

## Actividad Antifúngica *in vitro* de Extractos Acuosa de Especies contra *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum*, *Trichoderma* spp., *Penicillium digitatum* y *Aspergillus niger*

### Antifungal Activity *in vitro* of the Aqueous Extracts of Spice's Against *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum*, *Trichoderma* spp., *Penicillium digitatum* and *Aspergillus niger*

Isaura Cáceres Rueda de León, Rafael Colorado Vargas, Erika Salas Muñoz, Laila N. Muñoz Castellanos, León Hernández Ochoa, Facultad de Ciencias Químicas Universidad Autónoma de Chihuahua, Campus Universitario # 2, Chihuahua, Chihuahua, Apartado Postal 669, CP 31125, México. Correspondencia: lhernandez@uach.mx

(Recibido: Junio 21, 2013 Aceptado: Marzo 12, 2014)

---

Cáceres Rueda de León I, Colorado Vargas R, Salas Muñoz E, Muñoz Castellanos LN y Hernández Ochoa L. 2013. Actividad antifúngica *in vitro* de extractos acuosa de especias contra *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum*, *Trichoderma* spp., *Penicillium digitatum* and *Aspergillus niger*. Revista Mexicana de Fitopatología 31 (2): 105-112.

**Resumen.** En el presente trabajo se evaluó la actividad antifúngica *in vitro* de extractos acuosa de especias de clavo (*Eugenia caryophyllata*) canela (*Cinnamomum zeylanicum*); y orégano mexicano (*Lippia berlandieri*) obtenidos mediante la técnica de hidrodestilación, contra seis de los principales hongos patógenos que atacan a los alimentos (*Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum*, *Trichoderma* spp., *Penicillium digitatum* y *Aspergillus niger*). La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó utilizando la técnica de inhibición del crecimiento micelial y los componentes principales de los extractos acuosa obtenidos se evaluaron por HPLC. Los resultados obtenidos mostraron que el extracto acuosa de orégano presentó la mejor capacidad de inhibición de crecimiento radial del micelio con una concentración de 40 mg/L. Los principales constituyentes identificados en los extractos acuosa de las especies estudiadas fueron ácidos fenólicos, flavonoides, y compuestos volátiles (Eugenol, Timol y Carvacrol).

Palabras clave adicionales: Extractos acuosa, actividad antifúngica, hongos patógenos, clavo (*Eugenia caryophyllata*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*).

El tema de seguridad de alimentos con relación a la contaminación microbiana, la cual proviene, principalmente de hongos y bacterias, representa un reto en la actualidad

**Abstract.** In the present study the antifungal activity *in vitro* of the aqueous extracts of clove (*Eugenia caryophyllata*) cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*); and Mexican oregano (*Lippia berlandieri*) obtained by hydrodistillation process were evaluated, against six major pathogenic fungi that cause diseases in food (*Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum*, *Trichoderma* spp., *Penicillium digitatum* y *Aspergillus niger*). The minimum inhibitory concentration (MIC) was determinate by inhibition of mycelia growth and the principal compounds contained in the aqueous extracts were analyzed by HPLC. The results showed that the aqueous extracts of Mexican oregano showed major inhibition of mycelia growth with a 40mg/L. The principal constituents identified in the spice extracts were phenolic acids, flavonoids, and volatile compounds (Eugenol, Thymol and Carvacrol).

Additional keywords: Aqueous extracts, antifungal activity, pathogenic fungi, clove (*Eugenia caryophyllata*), cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*).

Currently, food safety in relation to microbial contamination (which comes mainly from fungi and bacteria) is a big challenge because of the high consumer demand for replacing chemical preservatives as some of them have shown to have carcinogenic effects on health; one possible solution to this problem are the natural products (Falerio *et al.*, 2005; Nutch *et al.*, 2006). It has been shown that a wide variety of plants contain natural compounds, which have antioxidant, anti-cancer and anti-microbial activity, among others (Shan *et al.*, 2005; Wojdylo *et al.*, 2007). These compounds are known as antimicrobial agents and may be intentionally added to the food or packaging, because they delay growth or kill microorganisms, thus increasing the resistance of adulteration or food safety (Davidson and

debido a la alta demanda de los consumidores para la sustitución de conservadores químicos debido a que algunos de ellos han demostrado tener efectos cancerígenos en la salud; una solución a esta problemática son los productos naturales (Falerio *et al.*, 2005; Nutchá *et al.*, 2006). Se ha demostrado que una gran variedad de plantas contienen compuestos naturales, los cuales presentan actividad antioxidante, anti cancerígena, así como antimicrobiana, entre otras (Shan *et al.*, 2005; Wojdylo *et al.*, 2007); Estos compuestos son llamados agentes antimicrobianos y pueden ser añadidos intencionalmente al alimento o a empaques, debido a que retardan el crecimiento o causan la muerte de los microorganismos aumentando así, la resistencia de la alteración de calidad o seguridad de un alimento (Davidson y Zivanovic, 2003); en estado natural, estos compuestos pueden desempeñar el papel de conservadores de alimentos de una manera natural y sin comprometer la salud de los consumidores (Beuchat, 2001); esto, debido a que varios de los agentes antimicrobianos han demostrado tener actividad biológica, la cual puede provenir de sus diversos componentes fenólicos presentes (Zhen-Dan *et al.*, 2005; Shan *et al.*, 2005; Cha y Chinnan, 2004). Para extraer dichos compuestos también es necesario el desarrollo de técnicas que permitan la obtención de éstos, como es el caso de la hidrodestilación (Hernández-Ochoa *et al.*, 2012) proceso por el cual, se obtienen los aceites esenciales que han sido ampliamente estudiados por su actividad biológica (Lambert *et al.*, 2001). Los aceites esenciales contienen hasta un 3 % de moléculas activas (Ortuño, 2006) sin embargo, su fuerte olor y sabor, en la mayoría de los casos, impide la aceptación de los consumidores. En el proceso de extracción de los aceites esenciales, existe una segunda fase, llamada extracto acuoso o agua floral, la cual, según recientes estudios, puede presentar actividad biológica contra diferentes tipos de bacterias, incrementando las expectativas para su utilización como conservador natural en alimentos, ya que algunos de los componentes activos contenidos en el aceite esencial pueden migrar hacia el extracto acuoso (Hernández-Ochoa *et al.*, 2012). Estudios de extractos acuosos de plantas, obtenidos por distintos métodos, ya se han utilizado recientemente para la producción de fungicidas alimentarios, incluyendo extractos de pino (*Pinus sylvestris*) abeto rojo (*Picea abies*), ajo (*Allium sativum*), albahaca, romero, laurel entre otros (Eslaminejad *et al.*, 2012; Özcan *et al.*, 2011). En el presente trabajo se investigó la actividad antifúngica y composición química de extractos acuosos de clavo, canela y orégano mexicano para la inhibición de seis de los principales hongos patógenos en alimentos: *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma* spp., *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum* y *Penicillium digitatum*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Materia vegetal.** Se utilizaron partes de tallo, hojas y flores de la planta de orégano mexicano (*Lippia berlandieri* Schauer) cultivada en la región de Chihuahua. Los frutos de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y clavo (*Eugenia caryophyllata*) fueron adquiridos en la empresa Comercial Cardona S.A. de la misma ciudad; todas las muestras fueron

Zivanovic, 2003); in natural state, these compounds may play the role of food preservatives in a natural way without compromising the consumers health (Beuchat, 2001); a number of antimicrobial agents have shown biological activity, which may come from their various phenolic components (Zhen-Dan *et al.*, 2005; Shan *et al.*, 2005; Cha y Chinnan, 2004). In order to extract these compounds it is necessary to develop extraction techniques, such as hydrodistillation (Hernández-Ochoa *et al.*, 2012), that is an essential oils extraction process which have been extensively studied because of their biological activity (Lambert *et al.*, 2001). Essential oils contain up to 3% of active molecules (Ortuño, 2006), however, its strong smell and taste, in most cases, avoids the consumer acceptance. During the extraction of essential oils process exists a second phase, called aqueous extract or floral water, which, according to recent studies, may have biological activity against different types of bacteria, increasing the expectations for its use as a natural preservative in food, because some of the active compounds contained in the essential oil can migrate to the aqueous extract (Hernández-Ochoa *et al.*, 2012). Studies of aqueous plant extracts obtained by different methods, have recently been used for the production of food fungicides, including pine extracts (*Pinus sylvestris*), Norway spruce (*Picea abies*), garlic (*Allium sativum*), basil, rosemary and laurel, among others (Eslaminejad *et al.*, 2012; Özcan *et al.*, 2011). In this study, the antifungal activity and chemical composition of aqueous extracts of clove, cinnamon and Mexican oregano were tested for the inhibition of six major pathogens present in food: *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma* spp., *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum* and *Penicillium digitatum*.

## MATERIALS AND METHODS

**Plan material.** Parts of the stem, leaves and flowers of Mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) cultivated in the region of Chihuahua were used. The cinnamon fruits (*Cinnamomum zeylanicum*) and clove (*Eugenia caryophyllata*) were obtained from Comercial Cardona S.A. Company in the same city; all samples were from the same batch and stored at room temperature (27±2 °C).

**Biological material.** Three of the strains used (*Fusarium oxysporum*, *Trichoderma* spp. and *Aspergillus niger*) were obtained from the culture collection of the Faculty of Chemistry. *Alternaria alternata* was isolated from saladette tomato (*Lycopersicon esculentum*) and pepper (*Capsicum annum* L.), both in decomposition process with remarkable cuticular damage; *Geotrichum candidum* was isolated from panela cheese and *Penicillium digitatum* was obtained from Capulin (*Ardisia compressa*); all strains were isolated according to Agrios (2005); once the cuticular damage was identified in the products, three deep triangular cuts were made with a scalpel of approximately 0.5 cm depth in external necrosis areas, then they were disinfested in a 2% sodium hypochlorite solution for 30 sec, then 3 washes with sterile water, and lastly, they were placed on sterile gauze to remove water excess. Samples were seeded in PDA (potato-dextrose agar Bioxon BD) agar and

provenientes del mismo lote y almacenadas a temperatura ambiente (27±2 °C).

**Material biológico.** Tres de las cepas utilizadas (*Fusarium oxysporum*, *Trichoderma* spp. y *Aspergillus niger*) fueron obtenidas del cepario de la Facultad de Ciencias Químicas. *Alternaria alternata* fue aislado de jitomate tipo saladette (*Lycopersicon esculentum*) y pimiento (*Capsicum annuum* L.) ambos en proceso de descomposición con daño cuticular notable; *Geotrichum candidum* se aisló de queso tipo panela y *Penicillium digitatum* se obtuvo del Capulín (*Ardisia compressa*); todas las cepas fueron aisladas de acuerdo a lo publicado por Agrios (2005); una vez identificado el daño cuticular en los productos se realizaron cortes profundos y triangulares con un bisturí de una profundidad de aproximadamente 0.5 cm en las zonas de necrosis externa, se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 2 % por 30 seg y después recibieron 3 lavados con agua esteril, finalmente se colocaron en gasas estériles para retirar el exceso de agua. Las muestras fueron sembradas en agar PDA (papa-dextrosa-agar BD Bioxon) y posteriormente identificadas morfológicamente de acuerdo al manual de Barnett y Hunter (1998).

**Hidrodestilación.** Las especias se sometieron individualmente al proceso de hidrodestilación utilizando un aparato modificado de extracción tipo Schilcher, con una relación de 1/10 (p/v) según lo publicado por Hernández-Ochoa *et al.*, 2012. La extracción tuvo una duración total de 5 h, y al final del proceso se recuperaron los extractos acuosos en frascos color ámbar para evitar la oxidación, las muestras fueron almacenadas en refrigeración a 4 °C.

**Determinación de la concentración.** Se realizó mediante una separación líquido-líquido (extracto/acetato de etilo) en un embudo, en una relación 1:2 (v/v). La fase orgánica de este proceso se llevó a un rotavapor y la determinación de la concentración se realizó mediante la diferencia de pesos del matraz con la ecuación 1:

$$ppm = \frac{mg}{L} \dots\dots\dots \text{Ecuación 1}$$

Donde ppm son las partes por millón.

**Determinación de la Composición Química mediante HPLC. El equipo utilizado fue un Sistema HPLC Dionex** (P680 Solvent Rack SOR-100) unido a una bomba doble para solventes y un detector UV; con columna C-18 Varian Polaris 5 (5 µm, 250 x 4.6 mm) con un flujo de 0.8 mL/min y un volumen de inyección de 20 µL siendo filtradas las muestras con filtros de 0.2 µ antes de ser inyectadas. La detección se llevó a cabo a 280 nm. Los compuestos fenólicos obtenidos de las 3 diferentes especias se analizaron mediante el método descrito por Shan *et al.* (2005), el cual consiste en un programa de gradientes entre dos diferentes soluciones: ácido fórmico al 2.5 % (solución A) y metanol 100 % (solución B). Estándares comerciales para la identificación fueron utilizados: ácidos fenólicos (ácido rosmarínico, ácido cinámico y ácido hidroxycinámico), cinamaldehído, acetil eugenol, alcohol cinámico, ácido p-coumarico, eugenol, quercetina, acetato

later morphologically identified according to the Barnett and Hunter (1998) manual.

**Hydrodistillation.** Spices were individually hydrodistilled using a modified Schilcher extraction apparatus, with a 1/10 (w/v) ratio as published by Hernández-Ochoa *et al.* (2012). Extraction lasted a total of 5 h, and the end of the process the aqueous extracts were recovered in amber vials to avoid oxidation, the samples were stored under refrigeration at 4 °C.

**Determination of concentration.** This calculation was done by liquid-liquid separation (extract/ethyl acetate) in a funnel, in a 1:2 ratio (v/v). The organic phase of this process was transferred to a rotary evaporator and the concentration estimation was done by the weight difference of the flask with equation 1:

$$ppm = \frac{mg}{L} \dots\dots\dots \text{Ecuación 1}$$

Where ppm are the parts per million.

**Determination of Chemical Composition by HPLC.** The equipment used was a Dionex HPLC system (P680 Solvent Rack SOR-100) with a double pump for solvent and a UV detector; C-18 column Varian Polaris 5 (5 µm, 250 x 4.6 mm) with a 0.8 mL/min flow rate and 20 µL injection volume filtered with 0.2 µ filters before injection. The detection was done at 280 nm. The phenol compounds obtained from the 3 different spices were analyzed by the method described by Shan *et al.* (2005), which consists of a gradient program of two different solutions: 2.5 % formic acid (solution A) and 100 % methanol (solution B). For the identification, commercial standards were used: phenolic acids (rosmarinic acid, cinnamic acid, and hydroxycinnamic acid), cinnamaldehyde, eugenol acetyl, cinnamic alcohol, p-coumaric acid, eugenol, quercetin, eugenol acetate, caryophyllene, gallic acid, catechin, epicatechin, thymol, carvacrol, vanillic acid, caffeic acid, p-cymene, chlorogenic acid, kaempferol and rosmarinic acid. All identification analyzes were performed in triplicate. A wide wave length was used to identify different types of polyphenols and all samples were stored at 4 °C.

**Biological activity of aqueous extracts.** CMI was determined according to the methodology described by Carrillo *et al.* (2003) in PDA cultures with ten different extract concentrations: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 and 1000 ppm. Each of the selected fungus were seeded, by using 4 mm diameter discoidal pieces made with a tunneler, taken from a seven days grown colony and placed in the center of the petri dishes with the treatments. The samples were incubated at 27 ± 2°C for seven days and for the recording of the growth, the colony was measured in two perpendicular diameters with a Vernier to calculate the average mycelial growth. Three replicates were done for each treatment and a control, with untreated inoculum for each of the aqueous extracts and concentration tested. Once values close to the minimum inhibitory concentration were determined, the number of tests was reduced and testing in 50 ppm intervals within the range of inhibition, were done. Analysis of variance was performed using the statistical

de eugenol, cariofileno, ácido gálico, catequina, epicatequina, timol, carvacrol, ácido vainillico, ácido cafeico,  $\rho$ -cimeno, ácido clorogénico, kaempferol y ácido rosmarínico. Todos los análisis de identificación se realizaron por triplicado. Se utilizó una de longitud onda amplia para identificar diferentes tipos de polifenoles y todas las muestras fueron almacenadas a 4 °C.

**Actividad biológica de extractos acuosos.** Se determinó la CMI de acuerdo a la metodología descrita por Carrillo *et al.*, (2003) en cultivos de PDA con diez diferentes concentraciones de extracto: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 ppm. Se sembró cada uno de los hongos seleccionados, utilizando trozos discoidales de 4 mm de diámetro hechos con un horador, tomados de una colonia de siete días de desarrollo y se colocaron en el centro de las cajas petri con los tratamientos. Las muestras se incubaron a 27±2 °C durante siete días y para el registro de su crecimiento se midió la colonia en dos diámetros perpendiculares con un Vernier para poder calcular el promedio del crecimiento del micelio. Se realizaron tres repeticiones por cada tratamiento, más un testigo, con inoculo sin tratamiento para cada uno de los extractos acuosos y concentraciones probadas. Una vez que se determinaron los valores cercanos a las concentraciones mínimas inhibitorias, se procedió a reducir el número de ensayos y realizar pruebas en intervalos de 50 ppm, dentro del rango de inhibición. Se realizó el análisis de varianza mediante el programa estadístico Minitab versión 15 y las pruebas se establecieron en relación a la comparación de medias de Tukey ( $p < 0.05$ ) con tres replicas por muestra.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Análisis fisicoquímicos.** Los resultados obtenidos para los análisis de pH de los extractos acuosos, mostraron que todos los extractos presentaron valores ácidos, siendo 5.3 ± 0.11 para el clavo, 5.5 ± 0.2 para canela y 6.2 ± 0.11 para orégano presentando diferencia significativa entre ellos ( $p < 0.05$ ). En el caso de la densidad, se obtuvieron valores muy similares a los del agua, con 0.9977 ± 0.0009 para el extracto acuoso de canela, 0.9977 ± 0.0015 para clavo y finalmente 0.9975 ± 0.0002 para orégano, sin significancia entre ellos ( $p > 0.05$ ), éste valor se debe a que los extractos presentan características muy parecidas a las del agua como ser un líquido no viscoso y polar. Las concentraciones finales, posterior a la eliminación del agua de los extractos acuosos obtenidos fueron de 1009.4 mg/L para la canela; 715.5 mg/L para el clavo y finalmente, el orégano con 500 mg/L. Concentraciones similares fueron reportadas por Seori *et al.*, (2011).

**Determinación de compuestos principales mediante HPLC.** Los principales compuestos fenólicos presentes en los extractos acuosos obtenidos fueron en su mayoría ácido gálico, flavonoides (catequina y kaempferol) y compuestos volátiles como eugenol, timol y carvacrol como se puede observar en la Figura 1, que muestra los cromatogramas obtenidos por HPLC para: A clavo (*Eugenia caryophyllata*), B orégano mexicano (*Lippia berlandieri*), C canela (*Cinnamomum zeylanicum*); detectados a 280 nm. Los resultados obtenidos muestran que, de la misma manera

software Minitab version 15 and the tests were established in relation to the Tukey means comparison ( $p < 0.05$ ) with three replicates per sample.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Physicochemical analysis.** The results obtained for pH analysis of aqueous extracts showed that all extracts were acid: 5.3 ± 0.11 for clove, 5.5 ± 0.2 for cinnamon and 6.2 ± 0.11 for oregano with significant differences between them ( $p < 0.05$ ). As for density, very similar to water values were obtained: 0.9977 ± 0.0015 for cinnamon aqueous extract, 0.9977 ± 0.0009 for clove and 0.9975 ± 0.0002 for oregano, without significance between them ( $p > 0.05$ ), this value is due to the extracts similar characteristics to water, like being a non-viscous and polar liquid. The final concentrations, after water removal from the obtained aqueous extracts, were: 1009.4 mg/ L for cinnamon; 715.5 mg/ L for clove and 500 mg/ L for oregano. Similar concentrations were reported by Seori *et al.*, (2011).

**Determination of main compounds by HPLC.** The major phenolic compounds present in the aqueous extracts obtained, were mainly gallic acid, flavonoids (catechin and kaempferol) and volatile compounds such as eugenol, thymol and carvacrol. Figure 1 shows the obtained HPLC chromatograms of: A clove (*Eugenia caryophyllata*), B Mexican oregano (*Lippia berlandieri*), C cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*); detected at 280 nm. Results obtained showed that, in the same way that in the essential oil (obtained from the hydrodistillation process, in which the aqueous extract is separated) analyzed by gas chromatography, the main compounds in the essential oils are the same that migrated to the aqueous phase, keeping their majority proportions, this may be due to the fact that hydrophilic extracts have proven to be one of the best solvents for molecules such as polyphenols (Suresh *et al.*, 2011). Figure 1A shows the determined chemical composition for the clove aqueous extract, where its main compound identified was eugenol. Also some flavanols, such as catechin and kaempferol, were identified, as well as some traces of chlorogenic acid and  $\rho$ -cymene. In the case of oregano aqueous extract, the results obtained showed that it tends to accumulate in its chemical composition higher concentrations of thymol than carvacrol, as shown in Figure 1B, these results are very similar to those reported by Rivero-Cruz *et al.*, (2011), in which they mention that thymol and carvacrol isomers, as well as  $\rho$ -cymene are the main constituents of the aqueous extract of the Mexican oregano *Polimintia longiflora* and *Lippia graveoles*. In the cinnamon aqueous extract (*Cinnamomum zeylanicum*) analyzed in this study (Figure 1C), it was determined the presence of cinnamaldehyde as the main component, and Kaempferol in lower proportion and traces of cinnamic alcohol, these results are similar to those obtained by Shan *et al.*, (2005).

**Biological activity of aqueous extracts.** Minimum inhibitory concentrations of the three extracts used against the six types of fungi studied, were determined. The results obtained are shown in Table 1, where it is possible to observe that the oregano aqueous extract, had the highest biological

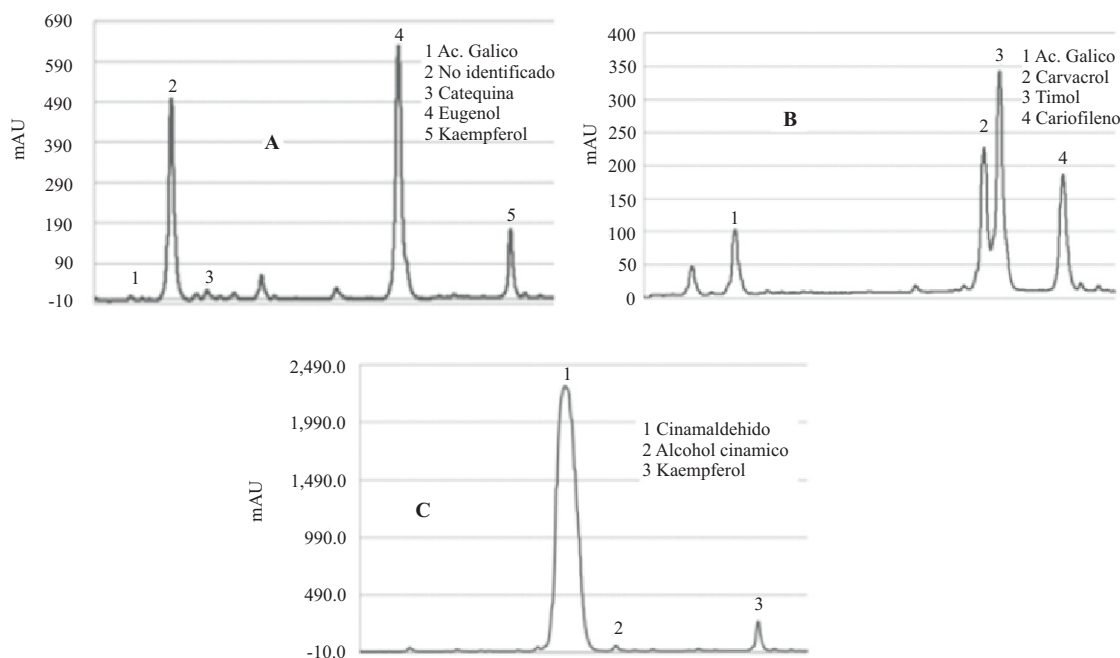


Figura 1. Comatogramas obtenidos de los extractos acuosos de **A:** clavo (*Eugenia caryophyllata*), **B:** orégano mexicano (*Lippia berlandieri*), **C:** canela (*Cinnamomum zeylanicum*); detectados a 280 nm por HPLC.

Figure 1. Chromatograms obtained from the aqueous extracts of **A:** clove (*Eugenia caryophyllata*), **B:** Mexican oregano (*Lippia berlandieri*), **C:** cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*); detected at 280 nm by HPLC.

que en el aceite esencial (obtenido en el proceso de hidrodestilación por el cual se separa el extracto acuoso) analizado mediante técnicas de cromatografía de gases, los compuestos mayoritarios en los aceites esenciales son los mismos que lograron migrar hacia la fase acuosa, manteniendo sus proporciones mayoritarias, esto se puede deber a que los extractos hidrofílicos han demostrado ser uno de los mejores solventes para moléculas como los polifenoles (Suresh *et al.*, 2011). La figura 1A, muestra la composición química determinada para el extracto acuoso de clavo, donde su principal compuesto identificado fue eugenol. También se identificaron algunos flavonoles como la catequina y kaempferol, y se pudo mínimamente detectar trazas de ácido clorogénico así como  $\rho$ -cimeno. En el caso del extracto acuoso de orégano, los resultados obtenidos mostraron que tiende a acumular en su composición química concentraciones más altas de timol que de carvacrol, como lo muestra la figura 1B, estos resultados son muy similares a los obtenidos por Rivero-Cruz *et al.*, (2011) en los cuales mencionan que los isómeros timol y carvacrol, así como  $\rho$ -cimeno son los compuestos mayoritarios del extracto acuoso del orégano mexicano *Polimintia longiflora* y *Lippia graveoles*. En el extracto acuoso de canela (*Cinnamomun zeylanicum*) analizado en el presente estudio (Figura 1C) se determino la presencia de Cinamaldehido como compuesto mayoritario y en menor proporción de Kaempferol, así

activity against the studied fungi, as it demonstrated higher inhibition of fungi and it slowed the growth in virtually all cases. Oregano aqueous extract confirmed high biological fungistatic and fungicidal activity for the species *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus niger*, showing complete inhibition at 200 ppm, while for *A. alternata*, *G. candidum*, *Trichoderma* spp. and *Penicillium digitatum* from 250 ppm. It is important to mention that, literature related to the antifungal activity of aqueous extracts of this variety of oregano was not found, so, the results obtained were compared with those reported by Jasso de Rodríguez *et al.* (2011) on the biological activity of the essential oil and extracts from *Lippia graveonlens*, where it is reported that that oregano extracts were active against *R. stolonifer*, *C. gloeosporioides* and *P. digitatum* at concentrations of 500  $\mu\text{l L}^{-1}$ , 4000  $\mu\text{l L}^{-1}$  and 3000  $\mu\text{l L}^{-1}$  respectively. The clove aqueous extract showed biological activity at 800 ppm for all fungi under study. It has been shown that clove essential oil has *in vitro* antifungal activity, affecting species that often develop in foods such as *Paecilomyces*, *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Rhizomucor* spp. and also some *Aspergillus* species (Joseph and Sujatha, 2011) and that significantly inhibits growth of *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Fusarium oxysporum*, *F. chrysogenum* and *Penicillium* spp., from 500 ppm and 1000 ppm (Kritzing *et al.*, 2002). It is difficult to attribute the biological activity of natural and

como trazas de alcohol cinámico, estos resultados son similares a los obtenidos por Shan *et al.*, (2005).

**Actividad biológica de extractos acuosos.** Se determinaron las Concentraciones Mínimas Inhibitoria de los tres extractos acuosos utilizados contra los seis tipos de hongos de estudio, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1, en la cual se puede observar que el extracto acuoso de orégano presentó mayor actividad biológica contra los hongos en estudio, demostró tener mayor inhibición de los hongos y reducir la velocidad de crecimiento en casi todos los casos. El extracto acuoso de orégano confirma tener gran actividad biológica fungistática y fungicida tanto para la especie de *Fusarium oxysporum* como para *Aspergillus niger*, mostrando inhibición total a 200 ppm, mientras que para *A. alternata*, *G. candidum*, *Trichoderma* spp. y *Penicillium digitatum* a partir de 250 ppm. Es importante mencionar que, no se encontraron referencias bibliográficas de la actividad antifúngica de extractos acuosos de esta variedad de orégano, por lo que los resultados obtenidos fueron comparados con los referenciados por Jasso de Rodríguez *et al.* (2011) sobre la actividad biológica del aceite esencial y extractos obtenidos con solventes de *Lippia graveolens*, en los cuales se menciona que extractos de orégano fueron activos contra *R. stolonifer*, *C. gloeosporioides*, *P. digitatum* a concentraciones de 500  $\mu\text{l L}^{-1}$ , 4000  $\mu\text{l L}^{-1}$  y 3000  $\mu\text{l L}^{-1}$  respectivamente. El extracto acuoso de clavo presentó actividad biológica a 800ppm para todos los hongos en estudio. Se ha demostrado que el aceite esencial de clavo posee actividad antifúngica *in vitro*, afectando especies que se desarrollan frecuentemente en los alimentos tales como *Paecilomyces*, *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Rhizomucor* spp., inclusive algunas especies de *Aspergillus* (Joseph and Sujatha, 2011) y que inhibe perceptiblemente el crecimiento de *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Fusarium oxysporum*, *F. chrysogenum*, *Penicillium* spp., a partir de 500 ppm y 1000 ppm (Kritzinger *et al.*, 2002). Es difícil atribuir la actividad biológica de mezclas naturales y complejas como los aceites esenciales y extractos acuosos a un componente particular. Generalmente, los componentes principales se encuentran para reflejar absolutamente bien las características biofísicas y biológicas de los extractos (Bakkali *et al.*, 2008). Sin embargo, es razonable asumir que la actividad fúngica de este extracto se puede relacionar con la presencia de una alta concentración (75-100 %) de *Eugenol*. Los componentes con estructura fenólica como el eugenol son altamente activos contra microorganismos (Gupta *et al.*, 2008). Este compuesto fenólico puede desnaturalizar las proteínas y reaccionar con los fosfolípidos de la membrana celular que cambian su permeabilidad (Bhuiyan *et al.*, 2010), lo cual se explica por la naturaleza ácida del grupo hidroxilo, que forma un puente de hidrógeno con un centro enzimático activo. Generalmente, los componentes principales parecen reflejar absolutamente bien las características biofísicas y biológicas de los aceites esenciales y extractos de los cuales fueron aislados, la amplitud de sus efectos que están dependientes de su concentración cuando fueron probados los aceites y extractos provenientes de una especie, efecto que disminuye

Cuadro 1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de extractos acuosos de especias contra hongos fitopatógenos. Table 1. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of aqueous spice extracts against pathogenic fungi.

	Extractos Acuosos		
	Clavo	Canela	Orégano
<i>Fusarium oxysporum</i>	800	500	200
<i>Alternaria alternata</i>	750	500	250
<i>Geotrichum candidum</i>	750	500	200
<i>Trichoderma</i> spp.	750	500	250
<i>Penicillium digitatum</i>	750	500	200
<i>Aspergillus niger</i>	750	500	200

\*Concentración expresada en ppm, los ensayos se realizaron por triplicado

and complex mixtures, such as essential oils and aqueous extracts, to a particular component. Generally, the main components reflect quite well the biophysical and biological properties of the extracts (Bakkali *et al.*, 2008). However, it is reasonable to assume that the fungal activity of this extract may be related to the presence of Eugenol high concentration (75-100 %). Phenolic structure components such as eugenol are highly active against microorganisms (Gupta *et al.*, 2008). This phenolic compound can denature proteins and it reacts with phospholipids of the cell membrane that change their permeability (Bhuiyan *et al.*, 2010), which is explained by the acidic nature of the hydroxyl group, which forms a hydrogen bond with an enzymatic active center. Generally, the main components seem to reflect quite well the biophysical and biological characteristics of the essential oils and extracts from which they were isolated, the extent of their effects depend on their concentration, and their effect decreases when combining plants. Thus, the synergistic functions of several molecules contained in an essential oil or extract, with respect to the action of one or two main components, seems questionable. However, it is possible that the activity of the major components is modulated by other molecules of less importance (Bakalli *et al.*, 2008). The antifungal activity of the Cinnamon extract (*Cinnamomum zeylanicum*) was determined at concentrations of 500 ppm for all fungi used in the study; these results agree with those obtained by Singh *et al.*, (2007) where they determined the biological activity of the essential oil and oleoresins of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) showing the complete mycelial inhibition against *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium citrium* and *Penicillium viridicatum* at 6  $\mu\text{L}$ . It is important to mention that a specific mechanism of action about how the extracts and essential oils work, is not known; however, a possible explanation is the effect of permeability, because each cell is surrounded by a layer known as permeable membrane, and through this semipermeable membrane each cell can exclude chemicals or let them in, as applicable. This means that, some fungicides are excluded or partially excluded by the semipermeable membrane and others can

al realizar la combinación de plantas. Así, funciones sinérgicas de varias de las moléculas contenidas en un aceite esencial o en extractos, con respecto a la acción de uno o dos componentes principales, parece cuestionable. Sin embargo, es posible que la actividad de los componentes principales, está modulada por otras moléculas de menor importancia (Bakalli *et al.*, 2008). La actividad antifúngica del extracto acoso de Canela (*Cinnamomun zeylanicum*) se pudo determinar a concentraciones de 500 ppm para todos los hongos utilizados en el estudio, estos resultados concuerdan con los obtenidos por Singh *et al.*, (2007) los cuales determinaron la actividad biológica del aceite esencial y oleorresinas de canela (*Cinnamomun zeylanicum*) demostrando la completa inhibición micelial contra *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium citrium* y *Penicillium viridicatum* a 6 µL. Es importante mencionar que no se conoce un mecanismo específico de acción acerca de cómo funcionan los extractos y aceites esenciales, sin embargo, una de las posibles explicaciones es el efecto de permeabilidad, debido a que cada célula está rodeada por una capa llamada membrana permeable, gracias a esta membrana semipermeable cada célula puede excluir compuestos químicos o bien dejarlos entrar, según sea el caso. Esto significa que, algunos fungicidas quedarán excluidos o parcialmente excluidos por la membrana semipermeable y otros podrán pasar; la membrana ha de contener proteínas y grasas. Por lo que, el compuesto debe poseer grupos solubles en agua y grupos solubles en grasas. La mayor parte de la molécula soluble en agua (grupos polares) se disolverán en la fase exterior proteica de la membrana semipermeable. Luego el grupo soluble en grasas, no polar, se disolverá en la parte central de la membrana. Si el compuesto puede disolverse en ambas partes de esta membrana, tendremos un compuesto capaz de penetrar (Zulueta-Rodríguez *et al.*, 2007).

## CONCLUSIÓN

Diferentes tipos de hongos patógenos alimentarios (*F. oxysporum*, *A.alternata*, *G. candidum*, *Trichoderma* spp., *P. digitatum* y *A.niger*) fueron inhibidos *in vitro* por extractos acuosos de especias obtenidos por hidrodestilación. El extracto acuoso de orégano presentó la mejor capacidad de inhibición de crecimiento radial del micelio con una concentración de 40 mg/L. La actividad biológica se pudo atribuir a los diferentes compuestos fenólicos encontrados en el análisis de la composición química. Los principales constituyentes identificados en los extractos acuosos de las especies estudiadas fueron ácidos fenólicos, flavonoides, y compuestos volátiles (Eugenol, Timol y Carvacrol).

## LITERATURA CITADA

- Agrios GN. 2005. Plant pathology. Fifth Edition. Academic Press. New York, USA. 922p.
- Bakalli F, Averbek S, Averbek D, and Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils-A review. Food and Chemical Toxicology 46:464-475.
- Barnett HL, and Hunter BB. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota. USA. 218p.
- Beuchat LR. 2001. Control of foodborne pathogens and spoilage microorganisms by naturally occurring antimicrobials. CRC Press. London, U.K. 149-169p
- Bhuiyan N, Begum J, Nandi N, Akter F. 2010. Constituents of the essential oil from leaves and buds of clove (*Syzygium caryophyllatum*). African Journal of Plant Science 4: 451-454.
- Carrillo JA, Montoya TJ, García RS, Cruz JE, Márquez I, Sañudo A. 2003. Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici Snyder y Hansen en Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el Valle de Culiacán, Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología 21:123-127.
- Cha D, Chinnan M. 2004. Biopolymer-Based antimicrobial packaging. Food Science and Nutrition 44: 223-237.
- Davidson PM, Zivanovic S. 2003. The use of natural antimicrobials. En: Food Preservation Techniques (P. Zeuthen y L. Bogh-Sorensen, eds.). Washington, DC, USA. 20-41p
- Eslaminejad P, Maziah Z, Eslaminejad T. 2012. Anti-fungal activity of cold and hot water extracts of spices against fungal pathogens of Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) *in vitro*. Microbial Pathogenesis 52:125-129.
- Faleiro L, Graca M, Gomes S, Costa L, Venâncio F, Teixeira A, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG. 2005. Antibacterial and Antioxidant Activities of Essential Oils Isolated from *Thymbra capitata* L. (Cav.) and *Origanum vulgare* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53:8162-8168.
- Gupta Ch, Garg AP, Uniyal RC, Kumari A. 2008. Comparative analysis of the antimicrobial activity of cinnamon oil and cinnamon extract on some food-borne microbes. African Journal of Microbiology Research

- 2:247-251.
- Hernández-Ochoa L, Macías-Castañeda CA, Nevárez-Moorillón GV, Salas-Muñoz E, Sandoval-Salas F. 2012. Antimicrobial activity of chitosan-based films including spices essential oils and functional extracts. *Journal of food* 10:85-91.
- Jasso de Rodriguez D, Rodriguez-Garcia R, Hernández-Castillo FD, Aguilar-Gonzalez CN, Saenz-Galindo A, Villarreal-Quintanilla, Moreno-Zuccolotto LE. 2011. In vitro antifungal activity of extracts of Mexican Chihuahua desert plants against postharvest fruit fungi. *Industrial Corps and Products* 34:960-966.
- Joseph B, Sujatha S. 2011. Bioactive compounds and its autochthonous microbial activities of extract and clove oil (*Syzygium aromaticum*) on some food borne pathogens. *Asian Journal of Biological Sciences* 4:35-43.
- Kritzinger Q, Aveling T, Marasas W. 2002. Effect of essential plant oils on storage fungi, germination and emergence of cowpea seeds. *Journal of Seed Science and Technology* 30:609-619.
- Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJE. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology* 91:453-462.
- Nutch S, Anuvat J, Vanee Ch, Panuwat S. 2011. Antimicrobial activity of cinnamon, clove and galangal essential oils and their principal constituents, and possible application in active packaging. *Presentacion the Proceedings of 15<sup>th</sup> IAPRI World Conference on Packaging*. 2-5 October, Tokyo, Japan.
- Ortuño MF. 2006. Métodos de obtención de aceites esenciales. En: *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes*. Aiyana Ediciones. Murcia, España. 20-62p
- Özcan MM, Fahad Y, AL Juhaimi. 2011. Antioxidant and antifungal activity of some aromatic plant extracts. *Journal of Medicinal Plants Research* 5:1361-1366.
- Rivero-Cruz I, Duarte G, Navarrete A, Bye R, Linares E, Mata R. 2011. Chemical Composition and Antimicrobial and Spasmolytic Properties of *Poliomintha longiflora* and *Lippia graveolens* Essential Oils. *Journal of Food Science* 76:309-317.
- Seori J, Kyung-Hyun Ch. 2011. Water extract of cinnamon and clove exhibits potent inhibition of protein glycation and anti-atherosclerotic activity in vitro and in vivo hypolipidemic activity in zebrafish. *Food and chemical toxicology* 49:1521-1529.
- Shan B, Yizhong Z, Sun M, Corke H. 2005. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:7749-7759.
- Singh G, Maurya S, De Lampasona MP, Catalan C. 2007. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food and Chemical Toxicology* 45:1650-1661.
- Suresh KD, Parmita J, Shyam NJ, Rishi B, Viswas KN. 2013. Antibacterial activity of aqueous extract of pomegranate peel against *Pseudomonas stutzeri* isolated from poultry meat. *Journal Food Science Technology* 50:555-560.
- Wojdyło A, Oszmianski J, Czemerys R. 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry* 105: 940-949.
- Zhen-Dan H, Chun-Feng Q, Quan-Bin H, Chuen-Lung Ch, Hong-Xi Xu, Ren-Wang J, Paul Pui-Hay B, Pang-Chui SH. 2005. Authentication and Quantitative Analysis on the Chemical Profile of Cassia Bark (*Cortex Cinnamomi*) by High-Pressure Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:2424-2428.
- Zulueta-Rodríguez R, Trejo-Aguilar D, Trigos-Landa A. 2007. Maravillosos mundo de los hongos. Editorial Universidad Veracruzana, Xalapa Veracruz, México. 91-102 p.