

Estudio *in vitro* de la capacidad antifúngica del aceite esencial de clavo *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. and Perry frente a *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler

M.P. Santamarina y J. Roselló (Departamento de Ecosistemas Agroforestales. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural. Universidad Politécnica de Valencia).

En el presente trabajo se estudia la capacidad antifúngica del aceite esencial de clavo (*Syzygium aromaticum*) extraído de las hojas y con un porcentaje superior al 85% de eugenol, frente a la especie *Alternaria alternata* aislada de cariósides de arroz de la variedad Bomba, procedente de la Albufera de Valencia. La tasa de crecimiento de *Alternaria* fue de 5,5 mmd⁻¹ cuando creció en el medio de cultivo PDA, mientras que cuando se adicionó el aceite de clavo a la dosis de 300 µg/ml al medio PDA, fue de 2,5 mmd⁻¹, reduciendo algo más del 50% la velocidad de crecimiento la presencia del aceite esencial. La adición del aceite de clavo al medio de cultivo además de reducir el crecimiento micelial de *Alternaria alternata* también modificó la forma, el color, la esporulación y la textura de las colonias.

INTRODUCCIÓN

Los principales extractos vegetales con actividad antimicrobiana son los aceites esenciales y las oleorresinas. Se encuentran en estructuras histológicas especializadas, llamados tejidos secretores, se originan generalmente de células parenquimáticas y su morfología es muy variable, pueden ser estructuras muy sencillas a muy complejas: desde simples células, las células secretoras; a estructuras de mayor complejidad que pueden atravesar distintos órganos de la planta, como los espacios secretores (conductos y cavidades), o los laticíferos; localizadas sobre o cerca de la superficie de la planta, en ocasiones en partes más internas de la planta.

El término aceite probablemente se origina del hecho que, el aroma de una planta existe en forma líquida inmiscible en agua, en glándulas o entre células. Los aceites esenciales se hallan en las flores, sumidades floridas, hojas, frutos y semillas de los vegetales, a veces, aunque no muy frecuentemente, en los tallos y raíces. Su distribución es amplia en el reino planta.

Su función en la planta sigue en estudio, pero se asocia la secreción de estos productos a la inhibición de la germinación de esporas fúngicas, como protección contra insectos y hongos, defensa contra herbívoros, cicatrización de heridas, como sistema de refrigeración, y para favorecer la polinización (SHIVA RAMAYONI, 2007).

Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas, son mezclas complejas de hasta 100 componentes, entre ellos: terpenoides, fenoles aromáticos, éteres, esteroides, aldehídos y cetonas que determinan el aroma característico de una planta (BATISH y col., 2008).

Los aceites esenciales han mostrado en diversos trabajos propiedades antibacterianas, antifúngicas, antiparasitarias e insecticidas (BURT, 2004; GUTIÉRREZ y col., 2008; PONCE y col., 2008). Algunos de ellos han sido ensayados en alimentos árbol del té (*Melaleuca alternifolia*), romero (*Rosmarinus officinalis*), menta (*Mentha piperita*), rosa mosqueta (*Rosa moschata*), clavo (*Syzygium aromaticum*), limón (*Citrus limon*), orégano (*Origanum vulgare*), etc.

Las oleorresinas son líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas. Constituyen las verdaderas esencias de las especias en su forma más concentrada y contienen gran cantidad de compuestos volátiles y no volátiles. Son los sustitutos preferidos de las especias tradicionales en las industrias de alimentos (PONCE y col., 2008). Algunas de las oleorresinas utilizadas en alimentos son: romero, orégano, ajo, cebolla, arándano, oliva, entre otros.

La necesidad de reducir el uso de productos químicos sintéticos en la agricultura ha incrementado el interés por la posible aplicación de aceites esenciales y sus compuestos.

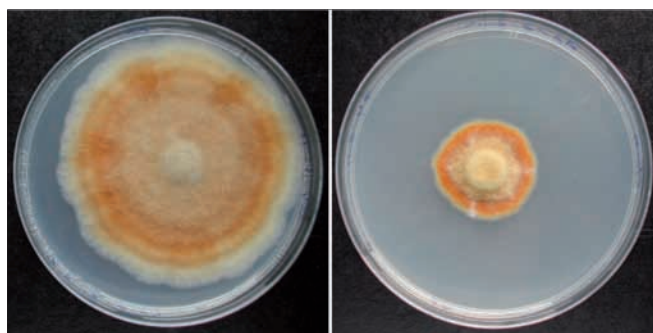


Figura 1. Colonia de *Alternaria alternata* crecida en medio PDA (izquierda) y medio PDA-Clavo (derecha) a los 7 días de inocular los discos.

Materiales y métodos

Hongo

El hongo utilizado *Alternaria alternata* fue aislado de carióspsides de arroz de la variedad Bomba, procedente de la Albufera de Valencia. Se tomaron los granos de arroz cáscara y se desinfectaron superficialmente con una solución de hipoclorito sódico al 1% durante 5 mn. y se colocaron en capsulas Petri conteniendo agar extracto de arroz (AEA). Las placas se incubaron siete días a 2°C hasta el desarrollo de las colonias. El hongo se identificó siguiendo las claves de Barnett y Hunter (1972).

Aceite esencial

El aceite esencial de clavo (*Syzygium aromaticum*) de la casa comercial GUINAMA, extraído de hojas y con un porcentaje superior al 85% de eugenol, fue el elegido para evaluar su actividad antifúngica.

Bioensayos de la actividad del aceite esencial de clavo

El aceite esencial fue disuelto, mezclado y homogeneizado por agitación en matraces con medio de cultivo PDA, previamente esterilizado, cuando aún está líquido, se adicionó a la concentración de 300 µg/ml, y se repartió en cápsulas Petri de 90x15 mm.

El hongo se sembró a modo de explantes discoidales de 8 mm de diámetro tomados con un sacabocados de una colonia de siete días de desarrollo, y se colocaron en el centro de las cápsulas Petri conteniendo el aceite esencial. El experimento se incubó a 25°C durante 7 días. El crecimiento micelial se evaluó midiendo diariamente dos diámetros perpendiculares de la colonia, y se calculó la velocidad de crecimiento. Se realizaron seis repeticiones por tratamiento. Las cápsulas Petri control contenían solamente PDA.

Análisis estadístico

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

Resultados y discusión

A los siete días de incubación el aceite esencial de clavo disminuyó significa-

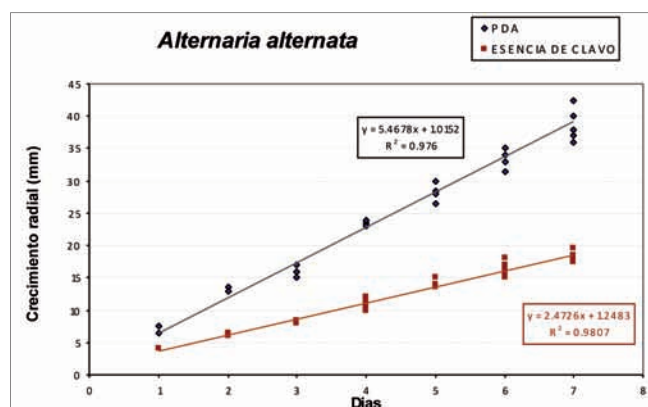


Figura 2. Crecimiento de *Alternaria alternata* en medio PDA (—) y medio PDA-Clavo (—).

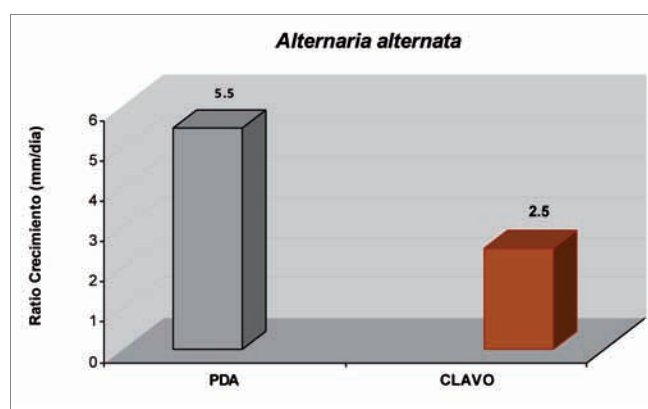


Figura 3. Velocidad de crecimiento (mm/día) de *Alternaria alternata* en medio PDA (■) y medio PDA-Clavo (■).

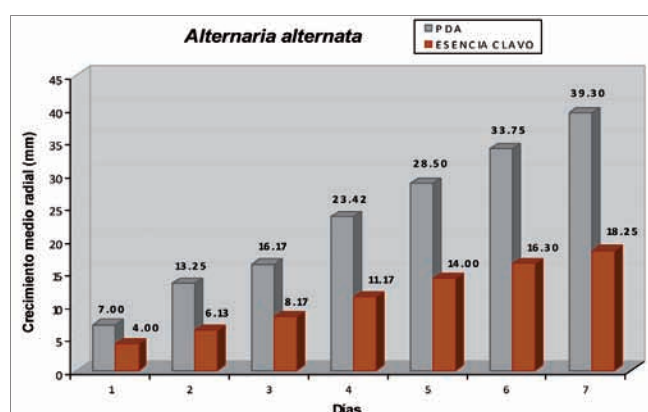


Figura 4. Crecimiento diario de *Alternaria alternata* en medio PDA (■) y medio PDA-Clavo (■) a lo largo de los siete días de lecturas.

tivamente el crecimiento micelial de *Alternaria alternata* a la dosis ensayada (Figura 1).

La tasa de crecimiento de *Alternaria* fue de 5,5 mmd⁻¹ cuando creció en el medio de cultivo PDA, mientras que cuando se adicionó el aceite de

clavo a la dosis de 300 µg/ml al medio PDA, fue de 2,5 mmd-1 (Figuras 2 y 3).

En la Figura 4 puede observarse las diferencias de las tasas de crecimiento diarias a lo largo de los siete días de lecturas, reduciendo algo más de la mitad la velocidad de crecimiento la presencia del aceite esencial a partir del segundo día, valor que se mantuvo a lo largo de toda la experiencia.

Álvarez Castellanos y col., (2001) probaron la actividad antifúngica del aceite esencial de *Crysantemum*, extraído de sus flores, sobre doce patógenos vegetales y observaron una reducción del 80% en el desarrollo micelial de *Alternaria* sp., *Aspergillus flavus* y *Phytium ultimum*.

Shafique y col., (2007) estudiaron el efecto de los extractos de hojas de *Syzygium* sobre la germinación de esporas de hongos y encontraron una importante reducción en la germinación de *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Fusarium solani* y *Rhizopus* sp.

La adición del aceite de clavo al medio de cultivo además de reducir en más del 50% la velocidad de crecimiento de *Alternaria alternata* también modificó la forma, el color y la textura de las colonias (Figura 1).

BIBLIOGRAFÍA

- ÁLVAREZ-CASTELLANOS, P.; BISHOP, C.D.; PASCUAL-VILLALOBOS, J.P. (2001). *Antifungal activity of the essentials oil of Crysantemun coronarium against agricultural pathogens*. Phytochemistry 57, 99-102.
- BATISH, D.; SINGH, H.; KOHLI, R.; KAUR, S. (2008). *Eucalyptus essential oil as a natural pesticide*. Forest Ecol. Manage. In Press.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. (1972). *Illustrated genera of imperfect fungi*. 4 Ed. Macmillan Publishing Company., U.S.A.. 218 p.
- BURT, S. (2004). *Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods, a review*. International Journal of Food Microbiology. 94, 223-253.
- GUTIÉRREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. (2008). *The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients*. International Journal of Food Microbiology. 124, 91-97.
- PONCE, A.; ROURA, S.; DEL VALLE, C.; MOREIRA, M. (2008). *Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: in vitro and in vivo* Studies. Postharvest Biology and Technology. 49, 294-300.
- SHAFIQUE, S.; JAVAID, A.; BAJWA, R.; SHAFIQUE, S. (2007). *Effect of Aqueous leaf extracts of allelopathic trees on germination and seed-borne mycoflora wheat*. Pak. J. Bot. 39(7), 2619-2624.
- SHIVA RAMAYONI, C. (2007). *Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos*. Tesis Doctoral. Dpto. de Sanidad y Anatomía de Animales. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona.