

Actividad antifúngica de hidrodestilados y aceites sobre *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum* y *Colletotrichum gloeosporioides**

Antifungal activity of hidrodestillates and oils on *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum* and *Colletotrichum gloeosporioides*

Sandra Isabel Ramírez González^{1§}, Orlando López Báez², Saúl Espinosa Zaragoza³ y Arnoldo Wong Villarreal⁴

¹Universidad Autónoma de Chiapas-Laboratorio de Agrotecnologías, Centro Universidad Empresa. Campus Ciudad Universitaria, km 8 Carretera Terán -Ejido Emiliano Zapata. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Tel. (961) 6178000 ext. 1725. (sanirg@yahoo.com). ²Universidad Autónoma de Chiapas, México. Laboratorio de Agrotecnologías, AUDES Cacao-Chocolate. Campus Ciudad Universitaria, km 8 Carretera Terán-Ejido Emiliano Zapata. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Tel. (961) 6178000 ext. 1725. (olopez@unach.mx). ³Universidad Autónoma de Chiapas-Facultad de Ciencias Agrícolas Campus IV. Entronque Carretera Costera y Estación Huehuetán, CP. 30660. Tel. (964) 62 7 01 28. (saulez1@gmail.com). ⁴Universidad Tecnológica de la Selva. Carretera Ocosingo-Altamirano Entronque Tonina km. 0.5 CP. 29950. Ocosingo. Chiapas. Tel. (919) 67 30 97 91 31. (wova79@hotmail.com). [§]Autor para correspondencia: mrmonroy@ipn.mx.

Resumen

El tomate y la papaya son cultivos de gran importancia económica para productores de Chiapas; sin embargo, atraviesan por una crisis productiva debida a las escasas alternativas para el manejo alternativo para sus principales enfermedades. En este estudio, se evaluó *in vitro* el efecto regulador de hidrodestilados y aceites de *Cinnamomum zeylanicum*, *Syzygium aromaticum* y *Pimenta dioica* (obtenidos por destilación tradicional y asistido por microondas) sobre *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum* aislados de *Lycopersicon esculentum* y sobre *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de *Carica papaya*. Se utilizó la técnica de medio envenenado, en un primer ensayo se probó concentración 30% (v/v) de hidrodestilados y 1% para aceites. Luego se determinó la concentración mínima inhibitoria. El efecto regulador se determinó cuantificando crecimiento micelial y formación de conidias. Los resultados indicaron que el hidrolato de clavo obtenido por destilación inhibió totalmente a *A. solani* y *F. oxysporum* al 30% y 10% a *C. gloeosporioides*, mientras que los asistidos por microondas de canela inhibieron a *A. solani* y *C. gloeosporioides* 10% y 30% a *F. oxysporum*, y el de clavo a 30% inhibe a *F. oxysporum* y *A. solani* y al 10% *C. gloeosporioides* y los

Abstract

Tomato and papaya are crops of great economic importance to producers from Chiapas; however, they are experiencing a production crisis due to limited options for alternative management of its major diseases. In this study, were assessed *in vitro* the regulatory effect hidrodestillates and *Cinnamomum zeylanicum*, *Syzygium aromaticum* and *Pimenta dioica* oils (obtained by traditional distillation and microwave assisted) on *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum* isolated from *Lycopersicon esculentum* and on *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Carica papaya*. Poisoned medium technique was used in a first trial a concentration of hidrodistillate at 30% (v/v) and 1% for oils were used. Then the minimum inhibitory concentration was determined. The regulatory effect was determined by quantifying mycelial growth and conidia formation. The results indicated that clove hidrodistillate completely inhibited *A. solani* and *F. oxysporum* at 30% and 10% to *C. gloeosporioides*, while cinnamon microwave-assisted inhibited *A. solani* and *C. gloeosporioides* 10% and 30% to *F. oxysporum*, and clove at 30% inhibits *F. oxysporum* and *A. solani* and at 10% *C. gloeosporioides* and cinnamon and clove oils at 0.05% inhibited *A. solani* and *C.*

* Recibido: septiembre de 2016
Aceptado: noviembre de 2016

aceites de canela y clavo al 0.05% inhibieron a *A. solani* y *C. gloesporioides*. Se concluye que los hidrodestilados y aceites de *C. zeylanicum*, *Z. aromaticum* y *P. dioica* obtenidos por microondas son más eficientes en inhibir el desarrollo de éstos patógenos que por destilación tradicional, los cuales pueden ser una alternativa para su manejo.

Palabras claves: *Cinnamomum zeylanicum*, *Syzygium aromaticum*, *Pimenta dioica*, hidrodestilación asistida por microondas.

Introducción

El uso de los plaguicidas de origen sintético han originado problemas por su uso irracional, tales como: la resistencia de las plagas a los plaguicidas, la presencia de residuos en las cadenas alimenticias y el ambiente físico (aire, agua, suelo), la destrucción de la fauna benéfica que es responsable de control natural de las plagas potenciales, el resurgimiento de las plagas después del tratamiento por los plaguicidas. Por tanto, el uso no inteligente de los plaguicidas, ha provocado la reducción de la interrelación trófica entre los organismos, la pérdida de biodiversidad, el desequilibrio ecológico y el decremento de la estabilidad ambiental (López *et al.* 2006).

La necesidad de reducir el uso de químicos sintéticos en la agricultura ha incrementado el interés por la posible aplicación de extractos vegetales y sus aceites esenciales para el control de fitopatógenos. Los extractos vegetales y aceites esenciales de cada planta pueden tener hasta más de sesenta componentes y de ellos puede haber varios con propiedades antifúngicas; generalmente están presentes como mezclas de compuestos y los patógenos pueden ser afectados diferencialmente por los compuestos individuales o por las mezclas en determinadas concentraciones y proporciones (Montes, 2009).

Diversos autores alrededor del mundo han reportado la actividad antifúngica de los extractos vegetales, aceites esenciales y sus compuestos realizado pruebas *in vitro*, en invernadero y en campo; utilizando diversos métodos de extracción de los metabolitos y mostrando variación de respuestas dependiendo de la especie, la parte utilizada, la concentración, la cepas de fitopatógenos y de la técnica de evaluación utilizada (Wilson, *et al.*, 1997; Gogoi *et al.*, 1997; Pitarokili *et al.*, 1999; Montes *et al.*, 2000; Meepagala *et al.*, 2002; Hernández *et al.* 2007; Ramírez, 2013).

gloesporioides. It is concluded that hidrodestillates and oils from *C. zeylanicum*, *Z. aromaticum* and *P. dioica* obtained by microwave are more efficient in inhibiting the growth of these pathogens than by traditional distillation, which can be an alternative for its management.

Keywords: *Cinnamomum zeylanicum*, *Syzygium aromaticum*, *Pimenta dioica*, microwave-assisted hydrodistillation.

Introduction

The use of synthetic pesticides have caused problems due to their irrational use, such as: pest resistance to pesticides, presence of residues in food chains and physical environment (air, water, and soil), destruction of beneficial fauna that is responsible for natural control of potential pests, pest resurgence after treatment with pesticides. Therefore, the unintelligent use of pesticides has led to the reduction of trophic interaction between organisms, biodiversity loss, ecological imbalance and decrease of environmental stability (López *et al.*, 2006).

The need to reduce the use of synthetic chemicals in agriculture has increased the interest by possible application of plant extracts and essential oils for the control of plant pathogens. Plant extracts and essential oils of each plant can have over sixty components and of them can be several with antifungal properties; generally are present as compounds mixtures and pathogens may be affected differentially by individual compounds or by mixtures in certain concentrations and ratios (Montes, 2009).

Several authors around the world have reported the antifungal activity of plant extracts, essential oils and their compounds performing *in vitro*, in greenhouse and field trials; using different extraction methods for metabolites and showing varying responses depending on the species, parts used, concentration, strains of pathogens and assessment technique used (Wilson *et al.*, 1997; Gogoi *et al.*, 1997; Pitarokili *et al.*, 1999; Montes *et al.*, 2000; Meepagala *et al.*, 2002; Hernández *et al.*, 2007; Ramírez, 2013).

However traditional extraction methods to obtain extracts have limited applicability because they require high processing times, toxic solvents, high temperatures that

Sin embargo los métodos tradicionales de extracción para la obtención de extractos tienen una limitada aplicabilidad, debido a que requieren altos tiempos de proceso, solventes de características tóxicas, emplean altas temperaturas que afecta la calidad del extracto final y económicamente son poco competitivos con otras alternativas de control (Ramírez, 2006).

Como alternativa se han desarrollado nuevas técnicas de extracción amigables con el medio, el producto y el ambiente, bajo nivel de riesgo para la salud humana y una calidad superior en los productos bioactivos. Entre estas alternativas se encuentran: el empleo de fluidos supercríticos que extrae de manera selectiva ciertas familias de compuestos con altos rendimientos y temperaturas inferiores a 50 °C (Martínez *et al.*, 2011); la extracción asistida por microondas (EAM) la cual requiere menor tiempo, menos uso de solventes con mayor tasa de extracción, ahorrando energía y obteniendo mejores productos con un menor costo y la asistida por ultrasonido (EAU) que reduce significativamente los tiempos de proceso gracias a la acción de ultrasonidos mayores a 16 KHz en el interior del extractor (Hayat *et al.*, 2009).

Cultivos como el tomate y la papaya son de gran importancia económica para muchos países, y de manera concreta para el estado de Chiapas se consideran como una alternativa para muchos productores, según datos de Servicio de información agroalimentaria y pesquera para 2014 el estado ocupa el cuarto lugar nacional en área de cultivo de papaya con un rendimiento de 80 t ha⁻¹, mientras que para el tomate rojo ocupa el doceavo y con un rendimiento de 35.72 t ha⁻¹ considerado bajo en comparación con otros estados productores. Un factor común en la producción de estos dos cultivos es el alto consumo de pesticidas que les permitan controlar los problemas fitosanitarios, los cuales dejan residuos en las frutas, elevan los costos de producción y contribuyen a la contaminación del medio ambiente. Por lo que los sistemas producto tomate y papaya han plasmado en sus planes rectores la necesidad de implementar alternativas de manejo para las principales enfermedades que son factor limitante para su producción (SAGARPA, 2012).

Es así como enfermedades en tomate tales como alternaria (*Alternaria solani*) y fusarium (*Fusarium oxysporum*) y antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en papaya son tratadas fundamentalmente con el uso de plaguicidas de síntesis química, además algunos productores por mantener una mayor vida de anaquel de sus productos sin presencia de patógenos aplican productos unos pocos días antes de

afectar la calidad del extracto final y no económicamente competitiva con otras alternativas de control (Ramírez, 2006).

Como alternativa se han desarrollado nuevas técnicas de extracción ambientalmente amigables, el producto y el ambiente, bajo niveles de riesgo para la salud humana y una calidad superior en los productos bioactivos. Entre estas alternativas se encuentran: el uso de fluidos supercríticos que extrae selectivamente ciertas familias de compuestos con alto rendimiento y temperaturas inferiores a 50 °C (Martínez *et al.*, 2011); extracción asistida por microondas (MAE) que requiere menos tiempo, menor uso de solventes con mayor tasa de extracción, ahorro de energía y mejores productos a menor costo y ultrasonido asistido (EAU) que reduce significativamente los tiempos de procesamiento gracias a la acción de ultrasonidos mayores a 16 KHz en el interior del extractor (Hayat *et al.*, 2009).

Cultivos como el tomate y la papaya son de gran importancia económica para muchos países, y de manera concreta para el estado de Chiapas se consideran como una alternativa para muchos productores, según datos del Servicio de información agroalimentaria y pesquera para 2014, el estado ocupó el cuarto lugar nacional en área de cultivo de papaya con un rendimiento de 80 t ha⁻¹, mientras que para el tomate rojo ocupó el doceavo y con un rendimiento de 35.72 t ha⁻¹ considerado bajo en comparación con otros estados productores. Un factor común en la producción de estos dos cultivos es el alto consumo de pesticidas que les permitan controlar los problemas fitosanitarios, los cuales dejan residuos en las frutas, elevan los costos de producción y contribuyen a la contaminación del medio ambiente. Por lo que los sistemas producto tomate y papaya han plasmado en sus planes rectores la necesidad de implementar alternativas de manejo para las principales enfermedades que son factor limitante para su producción (SAGARPA, 2012).

Así como enfermedades en tomate tales como alternaria (*Alternaria solani*) y fusarium (*Fusarium oxysporum*) y antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en papaya son tratadas fundamentalmente con el uso de plaguicidas de síntesis química, además algunos productores por mantener una mayor vida de anaquel de sus productos sin presencia de patógenos aplican productos unos pocos días antes de

afectar la calidad del extracto final y no económicamente competitiva con otras alternativas de control (Ramírez, 2006).

Como alternativa se han desarrollado nuevas técnicas de extracción ambientalmente amigables, el producto y el ambiente, bajo niveles de riesgo para la salud humana y una calidad superior en los productos bioactivos. Entre estas alternativas se encuentran: el uso de fluidos supercríticos que extrae selectivamente ciertas familias de compuestos con alto rendimiento y temperaturas inferiores a 50 °C (Martínez *et al.*, 2011); extracción asistida por microondas (MAE) que requiere menos tiempo, menor uso de solventes con mayor tasa de extracción, ahorro de energía y mejores productos a menor costo y ultrasonido asistido (EAU) que reduce significativamente los tiempos de procesamiento gracias a la acción de ultrasonidos mayores a 16 KHz en el interior del extractor (Hayat *et al.*, 2009).

Cultivos como el tomate y la papaya son de gran importancia económica para muchos países, y de manera concreta para el estado de Chiapas se consideran como una alternativa para muchos productores, según datos del Servicio de información agroalimentaria y pesquera para 2014, el estado ocupó el cuarto lugar nacional en área de cultivo de papaya con un rendimiento de 80 t ha⁻¹, mientras que para el tomate rojo ocupó el doceavo y con un rendimiento de 35.72 t ha⁻¹ considerado bajo en comparación con otros estados productores. Un factor común en la producción de estos dos cultivos es el alto consumo de pesticidas que les permitan controlar los problemas fitosanitarios, los cuales dejan residuos en las frutas, elevan los costos de producción y contribuyen a la contaminación del medio ambiente. Por lo que los sistemas producto tomate y papaya han plasmado en sus planes rectores la necesidad de implementar alternativas de manejo para las principales enfermedades que son factor limitante para su producción (SAGARPA, 2012).

Así como enfermedades en tomate tales como alternaria (*Alternaria solani*) y fusarium (*Fusarium oxysporum*) y antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en papaya son tratadas fundamentalmente con el uso de plaguicidas de síntesis química, además algunos productores por mantener una mayor vida de anaquel de sus productos sin presencia de patógenos aplican productos unos pocos días antes de

llevarlos a la venta, por lo que los plaguicidas no logran degradarse, reduciendo con ello la calidad biológica de los productos a comercializar.

En este trabajo se estudió la efectividad *in vitro* de extractos vegetales de *Pimienta dioica*, *Cinnamomum zeylanicum* Nees, *Syzygium aromaticum* L., obtenidos mediante destilación y microondas, sobre *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de *Carica papaya*, así como para los patógenos *Alternaria solani* y *Fusarium oxysporum* aislados de *Lycopersicon esculentum* con el propósito de generar alternativas viables para el manejo de éstos patógenos.

Metodología

En el Laboratorio de Agrotecnologías de la Universidad Autónoma de Chiapas fueron aislados y caracterizados los hongos *Alternaria solani* y *Fusarium oxysporum* de tomate y *Colletotrichum gloeosporioides* de papaya procedentes de plantas infectadas de la región Frailesca, del estado de Chiapas, México; los cuales fueron incubados en medio PDA a 23° +/- 2 °C. Las plantas de las cuales se obtuvieron los extractos para determinar su efectividad en el control de hongos fueron frutos secos de *Pimienta dioica*, corteza seca de *Cinnamomum zeylanicum* Nees y botones florales secos de *Syzygium aromaticum* L., con los cuales se elaboraron los extractos empleando dos métodos de extracción:

Hidrolato por destilación: se empleó un destilador adaptado para obtención de extractos. El material vegetal seco (250 g L⁻¹) se colocó dentro de la marmita del destilador junto con el agua, se tapó herméticamente para hacer el proceso de extracción continuo mediante la aplicación de calor y presión constante, el vapor fue conducido a un condensador y, mediante enfriamiento con agua corriente se obtuvo el hidroddestilado.

Extracción por hidroddestilación asistida por microondas: se utilizó la radiofrecuencia de un microondas adaptado para la extracción de los metabolitos, bajo las siguientes condiciones: 220 Kw de potencia, un periodo de 1 800 s y 2.450 MHz. Para realizar la extracción se colocó en la salida del equipo un condensador de reflujo con agua fría. La muestra se colocó en una gasa retenida por una malla de algodón, se generó el vapor en la parte inferior del matraz, para tal efecto se pusieron 300 ml de agua purificada y el vapor generado atravesó las muestras arrastrándose el aceite esencial con el vapor. La

papaya, as well as pathogens *Alternaria solani* and *Fusarium oxysporum* isolated from *Lycopersicon esculentum* with the purpose to generate viable alternatives to manage these pathogens.

Methodology

In the Laboratory of agro-technologies from the Autonomous University of Chiapas were isolated and characterized the fungi *Alternaria solani* and *Fusarium oxysporum* from tomato and *Colletotrichum gloeosporioides* from papaya collected in the Frailesca region, of the state of Chiapas, Mexico; which they were incubated on PDA medium at 23° +/- 2 °C. The plants of which extracts were obtained to determine their effectiveness to control fungi were *Pimienta dioica*, dried bark of *Cinnamomum zeylanicum* Nees and dried flower buds of *Syzygium aromaticum* L., with which were prepared the extracts using two extraction methods:

Hydrodistillation: a distiller adapted to obtain extracts was used. The dried plant material (250 g L⁻¹) was placed inside the pot distiller along with water, hermetically closed for the continuous extraction process through the application of heat and constant pressure, the steam was taken to a condenser and, by cooling with tap water the hidroddestillate was obtained.

Microwave assisted hydrodistillation extraction: a microwave radio frequency adapted to extract metabolites, under the following conditions was used: 220 Kw power, period of 1 800 s and 2 450 MHz. To perform the extraction was placed in the output of the equipment a reflux condenser with cold water. The sample was placed in gauze retained by a cotton mesh, the vapor generated at the bottom of the flask, to this end 300 ml of purified water were placed and the steam generated crossed the samples pulling the essential oil with the steam. Water began to boil after 590 s reaching a temperature of 89 °C. A final temperature of 91 °C was obtained. It worked with a sample of 250 g. Finally the essential oil of the hidroddestillate was separated, for this purpose a separatory funnel was used.

Trial 1. Screening to determine the effectiveness of extracts: poisoned medium with the extract was used. Initially, a screening test in which each extract was added individually to the medium potato-dextrose-agar (PDA) at a concentration

ebullición del agua comenzó transcurridos 590 s alcanzando una temperatura de 89 °C. Se obtuvo una temperatura final de 91 °C. Se trabajó con una muestra de 250 g. Finalmente se separó el aceite esencial del hidrodestilado, para tal efecto se utilizó un embudo de separación.

Ensayo 1. Screening para determinar efectividad de los extractos: se utilizó la técnica de medio envenenado con el extracto. Inicialmente se realizó un ensayo exploratorio en la que cada extracto se añadió de manera individual al medio de cultivo papa-dextrosa-agra (PDA), a una concentración del 30% (volumen/volumen) para los hidrodestilados, para el caso de aceites fue 0.1%; una vez preparado el medio con el extracto se procedió a servirlo en cajas petri estériles y se realizó la inoculación del respectivo hongo. Los cultivos fueron mantenidos en sala de cultivo bajo condiciones controladas de 23 °C +/- 2 °C y se incluyó un testigo absoluto en el cual el hongo fue cultivado en el medio original (PDA) sin ningún control. Se estudiaron un total de 10 tratamientos por patógeno y un total de 30 para éste ensayo.

El efecto inhibitorio se cuantificó mediante el crecimiento cada 24 h del diámetro del micelio del patógeno durante 12 días. También se cuantificó la producción de esporas, mediante la cámara de Neubauer. La unidad experimental estuvo constituida por una caja de petri y los tratamientos fueron distribuidos en un diseño completamente al azar con cinco repeticiones. Para determinar los efectos de los tratamientos estudiados, a los datos obtenidos se les practicó un análisis de varianza y la prueba de comparación de Tukey al 0.05%.

Ensayo 2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Los extractos que presentaron inhibición total del crecimiento y desarrollo del patógeno, se les determinó la CMI; evaluando concentraciones de 20, 10 y 5% (V/V) y para el caso del aceite se evaluaron 0.05 y 0.01% (V/V). Igualmente se empleó la técnica de difusión en agar y se evaluó crecimiento y formación de conidias con el mismo procedimiento descrito para el anterior ensayo.

Resultados

Ensayo 1. Los resultados para las dos variables evaluadas para cada hongo se presentan en el Cuadro 1. Para el caso de *Alternaria solani* se aprecia como el clavo en hidrolato

de 30% (vol/vol) was performed for hidrodestillates, for oils it was 0.1%; once the medium is prepared with the extract, it proceeded to pour it in sterile petri dishes and inoculation of the respective fungus was performed. Cultures were maintained in culture room under controlled conditions of 23 °C +/- 2 °C and an absolute control in which the fungus was cultured in the original medium (PDA) without any control was included. A total of 10 treatments per pathogen and a total of 30 for this test were studied.

The inhibitory effect was quantified through growth every 24h of mycelia diameter from pathogen for 12 days. Spore production was also quantified by Neubauer chamber. The experimental unit consisted of a petri dish and the treatments were distributed in a completely randomized design with five replications. To determine the effects of the treatments under study, the data underwent an analysis of variance and Tukey at 0.05%.

Trial 2. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC)

Extracts showing complete growth inhibition and pathogen development, were determined MIC; evaluating concentrations of 20, 10 and 5% (V/V) and for oils 0.05 oil and 0.01% (V/V). Similarly agar diffusion was employed and growth and conidia formation with the same procedure described for the above test was evaluated.

Results

Trial 1. The results for the two variables evaluated for each fungus are presented in Table 1. In the case of *Alternaria solani* it can be seen how clove (obtained by distillation and microwave) and oil did not allow growth and development of the pathogen, while for cinnamon this inhibitory effect was made by the microwave and oil treatments which recorded statistically significant differences with respect to absolute control. The analysis of variance conducted for the three pathogens recorded differences between treatments.

In the case of pepper, both Hydrolates and oils allowed the growth and formation of conidia of the pathogen; however, it is appreciated that treatments allowed mycelial growth inhibiting between 58.61% to 28.31% conidia formation compared to absolute control, showing statistically significant differences with it.

(obtenido por destilación y microondas) y el aceite, no permitieron el crecimiento y desarrollo de patógeno, mientras que para el caso de la canela este efecto inhibitorio lo presentó el hidrolato obtenido por microondas y el aceite, tratamientos que registraron diferencias estadísticas con respecto al testigo absoluto. El análisis de varianza practicado para los tres patógenos registró diferencias entre los tratamientos.

These results show higher inhibition percentages in growth and conidia formation to that reported by other authors; Such as Pupo *et al.* (2011) who evaluated 11 Cuban naturalized plants on *Alternaria solani* and found that flowers extracts of *T. erecta* and leaves of *L. peltata* stimulated the growth of *A. solani*. While flower extracts of *L. camara* and complete plant of *C. viscosa* with 2 mg mL⁻¹ inhibited more

Cuadro 1. Efecto de extractos y aceites de sobre el crecimiento y formación de conidias de *A. solani*, *F. oxysporum* y *C. gloesporioides*.

Table 1. Effect of extracts and oils on growth and conidia formation of *A. solani*, *F. oxysporum* and *C. gloesporioides*.

Tratamiento- patógeno	A. solani		F. oxysporum		C. gloesporioides	
	Crecimiento (mm)	Conidias (X10 ⁶ mL ⁻¹)	Crecimiento (mm)	Conidias (X10 ⁶ mL ⁻¹)	Crecimiento (mm)	Conidias (X10 ⁶ mL ⁻¹)
Clavo hidrolato destilación 30%	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
Clavo hidrolato microondas 30%	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
Clavo aceite 0.1%	0 a	0 a	15.50 c	0 a	0 a	0 a
Canela hidrolato destilación 30%	49.5 b	13.34 c	36.75 d	12.42 c	2.5 b	0 a
Canela hidrolato microondas 30%	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
Canela aceite 0.1%	0 a	0 a	11 b	0 a	0 a	0 a
Pimienta hidrolato destilación 30%	49.75 b	10.64 b	50 e	10.35 b	0 a	0 a
Pimienta hidrolato microondas 30%	49 b	9.1 b	12.5 b	0 a	0 a	0 a
Pimienta aceite 0.1%	49.75 b	18.43 d	50 e	21.91 d	46 d	8.86 b
Testigo	50 b	25.71 e	50 e	28.25 e	37.25 c	8.05 b

*Medias con la misma letra en la misma columna no son estadísticamente diferentes en la prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$).

Para el caso de pimienta, tanto los hidrolatos como el aceite permitieron el crecimiento y formación de conidias del patógeno; sin embargo, se aprecia que los tratamientos que permitieron crecimiento micelial inhibieron entre 58.61% a 28.31% la formación de conidias con respecto al testigo absoluto, mostrando diferencias estadísticas con éste.

Estos resultados muestran mayores porcentajes de inhibición en crecimiento y formación de conidias a lo reportado por otros autores; tal es el caso de Pupo *et al.* (2011) quienes evaluaron 11 plantas naturalizadas cubanas sobre *Alternaria solani* y encontraron que los extractos de flores de *T. erecta* y de hojas de *L. peltata* estimularon el crecimiento de *A. solani*. Mientras que con los extractos de flores de *L. camara* y planta completa de *C. viscosa*, con 2 mg mL⁻¹ inhibieron más de 50% de la germinación de los conidios y con 3 mg mL⁻¹ superaron 80%. El extracto de flores de *L. dulcis*, a esta misma dosis, alcanzó 93.5% de inhibición que estadísticamente resultó similar a la actividad mostrada por el Zineb (91.2%). Santander y Aquino (2009), reportan el efecto regulador del extracto acuoso de *Allium sativum* a concentraciones superiores al 50%, sin embargo reportan efecto fungistático ya que presentó crecimiento pasados 7 días de incubación.

than 50% conidia germination and with 3 mg ml⁻¹ exceeded 80%. Flower extract of *L. dulcis*, at the same dose, reached 93.5% inhibition which was statistically similar to the activity shown by Zineb (91.2%). Santander and Aquino (2009), report the regulating effect of the aqueous extract of *Allium sativum* at concentrations above 50%, however report fungistatic effect since showed growth after 7 days of incubation.

In the case of *F. oxysporum*, clove (both obtained by distillation and microwave) exerted total inhibitory effect, as cinnamon obtained by microwave, however in cinnamon and clove oils and pepper obtained by microwave, although registered growth, conidia formation was not present, and showed statistical differences compared with the control, which recorded the highest growth values and conidia formation. These results confirm those reported by López-Benítez *et al.* (2005), who showed that aqueous extracts of cinnamon and clove inhibited the growth of *F. oxysporum*, however showed how clove extract had lower activity on this pathogen than on *Rhizoctonia solani* and *Verticillium danieliae* at 144 h of incubation.

Para el caso de *F. oxysporum*, el hidrolato de clavo (obtenido tanto por destilación como por microondas) ejerció un efecto inhibitorio total, así como el hidrolato de canela obtenido por microondas, sin embargo en los aceites de canela y clavo y el hidrolato de pimienta obtenidos por microondas, a pesar que registraron crecimiento, no se presentó formación de conidias, y presentaron diferencias estadísticas con respecto al testigo, el cual registró los mayores valores de crecimiento y formación de conidias. Estos resultados que confirman lo reportado por López-Benítez *et al.* (2005), quienes demostraron que extractos acuosos de canela y clavo inhibieron el crecimiento de *F. oxysporum*, sin embargo evidenciaron como el extracto de clavo presentó menor actividad sobre éste patógeno que sobre *Rhizoctonia solani* y *Verticillium danieliae* a las 144 h de incubación.

Investigaciones realizadas por Barrera y García (2008), indican que los aceites de canela y clavo no inhibieron completamente el crecimiento de *Fusarium sp.* aislado de papaya, siendo el aceite de clavo el que presentó la mayor inhibición (84 al 29%), mientras que la canela registró una inhibición 68 a 30% utilizando $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ - $300 \mu\text{g mL}^{-1}$, resultados que coinciden con la presente investigación ya que ninguno de los dos aceites inhibió el crecimiento de *F. oxysporum*; sin embargo, el mayor porcentaje de inhibición se registró para el aceite de canela con 78%, mientras que el aceite de clavo fue de 69%, diferencia que puede ser debida a la procedencia del material o del proceso de extracción.

Los resultados del efecto de los tratamientos sobre *C. gloeosporioides*, se aprecia que tan solo en el aceite de pimienta permitió el crecimiento y formación de conidias superando incluso al testigo absoluto, mientras que el hidrolato de canela obtenido por destilación, solo presentó crecimiento del patógeno, registrando diferencia con los demás tratamientos, los cuales inhibieron tanto crecimiento como formación de conidias, apreciándose que el proceso de extracción utilizando microondas permite extraer mayor cantidad de metabolitos activos, ya que a la misma concentración inhibió completamente el crecimiento y formación de conidias.

Los resultados obtenidos con los aceites de clavo y canela no coinciden con los reportados por Martínez *et al.* (2012), quienes evaluaron diferentes concentraciones de estos aceites integrándolos en películas comestibles para recubrir papayas encontrando que a concentraciones del 0.08 a 0.06% reducían la infección de patógenos siendo más efectivo el aceite del clavo con una inhibición 88.9%, mientras el de canela fue 78%.

Research by Barrera and García (2008) indicate that cinnamon and clove oils did not completely inhibit the growth of *Fusarium sp.* Isolated from papaya, being clove oil which showed the greatest inhibition (84 to 29%), while cinnamon recorded inhibition of 68 to 30% using 100 mg mL^{-1} - 300 mg mL^{-1} , results that agree with the ones from this investigation since neither of the two oils inhibited the growth of *F. oxysporum*; however, the highest inhibition percentage was recorded for cinnamon oil with 78%, while clove oil was 69%, difference that may be due to the origin of the material or from the extraction process.

The results of treatments effect on *C. gloeosporioides*, shows that only in oil pepper allowed the growth and conidia formation surpassing even absolute control, while cinnamon obtained by distillation, only allowed growth of the pathogen, registering difference with other treatments, which inhibited both growth and conidia formation, appreciating that the extraction process using microwaves allows to extract larger amount of active metabolites, since the same concentration completely inhibited growth and conidia formation.

The results obtained with clove and cinnamon oils do not match those reported by Martínez *et al.*, (2012), who evaluated different concentrations of these oils integrating them into edible films to coat papayas finding that at concentrations of 0.08 to 0.06% reduced the pathogens infection being more effective clove oil with inhibition of 88.9%, while the cinnamon had 78%.

However, Guillén-Sánchez *et al.* (2014), also using chitosan films, beeswax / oleic acid mixed with thyme, cinnamon and clove oil report regulatory effect of the three oils but at concentrations over 0.5 and 1%, being the most sensitive fungus *C. gloeosporioides* to the oils effect in inhibiting its mycelial growth, while *Penicillium digitatum*, *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata* only presented inhibition at higher concentrations.

Trial 2. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC).

MIC was determined for each of the extracts that completely inhibited growth and development of the pathogen in the latter trial. For *A. solani* the results are presented in Table 2, analysis of variance performed recorded differences between treatments; for clove obtained both by distillation as microwave at 20% concentration recorded growth but did not allow conidia formation, effect that was also recorded by

Sin embargo, Guillen- Sánchez *et al.* 2014, utilizando igualmente películas de quitosano, cera de abeja/ácido oleico mezclados con aceites de tomillo, canela y clavo reportan efecto regulador de los tres aceites pero a concentraciones superiores de 0.5 y 1%, siendo el hongo más sensible *C. gloesporioides* al efecto de los aceites en la inhibición de su crecimiento micelial, mientras que *Penicillium digitatum*, *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium oxysporum* y *Alternaria alternata* solo presentaron inhibición a la mayor concentración.

Ensayo 2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se determinó la CMI para cada uno de los extractos que inhibieron completamente el crecimiento y desarrollo del patógeno en el ensayo anterior. Para el caso de *A. solani* los resultados se presentan en el Cuadro 2, el análisis de varianza practicado registró diferencias entre los tratamientos; para el caso de los hidrolatos de clavo obtenidos tanto por destilación como por microondas a concentración de 20% registraron crecimiento pero no permitieron formación de conidias, efecto que también presentó el hidrolato de clavo obtenido por microondas a concentración de 10%, mientras que el de destilación a esa misma concentración presentó mayor crecimiento y formación de conidias, así como todos los hidrolatos a concentración de 5%, aunque todos presentaron inhibición en la formación de conidias con respecto al testigo con quien el análisis estadístico detectó diferencias pero no registraron diferencias estadísticas entre ellos para ésta variable, efecto similar a lo reportado por Ramírez, 2013, quien reportó que hidrolatos de canela y clavo obtenidos por destilación a concentraciones del 10 y 20% (v/v), a pesar que permitieron crecimiento de *Moniliophthora roreri*, inhibieron la formación de conidias.

Con respecto a los aceites el de canela, inhibió totalmente el crecimiento y formación de conidias a concentración de 0.05%, mientras que al 0.01% redujo en 50.23% la cantidad de conidias y 16.5% el crecimiento micelial y registró diferencias estadísticas con el testigo absoluto; mientras que el aceite de clavo presentó inhibición de crecimiento y formación de conidias a concentración 0.05%, y a 0.01% inhibió al 100% la formación de conidias y 27% el crecimiento micelial.

Estos resultados indican un mayor efecto de los extractos obtenidos de canela ya sea por destilación o asistido por microonda sobre *A. solani*, toda vez que sus CMI fueron inferiores que las presentadas por los extractos obtenidos

clove obtenido por microwave at 10% concentration, while distillation at the same concentration had higher growth and conidia formation, as well as hidrodistillates at concentration of 5%, although all showed inhibition in conidia formation compared with the control with whom the statistical analysis detected differences but did not record statistical difference between them for this variable, similar to that reported by Ramírez (2013), who reported that cinnamon and cloves obtained by distillation at concentrations of 10 and 20% (v/v), although allowed growth of *Moniliophthora roreri*, inhibited conidia formation.

Cuadro 2. Determinación de CMI de extractos sobre el crecimiento y formación de conidias de *A. solani*.

Table 2. Determination of MIC from extracts on growth and conidia formation of *A. solani*.

Tratamiento - alternaria	Crecimiento Conidias	
	mm	X10 ⁶ mL ⁻¹
Canela hidrolato microondas 20%	0 a	0 a
Clavo aceite 0.05%	0 a	0 a
Canela aceite 0.05%	0 a	0 a
Canela hidrolato microondas 10%	0 a	0 a
Clavo hidrolato microondas 20%	10 b	0 a
Clavo hidrolato destilación 20%	30 b	0 a
Clavo aceite 0.01%	36.5 b	0 a
Clavo hidrolato microondas 10%	33.5 b	0 a
Canela aceite 0.01%	41.75 bc	8.46 b
Canela hidrolato microondas 5%	47.25 bc	9.6 b
Clavo hidrolato destilación 10%	50 c	11.76 b
Clavo hidrolato microondas 5%	50 c	12.4 b
Clavo hidrolato destilación 5%	50 c	14.5 b
Testigo	50 c	17 c

*Medias con la misma letra en la misma columna no son estadísticamente diferentes en la prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$).

Regarding cinnamon oil, totally inhibited growth and conidia formation at a concentration of 0.05%, while at 0.01% decreased by 50.23% the amount of conidia and 16.5% mycelial growth and recorded statistical differences with the absolute control; while clove oil showed growth inhibition and conidia formation at concentration 0.05%, and 0.01%, inhibiting 100% conidia formation and 27% mycelial growth.

These results indicate a greater effect of cinnamon extracts obtained either by distillation or microwave assisted on *A. solani*, since its MIC were lower than those presented by cloves and pepper extracts; and shows that the hidrodistillate obtained with microwave turns out to be more effective,

de clavo y de pimienta; y se evidencia que el hidrodestilado obtenido con microondas resulta ser más efectivo, ya que tanto para los extraídos a partir de clavo como de canela a la misma concentración resultó con mayor actividad reguladora que los obtenidos por destilación. El hidrodestilado de canela obtenido por microondas a 10%, y los aceites de canela y clavo a 0.05%, fueron los tratamientos que presentaron el mejor efecto regulador para este patógeno del tomate, incluso con mejores resultados que lo reportado por otros autores como Cortina (2014), quien evaluó aceites de canela y clavo sobre *Alternaria alternata* aislado de arroz, ya que a 300 µg/mL, no registró inhibición total de crecimiento, y de Ramírez (2013) que registró CMI para *M. roseri* de hidrodestilado de canela en 30% (v/v) y para clavo de 20% (v/v).

Para el caso de *C. gloeosporioides* se evaluó inicialmente concentraciones del 20 y 10% de los hidrolatos de pimienta, clavo y canela y de 0.05% para los aceites de clavo y canela, el análisis de varianza indicó diferencias estadísticas. Los resultados se presentan en el Cuadro 3, mostrando inhibición total de crecimiento y esporulación para los hidrolatos de clavo tanto los obtenidos por destilación como microondas, y los hidrolatos obtenidos por microonda de canela a 20 y 10% y pimienta a 20%, así como los aceites de clavo y canela al 0.05%, los cuales registraron diferencia con el testigo absoluto.

since both extracts from clove and cinnamon at the same concentration had higher regulatory activity than those obtained by distillation. cinnamon obtained by microwave at 10%, and cinnamon and clove oil at 0.05%, were the treatments that had the best regulatory effect for this pathogen of tomato, even with better results than those reported by other authors like Cortina (2014), who evaluated cinnamon and clove oil on *Alternaria alternata* isolated from rice, since 300 µg/mL, did not record total growth inhibition, and Ramirez (2013) which recorded a MIC for *M. roseri* of cinnamon 30% (v/v) and clove 20% (v/v) hydrodistillate.

In the case of *C. gloeosporioides*, initially concentrations of 20 and 10% of pepper, cloves and cinnamon hydrodistillates and of 0.05% for of clove and cinnamon oil were assessed; analysis of variance indicated statistical differences. The results are presented in Table 3, showing complete growth and sporulation inhibition for clove both obtained by distillation and microwave, and hydrodistillates obtained by microwave of cinnamon at 20 and 10% and pepper at 20%, thus clove and cinnamon oils at 0.05%, which recorded difference to absolute control.

So it was necessary in the case of this pathogen, to perform a second trial and be able to determine MIC, evaluating concentrations below, 5% for cinnamon, clove and

Cuadro 3. Determinación de CMI de extractos sobre el crecimiento y formación de conidias de *C. gloeosporioides*.
Table 3. Determination of MIC from extracts on growth and conidia formation of *C. gloeosporioides*.

Tratamientos para <i>C. gloeosporioides</i> prueba 1	Crecimiento (mm)	Conidias (X10 ⁶ mL ⁻¹)
Clavo hidrolato destilación 20%	0 a	0 a
Clavo hidrolato microondas 20%	0 a	0 a
Canela hidrolato microondas 20%	0 a	0 a
Pimienta hidrolato microondas 20%	0 a	0 a
Pimienta hidrolato destilado 20%	0 a	0 a
Clavo hidrolato destilación 10%	0 a	0 a
Clavo hidrolato microondas 10%	0 a	0 a
Canela hidrolato microondas 10%	0 a	0 a
Pimienta hidrolato microondas 10%	0 a	0 a
Canela aceite 0.05%	0 a	0 a
Clavo aceite 0.05%	0 a	0 a
Pimienta hidrolato destilado 10%	38.25 b	1.66 b
Testigo	33.25 b	11.18 c

Por lo que fue necesario para el caso de éste patógeno, realizar un segundo ensayo y poder determinar la CMI, donde se evaluaron a concentraciones inferiores, a 5% para el caso de los hidrodestilados de canela, clavo y pimienta obtenidos por microondas y de canela y clavo por destilación y 0.01% para los aceites, (Cuadro 4), todos los tratamientos inhibieron en diferentes porcentajes el crecimiento y formación de conidias, registrando diferencias estadísticas con el testigo absoluto, siendo los aceites de canela y clavo y el hidrodestilado de clavo obtenido por microondas los que inhibieron en mayor grado (79- 55%), por lo que su CMI sería de 10% y 0.05% para el caso de los hidrolatos y aceites respectivamente.

Los anteriores resultados permiten apreciar el efecto regulador de los hidrolatos y aceites de canela, clavo y pimienta para los tres hongos evaluados tanto en crecimiento de los patógenos, como en la formación de conidias en diferentes porcentajes de inhibición, sin embargo los resultados indican diferencias en actividad de estos extractos y aceites sobre los tres hongos, siendo *C. gloeosporioides* el patógeno que fue más sensible a los hidrodestilados de las tres plantas y a los aceites de canela y clavo, mientras que para *F. oxysporum* los hidrodestilado de pimienta en las dos formas de obtención y el de canela por destilación, a concentración de 30% no inhibieron completamente al patógeno así como los aceites de canela, clavo y pimienta a la concentración evaluada, los cuales si bien presentaron porcentajes de inhibición en crecimiento de 73.2 a 6.5% y en la formación de conidias de 100 a 22.4%, no lo inhibieron completamente.

La alta capacidad antifúngica encontrada en los aceites esenciales de *C. zeylanicum* y *S. aromaticum* coincide con los resultados reportados por Montes y Carvajal (1998) quienes observaron que *Aspergillus flavus* fue totalmente inhibido por los aceites esenciales de estas plantas. Wilson *et al.* (1997) evaluaron 49 aceites esenciales y encontraron que *C. zeylanicum* mostró la mayor actividad antifúngica contra *Botrytis cinerea*. Bravo *et al.* (1998) observaron que los aceites esenciales de *M. piperita*, *E. globulus*, *T. ambrosioides*, *C. zeylanicum*, *S. aromaticum* y *T. vulgaris* a dosis de 10 000 y 7 500 ppm inhibieron el crecimiento micelial de *Fusarium moniliforme*. Estos mismos autores también reportan el efecto inhibitorio sobre la esporulación del mismo hongo a dosis de 150 a 300 ppm de los aceites de *C. zeylanicum*, *S. aromaticum* y *T. vulgaris*.

La actividad fungicida de aceites de *C. zeylanicum*, *S. aromaticum* contra patógenos que causan antracnosis en plátano ha sido reportada por Ranasinghe *et al.* (2002).

pepper obtained by microwave and cinnamon and clove by distillation and 0.01% for oils (Table 4), all treatments inhibited in different percentages growth and conidia formation, registering statistical differences with absolute control, being cinnamon and clove oil and clove obtained by microwave which inhibited to a greater degree (79- 55%), so their MIC would be 10% and 0.05% for hidrodistillates and oils respectively.

Cuadro 4. Determinación de CMI de extractos sobre el crecimiento y formación de conidias de *C. gloeosporioides* prueba 2.

Table 4. Determination of MIC from extracts on growth and conidia formation of *C. gloeosporioides* trial 2.

Tratamientos para <i>C. gloeosporioides</i> prueba 2	Crecimiento (mm)	Conidias (X10 ⁶ mL ⁻¹)
Clavo aceite 0.01%	10.5 a	0.1 a
Canela aceite 0.01%	21 a	0.1 a
Clavo hidrolato microondas 5%	22.5 a	0.1 a
Clavo hidrolato destilado 5%	43.75 b	0.1011 b
Pimienta hidrolato microondas 5%	44.25 b	0.1016 c
Canela hidrolato microondas 5%	47.5 b	0.1016 c
Testigo	50 b	1.0212 d

The above results allowed us to appreciate the regulatory effect of hydrodistillates and oils of cinnamon, clove and pepper for three fungi evaluated both on pathogen growth, as in conidia formation in different inhibition percentages, however the results indicate differences in activity of these extracts and oils on the three fungi, being *C. gloeosporioides* the pathogen that was more sensitive to hidrodestillates from the three plants and to cinnamon and clove oil, while for the *F. oxysporum* pepper hidrodistillate in the two forms (distillation and microwave) and cinnamon by distillation at 30% concentration did not inhibited the pathogen in its totality as well as cinnamon, clove and pepper oils to the assessed concentration, which although presented inhibition percentages in growth of 73.2 to 6.5% and in conidia formation of 100 to 22.4%, did not inhibited completely.

The high antifungal capacity found in essential oils of *C. zeylanicum* and *S. aromaticum* coincides with the results reported by Montes and Carvajal (1998) who observed that *Aspergillus flavus* was completely inhibited by the essential oils of these plants. Wilson *et al.* (1997) evaluated 49 essential oils and found that *C. zeylanicum* showed the highest antifungal activity against *Botrytis cinerea*. Bravo *et al.* (1998) found that essential oils of *M. piperita*, *E.*

Las propiedades fungitóxicas de aceites esenciales de seis poblaciones de *Thymus zygis* contra *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* y *Colletotrichum acutatum* fueron reportadas por Pérez *et al.* (2007). Estos autores también publican la composición química de los aceites esenciales y la correlación entre la concentración de los compuestos y la actividad antifúngica reportados por Barrera y García (2008).

Los resultados de esta investigación indican que tanto el método tradicional de hidrodestilación y el asistido por microondas utilizando clavo, canela y pimienta permiten extraer metabolitos capaces de inhibir en diferentes porcentajes tanto el crecimiento como la formación de conidias, sin embargo se aprecia que el asistido por microondas permite obtener una mayor concentración de ellos, lo que logra reducir la CMI en la que afectan a los patógenos en comparación al método de destilación tradicional. Corroborando el reporte de Zharia (2011) citado por Aguilar y López (2013), quienes usaron hidrodestilación de clavo acoplado a microondas y fue comparada con la hidrodestilación tradicional donde no hubo grandes diferencias en cuanto a componentes obtenidos de los aceites esenciales recuperados por ambos métodos; sin embargo el tiempo de extracción y el tamaño de muestra fueron menores para el microondas. Los resultados de esta investigación dan alternativas mediante el uso de hidrodestilados y aceites vegetales, los cuales deberán ser ajustados a planes de manejo para cada cultivo y establecer su efectividad en campo.

Conclusiones

Los hidrodestilados y aceites de *C. zeylanicum*, *Z. aromaticum* y *P. dioica* obtenidos por destilación tradicional y asistido por microondas, poseen metabolitos capaces de reducir el crecimiento y formación de conidias de *A. solani*, *F. oxysporum* y *C. gloeosporioides*, los cuales pueden ser una alternativa para el manejo de éstos patógenos del tomate y la papaya.

Los hidrodestilados de *C. zeylanicum*, *Z. aromaticum* y *P. dioica* obtenidos con ayuda de microondas parecen tener una mayor cantidad de compuestos activos que los obtenidos con destilación ya que las CMI fueron menores o la actividad inhibitoria sobre los hongos a la misma concentración fue superior.

globulus, *T. ambrosioides*, *C. zeylanicum*, *S. aromaticum* and *T. vulgaris* at doses of 10 000 and 7 500 ppm inhibited the mycelial growth of *Fusarium moniliforme*. These authors also report inhibitory effect on sporulation of the same fungus at doses of 150 to 300 ppm of *C. zeylanicum*, *S. aromaticum* and *T. vulgaris* oils.

Fungicidal activity of *C. zeylanicum* and *S. aromaticum* against pathogens causing anthracnose in banana has been reported by Ranasinghe *et al.* (2002). The fungitoxic properties of essential oils from six populations of *Thymus zygis* against *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* and *Colletotrichum acutatum* were reported by Pérez *et al.* (2007). These authors also published the chemical composition of essential oils and the correlation between compounds concentration and antifungal activity reported by Barrera and García (2008).

The results of this research indicate that both traditional method of hydrodistillation and microwave assisted using clove, cinnamon and pepper allows to extract metabolites capable of inhibit in different percentages both growth and conidia formation, however it is appreciated that microwave assisted allows to obtain higher concentration of them, which allowed to decrease MIC in which affect to the pathogens compared to traditional distillation method. Corroborating the report from Zharia (2011) cited by Aguilar and López (2013), who used clove hidrodestillation coupled to microwave and was compared with traditional hidrodestillation where there were no major differences as for components obtained from essential oils recovered by both methods; however the extraction time and the sample size were lower for microwave. The results of this research provide alternatives using hidrodestillates and vegetable oils, which must be adjusted to management plans for each crop and establish its effectiveness in the field.

Conclusions

Hidrodestillates and *C. zeylanicum*, *Z. aromaticum* and *P. dioica* oils obtained by traditional distillation and microwave assisted possess metabolites capable to reduce growth and conidia formation of *A. solani*, *F. oxysporum* and *C. gloeosporioides*, which can be an alternative for handling these pathogens of tomato and papaya.

Los patógenos *C. gloesporioides* y *A. solani* parecen ser más sensibles al efecto de los hidrodestilados y aceite de *C. zeylanicum*, *Z. aromaticum* y *P. dioica*, que *F. oxysporum*.

El hidrolato de clavo obtenido por destilación inhibió totalmente el desarrollo de *A. solani* y *F. oxysporum* a concentración del 30% (v/v) y al 10% a *C. gloesporioides*, mientras que los asistidos por microondas de canela inhibieron a *A. solani* y *C. gloesporioides* a concentración de 10% (v/v), y 30% a *F. oxysporum*; y el de clavo a 30% inhibe a *F. oxysporum* y *A. solani* y al 10% *C. gloesporioides* y los aceites de canela y clavo al 0.05% inhibieron a *A. solani* y *C. gloesporioides*.

Agradecimientos

Al Consejo de Ciencia y Tecnología del estado de Chiapas por el apoyo en el financiamiento de la investigación.

Literatura citada

- Aguilar, G. A. y López, M. A. 2013. Extractos y aceite esencial del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y su potencial aplicación como agente antimicrobiano en alimentos. *Temas selectos de Ingeniería de alimentos*. 7(2):35-41.
- Asha, M. M.; Chaitra, M.; Yashoda, K.; Vivek M. N. and Prashith, T. R. 2013. Antibacterial activity of leaf and bark extracts of *Pimenta dioica* (Linn.) Merril against clinical isolates of staphylococcus aureus and streptococcus mutans. *World J. Pharmacy Pharmaceutical Sci.* 2(5):3207-3215.
- Barrera, N. y García, B. 2008. Actividad antifúngica de aceites esenciales sobre el crecimiento de *Fusarium* sp. *Revista UDO Agrícola*. 8(1):33-41.
- Boyd, A. and Benkeblia, N. 2014. In vitro evaluation of antimicrobial activity of crude extracts of *Pimenta dioica* L. (MERR.). *Acta Hort.* 1047:199-205.
- Cortina, R. 2014. Estudios *in vitro* de aceites esenciales para el control de *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler. Tesina Universidad Politécnica de Valencia. Master Universitario en producción vegetal y ecosistemas agroforestales. 2-6 pp.
- Garbanzo, C.; Pérez, A.; Bustos, J. and Vaillant, F. 2011. Identification and quantification of carotenoids by HPLC-DAD during the process of peach palm (*Bactris gasipaes* H. B. K.) flour. *Food Res. Inter.* 44:2377-2384.
- Gogoi, R.; Buruah, P. and Nath, S. C. 1997. Antifungal activity of the essential oil of *Litsea cubeba* Pers. *J. Essential oils Res.* 9:213-215.
- Guillen, S. J.; Hernández, M.; Bautista, B. S.; Barrera, L. y Guillen, S. D. 2014. Actividad biológica de películas de quitosano en el crecimiento micelial de hongos asociados con frutos de papaya. *Rev. Mex. Fitopatol.* 32 (suplemento julio): 70 p.

C. zeylanicum, *Z. aromaticum* and *P. dioica* hydrodistillates obtained using microwaves appear to have a greater amount of active compounds than those obtained with distillation, since MIC were lower or inhibitory activity on fungi at the same concentration was superior.

Pathogens *C. gloesporioides* and *A. solani* seem to be more sensitive to the effect of hydrodistillates and oil of *C. zeylanicum*, *Z. aromaticum* and *P. dioica*, than *F. oxysporum*.

Clove obtained by distillation completely inhibited the development of *A. solani* and *F. oxysporum* at a concentration of 30% (v/v) and at 10% *C. gloesporioides*, while microwave-assisted of cinnamon inhibited *A. solani* and *C. gloesporioides* at 10% concentration (v/v), and 30% to *F. oxysporum*; and clove at 30% inhibits *F. oxysporum* and *A. solani* and at 10% *C. gloesporioides* and cinnamon and clove oils at 0.05% inhibited *A. solani* and *C. gloesporioides*.

End of the English version



- Hayat, K.; Hussain, S.; Abbas, S.; Farooq, U.; Ding, B.; Xia, S.; Jia, Ch.; Zhang, X. and Xia, W. 2009. Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity *in vitro*. *Separation Purification Technol.* 70:63-70.
- Hernández, A.; Bautista, S. y Velázquez, M. 2007. Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. *Rev. Fitotec. Mex.* 30(2):119-123.
- Kuskoski, M.; Asuero, A.; Troncoso, A.; Mancini F. y Fett, R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencia Tecnología de Alimentos. Campinas.* 25(4):762-732.
- Martínez-Correa, H. A.; Magalhães, P.; Queiroga, C.; Peixoto, C.; Oliveira, A. and Cabral, F. 2011. Extracts from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves: Influence of extraction process on antioxidant properties and yield of phenolic compounds. *J. Supercr. Fluids.* 55:998-1006.
- López, B. O.; Ramírez, G. S. I.; Ramírez, G. M.; Moreno, B. G. y Alvarado, G. A. (Eds.). 2006. Agroecología y agricultura orgánica en el trópico. Primera edición, Editorial UPTC-UNACH, Tunja, Boyacá, Colombia. 427 p.
- López, B.; A. López, B. S.; Vázquez, B. y Rodríguez, H. 2006. Inhibición del Crecimiento Micelial de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. f. sp. *Lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen, *Rhizoctonia solani* Kühn y *Verticillium dahliae* Kleb. Mediante extractos vegetales acuosos. *Rev. Mex. Fitopatol.* 23(2):183-190.
- Martínez, V. M. and Castillo, H. and G. Acaricidal. 2011. Effect and chemical composition of essential oils extracted from *Cuminum cyminum*, *Pimenta dioica* and *Ocimum basilicum* against the cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitol. Res.* 108(2):481-487.

- Martínez, M. L.; Ponce L. y Castillo, P. 2012. Uso y evaluación de dos aceites esenciales (canela y clavo de olor) para control de las pudriciones fúngicas y determinación de la vida útil mediante películas protectoras comestibles en papaya *Carica papaya* Cv. Hawaiana. Tesis de Grado Facultad de Ingeniería mecánica y ciencias de la producción. Escuela superior politécnica del Litoral. Ecuador. 1-8 pp.
- Meepagala, K. M.; Sturtz, G. and Wedge, D. E. 2002. Antifungal constituents of the essential oil fraction of *Artemisia dracunculoides* L. var. *dracunculoides*. J. Agric. Food Chem. 50:6989-6992.
- Monte, B. R. and Carvajal, M. 1998. Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their components. J. Food Protec. 61:616-619.
- Pérez, S. R.; Infante, C.; Gálvez, F. and Uberta, L. 2007. Fungitoxic activity against phytopathogenic fungi and the chemical composition of *Thymus zygis* essential oils. Food Sci. Tech. Int. 13(5):341-347.
- Pitarokili, D.; Tzakou, O.; Couladis, M. and Verykokidou, E. 1999. Composition and antifungal activity of the essential oil of *Salvia pomifera* subsp. *Calycina* growing wild in Greece. J. Essential oil Res. 11:655-659.
- Pupo, Y.; Kalombo, D.; Herrera, L.; Malheiros, de M. D. and Vargas, B. 2011. Efecto de extractos vegetales en el crecimiento y germinación de esporas de *Alternaria solani* (E. & M.) J. & G. en condiciones *in vitro*. Rev. Iberoam. Micol. 28(1):60.
- Ramírez, M. 2006. Técnicas para la determinación de moléculas bioactivas de extractos de plantas para la formulación de bioplaguicidas. In: López, O. Agroecología y agricultura orgánica en el trópico. Imprenta de la UPTC. Colombia. 247 p.
- Ramírez, S. 2013. Efectividad de extractos vegetales en el manejo de la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) del cacao (*Theobroma cacao* L.) en México. Tesis de Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo. Universidad Nacional. Costa Rica. 162 p.
- Ranasinghe, L.; Jayawardena, B. and Abeywickrama, K. 2002. Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. L. M. Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana. Letters Appl. Microbiol. 35(3):208-211.
- Santander, G. y Aquino, J. 2009. Control alternativo de *Alternaria solani* Sorauer con extractos vegetales. Investigación Agraria. (1):11.
- SAGARPA. 2012. Sistema Producto Nacional Tomate Rojo. Plan Rector. Consultado en: <http://dev.pue.itesm.mx/sagarpa/nacionales/>.
- SIAP- SAGARPA. 2016. <http://www.siap.gob.mx/>.
- Stauffer A.; Orrego A. y Aquino A. 2000. Selección de extractos vegetales con efecto fungicida y/o bactericida. Rev. Cie. Tecnol. Dirección de Investigaciones-UNA. 1:29-33.
- Villa, M. A.; Pérez, L. R.; Morales, M. H.; Basurto, S. M.; Soto, P. J. y Martínez, E. E. 2015. Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. Acta Agron. 64(2):194-205.
- Wilson, C. L.; Solar, J.; El Ghaouth, A. and Winiewski, M. E. 1997. Rapid evaluation of plant extracts and essential oil for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. Plant Dis. 81:204-210.