



FUNGICIDAS BOTÁNICOS. Aceites esenciales de plantas nativas que controlan enfermedades de poscosecha de los cítricos

Elena Pérez Faggiani¹; Pamela Lombardo² ;
Noelia Umpiérrez²; Manuel Minteguiaga²; Pablo Alves¹;
Oribe Blanco¹; Andrea Guimaraens¹; Fátima Rodríguez³;
Helena Pardo⁴; Eduardo Dellacassa⁴

¹Laboratorio de Fitopatología de INIA Salto Grande

²Estudiantes de posgrado de la Universidad de la República

³Estudiante de grado de la Universidad ORT

⁴Docentes de la Facultad de Química de la Universidad
de la República

Los frutos cítricos (naranjas, mandarinas, limones y pomelos) son ampliamente consumidos a nivel mundial debido a su agradable sabor, beneficios nutricionales y su bajo precio en relación a otros alimentos naturales. El cultivo de los cítricos probablemente se ha originado hace unos 4000 años en las áreas tropicales y subtropicales de Asia y Malasia. Desde allí llegó al Mediterráneo desde donde se distribuyó a las áreas cítricas actuales. Los cítricos han ejercido, desde siempre, una gran fascinación por el perfume de sus flores y el sabor y aroma de sus frutos. En el hemisferio norte, la fruta es cosechada desde octubre a junio y en el hemisferio sur

desde febrero a noviembre. Por lo tanto, Uruguay tiene la posibilidad de ofrecer fruta fresca a países ubicados en el hemisferio norte durante los meses de escasez.

En las condiciones climáticas de Uruguay, *Penicillium digitatum* y *Geotrichum citri-aurantii* son los principales hongos que infectan a la fruta durante y luego de la cosecha. El control de los mismos se prolonga más allá de la etapa de recolección de la fruta, con la finalidad de mantener la calidad y prolongar la vida mostrador. Estos patógenos son muy peligrosos para aquella fruta que se exporta al hemisferio norte, ya que sufre largos periodos de transporte transcurriendo más de 30 días desde la cosecha hasta el consumo.

ACEITES ESENCIALES COMO FUNGICIDAS BOTÁNICOS

El efecto curativo de las plantas aromáticas que contienen aceites esenciales (a.e) se conoce desde antes de la era cristiana, siendo reconocidas por Hipócrates (460 – 370 AC). En el curso de la historia los a.e. siempre se aplicaron en la medicina tradicional por sus efectos

antimicrobianos. En la actualidad, son utilizados por su amplio espectro de actividades biológicas y terapéuticas (espasmolítica, antioxidante, psicotrópica, expectorante, antitumoral y antidiabética entre otras). A su vez, su uso se ha difundido a varios campos, principalmente en la industria cosmética, en la medicina alternativa, en la elaboración de productos de limpieza, aromatizantes y en la industria alimenticia (aromas, sabores y conservantes).

En la agricultura, el uso de compuestos botánicos (que incluyen a los a.e.) para el control de plagas y enfermedades no es algo nuevo. Se cree que puede haber empezado con la domesticación de las plantas, aunque a partir de la revolución verde, fueron desconsiderados a causa de que los fungicidas sintéticos demostraron ser eficientes, fáciles de usar y de bajo costo. No obstante, en la actualidad existen varias restricciones y cuestionamientos a esta práctica, ya que algunos fungicidas sintéticos pueden causar daños en la salud de los consumidores, en el medio ambiente o dejan de ser efectivos por que los hongos tienen la capacidad de generar resistencia a los mismos.

Por otra parte, se observa un marcado cambio de tendencia en la comercialización de cítricos y de productos hortifrutícolas; por un lado, aumenta considerablemente el volumen de los mercados de productos ecológicos, orgánicos o 'verdes', en los que se exige no solo la ausencia total de residuos químicos en el producto final sino también la prohibición de su uso durante todo el ciclo de producción. Por otra parte, lo que es muy grave para el sector productor, es que importantes mercados "tradicionales", especialmente supermercados o cadenas alimentarias, exigen el cumplimiento de criterios internos más restrictivos que los límites máximos de residuos establecidos por la legislación. Por ello, existe un interés cada vez mayor por los fungicidas botánicos aunque otrora parecieran anticuados y sin futuro.

La presencia de compuestos antifúngicos en los aceites esenciales se comprobó hace muchos años atrás. Sin embargo, no han sido masivamente usados en el desarrollo de productos comerciales debido a que para la industria ha sido más fácil encontrar, patentar y proteger nuevos compuestos sintéticos que productos naturales de plantas. En los últimos años la investigación en fungicidas botánicos se ha intensificado, desde que se ha demostrado que pueden mitigar el impacto negativo de los fungicidas de síntesis, evitándose los residuos sobre los alimentos, la contaminación ambiental y la resistencia de los patógenos.

Para ello, el desafío es encontrar productos de origen vegetal que sean efectivos, selectivos, biodegradables y de mínimo impacto negativo sobre el ambiente y consumidores. La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales está bien documentada, incluyendo numerosas experiencias con patógenos de poscosecha que afectan a los cítricos. La mayor cantidad de información disponible, hace referencia a estudios *in vitro* y pocos a.e. han sido estudiados *in vivo*. Sin embargo, estos escasos estudios demostraron la capacidad de los a.e. de aumentar la vida mostrador de la fruta debido al control de los patógenos.

EXPERIENCIA EN URUGUAY EN EL CONTROL DE *P. DIGITATUM* UTILIZANDO ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS NATIVAS

Las familias de plantas más conocidas de las que frecuentemente se obtienen aceites esenciales son Lamiáceas, Mirtáceas, Rutáceas y Apiáceas. Basados en estos antecedentes, se exploró el potencial de producción de a.e. y el efecto sobre *P. digitatum* de plantas nativas pertenecientes a las familias botánicas mencionadas y otras familias promisorias (Anacardiáceas, Asteráceas, Chenopodiáceas, Fabáceas y Verbenáceas).

Cuadro 1 - Beneficios y limitantes en el uso de aceites esenciales como fungicidas de poscosecha de cítricos

	Pueden ser bioactivos en fase vapor y/o líquida permitiendo diferentes opciones de aplicación
	Los compuestos fungicidas volátiles pueden penetrar en el fruto mejorando el control de infecciones latentes
	Son efectivos a bajas concentraciones
	Presentan mayores posibilidades de inocuidad para mamíferos (su ocurrencia en la naturaleza lleva a que algunos de ellos ya sean parte de la dieta humana)
	Baja residualidad (son de naturaleza efímera) y biodegradables
	Pueden alterar procesos metabólicos del fruto aumentando la vida mostrador
	Pueden controlar cepas de hongos resistentes a fungicidas de síntesis
	Pueden actuar en sinergia con fungicidas sintéticos
	Pueden agregar otras propiedades beneficiosas para el consumidor, como propiedades antioxidantes, antitumorales, antimutagénicas, antiinflamatorias, entre otras
	Como aspecto negativo pueden alterar los aromas y el sabor de la fruta expuesta



Mirtácea. Guayabo del país



Verbenácea. Salvia trepadora

METODOLOGÍA

El trabajo se inició con una revisión bibliográfica donde se buscó identificar en nuestra flora las plantas candidatas con mayor potencial de producción de aceites esenciales. Luego, se realizó la colecta del material, se identificó y se depositó un ejemplar en el herbario del Jardín Botánico Prof. Atilio Lombardo (IMM).

La obtención de los a.e. se realizó mediante destilación por arrastre con vapor de agua, empleando equipos de diferente capacidad (Figura 1) según el volumen de aceite esencial requerido para realizar las pruebas de evaluación. Todos los aceites fueron tipificados químicamente en el Laboratorio de Biotecnología de Aromas del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química.

Existen diferentes formas para evaluar la capacidad antifúngica de los aceites esenciales dependiendo de la infor-

mación que se desea obtener. Algunas pruebas son del tipo cualitativas y permiten conocer si el aceite esencial inhibe o no inhibe el desarrollo y/o la esporulación del hongo (Figura 2). Otras pruebas brindan información cuantitativa (cuánto aceite esencial es necesario utilizar para que inhiba la expresión del hongo) (Figura 3). También existen formas de análisis para conocer si el compuesto antifúngico presente en el aceite esencial actúa en fase líquida y/o fase volátil (Figura 4), para conocer si el efecto es fungicida o fungistático (Figura 5), y para identificar químicamente cual es el o los compuesto/s con actividad antifúngica en la mezcla que representa el aceite esencial (Figura 6).

RESULTADOS

A partir de los experimentos realizados *in vitro*, se determinó que de los 15 aceites esenciales obtenidos de plantas nativas, el 46% tiene efecto fungicida sobre *P. digitatum*. Para algunos de ellos, entre otros datos, se



Figura 1 - Diferentes tipos de destiladores de aceites esenciales. Capacidades: A = 100 L., B = 5L, C = 2L

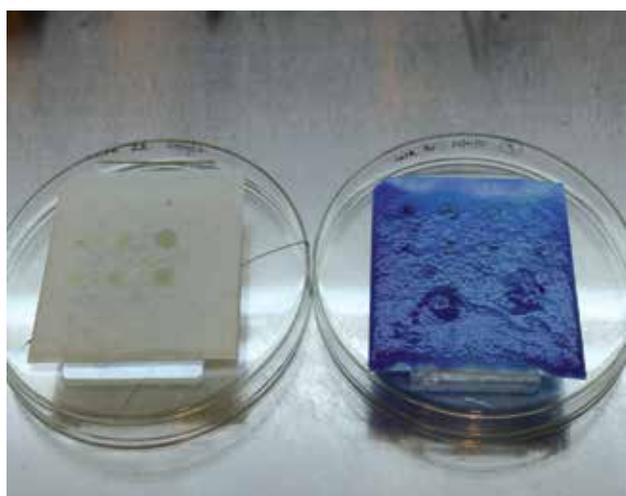


Figura 2 - Cromatografía de capa fina para detectar capacidad antifúngica en aceites esenciales.

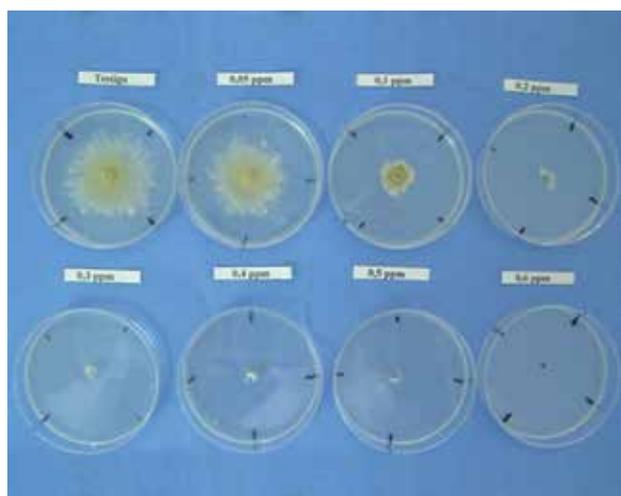


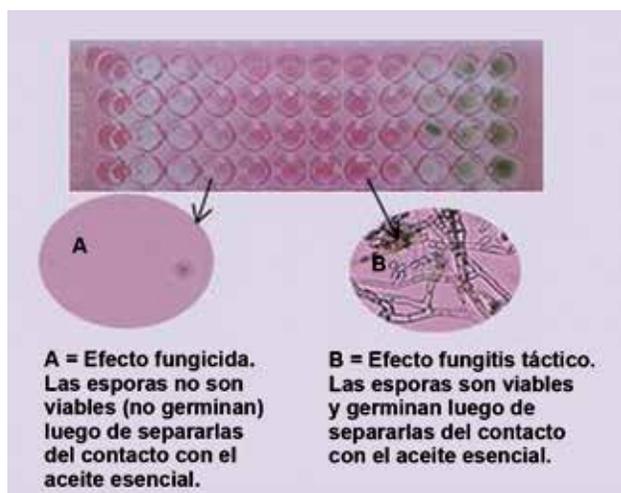
Figura 3 - Evaluación realizada para conocer la mínima concentración de aceite esencial que inhibe el desarrollo de *P. digitatum* en medio de cultivo agarizado.



Test fase volátil. Se evita el contacto directo entre el aceite esencial y el hongo.

Test fase líquida. El aceite esencial es incorporado en el medio nutritivo y se favorece el contacto con el hongo.

Figura 4 - Test para evaluar el efecto fungicida de la fase volátil y de la fase líquida del aceite esencial.



A = Efecto fungicida. Las esporas no son viables (no germinan) luego de separarlas del contacto con el aceite esencial.

B = Efecto fungistático. Las esporas son viables y germinan luego de separarlas del contacto con el aceite esencial.

Figura 5 - Método para determinar el efecto fungicida o fungistático de un aceite esencial.



Figura 6 - Cromatografía en capa fina para identificación de compuestos antifúngicos en aceites esenciales.



Figura 7 - Vista general de un ensayo para evaluar un recubrimiento para fruta cítrica que incorpora un aceite esencial con efecto fungicida. Se observa la fruta con el recubrimiento aplicado y previo al secado.

conoce el efecto antiesporulante, la concentración mínima necesaria que inhibe el crecimiento del hongo, si tienen efecto fungicida o fungistático, y si existe uno o más compuestos antifúngicos en el aceite esencial. El desafío actual es avanzar en el conocimiento necesario para poder desarrollar en un futuro mediano un producto comercial. Para ello se están evaluando alternativas que levanten las limitantes (alteración de aromas y sabor de la fruta) mediante el uso del aceite esencial en formulaciones nanoencapsuladas. A la vez, es necesario buscar formas de aplicación que sean efectivas y hagan uso de una mínima cantidad de aceite esencial. Para ello, se está evaluando la incorporación del aceite esencial en recubrimientos producidos con sustancias inocuas para la salud del consumidor (Figuras 7 y 8).

REFERENCIAS

Al-Samarrai, G.; H. Singh, M.Syarhabil. Evaluating eco-friendly botanicals (natural plant extracts) as alternatives to synthetic fungicides. *Ann. Agr.Env.Med.* 2012, 19, 673-676.

Antunes, M.D.; A.M. Cavaco. The use of essential oils for postharvest decay control. A review. 2010. *Flavour and Fragrance Journal.* 25:351-366

Holm, S.; Freiesleben, A.K Jäger. Correlation between plant secondary metabolites and their antifungal mechanisms-a review. *Med. Aromat.Plants* 2014, 3, 154.

Rai M.; M.C. Carpinella (Eds.) Naturally occurring bioactive compounds. *Advances in phytomedicine.* 2006. Elsevier.

Rouseff, R.L.; P. Ruiz Perez-Cacho, F.Jabalpurwala. Historical review of citrus flavor research during the past 100 years. *J. Agric. FoodChem.* 2009, 57, 8115-8124.

Dugo, G.; A. Di Giacomo (Eds.) *Citrus. The Genus Citrus.* Taylor & Francis, London, 2002.

Tasleem, A.; T.K. Mandal, R.Dabur. Natural products: Anti-fungal agents derived from plants. In: *Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry.* V.K Tiwary, B.B. Mishra (Eds.), ResearchSignpost, Kerala, India, 2011, 283-311.

Tripathi, P.; N.K. Dubey. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. 2003. *Postharvest, Biology and Technology* 32:235-245.

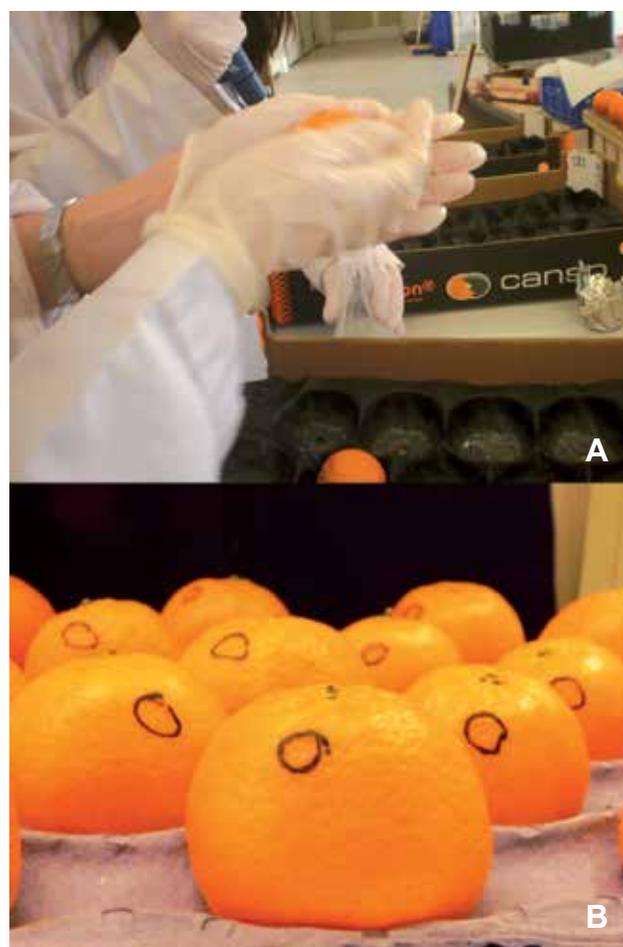


Figura 8 - A: Aplicación en forma experimental de un recubrimiento para fruta cítrica. B: Aspecto de una fruta cítrica luego de aplicado el recubrimiento y posterior al secado