

# Inhibición del crecimiento de *Penicillium chrysogenum* por presencia de aceites de *Cinnamomum zeylanicum*, *Allium cepa* y *Cymbopogon citratus*

Eber A. Quintana-Obregón<sup>1</sup>, Maribel Plascencia-Jatomea<sup>1</sup>,  
Gustavo A. González-Aguilar<sup>2</sup>, Mario O. Cortez-Rocha<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora, Rosales y Luis Encinas s/n, Hermosillo 83000, Sonora, México.

<sup>2</sup>Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Carretera a La Victoria Km 0.6, Hermosillo 83304, Sonora, México

Growth inhibition of *Penicillium chrysogenum* with oils of *Cinnamomum zeylanicum*, *Allium cepa* and *Cymbopogon citratus*

Abstract. The antifungal effects of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum*, *Allium cepa* and *Cymbopogon citratus* were evaluated on *Penicillium chrysogenum* spore germination and radial growth. It was determined that the minimum inhibitory concentrations 50 (CR<sub>50</sub>) were 294±16, 152±7 and 112±3 ppm of *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon citratus* and *Allium cepa*, respectively. The three oils significantly inhibited the spore germination and radial growth compared to controls. We recommended its use for further study for food protection.

Key words: spore germination, radial growth, antifungal activity

Resumen. Se evaluó el efecto antifúngico de los aceites esenciales *Cinnamomum zeylanicum*, *Allium cepa* y *Cymbopogon citratus* sobre la germinación de esporas y el crecimiento radial del micelio de *Penicillium chrysogenum*. Se determinó que la concentración mínima inhibitoria que disminuye el crecimiento radial en un 50% (CR<sub>50</sub>) fueron 294±16, 152±7 y 112±3 ppm para *C. zeylanicum*, *A. cepa* y *C. citratus*, respectivamente. Los tres aceites inhiben significativamente la germinación de esporas y el crecimiento radial del micelio con respecto a los testigos. Se recomienda su uso para posteriores estudios en protección de alimentos.

Palabras clave: germinación de esporas, crecimiento radial, actividad antifúngica

Received 21 June 2010; accepted 6 October 2010.

Recibido 21 de junio 2010; aceptado 6 de octubre 2010.

Los aceites esenciales exhiben actividad antimicrobiana en una amplia variedad de especies de insectos, bacterias, levaduras y hongos, por lo que se ha reportado su uso en la protección de alimentos como ingrediente o en películas, en cultivos agrícolas y en áreas urbanas (Gershenson y Croteau, 1991; Isman, 2000; Ramos-García *et al.*, 2010). Además, se consideran de baja peligrosidad y de bajo riesgo al ser humano (Isman, 2000). El uso de estos compuestos en hongos se puede dar afectando etapas del desarrollo como la germinación de esporas, formación de estructuras de

*Autor para correspondencia: M. Cortez-Rocha*  
*mcortez@guayacan.uson.mx*

penetración, desarrollo de micelio y esporulación. Por lo general, la germinación de esporas y el desarrollo micelial son utilizados en estudios *in vitro* para subsecuentes aplicaciones (Montes *et al.*, 2000). Los aceites esenciales de la canela (*Cinnamomum zeylanicum*), la cebolla mexicana (*Allium cepa* L.) y el té de limón (*Cymbopogon*) son comercializados en México y podrían ser aprovechados para combatir contaminación fúngica en alimentos. Debido a que *Penicillium chrysogenum* es un hongo presente en el medio ambiente y contaminante común en alimentos, el presente trabajo tuvo la finalidad de evaluar el efecto de los aceites esenciales de la canela, cebolla mexicana y té de limón sobre

la germinación de esporas y el crecimiento radial de *Penicillium chrysogenum*.

Se utilizó una cepa de *P. chrysogenum* de la colección del Laboratorio de Microbiología del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Universidad de Sonora. La cepa se cultivó en medio de cultivo V-8 estéril (jugo V-8 200 ml, CaCO<sub>3</sub> 3 g/L y agar 15 g/L), incubándose a 25 °C con fotoperiodos de 12 horas luz-oscuridad, por 96 h. Las esporas producidas se suspendieron en 20 ml de solución Tween 20 (0.1%) mediante agitación magnética por 5 minutos. Para la determinación del número de esporas por ml de solución se empleó una cámara de Neubauer y las diluciones de esporas obtenidas se guardaron en refrigeración (5°C) hasta su uso. Se evaluaron tres aceites esenciales comerciales (Aldrich) identificados como aceite de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) (hojas), aceite de té de limón (*Cymbopogon citratus*) (Guatemala) y aceite de cebolla (*Allium cepa*) (México). Para evaluar la actividad antifúngica de la cepa de *P. chrysogenum*, al medio V-8 se le adicionó Tween 80 hasta una solución final del 1%, la mezcla se agitó y esterilizó en autoclave. Se dejó enfriar a 45 °C y se le adicionó el aceite, mezclando y depositando de 8 a 10 ml en cajas de Petri de 5 cm de diám. Los tratamientos constaron de seis concentraciones (12.5, 25, 50, 100, 200 y 250 ppm) para

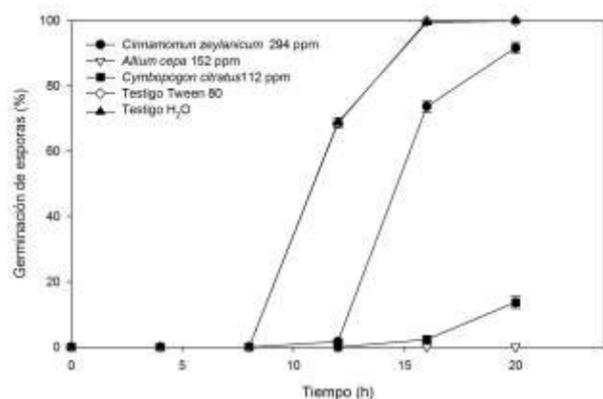


Figura 1. Porcentaje de germinación de esporas de *Penicillium chrysogenum* en presencia de aceites con dosis  $CR_{50}$  a 25 °C y fotoperíodos de 12 h luz-oscuridad.

cada aceite. Además se prepararon testigos sin aceite esencial, testigo H<sub>2</sub>O y testigo Tween 80 al 1%. Posteriormente mediante el análisis Probit se obtuvo la concentración mínima inhibitoria que disminuye el crecimiento radial en un 50% con respecto al testigo ( $CR_{50}$ ) para cada aceite, a partir de las cinéticas de crecimiento radial y porcentajes de inhibición. Cada tratamiento de aceites y testigos se inoculó con la técnica reportada por Plascencia-Jatomea *et al.* (2003) y modificada de la siguiente manera: con una pipeta Pasteur se realizó una perforación de 6 mm de diámetro en el centro del medio de cultivo contenido en placa de Petri, posteriormente se inoculó el microorganismo a una concentración de 10<sup>5</sup> esporas. Los cultivos se incubaron a 25 °C, con fotoperiodos de 12 horas luz-oscuridad. El diámetro del micelio desarrollado se midió cada 12 h. Se compararon los resultados del crecimiento del hongo con el medio testigo Tween 80 y se calculó el porcentaje de inhibición sobre el crecimiento radial del micelio con la ecuación descrita por Guo *et al.* (2008). La velocidad de extensión radial del micelio U (µm/h), se obtuvo a partir de la pendiente obtenida de graficar los datos experimentales en la etapa de crecimiento micelial en relación con el tiempo. El experimento se realizó por triplicado.

Con las dosis obtenidas mediante análisis Probit se evaluó su efecto sobre la germinación de esporas. Se inocularon diluciones de esporas de *P. chrysogenum* (10<sup>5</sup>) que fueron distribuidas, con ayuda de una varilla de vidrio estéril, en toda la superficie del medio. Posteriormente se incubaron a 25°C con fotoperiodos de 12 horas luz-oscuridad, tomándose muestras aleatorias a diferentes intervalos de tiempo. Además se determinó el porcentaje de esporas germinadas de acuerdo a la técnica reportada por El-Ghaouth *et al.* (1992). Asimismo se determinó el porcentaje de la inhibición germinatoria con la ecuación descrita por Plascencia-Jatomea *et al.* (2003), que se calculó con respecto al testigo Tween 80. También se evaluó el efecto de las  $CR_{50}$  sobre el crecimiento radial y la velocidad de extensión radial (U) (Sempere y Santamarina, 2007).

Tabla 1. Parámetros de crecimiento de *Penicillium chrysogenum* en presencia de aceites esenciales en medio V-8 con Tween 80 (1%) a diferentes concentraciones a las 96 h de incubación 25°C y fotoperiodos de 12 h luz-oscuridad

Aceite	Concentración ppm	Radio del micelio (mm)	Velocidad de extensión radial (µ h <sup>-1</sup> )	Inhibición radial (%)
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	0	8.5±0.3 <sup>B</sup>	126±2 <sup>A</sup>	NA
	12.5	9.1±0.1 <sup>AB</sup>	123±4 <sup>A</sup>	0.0±0.0 <sup>C</sup>
	25	9.3±0.2 <sup>A</sup>	127±2 <sup>A</sup>	0.0±0.0 <sup>C</sup>
	50	8.9±0.2 <sup>AB</sup>	123±4 <sup>A</sup>	0.0±0.0 <sup>C</sup>
	100	7.2±0.1 <sup>C</sup>	106±4 <sup>B</sup>	15.69±0.98 <sup>B</sup>
	200	6.9±0.1 <sup>C</sup>	103±1 <sup>B</sup>	18.63±0.98 <sup>B</sup>
<i>Allium cepa</i>	250	4.1±0.1 <sup>D</sup>	85±1 <sup>C</sup>	51.96±0.98 <sup>A</sup>
	0	8.5±0.3 <sup>A</sup>	126±2 <sup>A</sup>	NA
	12.5	8.0±0.2 <sup>A</sup>	114±3 <sup>A</sup>	5.88±2.94 <sup>C</sup>
	25	8.6±0.7 <sup>A</sup>	117±4 <sup>A</sup>	4.90±2.59 <sup>C</sup>
	50	8.0±0.1 <sup>A</sup>	112±2 <sup>A</sup>	5.88±1.69 <sup>C</sup>
	100	4.7±0.2 <sup>B</sup>	94±2 <sup>B</sup>	44.12±2.94 <sup>B</sup>
<i>Cymbopogon citratus</i>	200	4.2±0.0 <sup>B</sup>	90±0 <sup>C</sup>	50±0.0 <sup>B</sup>
	250	2.1±0.2 <sup>C</sup>	70±10 <sup>D</sup>	75.49±2.59 <sup>A</sup>
	0	8.5±0.3 <sup>A</sup>	126±2 <sup>A</sup>	NA
	12.5	9.3±0.5 <sup>A</sup>	129±4 <sup>AB</sup>	0.0±0.0 <sup>C</sup>
	25	8.3±0.3 <sup>A</sup>	117±4 <sup>A</sup>	3.92±1.96 <sup>C</sup>
	50	8.1±0.2 <sup>A</sup>	112±2 <sup>AB</sup>	3.92±1.96 <sup>C</sup>
	100	5.8±0.2 <sup>B</sup>	84±3 <sup>BC</sup>	31.37±1.96 <sup>B</sup>
	200	0.8±0.2 <sup>C</sup>	35±7 <sup>C</sup>	90.20±1.96 <sup>A</sup>
	250	0.5±0.5 <sup>C</sup>	0±0 <sup>D</sup>	94.12±1.96 <sup>A</sup>

NA= no aplica

Valores expresados en promedio de tres réplicas y error estándar

Diferentes superíndices indican grupos estadísticos para cada aceite (P<0.05, Tukey)

De acuerdo a los resultados obtenidos, no se encontró diferencia significativa en crecimiento radial entre el testigo H<sub>2</sub>O y el testigo Tween 80. Los tres aceites evaluados mostraron diferencia significativa en crecimiento radial con respecto al testigo Tween 80 a partir de una concentración de 100 ppm, encontrándose a 250 ppm el mayor porcentaje de inhibición a las 96 h (Tabla 1). En cuanto a la velocidad de extensión radial del micelio del hongo, las muestras con 250 ppm y 96 h de incubación mostraron diferencias significativas con respecto al testigo Tween 80, siendo de 85, 70 y 0.0 micras h<sup>-1</sup> para los aceites de *C. zeylanicum*, *A. cepa* y *C. citratus*, respectivamente (Tabla 1).

Las  $CR_{50}$  obtenidas fueron 294±16, 152±7 y 112±3 ppm para *C. zeylanicum*, *A. cepa* y *C. citratus*, respectivamente. Con las  $CR_{50}$  se encontró diferencia significativa entre tratamientos con aceites con respecto a los

testigos a las 20 h, encontrándose inhibición sobre la germinación de las esporas de 8.33±1.67, 100±0.0, 86.33±0.88 para aceite de *C. zeylanicum*, *A. cepa* y *C. citratus*, respectivamente (Figura 1). En crecimiento radial las  $CR_{50}$  mostraron diferencia significativa con respecto a los testigos, presentando a las 96 h de incubación inhibiciones radiales del aceite de 48.96±1.6%, 64.83±6.6% y 77.93±7.1% para *C. zeylanicum*, *A. cepa* y *C. citratus*, respectivamente (Figura 2). El aceite con mayor potencial inhibitorio fue *C. citratus*. Al duplicar la  $CR_{50}$  se podría esperar una inhibición del 100%, sin embargo en el presente estudio no se evaluó si el efecto de los aceites es fungicida o fungistático en esas concentraciones. Algunos autores mencionan que un posible mecanismo de acción de los aceites sobre el crecimiento de los hongos es debido a los constituyentes con alta hidrofobicidad presentes en la célula, lo que ocasiona

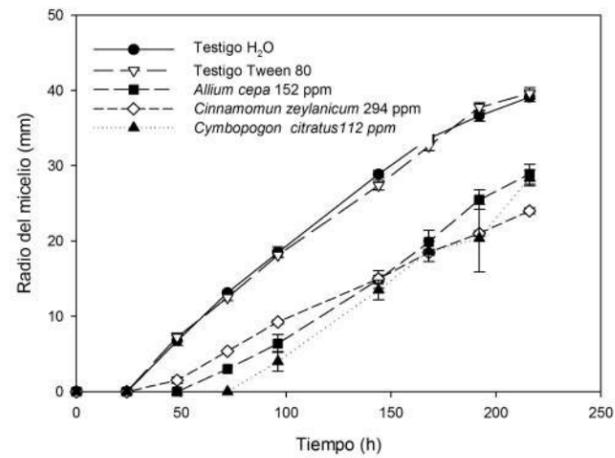


Figura 2. Cinética de crecimiento radial de *Penicillium chrysogenum* en presencia de aceites con dosis  $CR_{50}$  a 25 °C y fotoperíodos de 12 h luz-oscuridad.

trastornos en la permeabilidad y en el transporte de iones y de otros compuestos, así como en la separación de componentes lipídicos de la membrana celular y la mitocondria. Este efecto se ve favorecido a bajos pHs, temperaturas y niveles de oxígeno (Burt, 2004; Bosquez-Molina *et al.*, 2009). Esto pudiera indisponer los nutrientes necesarios para el desarrollo del hongo e inclusive inhibirlo, probablemente en función de la concentración de aceite esencial, sin embargo esta hipótesis no fue comprobada en este estudio.

## Literatura citada

- Bosquez-Molina E., S. Bautista-Baños, J. Morales-López, 2009. Aceites esenciales: bioconservadores con alto potencial en la industria alimentaria. *Industria Alimentaria* 31: 12-24.
- Burt S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. *International Journal of Food Microbiology* 94: 223-253.
- El-Ghaouth A., J.G.Arul, A. Asselin, 1992. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. *Phytopathology* 82:398-402.
- Gershenzon J., R. Croteau, 1991. Terpenoids. In: Rosenthal, G.A., Berenbam, M.R. (eds.), *Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites*. Academic Press, San Diego, CA. pp. 165-219.
- Guo, Z., R. Xing, S. Liu, Z. Zong, X. Xi, L. Wang, P. Li, 2008. The influence of molecular weight of quaternized chitosan on antifungal activity. *Carbohydrate Polymers* 71: 694-697.
- Isman M.B., 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection* 19: 603-608.
- Montes B., R., B.R., Cruz V., C., Martínez M., G., Sandoval G., G., García R., L., Zilch S., D., Bravo L., L., Bermúdez K., T., Flores H., E.M., M. Carvajal M., 2000. Propiedades antifúngicas de plantas superiores. Análisis retrospectivo de investigaciones. *Revista Mexicana de Fitopatología* 18: 125-131.
- Plascencia-Jatomea, M., G. Viniegra, R. Olayo, M. M. Castillo-Ortega, K. Shirai, 2003. Effect of chitosan and temperature on spore germination of *Aspergillus niger*. *Macromolecular Bioscience* 3: 582-586.
- Ramos-García M.L., S. Bautista-Baños, L.L. Barrera-Necha, I. Alia-Tejacal, M. Estrada-Carrillo, 2010. Compuestos antimicrobianos adicionados en recubrimientos comestibles para usos en productos hortofrutícolas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28:44-57.
- Sempere F., M.P. Santamarina, 2007. *In vitro* biocontrol analysis of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler under different environmental conditions. *Mycopathologia* 163:183-190.