

Evaluación *in vitro* de la actividad fungistática del aceite esencial de mandarina sobre el crecimiento de *Penicillium* sp.

Evaluation *in vitro* of the fungistatic activity of the mandarin essential oil on the growth of *Penicillium* sp.

María A. Velásquez¹, Rafael M. Álvarez², Pablo J. Tamayo³, Catarina P. Carvalho⁴

¹Ingeniera Microbióloga Industrial. Corpoica, C.I. La Selva, Rionegro, Antioquia, Colombia. mavelasquez@corpoica.org.co

²Ingeniero Químico, PhD. Grupo de Investigación en Sustancias Bioactivas (GISB), Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. malvarez153@gmail.com

³Ingeniero Agrónomo, MSc. Corpoica, C.I. La Selva, Rionegro, Antioquia, Colombia. ptamayo@corpoica.org.co

⁴Ingeniera Agrónoma, PhD. Corpoica, C.I. La Selva, Rionegro, Antioquia, Colombia. cpassaro@gmail.com

Fecha de recepción: 17/09/2013

Fecha de aceptación: 30/01/2014

ABSTRACT

The fungi *Penicillium digitatum* and *P. italicum* represent the main global economic loss to the citrus industry during postharvest stage. Nowadays, the use of fungicides is increasingly restricted due to their carcinogenic, teratogenic, high residuality, long degradation period, environmental contamination, increased pathogen resistance, among others. Natural antimicrobial compounds could be a safe and viable option to minimize disease losses facing the industry. In this study, we evaluated *in vitro* the activity of tymol, carvacrol and commercial mandarin oil (Italian Mandarin) at concentrations of 40 and 50 ppm using the agar diffusion method and microbiological testing. All the essential oils evaluated for both fungi, showed an inhibition rate between 50% and 100%, and the effect was higher at doses of 50 ppm. This effect was followed by inhibition of sporulation and germination. Carvacrol showed the higher antifungal activity for both fungi studied. *P. digitatum* showed a greater sensitivity to the effect of the essential oils evaluated compared to *P. italicum*. Commercial mandarin essential oil can be an alternative to the control of postharvest diseases caused by *Penicillium* sp. in plant products.

Key words: citrus, essential oils, bioactivity, tymol, carvacrol.

RESUMEN

Los hongos *Penicillium digitatum* y *P. italicum* representan mundialmente la principal pérdida económica para el sector cítrico durante la etapa de poscosecha. El uso de fungicidas es cada vez más restringido debido a sus efectos carcinogénicos, teratogénicos, alta residualidad, período largo de degradación, contaminación ambiental y aumento de la resistencia por parte de los patógenos, entre otros. Los compuestos antimicrobianos de origen natural pueden ser una alternativa viable y segura para minimizar las pérdidas por enfermedades que enfrenta el sector. En este trabajo se evaluó y comparó *in vitro* la actividad antifúngica del aceite comercial de mandarina, timol y carvacrol, a concentraciones de 40 y 50 ppm, usando el método de difusión en agar y pruebas microbiológicas. Todos los compuestos y aceites evaluados presentaron un porcentaje de inhibición entre 50% y 100%, para ambos hongos, siendo mayor la inhibición en dosis de 50 ppm. Carvacrol presentó mayor actividad antifúngica sobre ambos hongos. *P. digitatum* mostró mayor sensibilidad que *P. italicum* al efecto de los aceites esenciales evaluados. El aceite esencial comercial de mandarina puede ser una alternativa para el control de enfermedades poscosecha causadas por *Penicillium* sp., en productos vegetales.

Palabras claves: aceites esenciales, bioactividad, cítricos, carvacrol, timol.

INTRODUCCIÓN

La infección por hongos fitopatógenos es una de las principales causas de las pérdidas poscosecha en frutos cítricos, estimándose entre 3% y 6% del producto en países desarrollados (Perucho y Tuset, 2002; González *et al.*, 2001), mientras que en Colombia se estiman pérdidas poscosecha generales muy superiores, entre 12% y 25% de la producción total (MADR, 2005). Las pérdidas provocadas por las enfermedades pueden ser muy variables y dependen de muchos factores como: área productora, especie, variedad, edad, condición de los árboles, condiciones climatológicas durante toda la campaña, época y forma de cosecha, manejo de los frutos en poscosecha, condiciones de almacenamiento y mercado de destino (Palou, 2012). En cítricos, las principales enfermedades en poscosecha las ocasionan los patógenos *Penicillium digitatum* Sacc. y *Penicillium italicum* Wehmer, causantes del moho verde y azul, respectivamente. Estos hongos son los que presentan mayor incidencia, llegando a producir cerca de 80% de las pérdidas poscosecha en cítricos (Tuset, 1987), y se constituye así en el eje básico de cualquier estrategia de control de enfermedades de cítricos en poscosecha. La infección del fruto tiene lugar a través de heridas o microheridas producidas en la corteza antes, durante o después de la cosecha, lo que da como resultado infecciones irreversibles en un espacio de tiempo de 48h a 20 – 25 °C (Brown, 1983).

La estrategia clásica de control de estos patógenos en poscosecha es el empleo de fungicidas, tales como Imazalil (IMZ), Tiabendazol (TBZ) y Ortofenilfenato Sódico (SOPP) (Carvalho *et al.*, 2011). Sin embargo, muchos de estos compuestos pueden resultar tóxicos para los humanos incluso en dosis bajas o permitidas, por lo que los compuestos antimicrobianos de origen natural, por su potencial bioactivo, han surgido como una alternativa viable y de mínimo riesgo para los consumidores.

Extractos de plantas, así como aceites esenciales y compuestos fenólicos son de gran interés debido a su actividad antifúngica (Pepeljnjak *et al.*, 2003; Zacchino *et al.*, 2003). Más de 280 especies han sido investigadas por sus efectos tóxicos, de las cuales cien han demostrado alguna actividad sobre el crecimiento de hongos (Montes y Carvajal, 1998), como *Aspergillus niger*, *A. ochraceus*, *A. flavus*, *Eurotium* sp., entre otros (Sharma y Tripathi, 2008). El aceite de orégano, tomillo, clavos, ajo, perejil, apio, entre otros, han demostrado actividad antimicrobiana (Paster *et al.*, 1990; Barrera y García, 2008, Mora *et al.*, 2001, Carrillo *et al.*, 2010; Alzate *et al.*, 2009). En naranjas Valencia, Navel y Navelate, se

han encontrado compuestos que son escasos en otras plantas y causan inhibición en hongos como el *Penicillium digitatum* (Ortuño *et al.*, 2006). Viuda *et al.* (2008) consideran que los aceites esenciales de cítricos pueden ser una adecuada alternativa al uso de conservantes químicos en la industria de alimentos, al verificar la actividad antifúngica de aceites esenciales de limón, pomelo y naranjo dulce sobre los principales hongos causantes de pérdidas en los alimentos (*Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Penicillium chrysogenum* y *P. verrucosum*).

Sharma y Tripathi (2008) evaluaron la actividad antifúngica de aceites esenciales extraídos a partir del epicarpo de naranjo dulce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) sobre el crecimiento de *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem, y encontraron una reducción o inhibición total proporcional a la dosis aplicada. Son muchos los factores que influyen en la composición de aceites esenciales, denominada quimiotipo, entre ellos los más importantes son el origen, la especie y el órgano de la planta (Deba *et al.*, 2008).

El efecto de los aceites esenciales se ve favorecido por bajas temperaturas, bajo pH y bajos niveles de oxígeno (Burt, 2004; Bosquez, Bautista y Morales, 2009). Esto pudiera indisponer los nutrientes necesarios para el desarrollo de los hongos e inclusive inhibirlos, probablemente en función de la concentración de aceite esencial.

Algunos monoterpenos como carvacrol y timol corresponden estructuralmente al grupo de monoterpenos oxigenados (fenólicos), que se encuentran representativamente en una amplia variedad de aceites esenciales. El espectro de su bioactividad depende de la concentración y la forma como actúan en mezcla con otros compuestos o individualmente (Bakkali *et al.*, 2008). Varios autores han divulgado la actividad fungistática de carvacrol y timol sobre diferentes hongos, tales como *Botrytis cinerea*, *Alternaria arborescens*, *Rhizopus stolonifer*, *Phytophthora capsici*, *Phytophthora citrophthora*, *Penicillium italicum* y *Penicillium expansum* (Hernández *et al.* 2007; Plotto *et al.*, 2003; Muller *et al.*, 1995; Camele *et al.*, 2012).

La principal ventaja de los aceites esenciales es que pueden ser utilizados sobre cualquier alimento y normalmente son considerados como sustancias seguras para el consumo humano (generalmente reconocidas como safe -GRAS) (Kabara, 1991).

El objetivo de este estudio fue evaluar *in vitro* el efecto del aceite esencial de mandarina y sus componentes (timol y carvacrol) a diferentes dosis sobre el crecimiento, esporulación y germinación de *Penicillium digitatum* y *P. italicum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aceites esenciales y compuestos

Los aceites esenciales evaluados fueron: aceite comercial de mandarina (italian mandarin oil), timol y carvacrol, adquiridos comercialmente en la casa Sigma-Aldrich.

Cepas de patógeno

Se utilizaron cepas de *Penicillium digitatum* 10030 (Pd) y *Penicillium italicum* 10129 (Pi) de la colección de la Universidad Boulevard (Manssas, Virginia) NRRL 786. Los hongos fueron conservados en PDA (papa dextrosa agar, Merck) y PSA (papa sucrosa agar, preparado con papa y sucrosa marca Merck) a 26 y 24 °C, respectivamente.

Prueba de difusión en agar

La evaluación de la inhibición de crecimiento de Pd y Pi por los aceites, se realizó mediante el método de difusión en agar de acuerdo con la metodología propuesta por Viuda-Martos *et al.* (2008), en el cual se inocula un disco de medio con hongo en el medio de cultivo con aceite. Se evaluaron concentraciones de 40 y 50 ppm de cada uno de los aceites que se disolvieron en dimetil sulfoxido (DMSO), se mezclaron con medio de cultivo PDA y PSA a una temperatura de 40 °C y se adicionaron posteriormente a cajas de Petri. La concentración de esporas de Pd y Pi se ajustó a 1×10^6 esporas/mL usando un hematocitómetro. Un disco de micelio de 0,5 cm de diámetro tomado de los hongos de 7 a 10 días de crecimiento, se colocó en el centro de la caja de Petri y se incubó a 26 °C para Pd y a 24 °C para Pi. Se utilizaron como testigos los medios de cultivos mencionados inoculados con los hongos sin los tratamientos. Cada tratamiento o concentración de cada aceite se realizó por triplicado. La efectividad de los tratamientos se evaluó cuando se alcanzó 70% de crecimiento del control y el porcentaje de inhibición micelial (PIM) fue calculado con la fórmula propuesta por Pandey *et al.* (1982).

$$PIM = \frac{dc - dt}{dc} \times 100$$

Donde:

dc = diámetro de la colonia del control
dt = diámetro de los tratamientos

Inhibición de la esporulación

Para la cuantificación de inhibición de la esporulación, se tomaron colonias de 10-12 días de crecimiento de los compuestos a las concentraciones más efectivas y se removieron las esporas con la ayuda de una espátula Drigalsky adicionando 10 mL de agua con Tween 80 al 0,1%; se agitó durante 60 segundos y se determinó la concentración de esporas por mililitro utilizando una cámara de Neubauer. El porcentaje de inhibición se calculó usando la fórmula anterior, ajustando a cantidad de esporas (Araújo *et al.*, 2008).

Inhibición de la germinación de esporas

Se preparó una suspensión de esporas a partir de Pd y Pi con 7 días de crecimiento. Se tomaron 5 discos de micelio de 5 mm de diámetro con sacabocados y se trasladaron a un tubo de ensayo con 10 mL de agua destilada estéril y se agitó en vórtex por 1 minuto. Una alícuota de 100 µL se diluyó sobre la superficie de las cajas de Petri que contenían una solución de aceite en agar: agua (a: a) a las concentraciones a evaluar. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Las cajas se incubaron a 25 °C de 18 a 24 horas, se marcaron con azul de lactofenol y se realizaron observaciones bajo el microscopio (40X). Se contaron 100 esporas y se determinó el porcentaje de microconidios germinados cuando el tubo germinativo de estos alcanzó el doble del tamaño de la conidia (Surender *et al.*, 1987).

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar con tres repeticiones. Los datos fueron transformados por la función análoga $\arcseno\sqrt{X}$ donde X corresponde a la variable medida (inhibición del crecimiento, germinación y esporulación). Con el programa estadístico Statgraphics Centurion XV, versión 15.2, se realizó un análisis de varianza (anova) para determinar diferencias significativas entre los datos, usando la prueba LSD Fisher con un nivel de confianza de 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inhibición del crecimiento de *P. digitatum* y *P. italicum*

Entre los 22 compuestos evaluados en un tamizaje inicial mediante el método difusión en agar descrito en la metodología, carvacrol y timol fueron los compuestos más

efectivos a las tres concentraciones evaluadas (30, 40 y 50 ppm). Las concentraciones de 40 y 50 ppm mostraron el porcentaje de inhibición más elevado para ambos hongos; y el aceite comercial de mandarina se presentó en el mismo grupo homogéneo de estos dos compuestos (datos no mostrados), por lo que el estudio se prosiguió solamente con carvacrol y timol y aceite comercial de mandarina a una concentración de 40 y 50 ppm.

El efecto observado con carvacrol y timol en este estudio concuerda con los resultados divulgados por otros autores, según los cuales estos compuestos inhibieron el crecimiento de hongos como *Botrytis cinerea*, *Alternaria arborescens* y *Rhizopus stolonifer* (Hernández *et al.*, 2007; Plotto *et al.*, 2003). También Muller *et al.* (1995) demostraron que timol y su isómero estructural carvacrol inhibió completamente el crecimiento de *Phytophthora capsici* pero a una concentración de 100 ppm. La actividad observada puede atribuirse a daños ocasionados en la célula fúngica, ya que se altera la capacidad reproductiva y germinativa.

Camele *et al.* (2012) registraron actividad fungistática para carvacrol y timol contra *P. citrophthora* y *R. stolonifer*. Citral y carvacrol inhibieron el crecimiento de *B. cinerea*

a 250 ppm y timol a 150 y 250 ppm. Además, timol mostró actividad fungistática y fungicida contra *P. italicum*. El crecimiento del micelio de *P. expansum* fue inhibido por timol y carvacrol a 250 ppm. Estos resultados representan un importante paso hacia el propósito del uso de algunos aceites esenciales o sus componentes como conservantes naturales de las frutas y alimentos, debido a la seguridad que ofrecen a la salud del consumidor y efecto positivo en el alargamiento de la vida útil de los productos agrícolas frescos.

En la tabla 1 se presentan los resultados de inhibición de crecimiento de ambos hongos para carvacrol, timol y aceite esencial de mandarina evaluados a diferentes concentraciones. Como se puede observar, para *P. digitatum* se alcanzó cerca del 100% de inhibición en todos los tratamientos y concentraciones evaluadas, sin diferencias significativas. Cabe resaltar además, que estos compuestos presentaron una efectividad a concentraciones inferiores (40 y 50 ppm) a las reportadas por Sánchez (2002), el cual encontró una concentración mínima inhibitoria para *Penicillium digitatum* de 100 ppm. Para en el hongo *P. italicum* sólo carvacrol mostró una inhibición de 100% del crecimiento a 50 ppm.

Tabla 1. Porcentaje de inhibición de crecimiento de *P. digitatum* y *P. italicum* para aceite comercial de mandarina, timol y carvacrol a diferentes concentraciones

Tratamientos	Inhibición de crecimiento (%)			
	<i>Penicillium digitatum</i>		<i>Penicillium italicum</i>	
	40 ppm	50 ppm	40 ppm	50 ppm
Carvacrol	100,0 A ^z a ^x	100,0 A	95,1 A ^z a ^x	100,0 A
Timol	99,9 A	100,0 A	78,1 B a	81,9 B a
Aceite comercial de mandarina	98,3 A	100,0 A	51,7 C a	64,5 C b
ANOVA	y		y	
Tratamiento (T) (2)	10,8478 NS		1,1397*	
Concentración (C) (1)	6,96889 NS		0,0648*	
T x C (2)	10,8478 NS		0,0129 NS	
Residual (12)	26,6267		0,05926	

^x: en cada fila los valores seguidos con letras iguales no difieren significativamente al 5% (Test LSD).

^z: en cada columna los valores seguidos con letras iguales no difieren significativamente al 5% (Test LSD).

^y: suma de cuadrados para cada uno de los parámetros. Los grados de libertad para cada factor se indican entre paréntesis.

NS: no significativo.

*: significativo para $P < 0,05$.

Tabla 2. Porcentaje de inhibición de esporulación de *P. digitatum* y *P. italicum* para aceite comercial de mandarina, timol y carvacrol a diferentes concentraciones

Tratamientos	Inhibición de esporulación (%)			
	<i>Penicillium digitatum</i>		<i>Penicillium italicum</i>	
	40 ppm	50 ppm	40 ppm	50 ppm
Carvacrol	99,8 A ^z A ^x	100,0 A	98,7 A ^z a ^x	99,8 A
Timol	99,7 A	100,0 A	98,8 A	99,4 A
Aceite comercial de mandarina	99,6 A	100,0 A	43,9 B a	92,2 B
ANOVA	y		y	
Tratamiento (T) (2)	0,00568 NS		0,9122*	
Concentración (C) (1)	0,000544 NS		0,2244*	
T x C (2)	0,00057 NS		0,2563*	
Residual (12)	0,0080		0,0562	

^x: en cada fila los valores seguidos con letras iguales no difieren significativamente al 5% (Test LSD).

^z: en cada columna los valores seguidos con letras iguales no difieren significativamente al 5% (Test LSD).

^y: suma de cuadrados para cada uno de los parámetros. Los grados de libertad para cada factor se indican entre paréntesis.

NS: no significativo.

*: significativo para P < 0,05.

Inhibición de la esporulación y germinación de conidios en *P. digitatum* y *P. italicum*

Los aceites esenciales afectan etapas del desarrollo de los hongos como la germinación de esporas, formación de estructuras de 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).

En este estudio, el porcentaje de inhibición de esporulación para *P. digitatum* no presentó diferencias significativas entre los tratamientos y concentraciones evaluados, alcanzándose valores de inhibición entre 99% y 100% para todos los tratamientos (tabla 2). Sin embargo, para *P. italicum* (tabla 2) el aceite comercial de mandarina registró valores significativamente inferiores de inhibición de la esporulación en comparación con los demás compuestos a ambas concentraciones evaluadas. Es de resaltar que a 40 ppm el porcentaje de inhibición de conidios no alcanzó la concentración mínima inhibitoria (CI₅₀), es decir, este aceite no superó el 50% de inhibición para *P. italicum*.

En general, nuestro estudio concuerda con lo encontrado por Caccioni *et al.* (1998), donde el *Penicillium digitatum* se mostró más sensible al efecto antifúngico de los aceites esenciales que el *Penicillium italicum*.

Respecto a la inhibición de germinación, se observaron los mismos resultados que para esporulación donde todos los tratamientos evaluados presentaron inhibición de crecimiento superior al 50%, excepto para el aceite comercial de mandarina a 40 ppm que mostró un porcentaje de inhibición de germinación del *P. italicum* significativamente inferior con respecto a los demás tratamientos al finalizar las observaciones (41,9%), (tabla 3). En este caso el aumento de la concentración de aceite se tradujo en mayor inhibición.

Los compuestos estudiados mostraron además de inhibición de crecimiento del hongo, inhibición de esporulación y germinación. Asimismo, el aceite comercial de mandarina redujo significativamente el crecimiento micelial de ambos hongos principalmente a 50 ppm. Esto concuerda con los estudios desarrollados por otros autores (Baratta *et al.*, 1998; Bellelli *et al.*, 2004; Chaisawadi *et al.*, 2005; Chanthaphon *et al.*, 2008; Sharma y Tripathi, 2008; Shukla *et al.*, 2000; Quintana *et al.*, 2010; Viuda *et al.*, 2008) donde se ha publicado la actividad inhibitoria del crecimiento y/o germinación de hongos, realizando análisis antifúngicos a diferentes condiciones, a partir de aceites esenciales de canela, orégano, mejorana, limoncillo, limón, mandarina, pomelo (*Citrus paradisi* L.) y naranja dulce.

Tabla 3. Porcentaje de inhibición de germinación de *P. digitatum* y *P. italicum* para aceite comercial de mandarina, timol y carvacrol a diferentes concentraciones

Tratamientos	Inhibición de germinación (%)			
	<i>Penicillium digitatum</i>		<i>Penicillium italicum</i>	
	40 ppm	50 ppm	40 ppm	50 ppm
Carvacrol	100,0 A ^Z A ^X	100,0 A a	99,6 A a	99,8 A a
Timol	99,4 A a	100,0 A a	97,1 A a	99,6 A a
Aceite comercial de mandarina	86,7 B a	98,5 B b	41,9 B a	81,3 B b
ANOVA	y		y	
Tratamiento (T) (2)	0,2127 *		1,4020 *	
Concentración (C) (1)	0,0504 *		0,1701 *	
T x C (2)	0,0534 *		0,1735 NS	
Residual (12)	0,0106		0,2731	

^X: en cada fila los valores seguidos con letras iguales no difieren significativamente al 5% (Test LSD).

^Z: en cada columna los valores seguidos con letras iguales no difieren significativamente al 5% (Test LSD).

^Y: suma de cuadrados para cada uno de los parámetros. Los grados de libertad para cada factor se indican entre paréntesis.

NS: no significativo.

*: significativo para $P < 0,05$.

Algunos estudios han concluido que los principales compuestos de aceites esenciales presentan mayor actividad fungistática en mezcla que individualmente (Gill *et al.*, 2002; Mourey y Canillac, 2002). Sin embargo, algunas veces se observa lo contrario, debido a que la presencia de componentes del medio puede afectar la sinergia y causar antagonismo entre compuestos (Burt, 2004).

Está claro que los aceites esenciales poseen notables propiedades antimicrobianas, sin embargo su mecanismo de acción aún no está definido. 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 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 (Quintana *et al.*, 2010).

CONCLUSIONES

En este trabajo, solamente se observaron diferencias significativas entre la actividad fungistática de los compuestos y del aceite comercial de mandarina para *P. italicum* que parece presentar mayor resistencia al efecto fungistático de los aceites. Sin embargo, esa diferencia se reduce para la concentración de 50 ppm de aceite de mandarina por lo que en términos de costos no se justifica el aislamiento de un compuesto en particular para el control de estos hongos en poscosecha de cítricos. La concentración inhibitoria más efectiva encontrada para ambos hongos fue de 50 ppm. El aceite esencial comercial de mandarina además de inhibir el crecimiento de ambos hongos mostró un efecto fungistático sobre estos hongos, por lo que de acuerdo con nuestro estudio, este aceite puede ser una alternativa para el control de enfermedades poscosecha causadas por *Penicillium* sp., en productos vegetales, requiriéndose más estudios para conocer el modo de acción y las alteraciones morfológicas que provoca este aceite sobre estos hongos.

REFERENCIAS

- Alzate NA, Lopez VK, Marin HA, Murillo AW. 2009. Evaluación preliminar de la actividad fungicida de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus tereticornis*, Myrtaceae) y cáscara de naranja (*Citrus sinensis*, Rutaceae) sobre algunos hongos filamentosos. *Revista Tumbaga* 4: 59-71.
- Araújo D, Rodríguez D, Sanabria ME. 2008. Respuesta del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense, causante del mal de Panamá, a algunos extractos vegetales y fungicidas. *Revista Fitopatología Venezolana* 21 (1): 2-8.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils -A review. *Food and Chemical Toxicology* 46: 446-45.
- Baratta MT, Dorman HJD, Deans SG, Figueiredo AC, Borroso JG, Ruberto G. 1998. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal* 13: 235-244.
- Barrera LL, García LJ. 2008. Actividad antifúngica de aceites esenciales sobre el crecimiento de *Fusarium* sp. *Revista Universidad de Oriente Agrícola* 8 (1): 33-41.
- Bosquez E, Bautista S, Morales J. 2009. Aceites esenciales: bioconservadores con alto potencial en la industria alimentaria. *Industria Alimentaria* 31: 12-24.
- Brown GE. 1983. Control of Florida citrus decay with Guazatine. En: *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 96: 335-337.
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology* 94: 223-253.
- Caccioni DR, Guizzardi M, Biondi DM, Renda S, Ruberto G. 1998. Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *International Journal of Food Microbiology* 43 (1-2): 73-79.
- Camele I, Altieri L, De Martino L, De Feo V, Mancini E, Rana GL. 2012. In vitro control of post-harvest fruit rot fungi by some plant essential oil components. *International Journal of Molecular Science* 13 (2): 2290-2300.
- Carrillo YA, Gómez MI, Cotes JM, Núñez CE. 2010. Efecto de algunos aceites esenciales sobre el crecimiento de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary en condiciones de laboratorio. *Agronomía Colombiana* 28 (2): 245-253.
- Carvalho CP, Nunes C, Palou L. 2011. Control de enfermedades de poscosecha. En: Garcés Giraldo L, Pássaro Carvalho C. (eds.) *Cítricos: cultivo, poscosecha e industrialización*. Serie Lasallista Investigación y Ciencia, Caldas, Colombia 285-306.
- Chaisawadi S, Thongbute D, Methawiriyasilp W, Pitakworarat N, Chaisawadi A, Jaturonrasamee K, Khemkhaw J, Tanuthumchareon W. 2005. Preliminary study of antimicrobial activities on medicinal herbs of Thai food ingredients. *Acta Horticulturae (ISHS)* 675: 111-114.
- Chanthaphon S, Chanthachum S, Hongpattarakar T. 2008. Antimicrobial activities of essential oils and crude extracts from tropical Citrus spp. against food-related microorganisms. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 30 (1): 125-131.
- Deba F, Xuan TD, Yasuda M, Tawat S. 2008. Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. Var. *Radiata*. *Food Control* 19: 346-352.
- González L, Veyrat A, López B, Marcos J. 2001. Aplicación de agentes de biocontrol y péptidos antifúngicos como alternativas para el control de las podredumbres de la postrecolección de frutos cítricos. *Levante Agrícola. Especial Postcosecha* 355: 145-154.
- Hernández AN, Bautista S, Velázquez MG. 2007. Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades poscosecha Hortofrutícolas. *Revista Fitotecnia Mexicana* 30 (2): 119 - 123.
- Kabara JJ. 1991. Phenols and chelators. In: NJ Russel and GW Gould (Eds). *Food preservatives*. Glasgow, Blackie. pp. 200-214.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR). 2005. *Observatorio Agrocadenas Colombia*. Documento de trabajo 107. La cadena de cítricos en Colombia: Una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. Bogotá D. C., 64 p.
- Montes R, Cruz V, Martínez G, Sandoval G, García R, Zilch S, Bravo L, Bermúdez K, Flores HE, Carvajal M. 2000. Propiedades antifúngicas de plantas superiores. Análisis retrospectivo de investigaciones. *Revista Mexicana de Fitopatología* 18: 125-131.
- Montes R, Carvajal M. 1998. Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their components. *Journal of Food Protection* 61: 616-619.
- Mora AL, Torres R, Afanador L, Hernández CL, Hoyos RA. 2001. Actividad antifúngica de aceites esenciales contra el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz), Penz & Sacc). XXII Congreso de la Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines (Ascolfi) Memorias. Medellín, julio 11 - 13, p. 10.
- Mourey A, Canillac N. 2002. Anti-*Listeria monocitogenes* activity of essential oils component of confiners. *Food Control* 13: 289-292.
- Muller MF, Berger B, Yegen O. 1995. Chemical composition and fungitoxic properties of phytopathogenic fungi of essential oils selected aromatic plants growing wild in Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43 (8): 2262-2266.
- Ortuño A, Baidez A, Gómez P, Arcas MC, Porras I, García-Lidon A, Del Río JA. 2006. Citrus paradisi and Citrus sinensis flavonoids: Their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum*. *Food Chemistry* 98: 351-358.
- Palou L. 2012. Situación actual del control de enfermedades de poscosecha de cítricos en España. *Revista de Fruticultura* 23: 24-31.
- Pandey DK, Tripathi NN, Tripathi RD, Dixit SN. 1982. Fungitoxic and phytotoxic properties of the Essential oil of *H. suaveolens*. *Zeit, Pflanzkran. Pflanzkran*, 89: 344-349.
- Paster N, Juven BJ, Shaaya E, Menasherov M, Nitzan R, Weisslowicz H, Ravid U. 1990. Inhibitory effect of Oregano and Thyme essential oils on molds and food borne bacteria. *Letters in Applied Microbiology* 11: 33-37.
- Pepeljnjak S, Kosalec I, Kalodera Z, Kustrak D. 2003. Natural antimycotics from Croatian plants. In: Rai M, Mares D. (eds.). *Plant-derived antimycotics. Current trends and future prospects*, Hartworth Press, New York. p. 49-79.
- Perucho R, Tuset JJ. 2002. Hongos causantes del podrido en clementinas y mandarinas en post-cosecha. *Levante Agrícola* 355: 101-106.
- Plotto AD, Roberts D, Roberts RG. 2003. Evaluation of plant essential oils as natural postharvest disease control of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Acta Horticulturae* 628: 737-745.
- Quintana EA, Plascencia M, González GA, Cortez MO. 2010. Inhibición del crecimiento de *Penicillium chrysogenum* por presencia de aceites de *Cinnamomum zeylanicum*, *Allium cepa* y *Cymbopogon citratus*. *Revista Mexicana de Micología* 32: 59-62.
- Sánchez C. 2002. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International* 8 (3): 121-37.

- Sharma N, Tripathi A. 2008. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiological Research* 163 (3): 337–344.
- Shukla AC, Shahi SK, Dixit A. 2000. Epicarp of *Citrus sinensis*: a potential source of natural pesticides. *Indian Phytopathology* 53 (4): 468–471.
- Surender P, Janalah, C, Reddy VK, Reddy SM. 1987. Antifungal activity of secretions of scent glands from *Heteroptera* bugs. *Indian Journal of Experimental Biology* 25: 233-234.
- Tuset JJ. 1987. Podredumbres de los frutos cítricos. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Conselleria de Agricultura y Pesca de la Generalitat Valenciana.
- Viuda M, Ruiz Y, Fernández J, Pérez J. 2008. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control* 19 (12): 1130–1138.
- Zacchino S, Yunes R, Cechinel V, Enriz RD, Kouznetsov V, Ribas JC. 2003. The need for new antifungal drugs: Screening for antifungal compounds with a selective mode of action with emphasis on the inhibitors of the fungal cell wall. In: Mahendra Rai, Donatella Mares (Eds.) *Plant Derived Antimycotics*, Haworth Press (New York). p. 1-47.