

Evaluación del efecto inhibitorio de aceites esenciales sobre *Aspergillus flavus* y *Fusarium solani* (Mart.)Sacc., hongos autóctonos del cultivo de cacao

Evaluation of the inhibitory effect of essential oils on *Aspergillus flavus* and *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., native fungi of cocoa cultivation

Raquel A. Villamizar G.*, Oscar O. Ortíz R.**

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v27n1.116849

RESUMEN

El cultivo de cacao ha ido *in crecento* durante los últimos años, posicionando a Colombia en el concurso internacional Cacao of Excellence “como el mejor del mundo” en 2024. No obstante, en la cadena productiva del cultivo, el país aún tiene varios desafíos, dentro de los que se destaca la proliferación de hongos patógenos que pueden desarrollarse en las diferentes etapas de su producción. En la presente investigación se evaluó el efecto inhibitorio de 4 aceites esenciales sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus* y *Fusarium solani* (Mart.)Sacc., hongos patógenos nativos aislados de cultivos de cacao, en el departamento Norte de Santander, Colombia. Los análisis *in vitro* se hicieron empleando la técnica de difusión en medio PDA a través de unidades experimentales conformadas por el agente patógeno, los cuatro aceites esenciales, tres concentraciones por aceite, con tres réplicas, para un total de 54 unidades experimentales incluidos los controles, mientras que los ensayos *in vivo*, fueron realizados directamente sobre la corteza de mazorca de cacao, siguiendo el mismo diseño. El porcentaje de inhibición (% PICR) se calculó a partir del crecimiento micelial y usando métodos estadísticos basados en las características y distribución de los datos se determinó la dosis letal 90 (DL90) para cada aceite por medio de un modelo de regresión dosis respuesta ajustado a partir de un modelo no lineal de regresión. Los resultados indican que los aceites de anís, eucalipto y pronto alivio, inhibieron efectivamente el crecimiento de los dos patógenos en concentraciones que oscilaron entre 20 $\mu\text{L/mL}$ y 48 $\mu\text{L/mL}$, con lo cual podrían ser empleados como una alternativa eco-amigable que requiere escalarse a fase de campo, para evaluar su efectividad *in situ*.

Palabras claves: Agentes, biocontroladores, hongos patógenos, *Theobroma cacao*.

ABSTRACT

Cocoa cultivation has been growing in recent years, positioning Colombia in the international competition Cacao of Excellence “as the best in the world” in 2024. However, the country still faces several challenges in the production chain of the crop, including the proliferation of pathogenic fungi that can develop in the different stages of production. This research evaluated the inhibitory effect of essential oils on the growth of *Aspergillus flavus* and *Fusarium solani* (Mart.)Sacc., native pathogenic fungi isolated from cocoa crops in the department of Norte de Santander, Colombia. The *in vitro* analyses were performed using the technique of diffusion in PDA medium through experimental units con-

* Profesora Titular, Directora Grupo de Investigación en Salud Pública y Epidemiología, Departamento de Medicina, Facultad de Salud, Universidad de Pamplona, Colombia. raqvillamizar@unipamplona.edu.co. <https://orcid.org/0000-0003-1168-2353>

** Profesor Titular, Director Grupo de Investigación Nanotecnología y Gestión Sostenible (NANOSOST), Departamento de Ingeniería Industrial, Facultad de Ingenierías y Arquitectura, Universidad de Pamplona, Colombia. oscarortiz@unipamplona.edu.co, <https://orcid.org/0000-0003-2250-9804>

sisting of the pathogen, the four essential oils, three concentrations per oil, with three replicates for a total of 54 experimental units including controls, while the in vivo assays were performed directly on the cocoa pod rind, following the same design. The percentage inhibition (% PICR) was calculated from mycelial growth and using statistical methods based on the characteristics and distribution of the data, the lethal dose 90 (LD90) was determined for each oil by means of a dose-response regression model fitted from a non-linear regression model. The results indicate that anise, eucalyptus and soon relief oils effectively inhibited the growth of the two pathogens at concentrations ranging from 20 μ L/mL to 48 μ L/mL, which could be used as an eco-friendly alternative that needs to be scaled up to the field phase to evaluate its effectiveness *in situ*.

Keywords: Agents, biocontrollers, pathogenic fungi, *Theobroma cacao*.

Recibido: noviembre 10 de 2024

Aprobado: marzo 10 de 2025

INTRODUCCIÓN

El mayor productor de *Theobroma cacao* a nivel mundial es el continente africano con un 77,4%, seguido del continente americano con un 17,8% y por último Asia y Oceanía con un 4,8% (ICCO, 2022). En Colombia, el cultivo de cacao ha ido *in crecento* durante los últimos años, pasando de 59.740 toneladas (t) en 2019 a 63.416 Tn en 2022, otorgándole el décimo puesto a nivel internacional. Cabe resaltar que en febrero del 2024, la muestra de la Asociación Agroguamal ubicada en el departamento del Meta, obtuvo la mejor puntuación en el concurso internacional Cacao of Excellence, en Ámsterdam, posicionando el cacao colombiano **“como el mejor del mundo”** (Sanchez, F.V., 2023).

No obstante, en la cadena productiva del cacao existen aún muchos desafíos. Uno de ellos es la susceptibilidad de varios materiales biológicos distribuidos y sembrados en los diferentes departamentos (30 de los 32 que hay en el país) a una gran diversidad de patógenos. Este aspecto se ve favorecido por prácticas agroecológicas inadecuadas, pero sin duda se verá aumentado en los próximos años por los efectos negativos producto del cambio climático en regiones tropicales, como en la que se encuentra ubicada Colombia. Científicos predicen que la concentración de CO₂ para finales de siglo llegará a niveles entre 490 y 1370 ppm, lo cual producirá cambios en la temperatura global (entre 1.4 a 4.8 °C) y en los patrones de precipitaciones (Lahive *et al.*, 2019), favoreciendo la expansión de enfermedades y el incremento en la resistencia de los patógenos.

Los hongos, son microorganismos, cuyo crecimiento se ve favorecido por la elevada humedad relativa y vientos, que facilitan la producción y diseminación de sus estructuras reproductivas (esporas). Estos pueden desarrollarse en las diferentes etapas de su producción, que incluyen desde el establecimiento del cultivo, la cosecha, la fermentación, el secado, el almacenamiento, hasta la obtención del producto final. Especies del género *Aspergillus*

spp. y *Fusarium spp.* han sido reportadas por formar parte de la microbiota endofítica y epifítica del cultivo de cacao, pero también se han encontrado durante la fermentación y el secado en semilla. En el caso de *Aspergillus spp.* incluso se ha encontrado en almacenamiento y en el producto final (Delgado Ospina, *et al.*, 2021).

Una de las principales preocupaciones a nivel de salud pública sobre la presencia de mohos filamentosos en las diferentes etapas de producción de cacao y especialmente en el producto final, es su potencial micotoxigénico. Dentro de las micotoxinas más frecuentemente encontradas en cultivos de cacao se ha reportado la Ocratoxina A (OTA), aflatoxinas (AFs) y recientemente la citrinina (CIT) la cual es nefrotóxica (Delgado Ospina, *et al.*, 2021). La literatura indica que el chocolate contribuye con cerca de un 6% del total de exposición a Ocratoxina A (OTA) en la dieta alimentaria, con lo cual la comisión del Codex Alimentarios del 2013 ha recomendado reducir al máximo al presencia de infecciones por hongos en los cultivos de cacao (Codex Alimentarius, 2013).

La contaminación por esporas fúngicas ocurre principalmente durante el proceso de abertura de las mazorcas (cacotas), lo cual justifica la necesidad de encontrar métodos para eliminar y/o reducir la presencia de estos patógenos en el fruto antes de ser beneficiado, a fin de evitar que estos hongos y/o sus productos metabólicos, puedan potencialmente llegar al consumidor a través del producto transformado en chocolate y/o sus derivados.

A través de este estudio, se aborda el uso de aceites esenciales (AE) como agentes inhibidores eficientes y eco-amigables, para el control del crecimiento de *Aspergillus flavus* y *Fusarium solani* (Mart.)Sacc., hongos patógenos autóctonos, aislados del cultivo de cacao. Los AE, se definen como mezclas complejas de bajo peso molecular, volátiles y con propiedades aromáticas (Parrish *et al.*, 2020). Su actividad antifúngica se atribuye a la relación de terpenos/terpenoides, los cuales debido a su naturaleza altamente lipofílica y su bajo peso molecular,

son capaces de causar disrupción a nivel de membrana celular, produciendo la muerte o inhibiendo la esporulación y germinación de las esporas fúngicas (Nazzaro et al., 2017). El uso de AE para inhibir mohos filamentosos procedentes de diferentes cultivos ha sido reportado a nivel *in vitro* (Raveau et al., 2020) incluyendo especies de *Fusarium* spp. y *Aspergillus* spp. productoras de micotoxinas (Xiang et al., 2020). No obstante, para nuestro conocimiento, esta es la primera investigación que busca evaluar el efecto inhibitorio de 4 tipos de aceites esenciales diferentes a saber; *Illicium verum*, *Eucalyptus globulus*, *Rosmarinus officinalis cineoliferum* y *Lippia alba carvoniferum*, sobre el crecimiento *in vitro* e *in vivo* de *Aspergillus flavus* y *Fusarium solani*, hongos patógenos autóctonos, aislados a partir de cultivos de cacao en fase de cosecha, en el departamento de Norte de Santander, Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de los hongos patógenos. *Aspergillus flavus* y *Fusarium solani* (Mart.)Sacc. fueron provistos por el Laboratorio de Nanotecnología y Gestión Sostenible de la Universidad de Pamplona, Norte de Santander, Colombia, quienes reportaron su aislamiento e identificación molecular (Villamizar et al., 2016) a partir de mazorcas de cacao en fase de cosecha, provenientes de diferentes fincas cacaoteras del departamento Norte de Santander, las cuales tienen una media de 1 ha sembrada y un rendimiento promedio de 2000 kg/ha/año en condiciones óptimas de manejo de cultivo; esto quiere decir manejo agroclimático y aplicación profiláctica de control químico Ridomil (mancozeb+metalaxyl) y oxicloruro de cobre siguiendo las instrucciones del fabricante que usualmente es de 1 kg/ha. Las cepas de los patógenos se preservaron como cultivo monospórico en medio de cultivo PDA hasta su uso.

Obtención de aceites esenciales. Los aceites esenciales utilizados en esta investigación fueron adquiridos a través de la empresa Aromatma <https://aromatma.com/>, ubicada en la ciudad de Bogotá, Colombia. En la tabla 1 se indica el nombre, la parte de la planta de donde se obtuvo así como el proceso de obtención.

Determinación *in vitro* de la actividad antifúngica de los aceites esenciales frente a *Aspergillus flavus* y *Fusarium solani* (Mart.) Sacc.

Se empleó la técnica de difusión en agar reportado por da Silva Bomfim y colaboradores con algunas modificaciones (da Silva Bomfim et al., 2015). Las soluciones oleosas originales y concentradas, fueron diluidas empleando una solución estéril de Tween 80 al 0.1 % (Sigma Aldrich) y fueron adicionadas al agar patata dextrosa (PDA-Oxoid) hasta producir concentraciones finales así: AE01 (30 µL/mL, 25 µL/mL, 20 µL/mL); AE02 (50 µL/mL, 45 µL/mL, 40 µL/mL); AE03 (35 µL/mL, 30 µL/mL, 25 µL/mL), AE04 (25 µL/mL, 20 µL/mL, 15 µL/mL). Las concentraciones empleadas, son el producto de investigaciones preliminares propias no publicadas. El agar PDA modificado con las diferentes concentraciones de aceites y solidificado, fue inoculado con un trozo de 7 mm de diámetro que contenía el crecimiento de un cultivo joven de 5-7 días de los respectivos patógenos (*A. flavus* y *F. solani* (Mart.) Sacc.). Como controles positivos se emplearon cajas de agar PDA sin modificar, a las cuales se les inoculó directamente los patógenos, mientras que como controles negativos se tomaron cajas de agar PDA modificados con los diferentes aceites a las cuales no se les realizó ningún inóculo. Los ensayos fueron incubados a 25°C/10 días. Los análisis *in vitro* se hicieron empleando la técnica de difusión en medio PDA a través de unidades experimentales conformados por dos agentes patógenos, cuatro aceites esenciales, tres concentraciones por aceite, con tres réplicas, para un total de 54 unidades experimentales incluidos los controles.

El efecto inhibitorio se determinó midiendo el crecimiento de cada patógeno a través de cuatro radios perpendiculares hasta alcanzar el extremo de la caja de Petri utilizando un caliper digital. Se calculó el porcentaje de inhibición en el día 10 de incubación, empleando la fórmula PICR (%) = ((RC - RT) / RC)100, donde RC es el radio del control (promedio de los 4) y RT el radio de los diferentes tratamientos, de acuerdo con lo descrito por Gómez-López, et al., 2020. La actividad antifúngica de los aceites esenciales fue evaluado inicialmente *in vitro*, cuyo objetivo último fue determinar la dosis letal 90 (DL90).

Tabla 1. Aceites esenciales empleados en este estudio.

CÓDIGO	NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE VULGAR	ORGANO DE LA PLANTA/MÉTODO DE EXTRACCIÓN
AE01	<i>Illicium verum</i>	Anís estrellado	Semilla, destilación por arrastre de vapor
AE02	<i>Eucalyptus globulus</i>	Eucalipto	Hoja, destilación por arrastre de vapor
AE03	<i>Rosmarinus officinalis cineoliferum</i>	Romero	Sumidades floridas, destilación por arrastre de vapor
AE04	<i>Lippia alba carvoniferum</i>	Pronto alivio	Hoja, destilación por arrastre de vapor

Determinación *in vivo* de la actividad inhibitoria de los aceites esenciales frente a los diferentes fitopatógenos

Se realizó directamente sobre corteza de cacao. Para ello se utilizaron placas estériles de 24 pocillos con tapa TC (Cellstar, Sigma Aldrich, EE.UU.) en las cuales se colocaron piezas de 0.125 cm³ de corteza de cacao, respectivamente, previamente esterilizados mediante UV durante toda una noche. Cada trozo de corteza fue impregnado con 100 µL de la DL90 obtenida a partir de los resultados del ensayo anterior. Seguidamente, los trozos de corteza de cacao fueron contaminados artificialmente con una solución de esporas de cada uno de los patógenos de estudio. Para obtener los inóculos se adaptó la metodología propuesta por Santos y colaboradores (Santos *et al.*, 2012). Se partió de cultivos jóvenes (5-7 días), los cuales fueron depositados en un tubo de ensayo conteniendo 10 mL de solución salina 0.85 % con ayuda de un asa micológica. El contenido se agitó vigorosamente aplicando vortex a máxima revolución durante 120 segundos. Seguidamente, se realizaron diluciones en base 10 y se procedió a realizar el conteo de esporas empleando la cámara de Neubauer, visualizando a través de microscopio óptico (Nikon Eclipse E100), objetivo 40 X. El número de esporas fue calculado mediante la fórmula mostrada abajo. El inóculo fue ajustado hasta obtener una concentración final entre 3*10⁶ esporas/mL de cada uno de los patógenos analizados

$$\frac{\text{esporas}}{\text{mL}} = \frac{\text{Recuento obtenido}}{\text{Número de cuadros contados}} * \text{factor de dilución} * \text{factor de la cámara}$$

Las placas se incubaron a 25 °C durante 10 días. Como control positivo, se inoculó corteza de cacao con los respectivos patógenos. Como control negativo se empleó corteza de cacao sin inóculo (Villamizar *et al.*, 2016). Se evaluó visual y cualitativamente, la eficiencia de la DL90 de los respectivos aceites, para inhibir el crecimiento fúngico aparente. Los ensayos *in vivo*, fueron realizados directamente sobre corteza de cacao, empleando el mismo diseño que los ensayos de difusión en PDA.

Caracterización Microscópica

A través de microscopía óptica se visualizó el efecto de los aceites esenciales sobre la ultraestructura celular. Se empleó el método de microcultivo reportado por da Silva Bomfim y colaboradores con algunas modificaciones (da Silva Bomfim *et al.*, 2015). Se tomó una porción de agar PDA de 1.5x1.5 cm² el cual se depositó en el centro de un portaobjetos. Seguidamente, se le inoculó en el centro con ayuda de un asa micológica *A. flavus* procedente de un cultivo joven de no más de 5 días. El mismo procedimiento pero esta vez con agar PDA modificado con AE 04 a una concentración de 15 µL/mL

fue inoculado de igual forma a la descrita previamente con *A. flavus*, se llevó a incubación a 25 °C/10 días y seguidamente se realizó tinción simple con colorante azul de lactofenol y se observaron empleando Microscopio Nikon Eclipse E100, en objetivo de 100 X. El mismo procedimiento se realizó con *F. solani* (Mart.)Sacc.

Diseño de Experimentos y Análisis Estadístico de datos

Se aplicó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk a la variable de porcentaje de inhibición (% PICR) por cada patógeno. Se encontró que la distribución de los datos de *A. flavus* fue normal ($p = 0.067$) mientras que los de *F. solani* no fue normal ($p = 5.523e-06$), por lo que se analizaron con métodos paramétricos y no paramétricos, respectivamente. Para *A. flavus* se aplicó la prueba de ANOVA y la prueba post – Hoc de Tukey (análisis de rangos múltiples) para determinar las diferencias a la hora de inhibir el crecimiento de este patógeno entre los cuatro aceites. Para *F. solani*, se aplicó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. En cuanto a la determinación de la DL 90 se ajustó un modelo de regresión dosis-respuesta, utilizando un modelo log de 4 parámetros, donde el % PICR fue la respuesta y por tanto la variable dependiente, mientras que la concentración del aceite esencial fue la variable independiente. Se realizó un análisis de regresión múltiple para determinar la influencia del tipo de aceite y concentración en el % PICR. El modelo se evaluó mediante el coeficiente de determinación (R²). Los análisis estadísticos se realizaron en el Software R studio versión 3.4.1, y los análisis DL 90 se realizaron con el paquete DRC, paquete que se enfoca en el análisis dosis respuesta (Ritz & Streibig, 2005).

RESULTADOS

Los aceites esenciales tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de los hongos al producir en ellos cambios en su cinética de crecimiento y sus características morfológicas macro y microscópicas. En la Figura 1, se muestran los resultados del ensayo de inhibición en placa realizados frente al patógeno *A. flavus*. Se puede observar que después de los 10 días de incubación, los aceites AE 01, AE 02, AE 4 lograron inhibir significativamente el crecimiento fúngico en todas las concentraciones ensayadas, comparado con el control. En el caso de AE 03, donde la inhibición no fue total, especialmente a bajas concentraciones (25-30 µL/mL), se logró evidenciar cambio en la pigmentación así como en la cinética de crecimiento característica de este hongo.

A nivel microscópico se observó como el aceite AE 04 se fija a las hifas e ingresan debilitando la formación de estructuras fúngicas como los septos (Figura 1), despla-

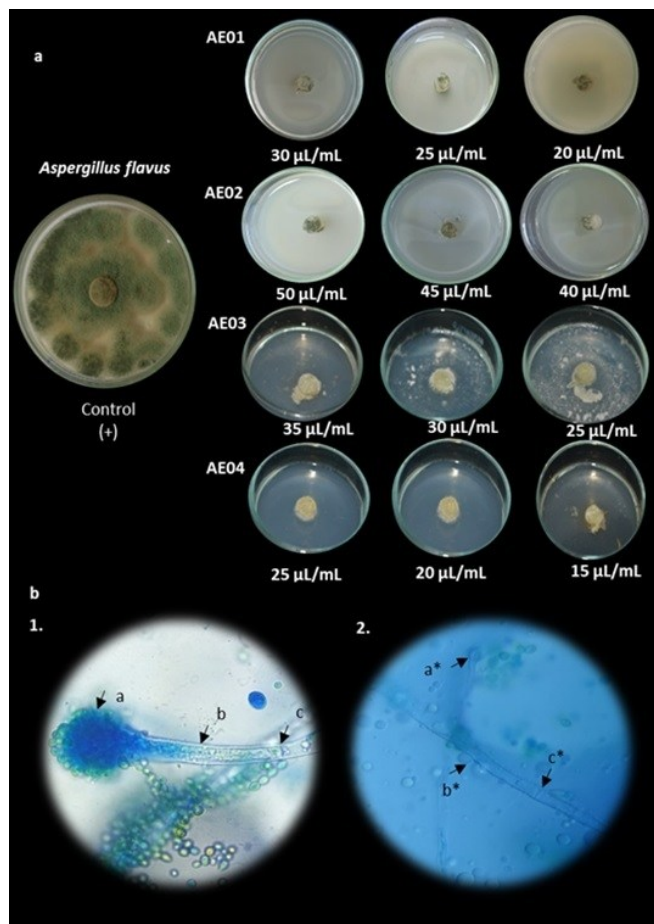


Figura 1. Efecto inhibitorio de los aceites esenciales AE01, AE02, AE03 y AE04 sobre a). *A. flavus* en agar PDA. b). Efecto a nivel de la ultraestructura fúngica de *A. flavus* antes (1) y después (2) de ser expuesto a 15 $\mu\text{L/mL}$ de AE 04.

zando el contenido celular interior y ocasionando una escasa conidiación en *A. flavus* como puede apreciarse en el numeral b-2.

El porcentaje de inhibición (% PICR) para *A. flavus* se muestra en la Figura 2. Se determinó que el AE04 en promedio, fue el aceite que tuvo un mejor desempeño con un % PICR de 84.13 en las tres concentraciones ensayadas, con una desviación estándar (SD) de 2.32, siendo este directamente proporcional. Es decir a mayor concentración del aceite, mayor % PICR. El aceite AE03, presentó lo menores porcentajes de inhibición con un promedio de 77.43 % en las tres concentraciones ensayadas. Entre tanto, los aceites A01 y A02 presentaron resultados más similares con un % PICR de 83.37 y 83.40, respectivamente. A través del análisis de rangos múltiple (post -Hoc Tukey test), se confirmó que el AE 03 presentó diferencias significativas en la inhibi-

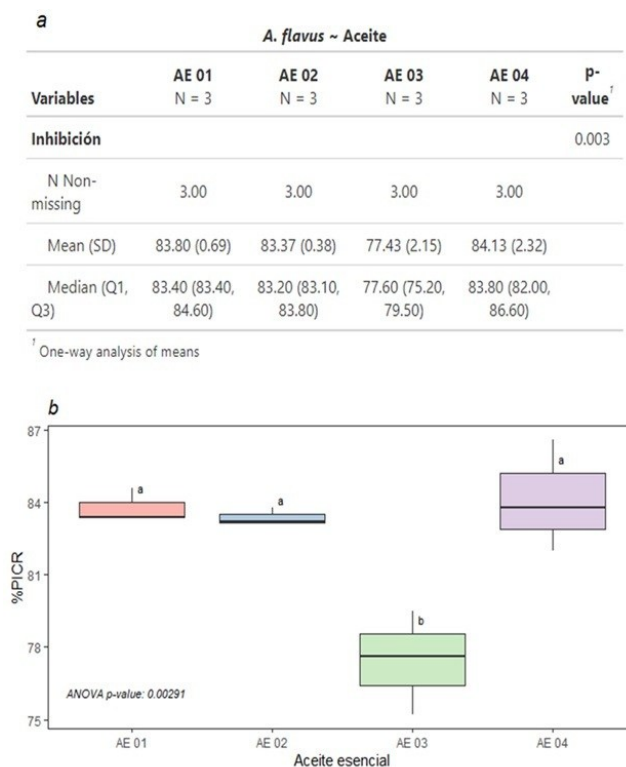


Figura 2. ANOVA de medias de inhibición de *A. flavus* (a) Box-plot de los niveles de inhibición de cada aceite para *A. flavus* (b). Letra distinta indica diferencia significativa.

ción del patógeno ($p = 0.003$) con respecto a los demás aceites (Figura 2b).

Los resultados del ensayo de inhibición en placa realizados frente al patógeno *F. solani* (Mart.) Sacc., después de los 10 días de incubación permitieron determinar que los aceites AE01, AE02 y AE04, redujeron significativamente el crecimiento fúngico con respecto al control en todas las concentraciones ensayadas, mientras que el AE03 tuvo un menor efecto inhibitorio, especialmente en la más baja concentración (25 $\mu\text{L/mL}$) con un % PICR promedio de 77.43. No obstante, se logró apreciar que ocasionó cambios en la pigmentación y en el crecimiento aéreo característico de este patógeno (Figura 3).

A nivel microscópico se observó que AE 04 impidió la formación de macroconidias (Figura 3-3.1), estructuras reproductivas del hongo, apareciendo en su mayoría solo hifas (Figura 3-3.2). El aceite permea la membrana celular, ingresa al interior de la ultraestructura celular y desplaza el contenido citoplasmático (Figura 3-3.2_b), ocasionando su engrosamiento (Figura 3-3.2_b*,c*), adelgazamiento de la estructura hifal (Figura 3-3.2_d*) y por tanto, pérdida de la integridad celular.

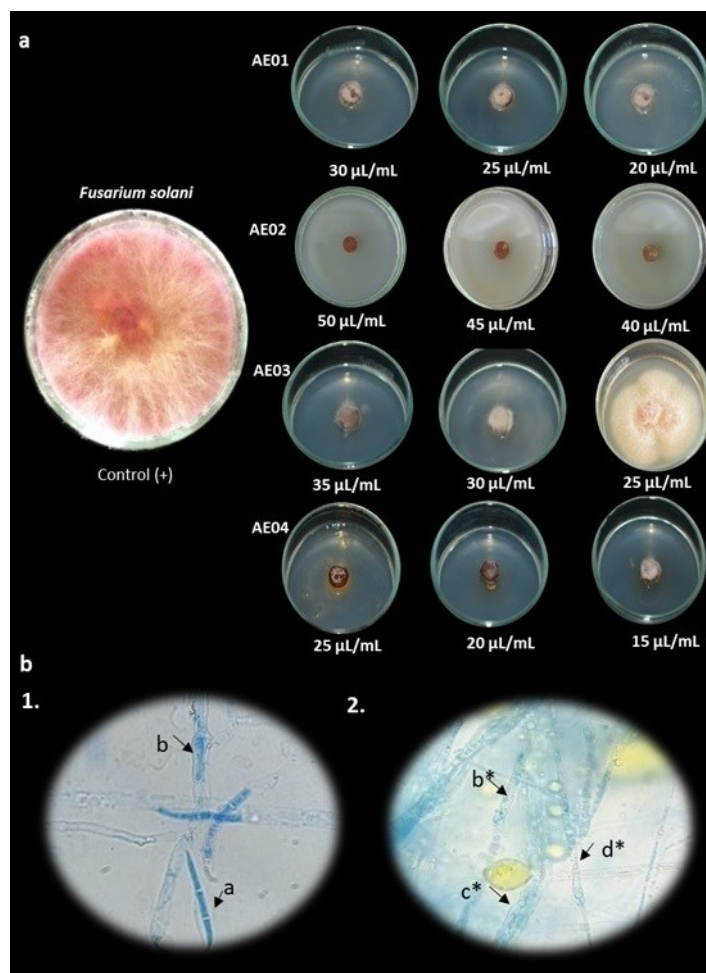


Figura 3. Efecto inhibitorio de los aceites esenciales AE01, AE02, AE03 y AE04 sobre a) *F. solani* (Mart.) Sacc. en difusión en agar PDA b). Efecto a nivel de la ultraestructura fúngica de *F. solani* antes (1) y después (2) de ser expuesto a 15 µL/mL de AE 04.

Para *F. solani* (Mart.) Sacc. se encontró que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los tipos de aceite AE01, AE02 y AE04 en el % PICR ($p = 0.212$). No obstante, al igual que en el test de inhibición de *A. flavus*, el AE03, fue el que presentó menor porcentaje de inhibición con un promedio de 71.73 % (Figura 4a y 4b). Para calcular la dosis letal (DL 90), se estimaron los rangos mediante intervalo delta y se aplicó *likelihood ratio test* para corroborar el efecto de la dosis, encontrando un valor $p < \alpha$ para ambas cepas, por lo que se pudo concluir que las dosis estimadas sí afectan la inhibición de ambos patógenos (Tabla 2).

Con base en el modelo para estimar la DL90 se realizaron las curvas dosis – respuesta por cepa, donde se corroboró que el aceite A04 es el mas recomendado para la inhibición constante de ambas cepas, mientras que el aceite A03 es el menos efectivo especialmente a bajas concentraciones. Adicionalmente se realizó un modelo de regre-

sión lineal múltiple para determinar la relación entre la inhibición de las cepas con respecto al tipo de aceite esencial y su concentración. Para *A. flavus*, el modelo determinó que los aceites AE01 y AE04 aumentan la inhibición 2.1 y 1.4 unidades respectivamente, donde el AE01 presenta una significancia marginal de $p = 0.06$ y A04 una significancia de $p = 0.002$. En contraste con los aceites AE02 y AE03 la disminuyen 4.6 y 7.4 unidades respectivamente, siendo el aceite A03 el que tuvo un menor desempeño con un nivel de significancia $p = 0.002$.

Con el fin de visualizar el efecto inhibitorio *in vivo* de la DL90 calculada para cada cepa (tabla 2), se procedió a ensayar directamente sobre corteza de cacao. Los resultados se muestran en la figura 5 y permiten concluir que las concentraciones calculadas a través del modelo estadístico empleado son efectivas a la hora de inhibir los patógenos, ya que no se evidenció crecimiento fúngico aparente sobre la corteza del cacao.

Tabla 2. Estimación DL 90 de los cuatro aceites esenciales (AE 01-AE 04) por cepa.

Estimación DL 90			
Cepa	Aceite	Intervalo	Likelihood ratio test
<i>A. flavus</i>	AE01	DL 90 = 23 µL/mL	$p = 0.0001$
	AE02	DL 90 = 48 µL/mL	
	AE03	DL 90 = 31 µL/mL	
	AE04	DL 90 = 22 µL/mL	
<i>F. solani</i>	AE01	DL 90 = 22 µL/mL	$p = 4.1e^{-7}$
	AE02	DL 90 = 45 µL/mL	
	AE03	DL 90 = 27 µL/mL	
	AE04	DL 90 = 20 µL/mL	

a

F. solani ~ Aceite

Variables	AE 01 N = 3	AE 02 N = 3	AE 03 N = 3	AE 04 N = 3	p-value [†]
Inhibición					0.2
N Non-missing	3.00	3.00	3.00	3.00	
Mean (SD)	85.27 (1.62)	86.10 (0.70)	71.73 (21.28)	85.90 (0.87)	
Median (Q1, Q3)	86.20 (83.40, 86.20)	86.40 (85.30, 86.60)	81.70 (47.30, 86.20)	86.30 (84.90, 86.50)	

[†] Kruskal-Wallis rank sum test

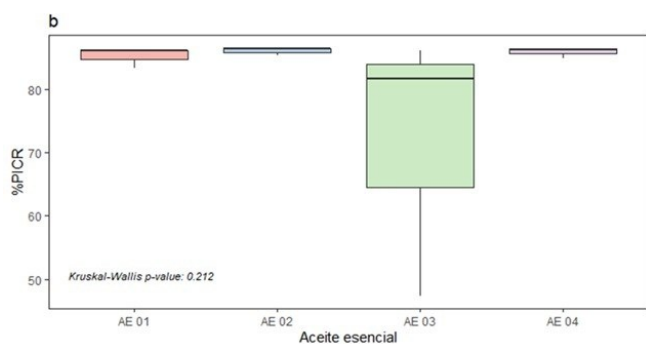


Figura 4. Kruskal Wallis de medianas de inhibición de *F. solani* (a) Boxplot de los niveles de inhibición de cada aceite para *F. solani* (b).

DISCUSIÓN

En esta investigación, se comprobó que los aceites *Illium verum* (AE 01) *Eucalyptus globulus* (AE 02) y *Lippia alba carvoniferum* (AE 04) exhibieron el mayor efecto inhibitorio frente a *Aspergillus flavus* y *Fusarium solani* (Mart.)Sacc., requiriendo concentraciones que oscilaron

entre 20-48 µL/mL para inhibir el 90% del crecimiento fúngico. A este respecto, se indica que todos los aceites fueron adquiridos comercialmente y en el caso de *Illium verum*, la casa fabricante reporta que se extrajo a partir de semillas de anís, por la técnica de destilación por arrastre de vapor y que su composición molecular está basado en los quimiotipos trans-Anetol (88.82 %), estragol (4.03 %), linalool (1.28 %) y foeniculin (1.07 %) (datos complementarios no mostrados). La literatura reporta que este aceite, tiene como principales compuestos químicos fenilpropanoides, flavonoides, neolignanos, monoterpénoides y sesquiterpenoides, siendo el componente dominante el fenilpropanoide transanetol con un rango de concentración 72-92 % (Sharafan et al., 2022) al que se le atribuye su efecto fungicida.

Esto explicaría el resultado observado en esta investigación, en la cual se requirieron entre 22 µL/mL y 23 µL/mL de *Illium verum* para inhibir el 90 % del crecimiento de *Aspergillus flavus* y *Fusarium solani* (Mart.)Sacc., respectivamente. Estas concentraciones fueron 10 veces menores a las reportadas por Soher y colaboradores, quienes encontraron que un aceite esencial de anís cuyos quimiotipos predominantes fueron transanetol (82.7%), cariofileno (4.8%) y limoneno (2.3%), inhibieron el crecimiento *Aspergillus flavus* y *Fusarium verticillioides*, provenientes de maíz colectado en Egipto, en un 83.2% y 65.11%, usando concentraciones de 100 mg/mL, respectivamente. Para lograr una completa inhibición, los autores usaron concentraciones de 200 mg/mL (Soher et al., 2016). La diferencia en los resultados se podría atribuir a la concentración del quimiotipo más predominante del aceite (trans-Anetol), ya que el empleado en esta investigación, estaba un 5 % más concentrado comparado al el utilizado por Soher et al.

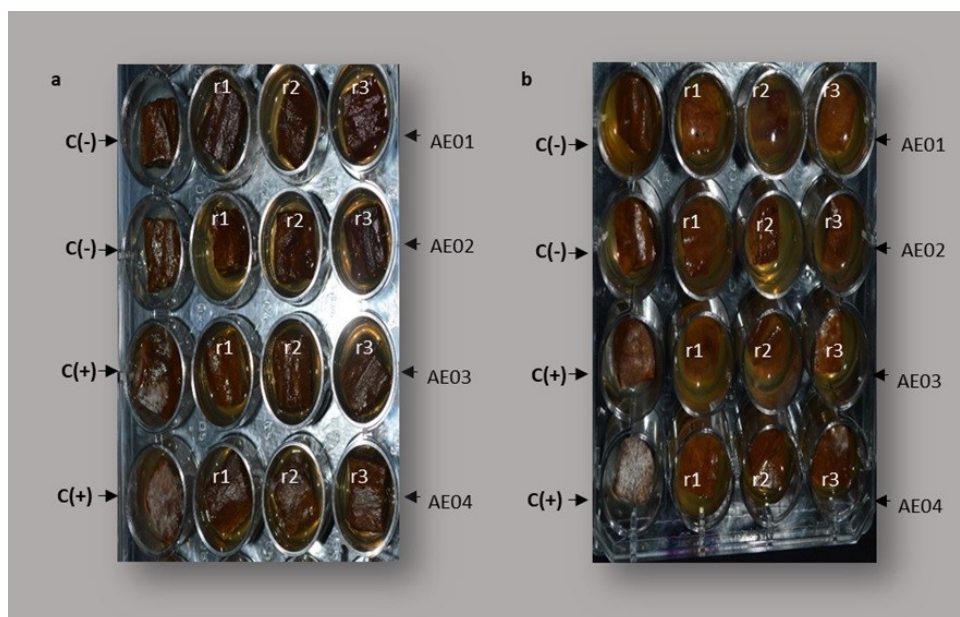


Figura 5. Efecto de inhibición *in vivo* de las dosis letales DL90 de 4 aceites esenciales sobre patógenos crecidos en corteza de cacao. **a)** *F. solani* (Mart.)Sacc. **b)** *A. flavus*. C(-) corresponden a los trozos de pulpa sin inocular (controles negativos) mientras que C(+) corresponden a los trozos corteza inoculados con los respectivos patógenos (controles positivos). r1, r2, r3 (número de réplicas hechas).

Se pudo evidenciar además, que las concentraciones empleadas del aceite esencial *Lippia alba carvoniifera* (AE 04) aunque fueron más bajas con respecto a los tres aceites restantes (AE 01, AE 02 y AE 03), su actividad inhibitoria fue la mejor frente a los dos patógenos. Este aceite esencial se caracteriza por la variabilidad en la composición química dependiendo del origen del material vegetal, de la etapa de crecimiento que se colecta la planta, así como la parte seleccionada para la destilación del aceite, por lo cual se ha reportado la existencia de al menos siete quimiotipos. Pandey *et al.*, analizaron el efecto de 11 tipos de aceites contra el hongo micotóxico *A. flavus*, demostrando que *Lippia alba*, fue el aceite esencial que exhibió una inhibición absoluta del crecimiento fúngico a una concentración de 0,28 $\mu\text{L/mL}$, lo cual fue atribuido por los autores a la presencia de citral (36.9%) y neral (29.3 %) como quimiotipos predominantes, seguido de mirceno (18.6 %). Los autores concluyeron que aplicando 80 $\mu\text{L}/0.25\text{ L}$ de aire, se inhibía significativamente la proliferación fúngica y la producción de aflatoxina B1 en el almacenamiento de semillas verdes (Pandey *et al.*, 2016). Fontana y colaboradores, mostraron que el aceite *Lippia alba* obtenido por hidrodestilación a partir de plantas de un jardín medicinal ubicado en la Universidad Federal de Santa María en Brazil, eran capaces de inhibir el crecimiento de varias especies fúngicas incluyendo *F. solani* aisladas a partir de cultivos de soja y fresa, en concentraciones que oscilaron entre 0.2 a 1.4 $\mu\text{L/mL}$. Los autores lo atri-

buyeron a la naturaleza lipofílica de los aceites y a su capacidad para fusionarse con la membrana citoplasmática de los hongos, ejerciendo acción desestabilizante (Fontana *et al.*, 2020). Esto coincide con los resultados obtenidos en esta investigación, ya que se logró observar como el AE 04 en *F. solani* (Mart.)Sacc. y *A. flavus*, permeó la ultraestructura y causó afectación en la integridad celular (Figuras 1 y 3, respectivamente), corroborando la interacción hidrofóbica con los grupos no polares de la membrana plasmática de los hongos estudiados. La fuerte actividad de los aceites esenciales sobre la germinación de las esporas de hongos, está relacionada con algunos componentes que afectan principalmente la pared y membrana celular de las conidias, impidiendo su germinación y crecimiento (Tariq *et al.*, 2019).

Eucalyptus Globulus es un aceite cuya composición está basada en monoterpenos oxigenados y no oxigenados, así como los sesquiterpenos oxigenados, que constituyen la mayor parte del aceite esencial. Los monoterpenos más oxigenados son el eucaliptol (51,62%) y el terpinen-4-ol (2,74%), mientras que los principales monoterpenos no oxigenados son el α -pineno (23,62%), el p-cimeno (10%) y el β - mirceno (8,74%). En este aceite esencial, el contenido de los principios activos varía en función del período de recolección de órganos de las plantas (Almas *et al.*, 2021). En esta investigación se lograron porcentajes de inhibición de *A. flavus* y *F. solani* (Mart.) Sacc. superiores al 80 % al usar el aceite esencial

Eucalyptus globulus en concentraciones que oscilaron entre 40-50 µL/mL. Estos resultados son ligeramente similares a los reportados por Pujiarti y colaboradores, quienes evaluaron el efecto inhibitorio del aceite esencial *Eucalyptus urophylla* frente a especies de *Fusarium oxysporum* y *Aspergillus niger*, demostrando que a mayor concentración del aceite, mayor inhibición, requiriendo hasta 20 mg/mL para obtener un 74.74 % y 77.29 %, respectivamente, con un IC₅₀ de 1.61 mg para *Fusarium oxysporum* y 13.56 mg/mL para *Aspergillus niger* (Pujiarti et al., 2018). La diferencia en concentraciones inhibitorias, puede atribuirse a la especie de eucalipto trabajada, así como a la técnica de extracción del aceite. Es bien sabido por la literatura que el método de destilación por arrastre de vapor es más eficiente para extraer aceites esenciales, con una eficiencia de hasta el 93 % (Villamizar & González, 2023) en comparación con la hidrodestilación.

Rosmarinus officinalis cineoliferum contiene 1,8-cineol, α -pineno, verbenona, alcanfor y borneol, pero las composiciones pueden variar ampliamente, lo que hace que existan más de 13 quimiotipos de este aceite esencial basándose en los porcentajes relativos de α pineno, 1,8-cineol, alcanfor, borneol, verbenona y acetato de bornilo (Satyal et al., 2017). En esta investigación, los proveedores de AE 03, indican que el aceite fue obtenido a partir de sumidades floridas procedentes de Tunisia. Este aceite logró porcentajes de inhibición % PICR de 77.43 y 71.73, respectivamente frente a *A. flavus* y *F. solani* (Mart.) Sacc., empleando concentraciones que oscilaron entre 25-35 µL/mL. Esto es ligeramente diferente a lo reportado por Ben Kaab y colaboradores, quienes emplearon aceite de romero obtenido a partir de hojas procedentes de la misma zona geográfica e indicaron que concentraciones de 6 µL/mL inhibían más del 80 % de la germinación de esporas de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium culmorum* y *Penicillium italicum* después de 120 horas de incubación (Ben Kaab et al., 2019). Lo anterior se podría atribuir a la especificidad que puede darse entre los aceites empleados y los patógenos objeto de estudio. La toxigenicidad de los hongos endofíticos y epifíticos del cacao así como de otros cultivares, se ve influenciada por la zona geográfica y las condiciones edafoclimáticas en las que se establecen los cultivos (Perreno et al., 2020). Las prácticas agro culturales, así como el uso de fungicidas, hacen que incrementan o atenúen su patogenicidad.

CONCLUSIÓN

Se logró evaluar la capacidad inhibitoria de cuatro (4) aceites esenciales adquiridos comercialmente frente a *Aspergillus flavus* y *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., patóge-

nos autóctonos, aislados de cultivos de cacao del departamento N de S, Colombia. Se puede resaltar que los aceites esenciales comparten un mecanismo de acción común, pero que su efectividad depende de su huella dactilar y de las características de resistencia y/o susceptibilidad que exhiba el patógeno objeto de estudio. A través de esta investigación se genera una alternativa efectiva y eco-amigable basada en el uso de los aceites esenciales de *Illicium verum* (anís) y *Lippia alba carvoni-ferum* (pronto alivio), como los agentes inhibidores con mejor desempeño, que pueden escalar a campo, a fin de evaluar su efectividad *in situ*. Esto sin duda, podría contribuir a la introducción de estrategias verdes para reducir los riesgos asociados a la presencia de hongos patógenos con potencial micotoxigénico en las mazorcas de cacao y por tanto; en el chocolate y derivados que se generan y comercializa en la región.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen Fedecacao N de S por facilitarnos los materiales biológicos (cacotas) y a Acadística <https://orcid.org/0000-0002-7574-5168> por sus valiosos aportes en los análisis estadísticos realizados.

REFERENCIAS

- Almas, I., Innocent, E., Machumi, F., y Kisinza, W. (2021). Chemical Composition of Essential Oils from *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus maculata* Grown in Tanzania. *Scientific African Journal*. 12, e00758. doi: 10.1016/j.sciaf.2021.e00758.
- Ben Kaab, S., Rebey, I.B., Hanafi, M., Berhal, C., Fauconier, M.L., De Clerck, C., Ksouri, R., y Jijakli, H. (2019). *Rosmarinus officinalis* essential oil as an effective antifungal and herbicidal agent. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 17(2), e1006. <https://doi.org/10.5424/sjar/2019172-14043>.
- Codex Alimentarius. CXC 72-2013. Código de prácticas para prevenir y reducir la contaminación del cacao por Ocratoxina A. <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/codes-of-practice/es/>. Fecha de consulta 010224.
- Delgado-Ospina, J., Molina-Hernández, J.B., Chaves-López, C., Romanazzi, G., y Paparella, A. (2021). The Role of Fungi in the Cocoa Production Chain and the Challenge of Climate Change. *Journal of Fungi (Basel)*. 10, 7(3), 202. doi: 10.3390/jof7030202.
- Fontana, D., Schmidt, D., Kulczynsk, S., Caron, B., y Pretto, M. (2020). Fungicidal potential of essential oils in control of *Fusarium* spp. and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Arquivos do Instituto Biológico*. 87, 1-10. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000612019>.

- Gómez-López, A., Martínez-Bolaños, L., Ortíz-Gil, G., Martínez-Bolaños, M., Avendaño-Arrazate, C. H., & Hernandez-Meneses, E. (2020). Bioaceites esenciales inhiben a *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par) Evans et al., causante de la monilia en el cultivo de cacao. *Acta Agrícola y Pecuaria*, 6(1). <https://aap.uaem.mx/index.php/aap/article/view/130>.
- ICCO (2022). *Fine or Flavor Cocoa - International Cocoa Organization*. Recuperado de <https://www.icco.org/fine-or-flavor-cocoa/> Fecha de consulta 020224.
- Lahive, F., Hadley, P. y Daymond, A.J. (2019). The physiological responses of cacao to the environment and the implications for climate change resilience. A review. *Agronomy for Sustainable Development*. 39, 5. <https://doi.org/10.1007/s13593-018-0552-0>.
- da Silva Bomfim, N., Polis, Nakassugi L., Pinheiro, Oliveira J.F., Kohiyama, C.Y., Galerani Mossini, S.A., Grespan, R., Botão Nerilo, S., Mallmann, C.A., Abreu Filho, B.A., Machinski, y Jr, M. (2015). Antifungal activity and inhibition of fumonisin production by *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg. *Food Chemistry*. 166, 330–336. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.019>.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., y Feo, V. (2017). Essential Oils and Antifungal Activity. *Pharmaceuticals* (Basel). 10(4), 86. doi: 10.3390/ph10040086.
- Pandey, A.K., Sonker, N. y Singh, P. (2016). Efficacy of some essential oils against *Aspergillus flavus* with special references to *Lippia alba* oil an inhibitor of fungal proliferation and aflatoxin B1 production in green gram seeds during storage. *Journal Food Science*. 81 (4), M928-34. DOI: 10.1111/1750-3841.13254.
- Parrish, N., Fisher, S.L., Gartling, A., Craig, D., Boire, N., Khuvis, J., Riedel, S., y Zhang, S. (2020). Activity of various essential oils against clinical dermatophytes of *Mycrosporum* and *Trychophyton*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10, 545913. doi: 10.3389/fcimb.2020.545913.
- Pujiarti, R., Nurjanto, H., y Sunarta, S. (2018). Antifungal Activity of *Eucalyptus urophylla* Oil Against *Aspergillus niger* and *Fusarium oxysporum*. *Agrivita Journal of Agricultural Sciences*. 40(1), 55-62. doi:10.17503/agrivita.v40i1.990.
- Sanchez, F.V. (13 de Septiembre de 2023). Sector cacaoero proyecta una producción de 126.000 toneladas para final de década. <https://www.agronegocios.co/agricultura/dia-internacional-del-chocolate-2023-una-radiografia-del-sector-cacaotero-3703229>.
- Santos, A., García, M., Cotes, A.M., y Villamizar, L. (2012). Efecto de la formulación sobre la vida útil de bioplaguicidas a base de dos aislamientos colombianos de *Trichoderma koningiopsis* Th003 y *Trichoderma asperellum* Th034. *Revista Iberoamericana de Micología*. 29(3), 150-156. doi:10.1016/j.riam.2011.11.002.
- Sharafan, M., Jafernik, K., Ekiert, H., Kubica, P., Kocjan, R., Blicharska, E., y Szopa, A. (2022). *Illicium verum* (Star Anise) and *Trans-Anethole* as Valuable Raw Materials for Medicinal and Cosmetic Applications. *Molecules*. 27, 650. <https://doi.org/10.3390/molecules27030650>.
- Satyral, P., Jones, T.H., Lopez, E.M., McFeeters, R.L., Ali, N.A., Mansi, I., Al-Kaf, A.G., y Setzer W.N. (2017). Chemotypic Characterization and Biological Activity of *Rosmarinus officinalis*. *Foods*. 5, 6(3), 20. DOI: 10.3390/foods6030020.
- Soher, E., Bassem, A., Sabry, A., Mohamed, S., y Hathout, A.H. (2016). Assessment of antimycotoxigenic and antioxidant activity of star anise (*Illicium verum*) in vitro. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 15(1), 20-27. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2014.05.003>.
- Tariq, S., Wani, S., Rasool, W., Shafi, K., Bhat, M.A., Prabhakar, A., Shalla, A.H., y Rather, M.A. (2019). A comprehensive review of the bacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microbial Pathogenesis*. 134, 103580. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103580.
- Raveau, R., Fontaine, J., y Sahraoui, A. (2020). Essential Oils as Potential Alternative Biocontrol Products against Plant Pathogens and Weeds: A Review. *Foods*. 9, 3, 365. <https://doi.org/10.3390/foods9030365>.
- Ritz, C., y Streibig, J. C. (2005). Bioassay Analysis using R. *Journal of Statistical Software*. 12 (5), 1-22. 10.18637/jss.v012.i05.
- Villamizar, R.A., Osma, J.F., y Ortíz, O.O. (2016). Fungicidal effect of silver nanoparticles on toxigenic fungi in cocoa. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 51 (12), 1929-1936. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016001200003>.
- Villamizar, R.A., y González, E.E. (2023). *BioNanotecnología aplicada al cultivo de Theobroma cacao L.* Primera edición. Colección Biología y Ciencias Naturales. Sello Editorial UniPamplona. ISBN: 978-628-7656-01-7. <https://books.unipamplona.edu.co/index.php/editorial/catalog/book/40>.
- Xiang, F., Zhao, Q., Zhao, K., Pei, H., y Tao, F. (2020). The Efficacy of Composite Essential Oils against Aflatoxigenic Fungus *Aspergillus flavus* in Maize. *Toxins*. 12 (9), 562. doi: 10.3390/toxins12090562.