

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

“Evaluación del efecto de aceite esencial de Pirul (*Schinus molle*), sobre el desarrollo *in vitro* de hongos de importancia agrícola”

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

MAYRA SUSANA DE LA ROSA JACOBO

Hermsillo, Sonora

Diciembre de 2016

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

APROBACIÓN

Los miembros del jurado designado para revisar la Tesis Profesional de Mayra Susana De la Rosa Jacobo, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el título de **Químico Biólogo Clínico**.

DR. Eber Addi Quintana Obregón

Presidente

M.C. Reyna Isabel Sánchez Mariñez

Secretaria

M.C. Ramón Gertrudis Valdez Melchor

Vocal

M.C. Héctor Manuel Escárcega Urquijo

Suplente

DEDICATORIAS

A mis Padres Margarito y Lourdes

Que siempre han sido los que me han acompañado en este camino y quienes apoyan todas y cada una de mis decisiones, aventuras, ocurrencias y locuras.

A mis Hermanos Abraham e Ismael

Por su apoyo, compañía y ayuda en las tareas y trabajos, dibujando, opinando o simplemente acompañando en las noches de desvelo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios:

A ti te agradezco que me hayas dado vida y salud, así como la oportunidad de disfrutar y compartir con mi familia y amigos una de las etapas más felices de mi vida y porque nunca me dejaste flaquear ni perder la fe en los momentos más difíciles.

A mis Padres Margarito y Lourdes:

Porque gracias a su cariño, guía y apoyo, he llegado a realizar uno de los anhelos más grandes de mi vida, fruto del inmenso apoyo, amor y confianza que en mí se depositó y con los cuales he logrado terminar mis estudios profesionales que constituyen el legado más grande que pudiera recibir y por lo cual les viviré eternamente agradecida.

A mis Hermanos Abraham e Ismael:

Agradezco también su apoyo porque han sido una fuente de estímulo y dedicación a ésta mi carrera profesional.

A mi Familia:

A mis abuelos, tías, tíos que no está conmigo presencialmente todos los días pero que aun así la distancia no les impide apoyarme y en cada paso que doy. La distancia podrá separarnos de aquellos que nos quieren pero jamás nos aleja de quienes nos aman.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
APROBACIÓN	2
DEDICATORIAS	3
AGRADECIMIENTOS	4
LISTA DE TABLAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
OBJETIVOS	12
OBJETIVO GENERAL	12
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
REVISIÓN DE LA LITERATURA	13
Generalidades de Hongos	13
Clasificación de hongos	13
Infecciones causadas por hongos	15
Género <i>Aspergillus</i>	15
Género <i>Cladosporium</i>	17
Micotoxinas	19
Aceites esenciales extraídos de plantas	21
Composición de los aceites esenciales	22
Propiedades físicas de los aceites esenciales.....	23
Propiedades antimicrobianas y antifúngico en aceites esenciales.....	24
Mecanismos de acción de los metabolitos antifúngicos.....	24
Método de extracción de aceite esencial	25
Destilación por arrastre de vapor.....	26
Árbol de Pirul (<i>Schinus molle</i>)	26
Aceite esencial de Pirul (<i>Schinus molle</i>)	28
MATERIALES Y MÉTODOS	30
Preparación del Inoculo.....	30
Obtención del Aceite esencial de Pirul (<i>Schinus molle</i>)	30
Evaluación Antifúngica del aceite esencial de Pirul	32
Crecimiento Radial.....	32
Germinación de Esporas	33

Diseño experimental	33
RESULTADOS	35
Obtención del inóculo de <i>Aspergillus niger</i>, <i>Aspergillus parasiticus</i> y <i>Cladosporium cladosporioides</i>	35
Crecimiento radial	35
<i>Aspergillus niger</i>	36
<i>Aspergillus parasiticus</i>	37
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	38
Dosis inhibitoria 50.....	39
Dosis mínima inhibitoria	40
Germinación de esporas	41
<i>Aspergillus parasiticus</i>	41
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	41
DISCUSIONES	43
<i>Aspergillus niger</i>	43
<i>Aspergillus parasiticus</i>	44
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	48
CONCLUSIONES	51
RECOMENDACIONES	52
REFERENCIAS	53

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Clasificación general de las clases más importantes de hongos... ..	14
2. Principales componentes volátiles y el grupo funcional al que pertenecen	22
3. Crecimiento radial de <i>Aspergillus niger</i> en medio de cultivo PDA con aceite esencial de Pirul a 25°C	36
4. Crecimiento radial de <i>Aspergillus parasiticus</i> en medio de cultivo PDA con aceite esencial de Pirul a 25°C	37
5. Crecimiento radial de <i>Cladosporium cladosporioides</i> en medio de cultivo PDA con aceite esencial de Pirul a 25°C	38
6. Dosis inhibitoria 50 (DI50) de aceite esencial de Pirul en hongos obtenidas a partir de crecimiento radial en medio PDA a 25°C	40
7. Dosis mínima inhibitoria (DMI) de aceite esencial de Pirul en hongos obtenidas a partir de crecimiento radial en medio PDA a 25°C	40
8. Comparación de parámetros utilizados por López-Meneses y col. (2015) y nuestro estudio en la evaluación del efecto de Pirul sobre <i>Aspergillus parasiticus</i> en la etapa de germinación de esporas	45

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Morfología microscópica de <i>Aspergillus</i> , se observan esporas, micelio característicos del género.....	16
2. <i>Cladosporium</i> spp en forma microscópicamente presenta hifas finas, septadas, ramificadas de color hialino a marrón, sostenidas por cadenas ramificadas de conidios cilíndricos.....	18
3. Morfología microscópica de <i>Cladosporium cladosporioides</i> : Conidios que generalmente quedan en cadenas acrópetas, con una coloración marrón.....	19
4. Frutos y hojas del árbol de Pirul (<i>Schinus molle</i>)	27
5. a) Muestra el secado de hojas de Pirul (<i>Schinus molle</i>) y b) Muestra las hojas secas...	30
6. Hojas de Pirul (<i>Schinus molle</i>) secas empaquetadas	31
7. Diagrama de extracción por hidrodestilación	32
8. Crecimiento radial de los hongos a las 96 horas: a) <i>Aspergillus niger</i> , b) <i>Aspergillus parasiticus</i> y c) <i>Cladosporium cladosporioides</i>	35
9. Germinación de esporas de <i>Aspergillus parasiticus</i> en presencia de aceite esencial de Pirul (DI50) a 25°C	41
10. Germinación de esporas de <i>Cladosporium cladosporioides</i> en presencia de aceite esencial de Pirul (DI50) a 25°C	42

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de aceite esencial de Pirul (*Schinus molle*), sobre el desarrollo *in vitro* de los hongos *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus* y *Cladosporium cladosporioides*. Se determinaron las dosis inhibitorias 50 (DI50) y dosis mínimas inhibitorias (DMI) del aceite esencial de Pirul (*Schinus molle*) con los valores del diámetro de las colonias a las 96 horas, se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial a partir de la evaluación del crecimiento de los hongos en concentraciones de 0, 10, 100, 250, 500 y 1000 ppm. Después con la DI50 del aceite esencial de Pirul obtenidas se evaluó el efecto sobre germinación de esporas en los hongos con mayor inhibición a menores concentraciones de aceite esencial. Las DI50 con aceite esencial de Pirul obtenidas fueron: 3, 649.87 $\mu\text{L/mL}$, 340.76 $\mu\text{L/mL}$ y 550.91 $\mu\text{L/mL}$ para *A. niger*, *A. parasiticus* y *C. cladosporioides*, respectivamente. Las DMI con aceite esencial de Pirul obtenidas fueron: 7, 551,063.18 $\mu\text{L/mL}$, 108, 686, 970.89 $\mu\text{L/mL}$ y 40, 542.89 $\mu\text{L/mL}$ para *A. niger*, *A. parasiticus* y *C. cladosporioides*, respectivamente. En germinación de esporas no se observó efecto significativo en las DI50.

INTRODUCCIÓN

Los hongos son considerados organismos más desarrollados que las bacterias, son estructuras normalmente pluricelulares con un metabolismo complejo. Colonizan materiales de naturaleza orgánica, inorgánica y tienen un papel importante en procesos de biodeterioro. Se transportan por medio de aire, agua, suelo y podrían transmitirse por medio de contacto con personas y animales. La exposición a hongos productores de toxinas puede afectar tanto la salud humana como la de otros organismos vivos y el ecosistema (Borrego, 2012; González y col., 2010).

En la sociedad destacan algunos géneros; como es el caso de *Aspergillus* debido a la capacidad que presentan algunas especies para producir deterioro y contaminación de sustratos alimentarios, así como la síntesis de micotoxinas las cuales representan un riesgo para la salud al ser producidas en alimentos destinados a consumo humano. Por otra parte el género *Cladosporium* tiene esporas que se transportan fácilmente y pueden viajar grandes distancias ya que se encuentran y se transportan a través de partículas de polvo. Muchas de las especies pertenecientes a este género son consideradas patógenas en plantas o saprofitas, son organismos principalmente oportunistas en plantas de infección secundaria, algunas producen cladosporiosis y otras se asocian con infecciones cutáneas, oculares y nasales (Borrego, 2012; González y col., 2010).

Muchas especies botánicas muestran una acción reguladora sobre un gran número de plagas y enfermedades. Éste efecto se le ha atribuido a la presencia de un grupo de metabolitos secundarios en las diferentes partes de las plantas que les confieren una protección natural; por ello se estudia la posibilidad de que sean utilizados en el manejo integrado de plagas y enfermedades. Se sabe que el uso de aceites esenciales sobre los hongos puede afectar las diferentes etapas de desarrollo del hongo, como la germinación de esporas, desarrollo del micelio y la esporulación (Rodríguez y col., 2000).

Una de las plantas que actualmente ha sido motivo de investigación, es el árbol de Pirul (*Schinus molle*). Siendo esta una planta originaria de Sudamérica, también se puede encontrar en climas cálido, semiárido y templado. Se dice que fue introducido a México en la época

colonial y su distribución se reporta en varios estados, entre los que se encuentra Sonora. Tiene flores diminutas y produce frutos parecidos a la pimienta por lo que comúnmente se le llama también pimienta rosa y es usada como sustituto de pimienta. En investigaciones recientes se sabe que especies del género *Schinus*, son utilizadas como base de hierbas tradicionales en medicamentos debido a que su composición química tiene metabolitos secundarios con actividad antifúngica, analgésica, antioxidante, antitumoral, entre otras. (López-Meneses, 2015; Murray y col., 2012).

Actualmente existen diferentes alternativas de uso de esta planta entre las que destaca, los aceites esenciales obtenidos de algunas de sus partes. Por lo que en este estudio se plantea el uso de aceite esencial del árbol de Pirul (*Schinus molle*), como posible control contra hongos fitopatógenos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del aceite esencial de Pirul (*Schinus molle*), sobre el desarrollo *in vitro* de *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus* y *Cladosporium cladosporioides*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Producir aceite esencial de Pirul (*Schinus molle*) con la técnica de Hidrodestilación.
- Determinar las dosis mínimas inhibitorias y dosis inhibitorias 50 del aceite esencial de Pirul (*Schinus molle*) sobre el crecimiento radial de *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus* y *Cladosporium cladosporioides* a partir de la técnica de crecimiento radial.
- Estimar el efecto de la dosis inhibitorias 50 sobre los hongos que presenten mayor efecto inhibitorio a menor concentración.

REVISIÓN DE LA LITERATURA

Generalidades de Hongos

Los hongos se definen como organismos eucariotes heterótrofos, con micelio característico y se nutren por absorción, aunque con sus variantes en características son organismos poco comunes con una amplia categoría. Son eucariotes y se diferencia de las bacterias que son procariotas, porque tienen núcleos y organelos que están rodeados por una membrana. Son comúnmente filamentosos, los cuales reciben el nombre de hifas y se encuentran rodeados por una pared, que en la mayoría de los hongos tiene como componente principal quitina. Las hifas crecen solo en sus extremos, es por esto que los hongos tienen un crecimiento apical, estas se ramifican continuamente detrás de los ápices y dan como resultado una red de hifas que reciben el nombre de micelio (Deacon, 1993).

Los hongos requieren de materia orgánica preformada para utilizarla como fuente de energía, es decir son heterótrofos (quimioorganótrofos) y también requieren de carbono para llevar a cabo la síntesis de estructuras celulares. Estos organismos absorben los nutrientes simples y solubles que obtienen por la degradación de polímeros complejos con enzimas extracelulares que liberan al medio, debido a que la pared celular de los hongos es muy rígida y no permite que fagociten el alimento. Se reproducen de forma sexual y asexual, en ambos casos forman esporas como resultado final. Aunque las esporas varían en tamaño y forma, se diferencian de las semillas de las plantas porque las esporas no tienen un embrión preformado (Deacon, 1993).

Los organismos heterótrofos son dependientes de los autótrofos para obtener su energía, como las plantas verdes y en el caso de los hongos estas constituyen su fuente de carbono. Los hongos se alimentan directamente de otros organismos (hospedero) por lo que se les llama parásitos y aunque también pueden alimentarse de materia orgánica muerta se les denomina como saprófito (saprótrofo) ambas, son actividades propias de los hongos (Deacon, 1993).

Clasificación de hongos

Los hongos se pueden clasificar primeramente en hongos con pared celular (*Eumycota*) y los que carecen de pared celular (*Myxomycota*), después se divide a los hongos verdaderos, los que tienen pared celular en los cinco grupos principales: 1) Mastigomycotina, 2) Zygomycotina,

3) Ascomycotina, 4) Basidiomycotina y 5) Deuteromycotina. A continuación en la tabla 1 se hace una descripción más detallada sobre las clases más importantes de hongos.

Los hongos clasificados en el grupo cuatro, llamados Deuteromycotina son los que tienen importancia en esta investigación pues en este grupo se encuentran los hongos *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus* y *Cladosporium cladosporioides*, organismos objeto de esta investigación.

Tabla 1. Clasificación general de las clases más importantes de hongos.

<p>Myxomycota (organismos sin pared celular)</p>	<p>1) Acrasiomycetes (mohos mucilaginosos celulares). Organismos amiboides que se agrupan para formar un cuerpo fructífero parecido a un hongo.</p> <p>2) Hydromyxocetes (mohos mucilaginosos reticulares). Células fusiformes que se mueven dentro de una red tubular de polisacáridos extracelulares.</p> <p>3) Myxomycetes (mohos mucilaginosos verdaderos). Masa protoplásmica multinucleada (plasmodio) que fagocita partículas alimenticias.</p> <p>4) Plasmodiophoromycetes (mohos mucilaginosos endoparásitos). Pequeños plasmodios parásitos de algas, hongos y plantas superiores.</p>
<p>Eumycota (hongos verdaderos con pared celular)</p>	<p>1) Mastigomycotina. Producen esporas asexuales flageladas (zoosporas).</p> <p>a) <i>Chytridiomycetes</i></p> <p>b) <i>Oomycetes</i></p> <hr/> <p>2) Zygomycotina. Por lo general miceliales, cenocíticos; las esporas asexuales no móviles se forman en un esporangio.</p> <p>a) <i>Zygomycetes</i></p> <p>b) <i>Trichomycetes</i></p> <hr/> <p>3) Ascomycotina. Micelio septado o levaduras, las esporas asexuales no se forman en un esporangio, las esporas sexuales se forman en un asca.</p> <p>a) <i>Hemiascomycetes</i></p> <p>b) <i>Euascomycetes</i></p> <hr/> <p>4) Deuteromycotina. Micelio ceptada o levaduras; esporas asexuales como en los Ascomycotina; no hay reproducción sexual, es rara o se desconoce.</p> <p>a) <i>Blastomycetes</i></p> <p>b) <i>Hyphomycetes</i></p> <p>c) <i>Coelomycetes</i></p> <hr/> <p>5) Basidiomycotina. Micelio septado o levaduras; esporas asexuales ausentes o como en los Ascomycotina; las esporas sexuales se forman en un basidio.</p> <p>a) <i>Teliomycetes</i></p>

b) *Hymenomyces*

c) *Gasteromyces*

(Tabla adaptada de Deacon, 1993).

Los hongos Deuteromycotina. Son conocidos como hongos imperfectos, se caracterizan principalmente por presentar un micelio con septos simples, algunos se desarrollan como levaduras, mientras que otros presentan alternancia entre las fases de micelio y levadura. Son organismos haploides y su pared celular se compone de quitina y glucanos. Algunos ejemplos de estos hongos son: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aerobasidium*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Humicola*, *Penicillium*, *Phialophora*, *Gloeosporium*, *Pesotum*, *Phomopsis* (Deacon, 1993).

Infecciones causadas por hongos

Millones de personas en todo el mundo están afectadas por infecciones fúngicas superficiales, que son las enfermedades más comunes de la piel. Estas infecciones, se producen tanto en personas sanas e inmunodeprimidos, son causadas principalmente por dermatofitos. El aumento de consecuencias sociales y de salud causadas por dermatofitos significa que hay un constante esfuerzo por desarrollar agentes antifúngicos naturales seguros y nuevos para curar los trastornos fúngicos humanos causados por dermatofitos (Tabassum y Vidyasagas, 2013).

Muchas enfermedades de la piel tales como la tiña son causadas por dermatofitos existentes en las zonas tropicales y semitropicales. En general, estos hongos viven en la capa superior de las células muertas de la piel y en las zonas húmedas del cuerpo y causan solamente una irritación menor. Otros tipos de infecciones por hongos podrían ser más graves, debido a que pueden penetrar en las células y causar picor, hinchazón y formación de ampollas. Entre los géneros que podrían causar infecciones o intoxicaciones por los metabolitos que producen se encuentran *Candida*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* y *Fusarium* entre otros (Tabassum y Vidyasagas, 2013).

Género *Aspergillus*

Los miembros del género *Aspergillus* son hongos filamentosos hialino, saprofito, pertenece al filo Ascomycota. Está formado por hifas hialinas septadas y puede tener reproducción asexual, con formación de conidios y sexual, además forman ascosporas dentro de ascas. Las especies

de este género suele diferenciarse en base al tamaño, tasa de crecimiento, textura; aterciopelada, granular, algodonosa, y también por el color de la colonia, esta coloración aparece por lo regular en todas las estructuras aéreas, en el micelio y en las cabezas conidiales. Aunado a ello, es termo tolerante por lo que puede vivir entre los 12 y 57°C, las esporas pueden sobrevivir a 70°C. *Aspergillus* se encuentran en cualquier lugar en la tierra. Hasta la fecha, más de 185 especies de *Aspergillus* han sido identificadas, de las cuales 20 han sido descritas como causantes de infecciones nocivas en los seres humanos, animales y plantas (BDATAiO, 2012; Tian y col., 2012).

Los hongos pertenecientes al género *Aspergillus* se multiplican de forma muy rápida sobre vegetales almacenados o en descomposición, en algunas frutas, cereales y semillas. Tienen un rango muy amplio de desarrollo en condiciones diversas de temperatura, humedad y aerobiosis, contaminando así muchos sustratos. Una de las características más relevantes de ciertos hongos del género *Aspergillus* es la capacidad que tienen de producir micotoxinas, entre las que resaltan por su importancia las aflatoxinas y ocratoxina. Algunas especies tienen hifas septadas y producen esporas asexuales de color negro en conidias. Muchas especies son xerofílicas (amantes de la resequead) (Bibek y Bhunia, 2008; González y col., 2010).

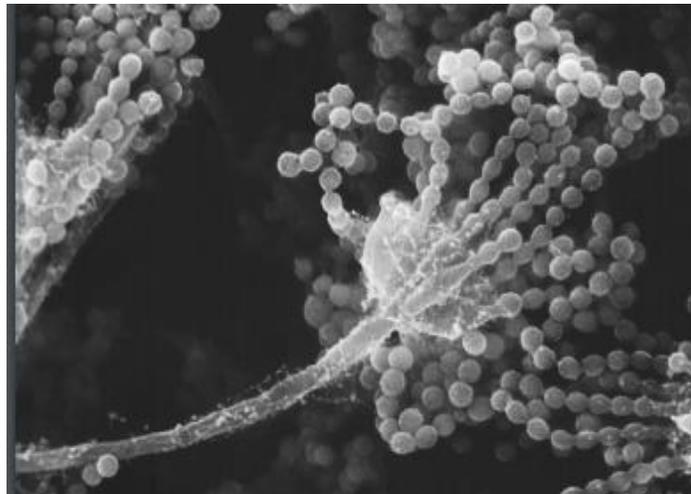


Figura 1. Morfología microscópica de *Aspergillus*, se observan esporas, micelio característicos del género.
Fuente: BDATAiO, 2012.

El mecanismo de transmisión de *Aspergillus* es principalmente por medio de las esporas o conidios, los cuales están presentes en el ambiente en forma de bioaerosoles y entran al organismo por la vía respiratoria, también se transmite por la contaminación de heridas y la intoxicación por ingerir alimentos contaminados. A pesar de que la Aspergilosis invasiva es poco común en personas inmunocompetentes, contribuye a la tasa de morbilidad y mortalidad en los pacientes inmunodeprimidos. Cerca de 4,5 millones de personas se ven afectadas por cantidades incontroladas de aflatoxinas en los países en desarrollo; aflatoxicosis ocupa el sexto lugar entre los 10 riesgos para la salud más importantes. Las especies de hongos del género *Aspergillus* han sido consideradas como los principales patógenos de plantas en todo el mundo. Siendo *A. parasiticus* un hongo de importancia agrícola por la contaminación con micotoxinas y *A. niger* como un hongo deteriorativo de los alimentos y también productor de toxinas. (Tabassum y Vidyasagas, 2013; Tian y col., 2012).

Teniendo en cuenta el impacto de las especies de *Aspergillus* en los cultivos, parece ser altamente deseable aplicar estrategias para prevenir su crecimiento, así como para eliminar o reducir su presencia en productos alimenticios (Pizzolitto y col., 2015).

***Aspergillus niger*.** Las colonias de *Aspergillus niger* son de color negro y la coloración aparece en toda la estructura aérea, tanto en el micelio como en las cabezas conidiales. Se sabe que *A. niger* produce la micotóxica Ocratoxina A, la cual tiene efecto Nefrotóxico en el organismo, y es también considerada como una sustancia carcinogénica de clasificación IARC: Grupo 2B, posiblemente carcinogénico en humanos (BDAiO, 2012).

***Aspergillus parasiticus*.** *A. parasiticus* es una de las principales especies productoras de aflatoxinas, Hepatotóxica e Inmunotóxica, causantes de enfermedades agudas y crónicas. Produce la aflatoxina B1, la cual es considerada como metabolitos secundario carcinogénico (Reglamento comisión Europea, 2006).

Género *Cladosporium*

Los hongos del género *Cladosporium* son considerados de los hongos ambientales más comúnmente aislados en todo el mundo. *Cladosporium* se encuentran entre las especies más frecuentes, tanto en ambientes exteriores e interiores.

El género comprende más de 40 especies nombradas oficialmente y 180 cepas no identificadas registradas en el banco de datos internacional *Universal Resource Protein*. Poseen

ramoconidios con o sin septos. La célula conidiógena es poliblastica, generalmente integrada y simpodial que da lugar a conidios, los cuales generalmente quedan en cadenas acrópetas, o a veces se presentan solitarios. Pueden ser de forma variada (elipsoidales, limoniformes, oblongos, esféricos, subesféricos, fusiformes), con una cicatriz en la base y pueden ser unicelulares o poseer 1-3 septos transversales; poseen pared lisa, verrugosa o equinada, hialina a pigmentada, de color oliváceo a marrón oscuro. (Quebéc, 2016).



Figura 2. *Cladosporium* spp en forma microscópicamente presenta hifas finas, septadas, ramificadas de color hialino a marrón, sostenidas por cadenas ramificadas de conidios cilíndricos.

Fuente: BDATAiO, 2014.

Las colonias de *Cladosporium* son de crecimiento lento, de piel de ante-marrón negruzco, pero también a veces gris o marrón, polvo similar a la gamuza, siendo a menudo debido a la abundante producción de conidios, tienen un tamaño aproximado de 3-7 x 2-4 micras. Los hongos del género *Cladosporium* son capaces de crecer en un amplio rango de temperaturas, desde -6 hasta 28°C, algunas especies pueden soportar niveles de sequedad, ligeramente xerófilas, tiene actividad de agua elevada. La mayoría de las especies de *Cladosporium* se consideran alérgenos importantes, dado que las esporas y fragmentos de hifas pueden provocar estados alérgicos del Tipo I característica por presentar asma y fiebre y

del Tipo II que consiste en neumonía por hipersensibilidad, por lo que se dice que aproximadamente un 10% de la población resulta sensible a este género de hongos (Borrego, 2012).

Cladosporium cladosporioides. *C. cladosporioides* es considerado un xerófilo, xerotolerante sino también sicrofilico, por su capacidad de crecer a temperaturas de congelación; puede crecer a un ritmo más lento a temperaturas entre -10 ° C y -3 ° C (Quebéc, 2016).

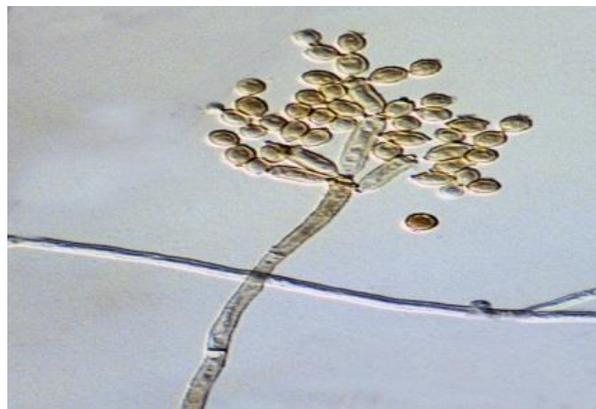


Figura 3. Morfología microscópica de *Cladosporium cladosporioides*: conidios que generalmente quedan en cadenas acrópetas, con una coloración marrón.

Fuente: The Atrium, 2013.

Micotoxinas

Los hongos son capaces de producir más de una micotoxina, algunas de ellas son producidas por más de una especie de hongos. Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidos por hongos filamentosos que pueden contaminar los cultivos y alimentos. El primer paso importante en el control del hongo y la contaminación por micotoxinas en alimentos es el control de ellos en las materias primas de las que se prepara los alimentos con el fin de prevenir la aparición de micotoxicosis y para minimizar los riesgos para la salud humana. Sin embargo,

aún no se ha establecido la incidencia y la importancia relativa de estas diferentes micotoxinas en animales y humanos (Calvet y col., 2015).

La producción de estos compuestos tóxicos está influenciada por varios factores, tales como humedad, temperatura, composición del sustrato, actividad de agua, pH y cepa fúngica (Dachery y col., 2015).

Hay una preocupación creciente acerca de la presencia de micotoxinas en los alimentos, ya que hasta el 25% de los cereales y alimentos hechos a base de cereales están contaminados con estos compuestos. Por otra parte, el público en general está en contra del uso de conservantes sintéticos en los alimentos y el uso de antimicrobianos naturales en los alimentos es una tendencia actual (Nazareth y col., 2016).

Aflatoxinas. Entre las micotoxinas, las aflatoxinas son metabolitos secundarios, cuya estructura química es heterocíclica, pertenecientes al grupo de las bisfurano cumarinas. Poseen toxicidad aguda y crónica, así como efectos mutagénicos y carcinogénicos en animales y el hombre. Estas sustancias tóxicas son particularmente importantes por causar graves problemas de salud después de la exposición a la alimentación humana y animal infectado. Las aflatoxinas son producidas por cepas de *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*, que a menudo pueden crecer en los alimentos almacenados (Calvet y col., 2015).

Estudios han mostrado que consiste en dos subgrupos (I y II). La mayoría de las cepas del grupo I producen aflatoxina B, y la mayoría de las cepas del grupo II producen tanto la aflatoxina B y aflatoxina G. Investigaciones demuestran que la aflatoxina B1 es la más tóxica de las aflatoxinas y es un carcinógeno potente de hígado. La evidencia sustancial también indica que la exposición a bajos niveles de aflatoxinas puede suprimir el sistema inmune y aumentar la susceptibilidad a las enfermedades. La aflatoxina B1 es el más tóxico para los mamíferos e induce la lesión de las células, la liberación de radicales libres y la peroxidación lipídica, se metaboliza por el hígado a través del sistema enzimático del citocromo P450 para generar el principal metabolito carcinogénico AFB1-8,9-epóxido u otras formas menos mutagénicas (Calvet y col., 2015; Ferreira y col., 2013).

Ocratoxina. La ocratoxina A (OTA) es una micotoxina con propiedades nefrotóxicos, genotóxicos, teratogénicos y carcinogénicos. La Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) ha clasificado la OTA en el grupo II B, es decir, como un posible carcinógeno para los humanos. Dos secciones de *Aspergillus* son conocidos como productores

de OTA; Circumdati: grupo al que pertenece *A. ochraceus* y Nigri: grupo en el que se clasifican *A. carbonarius* y *A. niger* (IARC, 1993; Dachery y col., 2015).

A pesar de los esfuerzos para controlar la contaminación por hongos, dichos hongos toxigénicos son ubicuos en la naturaleza y se producen a nivel mundial en el suministro de alimentos debido a la infestación de hongos de los productos agrícolas sensibles, tales como granos de cereales, frutos secos y frutas. Los hongos naturales asociados a los alimentos está dominada por las especies *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* (Ferreira y col., 2013).

Varios estudios revelan el uso de aceites esenciales como alternativa a las drogas de síntesis, estos burlan el aumento de la resistencia de algunos patógenos. Además, no sólo se podrían utilizar para la terapia de enfermedades infecciosas, sino también como conservantes en la industria alimentaria. Una posibilidad adicional es, entre otros, la aplicación de los aceites esenciales en productos para la piel con el fin de tratar o evitar infecciones dérmicas (Lang y Buchbauer, 2012).

Aceites esenciales extraídos de plantas

Los aceites esenciales son sustancias de base lipídica y se encuentran prácticamente en todas las plantas, estos lípidos son muy numerosos, se distribuyen en las distintas partes de la planta como son las raíces, tallos, hojas, flores y frutos. La cantidad de lípidos presentes en los aceites esenciales depende de la materia prima y el disolvente usado en la extracción. Actualmente se conocen alrededor de 3,000 aceites esenciales de los cuales 300 son de gran importancia comercial para la industria farmacéutica, cosmética y perfumería. El estudio de aceites esenciales se ha enfocado en la evaluación de la actividad antimicrobiana, si actúan como agentes antioxidantes o si tienen algún aporte nutrimental (Castañeda y col., 2007; Peredo y col., 2009).

Hay tres tipos de aceites esenciales: naturales, artificiales y sintéticos, los naturales se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas y químicas posteriores. Cada planta puede tener hasta más de 60 componentes y de todos estos varios pueden tener propiedades antifúngicas, no se sabe si la mayoría de las plantas han desarrollado metabolitos antifúngicos o si es una propiedad solo para determinadas especies y familias. En los años 90 se conocían cerca de 400 plantas de 60 familias con propiedad antifúngica, contra alrededor de 140 hongos y la lista de plantas con esta propiedad ha ido en aumento conforme el paso de los años (Castañeda y col., 2007; Chemat y col., 2012; Espinoza-Solís, 2014).

Los aceites esenciales pueden ser una alternativa a los agentes de control químicos comunes porque constituyen una fuente rica de compuestos bioactivos. Varios autores han demostrado la actividad antifúngica de extractos de plantas y su capacidad para inhibir la producción de micotoxinas. Además, se han intentado dilucidar el efecto de los productos químicos bioactivos sobre el crecimiento y las características morfológicas de hongos (Ferreira y col., 2013; Shukla, 2013).

Los aceites esenciales y extractos de plantas han sido conocidos y utilizados en todo el mundo para el tratamiento de muchas enfermedades, incluyendo enfermedades de la piel, y tienen efectos secundarios menos nocivos que los fármacos sintéticos correspondientes. En general, los aceites esenciales y extractos derivados de plantas se consideran como compuestos no tóxicos y potencialmente eficaces contra varios microorganismos incluyendo muchos hongos patógenos. Por lo tanto, se pueden utilizar como una terapia natural para inhibir hongos patógenos que causan infecciones superficiales. En los últimos años, se han generado interés en el desarrollo de agentes antifúngicos más seguros a partir de productos naturales de plantas tales como, aceites esenciales y extractos para controlar las enfermedades fúngicas (Tabassum y Vidyasagas, 2013; Pánek y col., 2014).

Composición de los aceites esenciales

Los componentes de los aceites esenciales varían dependiendo de las diferentes partes o parte de la planta que son usadas en la extracción. Se le atribuye el efecto antimicrobiano a los compuestos volátiles y se ha comprobado que estos compuestos de los aceites esenciales provienen de un grupo de terpenos, sesquiterpenos y probablemente diterpenos, se conoce que estos presentan diferentes grupos de hidrocarburos, ácidos, alcoholes, aldehídos, ésteres y cetonas. En la tabla 2 se describen algunos de los componentes volátiles de aceites esenciales, así como sus grupos funcionales (Reyes y col., 2012; Shukla, 2013).

Tabla 2. Principales componentes volátiles y el grupo funcional al que pertenecen.

Grupo químico funcional	Componentes
Fenoles	Carvacrol Eugenol Timol
Aldehídos	Citral

	Citronela Benzaldehido Perilaldehído Cinamaldehído
Alcoholes	Terpenos Borneol Mentol Geraniol Linalol Feniletanol
Alcoholes sesquiterpenos	Farnecol Cedrol
Cetonas	Alcanfor Carvona α -tujona
Ésteres	Acetato de linalilo Salicilato de metilo Etil acetato Anetol
Ésteres y Óxidos	Metil timol Anetol Cineol
Hidrocarburos	Careno B-cariofileno α -pineno Limonero

(Reyes y col., 2012)

Propiedades físicas de los aceites esenciales

Los aceites esenciales se caracterizan por sus propiedades físicas como lo son la densidad, viscosidad, índice de refracción y actividad óptica. La mayoría de los aceites esenciales tienen una densidad menor a la del agua y el índice de refracción es considerada una propiedad

característica de cada aceite esencial y puede cambiar si es diluida o mezclada con otras sustancias (Peredo y col., 2009).

Propiedades antimicrobianas y antifúngico en aceites esenciales

La creciente resistencia a los compuestos antifúngicos y el reducido número de fármacos disponibles, nos llevaron a buscar nuevas alternativas entre las plantas aromáticas y sus aceites esenciales, utilizados por sus propiedades antifúngicas. Recientemente, varios investigadores han informado de mono y sesquiterpenos hidrocarburos como los principales componentes de los aceites esenciales de plantas con un enorme potencial para inhibir patógenos microbianos (Tabassum y Vidyasagas, 2013; Joshi y col., 2011).

Los compuestos antimicrobianos activos de aceites esenciales son generalmente terpenos, que son de naturaleza fenólica, atacan a los patógenos a través de la pared celular y la membrana celular. Así, los compuestos fenólicos activos pueden tener varios objetivos invasivos que podrían conducir a la inhibición de los hongos patógenos infecciosos humanos. Los aceites esenciales usados para el control de hongos son compuestos formados por sustancias orgánicas volátiles, que pueden ser alcoholes, acetonas, cetonas, éteres, aldehídos, que se producen y se almacenan en los canales secretores de las plantas. La actividad antifúngica se puede atribuir a la presencia de algunos componentes tales como carvacrol, acetato de alfa-terpinyl, cimeno, timol, pineno, linalol de los cuales ya se sabe que presentan actividad antimicrobiana (Castañeda y col., 2007; Tabassum y Vidyasagas, 2013; Dos santos y col., 2015).

La evaluación de la actividad antimicrobiana se puede llevar a cabo con la determinación de la Dosis mínima inhibitoria (DMI), definida como la dosis mínima que se necesita de aceite esencial para detener el crecimiento del microorganismo (bactericida y fungicida). También se evalúa la actividad de aceites esenciales contra mohos con el control de la inhibición de la esporulación y la producción de toxinas. Son tres las características que van a definir la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales; el carácter hidrófilo o hidrófobo, la composición química y el tipo de microorganismo que se busca inhibir (Reyes y col., 2012).

Mecanismos de acción de los metabolitos antifúngicos

Es conocido que los terpenos son los principales responsables de la actividad antimicrobiana que tienen los aceites esenciales, este efecto se basa en la habilidad que tienen para dañar las

biomembranas. Interactúan con las enzimas de la membrana e interfieren en procesos vitales como la ósmosis, la síntesis de esteroides y fosfolípidos en función de sus características lipofílicas. Se sabe que el cineol reduce la división celular y que el limoneno, el α -pineno y el β -pineno inhiben el consumo de oxígeno, también es conocido que el 1-8 cineol inhibe la fosforilación oxidativa y la síntesis de ADN. Los isotiocianatos reaccionan con las proteínas de los hongos, lo que ocasiona su inactivación mediante su unión al grupo amino del aminoácido lisina o con el grupo sulfhidrilo de la cisteína (Espinoza-Solís, 2014; Kedia y col., 2014).

Las saponinas forman complejos con los esteroides en las membranas de los hongos lo cual ocasiona la desintegración de la membrana, siendo este el principal mecanismo de actividad antifúngica. En diversos estudios se ha demostrado que los compuestos fenólicos inhiben las enzimas reaccionando con los grupos sulfhidrilos de los aminoácidos. Las quinonas, flavonas, flavonoides, taninos y flavonoles forman complejos con los aminoácidos nucleofílicos de las proteínas lo que conduce a su inactivación. La mayoría de los hongos fitopatógenos excepto de los biotróficos, secretan enzimas hidrolíticas que se dispersan en las células del hospedero antes del avance de los microorganismos, esta acción puede ser inhibida por radicales libres de fenoles oxidados, los cuales funcionan como inhibidores no específicos (Avila y col., 2012; Espinoza-Solís, 2014).

Los mecanismos de acción de las proteínas y los polipéptidos antifúngicos pueden variar mucho, incluyen la degradación de polímeros de la pared celular, de los canales de la membrana, la degradación de los ribosomas y la inhibición de la síntesis de ADN, esto sin contar que existen muchas proteínas de las cuales aún se desconoce su mecanismo de acción (Espinoza-Solís, 2014; Kocic-Tanackov y col., 2015).

Método de extracción de aceite esencial

Es conocido que el método de obtención de los aceites esenciales es lo que va determinar los usos que puedan tener estos, porque el tipo de disolvente puede llegar a contaminarlos o limitar su uso y esto dependerá de la toxicidad del disolvente y la técnica usada para eliminarlos. Diferentes métodos son utilizados para la obtención de aceites esenciales de plantas, los principales dos son la destilación por medio de arrastre de vapor y la extracción con solventes orgánicos, en ambos se debe manejar con cuidado el almacenamiento, ya que los aceites esenciales son líquidos, viscosos, muy volátiles y sensibles a temperaturas altas (Peredo y col., 2009; Reyes y col., 2012).

Los aceites esenciales en fase vapor tienen mejor efectividad como agentes antimicrobianos. Debido a que los aceites esenciales son muy volátiles, su forma de evaluación es mejor en fase vapor. Diversas investigaciones señalan que algunos compuestos presentes en los aceites esenciales, como los terpenos, tienen mayor actividad antifúngica en fase vapor (Olivares-Cruz y López-Malo, 2013; Avila y col., 2012).

Destilación por arrastre de vapor

En el método de extracción conocido como destilación por arrastre de vapor de agua, se realiza una vaporización selectiva del componente volátil de una mezcla que se conforma por éste y otros considerados no volátiles, esto se logra con la inyección de vapor de agua de forma directa en el seno de la mezcla, al que se le llama “vapor de arrastre”. Tiene la función de condensar el componente volátil, formando otra fase inmiscible que va ceder el calor latente a la mezcla que se desea destilar para lograr su evaporación (Peredo y col., 2009).

La destilación por arrastre de vapor se lleva a cabo con una muestra de materia vegetal que por lo general se utiliza fresca y cortada en trozos pequeños, es colocada en un recipiente cerrado y sometida a una corriente de vapor de agua. La esencia es arrastrada y se condensa, luego es recolectada y separada de la fracción acuosa (Perdomo-Acevedo y Palomarez, 2014).

En este método el destilado que se obtenga será puro en relación al componente volátil, este destilado necesita ser decantado para separarse del agua. En una destilación simple no requiere ser decantado ya que no ocurre esto porque el destilado presenta ambos componentes pero siempre uno en mayor proporción, si este tipo de mezclas con aceites de elevado peso molecular se destilaran sin añadir vapor, la destilación requeriría de más energía para calentarlas y más tiempo y se podrían descomponer los aceites esenciales. Las principales ventajas que tiene la destilación por arrastre de vapor es que es un método sencillo y de bajo costo, y sus desventajas son los largos periodos de tiempo requeridos y el bajo rendimiento en comparación con otros métodos (Peredo y col., 2009).

Árbol de Pirul (*Schinus molle*)

Pirul (*Schinus molle*) es una planta que pertenece a la familia de las Anacardiáceas. Produce felandreno, alcohol terpenoide carvacrol, los cuales se eliminan a través de las hojas. El género *Schinus* pertenece a la familia *Anacardiaceae* y comprende 29 especies nativas de América del Sur, distribuidos en Perú, Bolivia, Chile, Argentina, Uruguay, Brasil y Paraguay. Se dice que fue

introducido a México en la época colonial. Algunas especies de *Schinus* han sido introducidas en otras regiones cálidas y tropicales alrededor del Mundo y se cultivan como árboles ornamentales. Un número de plantas de este género se utiliza en la popular medicina para varias patologías (Espinoza-Solís, 2014; Murray y col., 2012).

Pirul (*Schinus molle*) en algunos lugares de México es conocido con otros nombres populares, en Guerrero: *preconcuahuitj*, en Morelos como *copalquahuitl*, en Oaxaca como *yag lachi* y en Puebla como *ntaka*. Es un árbol que puede llegar a medir 15 metros de altura y tiene ramas colgantes de color verde, sus frutos globosos y con un color rojo-rosa característico, como los que se muestran en la Figura 4, son parecidos a la pimienta por lo que comúnmente se le llama también pimienta rosa y es usada como sustituto de pimienta. Las hojas y frutos tienen un aceite esencial que contiene mono y sesquiterpenos, los frutos contienen un aceite esencial, gomorresina y taninos. (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009; López-Meneses, 2015).



Figura 4. Frutos y hojas del Árbol de Pirul (*Schinus molle*).

Fuente: Universidad Nacional Autónoma de México UNAM, 2015.

Las hojas y frutos del Árbol de Pirul (*Schinus molle*) tiene usos terapéuticos en malestares como: cólico, dolor de estómago, estreñimiento, bilis, dolor de muelas o dientes,

como antirreumático, ayuda a la cicatrización de heridas. Es usado en infusiones, en la mayoría de los casos se hacen lavados con las hojas o frutos machacadas, también se utiliza de forma bebible en algunos casos para tratar malestares o enfermedades como tos, tuberculosis y asma. En el siglo XIX la Sociedad Mexicana de Historia Natural describe su uso como antiinflamatorio, antitumoral, catártico, enfermedades de encías, ojos y aftas. (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

Muchas especies de este género se han utilizado como base de hierbas tradicionales en medicamentos. La investigación química de especies de *Schinus* ha revelado muchos metabolitos secundarios de este género con actividades biológicas significativas, componentes bioactivos que incluyen monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenos, esteroides y flavonoides. A causa de la presencia de estos compuestos tiene usos significativos como antifúngicos, analgésicos, antioxidantes, antitumorales, etc. En las últimas décadas un número creciente de trabajos se han publicado con informes del aislamiento e identificación de metabolitos secundarios bioactivos y las actividades farmacológicas de extractos, aceites esenciales y compuestos aislados obtenidos a partir de este género (Murray y col., 2012).

Aceite esencial de Pirul (*Schinus molle*)

Se conoce que el aceite esencial de las hojas frescas posee actividad antibacterial, antiviral, antifúngica y antimicrobial. El aceite esencial de Pirul tiene un contenido alto de aceite esencial con un olor característico picante. Se le atribuyen propiedades antibacterial, antiséptico, antiviral, insecticida, antifúngico, antioxidante, antiinflamatorio, antitumoral, astringente y analgésico, es utilizado en la medicina popular para el dolor de muelas, reumatismo, desorden menstrual y antidepresivo, también en infecciones urinarias y respiratorias. Todas estas propiedades biológicas se deben a la amplia gama de componentes que se encuentran bioactivos, entre los que destacan fenoles, flavonoides, taninos, alcaloides, saponinas, esteroides y aceites esenciales (Espinoza-Solís, 2014; López-Meneses, 2015).

Entre los compuestos identificados en el aceite esencial de la hoja de Pirul se encuentran los monoterpenos car-3-ene, alfa-fenandreno, y el liganano croweacín, otros como sesquiterpenos iso-precalamenediol, flavonoides, quercetín, rutín, esteroles y beta-sitosterol. En los frutos se han identificado: monoterpenos alfa-cadineno, canfeno, carvacrol, para-gimeno, butirato de geraniol, limoneno, mirceno, hexanoato de nerol, alfa y beta-felandreno, alfa y beta-pineno, sabineno, alfa y gama-terpineno, alfa terpineol y el éster del ácido fórmico y terpinoleno; y los sesquiterpenos trans-ene-alfa-bergamont, bouboneno, alfa, beta, y T-cadinol, alfa y gama-

calacoreno, beta-cariofileno, alfa-copaeno, alfa-cubeneno, beta y gama-endesmol, germacreno D, beta-guaieno, alfa-gurjuneno, alfa y gama-mouroleno. T-mourolol y beta-spatuleno. También se han identificado en el fruto los triterpenos ácidos iso-mas-ticadienólico y el 3 epi isómero, y el alcaloide piperina (Espinoza-Solís, 2014).

Hay reportes de ensayos donde el aceite esencial extraído de las hojas frescas de *S. molle* tiene actividad antifúngica junto a especies de hongos *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium culmorum* y *Alternaria alternata* exhibió sensibilidad significativa a este aceite (Murray y col., 2012).

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del Inoculo

Se utilizaron cepas de hongos (*Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus* y *Cladosporium cladosporioides*) de colección del Departamento de investigación y posgrado en alimentos (DIPA) de la Universidad de Sonora.

Se prepararon medios agar papa dextrosa (PDA) en matraz, donde fueron resembrados las cepas de los hongos, incubándose por 7 días a 25°C con fotoperiodos de 12 horas luz-oscuridad. Posteriormente se preparó de cada uno de los cultivos de hongos una suspensión de esporas con solución Tween 20 al 0.1%, utilizando para ello un matraz de cultivo para la adecuada incorporación. Se realizó un conteo de esporas con la cámara de Neubauer y se determinó el número de esporas por mililitro de suspensión.

Obtención del Aceite esencial de Pirul (*Schinus molle*)

Las hojas de Pirul fueron colectadas a partir de árboles provenientes del Valle del Yaqui, Sonora (27°34'39N y 109°56'19O). Se almacenaron en costales de ixtle para su transporte y posteriormente se secaron a la sombra durante una semana a temperatura ambiente, figuras 5.

a)



b)



Figura 5. a) Muestra el secado de hojas de Pirul (*Schinus molle*) y b) Muestra las hojas secas.

Fuente: Propia autoría, 2014.

Una vez secas las hojas se empaquetaron en bolsas de plástico, conteniendo aproximadamente 100 g de material vegetal y se cerraron para almacenarlas a temperatura ambiente (figura 6).



Figura 6. Hojas de Pirul (*Schinus molle*) secas empaquetadas.

Fuente: Propia autoría, 2014.

Empleando un equipo de extracción por hidrodestilación como se ejemplifica en la figura 7, se procedió a la obtención de aceite esencial para la cual se colocó una muestra de 100 g de hojas secas en un matraz de separación cromatográfica conectado a otro matraz al cual se le agregaron 250 mL de agua destilada, se calentó a 100°C durante aproximadamente 4 horas y hasta que en la trampa se obtuvo el aceite esencial este se separó del agua floral por decantación (López-Meneses, 2015).

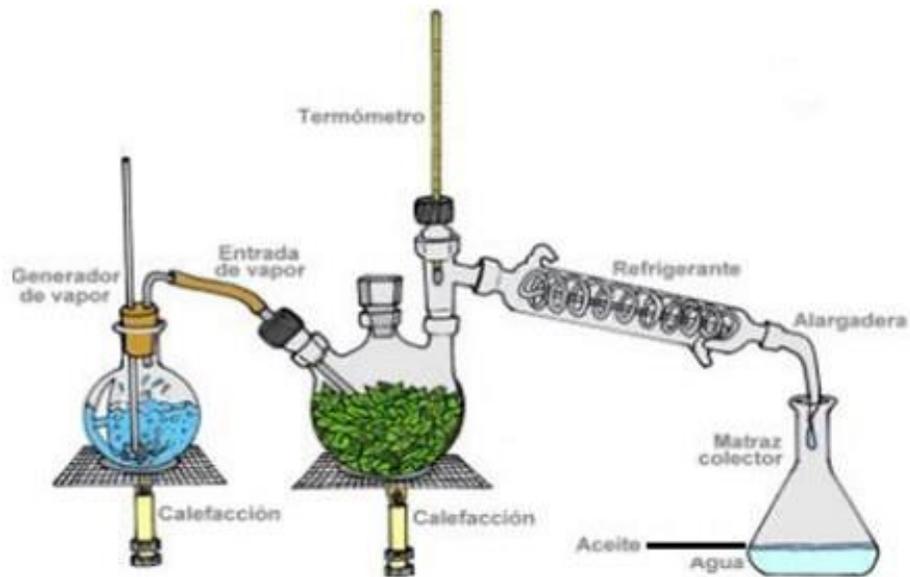


Figura 7. Diagrama de extracción por hidrodestilación.

Fuente: Aguiar., 2012.

Evaluación Antifúngica del aceite esencial de Pirul

Crecimiento Radial

Se determinó el crecimiento radial de *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus* y *Cladosporium cladosporioides*: por medio de la técnica de inoculación por siembra en pozo.

Se prepararon medios PDA con solución Tween 80 al 1% y una vez esterilizados se mezclaron con diferentes volúmenes de aceite esencial de Pirul, para obtener concentraciones de 0, 10, 100, 250, 500 y 1000 ppm. Para los controles se prepararon medios con PDA sin aceite esencial de Pirul, un control solo con medio PDA y otro con PDA y solución Tween 80 al 1%. En una campana de extracción se procedió a realizar el vaciado de 12 a 15 mL de la mezcla a placas de Petri hasta que solidificaran los medios de cultivo, tres replicas por tratamiento.

Técnica Inoculación de siembra en pozo. Se utilizó la técnica descrita por Quintana-Obregón y col., 2010. Después de solidificar los medios de cultivo se perforó (0.6 cm) el centro de cada placa formando un pozo con ayuda de una pipeta Pasteur previamente esterilizada y a cada pozo se le añadieron 25µl de inóculo a una concentración de 1×10^4 esporas/mL. Se incubó a

25°C con fotoperíodo por 12 horas en luz/oscuridad y se midió manualmente el diámetro de las colonias cada 12 horas. Se compararon los resultados con los medios controles hasta que cubrieron un 90% de la placa.

Con los valores obtenidos del diámetro de las colonias de los tratamientos a las 96 horas se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial, la dosis mínima inhibitoria (DMI), definida como la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de su incubación y la dosis inhibitoria 50 (DI50), la cual se define como la concentración en la que el hongo se desarrolló un 50% con respecto a un control (López-Meneses y col., 2012).

La DMI y DI50 se obtuvieron con el programa NCSS LLC, Utha, USA 2011.

Germinación de Esporas

Con la DI50 del aceite esencial de Pirul obtenidas se evaluó su efecto sobre germinación de esporas en los hongos de mayor efecto inhibitorio: *Aspergillus parasiticus* y *Cladosporium cladosporioides*.

Se prepararon medios de cultivo PDA con aceite esencial y se colocaron en placas Petri, como se describió previamente.

Técnica de Inoculación por siembra en placa. Se inocularon 1×10^4 esporas/mL de *Aspergillus parasiticus* y *Cladosporium cladosporioides* suspendidas en solución Tween 80 al 1%, las cuales fueron colocadas en el centro de la placa y distribuidas por toda la superficie con una varilla de vidrio estéril, tres replicas por hongo. Se incubó a 25°C por 12 horas usando luz/oscuridad. Se obtuvieron muestras aleatorias a las 0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 horas, estas se observaron en microscopio óptico y se contaron de cada placa 200 esporas al azar para determinar el número de esporas: germinadas y no germinadas por placa (López-Meneses y col., 2012).

Diseño experimental

Se utilizó un diseño aleatorio, basado en la aplicación de tratamientos con aceite esencial de Pirul (factor) y la concentración (6 niveles de 0, 10, 100, 250, 500 y 1000 ppm de aceite esencial), siendo el sujeto de experimento cada una de las cepas utilizadas de *A. niger*, *A. parasiticus* y *C. cladosporioides*.

Para el análisis estadístico se obtuvieron los promedios de las tres réplicas de cada concentración y se analizó la desviación estándar de cada tratamiento.

Se realizó análisis de varianza (ANOVA) para comparar grupos estadísticos ($P \leq 0.05$) con pruebas de medias Tukey-Kramer con el paquete estadístico JMP versión 5.0.1 (SAS, 2001).

RESULTADOS

Obtención del inóculo de *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus* y *Cladosporium cladosporioides*

Se obtuvieron inóculos de *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus* y *Cladosporium cladosporioides* a partir de cepas de la colección del DIPA. Las características morfológicas de los hongos resembrados coincidieron con la especie de referencia.

Crecimiento radial

El crecimiento radial de los tres hongos a las 96 horas se muestra en la figura 8, donde se hace evidente la ausencia de inhibición en la mayoría de los tratamientos en crecimiento radial del micelio de los hongos a las 96 horas.

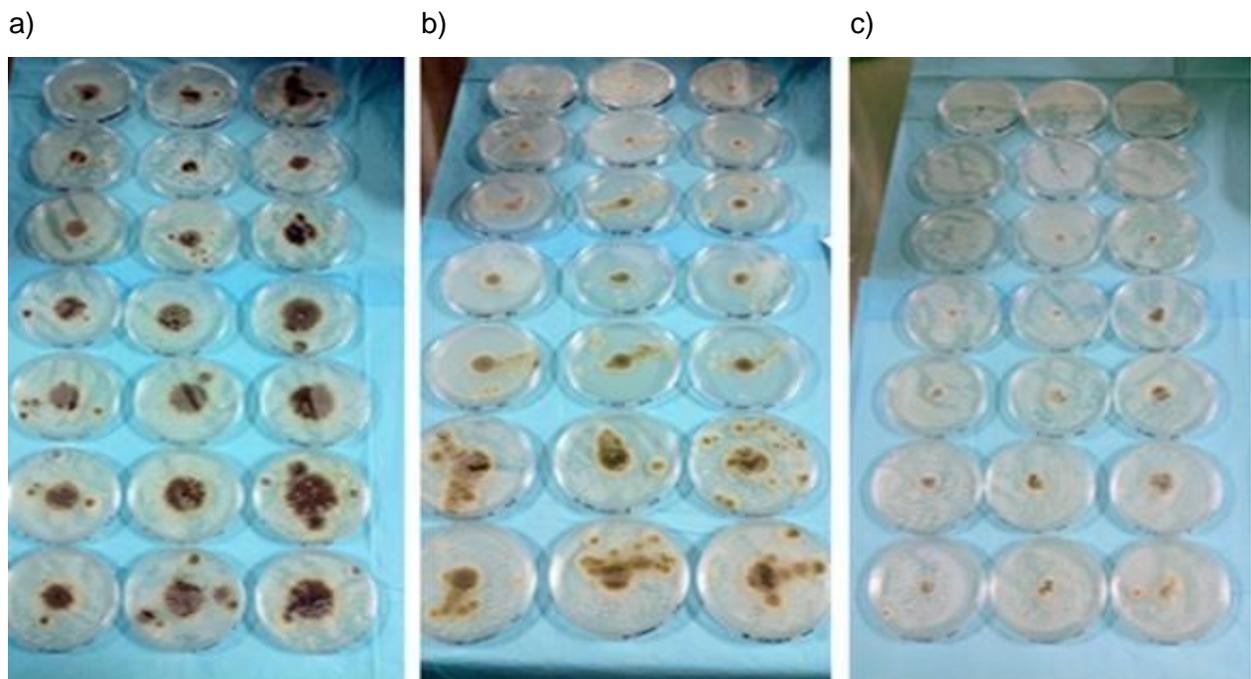


Figura 8. Crecimiento radial de los hongos a las 96 horas: a) *Aspergillus niger*, b) *Aspergillus parasiticus* y c) *Cladosporium cladosporioides*.

Fuente: Propia autoría, 2015.

Aspergillus niger

El crecimiento radial de *A. niger* en medio de cultivo PDA con aceite esencial de Pirul a 25°C se muestra en la tabla 3, donde se observa que al tiempo de 24 horas no hay diferencia significativa ($P \leq 0.05$) a las concentraciones utilizadas en este estudio. Al tiempo de 96 horas si hay diferencia significativa ($P \leq 0.05$), respecto a las concentraciones siendo la concentración de 500 ppm la que menor radio presento y encontrando así significativa la diferencia ($P \leq 0.05$) con respecto a las concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm. A las 144 horas la concentración de 500 ppm presenta menor radio y significativamente diferencia ($P \leq 0.05$) con las concentraciones de 100, 250 y 1000 ppm. Con este estudio se tiene el indicio de que *A. niger* no presenta un efecto tan marcado de inhibición.

Tabla 3. Crecimiento radial de *Aspergillus niger* en medio de cultivo PDA con aceite esencial de Pirul a 25°C.

Tiempo (h)	Concentración (ppm)	Radio (mm)
24	0	2.25±0.90 A
	10	2.17±0.80 A
	100	2.17±0.52 A
	250	1.58±0.58 A
	500	1.00±0.00 A
	1000	1.58±0.80 A
96	0	24.13±1.24 A
	10	19.50±0.71 AB
	100	21.83±1.38 A
	250	14.00±0.35 CD
	500	11.83±1.26 D
	1000	17.08±1.91 BC
144	0	37.88±0.88 A
	10	26.38±4.07 BC

100	36.00±1.98 A
250	31.38±4.07 AB
500	20.58±1.23 C
1000	31.58±0.80 AB

Promedio de tres replicas y desviación estándar. Letras capitales A, B y C indican grupos estadísticos en columna por cada tiempo ($P \leq 0.05$).

Aspergillus parasiticus

En la Tabla 4 se observa el crecimiento radial de *A. parasiticus* en medio de cultivo PDA con aceite esencial de Pirul a 25°C, a las 24 horas no hay diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre concentraciones, pero si entre ellas con respecto al control. A las 96 horas hay diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre el control y la concentración de 500 ppm, sin embargo entre las concentraciones de 100, 250, 500 y 1000 ppm no hay diferencia significativa ($P \leq 0.05$). Entre las concentraciones de 10 y 500 ppm si hay diferencia significativa notable. Las concentración que presento mayor crecimiento radial fue la de 100 ppm y la de menor crecimiento fue la de 500 ppm. En las 144 horas el hongo está dando muestra de estrés a las 500 y 1000 ppm, evidenciado por las diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$).

Tabla 4. Crecimiento radial de *Aspergillus parasiticus* en medio de cultivo PDA con aceite esencial de Pirul a 25°C

Tiempo (h)	Concentración (ppm)	Radio (mm)
24	0	1.50±1.00 A
	10	0.00±0.00 B
	100	0.00±0.00 B
	250	0.00±0.00 B
	500	0.00±0.00 B
	1000	0.17±0.29 B
96	0	15.67±1.61 A

	10	11.58±1.13 AB
	100	10.92±1.04 ABC
	250	9.33±2.96 BC
	500	6.42±2.16 C
	1000	6.83±1.13 BC
	0	18.83±2.25 A
	10	17.33±1.89 A
144	100	17.75±1.77 A
	250	13.67±2.57 AB
	500	11.33±2.38 B
	1000	13.25±0.25 AB

Promedio de tres replicas y desviación estándar. Letras capitales A, B y C indican grupos estadísticos en columna por cada tiempo ($P \leq 0.05$).

Cladosporium cladosporioides

El crecimiento radial de *C. cladosporioides* en medio de cultivo PDA con aceite esencial de Pirul a 25°C se muestra en la tabla 5, donde se observa que a las 24 horas no hay diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre concentraciones, tampoco muestra diferencias con control respecto al control. En las 96 horas no hay diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre las concentraciones de 10, 100 y 250 ppm, pero se encontró diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre estas concentraciones y las de 500 y 1000 ppm. A partir de las 500 ppm se muestra un efecto inhibitorio notable. A las 144 horas no hay diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre las concentraciones de 10, 100, 250 y 500 ppm, entre las concentraciones de 10 y 500 ppm si hay diferencia significativa ($P \leq 0.05$). La concentración que presento mayor crecimiento radial fue la de 10 ppm con un valor de 25.63±4.42 mm y la de menor crecimiento radial fue la de 1000 ppm con 12.08±1.29 mm.

Tabla 5. Crecimiento radial de *Cladosporium cladosporioides* en medio de cultivo PDA con aceite esencial de Pirul a 25°C

Tiempo (h)	Concentración (ppm)	Radio (mm)
24	0	0.00±0.00
	10	0.00±0.00
	100	0.00±0.00
	250	0.00±0.00
	500	0.00±0.00
	1000	0.00±0.00
	96	0
10		11.25±1.39 A
100		11.92±2.53 A
250		7.00±1.64 AB
500		3.42±1.23 B
1000		4.08±0.80 B
144		0
	10	25.63±4.42 A
	100	19.38±1.94 ABC
	250	19.88±2.65 ABC
	500	14.25±2.47 BC
	1000	12.08±1.29 C

Promedio de tres replicas y desviación estándar. Letras capitales A, B y C indican grupos estadísticos en columna por cada tiempo ($P \leq 0.05$).

Dosis inhibitoria 50

La Dosis Inhibitoria 50 (DI50) de aceite esencial de Pirul en hongos obtenidas a partir de crecimiento radial en medio PDA a 25°C se muestra en la tabla 6, esta fue determinada por el

programa NCSS LLC, Utha, USA 2011. La DI50 para *Aspergillus parasiticus* observada es baja comparada con los otros hongos.

Tabla 6. Dosis Inhibitoria 50 (DI50) de aceite esencial de Pirul en hongos obtenidas a partir de crecimiento radial en medio PDA a 25°C.

Hongo	Dosis Inhibitoria 50 ($\mu\text{L}/\text{mL}$)
<i>Aspergillus niger</i>	3, 649.87
<i>Aspergillus parasiticus</i>	340.76
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	550.91

Dosis mínima inhibitoria

En la tabla 7 se muestran los valores determinados mediante el programa NCSS LLC, Utha, USA 2011, para las Dosis mínima inhibitoria (DMI) de aceite esencial de Pirul en hongos obtenidas a partir de crecimiento radial en medio PDA a 25°C. La DMI para *Aspergillus parasiticus* denota que la concentración versus crecimiento no presenta un comportamiento lineal de Inhibición, evidenciado por la alta concentración de la DMI. *Cladosporium cladosporioides* muestra la DMI más baja en comparación con los demás hongos.

Tabla 7. Dosis mínima inhibitoria (DMI) de aceite esencial de Pirul en hongos obtenidas a partir de crecimiento radial en medio PDA a 25°C.

Hongo	Dosis Mínima Inhibitoria ($\mu\text{L}/\text{mL}$)
<i>Aspergillus niger</i>	7, 551, 063.18
<i>Aspergillus parasiticus</i>	108, 686, 970.89
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	40, 542.89

Germinación de esporas

Aspergillus parasiticus

En la figura 9 se encuentra representada de forma gráfica la germinación de esporas de *Aspergillus parasiticus* en presencia de aceite esencial de Pirul (DI50) a 25°C, donde se muestra que hay evidencia de Inhibición, también hay evidencia de un lento desarrollo en controles.

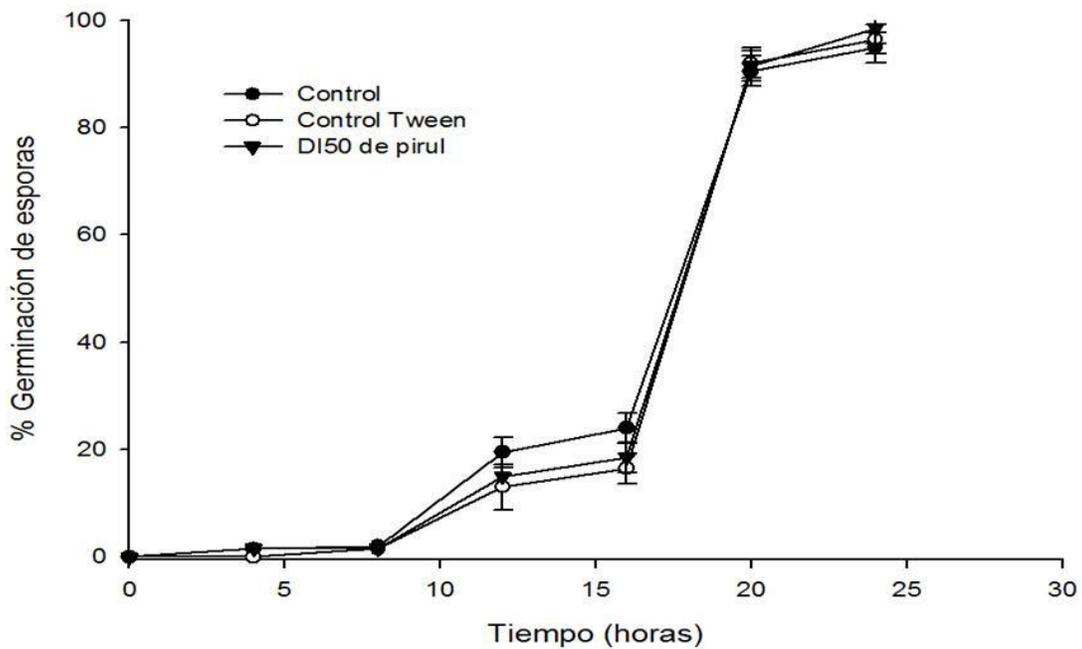


Figura 9. Germinación de esporas de *Aspergillus parasiticus* en presencia de aceite esencial de Pirul (DI50) a 25°C.

Cladosporium cladosporioides

La figura 10 muestra la representación gráfica de la germinación de esporas de *Cladosporium cladosporioides* en presencia de aceite esencial de Pirul (DI50) a 25°C, se observa que no hay diferencias estadísticas; no inhibe la germinación pero si el micelio.

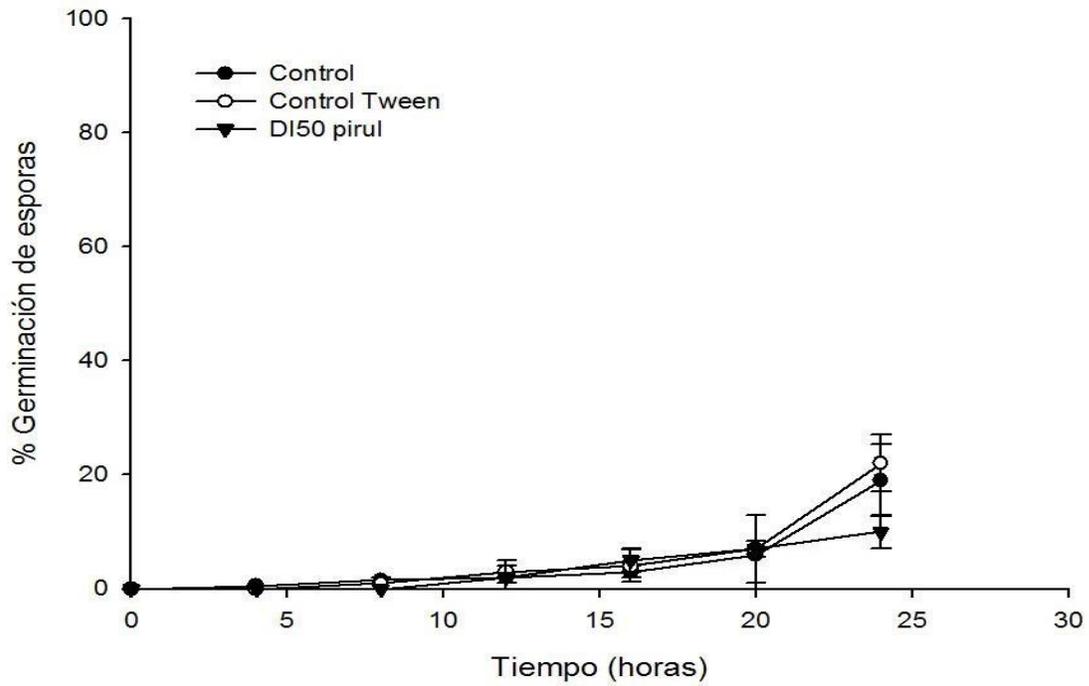


Figura 10. Germinación de esporas de *Cladosporium cladosporioides* en presencia de aceite esencial de Pirul (DI50) a 25°C.

DISCUSIONES

Aspergillus niger

En este estudio *A. niger* no presentó un efecto marcado de inhibición con el aceite esencial de Pirul (*Schinus molle*) en el crecimiento radial, esto es evidente debido a los valores altos de DMI, y DI50 obtenidas de aceite esencial de Pirul a partir del crecimiento radial en medio PDA a 25°C, dado que fueron valores muy elevados de aceite esencial de Pirul no se realizó germinación de esporas sobre éste hongo.

Rasooli y col. (2006) reportaron que las mezclas de aceites esenciales de timo con eriocalex y timo con x-porlock en *A. niger* expuestos a niveles de DMI, mostraron daño irreversible en la pared, membrana y orgánulos celulares.

Por otra parte Li y col. (2013) reportaron que es posible inhibir *A. niger* con aceite esencial de citronela, el cual ofrece un gran potencial fúngico en respuesta de destrucción de la pared celular de las hifas de *A. niger*, pasando través de la membrana celular, penetrando en el citoplasma, y actuando sobre los principales orgánulos. Posteriormente, las hifas se derrumbaron y se aplastaron debido a la pérdida de citoplasma y a que los orgánulos fueron destruidos gravemente. Del mismo modo, el aceite de citronela podría conducir a la ruptura de la pared celular y luego actuar sobre la esporoplasma para matar a los conidios.

Moghtader (2013) utilizó aceites esenciales de menta como antifúngico contra hongos transmitidos por el suelo, como lo es *A. niger*. Por el método de difusión en pocillo de agar, detectó la actividad antifúngica máxima de aceites esenciales. Se evidenció que los efectos antimicóticos de aceite esencial de *Mentha piperita* bajo investigación en comparación con mentol sintético en *A. niger*. El alto porcentaje de las actividades antifúngicas de aceite de menta es relacionado con el mentol, el compuesto orgánico principal. Este aceite esencial se puede utilizar para la actividad antifúngica y como compuesto natural. Concluyendo que la eficacia del aceite dependerá de la concentración, del patógeno y de los efectos de compuestos naturales de hongos.

Janatova y col. (2015) evaluaron la actividad antifúngica de siete componentes de aceites esenciales volátiles de las plantas: alil isotiocianato, carvacrol, cinamaldehído, disulfuro de dialilo, eugenol, timol y timoquinona contra *A. niger*. Para proporcionar efectos a largo plazo de la liberación controlada y facilidad de aplicación, estas sustancias se encapsularon en material de sílice mesoporoso. Se encontró actividad antifúngica en cinco de las siete sustancias ensayadas lo cual se relaciona con la tasa de evaporación de las sustancias puras

y encapsuladas. Concluyendo que su eficacia a largo plazo está asegurada por la liberación controlada y el fácil manejo, dando efectos positivos para su actividad antifúngica.

Así mismo Tian y col. (2015) evaluaron la actividad antifúngica de perilaldehído (PAE) contra *A. niger*. PAE mostró actividad antifúngica notable contra *A. niger*, con una concentración inhibitoria mínima (MIC) y una concentración fungicida mínima (MFC) de 0,25 y 1 l/mL, respectivamente. La acumulación de biomasa micelial también se inhibió por PAE de una manera dependiente de la dosis, inhibiendo por completo el crecimiento del micelio a 1 l/mL. Las concentraciones de PAE de 0.075 l/mL mostró la mayor inhibición del crecimiento fúngico en comparación con los controles. Otros experimentos indicaron que PAE activa un mecanismo de membrana activa que inhibe la síntesis de ergosterol, aumenta la permeabilidad de la membrana (como se evidencia por medio de mediciones de conductividad y pH extracelular), y altera la integridad de membrana, lo que lleva a la muerte celular.

Por lo antes mencionado al hecho de que en este estudio *A. niger* no fuera inhibido de forma marcada con el aceite esencial de Pirul (*S. molle*) se piensa que podría deberse a tres aspectos: 1) a la composición de aceite esencial utilizado, 2) al método de evaluación y 3) a las concentraciones que fueron utilizadas.

Aspergillus parasiticus

La DI50 para *A. parasiticus* es baja en comparación con la determinada por los demás hongos, lo que pudiera indicar que el aceite esencial de Pirul (*Schinus molle*) ha inhibido el desarrollo del hongo. Sin embargo la DMI denota que la concentración versus crecimiento no presenta un comportamiento lineal de inhibición, evidenciado por la alta concentración de la DMI. Esta tendencia pudiera indicar una posible adaptación del hongo a los componentes del aceite esencial de Pirul (*S. molle*). En la germinación de esporas se mostró evidencia de inhibición, sin embargo también hay un lento desarrollo en controles. Este lento desarrollo se puede deber a factores como la temperatura y adaptación al medio. *A. parasiticus* se desarrolla a temperatura de 27°C, mientras que en nuestro estudio se realizó a 25°C.

López-Meneses y col. (2015) reportan inhibición en un 75% para 10, 000 ppm en crecimiento radial de *A. parasiticus*. Indicando que es necesaria una alta concentración de aceite para lograr controlar al hongo en esta etapa de crecimiento. Por otra parte, el mismo estudio pero en la etapa de germinación de esporas reporta inhibición del 53% a las 24 horas, mientras que nuestros resultados no muestran diferencias significativas a ese tiempo. Estas diferencias se pueden explicar por las dosis de aceite esencial utilizadas en esta etapa, siendo

10 veces mayor la de López-Meneses y col. (2015). Estas diferencias con respecto a nuestro estudio se pueden deber a tres factores, la temperatura de incubación, la concentración de aceite esencial y el medio de cultivo utilizado. En la tabla 8 se comparan estos parámetros.

Tabla 8. Comparación de parámetros utilizados por López-Meneses y col. (2015) y nuestro estudio en la evaluación del efecto de Pirul sobre *A. parasiticus* en la etapa de germinación de esporas.

Parámetro	López-Meneses y col. (2015)	Nuestro estudio
Temperatura	27°C	25°C
Concentración (ppm)	3377	340
Medio de cultivo	Czapek líquido	PDA (medio sólido)

Previamente se ha reportado el efecto inhibitor del Pirul, Murray y col. (2012) reporta la capacidad antimicrobiana de extractos de Pirul obtenido por diversos métodos, entre los hongos evaluados se encuentran los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Candida*, *Fusarium* entre otros.

Se tienen el antecedente de que Gundidza (1993) reportaba que el aceite esencial de Pirul obtenido por hidrodestilación mostraba capacidad antifúngica contra *A. parasiticus* utilizando entonces el método de difusión en placa.

Es conocido que los aceites esenciales en fase vapor tienen mejor potencial, esto lo corroboran Olivares-Cruz y López-Malo (2013), quienes nos dicen que los aceites esenciales en fase vapor tienen efectividad como agentes antimicrobianos, de igual forma que las mezclas de los componentes principales de estos aceites esenciales. Debido a que los aceites esenciales son muy volátiles, la forma de su evaluación es mejor en fase vapor. Algunas investigaciones señalan que algunos compuestos presentes en los aceites esenciales, como los terpenos que tienen mayor actividad antifúngica en fase vapor. Y concluyen que las combinaciones de aceites esenciales en fase vapor han mostrado mayor efectividad, lo cual podría deberse a la combinación de los componentes que constituyen a los aceites, como el timol, carvacrol, cinamaldehído, entre otros.

Luque-Alcaraz y col. (2016) reportan resultados que sugieren una interacción química entre el quitosano y el aceite esencial de árbol de pimienta (*Schinus molle*). La mayor concentración de complejo de quitosano/aceite esencial de pimienta (*Schinus molle*) (CQ-AE) causó una disminución mayor (40-50%) en la viabilidad de *A. parasiticus*. La inclusión de aceite de árbol de pimienta (*Schinus molle*) en nanopartículas de quitosano (CQ) es una alternativa factible para obtener biocompositos antifúngicos, donde se fortalece la actividad que presenta cada compuesto individualmente. En base a esto se podría decir que el aceite esencial de Pirul (*Schinus molle*) podría tener un efecto más satisfactorio en inhibición de *A. parasiticus* si este se evaluara en conjunto con otros complejos en mezclas.

Las actividades antifúngicas de ocho aceites esenciales (AES): la albahaca, canela, eucalipto, mandarina, orégano, menta, árbol de té y tomillo fueron estudiadas por Hossain y col. (2016) se evaluaron por su capacidad para inhibir el crecimiento de *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Penicillium chrysogenum*. La actividad antifúngica de la AES se evaluó mediante la concentración mínima inhibitoria (MIC) utilizando el análisis de microplaca de 96 pocillos. Las interacciones entre las diferentes combinaciones de AE se realizaron mediante la técnica de tablero de ajedrez. La actividad antifúngica más alta fue exhibida por el orégano y el tomillo que mostró valores de MIC más bajos entre todos los hongos ensayados. La actividad antifúngica de los demás AE podría ser clasificado adecuadamente en una secuencia descendente de canela, menta, árbol de té y la albahaca. Eucalipto y mandarina mostraron la menor eficiencia ya que no podían inhibir a cualquier parte del crecimiento fúngico a 10.000 ppm. Una formulación combinada de orégano y tomillo dio lugar a un efecto sinérgico, que muestra una mayor eficiencia frente a *A. flavus*, *A. parasiticus* y *P. chrysogenum*. Las mezclas de té de menta y té de árbol producen efecto sinérgico contra *A. niger*. La aplicación de un modelo de Gompertz modificada teniendo en cuenta los parámetros de crecimiento de hongos como máximo diámetro de la colonia, máxima tasa de crecimiento y el retraso en períodos de tiempo, en virtud de los diferentes escenarios de tratamiento con AE, mostró que el modelo podría describir adecuadamente y predecir el crecimiento de los hongos ensayados en estas condiciones.

La investigación de Pizzolitto y col. (2015) evalúa los efectos de diez compuestos fenólicos naturales en el crecimiento de *Aspergillus parasiticus*, en el que determinaron las propiedades físico-químicas que están involucradas en la actividad antifúngica. De acuerdo con los resultados de concentración mínima inhibitoria (MIC) los valores de los compuestos individuales, isoeugenol, carvacrol y timol fueron los componentes más activos fenólicos (1,26 mm, 1,47 mm y 1,50 mm, respectivamente), seguido del eugenol (2,23 mm). Por otro lado,

creosol, p-cresol, o-cresol, m-cresol, vainillina, y fenol no tenían efectos sobre el desarrollo de hongos. Logaritmo del coeficiente de reparto octanol / agua (log P), el índice de refracción (RI), y el volumen molar (VM) demostraron que los descriptores que mejor explican la actividad antifúngica correlacionada son la lipofilia, la reactividad de los componentes, y el aspecto estérico. Estos resultados suponen una importante contribución a la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antifúngica.

Ferreira y col. (2013) informan de las actividades anti aflatoxigenica del aceite esencial de *C. longa* y la curcumina. Las pruebas medianas se prepararon con el aceite de *C. longa*, y el estándar de la curcumina a concentraciones varió de 0,01% a 5,0%. Todas las dosis del aceite esencial de la planta y el estándar de la curcumina interferían con la producción de micotoxinas. Tanto el aceite esencial y curcumina inhibieron significativamente la producción de aflatoxinas; el nivel de 0,5% tenían un efecto inhibitor de 99,9% y 99,6% en la producción de AFB1 AFB2. Los niveles de aflatoxina B1 de producción fueron 1,0 y 42,7 mg/mL, respectivamente, para las muestras tratadas con el aceite esencial de *C. longa* y curcumina a una concentración de 0,5%. Demostrando que compuestos vegetales naturales también han mostrado inhibir la producción de micotoxinas y puede ser una alternativa a los agentes químicos sintéticos.

Sultana y col. (2015) investigaron el crecimiento de *Aspergillus parasiticus* y la producción de Aflatoxinas, inhibidas durante el almacenamiento de los tres cereales más importantes (trigo, maíz y arroz) utilizando hojas de neem (*Azadirachta indica*) y kikar (*Acacia nilotica*). Los cereales se inocularon con esporas de moho y estabilizados por hojas en polvo de neem y kikar. Las muestras de ensayo con niveles de humedad de 21% se almacenaron a 30°C durante un período de 9 meses. Las aflatoxinas se cuantificaron en diferentes intervalos de tiempo en los cereales almacenados. Las hojas de Neem inhibieron completamente la síntesis de todos los tipos de aflatoxinas durante 4 meses en el trigo y durante 2 meses en el maíz, mientras que en la síntesis de arroz inhibido de tan sólo B2, G1 y G2 aflatoxina durante 3 meses. Kikar deja B2 aflatoxina totalmente inhibido, G1 y G2 durante 3 meses en el trigo, y durante 2 meses en el maíz. Entre dos plantas investigadas, las hojas de neem se encontraron más eficaces para la prevención de la producción de todo tipo de aflatoxinas en el almacenamiento a largo plazo de los cereales.

Nazareth y col. (2016): evaluaron la capacidad gaseosa del isotiocianato de alilo (AITC) que es un antimicrobiano volátil derivado de la mostaza negra oriental, en la inhibición de la producción de micotoxinas de *Aspergillus parasiticus* (productor de aflatoxinas) y *Fusarium poae* (productor de beauvericina y eniatina) en la harina de trigo. Las cajas Petri llenas de 2g de harina de trigo se inocularon con 104 conidios/g de *A. parasiticus* y *F. poae* y se colocan en un

frasco de 1L. AITC se añadió a 0,1, 1 o 10 I/L en la fase gaseosa. Los frascos fueron cerrados herméticamente y se mantuvieron a 23°C durante 30 días. Se identificaron las micotoxinas y cuantificados por LC-MS / MS. Incluso 0,1 I/L de AITC fue capaz de producir la reducción de 6,9 a 23% de la producción de micotoxinas. En general, la síntesis de aflatoxinas y beauvericina fue más afectada que eniatinas. El uso de AITC a 10 I/L inhibió completamente la producción de todas las micotoxinas para 30 días. AITC a dosis bajas se podría añadir a los paquetes de harina con el fin de inhibir la producción de micotoxinas potencialmente peligrosas.

Martins y col. (2014) estudiaron extractos de frutas de guaraná y juca, se ensayaron para determinar actividad antifúngica y anti micotoxigenica contra *Aspergillus parasiticus* utilizando el método de dilución en agar. Los tratamientos utilizados fueron diferentes a las tres concentraciones (1,08, 1,62 y 3,24%). A pesar de que no hay un tratamiento que inhibe completamente el crecimiento de hongos, *A. parasiticus* se redujo significativamente por los tratamientos en comparación con el grupo control. Los producción de aflatoxina B1, AFB2, AFG1 y AFG2 por *A. parasiticus* cultivado en el guaraná y extractos juca en tratamiento fue significativamente menor en comparación con los controles. *A. parasiticus* cepa produjo aflatoxinas en todas las concentraciones cuando crecen sobre los extractos de guaraná en medio tratado. Por lo anterior concluyeron que algunos extractos no inhiben la producción de aflatoxinas, como podría ser el caso de nuestro estudio, ya que *A. parasiticus* en medio de cultivo PDA con aceite esencial de Pirul (*Schinus molle*) a 25°C mostro estrés a las concentraciones de 500 y 1000 ppm a las 144 horas, por lo que se cree que este estrés podría dar como resultado producción de aflatoxinas.

Cladosporium cladosporioides

El crecimiento radial de *C. cladosporioides* en medio de cultivo PDA con aceite esencial de Pirul (*Schinus molle*) a 25°C, muestra una inhibición notable a partir de las 500 ppm, esto se confirma con la DMI determinada ya que presenta el valor más bajo en comparación con los demás hongos.

La germinación de esporas de *C. cladosporioides* en presencia de aceite esencial de Pirul (*S. molle*) con la DI50 no muestra diferencias estadísticas, no hay inhibición en la germinación, se puede deducir que utiliza el aceite esencial de Pirul como sustrato para inhibir el micelio.

Existen estudios que evaluaron la actividad antifúngica del extracto etanólico de las hojas de *molle*, *Schinus molle* y su acción como inhibidor micelial, Segura-Contreras y col.

(2015) realizaron una evaluación de *Schinus molle* sobre *Lasiodiplodia theobromae*. Prepararon el medio de cultivo agar papa dextrosa y luego se procedió a obtener el extracto etanólico a concentraciones de 0, 25, 30, 35%. Los resultados se analizaron mediante el porcentaje de inhibición del crecimiento de micelio. El extracto de *Schinus molle* demostró tener actividad antifúngica sobre *L. theobromae* a la concentración de 30% ($p < 0,05$). Concluyen que el extracto de *S. molle* presenta actividad antifúngica sobre *L. theobromae*, en condiciones de laboratorio.

En este estudio se utilizaron las hojas de Pirul (*Schinus molle*) para la extracción del aceite esencial en lugar del fruto, esto puede ser también uno de los factores por el cual se inhibió *Cladosporium cladosporioides*. Mehdi-Hashemi y Ali-Safavi, (2012), demostraron que el aceite esencial de la hoja de *P. orientalis* era más tóxico que el aceite de la fruta en *C. maculatus*, *S. oryzae*, y *T. castaneum*. El análisis por Cromatografía de gas – Espectrometría de masa (GC –MS) de los aceites reveló que el porcentaje de hidrocarburos monoterpenos fue mayor que otros componentes. El principal hidrocarburo era α -pineno, tanto en la hoja y el fruto. Por lo tanto, los aceites de *P. orientalis* poseen un potencial para su uso en la gestión de *S. oryzae*, *T. castaneum* y especialmente *C. maculatus*.

Elshafie y col. (2016) evaluaron la eficacia antimicrobiana in vitro de tres aceites esenciales (AE) derivados de plantas del género *Schinus* y extraídos de hojas y frutos de *S. terebinthifolius* y hojas de *S. molle*, de los cuales examinaron tanto las actividades antifúngicas y antibacterianas. La actividad antifúngica de los AE estudiados fue evaluado contra *Colletotrichum acutatum*, *Botrytis cinerea* y en comparación con la *azoxistrobina* fungicida sistémico. La concentración mínima inhibitoria de los AE estudiados se evaluó utilizando el método de micro-placa de 96 pocillos, donde los microorganismos ensayados mostraron diferentes niveles de sensibilidad a cada AE probado. Todas los AE investigados redujeron el crecimiento del micelio de hongos cuando se usó a bajas concentraciones 250-1000 ppm y 2.000 a 8.000 ppm contra *C. acutatum* y *B. cinerea*, respectivamente. Las concentraciones más altas de los mismos AE mostraron un efecto fungicida contra ambos hongos mitospóricos.

da Silva y col. (2014) evaluaron las propiedades antioxidantes, antifúngicas, anticolinesterásico y actividad citotóxica de aceites esenciales de especies de pimienta del Amazonas. Los sesquiterpenos eran las clases más altamente representadas y se identificaron 87 componentes, los principales compuestos que se encuentran en los aceites esenciales de pimienta fueron: Selin-11-en-4- α -ol, β -elemeno, β -selineno, α -selineno, biciclogermacreno, β -cariofileno, α -humuleno y todos los aceites analizados mostraron potente actividad antifúngica, con el límite de detección (DL) de 0,1 a 1,0 g contra *C. cladosporioides*. Esto podría ser una

explicación al porque en nuestro estudio *C. cladosporioides* mostro inhibición, pues se sabe que el aceite esencial de Pirul (*Schinus molle*) presenta sesquiterpenos en su composición.

El estudio de Zabka y col. (2014) explora la eficacia de 20 aceites esenciales contra *Alternaria alternata*, *Stachybotrys chartarum*, *Cladosporium cladosporium* y *Aspergillus niger*, relacionada con la abundancia de las sustancias activas de la mayoría. Se evaluó la concentración inhibitoria mínima (MIC100 y CIM50). El análisis por cromatografía de gases reveló gran abundancia de compuestos fenólicos altamente eficaces cuyas estructuras moleculares diferentes se correlaciona con diferencias en la eficacia de aceites esenciales que son similares a los niveles de algunos fungicidas sintéticos utilizados en la medicina y la agricultura. Debido a que los aceites esenciales representan seguridad al medio ambiente y son de origen natural, estos podrían ofrecer el potencial para convertirse en una alternativa donde el uso de fungicidas sintéticos no es posible por varias razones.

Espinoza-Solís (2014) describe como el principal mecanismo de acción de antifúngico de los aceites esenciales a las saponinas, las cuales forman complejos con los esteroides en las membranas de los hongos lo que ocasiona la desintegración de la membrana. En diversos estudios se ha demostrado que los compuestos fenólicos inhiben las enzimas reaccionando con los grupos sulfidrilos de los aminoácidos. Las quinonas, flavonas, flavonoides, taninos y flavonoles forman complejos con los aminoácidos nucleofílicos de las proteínas lo que conduce a su inactivación.

López-Meneses y col. (2015) menciona como afectan los aceites esenciales en la membrana: algunos autores han atribuido este fenómeno, no sólo a la presencia de terpenos, compuestos fenólicos, y otros componentes, sino también a la estructura química, tales como la presencia de grupos hidroxilo en sus compuestos fenólicos. Señala que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se podría deber a la presencia de un núcleo aromático, y un reactivo fenólico OH⁻; estos pueden formar enlaces de hidrógeno con los sitios activos de las enzimas diana. Se sabe que Aldehídos tales como formaldehído y glutaraldehído tienen actividad antimicrobiana. La conjugación de un grupo aldehído a un doble enlace carbono-carbono ha sido propuesto como una manera de producir una disposición altamente electronegativa, lo que puede explicar su actividad. López-Meneses y col. (2015) explican que son estos compuestos electronegativos los que pueden interferir en los procesos biológicos, como transferencia de electrones, reacciones con las proteínas y los ácidos nucleicos y, por lo tanto, inhiben el crecimiento de microorganismos.

CONCLUSIONES

La evaluación del efecto de aceite esencial de Pirul (*Schinus molle*) sobre el desarrollo *in vitro* de *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus* y *Cladosporium cladosporioides* indicó que se encontró un efecto marcado contra dos de los hongos evaluados; *A. parasiticus* y *C. cladosporioides*. *A. parasiticus* mostró la DI50 más baja en comparación con los demás hongos y un comportamiento no lineal de inhibición en su DMI, indicando una posible adaptación del hongo a los componentes del aceite esencial de Pirul (*S. molle*). *A. parasiticus* dio muestras de estrés en respuesta al aceite esencial de Pirul (*S. molle*). *C. cladosporioides* tiene una inhibición notable a partir de las 500 ppm, la germinación de esporas no se ve inhibida, pero el aceite esencial de Pirul (*S. molle*) actúa como sustrato para inhibir el micelio.

RECOMENDACIONES

Solo se recomienda el uso de aceite esencial de Pirul (*Schinus molle*) en *Cladosporium cladosporioides*, esto porque *Aspergillus parasiticus* da muestras de estrés.

Para lograr controlar al hongo en la etapa de crecimiento radial se considera recomendable evaluar otras concentraciones de aceite esencial de Pirul (*Schinus molle*). Asimismo modificar las condiciones de temperatura de incubación para *A. parasiticus* a 27°C.

Evaluar las DMI y DI50 utilizando medio de cultivo Czapek para los hongos evaluados y comparar los resultados con los medios ya utilizados.

Se proponen cambios para la obtención de aceite esencial de Pirul (*S. molle*), por ejemplo realizar la destilación por arrastre de vapor con hojas frescas.

Caracterizar el aceite esencial de Pirul (*S. molle*), identificar componentes y la cantidad en la que están presentes en el aceite para poder determinar a qué componentes en específico se debe la acción inhibitoria.

REFERENCIAS

- Aguilar A. 2012. Práctica #3 Destilación por arrastre de vapor. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Laboratorio de Química Orgánica I. Disponible en: <http://quimicaorganica1alejandraaguilar.blogspot.mx/2012/02/practica-3-destilacion-por-arrastre-de.html>. (Fecha de acceso: 06 de Julio de 2016).
- Avila R, Palou E, Jiménez MT, Nevárez GV, Navarro AR, López A. 2012. Antifungal activity by vapor contact of essential oils added to amaranth, chitosan, or starch edible films. Departamento de Ingeniería de Química y Alimentos y Ambiental. Universidad de las Américas Puebla. Ex hacienda Sta. Catarina Mártir S/N Cholula, Puebla. C.P. 72810 México. *International Journal of Food Microbiology* 153: 66-72.
- BDATAiO. 2012. *Aspergillus* spp. Fichas de Agentes Biológicos. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo. DB-H-A.ssp-12. Disponible en: <http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Hongos/Ficha%20Aspergillus%20spp.pdf>. (Fecha de acceso: 20 de Abril de 2016).
- BDATAiO. 2014. *Cladosporium* spp. Fichas de Agentes Biológicos. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo. DB-H-A.ssp-12. Disponible en: <http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Hongos/Cladosporium%20spp.pdf>. (Fecha de acceso: 20 de Abril de 2016).
- Bibek R, Bhunia A. 2008. *Fundamental food microbiology*. Editorial CR. 4th edición.
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. 2009. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana D. R. Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/atlas.php>. (Fecha de acceso: 17 de Mayo de 2014).
- Borrego AS. 2012. *Cladosporium*: género fúngico que deteriora soportes documentales y afecta la salud del hombre. *Boletín de Archivo Nacional*. 18-19-20: 104-118. Disponible en: <http://www.arnac.cu/wp-content/uploads/2013/03/Cladosporium.pdf>. (Fecha de acceso: 17 de Mayo 2014).
- BOLD SYSTEMS. 2014. *Cladosporium* sp taxonomy. Disponible en: http://www.boldsystems.org/index.php/Taxbrowser_Taxonpage?taxid=251826. (Fecha de acceso: 20 de Abril de 2016).
- Calvet RM, Pereira MMG, Costa APR, Torres AM, Muratori MCS. 2015. Toxigenic mycobiota and mycotoxins in shrimp feed. *Ciência Rural*, 45(6): 1021-1026.

- Castañeda ML, Muñoz A, Martínez JR, Stashenko E. 2007. Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas colombianas. *Scientia et Técnica*. XIII (033): 165-166.
- Chemat F, Abert M, Cravotto G. 2012. Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles. Université Avignon et des Pays de Vaucluse, INRA, UMR408, Avignon 84000, France. *International Journal of Molecular Science* ISSN 1422-0067. Int. J. Mol. Sci. 13, 8615-8627.
- da Silva JKR, Pinto LC, Burbano RMR, Montenegro RC, Guimarães EF, Andrade EHA, Maia JGS. 2014. Essential oils of Amazon Piper species and their cytotoxic, antifungal, antioxidant and anti-cholinesterase activities. *Industrial Crops and Products*, 58, 55-60.
- Dachery B, Manfroi V, Berleze KJ, Welke JE. 2015. Occurrence of ochratoxin A in grapes, juices and wines and risk assessment related to this mycotoxin exposure. *Ciência Rural*, (AHEAD), 00-00.
- Deacon JW. 1993. Introducción a la Micología moderna. Editorial LIMUSA NORIEGA S. A. de C. V. Primera Edición. LSB N 0-632.
- Dos Santos MRG, Da Silva JHS, Caxito MLDC. 2015. Brief review on the Medicinal uses and Antimicrobial Activity of different parts of *Schinus Terebinthifolius Raddi*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(12).
- Elshafie HS, Ghanney N, Mang SM, Ferchichi A, Camele I. 2016. An In Vitro Attempt for Controlling Severe Phytopathogens and Human Pathogens Using Essential Oils from Mediterranean Plants of Genus Schinus. *Journal of medicinal food*, 19(3): 266-273.
- Espinoza-Solís JA. 2014. CONTROL in vitro de *Fusarium oxysporum* Schlect f. sp. *Lycopersici* (Sacc.) Snyder and Hans Mediante la técnica de Biofumigación utilizando plantas presentes en el norte mexicano.
- Ferreira FD, Kimmelmeier C, Arrotéia CC, da Costa CL, Mallmann CA, Janeiro V, Machinski M. 2013. Inhibitory effect of the essential oil of *Curcuma longa* L. and curcumin on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* Link. *Food Chemistry*, 136(2): 789-793.
- González SA, González JM, Patiño AB. 2010. Diagnóstico y control de especies de *Aspergillus* productoras de Ocratoxina A.: 22,34, 37.
- Gundidza M. 1993. Antimicrobial activity of essential oil from *Schinus molle* Linn. *The Central African journal of medicine*, 39(11): 231-234.
- Hossain F, Follett P, Vu KD, Harich M, Salmieri S, Lacroix M. 2016. Evidence for synergistic activity of plant-derived essential oils against fungal pathogens of food. *Food microbiology*, 53, 24-30.

- IARC. (1993). Ochratoxin A. In: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Some Naturally Occurring Substances. International Agency for Research on Cancer, v.56, p.489-521.
- Janatova A, Bernardos A, Smid J, Frankova A, Lhotka M, Kourimská L, Kloucek P. 2015. Long-term antifungal activity of volatile essential oil components released from mesoporous silica materials. *Industrial Crops and Products*, 67, 216-220.
- Joshi V, Rakesh S, Vikas K. 2011. Antimicrobial activity of essential oils. Department of Food Science and Tecnology, Dr YS Parma university of Horticulture and Forestry, Nauni, Solan, HP, India. *Int. J. Ferm. Technol.* 1(2): 161-172.
- Kedia A, Prakash B, Mishra PK, Dubey NK. 2014. Antifungal and antiaflatoxicogenic properties of Cuminum cyminum (L.) seed essential oil and its efficacy as a preservative in stored commodities. *International journal of food microbiology*, 168, 1-7.
- Kocić-Tanackov S, Dimić G, Mojović L, Pejin J, Tanackov I, Djukić-Vuković A. 2015. Inhibitory effect of basil extract on the growth of *Cladosporium cladosporioides*, *Emericella nidulans*, and *Eurotium* species isolated from food. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6): 887-895.
- Lang G, Buchbauer G. 2012. A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 27(1): 13-39.
- Li WR, Shi QS, Ouyang YS, Chen YB, Duan, SS. 2013. Antifungal effects of citronella oil against *Aspergillus niger* ATCC 16404. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(16), 7483-7492.
- López-Meneses AK. 2012. Evaluación de Actividad Antifúngica de Aceites Esenciales en Hongos Micotoxigénicos. Universidad de Sonora. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos. 1: 35-36, 43-46
- López-Meneses AK, Plascencia-Jatomea M, Lizardi-Mendoza J, Rosas-Burgos EC, Luque-Alcaraz AG, Cortez-Rocha MO. 2015. Antifungal and antimycotoxigenic activity of essential oils from *Eucalyptus globulus*, *Thymus capitatus* and *Schinus molle*. *Food Science and Technology (Campinas)*, 35(4): 664-671.
- Luque-Alcaraz AG, Cortez-Rocha MO, Velázquez-Contreras CA, Acosta-Silva AL, Santacruz-Ortega HDC, Burgos-Hernández A, Plascencia-Jatomea M. 2016. Enhanced Antifungal Effect of Chitosan/Pepper Tree (*Schinus molle*) Essential Oil Bionanocomposites on the Viability of *Aspergillus parasiticus* Spores. *Journal of Nanomaterials*.
- Martins M, Kluczkovski AM, de Souza TP, Savi CPGD, Scussel VM. 2014. Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* by guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) and jucá (*Libidibia ferrea* Mart) extracts. *African Journal of Biotechnology*, 13(1): 131.

- Mehdi Hashemi S, Ali Safavi S. 2012. Componentes Químicos y Toxicidad de Aceites Esenciales de Tuya Oriental, *Platyclusus orientalis* (L.) Franco, contra Tres Escarabajos de Productos Almacenados. *Chilean journal of agricultural research*, 72(2): 188-194.
- Moghtader M. 2013. In vitro antifungal effects of the essential oil of *Mentha piperita* L. and its comparison with synthetic menthol on *Aspergillus niger*. *African Journal of Plant Science*, 7(11): 521-527.
- Murray AP, Rodriguez S, Alza NP. 2012. Chemical constituents and biological activities of plants from the genus *Schinus*. *RPMP. Ethnomed Ther Validation*, 32, 261-87.
- Nazareth TM, Bordin K, Manyes L, Meca G, Mañes J, Luciano FB. 2016. Gaseous allyl isothiocyanate to inhibit the production of aflatoxins, beauvericin and enniatins by *Aspergillus parasiticus* and *Fusarium poae* in wheat flour. *Food Control*, 62, 317-321.
- Olivares-Cruz MA, López-Malo A. 2013. Potencial antimicrobiano de mezclas que incluyen aceites esenciales o sus componentes en fase vapor. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 7-1 78-86.
- Pánek M, Reinprecht L, Hulla M. 2014. Ten essential oils for beech wood protection-efficacy against wood-destroying fungi and moulds, and effect on wood discoloration. *BioResources*, 9(3): 5588-5603.
- Perdomo-Acevedo D. y Palomarez B. 2014. Extracción y evaluación de rendimientos de los aceites esenciales del árbol aniba *perutilis hemsley* (comino) mediante el método de arrastre con vapor. Universidad Nacional Abierta a Distancia. 2008. Págs. 12-15. Disponible en: <http://66.165.175.249/bitstream/10596/3456/1/17685012.pdf>. (Fecha de acceso: 21 de Abril de 2016).
- Peredo HA, Palou E, López A. 2009. Aceites esenciales: métodos de extracción. Departamento de Ingeniería de Química y Alimentos. Universidad de las Américas Puebla. San Andrés Cholula, Puebla, México. *Temas Selectos de ingeniería de Alimentos* 3-1: 24-32.
- Pizzolitto RP, Barberis CL, Dambolena JS, Herrera JM, Zunino MP, Magnoli CE, Dalcero AM. 2015. Inhibitory effect of natural phenolic compounds on *Aspergillus parasiticus* growth. *Journal of Chemistry*, 2015.
- Québec. 2016. Institut National de santé publique. *Cladosporium cladosporioides*. Gouvernement du Québec. Disponible en: <https://www.inspq.qc.ca/node/488>. (Fecha de acceso: 10 de Enero de 2016).
- Quintana-Obregón EA, Plascencia-Jatomea M, Sánchez-Mariñez M, Rosas-Burgos E, Cortez-Rocha MO. 2010. Inhibición del crecimiento radial "in vitro" de *Fusarium verticillioides* en presencia de quitosano. *Rev. Iberoam. Polímeros*. 11(6):386-390.

- Quiles JM, Manyes L, Luciano F, Mañes J, Meca G. 2015. Influence of the antimicrobial compound allyl isothiocyanate against the *Aspergillus parasiticus* growth and its aflatoxins production in pizza crust. *Food and Chemical Toxicology*, 83, 222-228.
- Rasooli I, Rezaei MB, Allameh A. 2006. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. *Food Control*, 17(5): 359-364.
- Reglamento Comisión Europea. 2006. No. 1881/2006. Official Journal of the European Union, L364: 5-23.
- Reyes F, Palou E, López A. 2012. Vapores de aceites esenciales: alternativa de microbianos naturales. Departamento de Ingeniería de Química y Alimentos. Universidad de las Américas Puebla. Exhacienda Sta. Catarina Mártir S/N Cholula, Puebla, México. *Temas Selectos de ingeniería de Alimentos 6-1*: 29-39.
- Rodríguez TA, Morales D, Ramírez M. 2000. Efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento in vitro de hongos filopatógenos. Cuba. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. *Cultivos Tropicales*. 21- 2: 79-82.
- Segura-Contreras S, Rodríguez-Espejo M, Chico-Ruiz J. 2015. Actividad antifúngica del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* sobre el crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae* en condiciones de laboratorio. *Revista Rebiol*, 35(2): 47-52.
- Shukla AC. 2013. Plant secondary metabolites as source of postharvest disease management: An overview. *Journal of Stored Products and Postharvest Research*, 4(1): 1-10.
- Sultana B, Naseer R, Nigam P. 2015. Utilization of agro-wastes to inhibit aflatoxins synthesis by *Aspergillus parasiticus*: A biotreatment of three cereals for safe long-term storage. *Bioresource technology*, 197, 443-450.
- Tabassum N, Vidyasagas G. 2013. Antifungal investigations on plant essential oils. Medicinal plants and Microbiology Research Laboratory, Department of Post-Graduate Studies and Research in Botany, Gulbarga University, Gulbarga 585106, Karnataka, India. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. Vol 5 Suppl 2, 19-28.
- The Atrium. 2013. *Cladosporium cladosporioides* – allergenic. McLaughlin Library. University of Guelph. Ontario, Canada. Disponible en: <https://atrium.lib.uoguelph.ca/xmlui/handle/10214/6048>. (Fecha de acceso: 20 de Abril de 2016).
- Tian J, Ban X, Zeng H, He J, Chen Y, Wang Y. 2012. The mechanism of Antifungal Action of Essential oil from Dill (*Anethum graveolens* L.) on *Aspergillus flavus*. Key Laboratory of Combinatorial Biosynthesis and Drug Discovery, Ministry of Education, School of

- Pharmaceutical Sciences, Institute of Traditional Chinese Medicine & Natural Products, Wuhan University, Wuhan, P. R. China. PLoS ONE. Volume 7: Issue 1: e30147. 1-10. Disponible en: www.plosone.org. (Fecha de acceso: 10 de Abril de 2015).
- Tian J, Wang Y, Zeng H, Li Z, Zhang P, Tessema A, Peng X. 2015. Efficacy and possible mechanisms of perillaldehyde in control of *Aspergillus niger* causing grape decay. *International journal of food microbiology*, 202, 27-34.
- Universidad Nacional Autónoma de México UNAM. 2015. *Schinus Molle*. Laboratorio de plantas vasculares. Facultad de Ciencias UNAM. Disponible en: http://biologia.fciencias.unam.mx/plantasvasculares/ArbolesArbustosFCiencias/Angiospermas/schinus_molle.html. (Fecha de acceso: 20 de Abril de 2016).
- Zabka M, Pavela R, Prokinova E. 2014. Antifungal activity and chemical composition of twenty essential oils against significant indoor and outdoor toxigenic and aeroallergenic fungi. *Chemosphere*, 112, 443-448.