

DETERMINACION DE LA EFECTIVIDAD FUNGICIDA DEL ACEITE DE ORÉGANO CONTRA HONGOS QUE ATACAN GRANOS DE MAÍZ ALMACENADOS

R. Castro Franco; J. M. Sánchez Sánchez; R. Jacinto Soto¹

¹Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas- Universidad Autónoma Chapingo. Apartado Postal No. 8, Bermejillo, Dgo. 35230, México.

RESUMEN. Se determinó la actividad fúngica del aceite de orégano en el control de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. Los resultados indican que las concentraciones más efectivas fueron: 0.5 ml / L para lograr la mejor inhibición in vitro; En cuanto a los granos de maíz, 3 ml / L, evitaron la germinación de esporas, y 24 ml/L. controlaron la infestación de grano de maíz en 100 %. La humedad en el grano favoreció la infestación a pesar de la concentración de aceite de orégano (24 ml/L) .

Palabras clave: Aceite de orégano, inhibición, germinación, infestación, granos de maíz.

SUMMARY. The objective was to identify the use of the oil of oregano against infestations of the *Aspergillus fungi flavus* and *Aspergillus parasiticus*, (pathogenic that stored maize grains attack).The effective concentrations but were: 0,5 ml/L, to obtain the best inhibition in vitro; As far as maize grains, 3 ml/L, avoided the germination of spores, and 24 ml/L. controlled the infestation of maize grain in 100 %. the humidity in the grain favored the infestation in spite of the oregano oil concentration (24 ml/L).

Key words: Oil of oregano, inhibition, germination, infestation, grains of maize.

INTRODUCCION

Las zonas áridas de México tienen recursos forestales no maderables, de los cuales algunos son explotados y constituyen importantes fuentes de ingreso para los pobladores de estas regiones. Ejemplos de dichos recursos son: "Lechuguilla" *Agave lechuguilla* Torr., "Candelilla" *Euphorbia antisyphilitica* Zucc., y "Sotol" *Dasilirion leiophyllum* Engelm. para obtención de fibras duras o ixtle, cerote y bebidas alcohólicas respectivamente entre otros recursos (Benavides, 1991).

Otro de los recursos forestales no maderables que se explotan en ambientes áridos, es "el orégano" *Lippia berlandieri* Schauer. Su explotación en el municipio de Mapimí, toma gran importancia por ser una alternativa económica para los pobladores que no tienen otra actividad remunerativa. El aprovechamiento del orégano consiste en recolectar sus hojas, para luego comercializarlas en el mercado local. La población que realiza esta actividad se enfrenta al problema de precios bajos, derivado de la sobreoferta y la falta de valor agregado del producto (CONABIO, 2005).

La importancia del orégano crece al encontrar otras propiedades distintas a las tradicionales (alimentos, perfumería, y fármacos). Estudios actuales indican que el aceite de orégano ejerce poder inhibitorio sobre el crecimiento de hongos (Silva, 1998). Este hecho muestra un potencial enorme que puede aprovecharse para dar valor agregado al producto.

Se sabe que el crecimiento radial y la germinación de conidios de *Penicillium digitatum* es completamente inhibida por los aceites esenciales de orégano, tomillo y mejorana a concentraciones de 250 – 400 µg/ml (Dafarera *et al*, 2000).

Se reporta efectividad del aceite de orégano como fungicida contra: *Candida albicans*, *Phymatotricopsis omnivora*, *Rhizopus spp*, *Fusarium oxisporum* y *Phytoppthora capsici* (Portillo *et al*; 2005; CONABIO, 2005; Valero *et al*; 2005). Portillo *et al*; (2005), al hacer una prueba de antagonismo de hojas de orégano molido y aceites esenciales de orégano contra hongos como *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* responsables de la descomposición de alimentos,

encontraron que el aceite de orégano puede ser útil en el control de los hongos que ocasionan la descomposición de los alimentos. Lo anterior muestra el efecto fungicida del aceite de orégano contra diferentes hongos. Sin embargo, no hay reportes de trabajos realizados que prueben su efecto en el control de infestaciones en granos alimenticios almacenados. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto fungicida del aceite de orégano contra hongos que atacan granos de maíz almacenados.

MATERIAL Y METODOS

El trabajo se realizó en el laboratorio de la Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, (URUZA-UACH) localizada en el municipio de Tlahualilo Durango, a 3 Km. de Bermejillo Dgo., Con equipo de la URUZA y con material vegetativo silvestre colectado en la Sierra de Mapimí.

Fase de extracción en laboratorio

Preparación del orégano

Las plantas de orégano obtenidas en el campo, se secaron en la estufa a una temperatura de 35 °C, hasta que alcanzaron un peso constante. Posteriormente cada muestra fue limpiada cuidadosamente, para separar por un lado las hojas y flores y por otro los tallos y fibrillas de la corteza. Se tomaron para cada muestra el peso

seco de hojas y de tallos para generar la relación hoja-tallo. Antes de extraer los aceites se realizaron los análisis de porcentaje de humedad y porcentaje de cenizas.

Extracción del aceite de orégano

La extracción del aceite se realizó por el método de arrastre por vapor (Brewstwer *et al.*, 1970). El aceite recuperado se secó en columnas de sulfato de sodio anhidro, las muestras se pesaron y se midió su volumen, cada muestra fue depositada en recipiente estéril de vidrio con tapa de neopreno y se guardaron en la oscuridad a temperatura de entre 4 y 6 °C (para evitar oxidación rápida).

El presente trabajo incluyó una modificación al método, consistente en que la producción de vapor fue en olla de presión a la que se le adaptó una parrilla en donde se colocaron las hojas de orégano, de este modo se redujo el tiempo de extracción y se mejoró el rendimiento (Figura 1).

Actividad fungicida del aceite de orégano

Cepas de hongos y condiciones de crecimiento

Los hongos usados en este estudio fueron *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*. Estos fueron cultivados en papa dextrosa agar (PDA.) a temperatura de 26 °C. La

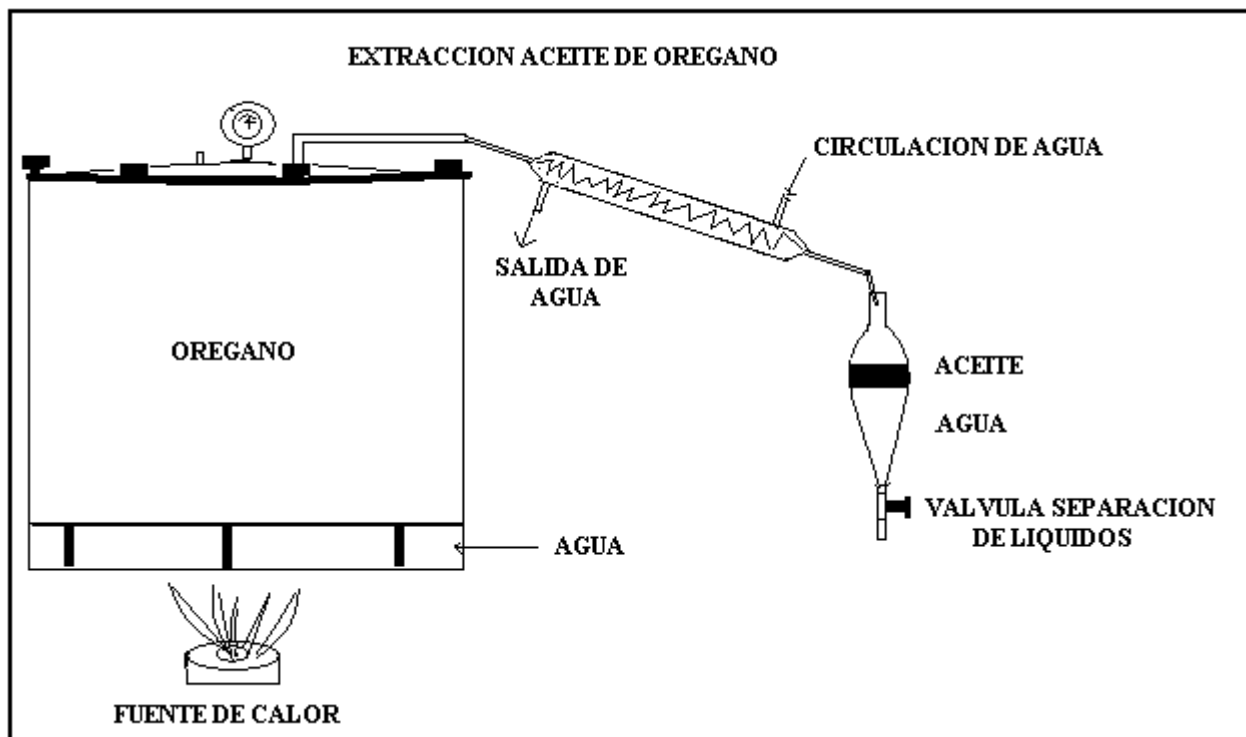


Figura 1. Extracción de aceites esenciales de orégano por arrastre de vapor.

cubierta de micelio se utilizó posteriormente como fuente de inóculo. Los discos se tomaron del margen de colonias de 4 días de edad y las esporas se quitaron de cada disco con agua esterilizada. Para el ensayo de germinación de las esporas, se hicieron suspensiones de esporas de cada hongo preparadas con agua estéril (10^3 esporas/ml medidas con un hemocitómetro).

Técnicas de Ensayo

Se tomaron frascos de vidrio (de 4.0 L de capacidad) con un fondo redondo, cerrados con un tapón de vidrio se ajustaron con un gancho y sirvieron como cámaras de fumigación. Los materiales de prueba se aplicaron en un cuadrado pequeño de papel filtro que se suspendió con un gancho junto con pequeñas jaulas de malla de alambre en las que se colocaron los discos con el micelio. Se determinó el efecto de supervivencia de la espóra, con suspensiones de la espóra (200 microL de cada hongo) expuesto en tubos de ensayo pequeños (biales) colocados en gradillas de plástico que fueron suspendidas por un gancho metálico. Para asegurar una distribución igual del aceite, se colocó un agitador magnético en el fondo de cada frasco, y se activó suavemente durante un periodo de exposición de 24 h. Los experimentos se efectuaron en un cuarto con una temperatura constante de 26 °C. Se transfirieron los discos del micelio a placas de petri (cada disco se puso en una placa por separado) conteniendo PDA. El período de incubación fue de 14 días a una temperatura de 26 °C. Transcurrido este tiempo, se midió el crecimiento lineal. Para el ensayo de germinación de las esporas, se tomaron tres porciones (2X 50 microL + 1 X 10 microL) de las suspensiones expuestas y se extendieron sobre la superficie de PDA en placas petri. Se contaron los granos con esporas germinadas durante el período de incubación a 26 °C durante 14 días.

Esterilización de la superficie de granos de maíz

Porciones del grano (100 g cada uno) se sumergieron durante 2 minutos en una solución al 2% de hipoclorito de sodio comercial (Clorox) y seguidamente se enjugaron (2 x 2 minutos) en agua estéril. El grano fue puesto a secar durante 1 h sobre un papel filtro estéril en una cámara estéril. El porcentaje de humedad del grano esterilizado fue de 10%, utilizando el método de estufa de circulación forzada (Anónimo, 1966).

Ensayos con granos de maíz

Ajuste de los granos a diferentes niveles de Porcentaje de humedad

Los granos se ajustaron a diferentes niveles de humedad, agregando agua estéril según el procedimiento descrito por Pixton (Pixton, 1967). El grano se mezcló completamente en una caja cerrada para permitir una distribución uniforme e incubada a 5 °C durante 14 días

(Pixton y Warburton, 1971). El porcentaje de germinación de esporas en granos de maíz se midió usando el método de ISTA (Anónimo, 1966).

Exposición de los granos a los materiales de la prueba.

Las porciones de granos (50 g cada uno) se introdujeron en los cestos de malla de alambre que se suspendieron con un gancho del tapón del frasco. Los granos fueron fumigados (por 24 a 72 h) con el aceite de orégano de la manera anteriormente descrita y de acuerdo a cada tratamiento, se pusieron los granos en cajas petri con PDA (10 granos/placa). La infestación con hongos, se definió como el por ciento de granos hongo-productivos estimados durante un período de 7 días de incubación a 26 °C.

Diseño experimental

El experimento correspondió a un diseño completamente al azar con un arreglo de tratamientos factorial. Para los tres primeros experimentos, intervinieron dos factores que fueron: concentración de aceite y hongo, para el último caso fueron concentración de aceite, hongo y humedad en los granos de maíz, en este la concentración de aceite fue constante por lo que se consideraron sólo dos factores. En general el tratamiento correspondió al siguiente modelo estadístico.

$$Y_{ijk} = m + F_i + \text{Rep}(F_i) + T_k^*(T_{TF})_{ik} + E_{ijk}$$

Donde:

Para halo de inhibición.

Y_{ijk} = halo de inhibición en mm, en cada concentración, i -ésima concentración de aceite, la j -ésima repetición, y en k -ésimo tipo de hongo.

Para porcentaje de germinación de esporas.

Y_{ijk} = porcentaje de germinación de esporas, en cada concentración, i -ésima concentración de aceite, la j -ésima repetición, y en k -ésimo tipo de hongo.

Para porcentaje de infestación de granos de maíz.

Y_{ijk} = porcentaje de germinación de esporas, en cada concentración, i -ésima concentración de aceite, la j -ésima repetición, y en k -ésimo tipo de hongo.

Para niveles de humedad en granos de maíz y 24 ml/L de aceite de orégano.

Y_{ijk} = porcentaje de infestación de esporas en granos de maíz, en cada concentración, i -ésimo nivel de humedad, la j -ésima repetición, y en k -ésimo tipo de hongo.

Y:

m = media general.

F_i = Efecto de la i -ésima concentración de aceite.
 $Rep(F_i)$ = Efecto aleatorio de la jk -ésima repetición dentro de la i -ésima concentración de aceite.
 $*(TF)_{ik}$ = Efecto de la interacción de la concentración de aceite y el tipo de hongo.
 E_{ijk} = Error aleatorio $e_{ijk} \sim NID(0, \sigma^2_e)$

los promedios de porcentajes de granos de maíz infestados mediante la prueba Tukey, con un nivel de significancia del 95 % encontramos que cuatro grupos de promedios fueron diferentes entre sí, el grupo "d" presentó el promedio más alto en cuanto al efecto del aceite de orégano contra la infestación de los hongos y como fue diferente a los demás grupos se tomó como el mejor efecto (Figura 3) .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Halo de inhibición

No se observó diferencia significativa con los diferentes tratamientos (0.5,1,2,3 ml / L de aceite de orégano), para el halo de inhibición tanto de *Aspergillus flavus* así como de *Aspergillus parasiticus*.

Porcentaje de germinación de esporas en granos de maíz

La concentración de 4 ml / L de aceite de orégano con 0 % de germinación de esporas fue la mejor, ya que las demás, no presentaron diferencia significativa (Figura 2).

Porcentaje de granos de maíz infestados

La infestación con hongos, se definió como el por ciento de granos hongo-productivos estimados durante un período de 7 días de incubación a 26 °C. Al comparar

La infestación de granos de maíz se redujo a 0 % con la concentración de 24 ml/L de aceite de orégano.

Niveles de humedad y 24 ml / L de aceite de orégano (AO)

Igual que el apartado anterior, la infestación de granos de maíz se definió como el por ciento de granos hongo-productivos estimados durante un período de 7 días de incubación a 26 °C. En la Figura 4, se observa que no hay efecto del aceite de orégano, ya que al incrementar los niveles de humedad, se incrementa también el porcentaje de infestación.

CONCLUSIONES

- No se observó efecto significativo en el halo de inhibición, para los hongos *A. flavus* y *A. Parasiticus*, con las diferentes concentraciones (0.5, 1, 2, 3 ml / L).

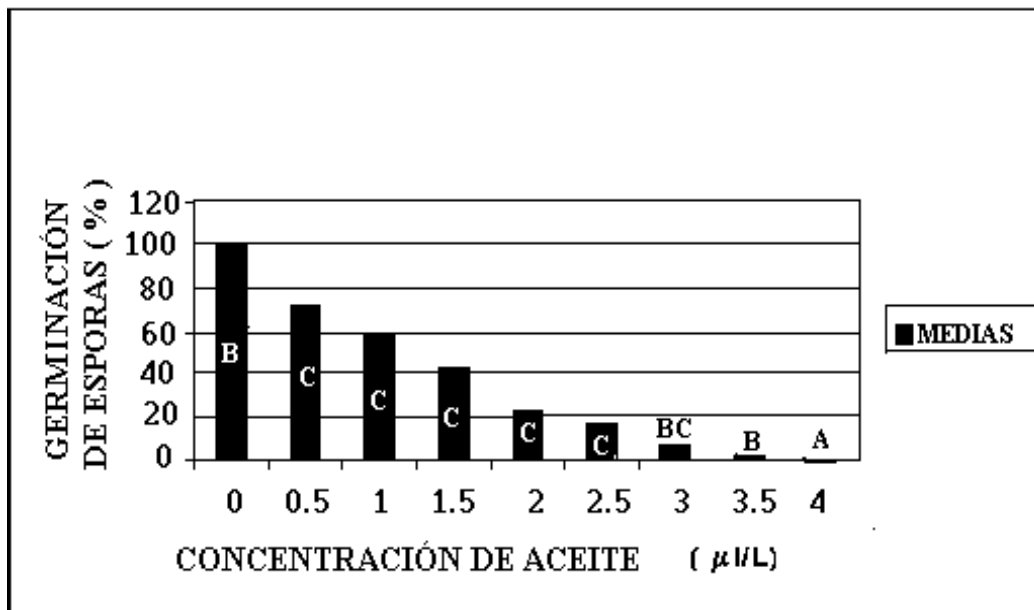


Figura 2. Gráfica de medias para germinación de esporas de *A. flavus* y *A. parasiticus* en granos de maíz.

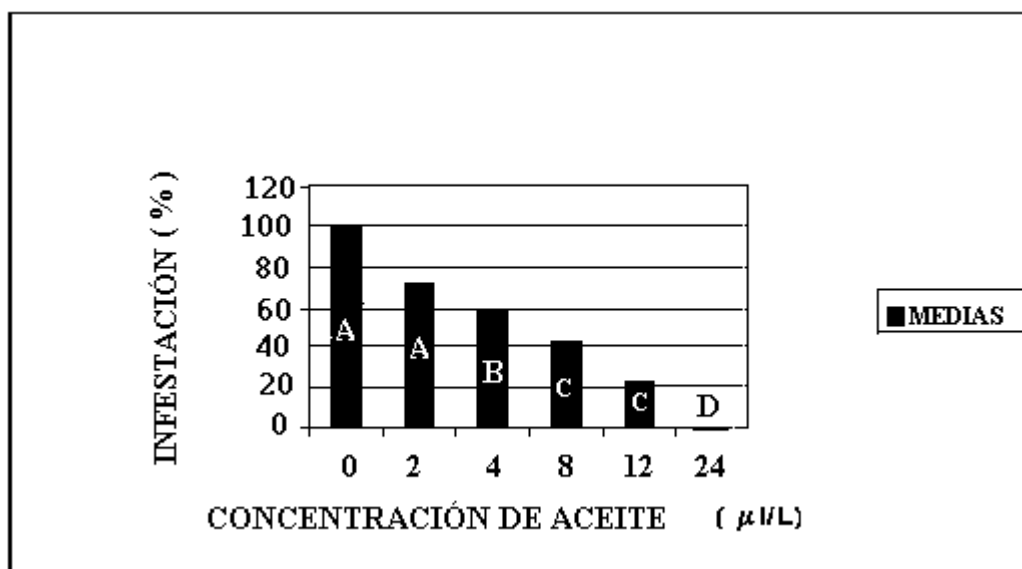


Figura 3. Gráfica de medias de infestación de *A. flavus* y *A. parasiticus* en granos de maíz.

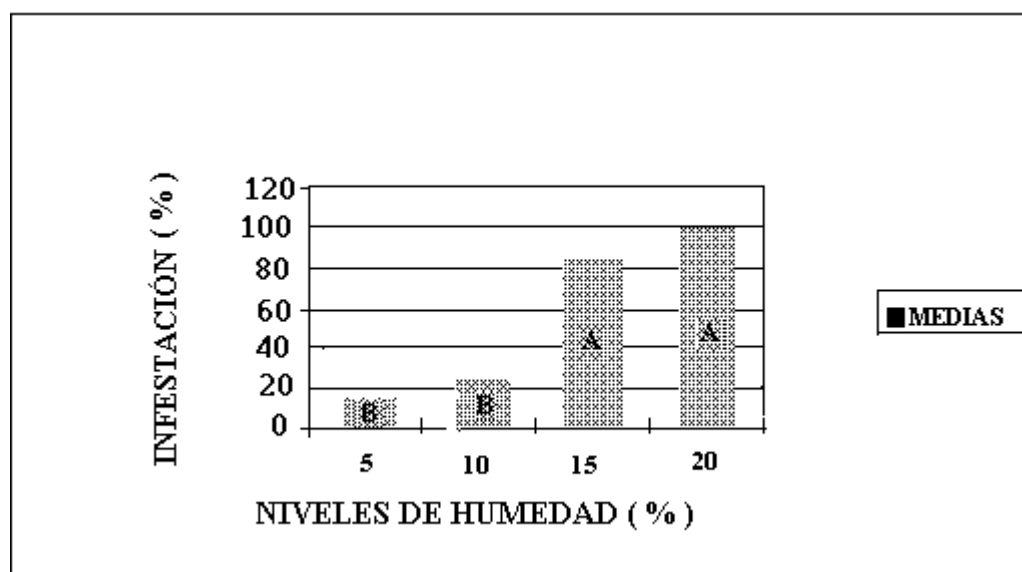


Figura 4. Gráfica de medias de infestación de *A. flavus* y *A. parasiticus* en granos de maíz.

- Las diferentes concentraciones de aceite de orégano surtieron efectos diferentes tanto para la germinación de esporas como para la infestación, en granos de maíz.

- Los niveles de humedad de los granos de maíz tuvieron mayor influencia que el aceite de orégano.

RECOMENDACIONES

Es necesario evaluar el efecto residual que tiene el aceite de orégano en granos almacenados, ya que se desconoce los niveles de toxicidad.

En base a los niveles tóxicos determinar la factibilidad de utilizar el aceite de orégano en granos almacenados.

LITERATURA CITADA

- Anonimo. 1966. International rules for seed testing. Proceedings of the International Seed Testing Association, Wagening, the Netherlands. 31, no. 1.
- Benavides G.C. 1991. Reproducción de dos especies de orégano (*Lippia graveolens* y *Poliomynta longiflora* A. Gray) En la región semiárida de

- Tamaulipas. Instituto de Ecología y Alimentos (UAT) <http://www.ecologia.uat.mx/biotam/atr3html>.
- Brewster, R. Q.; Vanderwerf, C.A. y Mc Ewen, W.E. 1970. Curso practico de química orgánica. Editorial Alambra. España.
- CONABIO (Comisión Nacional de Biodiversidad). 2005. Orégano Mexicano: oro vegetal.. Extraído el 28 de Enero de 2005 en <http://www.conabio.gob.mx/biodiversitas.htm>
- Dafarera, D. J.; Ziogas, B.N.; Polissiou, M.G. 2000. GC-MS Analysis of essential oils from some greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *J Agric Food Chem* 48, 2576 – 2581.
- Pixton, S.W. 1967. Moisture contentits significance and measurement in stored products. *J. Stored Prod. Res.* 3:35-47.
- Pixton, S.W. and Warburton.S 1971. Moisture content relative humidity equilibrium, at different temperatures of some oil seeds of economic importance. *J.Stored Prod.Res.* 7:261-269.
- Portillo, *et al.* (2005). Efecto antifúngico del orégano mexicano *Lippia berlandieri* (Schauer) contra hongos contaminantes de alimentos. Universidad Autonoma Chihuahua, Centro de Investigación en Recursos Naturales. Salaiques, Chihuahua.
- Silva, V. R. 1998. Efecto de la fertilización nitrogenada y fosforada sobre la cobertura foliar, altura de planta, y la composición del aceite esencial del orégano (*Lippia berlandier* Schauer) en el sur del Estado de Chihuahua. Tesis de maestría en ciencias en la Facultad de Ciencias Agrotecnológicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua. 82 pag.
- Valero, G.J.; Muñoz C., L.N.; Rivera Ch., B.E.; Rascón C., Q.; Silva V.R. y Nevárez M., G.V. (2005). control natural de cepas de *Phymatotrichopsis omnivora* (Shear) Duggar *In Vitro* Por medio de aceites esenciales de orégano. Centro de Investigación en Recursos Naturales. Salaiques, Chihuahua.