

EFFECTO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *CITRUS SINENSIS* Y *CITRUS RETICULATA* X *CITRUS SINENSIS* SOBRE LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE *RHIZOPUS STOLONIFER* Y *COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIOIDES*

Flor Narváez¹, Sonia Barzola¹, Flor M. Fon-Fay¹, Malena Martínez¹ y Janne Rojas-Vera^{1,2*}

¹Facultad de Ciencias de la Ingeniería, Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Quevedo, Provincia de Los Ríos, código postal 120501, Ecuador.

²Instituto de Investigaciones, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, código postal 5101, Venezuela.

E-mail: janner@ula.ve

RESUMEN

Se evaluó el potencial antifúngico de los aceites esenciales de hojas y pericarpios de *Citrus sinensis* (CS) y *Citrus reticulata* x *Citrus sinensis* (CRS) frente a *Rhizopus stolonifer* y *Colletotrichum gloeosporioides*. Las hojas de CS y CRS inhibieron el crecimiento radial en un 100 % en *R. stolonifer* en todas las dosis ensayadas (100, 200 y 400 µL), mientras que el conteo de esporas reveló ausencia de 99,8 % (100 µL) y 100 % para las dosis de 200 µL y 400 µL. En *C. gloeosporioides* se observó que las hojas de CRS y CS provocaron la inhibición del crecimiento radial y ausencia de esporas en un 100 %. Los aceites obtenidos de los pericarpios mostraron un índice de inhibición menor. Los resultados se consideran un aporte al estudio de los aceites esenciales con actividad inhibitoria frente a *R. stolonifer* y *C. gloeosporioides*.

Palabras clave: *Rhizopus stolonifer*, *Colletotrichum gloeosporioides*, aceites esenciales de cítricos, papaya, deterioro.

***Janne del Carmen Rojas Vera:** Farmacéutica (Universidad de Los Andes ULA, 1990), Magíster Scientiae en Química de medicamentos (ULA, 1995), Doctor of Philosophy (Universidad de Portsmouth, Inglaterra, 2002). Profesora Titular adscrita al Instituto de Investigaciones, Facultad de Farmacia y Bioanálisis (ULA). Desarrolla actualmente las líneas de investigación en Fitoquímica en las Familias Asteraceae, Euphorbiaceae, Hypericaceae, entre otras. Ha publicado más de 60 trabajos en revistas científicas arbitradas e indexadas de impacto y ha sido galardonada con varios premios, entre ellos Premio de Estímulo al Investigador, Orden Mariano Picón Salas 1era clase y Premio Estímulo a la Docencia.

ABSTRACT

Effect of the essential oils from *Citrus sinensis* and *Citrus reticulata* x *Citrus sinensis* on the growth inhibition of *Rhizopus stolonifer* and *Colletotrichum gloeosporioides*

The antifungal potential of leaves and peel essential oils from *Citrus sinensis* (CS) and *Citrus reticulata* x *Citrus sinensis* (CRS) against *Rhizopus stolonifer* and *Colletotrichum gloeosporioides* was evaluated. Both CS and CRS leaf essential oils caused 100% of radial growth inhibition in *R. stolonifer* at all tested doses (100, 200 and 400 µL), while values for spore formation showed 99.8% of inhibition for (100 µL) and 100% for 200 µL and 400 µL. CRS and CS leaf essential oils produced 100% radial growth inhibition of *C. gloeosporioides* and spores absence. Peel essential oils showed a minor inhibition effect. These results are considered a contribution to the study on essential oils with potential antifungal activity against *R. stolonifer* and *C. gloeosporioides*.

Keywords: *Rhizopus stolonifer*, *Colletotrichum gloeosporioides*, citrus essential oils, papaya, spoilage.

INTRODUCCIÓN

Carica papaya L. (Caricaceae) es el nombre botánico con el que se conoce a la papaya, uno de los productos agrícolas de mayor auge en los últimos años, no solo por las propiedades nutritivas que tiene sino por ser, además, un cultivo rentable. Es propia de climas templados a cálidos y se cultiva en más de 60 países de las

regiones tropicales y subtropicales; se estima que la producción mundial está aproximadamente en 11,22 millones de toneladas anuales (1-3). Su valor nutritivo comprende una variedad de compuestos tales como carbohidratos, vitaminas A, B, C, K ácido fólico y minerales como el calcio, fósforo, magnesio, hierro, sodio, potasio, entre otros (4).

La maduración de la papaya ocurre inmediatamente después de la cosecha por lo tanto debe conservarse entre 8 a 10 °C por un periodo máximo de 4 semanas; o de 5 a 7 días a 22 °C. Sin embargo, durante este tiempo es susceptible al ataque de microorganismos patógenos, siendo los hongos *Colletotrichum* sp., *Rhizopus stolonifer*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum* y *Penicillium digitatum* los causantes de enfermedades postcosecha más comunes (5-7). Se conoce que la infección comienza en el campo y permanece en reposo o latente hasta la fase climática o de maduración reduciendo la vida útil y afectando negativamente el valor comercial de estas frutas (8-10). El control de estas enfermedades se basa principalmente en el uso de fungicidas sintéticos pero estos traen efectos nocivos para los seres humanos y el medio ambiente. Es por esto que el uso de aceites esenciales ha captado la atención de los investigadores como alternativa natural y biodegradable (10).

En la presente investigación se evaluó el potencial antifúngico de los aceites esenciales de naranja (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) y tangor (*Citrus reticulata* x *Citrus sinensis*) frente a cepas de *Rhizopus stolonifer* y *Colletotrichum gloeosporioides*, aisladas del mesocarpio de la papaya var. Maradol.

MATERIALES Y MÉTODOS

La recolección de las papayas var. Maradol se realizó en la Finca "Fernando Jacho", Cantón Valencia, Provincia de Los Ríos, Ecuador. Las papayas fueron previamente lavadas con una solución de hipoclorito de sodio al 3 %. Posteriormente se enjuagaron tres veces consecutivas con agua destilada estéril para eliminar los restos de hipoclorito de sodio. Seguidamente, se escogieron las partes donde se observó descomposición y con la ayuda de un bisturí, se tomaron cinco muestras del mesocarpio de 0,5 cm² y fueron colocadas, cada una por separado, en cajas Petri estériles, que contenían el medio de cultivo agar papa dextrosa, APD (Neogen Corp., USA) y sulfato de

estreptomocina (laboratorios Richet, Argentina) al 1 %, como antibiótico. Las placas con las muestras se dejaron en la incubadora a 24 °C por dos días para el *Rhizopus stolonifer* y siete días para *Colletotrichum gloeosporioides*, para observar el crecimiento y desarrollo de los micelios y conidias. Todos los procedimientos se desarrollaron dentro de una cámara de flujo laminar y cumplieron con las condiciones de asepsia y esterilidad requeridas (11). Cada colonia desarrollada se separó y purificó por el sistema de repiques usando el medio de cultivo APD y la observación se efectuó por montaje microscópico. La identificación a nivel de género se realizó siguiendo las claves de Barnett y Hunter (12) y dio como resultado que las colonias aisladas correspondieron a *R. stolonifer* y *C. gloeosporioides*. La determinación se hizo con base a las características del micelio, color de la colonia, forma de conidióforos; y forma, tamaño y color de los conidios (12-14).

En la presente investigación se usaron aceites esenciales del pericarpio y hojas de naranja (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) y tangor (*Citrus reticulata* x *Citrus sinensis*). Los aceites esenciales del pericarpio fueron obtenidos por hidrodestilación y son procedentes del Laboratorio Isabruk Botanik S.A. ubicado en la ciudad de Ambato, Provincia de Tungurahua, Ecuador. Los aceites de las hojas fueron obtenidos por el mismo método en el laboratorio de Química Básica, UTEQ-Quevedo, Provincia de Los Ríos, Ecuador. El efecto inhibitorio de los aceites esenciales sobre los hongos *Rhizopus stolonifer* y *Colletotrichum gloeosporioides* se determinó mediante la observación del crecimiento radial del micelio medido en mm y conteo del número de esporas por mL de solución (11).

Con relación a la determinación del crecimiento radial, para este ensayo se prepararon cajas de Petri previamente esterilizadas a las que se les agregó el medio APD y las concentraciones de los aceites a ensayar 400 µL, 200 µL y 100 µL. Los aceites se mezclaron con Tween 20 al 1 % para mejorar su solubilidad y estabilidad en el medio. Cada concentración y tipo de aceite se colocó en placas por separado. Una vez homogeneizado y solidificado el medio, se colocó sobre el agar, una muestra de aproximadamente 6 mm de diámetro de cada hongo a ensayar, igualmente en placas separadas. El ensayo se realizó por duplicado y se incluyó una muestra testigo que contenía únicamente el medio APD y Tween 20 al 1 %. Estas placas se incubaron a 24 °C,

tomando mediciones diarias del crecimiento radial en mm durante un lapso de siete días con el uso de un calibrador vernier. Para determinar el porcentaje de inhibición se usó la fórmula $T - Tr / T * 100$, donde: T: testigo; Tr: tratamiento.

Una vez observado el crecimiento radial se continuó con el conteo del número de esporas por hongo ensayado en el estudio. Para esto se adicionaron 10 mL de agua destilada estéril a cada una de las placas usadas en el crecimiento radial. Se agitó cada placa suavemente con una varilla de vidrio y se tomó una alícuota de 1 mL de agua a la que se le agregó 1 μ L de Tween 20 al 1 %. Estas muestras se colocaron en viales Eppendorf y se agitaron en un Vortex mixer para obtener una solución homogénea. El número de esporas se contó usando una cámara de Neubauer (Marienfeld 0,0025 mm x 0,1 mm de profundidad) con la ayuda de un microscopio (Olympus CX1, lente número 10) (15). El porcentaje de inhibición se determinó mediante la fórmula $T - Tr / T * 100$, donde: T: testigo; Tr: tratamiento.

Los análisis estadísticos se realizaron usando el método de varianza y el sistema Stats Graphics Centurion. Para la separación de medias de los tratamientos se utilizó la prueba de significancia de Tukey ($p < 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la presente investigación se evaluó el potencial antifúngico de los aceites esenciales de *C. sinensis* (CS) y *C. reticulata* x *C. sinensis* (CRS) frente a cepas de *R. stolonifer* y *C. gloeosporioides*, aisladas del mesocarpio de la papaya var. Maradol. Se ensayaron diferentes concentraciones (100, 200 y 400 μ L), tanto para los aceites obtenidos de las hojas como de las cortezas de estos cítricos. Los aceites de las hojas de CS y CRS mostraron fuerte actividad inhibitoria tanto del crecimiento radial como en la formación de esporas en ambos hongos (Tabla 1). En *R. stolonifer* inhibieron el crecimiento radial en un 100 % en todas las dosis ensayadas, mientras que el conteo de esporas reveló ausencia de 99,8 % para la dosis de 100 μ L y 100 % para las dosis de 200 μ L y 400 μ L. Sin embargo, los aceites obtenidos de los pericarpios mostraron un índice de inhibición menor al compararlos con los de las hojas. En cuanto a crecimiento radial CS mostró 88,8 % para la dosis de 100 μ L, 80,8 % en 200 μ L y 87,8 % en 400 μ L. Por su parte, CRS reveló un mínimo poder inhibitorio en la dosis de 100 μ L con solo un 9,1 %; seguido por

un 44,4 % a la dosis de 200 μ L, mientras que a una dosis mayor, 400 μ L, mostró un 89,9 % de inhibición. En lo que respecta a la presencia de esporas, el aceite del pericarpio de CS presentó un 95,69 % de ausencia para las dosis de 100 μ L y 200 μ L y 91,13 % para la dosis de 400 μ L al compararlo con el aceite del pericarpio de CRS cuyos valores son 72,41 % en la dosis de 100 μ L, 64,38 % en la dosis de 200 μ L y 91,39 % en la dosis de 400 μ L (Tabla 2).

En *C. gloeosporioides* se observó igualmente que los aceites de las hojas de CRS y CS provocaron no solo la inhibición del crecimiento radial en un 100 % sino una ausencia de spora del 100 %, mostrando una fuerte actividad antifúngica frente a este hongo. Sin embargo, los aceites de los pericarpios de CRS y CS mostraron un comportamiento diferente. El aceite del pericarpio de CS reveló un 77,4 % de inhibición del crecimiento radial a la dosis de 100 μ L pero una completa inhibición (100 %) en las dosis de 200 μ L y 400 μ L, mientras que el aceite del pericarpio de CRS mostró valores entre 52,5 % (100 μ L), 75,9 % (200 μ L) y 81,1 % (400 μ L) de presencia de esporas indicando un poder antifúngico mucho menor.

La muestra testigo de *R. stolonifer* reveló un crecimiento exponencial que osciló entre 49 y 99 mm, en observaciones realizadas a las 24 h y 48 h. *C. gloeosporioides* igualmente reveló un crecimiento exponencial que osciló entre 11 y 69 mm en observaciones realizadas desde las 24 h hasta las 168 h de ensayo.

En la actualidad existe un gran interés de parte de los investigadores hacia la búsqueda de alternativas naturales que ayuden a combatir las plagas y alargar la vida media de los productos postcosecha. Un estudio realizado en Venezuela con el aceite esencial del pericarpio de *C. sinensis* var. Valencia reveló actividad inhibitoria entre 80 a 100 % del crecimiento radial y ausencia de esporas frente a *Colletotrichum gloeosporioides*, *Penicillium indicum*, *Fusarium solani*, *Rhizopus stolonifer* y *Aspergillus flavus*, lo que indica que el aceite esencial de esta especie puede usarse como alternativa factible para el control natural y eficaz de hongos postcosecha (10).

Los extractos de diversas plantas también han sido objeto de estudio para determinar la actividad antifúngica frente a los hongos que causan daño a los productos postcosecha.

Tabla 1. Crecimiento radial de los hongos ensayados a diferentes tiempos

Tratamiento con los aceites esenciales (h)	<i>Rhizopus stolonifer</i>			<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		
	Concentraciones (μ L)					
<i>Citrus sinensis</i> (hojas)	100	200	400	100	200	400
24	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-
72	-	-	-	-	-	-
96	-	-	-	-	-	-
120	-	-	-	-	-	-
144	-	-	-	-	-	-
168	-	-	-	-	-	-
Inhibición (%)	100	100	100	100	100	100
<i>Citrus sinensis</i> (pericarpio)	100	200	400	100	200	400
24	9	11	12	-	-	-
48	10	19	-	-	-	-
72	-	-	-	8	-	-
96	-	-	-	8	-	-
120	-	-	-	13	-	-
144	-	-	-	-	-	-
168	-	-	-	-	-	-
Inhibición (%)	88,8	80,8	87,8	77,4	100	100
<i>Citrus reticulata x Citrus sinensis</i> (hojas)	100	200	400	100	200	400
24	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-
72	-	-	-	-	-	-
96	-	-	-	-	-	-
120	-	-	-	-	-	-
144	-	-	-	-	-	-
168	-	-	-	-	-	-
Inhibición (%)	100	100	100	100	100	100
<i>Citrus reticulata x Citrus sinensis</i> (pericarpio)	100	200	400	100	200	400
24	10	8	9	-	-	-
48	15	8	-	-	-	8
72	19	9	-	-	-	9
96	22	9	-	14	8	-
120	28	10	-	18	9	-
144	36	13	-	26	15	-
168	54	18	-	31	20	-
Inhibición (%)	9,1	44,4	89,9	52,5	75,9	81,1

El crecimiento radial esta expresado en mm. Se partió de una muestra de cada hongo de 6 mm de diámetro.

Tabla 2. Conteo de esporas después de 168 h de tratamiento

Aceite esencial	<i>Rhizopus stolonifer</i>			<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		
	Concentraciones (µL)					
	100	200	400	100	200	400
<i>C. sinensis</i> (hojas)	99,76	100	100	100	100	100
<i>C. sinensis</i> (pericarpio)	95,69	95,69	91,13	95,50	98,76	96,46
<i>Citrus reticulata x Citrus sinensis</i> (hojas)	99,76	100	99,76	100	100	100
<i>Citrus reticulata x Citrus sinensis</i> (pericarpio)	72,41	64,38	91,39	50,15	24,19	27,73

La inhibición de la presencia de esporas esta expresada en porcentaje.

Los extractos de *Allium sativum* y *Cinnamomum zeylanicum*, mostraron efecto inhibitorio del 100 % sobre el crecimiento radial, la germinación y esporulación de *C. gloeosporioides*, considerándose efectivos para inhibir el desarrollo del hongo *in vitro* (16).

Otro estudio realizado con los extractos diclorometánico, hidroalcohólico y metanólico obtenidos de las semillas de *Swietenia humilis* (Meliaceae) fueron analizados para determinar su efecto en la inhibición del crecimiento micelial, esporulación y alteraciones en las estructuras germinativas de *R. stolonifer*, causante de la pudrición blanda en hortalizas. En este estudio se observó que el extracto metanólico inhibió la formación de esporas en un 100 % mientras que los extractos diclorometánico e hidroalcohólico causaron la inhibición en un 85,8 y 97,7 %, respectivamente (17).

Un estudio realizado en México reveló que el extracto de las hojas de *Cestrum nocturnum* posee efecto inhibitorio del crecimiento micelial de *R. stolonifer* a las concentraciones de 0,5; 2; 5 y 10 mg/mL (18). Por otro lado, los extractos de *Lantana camara*, *Lantana viburnoides*, *Echinops* sp. y *Ruta chalepensis* mostraron valores de inhibición de formación de esporas de 88,7; 85,8; 85,1 y 84,6 %, respectivamente (19). Los resultados observados en la presente investigación se consideran un aporte importante al estudio de los aceites esenciales con potencial actividad inhibitoria frente a *R. stolonifer* y *C. gloeosporioides*.

REFERENCIAS

1. Mostacero, J. y Mejía, F. *Taxonomía de fanerógamas útiles del Perú*. Trujillo, Libertad, 1993, pp. 48-66.
2. Bernal, A. *Papaya perfil comercial compilación*. Colima, Secretaría de desarrollo rural, dirección de comercialización y planeación, 2010, pp. 1-20.
3. Evans, E. y Ballen, F. *Una mirada a la producción, el comercio y el consumo de papaya a nivel mundial*. Gainesville, FL., Universidad de la Florida, pp. 1-6.

CONCLUSIONES

En la presente investigación se evaluó el potencial antifúngico de los aceites esenciales de *Citrus sinensis* y *Citrus reticulata x Citrus sinensis* frente a cepas de *Rhizopus stolonifer* y *Colletotrichum gloeosporioides*, observándose que los aceites de las hojas tanto de *C. sinensis* como de *C. reticulata x C. sinensis* mostraron fuerte actividad inhibitoria tanto del crecimiento radial como en la formación de esporas en ambos hongos. Los resultados observados en esta investigación se consideran un aporte al estudio de los aceites esenciales con potencial actividad inhibitoria frente a *Rhizopus stolonifer* y *Colletotrichum gloeosporioides*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Técnica Estatal de Quevedo por su apoyo para la realización del estudio. Además, Janne Rojas desea expresar gratitud a la Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT), Ecuador, por el apoyo a través del Proyecto Prometeo. Al Laboratorio Isabruk Botanik S.A. por proveer algunas de las muestras de los aceites esenciales usados en la investigación.

4. *Tabla de de nutrientes de frutas* [en línea]. Consultado 20 marzo 2016 en <https://lpcdedios.wordpress.com/tabla-de-nutrientes/>
5. Paul, R.; Nishijima, W.; Reyes, M. y Cavaletto, C. *Postharvest Biol Technol.* 11:165-79, 1997.
6. Gatto, M.; Ippolito, A.; Linsalata, V.; Cascarano, N.; Nigro, F; Vanadia, S. y Di Venere, D. *Postharvest Biol. Technol.* 61:72-82, 2011.
7. Tripathi, P.; Dubey, N. y Shukla, A. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24:39-46, 2008.
8. Solaimani, B.; Ramezani, M. y Saharkiz, M. *Adv. Environ. Biol.* 3:249-54, 2009.
9. Combrinck, S.; Regnier, T. y Kamatou, G. *Ind. Crops. Prod.* 33:344-349, 2011.
10. Guédez, C.; Cañizalez, L.; Avendañ, L.; Scorza, J.; Castillo, C.; Olivar, R.; Méndez, Y. y Sánchez, L. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 34:81-85, 2014.
11. Castellanos, G.; Jara, C. y Mosquera, G. *Manejo del Hongo en el Laboratorio.* Cali, Centro Internacional de Agricultura Tropical, 2011, p. 31.
12. Barnett, H. y Hunter, B. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*, 4a ed. New York, NY., MacMillan Publishing Co., 1987, p. 217.
13. Nelson, P.; Toussoun, T. y Marasas, W. *Fusarium species, an illustrated manul of identification.* London, University Press, 1983, p. 193.
14. Von Arx, J. *The genera of fungi sporulating in pure culture.* Berlín, Strauss and Cramer, 1981, p. 424.
15. Bastidas, O. *Technical note. Neubauer chamber cell counting. Celermociis* [en línea]. Consultado 20 marzo 2016 en <http://www.celeromics.com/en/index.php>
16. Valenzuela, N.; Landero, D.; Téliz, D.; Alatorre, R.; Orozco, M. y Ortiz, C. *Rev. Venez. Cienc. Tecnol. Aliment.* 4(1):47-62, 2013.
17. Angulo, M.; Armenta, E.; Saúl, R.; Carrillo, J.; Salazar, E. y Benigno, J. *Rev. Mex. Fitopatol.* 27(2):84-92, 2009.
18. Barrera, L. y Bautista, S. *Rev. Mex. Fitopatol.* 26(1):27-31, 2008.
19. Ademe, A.; Amare, A. y Kebede, W. *Plant. Pathol. Microb.* 4(10):1-4, 2013.