

Chemical characterization, compositional variability and mathematical modelling of the effect of essential oils in *Alternaria alternata*

Caracterización química, variabilidad composicional y modelamiento matemático del efecto de aceites esenciales en *Alternaria alternata*

Jaime Black-Solis, Rosa Isela Ventura-Aguilar, Laura L. Barrera-Necha, Silvia Bautista-Baños*, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, Carretera Yautepec-Jojutla, Km. 6, calle Ceprobi No. 8, CP 62731, Yautepec, Morelos, México. *Autor para correspondencia: sbautis@ipn.mx.

Recibido: 11 de diciembre, 2016.

Aceptado: 14 de febrero, 2017.

Black-Solis J, Ventura-Aguilar RI, Barrera-Necha LL, Bautista-Baños S. 2017. Chemical characterization, compositional variability and mathematical modelling of the effect of essential oils in *Alternaria alternata*. Revista Mexicana de Fitopatología 35: 204-226.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1612-5

Primera publicación DOI: 25 de marzo, 2017.

First DOI publication: March 25, 2017.

Resumen. Se desarrollaron modelos matemáticos del crecimiento y germinación *in vitro* de *Alternaria alternata* en presencia de aceites esenciales. Mediante el análisis de componentes principales, se encontraron similitudes entre ellos considerando su composición volátil. El crecimiento micelial y germinación de conidios de *A. alternata* se evaluó en PDA con aceites de canela, epazote y limón (0.25, 0.5, 1.0 $\mu\text{L mL}^{-1}$). Los aceites se obtuvieron por hidrodestilación y comercialmente. Se caracterizaron por cromatografía de gases acoplada a

Abstract. Mathematical models of *in vitro* growth and germination of *Alternaria alternata* in the presence of essential oils were developed. By using principal component analysis, similarities were found among the oils in terms of their volatile composition. The mycelial growth and conidial germination of *A. alternata* was evaluated in PDA with cinnamon, epazote and lime oils (0.25, 0.5 and 1.0 $\mu\text{L mL}^{-1}$). The oils used were obtained by hydrodistillation and commercially and were characterized by gas chromatography-mass spectrometry. The Baranyi and Roberts and logistics equations were used to fit the experimental data and to predict its behavior. Due to their chemical composition, the oils were grouped into: 1) cinnamon (commercial and non-commercial), in which cis-cinnamaldehyde predominated, 2) commercial lime (D-limonene) and epazote (commercial and non-commercial) with ascaridole and p-cimene, and 3) non-commercial lime. Cinnamon oil (0.5 and 1.0 $\mu\text{L mL}^{-1}$) inhibited mycelial growth of *A. alternata*, whereas

espectrometría de masas. Para ajustar los datos experimentales y predecir su comportamiento se emplearon las ecuaciones de Baranyi y Roberts y logística. Por su composición química los aceites se agruparon en: 1) canela (comercial y no-comercial), en el que predominó el cis-Cinamaldehído, 2) limón comercial (D-Limoneno), y epazote (comercial y no-comercial), con Ascaridol y ρ -Cimeno y 3) limón no-comercial. El aceite de canela (0.5 y $1.0 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$) inhibió el crecimiento micelial de *A. alternata*, mientras que, la germinación se inhibió 100% con la presencia de aceites de limón y epazote (0.25 y $0.5 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$). Los modelos matemáticos y el análisis de componente principales, son herramientas eficaces para entender el efecto de los aceites esenciales en *A. alternata*.

Palabras clave: desarrollo fúngico, Baranyi y Roberts, limón, epazote, canela

INTRODUCCIÓN

Los hongos del género *Alternaria* pueden causar enfermedades en numerosos productos hortofrutícolas, las cuales pueden presentarse durante el desarrollo del cultivo o en la postcosecha y causar la destrucción generalizada del cultivo y pérdidas en la producción (Mamgain *et al.*, 2013).

Durante la postcosecha, *Alternaria* tiene la capacidad de mantener una infección quiescente y manifestarse cuando se presentan las condiciones adecuadas, principalmente durante la maduración. En esta etapa, la principal especie que se ha identificado es *A. alternata* que causa la enfermedad del moho negro en solanáceas, principalmente (Troncoso-Rojas y Tiznado-Hernández, 2014).

Para el control de las enfermedades en frutos y hortalizas, se utilizan tradicionalmente fungicidas sintéticos, los cuales por un mal manejo y presencia

germinación was 100% inhibited with the presence of lime and epazote oils (0.25 and $0.5 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$). Mathematical models and principal component analyses are effective tools for understanding the effect of essential oils on *A. alternata*.

Key words: fungal development, Baranyi and Roberts, lime, epazote, cinnamon

INTRODUCTION

Fungi of *Alternaria* genus are responsible for diseases in a large number of vegetable and fruit products which may appear during crop development or postharvest, and cause widespread destruction of crops and production losses (Mamgain *et al.*, 2013).

During postharvest, *Alternaria* is able to maintain a quiescent infection and grow under favorable conditions, mostly at the maturity stage of horticultural products. At this stage, the main species identified is *A. alternata*, which produces black mold in Solanaceae mainly (Troncoso-Rojas and Tiznado-Hernández, 2014).

Synthetic fungicides have been traditionally used to control diseases on fruit and vegetables, but due to inappropriate management and presence of residues, they have affected the human health and caused in fungal strains, resistant (McCarroll *et al.*, 2002). For these reasons, over the last decades, the use of natural products, such as essential oils, has been studied as an option to control phytopathogenic fungi (Sivakumar and Bautista-Baños, 2014).

Essential oils (AE) are volatile aromatic compounds that contain the characteristic fragrance of the plants from which they are extracted (Krisch *et al.*, 2011). In plants, they act as messengers, attract pollinators, and protect against herbivores and microorganisms that cause plant diseases

de residuos, originan afecciones a la salud humana y generan cepas de hongos resistentes (McCarroll *et al.*, 2002). Debido a esto, en las últimas décadas se ha estudiado el uso de productos naturales para el control de hongos fitopatógenos, entre los que se puede mencionar a los aceites esenciales (Sivakumar y Bautista-Baños, 2014).

Los aceites esenciales (AEs) son derivados volátiles de plantas, los cuales son responsables de su aroma (Krisch *et al.*, 2011). En la planta funcionan como mensajeros, atrayentes de polinizadores y para defensa contra herbívoros y microorganismos que producen enfermedades (Baser y Buchbauer, 2009). Esta característica les confiere sus propiedades para su posible aplicación en el control de hongos fitopatógenos.

El contenido de compuestos y la efectividad de los AEs en el control de hongos fitopatógenos dependen de diversos factores que incluyen entre otros, la parte de la planta que se utiliza para la obtención del aceite, concentración y condiciones ambientales (Schmidt, 2009; Sánchez-González *et al.*, 2011; Raut y Karuppaiyil, 2014).

En estudios previos, se ha reportado la eficacia y especificidad de distintos AEs sobre el control de hongos fitopatógenos. Por ejemplo, Badawy y Abdelgaleil (2014) y Dimić *et al.* (2014) indicaron que el aceite esencial de limón (*Citrus limon*) inhibió el desarrollo de *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus parasiticus* y *Penicillium chrysogenum*. Manganyi *et al.* (2015) y Lu *et al.* (2013) también reportaron la efectividad del aceite esencial de corteza de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) en el control del crecimiento micelial y la germinación de esporas de los hongos *Colletotrichum destructivum*, *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* y *F. oxysporum*, mientras que en relación al aceite esencial de epazote (*Dysphania ambrosioides*) se ha reportado también su efecto inhibitorio sobre *Phyllosticta citricarpa* (Lombardo *et*

(Baser and Buchbauer, 2009). These characteristics make them suitable for controlling fungal phytopathogenic.

EOs compounds content and their effectiveness to control phytopathogenic fungi depend on various factors, e. g., the part of the plant from which oil is extracted, concentration and environment conditions (Schmidt, 2009; Sánchez-González *et al.*, 2011; Raut and Karuppaiyil, 2014).

Results of effectiveness and specificity of different AE for controlling phytopathogenic fungi have been reported in earlier studies. For example, Badawy and Abdelgaleil (2014) and Dimić *et al.* (2014) reported that lime essential oil (*Citrus limon*) inhibited the development of *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus parasiticus* and *Penicillium chrysogenum*. Manganyi *et al.* (2015) and Lu *et al.* (2013) also reported the effectiveness of (*Cinnamomum zeylanicum*) cinnamon bark essential oil in controlling mycelial growth and spore germination of *Colletotrichum destructivum*, *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* and *F. oxysporum*; epazote essential oil has also been reported to have inhibitory effects on *Phyllosticta citricarpa* (Lombardo *et al.*, 2016), *F. oxysporum* (Jaramillo *et al.*, 2012), *A. flavus*, *A. niger* and *C. gloeosporioides* (Jardim *et al.*, 2010).

Essentials oils may contain over than 100 compounds (Dima and Dima, 2015), thus to analyze and compare them, it is necessary to use multivariate statistics, which would allow to describe and analyze multidimensional observations of information obtained from diverse variables in the same study unit (Di Rienzo *et al.*, 2008).

Using EOs for controlling phytopathogenic fungi created the need to use mathematical models to understand and predict their development over time. In the beginning, models were developed to predict bacteria growth (Baranyi and Roberts,

al., 2016), *F. oxysporum* (Jaramillo *et al.*, 2012), *A. flavus*, *A. niger* y *C. gloeosporioides* (Jardim *et al.*, 2010).

Un aceite esencial puede estar constituido por más de 100 compuestos (Dima y Dima, 2015) por lo que, para poder realizar análisis y comparaciones entre ellos es necesario emplear estadística multivariada, la que permitirá describir y analizar observaciones multidimensionales de información obtenida de diversas variables en una misma unidad de estudio (Di Rienzo *et al.*, 2008).

El uso de AEs para el control de hongos fitopatógenos ha generado la necesidad de contar con modelos matemáticos que permitan comprender y predecir el desarrollo de los mismos, a través del tiempo. En un principio, los modelos se desarrollaron para predecir el crecimiento de bacterias (Baranyi y Roberts, 1994). No obstante, debido a la importancia de los hongos, como vectores de contaminación de alimentos, se han adecuado los modelos existentes para evaluar su crecimiento (García *et al.*, 2009).

Dantigny *et al.* (2007), García *et al.* (2010) y Longhi *et al.* (2013) reportaron que existen tres tipos de modelos matemáticos que pueden aplicarse para el análisis de hongos. El primario, permite representar el crecimiento del hongo en el tiempo, dado un conjunto de factores restrictivos. El secundario, representar la influencia de factores restrictivos sobre los parámetros calculados en el modelo primario. El modelo terciario, es una combinación de modelos primario y secundario, y permite predecir la influencia de los factores restrictivos sobre el crecimiento del hongo. En este sentido Basak y Guha (2015) reportaron el uso de modelos matemáticos mediante el uso de datos experimentales del crecimiento micelial y germinación de esporas de *P. expansum*. Tremarin *et al.* (2015) ajustaron los datos de crecimiento de *Byssochlamys fulva* y *Neosartorya fischeri*, al modelo de Baranyi y

1994). However, due to the importance of fungi as food contamination vectors, the models have been adapted to evaluate their growth (García *et al.*, 2009).

Dantigny *et al.* (2007), García *et al.* (2010) and Longhi *et al.* (2013) reported three types of mathematical models that may be useful to analyze fungi. The first type represents fungal growth over time, given by a series of restrictive factors; the second type represents the influence of restrictive factors on the primary model; and the third type is a combination of the first and second model types, and allows to predict the influence of restrictive factors on fungal growth. Basak and Guha (2015) reported the use of mathematical models based on experimental data of *P. expansum* mycelial growth and spore germination. Tremarin *et al.* (2015) adjusted data of *Byssochlamys fulva* and *Neosartorya fischeri* growth to the model of Baranyi and Roberts. Similarly, García *et al.* (2009) modeled the impact of optimal/suboptimal environment conditions on *A. carbonarius* and *P. expansum* growth by using Baranyi's function.

The objectives of this study were: 1. characterize chemically three essential oils; 2. evaluate their effectiveness in controlling *in vitro* *A. alternata*; 3. determine the variability of EOs by analyzing their main components, and 4. model the inhibitory effect of EOs on *A. alternata* mycelial growth and conidial germination.

MATERIALS AND METHODS

Vegetal material and essential oil extraction

We used lime peel (*Citrus limon*), epazote above-ground plant parts (*Dysphania ambrosioides*) and cinnamon bark (*Cinnamomum zeylanicum*). Limes were collected in orchards in Yautepec Morelos,

Roberts. De la misma manera, García *et al.* (2009) modelaron el impacto de condiciones ambientales óptimas/subóptimas en el crecimiento de *A. carbonarius* y *P. expansum* con el uso de la función de Baranyi.

Los objetivos del estudio fueron: 1. caracterizar químicamente tres aceites esenciales, 2. evaluar su efectividad en el control *in vitro* de *A. alternata*, 3. determinar la variabilidad en la composición de los AEs mediante el análisis de componentes principales y 4. modelizar el efecto inhibitorio de los AEs sobre el crecimiento micelial y la germinación de conidios de *A. alternata*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y extracción de aceites esenciales

Como material vegetal se utilizó la cáscara de frutos de limón (*Citrus limon*), parte aérea de epazote (*Dysphania ambrosioides*) y corteza de canela (*Cinnamomum zeylanicum*). Los frutos de limón se recolectaron en huertos de Yautepec Morelos, México (18° 53' 09" Norte y 99° 03' 38" Oeste). Mientras que la parte aérea de epazote y la corteza de canela se adquirieron en la Central de Abasto en Cuautla Morelos, México (18° 48' 44" Norte y 98° 57' 21" Oeste). Las especies vegetales se identificaron en el Herbario de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (número de especímenes 34057-limón y 34058-epazote).

El material vegetal se utilizó para la obtención de AEs mediante el método de hidrodestilación (Díaz-Cedillo *et al.*, 2013). 1 kg del material vegetal se colocó en un destilador de cristal tipo italiano y se mantuvo en ebullición (97 °C) por 2 h. Los AEs que se obtuvieron, se almacenaron en frascos ámbar a 4 °C y el rendimiento se determinó por

México (18° 53' 09" north and 99° 03' 38" west). Epazote above-ground parts and cinnamon barks were purchased at the Central de Abasto (wholesale market) in Cuautla, Morelos, Mexico (18° 48' 44" north and 98° 57' 21" west). The vegetal species were identified at the Universidad Autónoma del Estado de Morelos Herbarium (number of specimens 34057-lime and 34058-epazote).

Vegetal material was used to obtain EOs by hydrodistillation (Díaz-Cedillo *et al.*, 2013). One kilogram of vegetal material was placed in an Italian-type distiller and kept on boiling (97 °C) for 2 h. The EOs obtained were stored in amber jars at 4 °C and then their yield was gravimetrically determined. Furthermore, lime EOs were purchased at the company Hersol (State of Mexico, Mexico), epazote AE at the company Aceites y Esencias (State of Mexico, Mexico) and cinnamon bark AE at the company dōTERRA (Mexico City, Mexico). According to the manufacturer's specifications, the EOs were 99 % pure industrial-grade.

Chemical characterization of essential oils using CG-EM

The commercial EOs and the ones obtained by hydrodistillation were diluted in chloroform in a 1:10 v/v. Then, 1 µL of the dissolution was injected in a gas chromatograph (GC) SCION 456-GC (Bruker Daltonics, Billerica, USA) adapted to an EVOQ mass triple quadrupole detector and a PAL-COMBI xt automatic sample injector (Bruker Daltonics, Inc.). The mass spectrometer (EM) was set to a 50 to 500 mass-charge⁻¹ range using the MS Workstation version 8.2 software (Bruker Daltonics, Inc.).

The GC-EM was equipped with a BR-1ms capillary column 30 m long, 0.25 mm internal diameter and 0.25 µm thick (Bruker Daltonics, Inc.). The injector and detector temperature was

gravimetría. Adicionalmente, se adquirieron AEs de limón a la empresa Hersol (Edo. México, México), el de epazote se obtuvo de la empresa Aceites y Esencias (Edo. México, México) y el de corteza de canela de la empresa dōTERRA (México DF, México). De acuerdo con las especificaciones del fabricante, los AEs fueron grado industrial con 99 % de pureza.

Caracterización química de los aceites esenciales por CG-EM

Los AEs comerciales y los que se obtuvieron por hidrodestilación, se disolvieron en cloroformo en una proporción 1:10 v/v. Posteriormente, 1 μL de la disolución se inyectó en un cromatógrafo de gases (CG) SCION 456-GC (Bruker Daltonics, Billerica, USA) acoplado a un detector de masas EVOQ triple cuadrupolo y con inyector automático PAL-COMBI xt (Bruker Daltonics, Inc.). El espectrómetro de masas (EM) se operó en un rango de 50 a 500 masa carga⁻¹ mediante el uso del software MS Workstation versión 8.2 (Bruker Daltonics, Inc.).

El CG-EM se equipó con una columna capilar BR-1ms FS de 30 m de longitud, 0.25 mm diámetro interno y 0.25 μm espesor (Bruker Daltonics, Inc.). Las temperaturas del inyector y del detector fueron 220 °C y 280 °C, respectivamente. El gas acarreador fue Helio (He) a un flujo de 1 mL min⁻¹. La temperatura inicial del horno fue de 55 °C durante 1 min, posteriormente, se aumentó a 155 °C con una velocidad de calentamiento de 20 °C min⁻¹ y se mantuvo por 2 min, posteriormente se aumentó a 255 °C, a una velocidad de calentamiento de 10 °C min⁻¹ con un tiempo total de análisis de 20.14 min por muestra.

Los compuestos que se detectaron se identificaron mediante la comparación de su tiempo de retención y espectro de masas con los datos procedentes de estándares contenidos en la biblioteca del

220 °C and 280 °C, respectively. Helium (He) was used as carrier gas at a 1 mL min⁻¹ flow rate. The initial oven temperature was 55 °C for 1 min and then increased to 155 °C at heat speed rate of 20 °C min⁻¹; this rate was maintained for 2 min and then increased to 255 °C at heat speed rate of 10 °C min⁻¹ and a total analysis period of 20.14 min per sample.

The detected compounds were identified by comparing their retention time and mass spectrum with data from standards included in NIST (National Institute of Standards and Technology, MD) team's library.

Fungus isolate and crop conditions

The *A. alternata* isolate was obtained from the fungi collection of the Laboratory of Tecnología Postcosecha de Productos Agrícolas (Ceprobi, Morelos, Mexico). The species that had already been morphologically and molecularly identified was grown in potato-dextrose-agar culture (PDA, Bioxon, Mexico) for 14 days at 28 °C.

Inhibition test of mycelial growth

The EOs inhibitory effect was determined using the agar-dilution method reported by Chen *et al.* (2014) which involves mixing essential oil concentrations (0.25, 0.5, 1.0 $\mu\text{L mL}^{-1}$) with 0.1 % (v/v) Tween 20 (Hycel, Mexico City, Mexico) in 150 mL of PDA medium. Then, Petri dishes 90 mm in diameter were filled with 25 ml of the mixture (6 replications per treatment) and left to cool at room temperature (25 \pm 2 °C). PDA and PDA-Tween were used as controls.

A PDA disk 100 mm in diameter containing *A. alternata* was grown in the center of a Petri dish and incubated at 28 \pm 2 °C. Mycelial growth was measured daily using a vernier caliper in order to evaluate the diameter reached by the mycelium

equipo, NIST (National Institute of Standards and Technology, MD, USA).

Actividad antifúngica

Cepa del hongo y condiciones de cultivo

La cepa de *A. alternata* se obtuvo de la colección de hongos del Laboratorio de Tecnología Postcosecha de Productos Agrícolas (Ceprobi, Morelos, México). La especie ya identificada morfológica y molecularmente se cultivó en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA, Bioxon, México) por 14 días a 28 °C.

Ensayo de inhibición del crecimiento micelial

El efecto inhibitorio de los AEs se determinó por el método de dilución en agar reportado por Chen *et al.* (2014) el cual consistió en mezclar las concentraciones (0.25, 0.5, 1.0 $\mu\text{L mL}^{-1}$) del aceite esencial con 0.1 % (v/v) de Tween 20 (Hycel, México DF, México) en 150 mL de medio PDA. Posteriormente, se vaciaron 25 mL de la mezcla en cajas Petri de 90 mm de diámetro (6 repeticiones por tratamiento) y se dejaron enfriar a temperatura ambiente (25±2 °C). Adicionalmente, se utilizaron los tratamientos de PDA y PDA-Tween, como controles.

Posteriormente, en el centro de la caja se sembró un disco PDA de *A. alternata* de 10 mm de diámetro. Las cajas se sellaron e incubaron a 28±2°C. El crecimiento micelial se midió diariamente evaluando el diámetro que alcanzó el micelio a través del tiempo con la ayuda de un vernier. El ensayo se detuvo cuando en el tratamiento control (sólo PDA), el micelio cubrió por completo la caja Petri. Los resultados se reportaron como índice de inhibición del crecimiento micelial (*IM*) de acuerdo a la ecuación (1), donde C_c representa el crecimiento en el control y C_T el crecimiento en el tratamiento.

over time. The test ended when the mycelium completely covered the Petri dish containing the control treatment. The results were reported as mycelial growth inhibition index (*IM*), according to the following equation (1), where C_c denotes the control's growth, and C_T the growth in the treatment.

$$IM = \left(\frac{C_c - C_T}{C_c} \right) \times 100 \quad (1)$$

Treatments reaching 100 % inhibition were re-grown in PDA culture but without adding essential oil to evaluate the fungistatic or fungicide effect of the EOs used.

Inhibition test for conidial germination

The effect of EOs on conidial germination was evaluated using the technique described by Bautista-Baños *et al.* (2008). A conidial solution (10^5 conidia mL^{-1}) of a 14-day old monosporic culture of *A. alternata* was prepared and added to six disks containing PDA (25 $\mu\text{L disk}^{-1}$) which then were placed on glass slides. Later, 10 μL of EOs were added to each disk (0.25, 0.5, 1.0 $\mu\text{L mL}^{-1}$) incubated at 28±2 °C within sealed Petri dishes. Germination was carried out after 2, 4, 6 and 8 h. A conidium was considered germinated when a germ tube was observed regardless of its length (Costa *et al.*, 2015).

After the incubation period, a drop of lactophenol blue solution was added to each disk and 100 conidia per disk were observed under an optical microscope 40x objective (Nikon alphaphot-2 YS2-H, Japan). The percentage germination was calculated ($G_{\%}$) using the following equation (2), where E_G denotes the number of germinated conidia, and T_E the total conidia.

$$IM - \left(\frac{C_c - C_T}{C_c} \right) \times 100 \quad (1)$$

Los tratamientos que presentaron inhibición del 100 % se sembraron en medio PDA sin la adición de aceite esencial para evaluar el efecto fungistático o fungicida de los AEs empleados.

Ensayo de inhibición de la germinación de conidios

El efecto de los AEs sobre la germinación de conidios se evaluó siguiendo la técnica descrita por Bautista-Baños *et al.* (2008). De un cultivo monospórico de *A. alternata* de 14 días de edad (10^5 conidios mL⁻¹) se obtuvo una solución de conidios que se agregó a seis discos de PDA (25 µL disco⁻¹), los cuales se colocaron en portaobjetos. Posteriormente, a cada disco se añadieron 10 µL de AEs (0.25, 0.5, 1.0 µL mL⁻¹) y se incubaron a 28±2 °C, dentro de cajas Petri selladas. La evaluación de la germinación se realizó a las 2, 4, 6 y 8 h. Se consideró que un conidio había germinado cuando se observó la presencia de su tubo germinativo, sin importar su longitud (Costa *et al.*, 2015)

Después del período de incubación, se colocó una gota de azul de lactofenol en cada disco y se evaluaron 100 conidios por disco en un microscopio óptico objetivo 40x (Nikon alphaphot-2 YS2-H, Japón). Se determinó el porcentaje de germinación ($G_{(%)}$) mediante la ecuación (2), donde E_G representa el número de conidios germinados y T_E el total de conidios.

$$G_{(%) = \left(\frac{E_G}{T_E} \right) \times 100 \quad (2)$$

$$G_{(%) = \left(\frac{E_G}{T_E} \right) \times 100 \quad (2)$$

Adjusting experimental data to mathematical models

Experimental data of *A. alternata* mycelial growth in PDA culture in terms of time, with and without EOs, were adjusted to the model of Baranyi and Roberts (1994) to estimate the maximum growth rate and apparent lag phase time using the following equation (3).

$$D_{(t)} = D_0 + \mu_{\max} \left[t + \left(\frac{1}{\mu_{\max}} \right) \cdot \ln \left\{ e^{(-\mu_{\max} t)} + e^{(-\mu_{\max} \lambda)} - e^{(-\mu_{\max} t - \mu_{\max} \lambda)} \right\} \right] \quad (3)$$

Where $D_{(t)}$ denotes the diameter of the mycelium (cm) at any time t (días); D_0 , the diameter at $t=0$, μ_{\max} (cm day⁻¹), the maximum growth rate; and λ (days), the apparent lag phase time.

The model was developed using DMFit version 3.5 (Microsoft Excel add-in) (Institute of Food Research, Norwich, UK). To evaluate the model, it was estimated the Mean Square Root Error (MSRE) and the determination coefficient (R^2). Models with MSRE values near to zero and R^2 near to one were considered to be the best (Tremarin *et al.*, 2015). Growth data (experimental and predicted by the model) were used to plot surface graphs using SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc., CA, USA).

The conidial percentage germination was adjusted to the logistic model (Equation 4) to

Ajuste de datos experimentales a modelos matemáticos

Los datos experimentales del crecimiento micelial de *A. alternata* en medio PDA con y sin AEs en función del tiempo se ajustaron al modelo de Baranyi y Roberts (1994) para estimar la tasa máxima de crecimiento y tiempo de fase lag aparente, con la ecuación (3).

$$D_{(t)} = D_0 + \mu_{\max} \left[t + \left(\frac{1}{\mu_{\max}} \right) \cdot \ln \left\{ e^{(-\mu_{\max} t)} + e^{(-\mu_{\max} \lambda)} - e^{(-\mu_{\max} t - \mu_{\max} \lambda)} \right\} \right] \quad (3)$$

Donde $D_{(t)}$ es el diámetro del micelio (cm) a cualquier tiempo t (días), D_0 es el diámetro a $t=0$, μ_{\max} (cm día⁻¹) es la tasa máxima de crecimiento y λ (días) es el tiempo de fase lag aparente.

El modelo se desarrolló con el software DMFit versión 3.5 (Microsoft Excel add-in) (Institute of Food Research, Norwich, UK). Para la evaluación del modelo se estimaron la raíz del cuadrado medio del error (RMSE) y el coeficiente de determinación (R^2), modelos con valores de RMSE cercanos a cero y R^2 cercano a uno se consideraron los mejores (Tremarin *et al.*, 2015). Con los datos del crecimiento (experimentales y predichos por el modelo) se elaboraron gráficos de superficie con el software SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc., CA, USA).

El porcentaje de germinación de conidios se ajustó al modelo logístico (Ecuación 4) para estimar los parámetros, tasa de incremento en el porcentaje de germinación y tiempo requerido para alcanzar el 50 % de germinación. Las unidades experimentales que contenían los AEs que no permitieron la germinación del hongo se omitieron en el análisis. Para esto se utilizó el paquete estadístico InfoStat

estimate the parameters, the increase in the percentage germination and the time required to reach 50 % germination. Experimental units containing EOs that not allowed fungal germination were omitted in the analysis. For this purpose, we used the statistical software InfoStat version 2016 (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

$$P = \frac{P_{\max}}{(1 + e^{k(r-t)})} \quad (4)$$

Where P denotes the germination percentage; P_{\max} , the maximum percentage germination (100 %); k (h⁻¹), the increase in the rate of percentage germination; r (h), the time required to reach 50 % germination; and t (h), the time (Dantigny *et al.*, 2007).

Statistical analysis

Data of the volatile compounds of the six different EOs identified through GC-EM were analyzed using principal component analysis (PCA) to obtain the variability of the studied systems with the software package InfoStat version 2016; mycelial growth and conidial germination at the end of the growth period were analyzed using a completely randomized design in a factorial arrangement with 6 replications. The factors used were 1) type of essential oil (lime, epazote and cinnamon); 2) source (hydrodistilled or commercial); and 3) concentration (0.25, 0.5 and 1.0 $\mu\text{L mL}^{-1}$). Tukey's test ($p \leq 0.05$) to compare the medians, and the InfoStat version 2016 software for data analysis was used. The experiment was performed in duplicate.

versión 2016 (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

$$P = \frac{P_{\max}}{(1 + e^{k(r-t)})} \quad (4)$$

Donde P es porcentaje de germinación, P_{\max} es el porcentaje máximo de germinación (100 %), k (h^{-1}) es la tasa de incremento en el porcentaje de germinación, r (h) es el tiempo requerido para alcanzar el 50 % de germinación y t (h) es el tiempo (Dantigny *et al.*, 2007).

Análisis estadístico

Los datos de los compuestos volátiles identificados por CG-EM de los seis diferentes AEs se sometieron a un análisis de componentes principales (ACP) con la finalidad de obtener la variabilidad de los sistemas estudiados empleando el paquete estadístico InfoStat versión 2016, mientras que, el crecimiento micelial y la germinación de conidios al final del período de crecimiento, se analizaron a través de un diseño completamente al azar con arreglo factorial con 6 repeticiones. Los factores fueron: 1) tipo de aceite esencial (limón, epazote y canela), 2) procedencia (hidrodestiado o comercial) y 3) concentración (0.25, 0.5 y 1.0 $\mu\text{L mL}^{-1}$). Se utilizó la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) para la comparación de medias y el software InfoStat versión 2016, para el análisis de datos. El experimento se realizó por duplicado.

RESULTADOS

Composición química de los aceites esenciales

Los resultados muestran que hubo diferencias en la composición de los AEs que se evaluaron,

RESULTS

Chemical composition of essential oils

Results show differences in the composition of the EOs evaluated regarding the vegetal material and the method used to extract them (by hydrodistillation or commercial). Cinnamon, lime and epazote EOs obtained by hydrodistillation yielded 0.49, 0.33 and 0.015 %, respectively.

Considering the type of vegetal material from which the EOs were extracted, it was observed that lime and epazote oils contained terpenes mainly (D-Limonene, ρ -Cymene and Ascaridole), while the predominant compounds in cinnamon oil were aldehydes (cis-Cinnamaldehyde) (Table 1). However, considering the method used, differences in the content of the detected compounds were noted.

As for D-Limonene, it was observed 7.26 % more content in the lime AE obtained by hydrodistillation compared with the commercial AE. In epazote AE, two main components were identified: ρ -Cymene in non-commercial oil (22.40 %) and Ascaridole in commercial oil (27.30 %). Finally, the content of cis-Cinnamaldehyde in commercial cinnamon oil was 4.20 % higher than that obtained by hydrodistillation; this compound was the highest in both EOs.

Principal component analysis (PCA)

For PCA, compounds representing an area greater than 1 % were used in the chromatographic analysis. According to Terrádez (2002) there is no definite rule regarding the number of principal components (PC) to be used, but it is important to keep in mind that one of the objectives of the analysis was to reduce the number of variables. In this regard, we selected the PCs that contributed at least 5 % of the total variance and whose proportion

en función del material vegetal y de su método de obtención (hidrodestilación o comercial). Los AEs que se obtuvieron por hidrodestilación tuvieron rendimientos de 0.49, 0.33 y 0.015 % para canela, limón y epazote, respectivamente.

Considerando el tipo de material vegetal del que provienen los Aes, se observó que los aceites de limón y epazote se constituyeron principalmente de terpenos como el D-Limoneno, ρ -Cimeno y Ascaridol, mientras que, en el aceite de canela predominaron aldehídos como el cis-Cinamaldehído (Cuadro 1). Sin embargo, al considerar el método de obtención, se apreciaron diferencias en el contenido de los compuestos que se detectaron.

En el caso del D-Limoneno, se observó un 7.26 % más de contenido en el aceite esencial de limón que se obtuvo por hidrodestilación en comparación con el comercial. Mientras que, en epazote se identificaron dos componentes principales, el ρ -Cimeno en el aceite no comercial (22.40 %) y el Ascaridol

of accumulated variance explained at least 70 % of the same (Mora-Aguilera and Campbell, 1997). The results were grouped in five PCs that explain 100 % of the variability in the chemical composition of the EOs used (Table 2). However, given that PC1 and PC2 explained 74.0 % of the variability, the results were described in PC1 and PC2 terms.

Figure 1A, shows the three groups formed considering the type of vegetal material. The first group corresponds to lime oil obtained by hydrodistillation; the second group, to cinnamon oils (commercial and non-commercial); and the third group, to lime (commercial) and epazote (commercial and non-commercial) oils. In PC1 we observed that essential cinnamon oil was different from epazote and lime oils. In PC2, differences were found among epazote (commercial and non-commercial) and lime (commercial) oils, and cinnamon (commercial and non-commercial) lime oils obtained by hydrodistillation.

Cuadro 1. Resumen de los principales compuestos orgánicos volátiles de tres aceites esenciales detectados por CG-EM.
Table 1. Summary of the main volatile organic compounds of three essential oils detected by CG-EM.

AE hidrodestilado	Compuesto	AR (%)	TR (min)	AE comercial	Compuesto	AR (%)	TR (min)	GF
Limón	D-Limoneno	32.44	5.10	Limón	D-Limoneno	25.18	5.10	T
	L- β -Pinenol	14.93	4.63		L- β -Pinenol	2.49	4.63	T
	γ -Terpineno	8.95	6.21		γ -Terpineno	5.49	6.21	T
	Citral	5.82	6.80					T
	Otros	37.86			Otros	66.84		
Epazote	ρ -Cimeno	22.40	4.98	Epazote	Ascaridol	27.29	6.65	T
	trans-Ascaridol glicol	10.07	6.92		trans-Ascaridol glicol	1.15	6.92	T
	Isoascaridol	6.33	7.24		Isoascaridol	19.40	7.24	T
	Otros	61.20			Otros	52.16		
Canela	cis-Cinamaldehído	42.20	6.85	Canela	cis-Cinamaldehído	46.40	6.85	A
	Ácido acético, cinamil ester	8.59	8.63		Ácido acético, cinamil ester	10.90	8.63	E
	Linalool	5.27	5.49		Linalool	2.80	5.49	T
	α -Felandreno	1.72	4.81					T
	Benzoato de Benzilo	1.13	12.42					E
	Otros	41.10			Otros	39.89		

AE-aceite esencial, AR-área relativa, TR-tiempo de retención, GF-grupo funcional, A-aldehído, E-éster, T-terpeno
AE-essential oil; AR-relative area; TR-retention time; GF-functional group; A-aldehyde, E-ester, T-terpene

en el comercial (27.30 %). Finalmente, el contenido de cis-Cinamaldehído fue superior en el aceite comercial de canela en un 4.20 % con respecto al que se obtuvo por hidrodestilación, siendo este el compuesto mayoritario en ambos AEs.

Análisis de componentes principales

Para el ACP se utilizaron los compuestos que representan un área superior al 1 % en el análisis cromatográfico. De acuerdo con Terrádez (2002) no hay una regla definida sobre el número de componentes principales (CP) que se deban utilizar, pero es importante considerar que uno de los objetivos de este análisis era reducir el número de variables. En este sentido, se seleccionaron los CP que aportaron al menos un 5 % de la varianza total y que la proporción de varianza acumulada explicara al menos el 70 % de la misma (Mora-Aguilera y Campbell, 1997). Los resultados se agruparon en cinco CP que explican el 100 % de la variabilidad en la composición química de los AEs utilizados (Cuadro 2), no obstante, debido a que los CP1 y CP2 explicaron el 74.0 % de la variabilidad, los resultados se describieron en términos de estos.

En la Figura 1A se puede apreciar la formación de tres grupos, considerando el tipo de material vegetal. En el primer grupo se encuentra el aceite de limón que se obtuvo por hidrodestilación, en el segundo grupo los aceites de canela (comercial y no comercial) y en el tercero los aceites de limón (comercial) y epazote (comercial y no comercial). En el CP1 se observó que el aceite esencial de canela fue diferente a los aceites de epazote y limón. Mientras que, con el CP2 se apreciaron diferencias entre los aceites de epazote (comercial y no comercial) y limón (comercial) y los aceites de canela (comercial y no comercial) y limón que se obtuvo por hidrodestilación.

Por otra parte, se encontraron valores significativos en el CP1 por la presencia de compuestos

Cuadro 2. Análisis de componentes principales (eigenvalores) entre los compuestos de tres diferentes aceites esenciales

Table 2. Principal Component Analysis (eigenvalues) among the compounds of three different essential oils.

Componentes principales	Eigenvalor	Varianza total (%)	Varianza acumulada (%)
1	5.53	42.6	42.6
2	4.08	31.4	74.0
3	1.98	15.2	89.2
4	1.02	7.9	97.1
5	0.39	2.9	100.0

On the other hand, significant values were observed in PC1 due to the presence of monoterpene compounds, while PC2 was positively correlated with aldehydes and esters (data not shown). This is clearly appreciated in Figure 1B with three groups formed: a) the first group included D-Limonene and L- β -Pinene, which correspond to lime oil composition; b) in the second group we observed aldehydes, esters and non-cyclic monoterpenes such as cis-Cinnamaldehyde, compounds that are present in cinnamon oil; and c) the third group, showed oxygenated monoterpenes as Ascaridole, compounds that are present in epazote oil.

Mycelial growth inhibition

Statistically significant differences were observed ($p < 0.0001$) in *A. alternata* *in vitro* mycelial growth (at day 9-time when the control treatment reached its maximum growth) by the effect of the essential oil type, source and concentration (Table 3). Results showed that *A. alternata* did not grow on the PDA medium to which cinnamon essential oil (commercial and non-commercial) was added at concentrations of 0.5 and 1.0 $\mu\text{L mL}^{-1}$, and which had a fungicidal effect on the fungus. In contrast, commercial lime essential oil at 0.25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ concentration

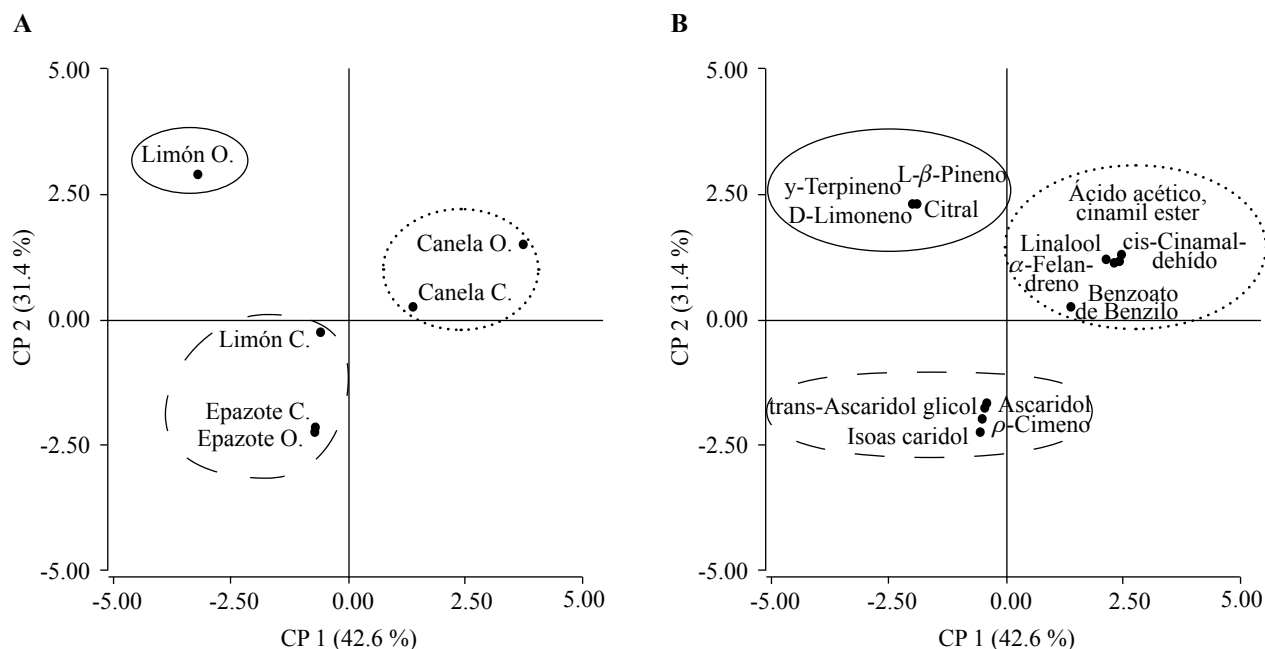


Figura 1. Distribución de los aceites esenciales (A) y compuestos que se identificaron (B) de acuerdo a los eigenectores del análisis de componente principal calculados para el CP1 y CP2 (74% varianza).
Figure 1. Distribution of essential oils (A) and compounds identified (B) according to eigenectors from principal component analysis calculated for PC1 and PC2 (74 % variance).

monoterpenicos. Mientras que, el CP2 correlaciona positivamente con aldehídos y ésteres (datos no mostrados). Esto se aprecia con claridad en la figura 1B con la formación de tres grupos, a) el primer grupo incluyó el D-Limoneno y L-β-Pineno, los cuales correspondieron a la composición del aceite de limón, b) en el segundo grupo estuvieron presentes aldehídos, ésteres y monoterpenos no ciclicos como el cis-Cinamaldehído, compuestos constituyentes del aceite de canela y c) el tercer grupo los monoterpenos oxigenados como el Ascaridol, compuestos presentes en el aceite de epazote.

Inhibición del crecimiento micelial

Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.0001$) en el crecimiento micelial *in vitro* de *A. alternata* (al día 9-tiempo en el que el tratamiento control alcanzó su máximo

did not inhibit *A. alternata* growth, while, at the same concentration, commercial lime and epazote oils showed limited inhibition (4.06 and 3.42 %, respectively). A similar effect was observed with commercial lime oil at a concentration of $0.5 \mu\text{L mL}^{-1}$ (3.18 % inhibition).

Inhibition of conidial germination

The percentage germination of *A. alternata* conidia to which EOs were directly applied showed statistically significant differences ($p < 0.0001$), as a result of the treatments, when they were evaluated after 8 h (data not shown). No germination was observed in treatments containing cinnamon essential oil ($0.25, 0.5$ and 1.0 mL^{-1}), non-commercial lime and epazote oils (0.5 and $1.0 \mu\text{L mL}^{-1}$) and commercial lime and epazote oils ($1.0 \mu\text{L mL}^{-1}$).

crecimiento) por efecto del tipo de aceite esencial, su procedencia y la concentración (Cuadro 3). Los resultados indicaron que *A. alternata* no creció en el medio PDA adicionado con aceite esencial de canela (comercial y no comercial) en concentraciones de 0.5 y 1.0 $\mu\text{L mL}^{-1}$, mismos que tuvieron un efecto fungicida sobre el hongo. Por el contrario, el aceite comercial de limón en concentración de 0.25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ no inhibió el crecimiento de *A. alternata*, mientras que a la misma concentración, los aceites no comerciales de limón y epazote presentaron una inhibición limitada (4.06 y 3.42 %, respectivamente). Efecto similar se observó con el aceite comercial de limón en concentración de 0.5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (3.18 % de inhibición).

Treatments showing the highest germination inhibition percentage were non-commercial lime (92.50 %) and epazote oils (93.33 %) at a concentration of 0.25 $\mu\text{L mL}^{-1}$, while at a concentration of 0.5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ it was the commercial lime and epazote oils (91.0 % and 94.17 %, respectively) that showed the highest percentage germination inhibition; this suggests that the results depend on the oil concentration used.

Mycelial growth model

Experimental data of *A. alternata* mycelial growth on PDA at different concentrations of EOs, in terms of time were adjusted to the model of

Cuadro 3. Crecimiento micelial y porcentaje de inhibición de *A. alternata* incubado por 9 días en medio PDA, adicionado con AEs.

Table 3. Mycelial growth and percentage inhibition of *A. alternata* incubated for 9 days in PDA medium to which AEs were added.

Aceite esencial	Procedencia	Dosis ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	CM \pm DE (cm)	Inhibición (%)
Control			8.50 \pm 0 g	0.0
Tween® 20			7.92 \pm 0.14 e f g	7.8
Limón	Hidrodestilado	0.25	8.20 \pm 0.34 f g	4.1
Limón	Hidrodestilado	0.50	7.49 \pm 0.17 e f	13.5
Limón	Hidrodestilado	1.00	6.15 \pm 0.17 d	31.4
Epazote	Hidrodestilado	0.25	8.25 \pm 0.20 f g	3.4
Epazote	Hidrodestilado	0.50	7.41 \pm 0.17 e f	14.6
Epazote	Hidrodestilado	1.00	7.17 \pm 0.22 e	17.7
Canela	Hidrodestilado	0.25	2.48 \pm 0.89 b	80.3
Canela	Hidrodestilado	0.50	1 a	100.0
Canela	Hidrodestilado	1.00	1 a	100.0
Limón	Comercial	0.25	8.50 \pm 0 g	0.0
Limón	Comercial	0.50	8.26 \pm 0.14 f g	3.2
Limón	Comercial	1.00	7.43 \pm 0.14 e f	14.3
Epazote	Comercial	0.25	7.04 \pm 0.15 d e	19.5
Epazote	Comercial	0.50	5.06 \pm 0.11 c	45.9
Epazote	Comercial	1.00	2.76 \pm 0.30 b	76.6
Canela	Comercial	0.25	3.17 \pm 2.15 b	71.1
Canela	Comercial	0.50	1 a	100.0
Canela	Comercial	1.00	1 a	100.0

CM-Crecimiento micelial; DE-desviación estándar; medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0.05$) por la prueba de Tukey.

CM-Mycelial growth; DE-standard deviation; medians with the same letter are significantly different ($p > 0.05$) by Tukey's test.

Inhibición de la germinación de conidios

El porcentaje de germinación de conidios de *A. alternata* a los que se aplicó directamente los AEs, presentó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.0001$) por efecto de los tratamientos, al ser evaluados después de 8 h (datos no mostrados). En los tratamientos que contenían aceites esencial de canela (0.25, 0.5 y 1.0 $\mu\text{L mL}^{-1}$), los aceites de limón y epazote no comerciales (0.5 y 1.0 $\mu\text{L mL}^{-1}$) y los aceites de limón y epazote comerciales (1.0 $\mu\text{L mL}^{-1}$) no se observó germinación.

Los tratamientos que presentaron el mayor porcentaje de inhibición de la germinación fueron los aceites no comerciales de limón (92.50 %) y epazote (93.33 %) en concentración de 0.25 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Mientras que, en concentración de 0.5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ fueron los aceites comerciales de limón y epazote (91.0 % y 94.17 %, respectivamente), evidenciándose un efecto de dependencia con la concentración del aceite utilizado.

Modelo de crecimiento micelial

Los datos experimentales del crecimiento micelial de *A. alternata* en PDA con diferentes concentraciones de AEs en función del tiempo se ajustaron al modelo de Baranyi y Roberts. Se observó una tendencia de disminución en el crecimiento micelial con un incremento en la concentración de AEs en el medio de cultivo (Figura 2).

Con los datos de crecimiento de los tratamientos evaluados se desarrollaron 14 modelos (Cuadro 4). El coeficiente de determinación (R^2) promedio fue 0.97, mientras que la raíz del cuadrado medio del error (RMSE) fue 0.15. En los modelos que se desarrollaron, a mayor concentración de aceite esencial se observó una disminución de la tasa máxima de crecimiento (μ_{max}) y un incremento en el tiempo de fase lag aparente (λ).

Baranyi and Roberts. Mycelial growth tended to decrease as the concentration of EOs in the culture medium increased (Figure 2).

Based on data of the evaluated treatments, we developed 14 models (Table 4). The average determination coefficient (R^2) was 0.97, while the root-mean-square error (RMSE) was 0.15. In the models developed, we observed that as the concentration of essential oil increased, the maximum growth rate decreased (μ_{max}) and the time of the apparent lag phase increased (λ).

Conidial germination model

Experiment data of conidial germination were adjusted to the Logistic model. Using the evaluated treatments 5 models were developed (Table 5). The average RMSE was 1.98. The increase in EOs concentration affected germination, and as the concentration of essential oil increased, there was a lower rate of germination increase k (h^{-1}) and more time was required to reach 50 % germination r (h).

DISCUSSION

Yields of EOs obtained by hydrodistillation were lower than those reported in the literature. For essential epazote oil, Jaramillo *et al.* (2012) reported yields of 0.4 %. For cinnamon oil, Golmohammad *et al.* (2012) reported yields of 3.6 %, and Saleem *et al.* (2015) and Unlu *et al.* (2010) reported yields of 0.93 %. Differences in yields of the EOs evaluated, compared with yields reported in literature, may be attributed to factors such as the methodology used during essential oil extraction, as well as its effectiveness (Schmidt, 2009; Golmakani and Moayyedi, 2015).

For example, Hamdani and Allem (2015), and Sharma and Vashist (2015), extracted lime essential

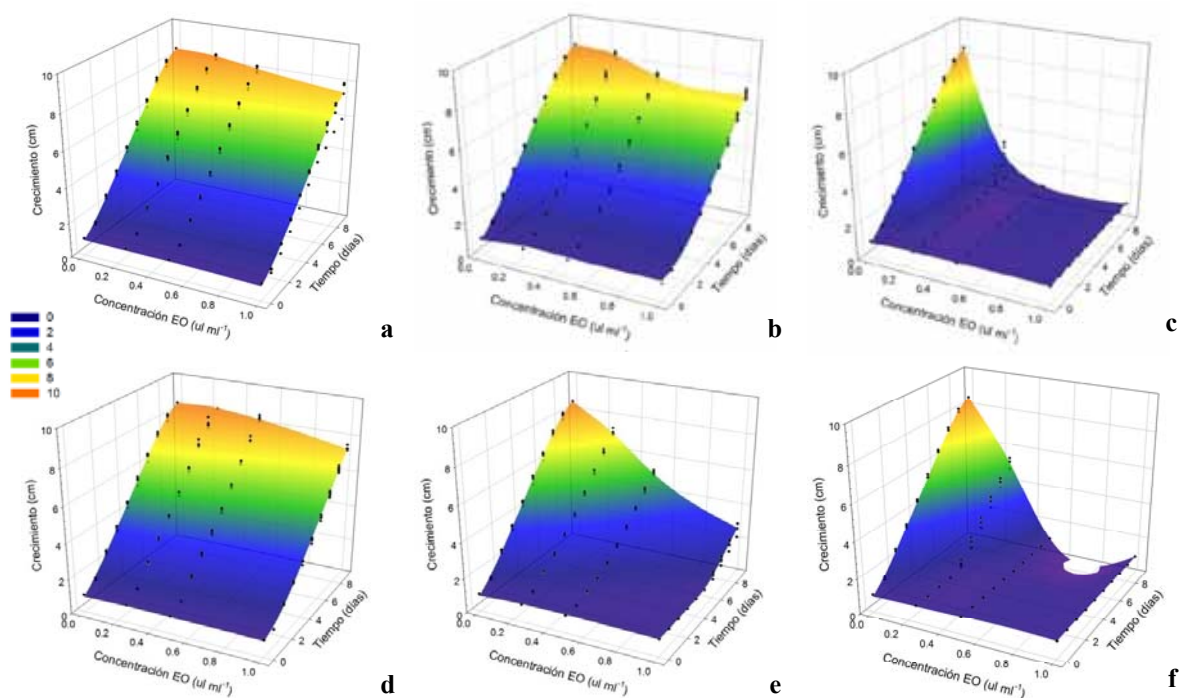


Figura 2. Gráfico de superficie del efecto de diferentes concentraciones de aceites esenciales sobre el crecimiento micelial de *A. alternata*. Aceites esenciales obtenidos por hidrodestilación. a. limón. b. epazote. c. canela. Aceites esenciales comerciales. d. limón. e. epazote. f. canela. Datos experimentales (◆), datos predichos por el modelo (■).

Figure 2. Surface graph of the effect of different concentrations of essential oils on *A. alternata* mycelial growth. Essential oils obtained by hydrodistillation. a. lime. b. epazote. c. cinnamon. Commercial essential oils. d. lime. e. epazote. f. cinnamon. Experimental data (◆), data predicted by the model (■).

Modelo de germinación de conidios

Los datos experimentales de germinación de conidios se ajustaron al modelo Logístico. Con los tratamientos evaluados se desarrollaron 5 modelos (Cuadro 5). El RMSE promedio fue 1.98. El incremento en la concentración de AEs afectó la germinación, observándose que a mayor concentración de aceite esencial hubo una menor tasa de incremento en el porcentaje de germinación k (h^{-1}) y un mayor tiempo requerido para alcanzar el 50 % de germinación r (h).

oil by hydrodistillation using a Clevenger-type distiller and obtained yields of 1.0-1.5 %, which were 3 to 5 times higher than the yield obtained in this research using an Italian-type distiller. Similarly, the condition of the plant material (fresh or dry) and the variety, influence yield and their fungicidal/fungistatic effect, which can explain the variation cited in literature (Schmidt, 2009).

Although there are several reports associated with AE composition, the effect of a commercial product has not been compared to that of regional species, such as the ones used in this research. Using

Cuadro 4. Parámetros obtenidos por el ajuste de los datos experimentales del crecimiento micelial de *A. Alternata*, incubado en PDA y AEs al modelo de Baranyi y Roberts.

Table 4. Parameters obtained by adjusting experimental data of mycelial growth of *A. alternata* incubated in PDA and AEs to the model of Baranyi and Roberts.

Tratamiento	μ_{max} real (cm día ⁻¹)	$\mu_{max} \pm SE$ (cm día ⁻¹)	$\lambda \pm SE$ (días)	R ²	RMSE
Control	0.98	0.99±0.01	0.48±0.11	0.99	0.12
Limón O-0.25	1.00	1.00±0.02	1.73±0.15	0.99	0.23
Limón O-0.5	0.99	0.99±0.01	2.50±0.08	0.99	0.13
Limón O-1.0	0.91	0.91±0.01	3.36±0.07	0.99	0.11
Epazote O-0.25	0.98	0.98±0.01	1.81±0.11	0.99	0.16
Epazote O-0.5	0.88	0.88±0.01	1.88±0.11	0.99	0.14
Epazote O-1.0	0.89	0.89±0.01	2.28±0.11	0.99	0.16
Canela O-0.25	0.81	0.82±0.18	7.16±0.33	0.69	0.31
Limón C-0.25	0.95	0.96±0.01	0.60±0.11	0.99	0.12
Limón C-0.5	0.89	0.89±0.01	0.87±0.08	0.99	0.10
Limón C-1.0	0.84	0.84±0.01	1.35±0.12	0.99	0.14
Epazote C-0.25	0.79	0.79±0.01	1.48±0.08	0.99	0.09
Epazote C-0.5	0.64	0.64±0.01	2.77±0.08	0.99	0.08
Epazote C-1.0	0.47	0.47±0.03	5.31±0.19	0.94	0.14
Canela C-0.25	0.78	0.78±0.03	3.65±0.21	0.98	0.20

O-AE obtenido;C-AE comercial; μ_{max} -tasa máxima de crecimiento; λ -tiempo de fase lag aparente; SE-error estándar; R²-coeficiente de determinación; RMSE-raíz del cuadrado medio del error

O-AE obtained;C-AE commercial; μ_{max} -maximum growth rate; λ - apparent lag phase time; SE-standard error; R²-determination coefficient; RMSE- square root mean error

Cuadro 5. Parámetros obtenidos por el ajuste de los datos experimentales de la germinación de conidios de *A. Alternata*, incubado en contacto directo en AEs al modelo logístico.

Table 5. Parameters obtained by adjusting experimental data of conidial germination of *A. alternata* incubated in direct contact with AEs to the logistic model.

Tratamiento	Germinación (%)	k (h ⁻¹)	SE	r (h)	SE	RMSE
Control	98.33	0.51	0.08	7.66	1.95	5.28
Limón O. - 0.25	7.50	4.59	>100	6.15	55.35	1.16
Epazote O. - 0.25	6.67	2.22	20.91	7.00	15.29	0.42
Limón C. - 0.25	29.17	5.39	>100	5.98	6.05	2.54
Limón C. - 0.5	9.00	4.85	>100	7.77	>100	1.12
Epazote C. - 0.25	11.50	5.51	>100	5.92	22.03	2.26
Epazote C. - 0.5	5.83	5.55	>100	7.34	>100	1.14

O-AE obtenido;C-AE comercial; k-tasa de incremento en el porcentaje de germinación; r-tiempo requerido para alcanzar el 50% de germinación; SE-error estándar; RMSE-raíz del cuadrado medio del error

O-AE obtained;C-AE commercial; k-rate of increase in percentage germination; r-time required to reach 50 % germination; SE-standard error; RMSE-square root mean error

DISCUSIÓN

Los rendimientos que se obtuvieron debido al proceso de hidrodestilación de los AEs fueron inferiores a lo reportado en la literatura. En el caso del aceite esencial de epazote, Jaramillo *et al.* (2012) reportaron un rendimiento de 0.4 %. Mientras que, en el aceite de canela, Golmohammad *et al.* (2012) reportaron un 3.6 % y Saleem *et al.* (2015) y Unlu *et al.* (2010) 0.93 %. Las diferencias en los rendimientos de los AEs evaluados, respecto a lo reportado en la literatura, pueden ser atribuidos a factores como la metodología que se utilizó durante la extracción del aceite esencial y su eficiencia (Schmidt, 2009; Golmakani y Moayyedi, 2015).

Por ejemplo, Hamdani y Allem (2015) y Sharma y Vashist (2015) obtuvieron aceite esencial de limón por el método de hidrodestilación utilizando un destilador tipo Clevenger y alcanzaron un rendimiento de 1.0- 1.5 %, que fue de 3 a 5 veces superior al que se obtuvo en la presente investigación, empleando un destilador tipo italiano. De igual manera el estado del material vegetal (fresco o seco) y la variedad tiene influencia en el rendimiento y su efecto fungicida/fungistático; explicándose con ello la variación citada en la literatura (Schmidt, 2009).

A pesar de que existen diversos reportes asociados con la composición de los AEs, no se había contrastado el efecto de un producto comercial y aquel procedente de especies regionales como las que se emplearon en esta investigación. En este sentido, su empleo en la extracción de AEs y en el control de *A. alternata* es una alternativa viable para el aprovechamiento integral del mismo.

Por otra parte, la reducida capacidad del aceite esencial de limón para inhibir el crecimiento de *A. alternata*, puede ser debido a que contiene D-Limoneno como el componente más abundante; el cual posee una actividad insecticida, pero no

these species to obtain EOs, and evaluate their control on *A. alternata* can be a viable alternative for effectively using them.

On the other hand, the limited capacity of essential lime oil to inhibit *A. alternata* growth may be attributed to its high concentration of D-Limonene, the most abundant component, which has insecticidal but not antimicrobial activity, as reported by Guo *et al.* (2016).

Regarding essential epazote oil, there are no studies about their application to control *A. alternata*. However, its effect has already been evaluated on other microorganisms. Lombardo *et al.* (2016) found limited growth inhibition *in vitro* of *P. citricarpa* at a concentration of 1 mg mL⁻¹, and Jardim *et al.* (2008) reported total inhibition, among others, of *A. niger*, *C. gloeosporioides* and *F. oxysporum*, at 0.3 % concentration. The effectiveness of epazote oil to control phytopathogenic fungi is attributed to the presence of Ascaridole (Jardim *et al.* 2010). However, in this study, we did not identify this compound in epazote oil obtained by hydrodistillation, but we identified it in commercial oil (27.29 %). This result could explain the higher antifungal activity of the commercial oil (76.6 % inhibition at a concentration of 1.0 µL mL⁻¹).

As for essential cinnamon oil, it completely inhibited *in vitro* growth of *A. alternata*; a similar effect was reported by Lu *et al.* (2013) at a concentration of 240 mg mL⁻¹. Its effect has also been evaluated in other fungi. Nasir *et al.* (2015) reported growth inhibition of *A. niger* (100 %) at a concentration of 0.08 µL mL⁻¹, while Saleem *et al.* (2015) reported 50 % more inhibition in *A. niger* and *A. flavus* at 2 mg mL⁻¹. In all reports, Cynamaldehyde was found to be the main compound and responsible for the antifungal activity (Schwab *et al.*, 2008).

Regarding inhibition of the conidial germination, we observed an effect depending

antimicrobiana de acuerdo con lo reportado por Guo *et al.* (2016).

Respecto al aceite esencial de epazote, no existen estudios de su aplicación en el control de *A. alternata*. Sin embargo, ya se ha evaluado su efecto en el crecimiento de otros microorganismos. Lombardo *et al.* (2016) encontraron limitada inhibición del crecimiento *in vitro* de *P. citricarpa* en concentración de 1 mg mL⁻¹ y Jardim *et al.* (2008) reportaron una inhibición total en *A. niger*, *C. gloeosporioides* y *F. oxysporum*, entre otros, a una concentración de 0.3 %. La efectividad en el control de hongos fitopatógenos del aceite de epazote se atribuye a la presencia del Ascaridol (Jardim *et al.* 2010). No obstante, en el presente trabajo no se identificó este compuesto en el aceite esencial de epazote que se obtuvo por hidrodestilación, pero sí en el aceite comercial (27.29%), esto podría explicar la mayor actividad antifúngica del aceite comercial (76.6 % de inhibición en concentración de 1.0 µL mL⁻¹).

En relación al aceite esencial de canela, este inhibió completamente el crecimiento *in vitro* de *A. alternata* y un efecto similar fue reportado por Lu *et al.* (2013) a una concentración de 240 mg mL⁻¹. También se ha evaluado su efecto en otros hongos. Nasir *et al.* (2015) reportaron una inhibición del crecimiento de *A. niger* (100 %) con una concentración de 0.08 µL mL⁻¹ mientras que, Saleem *et al.* (2015) encontraron una inhibición superior al 50 % en *A. niger* y *A. flavus* a 2 mg mL⁻¹. En todos los reportes, el cinamaldehído es el compuesto principal y el responsable de la actividad antifúngica (Schwab *et al.*, 2008).

Respecto a la inhibición de la germinación de conidios se observó un efecto dependiente de la concentración del aceite; es decir, a mayor cantidad de aceite esencial aplicado se observó un menor el porcentaje de germinación. Este fenómeno puede deberse a que los AEs retrasaron el desarrollo del tubo germinativo o causaron la ruptura de la membrana plasmática de los conidios produciendo una

on oil concentration. This means that as more essential oil was applied, germination decreased. This phenomenon may have been produced by EOs by delaying the development of the germ tube or causing rupture of conidia cell membrane, which in turn caused disorganization of the conidia cytoplasm and destroyed organelles (Perina *et al.*, 2014). Lu *et al.* (2013) reported the same effect, with an increased concentration of essential cinnamon oil (20 to 80 µg·mL⁻¹), increased *A. alternata* the inhibition of conidial germination from 30 to 100 %.

In this study PCAs facilitated the analysis and grouping of the evaluated EOs according to their chemical composition and source (hydrodistillation or commercial), and allowed to explain their effect on *A. alternata* growth. It was confirmed that essential cinnamon oil (commercial and non-commercial) had different composition compared with the remaining oils. Similarly, Petretto *et al.* (2016) used PCAs based on data of the composition of essential *Myrtus communis* oil and classified different specimens and wild varieties, finding the more representative compounds of each variety. Furthermore, in a study conducted by Méndez-Tovar *et al.* (2016) PCA allowed to analyze the influence of the harvest year on the chemical composition of EOs from *Thymus mastichina*, *Salvia lavandulifolia* and *Lavandula latifolia* populations.

Given the extent of the study and data obtained about mycelial growth and conidial germination, the use of mathematical tools is useful to appreciate the combined effect of different doses and essential oils during time. The use of mathematical modeling in *A. alternata* is innovative, so it can allow us to reduce analysis time, estimate its behavior considering diverse factors and optimize processes associated with fungal control.

There are already reports on the use of mathematical models based on Baranyi and Roberts

desorganización del citoplasma y destrucción de organelos (Perina *et al.*, 2014). En el trabajo de Lu *et al.* (2013) se presentó el mismo efecto, con un aumento en la concentración de aceite esencial de canela (20 a 80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) en el cual se incrementó la inhibición de germinación de conidios de *A. alternata* de 30 a 100 %.

La aplicación del ACP en este trabajo, facilitó el análisis y agrupación de los AEs evaluados de acuerdo a su composición química y su procedencia (hidrodestilación o comercial) y con ello fue posible explicar su efecto sobre el crecimiento *A. alternata*. Se confirmó que el aceite de canela (comercial y no-comercial) fue diferente en composición en comparación con el resto de los aceites. De manera similar, Petretto *et al.* (2016) realizaron un ACP con los datos de composición del aceite esencial de *Myrtus communis* y lograron clasificar diferentes especímenes de variedades cultivadas y silvestres, encontrando los compuestos más representativos para cada una de las variedades. Asimismo, en el trabajo de Méndez-Tovar *et al.* (2016) el ACP permitió analizar la influencia del año de cosecha sobre la composición química de los AEs de poblaciones de *Thymus mastichina*, *Salvia lavandulifolia* y *Lavandula latifolia*.

Debido a la magnitud del estudio y datos generados sobre el crecimiento micelial y germinación de conidios, el empleo de herramientas matemáticas permite apreciar el efecto combinado de diferentes dosis y aceites, a través del tiempo. El empleo del modelamiento matemático en el hongo *A. alternata*, es algo novedoso, lo cual permitirá reducir tiempos de análisis de datos, estimar comportamientos considerando diversos factores y optimizar procesos asociados con el control del hongo.

Ya se ha reportado el uso de modelos matemáticos basados en la función de Baranyi y Roberts

function to model *P. expansum* data of mycelial growth on PDA, adding betel leaf oil (*Piper betle*). Results from this experiment showed that higher concentrations of essential oil in the medium culture decreased the maximum growth rate (μ_{max}) and increased the apparent lag phase time (λ) (Basak and Guha, 2015). Similarly, Marín *et al.* (2008) and Tremarin *et al.* (2015) used fungal growth models based on Baranyi and Roberts equation but without a restrictive agent (essential oil) in the culture medium. Instead, they modified the parameters of the culture medium (temperature and pH). The study showed an effect of the modification to the parameters of the culture, on the parameters of the maximum growth rate (μ_{max}) and apparent lag phase time (λ). Dantigny *et al.* (2007) and Basak and Guha (2015) also used mathematical modeling (logistics model) in spore germination of phytopathogens such as *P. expansum* and *P. verrucosum*.

CONCLUSIONS

Mycelial growth and conidial germination of *A. alternata* was affected by the use of cinnamon oil at concentrations of 0.5 and 1 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ regardless of its source (commercial and non-commercial). On the other hand, data analysis using principal components resulted to be an appropriate methodology to group the EOs, that were evaluated according to their chemical composition, and thereby explaining their fungicidal or fungistatic effect. Finally, by using mathematical modeling it was established that as the concentrations of essential oil increased in the culture medium, the maximum growth rate (μ_{max}) decreased and the apparent lag phase time (λ) increased.

para modelar los datos de crecimiento micelial de *P. expansum* cultivado en PDA con aceite esencial de la hoja de betel (*Piper betle*), observándose que a mayor concentración de aceite esencial en el medio de cultivo, se presentó una disminución en la tasa máxima de crecimiento (μ_{max}) y un incremento en el tiempo de fase lag aparente (λ) (Basak y Guha, 2015). De igual manera, Marín *et al.* (2008) y Tremarin *et al.* (2015) presentaron modelos de crecimiento de hongos basados en la ecuación de Baranyi y Roberts pero sin un agente restrictivo (aceite esencial) en el medio de cultivo, sino modificando de los parámetros de cultivo como temperatura y pH. En el estudio se observó un efecto de la modificación de parámetros de cultivo sobre los parámetros la tasa máxima de crecimiento (μ_{max}) y tiempo de fase lag aparente (λ). Adicionalmente Dantigny *et al.* (2007) y Basak y Guha (2015) emplearon el modelamiento matemático (modelo logístico) en la germinación de esporas de fitopatógenos como *P. expansum* y *P. verrucosum*.

CONCLUSIONES

El crecimiento micelial y la germinación de conidios de *A. alternata*, se afectó por el uso de aceite de canela en concentraciones de 0.5 y 1 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$, independientemente de su procedencia (comercial y no comercial). Por otra parte, el análisis de datos a través de componentes principales resultó ser una metodología apropiada para agrupar los AEs que se evaluaron en función de su composición química y con ello explicar el efecto fungicida o fungistático de los mismos. Finalmente, a través del modelamiento matemático se estableció que, a mayor concentración de aceite esencial en el medio de cultivo, se presenta una disminución en la tasa máxima de crecimiento (μ_{max}) y un incremento en el tiempo de fase lag aparente (λ).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank M.S. Gabriel Flores Franco, curator at UAEM's Herbarium for his support to identify the vegetal species used in this study, and to Dra. Mayra Beatriz Gómez Patiño from IPN's Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías for her support to analyze the chemical composition of the EOs used.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al M. en C. Gabriel Flores Franco, curador del Herbario de la UAEM por su apoyo en la identificación de las especies vegetales y a la Dra. Mayra Beatriz Gómez Patiño del Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías del IPN por su apoyo en el análisis de la composición química de los AEs.

## LITERATURA CITADA

- Badawy M and Abdelgaleil S. 2014. Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi. *Industrial Crops and Products* 52:776-782. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.003>
- Baranyi J and Roberts T. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology* 23:277-294. DOI: 10.1016/0168-1605(94)90157-0
- Basak S and Guha P. 2015. Modelling the effect of essential oil of betel leaf (*Piper betle* L.) on germination, growth, and apparent lag time of *Penicillium expansum* on semi-synthetic media. *International Journal of Food Microbiology* 215:171-178. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.019>
- Baser K and Buchbauer G. eds. 2009. *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. CRC Press. NW-USA, 975p. <https://ttnmai.files.wordpress.com/2012/09/handbookofessentialoil.pdf>
- Bautista-Baños S, Barrera-Necha L, Hernandez-Lauzardo A, Velázquez-Del Valle M, Alia-Tejagal I y Guillén-Sánchez

- D. 2008. Polvos, extractos y fracciones de hojas de *Cestrum nocturnum* L. y su actividad antifúngica en dos aislamientos de *Fusarium* spp. Revista UDO Agrícola 8:42-51. <http://www.bioline.org.br/pdf?cg08006>
- Chen Q, Xu S, Wu T, Guo J, Sha S, Zheng X and Yu T. 2014. Effect of citronella essential oil on the inhibition of postharvest *Alternaria alternata* in cherry tomato. Journal of the Science of Food and Agriculture 94:2441-2447. DOI: 10.1002/jsfa.6576
- Costa L, Pinto J, Bertolucci S, Costa J, Alves P and Niculau E. 2015. antifungal activity of *Ocimum selloi* essential oil and methylchavicol against phytopathogenic fungi. Revista Ciência Agronômica 46:428-435. <http://dx.doi.org/10.5935/1806-6690.20150023>
- Dantigny P, Marin S, Beyer M and Magan N. 2007. Mould germination: data treatment and modelling. International Journal of Food Microbiology 114:17-24. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.11.002
- Di Rienzo J, Casanoves F, Balzarini M, González L, Tablada M y Robledo C. 2008. InfoStat manual de usuario. Grupo InfoStat, FCA. 333p.
- Díaz-Cedillo F, Serrato-Cruz M, de la Cruz-Marcial J, Sánchez-Alonso M y López-Morales V. 2013. Compuestos mayoritarios del aceite esencial en órganos de una población de *Tagetes coronopifolia* Willd. Revista Fitotecnia Mexicana 36:405-411. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61029714006>
- Dima C and Dima S. 2015. Essential oils in foods: extraction, stabilization, and toxicity. Current Opinion in Food Science 5:29-35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2015.07.003>
- Dimić G, Kocić-Tanackov S, Mojović L and Pejin J. 2014. Antifungal activity of lemon essential oil, coriander and cinnamon extracts on foodborne molds in direct contact and the vapor phase. Journal of Food Processing and Preservation 1-10. DOI:10.1111/jfpp.12410
- García D, Ramos A, Sanchis V and Marín S. 2009. Predicting mycotoxins in foods: a review. Food Microbiology 26:757-769. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2009.05.014>
- García D, Ramos A, Sanchis V and Marín S. 2010. Modelling mould growth under suboptimal environmental conditions and inoculum size. Food Microbiology 27:909-917. DOI:10.1016/j.fm.2010.05.015
- Golmakani M and Moayyedi M. 2015. Comparison of heat and mass transfer of different microwave-assisted extraction methods of essential oil from *Citrus limon* (Lisbon variety) peel. Food Science & Nutrition 3:506-518. DOI: 10.1002/fsn3.240
- Golmohammad F, Eikani M and Maymandi H. 2012. Cinnamon bark volatile oils separation and determination using solid-phase extraction and gas chromatography. Procedia Engineering 42:247-260. DOI: 10.1016/j.proeng.2012.07.416
- Guo S, Zhang W, Liang J, You C, Geng Z, Wang C and Du S. 2016. Contact and repellent activities of the essential oil from *Juniperus formosana* against two stored product insects. Molecules 21:504. DOI: 10.3390/molecules21040504
- Hamdani F and Allem R. 2015. Propriétés antifongiques des huiles essentielles des feuilles de *Citrus* vis-à-vis d'*Alternaria alternata* et *Penicillium* sp in vitro. Phytothérapie 1-4. DOI: 10.1007/s10298-015-0978-3
- Jaramillo B, Duarte E y Delgado W. 2012. Bioactividad del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* colombiano. Revista Cubana de Plantas Medicinales 17:54-64. <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v17n1/pla06112.pdf>
- Jardim C, Jham G, Dhingra O and Freire M. 2008. Composition and antifungal activity of the essential oil of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. Journal of Chemical Ecology 34:1213-1218. DOI: 10.1007/s10886-008-9526-z
- Jardim C, Jham G, Dhingra O and Freire M. 2010. Chemical composition and antifungal activity of the hexane extract of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. Journal of the Brazilian Chemical Society 21:1814-1818. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532010001000004>
- Krisch J, Rentsenkhand T and Vágölygi C. 2011. Essential oils against yeasts and moulds causing food spoilage. FormateX research center. Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances Microbiology 1135-1142.
- Lombardo P, Guimaraens A, Franco J, Dellacassa E and Faggiani E. 2016. Effectiveness of essential oils for postharvest control of *Phyllosticta citricarpa* (citrus black spot) on citrus fruit. Postharvest Biology and Technology 121:1-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.07.002>
- Longhi D, Dalcanton F, Fálcao G, Mattar B and Borges J. 2013. Assessing the prediction ability of different mathematical models for the growth of *Lactobacillus plantarum* under non-isothermal conditions. Journal of Theoretical Biology 335:88-96. DOI: 10.1016/j.jtbi.2013.06.030
- Lu M, Han Z, Xu Y and Yao L. 2013. Effects of essential oils from Chinese indigenous aromatic plants on mycelial growth and morphogenesis of three phytopathogens. Flavour and Fragrance Journal 28:84-92. DOI: 10.1002/ffj.3132
- Mamgain A, Roychowdhury R and Tah J. 2013. *Alternaria* pathogenicity and its strategic controls. Research Journal of Biology 1:1-9. [https://www.researchgate.net/publication/26665233\\_1\\_REVIEW\\_Alternaria\\_pathogenicity\\_and\\_its\\_strategic\\_controls](https://www.researchgate.net/publication/26665233_1_REVIEW_Alternaria_pathogenicity_and_its_strategic_controls)
- Manganyi M, Regnier T and Olivier E. 2015. Antimicrobial activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* isolates and their biofilms. South African Journal of Botany 99:115-121. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2015.03.192>
- Marín S, Cuevas D, Ramos A and Sanchis V. 2008. Fitting of colony diameter and ergosterol as indicators of food borne mould growth to known growth models in solid medium. International Journal of Food Microbiology 121:139-149. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.030>
- McCarroll N, Protzel A, Ioannou Y, Stack F, Jackson M, Waters M and Dearfield K. 2002. A survey of EPA/OPP and open literature on selected pesticide chemicals III. Mutagenicity and carcinogenicity of benomyl and carbendazim. Review. Mutation Research 512:1-35. [http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5742\(02\)00026-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5742(02)00026-1)
- Méndez-Tovar I, Novak J, Sponza S, Herrero B and Asensio-S-Manzanera M. 2016. Variability in essential oil composition of wild populations of Labiatae species collected in Spain. Industrial Crops and Products 79:18-28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.10.009>

- Mora-Aguilera G and Campbell C. 1997. Multivariate techniques for selection of epidemiological variables. In Franc L and Neher D. eds. Exercises in plant disease epidemiology. APS Press 51-58
- Nasir M, Tafess K and Abate D. 2015. Antimicrobial potential of the ethiopian *Thymus schimperi* essential oil in comparison with others against certain fungal and bacterial species. BMC Complementary and Alternative Medicine 15:1. DOI: 10.1186/s12906-015-0784-3
- Perina F, Amaral D, Fernandes R, Labory C, Teixeira G and Alves E. 2014. *Thymus vulgaris* essential oil and thymol against *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler: effects on growth, viability, early infection and cellular mode of action. Pest Management Science 71:1371-1378 DOI: 10.1002/ps.3933
- Petretto G, Maldini M, Addis R, Chessa M, Foddai M, Rourke J and Pintore G. 2016. Variability of chemical composition and antioxidant activity of essential oils between *Myrtus communis* var. *Leucocarpa* DC and var. *Melanocarpa* DC. Food Chemistry 197:124-131. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.056>
- Raut J and Karuppaiyl S. 2014. A status review on the medicinal properties of essential oils. Industrial Crops and Products 62:250-264. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.055>
- Saleem M, Bhatti H, Jilani M and Hanif M. 2015. Bioanalytical evaluation of *Cinnamomum zeylanicum* essential oil. Natural Product Research 29:1857-1859. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2014.1002088>
- Sánchez-González L, Vargas M, González-Martínez C, Chiralt A and Cháfer M. 2011. Use of essential oils in bioactive edible coatings: a review. Food Engineering Reviews 3:1-16. DOI 10.1007/s12393-010-9031-3
- Schmidt E. 2009. Production of essential oils. In Baser K and Buchbauer G. eds. Handbook of essential oils: science, technology, and applications. CRC Press 83-119. DOI: 10.1201/b19393-6
- Schwab W, Davidovich-Rikanati R and Lewinsohn E. 2008. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. The Plant Journal 54:712-732. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2008.03446.x
- Sharma D and Vashist H. 2015. Hydrodistillation and comparative report of percentage yield on leaves and fruit peels from different citrus plants of rutaceae family. Journal of Plant Sciences 10:75-78. DOI: 10.3923/jps.2015.75.78
- Sivakumar D and Bautista-Baños S. 2014. A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. Review. Crop Protection 64:27-37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2014.05.012>
- Terrádez M. 2002. Análisis de componentes principales. Proyecto e-Math. Universitat Oberta de Catalunya. [www.uoc.edu/in3/emath/docs/Componentes\\_principales.pdf](http://www.uoc.edu/in3/emath/docs/Componentes_principales.pdf) (consulta, febrero 2017)
- Tremarin A, Longhi D, Martins B and Falcão G. 2015. Modeling the growth of *Byssochlamys fulva* and *Neosartorya fischeri* on solidified apple juice by measuring colony diameter and ergosterol content. International Journal of Food Microbiology 193:23-28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.10.006>
- Troncoso-Rojas R and Tiznado-Hernández M. 2014. *Alternaria alternata* (black rot, black spot). In Bautista-Baños S. ed. Postharvest decay: control strategies. Elsevier 87-147. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-411552-1.00005-3>
- Unlu M, Ergene E, Unlu G, Zeytinoglu H and Vural N. 2010. Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). Food and Chemical Toxicology 48:3274-3280. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2010.09.001>