS. *Journal of Plant Protection Research*, 50: 409-415.

ITO, M. (2008). Studies on perilla, agarwood and cinnamon through a combination of fieldwork and laboratory work. *Journal of Natural Medicines*, 62: 387-395.

KILIC, A.; ALTUNTAS, E. (2005). Wood and bark volatile compounds of *Laurus nobilis* Original Arbeiten. *Springer Verlage*, 2: 145-157.

LANGENHEIM, J.H. (1994). Higher plant terpenoids: a phyto-centric overview of their ecological roles. *Journal of Chemical Ecology*, 20: 1223-1280.

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 Science and Food Agriculture*, 85: 2047-2053.

LÓPEZ, P.; SÁNCHEZ, C.; BATLLE, R.; NERIN, 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: 4348-4356.

LÓPEZ-MALO, A.; PALOU, E.; PARISH, M.E.; DAVIDSON, P.M. (2005). Methods for activity assay and evaluation of results. *Antimicrobials in Foods*, 659-680.

MAHMOUD, S.S.; CROTEAU, R.B. (2002). Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science*, 7 (8): 366-373.

MULLER-RIBEAU, 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. *J. Agric. Food Chem.*, 43: 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: 327-328.

NYCHAS, G.J.E. (1995). Natural antimicrobials from plants. *New Methods of Food Preservation*. Ed. Gould, G.W. Blackie Academic and Professional. London, 58-89.

OZCAN, M.; CHALCHAT, J. (2005). Effect of different locations on the chemical composition of essential oils of bay (*Laurus nobilis* L.) leaves growing wild in Turkey. *Journal of Medicinal Food*, 8: 408-411.

PARAN, B.; SHARMA, R.K.; SIGH, R.S.; GHOSH, A.C.; BARUAH, P. (1996). Fungicidal activity of some naturally occurring essential oils against *Fusarium moniliformae*. *Journal of Essential Oil Research*, 8: 411-412.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. (2009). *Fungi and food spoilage*. Aspen Publishers. United Kingdom.

POLITEO, O.; JUKIC, M.; MILOS, M. (2007). Chemical composition and antioxidant activity of free volatile aglycones from bay (*Laurus nobilis* L.) compared to its essential oil. *Croatia Chemical Acta*, 80: 121-126.

PURDUE UNIVERSITY (2012). *Tropical Horticulture: Lecture 36*. West Lafayette, USA, visto el 26 de Noviembre de 2014.

https://www.hort.purdue.edu/newcrop/hort_403/pp_pdf/pp_36.pdf

REGIÓN DE MURCIA DIGITAL (2014). Canal Gastronomía (especies- laurel), visto el 1 de Julio de 2014.

http://www.regmurcia.com/servlet/s.SI?sit=c,543,m,2719&r=ReP-19873-DETALLE_REPORTAJESPADRE

ROSELLÓ, J. (2003). *Capacidad antagonista de Penicillium oxalicum Currie & Thom y Trichoderma harzianum Rifai frente a diferentes agentes fitopatógenos. Estudios ecofisiológicos*. Tesis doctoral en Ciencias Biológicas. Universidad Politécnica de Valencia.

ROSELLÓ, J.; SEMPERE, F.; SANTAMARINA, M.P. (2004). Respuestas al agua y a la temperatura del agente causante de la fusariosis del tomate: *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Phytoma España*, 162: 98-100.

SAMSON, R.; HOEKSTRA, E.; FRISVAD, J.; FILTENBORG, O. (2004). *Introduction to food-and airborne fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS). Utrecht.

SANCHIS, V.; MARÍN, S.; RAMOS, A.J. (2004). Micotoxinas y seguridad alimentaria. *Alimentación, Nutrición y Salud*, 11: 17-23.

SANZ-BERZOSA, I.; SANTAMARINA, M.P.; ROSELLÓ, J. (2013). Composición química de aceites esenciales con potencial antifúngico. *Phytoma España*, 253: 66-68.

SANTAMARINA, M.P.; ROSELLÓ, J.; GIMÉNEZ, S.; SANZ-BERZOSA, I. (2014). Antifungal activity and potential use of essential oils against *Fusarium culmorum* and *Fusarium verticillioides*. *45th International Symposium on Essential Oils (ISEO)*. Istanbul.

SIMIC, A.; SOKOVIC, M.; RISTIC, M.; GRUJIC-JOVANOVIC, S.; VUKOJEVIC, J.; MARIN, P. (2004). The chemical composition of some *Lauraceae* essential oils and their antifungal activities. *Phytotherapy Research*, 1: 713-717.

SINGH, G.; SUMITRA, M.; DELAMPASONA, M.P.; CATALAN, CESAR A.N. (2007). A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food and Chemical Toxicology*, 45: 1650-1661.

SUMALAN, R.M.; ALEXA, E.; POIANA, M.A. (2013). Assesment of inhibitory potential of essential oils on natural mycoflora and *Fusarium* mycotoxins production in wheat. *Chemistry Central Journal*, 7 (32): 1-12.

THOLL, D. (2006). Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, 9: 297-304.

TIAN, J.; XIAOQUAN, B.; HONG, Z.; JINGSHENG, H., BO, H.; YOUWEI, W. (2011). Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak. *International Journal of Food Microbiology*, 145: 464-470.

TORRES, L. (2009). *Hierbas aromáticas y especias*. Editorial Océano. Barcelona.

TULEY DE SILVA, K. (1996). *A Manual on the Essential Oil Industry*. United Nations Industrial Development Organization. Vienna.

TZORTZAKIS, N.G. (2007). Maintaining postharvest quality of fresh produce with volatile compounds. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8: 111-116.

TZORTZAKIS, N.G. (2008). Impact of cinnamon oil-enrichment on microbial spoilage of fresh produce. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10: 97-102.

VAN DER BRAAK, S.A.A.J., LEIJTEN, G.C.J.J. (1999). Essential oils and Oleoresins: A Survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union. *CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries*. Rotterdam, 116.

VELLUTI, A.; SANCHIS, V.; RAMOS, A.J.; EGIDO, J.; MARIN, S. (2003). Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. *J. Food Microbiol.*, 89 (2-3): 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.

WAINWRIGHT, M. (2003). *Introducción a la biotecnología de los hongos*. Editorial Acribia. Zaragoza.

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*. *The American Phytopathological Society*, 81 (2): 204-210.

YENJIT, P.; ISSARAKRAISILA, M.; INTANA, W.; CHANTAPROMMA, 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.

ZHENG-KUI, L.; YING-FANG, H.; GUO-PING, G.; YU-HONG (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.

ANEXOS

ANEXOS

- **ANEXO 1:** ROSELLÓ, J.; GIGANTE, A.M.; SANTAMARINA, M.P. (2014). Potencial de los aceites comerciales de Laurel y Canela en el control de *Fusarium oxysporum*. *Phytoma España*. 254, 70-72.

Se incluye en el Anexo 1: Portada de la revista *Phytoma España* (254), la primera página de la revista y el citado artículo.

- **ANEXO 2:** ROSELLÓ, J.; GIGANTE, A.M.; SANTAMARINA, M.P. (2014). Potencial de los aceites comerciales de Laurel y Canela en el control de *Fusarium oxysporum* (Póster). 36^{as} *Jornadas de Productos Fitosanitarios* (2014). Barcelona.

Se incluye en el Anexo 2: Póster y carátula de las 36^{as} Jornadas de Productos Fitosanitarios (Barcelona, 2014).