

EFEECTO INHIBITORIO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *MENTHA SPICATA* Y *MATRICARIA CHAMOMILLA* FRENTE A *FUSARIUM SP.* Y *ALTERNARIA SP.*

Mary Cruz-Sabando¹, Flor Marina Fon-Fay^{1*}, Sonia Barzola¹, Malena Martínez¹,
Juan Neira¹ y Janne Rojas-Vera^{1,2}

¹Facultad de Ciencias de la Ingeniería, Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Quevedo, provincia Los Ríos, CP 120501, Ecuador.

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

E-mail: ffonfay@uteq.edu.ec

RESUMEN

Se evaluó el efecto de los aceites esenciales de *Mentha spicata* (ME) y *Matricaria chamomilla* (MC) sobre el crecimiento de los hongos, *Fusarium* y *Alternaria*, presentes en el tomate. El aceite ME mostró fuerte actividad inhibitoria tanto del crecimiento radial (100 % de inhibición en ambos hongos) como en la formación de esporas (99,8 % *Fusarium* y 100 % *Alternaria*). El aceite MC mostró una menor actividad con valores de inhibición del crecimiento radial entre 67,9 y 73,4 % frente a *Fusarium* y 79,0 y 85,9 % frente a *Alternaria*. Con relación a la presencia de esporas el aceite MC mostró valores de inhibición que oscilaron entre 62,0 y 73,8 % para *Fusarium* y 93,0 y 99,0 % para *Alternaria*. Los resultados observados en esta investigación se consideran un aporte al estudio de los aceites esenciales con potencial actividad inhibitoria frente a *Fusarium* y *Alternaria*.

Palabras clave: efecto antifúngico, aceite esencial, tomate.

ABSTRACT

Inhibitory activity of *Mentha spicata* and *Matricaria chamomilla* essential oils against *Fusarium sp.* and *Alternaria sp.*

Growth inhibition effect of *Mentha spicata* (ME) and *Matricaria chamomilla* (MC) essential oils against *Fusarium* and *Alternaria* fungus present in tomato has been evaluated. ME essential oil showed strong inhibitory activity on both radial growth (100 % inhibition, both fungus) and spore formation (99,8 % *Fusarium* and 100 % *Alternaria*). MC essential oil showed minor activity revealing growth inhibition values between 67,9-73,4 % *Fusarium* and 79,0-85,9 % *Alternaria*. Regarding spore formation, MC essential oil showed inhibition values between 62,0-73,8 % *Fusarium* and 93,0-99,0 % *Alternaria*. Results obtained in present investigation are considered a contribution to the study on essential oils with potential antifungal activity against *Fusarium* and *Alternaria*.

Keywords: antifungal effect, essential oil, tomato.

INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) pertenece a la familia Solanaceae que comprende aproximadamente 1 100 géneros y 20 000 especies distribuidas a nivel mundial (1). Es uno de los vegetales más ampliamente usados como parte de una dieta saludable, siendo considerado el segundo en importancia después de la papa

Flor Marina Fon Fay: Ingeniera Química (Universidad de Guayaquil, 1987). Master en Investigación para el Desarrollo Educativo, (Universidad Técnica Estatal de Quevedo, 2005). Master en Procesos de Alimentos (Universidad Agraria del Ecuador, 2015). Sus principales líneas de investigación son toxicología de alimentos y actividad de aceites esenciales.

debido a su composición de minerales, vitaminas y agentes antioxidantes como la quercetina, β -caroteno, licopina, entre otros (2, 3).

El tomate es cultivado en muchas zonas, con amplia variabilidad de condiciones de clima y suelo, sin embargo, se prefieren los climas secos, tanto para la producción como para uso agroindustrial. Se estima que la producción global de tomates para consumo en fresco y procesado se encuentra en aproximadamente 108 millones de toneladas métricas, con un rendimiento promedio de 36 t por hectárea cultivada (4, 5).

Sin embargo, para que esta hortaliza pueda llegar en buen estado y permanecer por un tiempo prolongado en los anaqueles de un mercado hay que tomar en cuenta una serie de cuidados que van desde el cultivo, la cosecha, el transporte hasta el almacenamiento y la venta. Existe amplia información sobre este tema, no obstante, uno de los mayores problemas que enfrentan los agricultores y comerciantes del tomate son las plagas y enfermedades que deben ser detectadas a tiempo con el fin de aplicar las medidas de control necesarias (4, 5). Entre las más comunes se pueden mencionar la mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum*), polilla del tomate (*Tuta absoluta*), los nemátodos (*Meloidogyne* spp.), enfermedades causadas por virus, bacterias (*Pseudomonas* sp., *Xanthomonas* sp., *Clavibacter michiganensis*) y hongos (*Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Phytophthora* sp., *Pyrenochaeta* sp.) (4-6).

En la actualidad existe un creciente interés por el estudio de alternativas naturales para el control de las plagas y enfermedades de los cultivos. Los extractos vegetales y los aceites esenciales derivados de plantas aromáticas se presentan como una elección viable. Es por esto que diversas investigaciones se han enfocado en la búsqueda de sustancias con actividad insecticida, antibacteriana y antifúngica en los productos naturales (7-9).

En la presente investigación se evaluó la actividad antifúngica de los aceites esenciales de hierba buena (*Mentha spicata* L.) y manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) frente a cepas de *Fusarium* y *Alternaria*, aisladas del mesocarpio de dos variedades del tomate riñón (fortuna y chonto) comercializado en la zona de Quevedo, provincia Los Ríos, Ecuador.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los tomates se adquirieron en el mercado de la ciudad de Quevedo, provincia Los Ríos, procedentes de la ciudad de Latacunga, provincia Cotopaxi, Ecuador. Estos fueron de las variedades Chonto y Fortuna, cosechados en marzo de 2015.

Los tomates fueron previamente lavados 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 secciones de mesocarpio (0,5 cm²) infectadas por patógenos con la ayuda de un bisturí y fueron colocadas en cajas Petri que contenían el medio de cultivo agar papa dextrosa, APD (Neogen Corp.) y Estreptomycin® al 0,5 %, como antibiótico. Las placas con las muestras se dejaron en la incubadora a una temperatura de 24 °C por 7 d, para observar el crecimiento y desarrollo de los micelios y conidias. Todos los procedimientos se desarrollaron bajo las condiciones de asepsia y esterilidad requeridas (10)

Para la identificación de las colonias de hongos, 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 según las claves de Barnett y Hunter (11), y dio como resultado que las colonias aisladas correspondieron a los géneros *Fusarium* y *Alternaria*. 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 (11-13)

Se usaron aceites esenciales de *Mentha spicata* (ME) y *Matricaria chamomilla* (MC), procedentes del Laboratorio Isabruk Botanik S.A. ubicado en la ciudad de Ambato, provincia Tungurahua, Ecuador. Los aceites fueron obtenidos por hidrodestilación durante 3 h.

El efecto inhibitorio de los aceites esenciales sobre los hongos *Fusarium* y *Alternaria* se determinó mediante la observación del crecimiento radial del micelio medido en cm y conteo del número de esporas por mL de solución (10). 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 100, 200 y 400 μ L. Los aceites se mezclaron

con Tween 20 a una concentración de 1 % para mejorar su solubilidad y estabilidad en el medio. Cada concentración y tipo de aceite (ME y MC) 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 a la concentración de 1 %. Estas placas se incubaron a 24 °C, tomando mediciones diarias del crecimiento radial en mm durante un lapso de 7 d con el uso de un calibrador Vernier. Para determinar el porcentaje de inhibición del micelio 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 (Labnet

SO200) 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 10X) (14). El porcentaje de inhibición de la esporulación se determinó mediante la fórmula $T-Tr/T*100$, donde: T-testigo; T- tratamiento.

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

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó la inhibición del crecimiento de los hongos *Fusarium* y *Alternaria* aislados e identificados en dos variedades del tomate riñón (fortuna y chonto) cultivados en la ciudad de Latacunga, provincia Cotopaxi, Ecuador. Se ensayaron aceites esenciales de las especies *Mentha spicata* y *Matricaria chamomilla* a diferentes concentraciones (100, 200 y 400 μ g/mL). El aceite ME mostró fuerte actividad inhibitoria tanto del crecimiento radial como en la formación de esporas en ambos hongos (Tabla 1).

Tabla 1. Crecimiento radial del micelio de *Fusarium* y *Alternaria* durante los 7 d de tratamiento

Tratamiento (h)	<i>Fusarium</i> sp.			<i>Alternaria</i> sp.		
	Concentración (μ L)					
<i>M. spicata</i>	100	200	400	100	200	400
24	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-
72	-	-	-	-	-	-
96	-	-	-	-	-	-
120	-	-	-	-	-	-
144	-	-	-	-	-	-
168	-	-	-	-	-	-
Inhibición (%)	100	100	100	100	100	100
<i>M. chamomilla</i>	100	200	400	100	200	400
24	7	-	-	-	-	-
48	9	8	-	-	-	-
72	10	10	13	10	10	-
96	11	10	15	10	10	10
120	12	13	16	10	10	10
144	14	15	17	10	10	10
168	20	17	20	11	10	10
Inhibición (%)	67,9	73,4	69,5	79,0	80,9	85,9

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

En *Fusarium* se observó inhibición del crecimiento radial del 100 % en todas las dosis ensayadas, mientras que el conteo del número de esporas reveló un 99,8 % de inhibición para la dosis de 100 μ L; 99,9 % para la dosis de 200 μ L y un 100 % de ausencia de esporas en la dosis de 400 μ L. En *Alternaria* se observó que el aceite ME presentó completa inhibición (100 %) en ambos ensayos (Tablas 1 y 2). Por su parte el aceite MC mostró una actividad menor comparado con el revelado por ME; se observaron valores del porcentaje de inhibición de crecimiento radial del micelio de 67,9 % (100 μ L), 73,4 % (200 μ L) y 69,5 % (400 μ L) frente a *Fusarium*, mientras que para *Alternaria* los valores fueron 79,0 % (100 μ L), 80,9 % (200 μ L) y 85,9 % (400 μ L). En el conteo de esporas los valores fueron 62,0 % (100 μ L), 69,5 % (200 μ L) y 73,8 % (400 μ L) de inhibición frente a *Fusarium* y para *Alternaria* 93,0 % (100 μ L), 96,0 % (200 μ L) y 99,0 % (400 μ L), (Tablas 1 y 2). Las muestras testigo revelaron un crecimiento radial del micelio de 68 mm (*Fusarium*) y 71 mm (*Alternaria*), en observaciones realizadas a los 7 d de crecimiento, evidenciando el desarrollo normal de ambos hongos.

En la actualidad existe un creciente interés por el estudio de los aceites esenciales con efecto fungicida ya que son inocuos para el medio ambiente y los consumidores, por lo que se ha incrementado el interés de su aplicación en el manejo de enfermedades de campo y post-cosecha (7, 15). Diversos estudios han revelado el potencial de los aceites esenciales en el control de especies de *Fusarium*. El aceite de *Cassia* posee un potente efecto inhibitorio frente a *Fusarium moniliforme* y *Fusarium proliferatum* (16).

Los aceites de *Thymus vulgaris* L. y *Oreganum vulgare* L. mostraron inhibición frente a *Fusarium oxysporum* (17). El aceite de *Piper auritum* Kunth. provocó total inhibición en el crecimiento de *Fusarium solani* y *Fusarium redolens*, mientras que *Piper aduncum* L. subsp. *ossanum* (C.DC.) Saralegui muestra efecto fungistático (18). Por su parte, los aceites de *Pimpinella anisum* L., *Ocimum basilicum* L., *Ocimum basilicum* var. *genovese* y *Piper auritum* Kunth. mostraron efecto fungicida sobre *Alternaria* (19). Por otro lado, el aceite de *Muralla koenigii* (L.) Sprengel inhibió el crecimiento de *Alternaria solani* (20), mientras que el aceite de *Dianthus caryophyllus* L. provocó inhibición del crecimiento micelial de este hongo (21). Además, los aceites de *Melaleuca* sp, *Ocimum basilicum* L. y *Pimpinella anisum* L. inhibieron el crecimiento de *Alternaria porris* (22).

CONCLUSIONES

En la presente investigación se observó inhibición del crecimiento de los hongos *Fusarium* y *Alternaria* al ser tratados con los aceites esenciales de *Menta spicata* y *Matricaria chamomilla*, sin embargo, resultó más efectivo el aceite de *M. spicata* ya que mostró total inhibición del crecimiento radial en 100 % en ambos hongos. Con relación a la presencia de esporas se observó 99,8 % de inhibición para el *Fusarium*, mientras que en *Alternaria* hubo completa ausencia con un 100 % de inhibición. Los resultados observados en esta investigación se consideran un aporte al estudio de los aceites esenciales con potencial actividad inhibitoria frente a *Fusarium* y *Alternaria*.

Tabla 2. Conteo del número de esporas después de 7 d de crecimiento

Aceite esencial	<i>Fusarium</i> sp.			<i>Alternaria</i> sp.		
	Concentración (μ L)					
	100	200	400	100	200	400
<i>M. spicata</i>	99,8	99,9	100	100	100	100
<i>M. chamomilla</i>	62,0	69,5	73,8	93,0	96,0	99,0

La inhibición de esporas está expresada en porcentaje.

REFERENCIAS

1. Badillo, V. *Ernstia* 11:191-192, 2001.
2. Dorais, M.; Ehret, D. y Papadopoulos, A. *Phytochem. Rev.* 7(2):231-250, 2008.
3. Falcones, P. *El cultivo del Tomate*, Barcelona, Mundi-prensa, 2001, pp. 16-18.
4. Villasanti, C y Pantoja, A. *El cultivo del tomate con buenas prácticas agrícolas en la agricultura urbana y periurbana*, Paraguay, FAO, 2013, p. 70.
5. Escalona, V.; Alvarado, P.; Monardes, H.; Urbina, C. y Martin, A. *Manual de cultivo de tomate (Lycopersicon esculentum Mill.)*, Santiago de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, 2009, p. 60.
6. Laterrot, G.; Marcheoux, T. y Candresse, D. *Enfermedades del Tomate*, Madrid, Paraninfo, 2011, p. 679.
7. Pino, O.; Sánchez, Y.; Rojas, M.; Rodríguez, H.; Abreu, Y.; Duarte, Y.; Martínez, B.; Peteira, B.; Correa, T. y Martínez, D. *Rev. Protección Veg.* 26(3):177-186, 2011.
8. Celis, A.; Mendoza, C.; Pachón, M.; Cardona, J.; Delgado, W. y Cuca, L. *Agronomía Colombiana* 26(1):97-106, 2008.
9. Muñoz, F. *Plantas Medicinales y Aromáticas en Cultivo y Procesado*, Madrid, Artes Gráficas, 2002, p. 309.
10. Castellanos, G.; Jara, C. y Mosquera G. *Manejo del Hongo en el Laboratorio*, Cali, Centro Internacional de Agricultura Tropical, 2011, p. 31.
11. Barnett, H. y Hunter, B. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*, 4a ed., falta ciudad NY, Macmillan Publishing Company, 1987, p. 217.
12. Nelson, P.; Toussoun, T. y Marasas, W. *Fusarium species, an illustrated manual of identification*, London, UK, University press, 1983, p. 193.
13. Von Arx, J. *The genera of fungi sporulating in pure culture*, Leutershausen, Strauss Cramer, 1981, p. 424.
14. Bastidas, O. Technical note. *Neubauer chamber cell counting* [en línea]. Consultado en <http://www.celeromics.com/en/resources/docs/Articles/Neubauer-Chamber-Cell-Counting.pdf>
15. Duarte, Y.; Pino, O.; Infante, D.; Sánchez, Y.; Travieso, M. y Martínez, B. *Rev. Prot. Veg.* 28(1):54-59, 2013.
16. Udomsilp, J.; Piyo, A.; Khang-Khun, P. y Thobunluepop, P. *As. J. Food Ag-Ind. (special issue)*:24-30, 2009.
17. Wogiatzi, E.; Gougoulias, N.; Papachatzis, A.; Vagelas, I. y Chouliaras, N. *Biotechnol. Biotechnol.* 23(3):1322-1324, 2009. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*
18. Duarte, Y.; Pino, O.; Martínez, B. *Rev. Prot. Veg.* 28(3):232-235, 2013.
19. Duarte, Y.; Pino, O.; Infante, D.; Sánchez, Y.; Travieso, M. y Martínez, B. *Rev. Prot. Veg.* 28(1):54-59, 2013.
20. Manoj, M.; Ram, V.; Mahesh, G.; Narendra, P. y Kailash, P. *IJRAP* 1(2):549-552, 2010.
21. Nehal, S. y El-Mougy, J. *J. Plant Prot. Res.* 49(1):58-62, 2009.
22. Thaker, V. y Pawar, V. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23:1099-1106, 2007.