



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

EFFECTO INHIBITORIO DE EXTRACTOS DE *Thymus vulgaris* SOBRE LA
CONCENTRACIÓN DE AFLATOXINAS Y OCRATOXINA A
(Modalidad: Tesis de Grado)

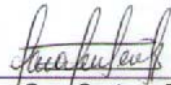
Zuny José Alcalá Meneses

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOANÁLISIS

CUMANÁ, 2012

EFFECTO INHIBITORIO DE EXTRACTOS DE *Thymus vulgaris* SOBRE LA
CONCENTRACIÓN DE AFLATOXINAS Y OCRATOXINA A

APROBADO POR:



Dra. Sara Centeno Briceno
Asesor



INDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMEN.....	v
INTRODUCCIÓN	1
MATERIALES Y MÉTODOS	9
Cepas fúngicas	9
Planta.....	9
Suspensión de conidios	10
Extracción etanólica y actividad antifúngica	10
Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).....	11
Actividad antiaflatoxigénica y antiocratoxigénica.....	11
Análisis estadístico.....	13
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
CONCLUSIONES	23
RECOMENDACIONES.....	24
BIBLIOGRAFÍA	25
HOJA DE METADATOS	32

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación representa en mi vida un gran e importante logro, conduciéndome a otros triunfos que me llenarán de alegría y satisfacción, siendo uno de ellos el tan anhelado título de licenciado en Bioanálisis.

La realización de mi trabajo de grado, fue llevada a cabo gracias a mi esfuerzo, dedicación y esmero, pero es muy importante mencionar que la ayuda, el amor y la comprensión de ciertos seres, fueron indispensable para alcanzar mi gran sueño, por tal motivo se lo dedico a todos ellos y de antemano les doy gracias de corazón.

En primer lugar se lo dedico a DIOS TODOPODEROSO, por darme fortaleza, sabiduría, paciencia y por ayudarme a superar muchos obstáculos que se me presentaron durante la ejecución de mi proyecto, a ti te digo que te amo.

A mi madre, Zunilde Meneses, por su amor incondicional, por darme todo en la vida sin importarle sacrificarse y porque gracias a ella soy una persona con buenos principios y sentimientos, este triunfo es tuyo mamá, te amo mucho.

A mi compañero sentimental, Jesús Marval, porque me apoyó de manera muy especial durante la realización de mi Trabajo de Grado, brindándome siempre una palabra de aliento, acompañándome tanto en los momentos difíciles como felices de mi vida, por tal motivo eres muy importante para mí y te amo mucho.

AGRADECIMIENTOS

A

La Dra. Sara Centeno, porque aceptó ser mi asesora académica en la elaboración de mi Trabajo de Grado, aportándome en todo momento recomendaciones que fueron de gran utilidad para la realización del mismo, además, me suministró las instalaciones, equipos y materiales del Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas para poder llevar a cabo esta investigación.

La licenciada Luz Salazar, por su cooperación y valioso apoyo, durante la ejecución de la etapa experimental de mi trabajo, la cual considero que es una guía muy importante para todos los tesisistas y un gran ser humano.

Antonio Moreno, por el transporte de las plantas de *Thymus vulgaris*, desde el estado Nueva Esparta, las cuales fueron indispensables en la realización de la investigación.

A todos ellos, gracias

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Valores promedios de los halos de inhibición de <i>Aspergillus flavus</i> y <i>Aspergillus ochraceus</i>	14
Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria del extracto de <i>Thymus vulgaris</i> frente a <i>Aspergillus flavus</i> y <i>Aspergillus ochraceus</i>	16
Tabla 3. Efecto del extracto de <i>Thymus vulgaris</i> sobre las concentraciones de aflatoxinas totales (AFt).....	18
Tabla 4. Efecto del extracto de <i>Thymus vulgaris</i> sobre las concentraciones de ocratoxina A (OTA).....	19

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tallos y hojas de la planta <i>Thymus vulgaris</i>	9
Figura 2. Actividad antifúngica del extracto de <i>Thymus vulgaris</i> sobre <i>Aspergillus flavus</i> (A: control, B: halo de inhibición del extracto de <i>Thymus vulgaris</i> sobre el microorganismo inoculado).	15
Figura 3. Actividad antifúngica del extracto de <i>Thymus vulgaris</i> sobre <i>Aspergillus ochraceus</i> (A: control, B: halo de inhibición del extracto de <i>Thymus vulgaris</i> sobre el microorganismo inoculado).	15

RESUMEN

Las micotoxinas son metabolitos secundarios sintetizados por hongos filamentosos, siendo las aflatoxinas y ocratoxina A, las que ocasionan daños con mayor frecuencia al hombre. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto inhibitorio del extracto de *Thymus vulgaris* (Tomillo) sobre la concentración de aflatoxinas y ocratoxina A, producidas por *Aspergillus flavus* y *Aspergillus ochraceus*; para lo cual se prepararon suspensiones de conidios de los microorganismos en estudio y extractos etanólicos de la planta *Thymus vulgaris*. Posteriormente, al extracto obtenido se le determinó la actividad antifúngica, concentración mínima inhibitoria (CMI) y, por último, la actividad antimicotoxigénica, a través del método de ELISA. Los resultados obtenidos de la actividad antifúngica del extracto de *Thymus vulgaris* sobre *Aspergillus flavus* fue un promedio de halos de inhibición de 31,00 mm, mientras que para *Aspergillus ochraceus* el promedio fue de 36,00 mm. La CMI del extracto fue de 47,50 mg/ml para *A. flavus* y de 23,75 mg/ml para *A. ochraceus*. Al evaluar la actividad antimicotoxigénica del extracto de *Thymus vulgaris*, se observó que las concentraciones de las aflatoxinas totales de 5,00; 14,00 y 45,00 $\mu\text{g}/\text{kg}$, disminuyeron en un 85,60%, 71,31% y 84,84%, respectivamente. Las concentraciones de ocratoxina A de 5,00; 10,00 y 40,00 $\mu\text{g}/\text{kg}$, descendieron en un 64,50%, 79,62% y 92,80%, respectivamente. Se concluyó que el extracto de *Thymus vulgaris* posee actividad antifúngica sobre *Aspergillus flavus* y *Aspergillus ochraceus*, del mismo modo, presenta actividad antimicotoxigénica sobre las micotoxinas sintetizadas por estos hongos contaminantes de alimentos.

Palabra y/o Frases Claves: Aflatoxinas, Ocratoxina A, *Thymus vulgaris*, Actividad antifúngica.

INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son sustancias naturales, tóxicas, de baja masa molecular, producidas como metabolitos secundarios por numerosas especies de hongos, pertenecientes, principalmente, a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, bajo condiciones adecuadas. Se han descrito más de 300 micotoxinas; sin embargo, las que pueden ocasionar daños, comúnmente, a la salud de humanos y animales son: aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, zearalenonas, fumonisinas y los alcaloides del cornezuelo de centeno (D'Mello y Macdonald, 1997; Abramson *et al.*, 1997; Hussein y Brasel, 2001; Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO), 2004; Duarte y Villamil, 2006; Zavieso, 2006; Pavón *et al.*, 2007).

Entre las micotoxinas mencionadas anteriormente, las aflatoxinas son las más estudiadas y las que se encuentran contaminando con mayor frecuencia diversos alimentos, ocasionando problemas de salud pública. Las aflatoxinas son compuestos heterocíclicos constituidos por dihidrofuranos, fusionados a un anillo de cumarina. Los principales tipos de aflatoxinas son B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ y M₂, considerándose la del tipo B₁ el carcinógeno natural más potente y la producida en mayor proporción por hongos toxicogénicos. Las primeras cuatro sustancias presentan propiedades fluorescentes, correspondiendo la letra B al color azul y la G al color verde; y los subíndices indican la movilidad cromatográfica relativa. Las del tipo M son derivados metabólicos de las aflatoxinas B₁ y B₂, que se originan en el hígado de los mamíferos luego del consumo de alimentos contaminados por éstas, apareciendo en la leche de las hembras y en sus productos lácteos, siendo la aflatoxina M₁ la más relevante para la salud humana (D'Mello y Macdonald, 1997; Santos, 1999; Peraica *et al.*, 2000; Hussein y Brasel, 2001; Bennett y Klich, 2003; Requena *et al.*, 2005; Duarte y Villamil, 2006; Gimeno, 2005; Urrego y Díaz, 2006; Sengun *et al.*, 2008; Bejarano y Centeno, 2009).

Estas toxinas son producidas, principalmente, por tres especies de hongos pertenecientes al género *Aspergillus*: *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*, los cuales son hongos filamentosos saprófitos, abundantes en la naturaleza, contaminantes de una gran variedad de substratos, especialmente granos, suelos, vegetación en descomposición, material de construcción, polvos domésticos y ambientes internos, como hospitales. Se reproducen de manera asexual por medio de conidios y se encuentran extendidos por todo el mundo, especialmente en países tropicales y subtropicales. Estas especies se diferencian en base a los tipos de metabolitos secundarios que producen, ya que *A. flavus* produce sólo aflatoxinas B₁ y B₂, mientras que *A. parasiticus* produce aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂. La especie *A. nomius*, produce aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ y la nominicina, que es un metabolito distintivo de la especie (Latgé, 1999; Abarca, 2000; Abarca *et al.*, 2000; Peraica *et al.*, 2000; Buendía y López; 2001; Soliman y Badeea, 2002; FAO, 2004; Soriano, 2007; Lazo y Sierra, 2008; Pasqualotto, 2008; Piontelli, 2008; Sengun *et al.*, 2008).

La diferenciación entre estas especies de hongos también puede efectuarse en base a las características macroscópicas y microscópicas que presentan. Desde el punto de vista macroscópico, son muy similares, desarrollando colonias de color verde oliváceo a verde amarillento, micelio blanco, esclerocios de color marrón oscuro a negro, cuando están presentes y la textura generalmente es lanosa. Microscópicamente, *A. flavus* posee cabezas conidiales, generalmente, biseriadas y los conidios son lisos o levemente rugosos. *A. parasiticus* posee cabezas conidiales uniseriadas y los conidios presentan paredes gruesas y rugosas. Por último, *A. nomius*, morfológicamente es similar a *A. flavus*, pero forma esclerocios más pequeños y alargados (Abarca, 2000; Hedayati *et al.*, 2007; Soriano, 2007; Lazo y Sierra, 2008; Piontelli, 2008).

Las aflatoxinas se encuentran contaminando alimentos, tales como: cereales, granos, higos, semillas oleaginosas, nueces, tabaco, almendras, pistachos, avellanas,

especias, frutos secos, café, cacao, entre otros; constituyendo éstas un riesgo para la salud humana, ya que son sustancias con efectos mutagénicos, teratogénicos, carcinogénicos e inmunosupresores. El hígado es el principal órgano afectado, pero también pueden actuar sobre el riñón y el cerebro. La evaluación de los resultados epidemiológicos y de laboratorio realizada en 1987, por el centro internacional de investigaciones sobre el cáncer (CIIC), estableció que existen hechos que demuestran el efecto carcinogénico de las aflatoxinas en el ser humano, clasificándolas como carcinógenos del grupo 1, excepto la aflatoxina M₁, que las clasifican en el grupo 2B como posibles carcinogénicos para el hombre (Santos, 1999; Peraica *et al.*, 2000; Soliman y Badaea, 2002; Bennett y Klich, 2003; Astoviza y Socarrás, 2005; Gimeno, 2005; Gimeno y Martins, 2005; Duarte y Villamil, 2006; Urrego y Díaz, 2006).

Otras micotoxinas que ocasionan daños importantes a la salud humana, son las ocratoxinas, producidas principalmente, por *Aspergillus ochraceus* y *Penicillium verrucosum*, siendo la ocratoxina A (OTA) el compuesto más tóxico y predominante dentro de este grupo. Se definen, químicamente, como una molécula formada por un anillo de isocumarina, unido a una molécula de L-β- fenilalanina por medio de su grupo carboxilo, a través de un enlace tipo amida. Contaminan productos alimenticios tales como: cereales, café, cebada, trigo, avena, frutos secos, especias y determinados vinos. El principal órgano diana donde ejercen sus efectos tóxicos es el riñón; asimismo, actúan sobre el sistema inmune, el sistema nervioso y el hígado; además, presentan propiedades teratogénicas, carcinogénicas, inmunotóxicas y genotóxicas en animales de experimentación y está catalogada por la agencia internacional para la investigación en cáncer (IARC) en el grupo 2B, como posible carcinógeno para los humanos. Se ha asociado el consumo crónico de OTA con el desarrollo de una enfermedad endémica, conocida como nefropatía endémica de los Balcanes, debido a la semejanza que existe entre sus síntomas con los de la nefropatía porcina ocasionada por la OTA, y se trata de una nefritis crónica progresiva que afecta a las poblaciones rurales de la península balcánica, más

frecuentemente al sexo masculino que al femenino y progresa hasta la muerte (Pacin, 1990; Peraica *et al.*, 2000; Hussein y Brasel, 2001; Bayman *et al.*, 2002; Arbillaga *et al.*, 2004; Astoviza y Socarrás, 2005; Duarte y Villamil, 2006; Koller *et al.*, 2006; Zaviezo, 2006; Pavón *et al.*, 2007; Soriano, 2007).

Existen diversos compuestos similares a la OTA, tales como: ocratoxina B (OTB), que se diferencia de la OTA por falta de un átomo de cloro en su estructura química y es menos tóxica; ocratoxina C (OTC), metil éster de la OTA, los metil y etil ésteres de la OTB, 4-hidroxi ocratoxina A y las ocratoxinas α (OT α) y β (OT β), que son productos de la hidrólisis de la OTA y OTB, no poseen la molécula de fenilalanina en su estructura y son consideradas no tóxicas para los seres vivos (Pacin, 1990; Pavón *et al.*, 2007; Soriano, 2007).

Existen niveles permitidos de micotoxinas en los alimentos que varían según las normativas de los países o las comunidades de comercialización internacional a las que pertenecen. En Venezuela, se encuentran reglamentados los niveles máximos de las aflatoxinas totales (AFt) únicamente para el maíz, harina de maíz, maníes y manteca de maní, el cual es 20,00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y de la aflatoxina M1 para la leche de consumo (0,50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y para leche en polvo (5,00 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (COVENIN, 1983). No hay normativas que regulen los límites para la OTA en el país Venezuela; sin embargo, existen niveles de dicha micotoxina sólo para los cereales sin procesar (5,00 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y los cereales procesados (3,00 $\mu\text{g}/\text{kg}$) en treinta países del continente Europeo (FAO, 2003).

El control de estas micotoxinas se puede lograr evitando el crecimiento fúngico y, por ende, la formación de las toxinas, a través de la aplicación de estrategias preventivas en la pre y post-cosecha. Durante la pre-cosecha se debe realizar un correcto mantenimiento de la plantación (riego, rotación de cultivos, análisis de suelo, entre otros), evitar condiciones de estrés del cultivo (carencia o exceso de regadío y la

presencia de malezas), utilizar variedades de plantas que presenten resistencia al ataque fúngico, aplicar insecticidas adecuados para el control de insectos, que facilitan la entrada de hongos micotoxigénicos y usar fungicidas (Abramson *et al.*, 1997; Santos, 1999; Sanchis *et al.*, 2000; FAO, 2004; Astoviza y Socorrás, 2005; Gimeno y Martins, 2005; Requena *et al.*, 2005; Murphy *et al.*, 2006; Zaviezo, 2006; Soriano, 2007).

En la recolección se deben utilizar equipos de cosecha funcionales y limpios, evitar lesionar físicamente los granos, realizándole una buena limpieza a los mismos, ya que en el polvo o material extraño abundan esporas fúngicas, y asegurarse que se encuentren plenamente maduros. En la post-cosecha, las medidas incluyen el uso de transportes que estén secos y libres de hongos visibles, además se debe cumplir con las correctas condiciones de almacenamiento, dentro de las cuales abarcan, el control del contenido de humedad (no superior a 12%), temperatura (20-22°C), actividad de agua (aw) por debajo 0,70, tratamiento de las materias primas en los silos con corrientes de aire frío y seco, tratamiento con corrientes de anhídrido carbónico y la limpieza de las circuitos de fabricación, que ayudan a impedir la proliferación de hongos y la producción de micotoxinas (Sanchis *et al.*, 2000; FAO, 2004; Astoviza y Socorrás, 2005; Gimeno y Martins, 2005; Murphy *et al.*, 2006; Zaviezo, 2006; Soriano, 2007).

Debido a que es difícil impedir la formación de las micotoxinas en los alimentos, se han creado métodos de detoxificación, los cuales son tratamientos post-cosecha, que tienen como finalidad hacer desaparecer o disminuir su efecto tóxico y han sido clasificados en métodos físicos, químicos y biológicos, teniendo en cuenta que el procedimiento correcto de detoxificación tiene que ser fácil de emplear, de bajo costo, que no produzcan compuestos que también sean tóxicos, debe ser irreversible y no debe modificar el sabor ni el valor nutricional del alimento tratado. Dentro de los métodos físicos se tienen: la selección de granos, separación mecánica

de la cáscara y el polvo del resto del cereal, los cuales resultan apropiados, ya que por lo general, la mayor concentración de micotoxinas se encuentran en el pericarpio de los granos y en el polvo del cereal (FAO, 2004; Gimeno y Martins, 2005; Mallmann, 2007).

Los tratamientos térmicos, también pueden ser efectivos; sin embargo, hay que tener en cuenta que las micotoxinas son sustancias resistentes a las altas temperaturas, así pues, las aflatoxinas y OTA resisten temperaturas hasta los 120 y 100°C, respectivamente, lo que puede originar alteraciones en las cualidades organolépticas y nutricionales de los alimentos. Cabe mencionar, que el tiempo de aplicación de la temperatura al alimento, genera una mayor efectividad en el proceso. Por ejemplo, la freidura o tostado a 200°C durante 30 minutos puede reducir la aflatoxina B₁ en maíz, maní, nueces, entre otros, en un 40,00 a 80,00%, y la OTA en el café, durante 5 minutos, aproximadamente, en un 80,00 a 90,00%. Por último, se tiene la irradiación, el cual es un proceso que utiliza rayos γ , X y UV, para degradar las micotoxinas, en especial las aflatoxinas. Los rayos γ , pueden reducir la AFB₁ en maníes en un 75,00 a 100,00% (Gimeno y Martins, 2005; Mallmann, 2007).

Con respecto a los métodos químicos, se utiliza una amplia diversidad de sustancias químicas, como: amoníaco, ozono, cloro, formol, bisulfito de sodio y el tratamiento con hidróxido de calcio y monometilamina, para inactivar ciertas micotoxinas. El uso de amoníaco y el tratamiento con hidróxido de calcio y monometilamina reducen en un 98,00% a las AFB₁, en semillas oleaginosas, algodón y tortas de maníes, por la transformación de éstas en compuestos no tóxicos. El bisulfito de sodio destruye la AFB₁ y el ozono puede degradar las aflatoxinas en los cereales (Lara, 2003; Gimeno y Martins, 2005; Soriano, 2007; Sengun *et al.*, 2008).

Dentro de los métodos biológicos destacan: el uso de microorganismos, enzimas y modificación genética del alimento. En el primer caso, se requiere utilizar

microorganismos que inhiban el crecimiento de los hongos micotoxigénicos y, por ende, la producción de micotoxinas; por ejemplo las cepas fúngicas no micotoxigénicas de *A. flavus* y *A. parasiticus* compiten con las cepas micotoxigénicas, provocando una disminución de aflatoxinas en maníes en un 99,00%. El uso de enzimas biotransformadoras puede transformar las micotoxinas en compuestos menos tóxicos o no tóxicos. Este caso, puede tener relación con una enzima sintetizada por *Flavobacterium aurantiacum*, que podría ser la responsable de la disminución de la aflatoxina B₁ presente en maíz, maníes, aceite vegetal, entre otros (Lara, 2003; Soriano, 2007).

En la actualidad, se está estudiando la posibilidad de usar plantas naturales con actividad antifúngica, como medida de control de micotoxinas, dentro de las cuales se encuentra *Thymus vulgaris* (Tomillo), perteneciente a la familia de las labiadas, posee una altura de 10-40 centímetros y es muy ramificada. Las hojas son más largas que anchas, opuestas y blanquecinas por su envés y las flores se encuentran agrupadas en la extremidad de las ramas. Se trata de una planta aromática, perenne, la cual procede de la cuenca mediterránea occidental y presenta propiedades, tales como: antiespasmódicas, antitusivas, expectorantes, antibacterianas, antisépticas, antifúngicas, antivíricas, antiinflamatorias, antihelmínticas, antioxidantes, eupépticas y estrogénicas, además se usa como condimento (Özguven y Tansi, 1998; Fuselli *et al.*, 2006; Jordan *et al.*, 2006; López, 2006; Necha y García, 2008; Bejarano y Centeno, 2009; Imelouane *et al.*, 2009).

La composición química de esta planta está constituida principalmente por los flavonoides y por fenoles monoterpénicos: timol y carvacrol, junto con otros monoterpenos como p-cimeno, linalol, geraniol, gammaterpineno, limoneno y borneol, presentes en el aceite esencial, el cual es un líquido amarillo pálido, aceitoso, aromático, obtenido de diferentes partes de las plantas, como las flores, hojas, tallos, frutos y raíces. No obstante, hay que tener presente que la composición del aceite

esencial es variable, según la época y el lugar de recolección de la planta (Özguven y Tansi, 1998; Burt, 2004; López, 2006; Segvic *et al.*, 2006; Muñoz *et al.*, 2007; Necha y García, 2008; Keefover-Ring *et al.*, 2009; Caplin *et al.*, 2009; García *et al.*, 2010; Rodríguez, 2011).

Las micotoxinas contaminan alimentos dirigidos a humanos y animales, representando este hecho un problema de salud pública y grandes pérdidas agroeconómicas; actualmente, se están buscando alternativas que incluyen el uso de plantas con propiedades antifúngicas, para minimizar esta situación; en el presente trabajo de investigación se utilizó *Thymus vulgaris* para el control de hongos contaminantes de alimentos y sus principales toxinas, el cual tiene por objetivo evaluar el efecto inhibitorio del extracto de *Thymus vulgaris* (Tomillo) sobre la concentración de aflatoxinas y ocratoxina A, producidas por *Aspergillus flavus* y *Aspergillus ochraceus*, respectivamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas fúngicas

Se utilizaron las cepas de *Aspergillus flavus* (DB-146F) y *Aspergillus ochraceus* (DB-91F), aisladas de muestras de alimentos concentrados para pollos y pertenecientes a la colección de hongos del Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas del Departamento de Bioanálisis, Núcleo Sucre, Universidad de Oriente.

Planta

Los extractos naturales fueron obtenidos de la planta *Thymus vulgaris* (Tomillo), la cual se adquirió fresca en un supermercado de la ciudad de Porlamar, estado Nueva Esparta. Se utilizaron sólo las hojas y los tallos de las plantas, que fueron deshidratadas en una estufa (marca P Selecta) a 45°C hasta que estuvieran completamente secas.



Figura 1. Tallos y hojas de la planta *Thymus vulgaris*.

Suspensión de conidios

La suspensión de conidios se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Rasooli *et al.* (2008), con ciertas modificaciones; para ello, *A. flavus* y *A. ochraceus* fueron cultivados cada uno en un tubo de ensayo, con agar papa dextrosa (PDA) a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 7 días. Luego, se preparó una suspensión de conidios, agregando a cada tubo 10,00 ml de solución salina fisiológica estéril y se procedió a agitar vigorosamente para facilitar el desprendimiento de los conidios. La suspensión obtenida en cada tubo se filtró por separado a través de una gasa doble estéril, eliminando de esta forma otras estructuras fúngicas, obteniéndose sólo conidios en la suspensión. Se determinó el número de conidios por ml de la suspensión a cada uno de los tubos, utilizando la cámara de Neubauer y se ajustó la concentración a 10^6 conidios/ml.

Extracción etanólica y actividad antifúngica

Se trituraron las hojas y los tallos secos de las plantas en un mortero, hasta obtener un fino polvo y posteriormente, se procedió a preparar el extracto, utilizando como solvente el etanol al 80,00% (marca Riedel de Haën).

Se realizó la extracción etanólica, siguiendo el método de Bluma *et al.* (2008), con modificaciones. Se pesaron 3,00 g de la planta triturada en una balanza de precisión (marca Ohaus), luego, se midieron 16,00 ml de etanol en un cilindro graduado, posteriormente, se agregó agua destilada hasta completar 20,00 ml. Se mezcló la cantidad pesada de la planta con los 20,00 ml del etanol al 80,00%, esta mezcla se dejó en reposo durante 48 horas, a temperatura ambiente y en oscuridad. El extracto obtenido se filtró con papel de filtro Whatman # 1, con la ayuda de un embudo, el cual fue colocado en un beaker; éste, a su vez, se vertió en una placa de Petri de vidrio, previamente pesada; después, la placa de Petri que contenía el extracto se guardó en oscuridad hasta que el etanol se evaporara completamente. Se determinó el peso seco del extracto, restando el peso de la cápsula de Petri con el

extracto menos el peso de la placa sin el mismo. Finalmente, el extracto obtenido se resuspendió con agua destilada en una proporción 1:1, fue depositado en viales y guardado en refrigeración.

La actividad antifúngica del extracto obtenido se determinó de acuerdo a la metodología de Souza *et al.* (2005), con ligeras modificaciones. En placas de Petri con agar papa dextrosa (PDA) fueron diseminados 100 µl de la suspensión de conidios de *A. flavus* y de *A. ochraceus*, por separado, con un asa de Digrlaski. Luego, se impregnaron discos de papel de filtro estériles de 6,00 milímetros (mm) de diámetro con el extracto y se situaron en el medio de las placas de Petri con agar papa dextrosa inoculadas con las suspensiones de conidios. Se contó con un tratamiento control de discos impregnados en etanol al 80,00%. Posteriormente, las placas fueron incubadas por tres días a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y examinadas cada 24 horas. Los halos de inhibición se midieron usando una regla graduada y fueron expresados en milímetros.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó siguiendo la metodología descrita por Rasooli y Mirmostafa (2003) y Rasooli *et al.* (2008), con ciertas modificaciones. Se mezclaron 100 µl de varias diluciones del extracto (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, y 1:32) en los micropozos de una placa que contenían 100 µl de caldo Sabouraud dextrosa y 50 µl de la suspensión de conidios de *A. flavus*. Posteriormente, las placas se incubaron a 28°C durante 48 horas. La CMI correspondió al micropozo con la mayor dilución que no mostró crecimiento fúngico. Este mismo procedimiento se llevó a cabo con la suspensión de conidios de *A. ochraceus*.

Actividad antiaflatoxigénica y antiocratoxigénica

Se mezclaron 100 µl del extracto con 100 µl de aflatoxina de concentraciones conocidas (1,70; 5,00; 15,00 y 45,00 µg/kg); el mismo procedimiento se llevó a cabo

con concentraciones conocidas de ocratoxina A (5,00; 10,00; 20,00 y 40,00 $\mu\text{g}/\text{kg}$), luego, se aplicó a dichas mezclas el ensayo de inmunoabsorción ligada a enzima (ELISA) de tipo competitivo, siguiendo las instrucciones del kit RIDASCREEN[®]FAST (BIOPHARM, Alemania) para determinar la disminución de las concentraciones de las aflatoxinas y ocratoxina A, respectivamente, el cual se basa en lo siguiente: los pocillos de la microplaca estaban sensibilizados con anticuerpos de captura dirigidos contra anticuerpos anti-micotoxinas. Se agregaron los estándares de las micotoxinas o la solución de las muestras, el conjugado micotoxina-enzima compitió por los sitios de unión de los anticuerpos anti-micotoxinas. Al mismo tiempo, los anticuerpos anti-micotoxinas se unieron a los anticuerpos de captura inmovilizados. Cualquier conjugado enzimático no unido se removió en el paso de lavado. Se agregó el sustrato/cromógeno a los pocillos. El conjugado enzimático unido convirtió el cromógeno en un producto azul. La adición de la solución stop llevó a un cambio de color azul al amarillo. La medición se realizó, fotométricamente, a 450 nm. La absorbancia es inversamente proporcional a la concentración de las micotoxinas en la muestra (Soriano, 2007).

El procedimiento del ensayo se llevó a cabo de la siguiente manera: se agregaron 50 μl de los estándares y de las muestras a analizar a los pocillos correspondientes; seguidamente, se agregaron 50 μl del conjugado micotoxina-enzima a los pocillos adecuados y 50 μl de anticuerpo anti-micotoxina a cada pocillo. Se mezcló el contenido de la microplaca suavemente y fue incubado durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el líquido de los pocillos y se golpeó la microplaca, vigorosamente, hacia abajo sobre un papel absorbente (tres veces) para asegurarse una completa remoción de líquido de los pocillos. Se lavaron los pocillos tres veces con agua destilada (250 μl por cada pocillo) utilizando una pipeta multicanal o una botella de lavado, y se vaciaron los pocillos reiteradamente de la forma ya indicada, después de cada lavado. Se agregaron dos gotas o 100 μl de sustrato/cromógeno a cada pocillo. Se mezcló el contenido de la microplaca

suavemente y se incubó 5 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente (20-25°C). Para finalizar, se agregaron dos gotas o 100 µl de la solución stop a cada pocillo. Se mezcló el contenido de la microplaca suavemente y se midió la absorbancia a 450 nm en el transcurso de los siguientes 10 minutos con un lector de ELISA, marca BIOTEK, MODELO ELX800. La obtención de los resultados se realizó usando el software comercial KC- Junior™. Cada ensayo se acompañó de un control con el extracto solo y se realizaron 6 repeticiones.

Análisis estadístico

Se comparó la actividad antifúngica del extracto de *Thymus vulgaris* contra *A. flavus* y *A. ochraceus*; así mismo, se comparó la actividad antimicotoxigénica de dicho extracto, mediante el análisis estadístico t-Student con un nivel de significancia de $p < 0,05$ usando el programa estadístico Statgraphics en su última versión (Wayne, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estudio de la actividad antifúngica del extracto de *Thymus vulgaris*, contra *A. flavus* reveló un promedio de halos de inhibición de 31,00 mm, mientras que para *A. ochraceus*, el promedio fue de 36,00 mm. Al analizar estos resultados, se observó que son estadísticamente significativos (tabla 1), por lo que dicho extracto podría ser utilizado como sustancia antifúngica para el control de estos microorganismos. Hay que resaltar que *A. ochraceus* fue más sensible al extracto, ya que el promedio de los halos de inhibición de dicho hongo es mayor al promedio correspondiente a *A. flavus*. Existen pocas investigaciones que comparen la acción antifúngica de extractos naturales sobre *A. flavus* y *A. ochraceus*. Shiva (2007) obtuvo halos de inhibición de $5,33 \pm 0,76$ mm para *A. flavus* y de $7,50 \pm 0,87$ mm para *A. ochraceus*, usando extractos de plantas pertenecientes a la familia Rutaceae, tales como: *Citrus limonum*, *Citrus aurantium*, *Citrus bergamica* y *Barosma betulina*, notándose que el diámetro del halo de inhibición para *A. ochraceus* también fue mayor que para *A. flavus*. Gómez *et al.* (2007), estudiaron la actividad antifúngica del extracto crudo del árbol *Fagara monophylla* frente a *A. flavus* y *A. terreus*, presentando este último microorganismo algunas similitudes con *A. ochraceus*, dentro de las cuales se encuentra la producción de ocratoxina A, exhibiendo halos de inhibición de 21,00 y 40,00 mm, respectivamente.

Tabla 1. Valores promedios de los halos de inhibición de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus ochraceus*.

Extracto	Microorganismos	Halos de inhibición Promedios (mm)	Valor t
<i>Thymus vulgaris</i>	<i>A. flavus</i>	31,00	3,35
	<i>A. ochraceus</i>	36,00	

Los valores promedios de los halos de inhibición fueron analizados mediante el método estadístico de t-Student *($p < 0,05$). Grados de libertad (gl): 7.

En las figuras 2 y 3, se muestran los halos de inhibición producidos por el extracto de *Thymus vulgaris* sobre *Aspergillus flavus* y *Aspergillus ochraceus*, observándose que el extracto actuó como sustancia antifúngica sobre el crecimiento de los hongos en estudio durante 72 horas de incubación.

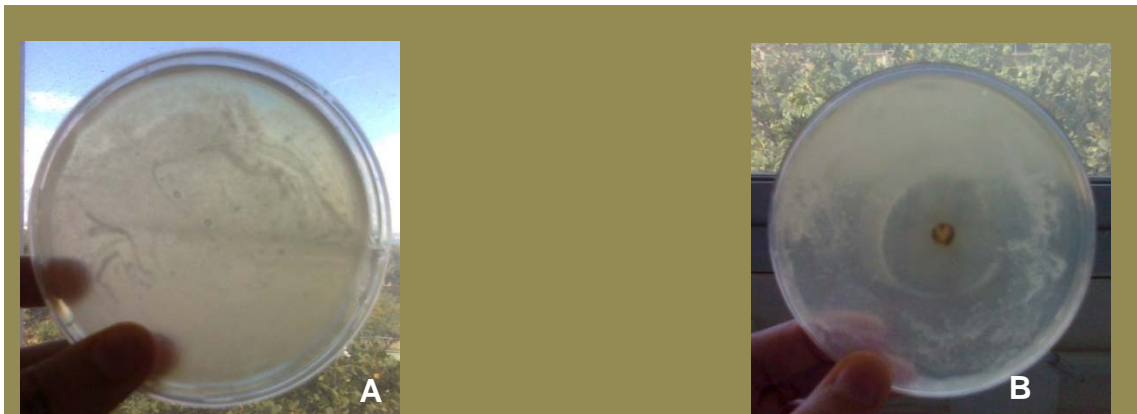


Figura 2. Actividad antifúngica del extracto de *Thymus vulgaris* sobre *Aspergillus flavus* (A: control, B: halo de inhibición del extracto de *Thymus vulgaris* sobre el microorganismo inoculado).



Figura 3. Actividad antifúngica del extracto de *Thymus vulgaris* sobre *Aspergillus ochraceus* (A: control, B: halo de inhibición del extracto de *Thymus vulgaris* sobre el microorganismo inoculado).

Con relación a la prueba de la CMI, se observó que *Thymus vulgaris* inhibió el crecimiento de *Aspergillus flavus* hasta la dilución 1:2, correspondiente a una concentración de 47,50 mg/ml; así mismo, inhibió el crecimiento de *Aspergillus ochraceus* hasta la dilución 1:4, a una concentración de 23,75 mg/ml (tabla 2), notándose que estos resultados apoyan a los obtenidos en la actividad antifúngica, ya que la concentración más baja del extracto que pudo inhibir el crecimiento de *A. flavus* fue mayor que la requerida para *A. ochraceus*, demostrándose una vez más que este último microorganismo es el más susceptible al extracto. Carrera (2011), realizó un trabajo de investigación basado en la comparación de la actividad antifúngica y antiaflatoxigénica del extracto de *Melissa officinalis*, de origen etanólico, con el extracto de origen metanólico, obteniendo una CMI del extracto etanólico de 23,30 mg/ml para *A. flavus*, concentración similar a la obtenida en el presente trabajo de investigación.

Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria del extracto de *Thymus vulgaris* frente a *Aspergillus flavus* y *Aspergillus ochraceus*.

Extracto	Microorganismos	Concentraciones mínimas inhibitorias (diluciones)				
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
<i>Thymus vulgaris</i>	<i>A. flavus</i>	+	-	-	-	-
	<i>A. ochraceus</i>	+	+	-	-	-

(+) = No Crecimiento (-) = Crecimiento

La actividad antifúngica de *Thymus vulgaris* es atribuida, principalmente, a los monoterpenos presente en su aceite esencial, definidos químicamente como moléculas constituidas por dos (2) unidades de isopreno, de 5 átomos de carbono

cada una. El timol y carvacrol, representan las principales sustancias dentro de este grupo, ya que diversos estudios indican que son los responsables de gran parte de la actividad antimicrobiana del aceite esencial y se caracterizan por ser compuestos fitoquímicos simples y muy similares estructuralmente, conformados por un grupo fenol, que se diferencian entre sí por la posición de los grupos hidroxilos en la molécula, por lo que se cree que este grupo hidroxilo es el responsable de su alto potencial tóxico, en comparación con los demás componentes (Özguven y Tansi, 1998; Domingo y López, 2003; Burt, 2004; Cañigüeral y Vila, 2007; Vázquez *et al.*, 2007; Alzate *et al.*, 2009; Ardila *et al.*, 2009, García *et al.*, 2009; Keefover-Ring *et al.*, 2009).

Está comprobado que el timol es la sustancia que se encuentra en mayor proporción y la que tiene la mayor actividad antifúngica. Según Öscan y Chalchat (2004), el aceite esencial obtenido de las partes aéreas de la planta, recolectadas en Turquía, posee un 46,20% de timol, mientras que los demás componentes no superan el 20,00%. Por su parte, Seung-Joo *et al.* (2005), en un estudio realizado al aceite esencial de plantas obtenidas en el norte de California, determinaron que contenía un 72,00% de timol, mientras que los demás componentes encontrados presentaron porcentajes inferiores al 10,00% (Özguven y Tansi, 1998; Domingo y López, 2003; Alzate *et al.*, 2009; Keefover-Ring *et al.*, 2009).

Existen pocos estudios centrados a comprender los mecanismos de acción de los metabolitos secundarios sintetizados por las plantas; no obstante, se sabe que el ataque de estos componentes se encuentran enfocados a las membranas de las células fúngicas. Se ha probado que los monoterpenos son los principales responsables de la actividad antimicrobiana, debido a que poseen la capacidad de ocasionar daños a las membranas, a través de interacciones con enzimas presentes en éstas e interrupción de procesos vitales como la ósmosis, síntesis de esteroides y fosfolípidos, esto se debe a las cualidades lipofílicas que presentan estos componentes. Se ha demostrado que el

timol y carvacrol, son los más potentes inhibidores de los procesos enzimáticos, posiblemente mediante reacciones con los grupos sulfhidrilo de los aminoácidos o por interacciones no específicas con proteínas. Se sabe que el limoneno inhibe el consumo de oxígeno y los flavonoides forman complejos con los aminoácidos nucleofílicos de las proteínas, lo que acarrea su inactivación (Domingo y López, 2003; Hernández *et al.*, 2007; Montes-Belmo, 2009; Rodríguez, 2011).

Al evaluar la actividad antimicotoxigénica del extracto de *Thymus vulgaris*, se observó que posee la capacidad de disminuir a las aflatoxinas totales, ya que las concentraciones iniciales de 5,00; 15,00 y 45,00 µg/kg fueron reducidas en 85,60; 71,31 y 84,84%, respectivamente. En la tabla 3, se muestra la actividad antiaflatoxigénica del extracto de *Thymus vulgaris*, notándose diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones iniciales y finales de las afltoxinas totales (AFt).

Tabla 3. Efecto del extracto de *Thymus vulgaris* sobre las concentraciones de aflatoxinas totales (AFt).

Concentración inicial de AFt (µg/kg)	Concentración inicial de AFt (µg/kg)	Promedio de las concentraciones finales	% de reducción	Valor t
5,00	0,50	0,72	85,60	6,28
5,00	0,17			
5,00	1,50			
15,00	4,35	4,30	71,31	193,75
15,00	4,28			
15,00	4,28			
45,00	7,32	6,82	84,84	53,06
45,00	5,99			
45,00	7,15			

Muestras analizadas mediante el método estadístico t- Student *(p<0,05). Grados de libertad (gl): 5.

Por otra parte, en la tabla 4 se observa que el extracto de *Thymus vulgaris*, del mismo modo, tiene la capacidad de reducir a la OTA, notándose en todos los casos disminuciones estadísticamente significativas de las concentraciones iniciales de dicha micotoxina.

Los estudios realizados acerca de las aflatoxinas se han centrado fundamentalmente en la aflatoxina B₁, ya que es la más tóxica y predominante dentro de este grupo de micotoxinas, siendo las aflatoxinas B₂, G₁, G₂, M₁ y M₂ derivados de la B₁, presentando éstas una analogía en sus estructuras químicas. Una vez ingerida, se absorbe en el tracto gastrointestinal debido a su alta liposolubilidad y es transportada hacia el hígado, a través de los eritrocitos y proteínas plasmáticas, por vía portal, donde es biotransformada por enzimas microsomales, pertenecientes a la superfamilia del citocromo P450, en un metabolito electrofílico denominado AFB₁-8,9-epóxido; éste se une covalentemente con el nitrógeno N-7 de los residuos guanil del ADN, a través de la inducción de la depurinación y ruptura de la hebra de ADN, originando aductos persistentes con regiones de ADN ricas en guanina.

Tabla 4. Efecto del extracto de *Thymus vulgaris* sobre las concentraciones de ocratoxina A (OTA).

Concentración inicial de OTA (µg/kg)	Concentración final de OTA (µg/kg)	Promedio de las concentraciones finales	% de reducción	Valor t
5,00	1,92	1,78	64,50	9,06
5,00	1,85			
5,00	1,55			
10,00	1,14	2,04	79,62	8,60
10,00	2,14			
10,00	2,82			

40,00	3,31			
40,00	2,81	2,88	92,80	103,78
40,00	2,51			

Muestras analizadas mediante el método estadístico t- Student *(p<0,05). Grados de libertad (gl): 5.

En el proceso de replicación del ADN, el complejo formado se intercala provocando la transversión de la guanina a timina en el codón 249 del gen p53 y, en consecuencia, origina mutación en las células somáticas, que se traduce en cáncer; el aducto epóxido-guanina es eliminado por la orina usándose como biomarcador. También, la aflatoxina B₁-epóxido puede formar aductos con proteínas celulares a través de los residuos de lisina, provocando toxicidad, los cuales se emplean como biomarcadores en el suero. Después de la formación de la AFB₁-epóxido se puede formar AFB₁ dihidrodiol, las cuales son metabolitos de la aflatoxina B₁ que también se unen a proteínas celulares, provocando daño celular y, en consecuencia, la muerte. Es importante mencionar que la AFB₁-8,9-epóxido puede ser detoxificada por la acción de una glutatión-S-transferasa, dando origen a un conjugado con el glutatión (Peraica *et al.*, 1999; Santos, 1999; Álvarez *et al.*, 2000; Hussein y Brasel, 2001; Soliman y Badaea, 2002; Bennett y Klich, 2003; Astoviza y Socarrás, 2005; Gimeno, 2005; Gimeno y Martins, 2005; Duarte y Villamil, 2006; Urrego y Díaz, 2006; Bucio *et al.*, 2007; Soriano, 2007).

Por otra parte, las ocratoxinas son el segundo grupo en importancia después de las aflatoxinas, siendo la OTA la de mayor interés, ya que ocasiona repercusiones negativas en la salud del ser humano y es objeto de una especial vigilancia en todo el mundo, por su marcado poder toxicológico. Al ser ingerida, se absorbe casi totalmente en el tracto gastrointestinal y alcanza la circulación general. Aunque, la ingesta de OTA se lleve a cabo en forma crónica, la capacidad de unirse a proteínas plasmáticas, especialmente, a la albúmina, contribuye a que tenga una vida media larga, aumentando de esta forma su potencial tóxico. Su principal mecanismo de acción es la interrupción de la síntesis proteica, por medio de la inhibición

competitiva de la enzima tRNA fenilalanina sintetasa; es decir, la OTA compite con la fenilalanina en la unión con su correspondiente ARN de transferencia. También inhibe la respiración mitocondrial en hígado de ratas, a través de la inhibición competitiva de la ATPasa, succinato deshidrogenasa y citocromo C. Se menciona que la OTA estimula la peroxidación lipídica, ya que diversos estudios *in vivo*, en la que fue suministrada en ratas así lo evidenció; también se realizaron estudios *in vitro* en microsomas de hígado o riñón de ratas, utilizando trazas de hierro, que confirman que la OTA promueve la peroxidación lipídica, se cree que esta micotoxina forma complejos con el hierro, como resultado, se producen radicales hidroxilos extremadamente tóxicos en presencia de NDPH-citocromo P450 reductasa. Es probable que el proceso de peroxidación lipídica sea responsable de cambios a nivel de la estructura de las membranas celulares, que permiten la afluencia de calcio a la célula, causando cambios en la actividad metabólica de la misma y, en última instancia, su muerte. Además, se cree que la OTA tienen la capacidad de originar aductos y roturas sencillas en el ADN (Marquardt y Frohlich, 1992; Rahimtula *et al.*, 1988; López *et al.*, 2000; Bayman *et al.*, 2002; Arbillaga *et al.*, 2004; Assaf *et al.*, 2004; Astoviza y Socarrás, 2005; Koller *et al.*, 2006; Soriano, 2007).

Los extractos de plantas con efectos fungicidas son utilizados actualmente para contrarrestar un problema de índole mundial, como es la contaminación de alimentos durante la pre y post cosecha, por hongos micotoxigénicos y sus micotoxinas, ya que poseen un bajo costo y carácter inocuo para el hombre y la naturaleza. El efecto antifúngico que presentan los extractos naturales es atribuido a una gran diversidad de metabolitos secundarios sintetizados por las plantas como mecanismo de defensa contra el ataque de microorganismos, insectos y otros animales en la naturaleza; sin embargo, no está bien dilucidado el mecanismo de acción de estas sustancias a la célula fúngica. En la presente investigación, se demostró el efecto antifúngico del extracto de *Thymus vulgaris* contra los microorganismos en estudio y, además, presentó actividad antimicotoxigénica frente a las micotoxinas sintetizadas por éstos,

por lo que el extracto de *Thymus vulgaris* puede ser usado como medida de control de estos hongos contaminantes de alimentos y sus micotoxinas.

CONCLUSIONES

El extracto de *Thymus vulgaris* evidenció una marcada actividad antifúngica sobre *Aspergillus flavus* y *Aspergillus ochraceus*.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto obtenido fue de 47,50 mg/ml para *Aspergillus flavus* y de 23,75 mg/ml para *Aspergillus ochraceus*.

El extracto de *Thymus vulgaris* redujo en un 80,58% y un 78,93%, las concentraciones iniciales de aflatoxinas y ocratoxina A, respectivamente.

RECOMENDACIONES

Continuar el estudio, probando la actividad antifúngica del extracto de *Thymus vulgaris* contra otros hongos contaminantes de alimentos.

Comprobar la actividad antifúngica de otros extractos naturales.

Aplicar diferentes concentraciones de los extractos naturales, con la finalidad de observar su actividad antifúngica.

Aislar los compuestos activos de cada extracto en estudio.

BIBLIOGRAFÍA

Abarca, M. 2000. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17: S79-S84.

Abarca, M.; Bragulat, M.; Castellá, G.; Accensi, F. y Cabañes, F. 2000. Hongos productores de micotoxinas emergentes. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17: S63-S68.

Abramson, D.; Mills, J.; Marquardt, R. y Frohlich, A. 1997. Mycotoxins in fungal contaminated samples of animal feed from western Canada, 1982-1994. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 61: 49-52.

Álvarez, M.; Carvajal, M.; Ruisánchez, N. y Rojo, F. 2000. Aductos-ADN-aflatoxina como biomarcadores de exposición en grupos de riesgo de cáncer de hígado. *Revista Cubana de Oncología*, 16(1): 35-39.

Alzate, D., Mier, G.; Afanador, L.; Durango, D.; García, C. 2009. Evaluación de la fitotoxicidad y la actividad antifúngica contra *Colletotrichum acutatum* de los aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*), limoncillo (*Cymbopogon citratus*), y sus componentes mayoritarios. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 16(1): 116-125.

Arbillaga, L.; Espeleta, O. y López, A. 2004. Es la Ocratoxina A una micotoxina mutagénica. *Revista de Toxicología*, 21: 1-10.

Ardila, M., Vargas, A., Pérez, J. y Mejías, L. 2009. Ensayo preliminar de la actividad antibacteriana de extracto de *Allium sativum*, *Coriandrum sativum*, *Eugenia Caryophyllata*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis* y *Thymus vulgaris* frente a *Clostridium perfringens*. *Biosalud*, 8: 47-57.

Assaf, H.; Azouri, H. y Pallardy, M. 2004. Ochratoxin A induces apoptosis in human lymphocytes through down regulation of Bcl-xL. *Toxicological Sciences*, 79(2): 335-344.

Astoviza, M. y Socarrás M. 2005. Micotoxinas y cáncer. *Revista Cubana de Investigación y Biomedicina*, 24(1): 54-59.

Bayman, P.; Baker, J.; Doster, M.; Michailides, T. y Mahoney, N. 2002. Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5): 2326-2329.

Bejarano, R. y Centeno, S. 2009. Extracto de *Citrus limon* para el control de aflatoxinas y hongos aflatoxigénicos en alimentos concentrados para pollos de engorde producidos en Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29: 57-61.

Bennett, J. y Klich, M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3): 497-516.

Bluma, R.; Amaiden, M. y Etcheverry, M. 2008. Screening of argentine plant extracts: Impact on growth parameters and aflatoxin B₁ accumulation by *Aspergillus* section *Flavi*. *International Journal of Food Microbiology*, 122: 114-125.

Bucio, C.; Luna, H.; Martínez, O. y Guzmán, D. 2007. Efecto del extracto de estigmas de maíz sobre *Aspergillus* spp. *Acta Universitaria*, 17(1): 59-62.

Buendía, B. y López, M. 2001. ¿Qué debemos saber sobre *Aspergillus*? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 19(3): 142-144.

Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253.

Cañigual, S. y Vila, R. 2007. Los aceites esenciales en fitoterapia. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 6(5): 146.

Caplin, J.; Allan, I. y Hanlon, G. 2009. Enhancing the *in vitro* activity of *Thymus* essential oils against *Staphylococcus aureus* by blending oils from specific cultivars. *International Journal of Essential Oil Therapeutics*, 3: 35-39.

Carrera, Y. 2010. Actividad antifúngica y antiaflatoxigénica de extractos de toronjil (*Melissa officinalis*) sobre *Aspergillus flavus*. Trabajo de Pregrado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.

COVENIN (Comisión Venezolana de Normas Industriales). 1983. Alimentos completos para aves. Norma N°1881. FONDONORMA. Caracas.

D'Mello, J. y Macdonald, A. 1997. Mycotoxins. *Animal Feed Science Technology*, 69: 155-166.

Domingo, D. y López, M. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia*, 16(4): 385-393.

Duarte, S. y Villamil, L. 2006. Micotoxinas en la salud pública. *Revista de Salud Pública*, 8(1): 129-135.

Fuselli, S.; García, S.; Gende, L.; Eguaras, M. y Fritz, R. 2006. Inhibición de *Paenibacillus larvae* empleando una mezcla de aceites esenciales y timol. *Revista Argentina de Microbiología*, 38: 89-92.

García, A.; Pérez, E. y Carril, U. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*, 2(3): 119-145.

García, C.; Martínez, A.; Ortega, J. y Castro, F. 2010. Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. *Revista Química Viva*, 2: 86-96.

Gimeno, A. 2005. "Aflatoxina M1 en la leche. Riesgos para la Salud Pública, Prevención y Control". "Engormix". <<http://www.engormix.com/aflatoxina-leche-riesgos-salud-s-articulos-372-MYC.htm>> (16/06/2010).

Gimeno, A. y Martins, M. 2005. "Riesgos de Micotoxicosis que algunas Micotoxinas (Como Contaminantes de los Alimentos) Pueden Provocar en Humano". "Engormix". <<http://www.engormix.com/riesgos-micotoxicosis-algunas-micotoxinas-s-articulos-366-MYC.htm>> (18/06/2010).

Gómez, Y.; Gil, K.; González, E. y Farías, L. 2007. Actividad antifúngica de extractos orgánicos del árbol *Fagara monophylla* (Rutaceae) en Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 55(3-4): 767-775.

Hedayati, M.; Pasqualotto, A.; Warn, P.; Bowyer, P. y Denning, D. 2007. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology*, 153: 1677-1692.

Hernández, A.; Bautista, S. y Velázquez, M. 2007. Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30(2): 119-123.

Hussein, H. y Brasel, J. 2001. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167: 101-134.

Imelouane, B.; Amhamdit, H.; Wathélet, J.; Ankit, M.; Khedid, K. y El Bachiri, A. 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of Thyme

(*Thymus vulgaris*) from eastern Morocco. *International Journal of Agriculture & Biology*, 11(2): 205-208.

Jordan, M.; Martínez, R.; Goodner, K.; Baldwin, E. y Sotomayor, J. 2006. Seasonal variation of *Thymus hyemalis* lange and spanish *Thymus vulgaris* L. essential oils composition. *Industrial Crops and Products*, 24: 253-263.

Keefover-Ring, K.; Thompson, J. y Linhart, Y. 2009. Beyond six scents: defining a seventh *Thymus vulgaris* chemotype new to southern France by ethanol extraction. *Flavour and Fragrance Journal*, 24:117-122.

Koller, G.; Wichmann, G.; Rolle-Kampczyk, U.; Popp, P. y Herbarth, O. 2006. Comparison of ELISA and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection in the analysis of ochratoxin A in low volumes of human blood serum. *Journal of Chromatography B*, 840: 94-98.

Lara, J. 2003. “Métodos de Determinación, Identificación y Control de Micotoxinas en Ingredientes para la Nutrición Animal”. “Engormix”. <<http://www.engormix.com/metodos-determinacion-identificacion-control-s-articulos-300-MYC.htm>> (18/06/2010).

Latgé, J. 1999. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(2): 310-350.

Lazo, R. y Sierra, G. 2008. Investigación del efecto de las micotoxinas en el ser humano. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25: 7-11.

López de Cerain, A.; Jiménez, A.; Ezpeleta, O. y Bello, J. 2000. Efectos tóxicos de la ocratoxina A. *Revista de Toxicología*, 17: 61-69.

López, M. 2006. Tomillo. Propiedades farmacológicas e indicaciones terapéuticas. *Offarm*, 25(1): 74-77.

Mallmann, C.; Rauber, R. y Giacomini, L. 2007. “Factores de formación de las micotoxinas y sus formas de control”. “Engormix”. <<http://www.engormix.com/Factores-formacion-micotoxinas-sus-s-articulos1841-MYC.htm>> (17/06/2010).

Marquardt, R. y Frohlich, A. 1992. A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *Journal of Animal Science*, 70: 3968-3988.

Montes-Belmo, R. 2009. Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Micología*, 29:73-82.

Muñoz, A.; Castañeda, M.; Blanco, K.; Cardenas, C.; Reyes, J. y Kouznetsov, V. 2007. Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de Timol y Carvacrol. *Scientia Et Technica*, 33: 125-128.

Murphy, P.; Hendrich, S.; Landgren, C. y Bryant, C. 2006. Food mycotoxins: An update. *Journal of Food Science*, 71(5): R51-R65.

Necha, L. y García, L. 2008. Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium* sp. aislado de papaya (*Carica papaya*). *Revista UDO Agrícola*, 8(1): 33-41.

Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2003. Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003. *Estudio FAO Alimentación y Nutrición, N° 81. Roma, Italia.*

Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2004. Manual sobre la aplicación del sistema de análisis de peligro y de puntos críticos de control (APPCC) en la prevención y el control de las micotoxinas. *Estudio FAO Alimentación y Nutrición, N°73. Roma, Italia.*

Öscan, M. y Chalchat, J. 2004. Aroma profile of *Thymus vulgaris* L. growing wild in Turkey. *Journal of plant Physiology*, 30(3-4): 68-73.

Özguven, M. y Tansi, S. 1998. Drug yield and essential oil of *Thymus vulgaris* L. as influenced by ecological and ontogenetical variation. *Tübitak*, 22: 537-542.

Pacin, A. 1990. Micotoxicosis por ocratoxina A. *Toxicología*, 4: 385-399.

Pasqualotto, A. 2008. Differences in pathogenicity and clinical syndromes due to *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*. *Medical Mycology*, 47(1): S261-S270.

Pavón, M.; Blanco, R. y González, I. 2007. Detección de ocratoxina A en higos secos utilizando el anticuerpo MAP₁ y una técnica de ELISA competitivo. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 1(2): 253-261.

Peraica, M.; Radic, B.; Lucic, A. y Pavlovic, M. 2000. Efectos tóxicos de la micotoxinas en el ser humano. *Boletín de la Organización Mundial de la Salud*, 77(9): 754-766.

Piontelli, E. 2008. Aportes morfotaxonómicos en el género *Aspergillus* (Link): claves para las especies ambientales y clínicas más comunes. *Boletín Micológico*, 23:49-66.

Rahimtula, A.; Béréziat, J.; Bussacchini-Griot, V. y Bartsch, H. 1988. Lipid peroxidation as a possible cause of ochratoxin a toxicity. *Biochemical Pharmacology*, 37: 4469-4477.

Rasooli, I. y Mirmostafa, S. 2003. Bacterial susceptibility and chemical composition of essential oils from *Thymus kotschyanus* and *Thymus persicus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:2200-2205.

Rasooli, I.; Hadi, M.; Yadegarinia, D.; Gachkar, L.; Allameh, A. y Begher, M. 2008. Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 122: 135-139.

Requena, F.; Saume, E. y León, A. 2005. Micotoxinas: riesgo y prevención. *Zootecnia Tropical*, 23(4): 393-410.

Rodríguez, E. 2011. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable*, 7(1):153-170.

Sanchis, V.; Marín, S. y Ramos, A. 2000. Control de micotoxinas emergentes. Situación legislativa actual. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17: S69-S75.

Santos, O. 1999. Importancia y efectos de la aflatoxina en los seres humanos. *MEDUNAB*, 2(6): 124-129.

Segvic, M.; Kosalec, I.; Mastelic, J.; Pieckova, E. y Pepeljnak, S. 2006. Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. *Letters in Applied Microbiology*, 44:36-42.

Sengun, I.; Yaman, D. y Gonul, S. 2008. Mycotoxins and mould contamination in cheese: a review. *World Mycotoxin Journal*, 1(3): 291-298.

Seung-Joo, L.; Katumi, U.; Takayuki, S. y Kwang-Geun, L. 2005. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 91: 131-137.

Shiva, C. 2007. Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento. Trabajo para ascender a la categoría de doctor. Departamento de Anatomía Animales, Universidad Autónoma de Barcelona, España.

Soliman, K. y Badeaa, R. 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and Chemical Toxicology*, 40: 1669-1675.

Soriano, J. 2007. *Micotoxinas en Alimentos*. Editorial Díaz de Santos, S.A. Madrid, España.

Souza, E.; Lima, E.; Freire, K. y Paiva, C. 2005. Inhibitory action of some essential oils and phytochemical on the growth of various isolated fungi from foods. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(2): 245-250.

Urrego, J. y Díaz, G. 2006. Aflatoxinas: mecanismos de toxicidad en la etiología de cáncer hepático celular. *Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia*, 54(2): 108-116.

Vázquez, A.; Pérez, L. y Díaz, R. 2007. Biomoléculas con actividad insecticida: una alternativa para mejorar la seguridad alimentaria. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5(4): 306-313.

Wayne, D. 2002. *Bioestadística*. Cuarta edición. Editorial Limusa, S.A. México D.F., México.

Zaviezo, D. 2006. Consideraciones técnicas sobre la problemática de las micotoxinas y las micotoxicosis aviares. *Ciencia y Trabajo*, 8(22): 154-158.

HOJA DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

Título	Efecto Inhibitorio De Extractos De Thymus Vulgaris Sobre La Concentración De Aflatoxinas Y Ocratoxina A
---------------	---

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Alcalá M, Zuny J	CVLAC	17.538.212
	e-mail	zunyalcala@hotmail.com
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Aflatoxinas
Ocratoxina A
Thymus vulgaris
Actividad antifúngica

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

Resumen (abstract):

Las micotoxinas son metabolitos secundarios sintetizados por hongos filamentosos, siendo las aflatoxinas y ocratoxina A, las que ocasionan daños con mayor frecuencia al hombre. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto inhibitorio del extracto de *Thymus vulgaris* (Tomillo) sobre la concentración de aflatoxinas y ocratoxina A, producidas por *Aspergillus flavus* y *Aspergillus ochraceus*; para lo cual se prepararon suspensiones de conidios de los microorganismos en estudio y extractos etanólicos de la planta *Thymus vulgaris*. Posteriormente, al extracto obtenido se le determinó la actividad antifúngica, concentración mínima inhibitoria (CMI) y, por último, la actividad antimicotoxigénica, a través del método de ELISA. Los resultados obtenidos de la actividad antifúngica del extracto de *Thymus vulgaris* sobre *Aspergillus flavus* fue un promedio de halos de inhibición de 31,00 mm, mientras que para *Aspergillus ochraceus* el promedio fue de 36,00 mm. La CMI del extracto fue de 47,50 mg/ml para *A. flavus* y de 23,75 mg/ml para *A. ochraceus*. Al evaluar la actividad antimicotoxigénica del extracto de *Thymus vulgaris*, se observó que las concentraciones de las aflatoxinas totales de 5,00; 14,00 y 45,00 µg/kg, disminuyeron en un 85,60%, 71,31% y 84,84%, respectivamente. Las concentraciones de ocratoxina A de 5,00; 10,00 y 40,00 µg/kg, descendieron en un 64,50%, 79,62% y 92,80%, respectivamente. Se concluyó que el extracto de *Thymus vulgaris* posee actividad antifúngica sobre *Aspergillus flavus* y *Aspergillus ochraceus*, del mismo modo, presenta actividad antimicotoxigénica sobre las micotoxinas sintetizadas por estos hongos contaminantes de alimentos.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Centeno, Sara	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input checked="" type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	5.702.407
	e-mail	sara.centeno@hotmail.com
	e-mail	
Herrera, Hernando	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	5.872.352
	e-mail	hherreramata@yahoo.es
	e-mail	
Díaz, Josefa	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	5.007.425
	e-mail	diazvv@gmail.com
	e-mail	
Salazar, Luz	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	13.630.199
	e-mail	Luz28salazar@yahoo.com
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2012	03	22

Lenguaje: SPA

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis-AlcaláZuny.doc	Word

Alcance:

Espacial: Universal

Temporal: Intemporal

Título o Grado asociado con el trabajo: Licenciatura en Bioanálisis

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciatura

Área de Estudio: Bioanálisis

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:
Universidad de Oriente-Núcleo de Sucre

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CUN°0975

Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano
Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ
Vicerrector Académico
Universidad de Oriente
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda "SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009".

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.

UNIVERSIDAD DE ORIENTE
SISTEMA DE BIBLIOTECA
RECIBIDO POR *[Firma]*
FECHA 5/8/09 HORA 5:30

Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

[Firma]
JUAN A. BOLANOS CUNTELE
Secretario



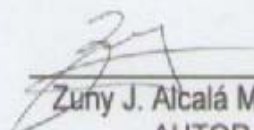
C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YGC/maruja

Apartado Correos 094 / Telfa: 4008042 - 4008044 / 8008045 Telefax: 4008043 / Cumaná - Venezuela

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso- 6/6

Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009) : "los Trabajos de Grado son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y sólo podrán ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario para su autorización".


Zuny J. Alcalá Meneses
AUTOR


Sara Centeno
TUTOR