



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

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA Y ANTIAFLATOXIGÉNICA DE EXTRACTOS DE  
TORONJIL (*Melissa officinalis*) SOBRE *Aspergillus flavus*  
(Modalidad: Tesis de grado)

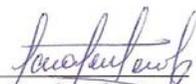
Yohanna Carolina Carrera Jaspe

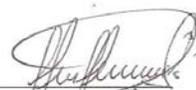
TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOANÁLISIS

CUMANÁ, 2011

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA Y ANTI AFLATOXIGÉNICA DE EXTRACTOS DE  
TORONJIL (*Melissa officinalis*) SOBRE *Aspergillus flavus*

APROBADO POR:

  
Dra. Sara Centeno  
Asesora Académica

  
M.Sc. Fernando Herrera  
Jurado

  
Prof. Josefa Díaz  
Jurado

## INDICE

DEDICATORIA .....	i
AGRADECIMIENTOS .....	ii
LISTA DE TABLAS .....	iii
LISTA DE FIGURAS .....	iv
RESUMEN .....	v
INTRODUCCIÓN .....	1
MATERIALES Y MÉTODOS .....	10
Cepa fúngica .....	10
Planta .....	10
Extracciones y actividad antifúngica .....	11
Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) .....	13
Actividad antiaflatoxigénica .....	13
Análisis estadístico .....	14
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	15
CONCLUSIONES .....	28
RECOMENDACIONES .....	29
BIBLIOGRAFÍA .....	30
HOJA DE METADATOS .....	37

## **DEDICATORIA**

Al finalizar un trabajo tan arduo como es el desarrollo de una tesis, es inevitable no pensar que este trabajo hubiese sido imposible sin mi perseverancia y sin la motivación de personas que me ayudaron para que esta meta llegue a un feliz término. Por ello, es para mí un verdadero placer utilizar este espacio para dedicarle este trabajo a todos ellos.

Principalmente a mi familia, porque sin su apoyo, colaboración e inspiración habría sido muy difícil llevar a cabo esta meta. A mis padres, Nelly y Esteban, que sin escatimar esfuerzo alguno han sacrificado gran parte de su vida para formarme y educarme. Donde la ilusión de su vida ha sido convertirme en persona de provecho y nunca podré pagar todos sus desvelos ni aún con las riquezas más grandes del mundo. A mi hermano Carlos Alberto y su esposa por su paciencia, por ayudarme y apoyarme sin condiciones y desearme siempre lo mejor.

A mi futuro esposo David Paisan, muchas gracias por estos 9 años de conocernos y por los 2 años de noviazgo, en los cuales hemos compartido tantas cosas buenas y otras no tan buenas; por todo el apoyo que me has dado para continuar y seguir con mi camino, gracias por estar conmigo y recuerda que eres muy importante para mí.

A mis amigas: Vanessa Rivera, Roselis Lunar, Marihé Mata, María García y Marina Mujica por ayudarme a crecer y madurar como persona y por estar siempre conmigo, apoyándome en todas las circunstancias posibles.

A mis compañeras de estudios: María Victoria Figueras, Yemile Khayat, Reina Marín, Sayreth Cerrada, María Laura Reyes, Isabel Marzullo y Geraldine Fuentes, porque hace varios años atrás iniciamos esta carrera, encontrándonos en el camino para apoyarnos unas a las otras para culminar satisfactoriamente este sueño de convertirnos en profesionales del Bioanálisis.

## **AGRADECIMIENTOS**

A

La Dra. Sara Centeno por aceptar asesorarme en esta investigación, además, por su paciencia, perseverancia, fortaleza, colaboración y sus consejos que fueron muy útiles durante el desarrollo de este trabajo, y sobre todo por facilitarme las instalaciones, equipos y materiales del Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas del Departamento de Bioanálisis, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente.

La M.Sc. Rossiannys Rodríguez, por su ayuda en la realización del ELISA y en el análisis estadístico.

La Licda. Luz Salazar, por su colaboración en el laboratorio durante el desarrollo de la fase experimental de la tesis.

La Licda. Mailynd Mundarain, por cooperar conmigo al principio con las traducciones de los artículos científicos.

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Efecto del extracto etanólico y metanólico de <i>Melissa officinalis</i> sobre el crecimiento de <i>Aspergillus flavus</i> .....	16
Tabla 2. Halos de inhibición de los extractos acuosos de <i>Melissa officinalis</i> sobre el crecimiento de <i>Aspergillus flavus</i> .....	19
Tabla 3. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos acuosos de <i>Melissa officinalis</i> sobre <i>Aspergillus flavus</i> . ....	20
Tabla 4. Efecto de los extractos acuosos de <i>Melissa officinalis</i> sobre la concentración de aflatoxinas totales. ....	25

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tallos y hojas de <i>Melissa officinalis</i> (A: Tallos y hojas frescos y B: Tallos y hojas secos). .....	10
Suspensión de conidios.....	11
Figura 2. Efecto del extracto etanólico de <i>Melissa officinalis</i> sobre el crecimiento de <i>Aspergillus flavus</i> . .....	17
Figura 3. Efecto del extracto de metanólico de <i>Melissa officinalis</i> sobre el crecimiento de <i>Aspergillus flavus</i> . .....	17
Figura 4. Efecto del extracto etanólico de <i>Melissa officinalis</i> sobre el crecimiento de <i>Aspergillus flavus</i> (A: Agar papa dextrosa (PDA) + extracto etanólico de <i>M. officinalis</i> (1:10), inoculación central de <i>A. flavus</i> , B: Control). .....	18
Figura 5. Efecto del extracto metanólico de <i>Melissa officinalis</i> sobre el crecimiento de <i>Aspergillus flavus</i> (A: Agar papa dextrosa (PDA) + extracto metanólico de <i>M. officinalis</i> (1:10), inoculación central de <i>A. flavus</i> , B: Control). .....	18
Figura 6. Halo de inhibición del extracto acuoso de origen etanólico de <i>Melissa officinalis</i> sobre el crecimiento de <i>Aspergillus flavus</i> (A: Agar papa dextrosa (PDA) inoculado con <i>A. flavus</i> + disco central impregnado con el extracto de origen etanólico de <i>M. officinalis</i> , B: Control).....	19
Figura 7. Halo de inhibición del extracto acuoso de origen metanólico de <i>Melissa officinalis</i> sobre el crecimiento de <i>Aspergillus flavus</i> (A: agar papa dextrosa (PDA) inoculado con <i>A. flavus</i> + disco central impregnado con el extracto de origen etanólico de <i>M. officinalis</i> , B: Control).....	20

## RESUMEN

Las aflatoxinas son un grupo de metabolitos tóxicos producidos principalmente por *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* y son halladas frecuentemente en cereales. La aflatoxina B<sub>1</sub> es el miembro más tóxico y carcinogénico del grupo de las aflatoxinas. Debido a que el uso de fungicidas en los cultivos agrícolas ha provocado el desarrollo de resistencia fúngica, contaminación ambiental y riesgos de salud pública, se ha estudiado la actividad antifúngica de los extractos de plantas silvestres, para la búsqueda nuevas alternativas en el control de hongos y sus micotoxinas. Es por ello, que el objetivo de la presente investigación fue evaluar la actividad antifúngica y antiaflatoxigénica de extractos de toronjil (*Melissa officinalis*) sobre *Aspergillus flavus*. Se obtuvieron extractos de *Melissa officinalis* utilizando etanol al 80,00% y metanol al 70,00%. Se determinó la actividad antifúngica de los extractos obtenidos a través de dos metodologías; con una se obtuvieron los extractos etanólico y metanólico, y con la otra se obtuvieron extractos acuosos. Adicionalmente, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos acuosos sobre *Aspergillus flavus* y finalmente se determinó la actividad antiaflatoxigénica a través del método de enzima inmunoensayo competitivo (ELISA). Los resultados obtenidos de la actividad antifúngica mostraron que los extractos etanólico y metanólico produjeron un porcentaje de inhibición en promedio de 23,62% y 50,00%, respectivamente, sobre el hongo ensayado, mientras que el extracto acuoso de origen etanólico y el acuoso de origen metanólico evidenciaron en promedio halos de inhibición de 22 mm y 23 mm, respectivamente. Así mismo, presentaron unas CMI de 23,30 mg/ml y 33,30 mg/ml, respectivamente. En cuanto a la actividad antiaflatoxigénica, el extracto acuoso de origen etanólico redujo las concentraciones de aflatoxinas de 5, 15 y 45 µg/kg en un 90,00%, 85,28% y 84,70%, respectivamente; en cambio, el extracto acuoso de origen metanólico redujo las concentraciones de aflatoxinas en un 86,00%, 91,59% y 89,31, respectivamente. En conclusión, los extractos de *Melissa officinalis* mostraron actividad antifúngica y antiaflatoxigénica sobre *Aspergillus flavus*, inhibiendo en gran parte su crecimiento y reduciendo significativamente las concentraciones de aflatoxinas.

## INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son compuestos químicos tóxicos producidos como metabolitos secundarios por varios hongos, cuando crecen en condiciones favorables, y son excretados por ellos en diversos sustratos, los cuales incluyen granos, cereales, nueces, especias, frutas, verduras, semillas oleaginosas, entre otros, que son utilizados para el consumo humano y/o animal. La contaminación de estos alimentos por hongos y sus respectivos metabolitos tóxicos ocurre, principalmente, durante los periodos de pre y post cosecha, en los cuales la humedad y la temperatura juegan un papel importante en el crecimiento del hongo y en la producción de micotoxinas (Sibanda *et al.*, 1997; Dalcero *et al.*, 1998; FAO, 2004; Trucksess *et al.*, 2006; Bloom *et al.*, 2007; Kralj y Prosen, 2009).

La toxicidad de las micotoxinas es individual, variable y depende de las condiciones físicas y químicas de cada toxina, del nivel de consumo, del tiempo de exposición, de las especies de animales contaminadas, del sexo, de la edad, de la raza, del estado fisiológico y nutricional de los consumidores, de las condiciones ambientales y de la sinergia entre las micotoxinas presentes simultáneamente en los alimentos y piensos. Además, las micotoxinas presentan una gama de efectos tóxicos que van desde los carcinogénicos, teratogénicos o mutagénicos, hasta alteraciones de tipo hormonal o inmunosupresor. Se conocen más de 300 micotoxinas; sin embargo, las principalmente asociadas a problemas de toxicidad alimentaria son: las aflatoxinas, las ocratoxinas, la zearalenona, las fumonisinas y los tricotecenos. Las aflatoxinas han despertado un mayor interés debido a su toxicidad aguda y crónica, y su continua presencia como contaminantes en productos de consumo humano y/o animal (Cutuli *et al.*, 1991; Sanchis *et al.*, 2000; Bennett y Klich, 2003; Heidler y Schatzmayr, 2003; Requena *et al.*, 2005; Trucksess *et al.*, 2006).

Las aflatoxinas son un grupo de metabolitos fúngicos que, químicamente, son derivados difurano cumarinas, comúnmente encontradas en el maíz, maní, higos, algodón, leche, tabaco, frutos secos y otros alimentos. Estas toxinas fueron aisladas y caracterizadas en

1960, después de la muerte de miles de pavos en Londres, debido a una necrosis aguda del hígado e hiperplasia del conducto biliar (conocida como enfermedad X de los pavos), como consecuencia del consumo de harina de maní contaminada con toxinas de *Aspergillus flavus*. Recientemente, se confirmó la intervención del ácido ciclopiazónico en la etiología de la enfermedad X de los pavos. Las aflatoxinas han sido descritas como hepatotóxicas, carcinogénicas, mutagénicas y teratogénicas (D'Mello y Macdonald, 1997; Sibanda *et al.*, 1997; Bennett y Klich, 2003; FAO, 2004; Boermans y Leung, 2007; Martins *et al.*, 2007; Biagi, 2009).

En la actualidad se conocen 18 tipos de aflatoxinas, de las cuales sólo las aflatoxinas del grupo B (B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>), G (G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>) y M (M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub>) tienen importancia como contaminantes de alimentos. Las aflatoxinas del grupo B y G son directamente producidas por el hongo, y las del grupo M son derivados hidroxilados de los grupos anteriores. La designación B y G es debida a su fluorescencia bajo la luz ultravioleta (Blue: azul y Green: verde) y la numeración 1 y 2 hace referencia a la movilidad cromatográfica relativa (Bennett y Klich, 2003; Del Río *et al.*, 2007; Soriano, 2007; Marai y Asker, 2008).

La aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) es el principal miembro tóxico del grupo de las aflatoxinas, ya que es el más poderoso carcinógeno natural que se ha conocido y ha sido clasificado por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer como un carcinogénico en seres humanos del grupo I. Se puede encontrar en la cebada, frijoles, granos, semillas de algodón, arroz, trigo, entre otros productos agrícolas. Algunos efectos de la AFB<sub>1</sub> es que produce disminución de entrada o rechazo de comida en animales, reducción de la absorción nutritiva y del metabolismo, hemorragias y necrosis (Boermans y Leung, 2007; Martins *et al.*, 2007; Soriano, 2007; Oliveira *et al.*, 2009).

Las aflatoxinas son producidas, principalmente, por *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, que son especies del género *Aspergillus* pertenecientes a la sección *Flavi*, los cuales se encuentran mayoritariamente en regiones subtropicales y tropicales con clima cálido y húmedo. Ambas especies se encuentran habitualmente contaminando cultivos de maíz, maní, semillas de algodón, cereales y especias. *A. flavus* típicamente

produce las aflatoxinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> y, a menudo, el ácido ciclopiazónico, mientras que *A. parasiticus* produce las aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>, pero no ácido ciclopiazónico (D'Mello y Macdonald, 1997; Magnoli *et al.*, 1998; Placinta *et al.*, 1999; Horn *et al.*, 2000; González *et al.*, 2003; Maraqa *et al.*, 2007; Soriano, 2007; Lazo y Sierra, 2008; Biagi, 2009).

El género *Aspergillus* pertenece a la subdivisión Deuteromycotina, la cual se caracteriza por reproducirse por conidios a partir de una célula conidiógena (reproducción asexual) y de carecer de reproducción sexual o estado perfecto. Además, los deuteromicotinas se dividen generalmente en base a la formación de sus conidios. Las colonias del género *Aspergillus* son de crecimiento rápido, presentándose en diferentes tonos: blanquecinas, amarillentas, marrón-amarillentas, negruzcas, marrón-negruzcas o verdosas. Están compuestas por densas agrupaciones de conidióforos erectos sobre los que se encuentran las células conidiógenas, que son las que originarán las esporas asexuales o conidios. La vesícula, fiálides, métulas y conidios forman la cabeza conidial. Los conidios en cadenas pueden formar columnas compactas o divergentes, son unicelulares, lisos o rugosos e hialinos o pigmentados (Samson *et al.*, 1995; Soriano, 2007).

Las colonias de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* son de color verde amarillento a verde oliváceo y pueden presentar esclerocios marrones o negros, variables en forma y tamaño. *A. flavus* presenta conidióforos de paredes gruesas, incoloros y rugosos. La vesícula es subglobosa o globosa y las fiálides son uniseriadas o biseriadas. Los conidios son lisos o ligeramente rugosos y las cabezas conidiales habitualmente biseriadas. *Aspergillus parasiticus*, en cambio, presenta conidióforos de paredes lisas y pigmentados, y fiálides incoloras o amarillo pálido. Los conidios son de paredes gruesas, globosos, rugosos y de color amarillo-verde, las cabezas conidiales suelen ser uniseriadas (Hedayati *et al.*, 2007; Soriano, 2007).

Estas dos especies de *Aspergillus* se desarrollan cuando condiciones, como la temperatura y la humedad, favorecen su proliferación. *A. flavus* puede proliferar a temperaturas de 10 a 43°C, produciendo aflatoxinas en un intervalo de temperaturas de

15 a 37°C, y puede proliferar con una actividad de agua alta, aproximadamente de 0,99. *A. parasiticus* puede crecer a una temperatura de 30°C y producir toxinas a 28°C. Además, puede proliferar con una actividad de agua mínima de 0,83 y producir aflatoxinas en un valor de 0,87 (D'Mello y Macdonald, 1997; FAO, 2004).

En cuanto a la legislación de las micotoxinas, numerosos países han establecido reglamentos para su control, centrados básicamente en las aflatoxinas. A nivel mundial, en el año 2003 alrededor de 99 países tenían reglamentos para las micotoxinas en los alimentos y/o en las raciones representando, aproximadamente, el 87% de los habitantes del planeta. De hecho, todos los países con reglamentaciones para las micotoxinas tenían en el año 2003, al menos, límites reglamentados para la aflatoxina B<sub>1</sub> o para aflatoxinas totales. Para la aflatoxina B<sub>1</sub> en los alimentos, los países pertenecientes a la Unión Europea (UE) y la Asociación Europea de Libre Comercio (AELC) se rigen por el valor límite de 2 µg/kg, mientras que 21 países de África, de Asia/Oceanía, de América Latina y de Europa aplican el valor límite de 5 µg/kg. Para las aflatoxinas totales en los alimentos, los países pertenecientes a la UE y AELC se rigen por el valor de 4 µg/kg, y por otro parte, en 17 países, la mitad de ellos en América Latina y en varios países del África, además de Estados Unidos, aplican el valor de 20 µg/kg (FAO, 2003).

Los países pertenecientes a la UE, AELC y otros países en el África, Asia y América Latina aplican el valor máximo permitido de aflatoxina M<sub>1</sub> de 0,005 µg/kg en los productos lácteos, mientras que Estados Unidos y varios países asiáticos y europeos se rigen por el valor de 0,5 µg/kg. En Venezuela, solamente se encuentran reglamentados los niveles máximos de las aflatoxinas totales para maíz, harina de maíz, maníes, manteca de maní y alimentos concentrados para aves en 20 µg/kg y de la aflatoxina M<sub>1</sub> para la leche de consumo en 0,5 µg/kg y leche en polvo en 5,0 µg/kg (COVENIN, 1983; FAO, 2003).

Para destruir, inactivar o eliminar las micotoxinas y los efectos tóxicos de los alimentos contaminados con ellas, se debe contar con un método de descontaminación ideal que sea fácil de usar, económico, que no forme compuestos más tóxicos que la micotoxina

original y no altere las cualidades nutricionales ni organolépticas de los alimentos. El control de estas sustancias tóxicas se realiza mediante métodos físicos, químicos y biológicos. Los tratamientos físicos incluyen: la selección de granos, el descascarillamiento, la separación mecánica de la cáscara y el polvo del resto del cereal, el lavado, la flotación, la temperatura, la absorción con solventes orgánicos y la irradiación. Así se tiene, por ejemplo, que la eliminación física de los maníes descoloridos, dañados o mal desarrollados disminuye de manera significativa la concentración de las aflatoxinas y fumonisinas. La eliminación de los granos de maíz menores de 3 mm puede reducir el nivel de fumonisinas en un 70,00%. La flotación puede disminuir hasta un 90,00% las altas concentraciones de aflatoxinas en el maíz y el maní contaminado, debido al flote sobre el agua. El enjuague de los granos con agua o con solución de carbonato de sodio podría reducir la concentración de las micotoxinas deoxinivalenol (DON), zearalenona (ZEA) y fumonisinas en trigo y maíz (Sanchis *et al.*, 2000; Peraica *et al.*, 2002; Heidler y Schatzmayr, 2003; Soriano, 2007).

Por otra parte, hay que tener en cuenta que las micotoxinas son resistentes al calor, por lo que las altas temperaturas no son utilizadas en la descontaminación de cereales y otros productos agrícolas, debido a sus repercusiones en las propiedades nutricionales y organolépticas de los alimentos obtenidos. El uso de absorbentes en los alimentos para animales ha mostrado efectividad para determinadas micotoxinas, aumentando la productividad y reduciendo la mortalidad, pero ha mostrado el inconveniente de absorber minerales y vitaminas, aunque su incorporación en los piensos permite la formación de compuestos inertes, irreversibles y estables, previniendo la formación de metabolitos más tóxicos que la micotoxina original. Los absorbentes más utilizados son el carbón activo, los glucomananos esterificados, la colestiramina y los aluminosilicatos. La irradiación es una de las últimas técnicas físicas utilizadas y los diferentes tipos de irradiaciones (irradiación  $\gamma$ , X, UV,) han sido probados para la detoxificación de micotoxinas. La  $\gamma$ -irradiación reduce la concentración de las toxinas T-2, ZEA y DON en el trigo. Es importante destacar, que el éxito de los procedimientos físicos depende del nivel de contaminación y la distribución de las micotoxinas, y además, varias de estas técnicas son relativamente costosas y pueden eliminar o destruir nutrientes

esenciales en los alimentos (Peraica *et al.*, 2002; Heidler y Schatzmayr, 2003; Soriano, 2007).

Los métodos químicos requieren de facilidades de reacción, tratamientos adicionales, como secado y limpieza, que implican más tiempo y resultan ser costosos; sin embargo, el uso de compuestos químicos como peróxido de hidrógeno, bisulfito, cloro, hidróxido de calcio, azúcares, ozono o compuestos fungistáticos (ácido propiónico, ácido fórmico, hidróxido de sodio, propionato de amonio, entre otros) tienen la capacidad de degradar las toxinas fúngicas de productos agrícolas. El peróxido de hidrógeno destruye en gran cantidad la aflatoxina B<sub>1</sub> en el maíz y no deja metabolitos más tóxicos que la micotoxina original. El bisulfito de sodio es un aditivo alimentario que reduce significativamente el DON y la aflatoxina B<sub>1</sub> en alimentos para cerdos a base de maíz. El cloruro de sodio reduce la concentración de aflatoxinas en maníes sin cáscara, cocidos bajo presión. En el proceso de nixtamalización, el maíz se cocina en agua adicionada con cal, permitiendo la reducción de las aflatoxinas en un 90,00%, debido a que éstas se transforman en metabolitos no tóxicos como aflatoxina B<sub>2a</sub> y G<sub>2a</sub>. Por otra parte, el calentamiento de la fumonisina B<sub>1</sub>, junto con glucosa durante 48 horas, puede reducir la cantidad de esta micotoxina hasta un 95,00%. Así mismo, el ozono puede degradar las aflatoxinas en cereales. Los fungistáticos como el ácido propiónico y sus sales cálcica y sódica, el propionato de amonio, el ácido sórbico y su sal potásica, el ácido fórmico y sus sales cálcica y sódica inhiben el crecimiento y la proliferación de los hongos micotoxigénicos, debido a que inhiben la síntesis de varias enzimas a nivel de la célula fúngica (Huwig *et al.*, 2001; Peraica *et al.*, 2002; Heidler y Schatzmayr, 2003; Soriano, 2007).

Dentro de los métodos biológicos tenemos: el uso de enzimas biotransformadoras, de agentes biológicos de control y de plantas modificadas genéticamente. Las enzimas biotransformadoras pueden transformar las micotoxinas en compuestos menos tóxicos o no tóxicos. Por ejemplo, es probable que una proteína con características enzimáticas producidas por *Flavobacterium aurantiacum* sea la responsable de la reducción de la aflatoxina B<sub>1</sub>. En el caso de los agentes biológicos, se aplican hongos u otros microorganismos antagónicos para que inhiban el crecimiento de los hongos

micotoxigénicos y sus metabolitos en el producto elaborado. Cepas no aflatoxigénicas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* compiten con las cepas micotoxigénicas, logrando reducir las aflatoxinas en un 99,00% en cereales. Por otra parte, la bacteria *Flavobacterium aurantiacum*, puede eliminar la aflatoxina B<sub>1</sub> en aceites vegetales, maíz, maníes y derivados. Las plantas modificadas genéticamente reducen la contaminación por micotoxinas. El llamado maíz Bt, es un maíz al que se le ha ingresado los genes de la bacteria *Bacillus thuringiensis*, que elaboran una toxina dañina para las larvas de lepidópteros que se alimentan de la planta, minimizando la infección de ciertos hongos y disminuyendo los niveles de fumonisinas (Soriano, 2007).

Mundialmente, las pérdidas después de las cosechas han sido estimadas en un 50,00% y es debido mayoritariamente a las infecciones fúngicas. En países en vías de desarrollo, las pérdidas después de las cosechas son a menudo más severas, debido a la carencia de manejo adecuado e instalaciones de almacenaje de atmósfera refrigeradas controladas. Los hongos en alimentos almacenados son responsables del cambio de sus características organolépticas, de la reducción del valor nutricional y la consiguiente producción de micotoxinas. Actualmente, la actividad antifúngica de las plantas ha sido estudiada por las resistencias de patógenos a los diferentes fungicidas comerciales utilizados, en el control de enfermedades de cultivos agrícolas y por la presencia de residuos químicos en la cadena de alimentos, lo que ha estimulado en los últimos años a la búsqueda de nuevas sustancias antifúngicas de origen vegetal, las cuales han sido efectivas contra fitopatógenos tanto *in vitro* como *in vivo*. Los extractos naturales de plantas son de interés por ser sustitutos efectivos para producir sintéticamente agentes antimicrobianos y son una alternativa para evitar la contaminación de alimentos o piensos por hongos (Magro *et al.*, 2006; Márquez *et al.*, 2007; Thanaboripat *et al.*, 2007).

Los aceites esenciales son compuestos volátiles, naturales y complejos caracterizados por un olor fuerte, producidos por plantas aromáticas como metabolitos secundarios, constituidos generalmente por terpenos, hidrocarburos lineales, derivados del benceno, ésteres, alcoholes, ácidos grasos, fenoles, ceras, acetales, cetonas, aldehídos, glicósidos

(terpenos unidos químicamente a azúcares), alcaloides, cumarinas, esteroides y compuestos heterocíclicos. Son mezclas solubles en etanol y éter, y casi insolubles en agua. Los aceites esenciales se extraen de diversas plantas aromáticas, por lo general localizadas en climas templados a cálidos de países del mediterráneo y países tropicales. Son obtenidos a partir de material vegetal como flores, hojas, tallos, ramas, semillas, frutos, raíces, madera o corteza. Además, juegan un rol importante en la protección de las plantas como sustancias antibacterianas, antivirales, antifúngicas, insecticidas y también contra herbívoros por reducir su apetito para tales plantas. Ellos también pueden atraer algunos insectos para favorecer la dispersión de polen y semillas, o rechazar otros indeseables (Burt, 2004; Celis, 2007; Bakkali *et al.*, 2008).

Los aceites esenciales pueden contener cerca de 20-60 componentes en concentraciones diferentes. Se caracterizan por dos o tres grandes componentes en concentraciones bastantes altas (20,00-70,00%), en comparación a los componentes presentes en cantidades traza. Por ejemplo, el carvacrol (30,00%) y timol (27,00%) son los componentes principales del aceite esencial de *Origanum compactum*, linalol (68,00%) del aceite esencial de *Coriandrum sativum*, mentol (59,00%) y mentona (19,00%) del aceite esencial de *Mentha piperita*, entre otros. En la actualidad, se conocen aproximadamente 3 000 aceites esenciales, de los cuales 300 son comercialmente importantes, siendo usados en las industrias farmacéuticas, agronómicas, cosméticas, de perfumes y en la preservación de productos de alimentación; además, son usados como antimicrobianos, analgésicos, sedantes, antiinflamatorios, espasmolíticos y anestésicos locales (Celis, 2007; Bakkali *et al.*, 2008).

Considerando el gran número de compuestos químicos presentes en los aceites esenciales, lo más probable es que su actividad antimicrobiana no se debe a un mecanismo específico, sino que actúan en varias partes de las células. Se han propuesto posibles mecanismos de acción mediante el cual puede ser reducido el crecimiento del micelio o totalmente inhibido. Por una parte, se le atribuye esta función a los compuestos fenólicos: la anfipaticidad de estos compuestos puede explicar sus

interacciones con biomembranas y, por lo tanto, la actividad antimicrobiana. También es comúnmente aceptado que los efectos tóxicos de los componentes de los aceites esenciales y extractos son responsables de la actividad antimicrobiana, debido que alteran la funcionalidad estructural de la membrana celular (Sikkema *et al.*, 1995; Burt, 2004; Bakkali *et al.*, 2008; Hadizadeh *et al.*, 2009).

*Melissa officinalis*, conocida comúnmente como toronjil, citronela, limonera, es natural del sur y centro de Europa. Crece en estado silvestre en regiones tropicales en malezas o bosques o junto a las casas de campo en terrenos ricos en materia orgánica, en lugar sombreado. Puede encontrarse cultivada en jardines. Es utilizado como planta medicinal casera y para la industria farmacéutica o en la industria cosmética. Es una planta perenne (en los climas cálidos) perteneciente a la familia de las labiadas, que puede crecer hasta 80 cm de altura; de tallos erectos, cuadrados y leñosos. Hojas con dientes muy marcados, con característico olor a limón, pecioladas, ovales. Flores blancas o rosadas de hasta 1,2 cm reunidas en verticilos de hasta diez flores. Se le atribuyen propiedades medicinales antiespasmódicas, digestivas, bacteriostáticas y antivirales (Cardona, 1997; Izco *et al.*, 1997; Sitte *et al.*, 2004).

Los fungicidas son la primera elección para el control de hongos y sus metabolitos, pero en la actualidad, estos compuestos químicos empleados en el control de hongos en los cultivos han provocado el desarrollo de resistencia fúngica, contaminación ambiental y riesgos de salud pública. Todo esto ha permitido el estudio de la actividad antifúngica de las plantas silvestres para la búsqueda de nuevas sustancias antifúngicas entre los productos naturales, como una alternativa innovadora para el control de los hongos y sus micotoxinas. Es por ello, que el objetivo de la presente investigación fue evaluar la actividad antifúngica y antiaflatoxigénica de extractos de toronjil (*Melissa officinalis*) sobre *Aspergillus flavus*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepa fúngica

Se utilizó una cepa de *Aspergillus flavus* (FAF-201) aislada de muestras de alimentos concentrados para pollos y perteneciente a la colección de hongos del Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas del Departamento de Bioanálisis, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente.

### Planta

Los extractos alcohólicos fueron obtenidos de la planta *Melissa officinalis* (toronjil), la cual fue adquirida fresca en el mercado municipal de la ciudad de Cumaná, estado Sucre. Se emplearon, únicamente, hojas y tallos, que fueron secados en una estufa (marca P Selecta) a 45°C, hasta sequedad total.



Figura 1. Tallos y hojas de *Melissa officinalis* (A: Tallos y hojas frescos y B: Tallos y hojas secos).

## **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* fue cultivado en tubos de ensayo con agar papa dextrosa (PDA) a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  por 10 días. Posteriormente, se preparó una suspensión de conidios, agregando al tubo 10 ml de solución salina (0,90%) estéril y se procedió a agitar vigorosamente para facilitar el desprendimiento de los conidios. La suspensión obtenida se filtró a través de doble gasa estéril, eliminando de esta forma otras estructuras fúngicas y obteniendo sólo conidios en la suspensión. Se determinó el número de conidios por ml de la suspensión, utilizando cámara de Neubauer y se ajustó la concentración a  $10^6$  conidios/ml.

## **Extracciones y actividad antifúngica**

Una vez seca la planta, fue triturada en un mortero de cerámica, obteniéndose un fino polvo y se procedió a preparar los extractos, usando como solventes etanol y metanol.

La obtención de los extractos se llevó a cabo siguiendo dos metodologías; la primera de ellas fue por el método descrito por Tequida-Meneses *et al.* (2002), con ligeras modificaciones. Se mezclaron 10 g de polvo de la planta con 90 ml de etanol al 80,00% y otros 10 g con metanol al 70,00%. Las extracciones se realizaron mediante remojo por 15 min, con agitación mecánica, utilizando un shaker (marca Lab Line), dejando reposar la mezcla durante 48 horas en oscuridad, a temperatura ambiente. Los extractos obtenidos se filtraron en dos etapas: primero a través de tela de lino para eliminar las partículas vegetales de mayor tamaño, seguida de centrifugación a 7 000 rpm por 10 minutos con posterior decantación y, finalmente, una segunda filtración con papel Whatman # 1. Los extractos obtenidos se almacenaron en frascos de vidrio color ámbar que se guardaron en refrigeración.

Cada uno de los extractos preparados fue mezclado con agar papa dextrosa (PDA) a  $45-50^\circ\text{C}$ , en una relación 1:10 (18 ml de PDA y 2 ml del extracto). La mezcla fue vertida sobre una placa de Petri. Una vez solidificado el agar, las placas se incubaron por 24 h

para la evaporación del alcohol utilizado como solvente. Después se inocularon con la suspensión de conidios correspondiente, por punción central. Se contó con un tratamiento control que consistió en una placa de Petri, donde se mezclaron 18 ml de PDA con 2 ml del solvente utilizado. Las placas fueron incubadas por 7 días a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  y se examinaron cada 48 h. Se midió el diámetro de las colonias de los hongos desarrollados, que se representaron gráficamente en función del crecimiento radial expresado en milímetros y el tiempo de incubación en horas. El porcentaje de inhibición de crecimiento fue calculado tomando en cuenta que la inhibición es el inverso del crecimiento.

La segunda metodología utilizada para la obtención de los extractos fue el método de Bluma *et al.* (2008), con modificaciones. Se mezclaron 3 g de polvo de la planta con 20 ml de alcohol, utilizando etanol al 80,00% y metanol al 70,00%; estas mezclas se dejaron en reposo durante 48 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Los extractos obtenidos se filtraron con papel de filtro Whatman # 1 y éstos, a su vez, se vertieron en placas de Petri de vidrio, que fueron previamente pesadas; posteriormente, las placas que contenían los extractos fueron guardadas en oscuridad hasta que se evaporó completamente el alcohol utilizado, y luego se determinó el peso seco de los extractos. Finalmente, los extractos obtenidos se resuspendieron con 3 ml de agua destilada estéril y fueron depositados en viales y se guardaron en refrigeración.

La actividad antifúngica de los extractos obtenidos fue determinada de acuerdo a De Souza *et al.* (2005), con ligeras modificaciones. En placas de Petri que contenían agar papa dextrosa (PDA) fueron diseminados uniformemente 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión de conidios con asa de Diglaski. A continuación, y separadamente, se impregnaron los discos de papel de filtro estériles de 6 mm de diámetro con cada uno de los extractos y se situaron en el medio de las placas de Petri con PDA inoculadas con la suspensión de conidios. Se contó con un tratamiento control de placas de que contenía PDA inoculada con la suspensión de conidios. Las placas fueron incubadas por tres días a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Los halos de inhibición fueron medidos usando una regla.

### **Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)**

La CMI se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Rasooli y Mirmostafa (2003) y Rasooli *et al.* (2008), realizándole ciertas modificaciones; para ello se mezclaron 100 µl de varias diluciones de los extractos (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*. La placa se incubó a 28°C durante 48 horas. La concentración mínima inhibitoria correspondió al micropozo con la mayor dilución que no mostró crecimiento fúngico.

### **Actividad antiaflatoxigénica**

Se puso en contacto 100 µl de los extractos con 100 µl de aflatoxinas de concentración conocida (5, 15 y 45 µg/kg), durante 5 minutos y, posteriormente, se aplicaron a las mezclas el método de enzima inmunoensayo competitivo (ELISA), siguiendo las instrucciones del kit RIDASCREEN®FAST (BIOPHARM, Alemania), para determinar la reducción de la concentración de las aflatoxinas después de la adición de los extractos. La base del ensayo es la reacción antígeno-anticuerpo. Los pocillos de la microplaca están sensibilizados con anticuerpos de captura dirigidos contra anticuerpos anti-aflatoxina. Se agregan los estándares de aflatoxina o la solución de las muestras, el conjugado aflatoxina-enzima y los anticuerpos anti-aflatoxina a los pocillos. La aflatoxina libre y el conjugado aflatoxina-enzima compiten por los sitios de unión de los anticuerpos anti-aflatoxina (inmunoensayo enzimático competitivo). Al mismo tiempo, los anticuerpos anti-aflatoxina se unen a los anticuerpos de captura inmovilizados. Cualquier conjugado enzimático no unido se remueve en el paso de lavado. Se agrega sustrato/cromógeno a los pocillos. El conjugado enzimático unido convierte al cromógeno en un producto azul. La adición de la solución stop lleva a un cambio de color del azul al amarillo. La medición se hace fotométricamente a 450 nm y la absorbancia es inversamente proporcional a la concentración de la aflatoxina en la muestra.

El procedimiento del ensayo se hizo de la siguiente forma: se agregaron 50 µl de los estándares y de las muestras a analizar a los pocillos correspondientes; inmediatamente, se agregaron 50 µl del conjugado aflatoxina-enzima a los pocillos correspondientes y 50 µl de anticuerpo anti-aflatoxina 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 con agua destilada (250 µl por pocillo), utilizando una botella de lavado y se vaciaron los pocillos nuevamente de la forma ya indicada. Se repitió este paso dos veces más. Se agregaron dos gotas o 100 µl de substrato/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). Finalmente, se agregaron dos gotas o 100 µl de la solución stop a cada pocillo, se mezcló el contenido de la microplaca suavemente. Se midió la absorción a 450 nm en el transcurso de los siguientes 10 minutos con un lector de ELISA marca BIOTEK MODELO ELX800. La lectura de los resultados se realizó usando el software comercial KC-Junior™. Cada ensayo se acompañó de un control con las aflatoxinas de concentración conocida y se realizaron 3 repeticiones.

### **Análisis estadístico**

Para comparar los niveles de aflatoxinas antes y después del tratamiento con los extractos de *Melissa officinalis*, se realizó un análisis de t-Student para datos apareados, con un nivel de significancia de  $p < 0,05$  usando el programa estadístico Statgraphics, versión 5.1 (Wayne, 2002).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la naturaleza, *Aspergillus flavus* es uno de los hongos más abundantes y ampliamente distribuido. Es un hongo saprófito, capaz de sobrevivir en muchas fuentes de nutrientes orgánicos, como escombros de plantas, hojas de árboles, madera en descomposición, alimentos preparados para animales, algodón y granos almacenados. *A. flavus* daña cultivos de maíz, algodón y maní, así como también frutos secos (nueces, pistachos). En general, la alta temperatura en el ambiente y el estrés de la planta son los dos parámetros ambientales más estrechamente correlacionados con las infecciones de *A. flavus* en las plantas. Además, este hongo produce muchos metabolitos secundarios, como las aflatoxinas, que son tóxicas y carcinogénicas, causan aflatoxicosis e inducen cáncer en mamíferos que consumen alimentos contaminados con éstas (Yu *et al.*, 2005; Sudhakar *et al.*, 2009).

Dada esta situación, en los últimos años se ha mostrado interés en reconocer la importancia de los hongos fitopatógenos y la dificultad para lograr un buen control de los mismos, así como el aumento en la resistencia a los antifúngicos comerciales, incrementándose la investigación para la búsqueda de alternativas basadas en productos naturales. El interés por la posible aplicación de aceites esenciales para el control de fitopatógenos ha aumentado por la necesidad de minimizar el uso de fungicidas comerciales en la agricultura. Se ha demostrado que los aceites esenciales y sus compuestos tienen un efecto fungicida, son inocuos para el medio ambiente, para los consumidores y para el control de enfermedades post cosecha. Sin embargo, es importante tener en cuenta que para obtener aceites esenciales de composición constante, tienen que ser extraídos en las mismas condiciones que la planta, del mismo órgano de la planta que ha estado creciendo en el mismo suelo, bajo el mismo clima y ha sido escogida en la misma temporada, de lo contrario los aceites esenciales pueden presentar cambios, modificándose las proporciones de los metabolitos o transformándose unos en otros. (Prabuseenivasan *et al.*, 2006; Celis, 2007; Bakkali *et al.*, 2008; Barrera-Necha y García-Barrera, 2008).

Al evaluar la actividad antifúngica de los extractos etanólico y metanólico de *Melissa officinalis* sobre *Aspergillus flavus*, los resultados mostraron una reducción estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) del crecimiento del hongo ensayado, en comparación con el control (Tabla 1). Resultados similares fueron obtenidos por Pirzada *et al.* (2009), los cuales mostraron que el extracto etanólico de la planta *Cressa cretica* sobre *A. flavus* presentó un porcentaje de inhibición de crecimiento de 28,58%, mientras que con el extracto metanólico fue de 42,86%. Por su parte, Bejarano y Centeno (2009) obtuvieron que el extracto de *Citrus limon* inhibió totalmente el crecimiento de *A. flavus*, *Penicillium citrinum* y *Aspergillus niger*, por lo que el porcentaje de inhibición de crecimiento de este extracto sobre dichos hongos fue de 100%, atribuyéndolo el efecto antifúngico del extracto *Citrus limon* a la presencia de compuestos fitoquímicos, que son moléculas orgánicas y su acción puede estar relacionada con la ruptura de las membranas plasmáticas de los microorganismos por medio de compuestos lipofílicos.

Tabla 1. Efecto del extracto etanólico y metanólico de *Melissa officinalis* sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus*.

Extractos de <i>Melissa officinalis</i>	Crecimiento de <i>Aspergillus flavus</i> (mm)	Control	Promedio del % de inhibición de crecimiento	p valor
Etanólico	55,00	72,00	25,00	0,0010
	53,00			
	54,00			
Metanólico	37,00	64,00	44,79	0,0009
	34,00			
	35,00			

En las figuras 2 y 3 se muestran los efectos del extracto etanólico y metanólico, respectivamente, de *Melissa officinalis* sobre *A. flavus*, observándose que los extractos actuaron como agentes antifúngicos sobre el crecimiento de la especie ensayada durante 7 días de incubación. Así mismo, en las figuras 4 y 5 se muestran imágenes fotográficas del efecto de los extractos de *M. officinalis* sobre *A. flavus*

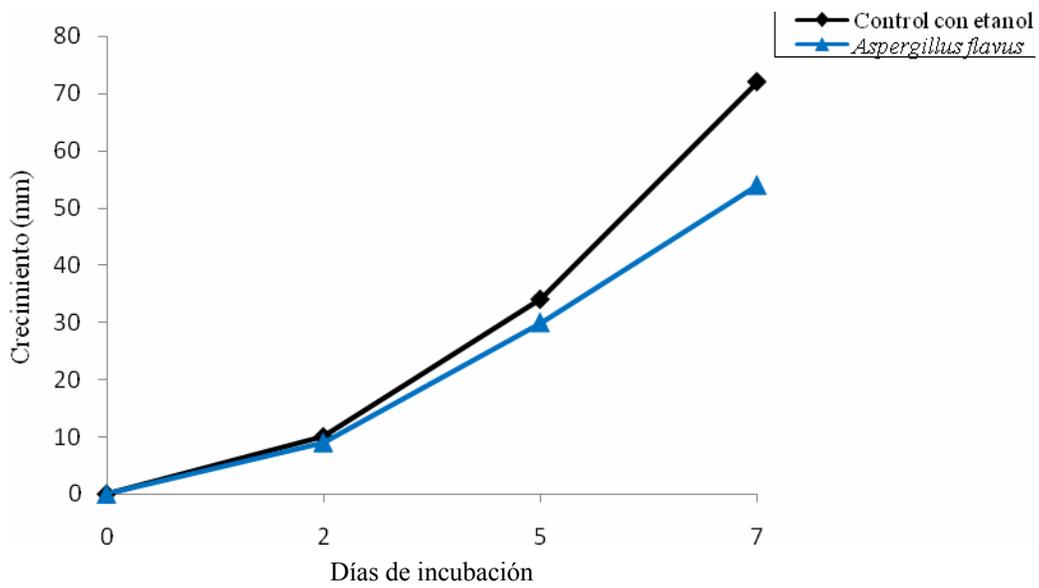


Figura 2. Efecto del extracto etanólico de *Melissa officinalis* sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus*.

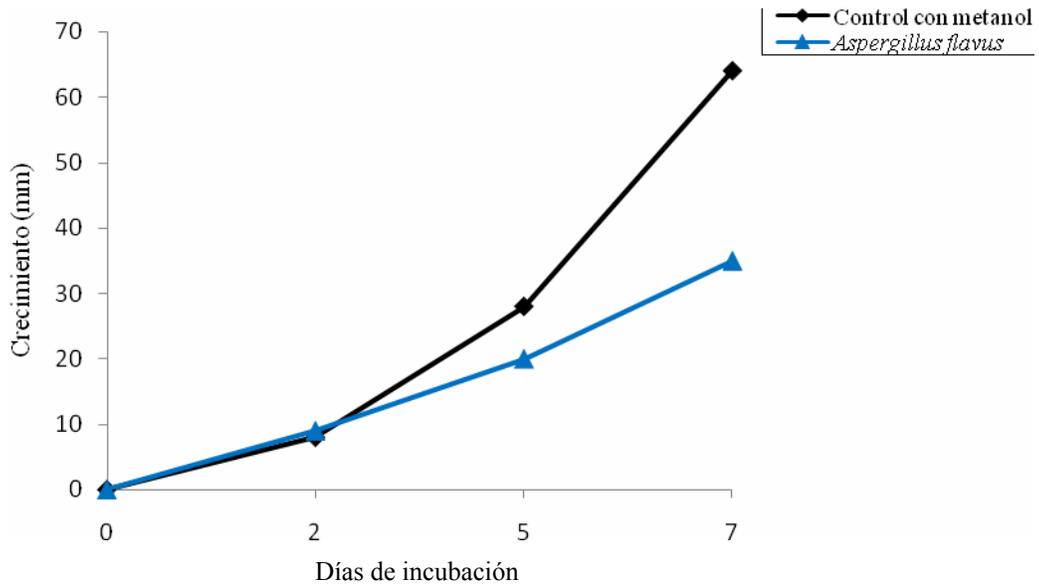


Figura 3. Efecto del extracto de metanólico de *Melissa officinalis* sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus*.

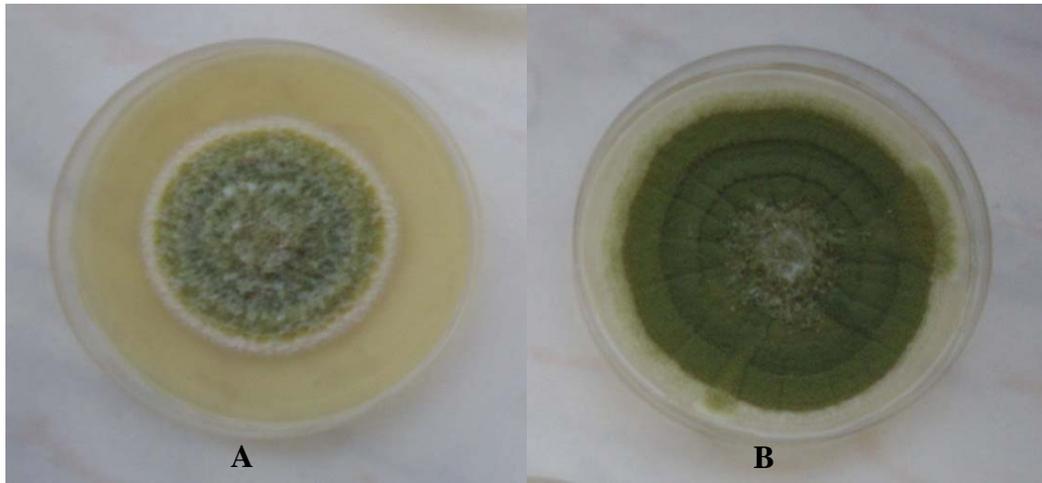


Figura 4. Efecto del extracto etanólico de *Melissa officinalis* sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus* (A: Agar papa dextrosa (PDA) + extracto etanólico de *M. officinalis* (1:10), inoculación central de *A. flavus*, B: Control).

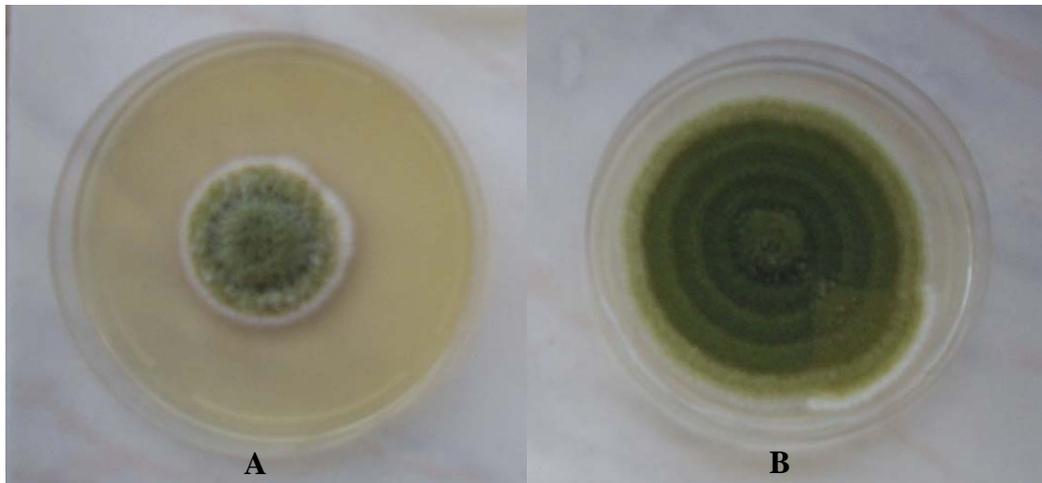


Figura 5. Efecto del extracto metanólico de *Melissa officinalis* sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus* (A: Agar papa dextrosa (PDA) + extracto metanólico de *M. officinalis* (1:10), inoculación central de *A. flavus*, B: Control).

Por otra parte, al comparar los halos de inhibición producidos por los extractos acuosos de *Melissa officinalis* sobre *Aspergillus flavus*, el resultado obtenido no es estadísticamente significativo ( $p > 0,05$ ), por lo que ambos extractos podrían ser utilizados como sustancias antifúngicas contra *Aspergillus flavus*. Cárdenas *et al.* (2005), demostraron que el extracto etanólico de *Chrysactinia mexicana* sobre *Aspergillus flavus*

presentó un halo de inhibición de  $18,8 \pm 0,19$  mm y con el extracto metanólico el halo fue de  $16,6 \pm 0,22$  mm. Así mismo, Centeno *et al.* (2010), obtuvieron con el extracto etanólico *Thymus vulgaris* y *Rosmarinus officinalis* un halo de inhibición en promedio de 11,4 mm y 14,6 mm, respectivamente, sobre *Aspergillus flavus*.

Tabla 2. Halos de inhibición de los extractos acuosos de *Melissa officinalis* sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus*.

Extractos acuosos de <i>Melissa officinalis</i>	Microorganismo	Inhibición (mm)	p valor
Origen etanólico	<i>Aspergillus flavus</i>	22,00	0,5472
Origen metanólico	<i>Aspergillus flavus</i>	23,00	

En las figuras 6 y 7 se muestran imágenes fotográficas de los halos de inhibición producidos por el extracto acuoso de origen etanólico y el extracto acuoso de origen metanólico, respectivamente, de *Melissa officinalis* sobre *Aspergillus flavus*, observándose que los extractos actuaron como sustancias antifúngicas sobre el crecimiento de la especie estudiada durante 72 horas de incubación.

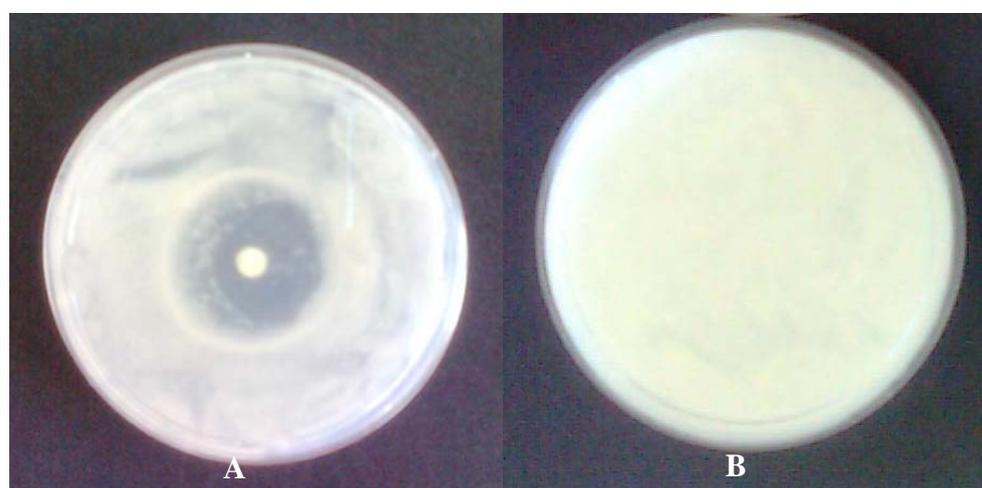


Figura 6. Halo de inhibición del extracto acuoso de origen etanólico de *Melissa officinalis* sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus* (A: Agar papa dextrosa (PDA) inoculado con *A. flavus* + disco central impregnado con el extracto de origen etanólico de *M. officinalis*, B: Control)

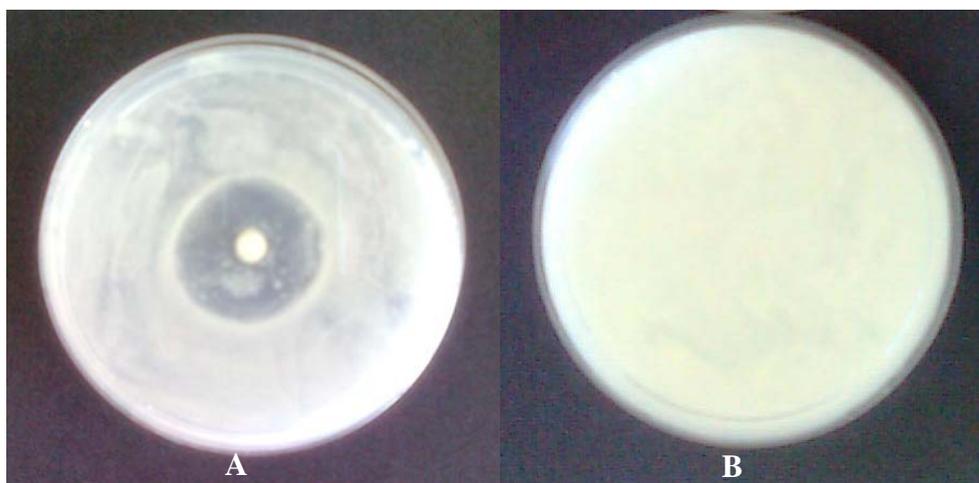


Figura 7. Halo de inhibición del extracto acuoso de origen metanólico de *Melissa officinalis* sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus* (A: agar papa dextrosa (PDA) inoculado con *A. flavus* + disco central impregnado con el extracto de origen etanólico de *M. officinalis*, B: Control).

Así mismo, la concentración mínima inhibitoria (CMI) para ambos extractos acuosos se observó a nivel de la dilución 1:2 (Tabla 1), que corresponde a una concentración de 23,30 mg/ml y 33,30 mg/ml para el extracto acuoso de origen etanólico y el extracto acuoso de origen metanólico, respectivamente. Ram Kumar *et al.* (2010), al ensayar con el extracto etanólico de *Syzygium aromaticum* y *Allium sativum* obtuvieron una CMI de 20 mg/ml sobre *Aspergillus flavus*. Doughari y Obidah (2008) obtuvieron una CMI de 48 mg/ml con el extracto metanólico de *Leptadenia lancifolia* sobre *Aspergillus flavus*. Por otra parte, Centeno *et al.* (2010) obtuvieron una CMI de 1 200 ppm con el extracto etanólico de *Thymus vulgaris* sobre *Aspergillus ochraceus*.

Tabla 3. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos acuosos de *Melissa officinalis* sobre *Aspergillus flavus*.

Extractos de <i>Melissa officinalis</i>	Microorganismo	Concentración Mínima Inhibitoria				
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
Origen etanólico	<i>Aspergillus flavus</i>	+	-	-	-	-
Origen metanólico	<i>Aspergillus flavus</i>	+	-	-	-	-

(+) No crecimiento, (-) Crecimiento

Es importante destacar que los extractos de origen metanólico obtenidos por ambos métodos presentaron mayor actividad antifúngica con respecto a los extractos de origen etanólico. Esto confirma lo señalado por Rhouma *et al.* (2009) cuando sostienen que el metanol es un mejor solvente para obtener una extracción más constante de sustancias antimicrobianas de plantas silvestres, en comparación con otros solventes como agua, etanol y hexano. Sin embargo, los extractos a base de metanol no serían los más idóneos para ser utilizados como sustancias antifúngicas, debido a su condición de tóxico para las plantas, animales y humanos.

El efecto antifúngico de *Melissa officinalis* sobre el hongo ensayado probablemente se debe a uno o todos los componentes de su aceite esencial. Estudios fitoquímicos realizados a *Melissa officinalis* han permitido conocer su composición química. Bahtiyarca y Cosge (2006), señalaron que los componentes del aceite esencial de esta planta son: citronelal (39,00%), citral (33,00%) y geranial (2,00%). Por su parte, De Martino *et al.* (2009) obtuvieron citronelal (39,56%), carvacrol (13,31%) e iso-mentona (8,85%). Todos estos compuestos son terpenos, específicamente monoterpenos, los cuales constituyen el 90% de los aceites esenciales (Bakkali *et al.*, 2008).

Los monoterpenos son metabolitos secundarios de las plantas, que juegan un papel importante en la función metabólica de ellas y resultan menos perjudiciales que los fungicidas químicos, desde el punto de vista ambiental. Estos compuestos en las plantas atraen insectos beneficiosos, que ayudan en el proceso de polinización. Los monoterpenos se forman a partir de la unión de dos unidades de isopreno y contienen 10 átomos de carbono. Los isopropilmetilfenoles como el carvacrol, timol y el espintanol, son monoterpenos que están asociados con diversas actividades biológicas, como antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes, lehismanicida, entre otras (Arango *et al.*, 2007; Bakkali *et al.*, 2008; Vaillant *et al.*, 2009).

Diversos investigadores han comprobado el efecto de los componentes de los aceites esenciales sobre microorganismos que afectan cultivos de importancia económica; así,

Vaillant *et al.* (2009) demostraron que el aceite esencial citronelal, obtenido de la planta *Cymbopogon nardus*, inhibió el crecimiento del hongo patógeno *Rhizoctonia solani*, que fue aislado de cultivos de papa. Alzate *et al.* (2009) obtuvieron que el aceite citral, extraído de las plantas *Thymus vulgaris* y *Cymbopogon citratus*, inhibieron el crecimiento y la esporulación del hongo *Colletotrichum acutatum*, el cual afecta, en su mayoría, los cultivos de fresas. Barrera-Necha *et al.* (2009) evidenciaron que el aceite esencial carvacrol, obtenido de las plantas *Cinnamomum zeylanicum*, *Syzygium aromaticum* y *Thymus vulgaris*, presentaron alta actividad antifúngica sobre *Fusarium oxysporum*.

Las propiedades biológicas de los aceites esenciales están directamente relacionadas con su composición química. Así, los sesquiterpenos presentan actividad citotóxica y mutagénica, y no son tan efectivos para inhibir el desarrollo de los microorganismos como sus análogos oxigenados. Sin embargo, los fenoles son inhibidores del crecimiento, dependiendo de su estructura química, razón por la cual los aceites esenciales con alto contenido de fenoles presentan elevada actividad antimicrobiana. La actividad citotóxica de los aceites esenciales se debe principalmente a la presencia de fenoles, aldehídos y alcoholes, mientras que las actividades antibacterianas y antifúngicas se deben a ciertos terpenoides y compuestos fenólicos. Las condiciones físicas que mejoran la acción de los aceites esenciales son el pH bajo, la baja temperatura y los bajos niveles de oxígeno bajos (Burt, 2004; Celis, 2007; Bakkali *et al.*, 2008).

Se han realizado estudios para entender el mecanismo de acción de los extractos de plantas, aceites esenciales y sus respectivos componentes; sin embargo, todavía no está claro. Omidbeygi *et al.* (2007) sugieren que los componentes de los aceites esenciales y extractos atraviesan la membrana celular, interactuando con las enzimas y las proteínas de la membrana, produciendo así un flujo de protones hacia el espacio extracelular que induce cambios en las células y finalmente su muerte. Cristani *et al.* (2007) informaron que la actividad antimicrobiana está relacionada no sólo con la capacidad de los terpenos de afectar la permeabilidad, sino también otras funciones de las membranas celulares,

atravesando las membranas celulares, penetrando en el interior de la célula e interactuando con los sitios críticos intracelulares. Lucini *et al.* (2006) indicaron que la inhibición del crecimiento micelial es causada por los monoterpenos presentes en los aceites esenciales. Estos compuestos podrían incrementar la concentración de peróxidos lipídicos, como radicales hidroxilo, alcoxilo y alkoperoxilo, logrando así la muerte del hongo. Para Sharma y Tripathi (2006), los componentes de los aceites esenciales y extractos actuarían en las hifas del micelio, provocando la salida de los componentes del citoplasma, la pérdida de rigidez y la integridad de la pared celular de las hifas, dando lugar a su colapso y la muerte del micelio. Daferera *et al.* (2000) reportaron que la actividad antifúngica de los aceites esenciales podría deberse a la formación de puentes de hidrógeno entre el grupo hidroxilo de los compuestos fenólicos del aceite y los sitios activos de ciertas enzimas.

Incluso, los aceites esenciales en las células eucariotas, como los hongos, pueden provocar despolarización de las membranas mitocondriales, disminuyendo el potencial de membrana, al afectar el ciclo iónico de  $\text{Ca}^{2+}$  y otros canales iónicos y reducir el gradiente de pH que afectan, como en las bacterias, la bomba de protones y la reserva de ATP. Todos estos procesos cambian la fluidez de las membranas, volviéndolas anormalmente permeables y la presión oxidativa y el fracaso bioenergético son los responsables de la salida de los radicales, del citocromo C, de los iones de calcio y de las proteínas. La permeabilización interna y externa de las membranas mitocondriales conduce a la muerte celular por apoptosis y necrosis; al parecer, las reacciones en cadena de la pared celular o la membrana celular externa invaden totalmente la célula, a través de las membranas de los diferentes organelos como mitocondrias y peroxisomas (Bakkali *et al.*, 2008).

También los efectos biológicos de los aceites esenciales pueden ser el resultado de una sinergia de todas las moléculas o sólo de las moléculas presentes en mayor proporción. Los principales componentes de los aceites esenciales pueden constituir hasta el 85% de la igualdad de oportunidades en cuanto a la actividad antimicrobiana, mientras que los

componentes presentes en trazas tienen un papel crítico que desempeñar en dicha actividad, posiblemente, produciendo un efecto sinérgico entre otros componentes. Por lo tanto, las funciones sinérgicas de las diversas moléculas contenidas en un aceite esencial, en comparación con la acción de uno o dos componentes principales del aceite, parece cuestionable. Sin embargo, es posible que la actividad de los principales componentes sea modulada por otras moléculas de menor importancia. La sinergia ha sido observada entre el carvacrol y su precursor *p*-cimeno y entre el cinnamaldehído y el eugenol. Por lo mismo, es probable que varios componentes de los aceites esenciales desempeñen un papel en la penetración de las células, atracción hidrofílica o lipofílica, fijación en las paredes celulares y membranas, y la distribución celular. Esta última característica es muy importante, porque la distribución del aceite en la célula determina los diferentes tipos de reacciones de los radicales libres producidos, en función de su repartición en la célula (Burt, 2004; Bakkali *et al.*, 2008).

Por otra parte, al evaluar la actividad antiaflatoxigénica de los extractos de *Melissa officinalis*, los resultados mostraron que los extractos etanólico y metanólico no afectaron las concentraciones iniciales de aflatoxinas totales (AFt), por lo que sus porcentajes de reducción de aflatoxinas fueron de 0%. En la tabla 4 se muestra la actividad antiaflatoxigénica de los extractos acuosos de *Melissa officinalis*, observándose en todos los casos una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) de todas las concentraciones iniciales de las aflatoxinas totales probadas. Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Bejarano y Centeno (2009), en los que el extracto de *Citrus limon* redujo la concentración de 45  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de AFt en un 73,60%, seguido de 69,30% y 67,50% para rangos de concentración entre 5-15  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 1,7-5,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de AFt, respectivamente.

El interés por las aflatoxinas se ha centrado en la aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), debido, principalmente, a su toxicidad aguda y crónica y a su actividad carcinogénica en animales y humanos. Además, pueden ser responsables del cáncer de hígado humano en ciertas partes del mundo. La AFB<sub>1</sub> es absorbida en el intestino delgado y transportada hasta el hígado por vía portal. La toxina entra en la célula y es metabolizada en el

retículo endoplasmático rugoso, donde sufre un proceso de hidroxilación y se transforma, principalmente, en aflatoxinas P<sub>1</sub>, M<sub>1</sub> y Q<sub>1</sub>. También se puede formar la

Tabla 4. Efecto de los extractos acuosos de *Melissa officinalis* sobre la concentración de aflatoxinas totales.

Extractos acuosos de <i>Melissa officinalis</i>	Concentración inicial de AFt (µg/kg)	Concentración final de AFt (µg/kg)	Promedio del % de reducción	t-Student	p valor
Origen etanólico	5	0,20			
	5	0,00	90,00	54,80*	0,0003
	5	0,30			
	15	1,18			
	15	2,48	85,28	24,17*	0,0017
	15	2,95			
	45	6,03			
	45	8,39	84,70	50,35*	0,0003
	45	6,22			
Origen metanólico	5	0,20			
	5	0,40	86,00	54,04*	0,0003
	5	0,10			
	15	0,70			
	15	1,89	91,59	39,76*	0,0006
	15	1,18			
	45	4,96			
	45	4,84	89,31	391,45**	0,0001
	45	4,61			

Las muestras fueron analizadas a través del método estadístico t-Student a un nivel de confiabilidad de 95% (p<0,05). Estableciéndose diferencias estadísticamente significativas (\*) y altamente significativas (\*\*).

aflatoxina B<sub>1</sub>-8,9- epóxido, la cual puede ser detoxificada por la acción de una transferasa inducible, para dar lugar a la formación de un conjugado con el glutatión en su forma tiólica (GSH); además, el epóxido se une covalentemente a diversas macromoléculas, como ácidos nucleicos y proteínas, dando lugar a disrupciones en la transcripción y en la traducción, respectivamente. El aducto de ADN formado, aflatoxina B<sub>1</sub>-guanina, es usado como biomarcador en orina. Por otra parte, el epóxido

unido a las proteínas es responsable de su efecto tóxico y origina la eliminación del aducto aflatoxina B<sub>1</sub>-lisina, empleado como biomarcador en suero (Gonçalez *et al.*, 2001; Soriano, 2007; Thanaboripat *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2008).

La AFB<sub>1</sub> causa daño en las células por dos vías diferentes. En primer lugar, la AFB<sub>1</sub> es activada por la AFB<sub>1</sub>-8,9-epóxido y las formas aducto, principalmente por la posición N7 de guanina, que es responsable de sus efectos mutagénicos y carcinogénicos. En segundo lugar, las aflatoxinas, en especial la AFB<sub>1</sub>, produce especies reactivas del oxígeno, tales como el radical anión superóxido, peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos lipídicos; aunque éstos no parecen interactuar con el ADN, pero son precursores del radical hidroxilo, y los radicales hidroxilos interactúan con el ADN y producen mutaciones. La síntesis de las aflatoxinas es controlada por enzimas específicas que se expresan por el ADN. La expresión génica, la transcripción, el transporte del ARN y transformación, traducción, procesamiento de la proteína y localización puede, teóricamente, ser inhibida por productos naturales de plantas (Alpsoy, 2010).

Se ha informado que la biosíntesis de las aflatoxinas, en especial la de la aflatoxina B<sub>1</sub>, puede ser inhibida por numerosos compuestos y extractos de ciertas plantas que son tóxicos para los hongos, y pueden ser útiles para controlar el crecimiento de hongos y la producción de micotoxinas. Estos inhibidores naturales de la síntesis de las aflatoxinas pueden actuar en tres niveles: en el primer nivel intervienen en el medio ambiente y los factores fisiológicos que afectan la biosíntesis de las aflatoxinas, en el segundo nivel inhiben los circuitos de señalización en la entrada de la ruta biosintética y en el tercer nivel ejercen su inhibición directamente en la expresión génica o la actividad enzimática en la ruta. Mientras que el modo de acción de la mayoría de los compuestos inhibidores es desconocido, hay pocas pruebas que afirman que dichos compuestos tienen un efecto en la transcripción de los genes o en la actividad enzimática en los distintos pasos de la ruta biosintética. Lo más probable es que los compuestos inhibidores conocidos alteran los moduladores ambientales y fisiológicos de la biosíntesis de las aflatoxinas o alteran

las vías de señalización en la entrada de la red reguladora (Gonçalez *et al.*, 2001; Alpsy, 2010).

Como se ha señalado, la utilización de extractos vegetales para controlar hongos micotoxigénicos ha sido ampliamente estudiada; no obstante, sus actividades antimicotoxigénicas todavía no se han determinado en su totalidad; por esta razón, la actividad antifúngica y antiaflatoxigénica que han demostrado los extractos de *Melissa officinalis* en la presente investigación es un aporte que puede ayudar al control de las micotoxinas en los alimentos (Magro *et al.*, 2006).

## CONCLUSIONES

Los extractos de *Melissa officinalis* obtenidos por ambos métodos de extracción demostraron poseer actividad antifúngica sobre *Aspergillus flavus*.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos acuosos de *Melissa officinalis* fue de 23,30 mg/ml para el extracto de origen etanólico y de 33,30 mg/ml para el extracto de origen metanólico, respectivamente.

Los extractos acuosos de *Melissa officinalis* redujeron significativamente las concentraciones iniciales de aflatoxinas.

El extracto acuoso de origen etanólico redujo las concentraciones iniciales en un rango de 84,70-90,00% y el extracto acuoso de origen metanólico las redujo en un rango de 89,31-91,59%.

## RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede recomendar:

Continuar la presente investigación con otros hongos considerados micotoxigénicos y con otras micotoxinas.

Ejecutar técnicas cromatográficas para obtener individualmente los componentes del aceite esencial de *Melissa officinalis*, para así evaluar la actividad antifúngica y antiaflatoxigénica de cada uno de los componentes y determinar si uno o todos los componentes son los responsables del efecto antifúngico y aflatoxigénico de *Melissa officinalis*.

Aplicar metodologías para adicionar los extractos de *Melissa officinalis* como aditivo en los alimentos para prevenir el desarrollo de hongos y la consecuente producción de micotoxinas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alpsoy, L. 2010. Inhibitory effect of essential oil on aflatoxin activities. *African Journal of Biotechnology*, 9(17): 2474-2481.
- Alzate, D.; Mier, G.; Afanador, L.; Durango, D. y 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.
- Arango, N.; Vanegas, N.; Vega, J.; García, C. y Rojano, B. 2007. Actividad antifúngica del isoespintanol sobre hongos del genero *Colletotricum*. *Scientia Et Technica*, XIII(33): 279-280.
- Bahtiyarca, R. y Cosge, B. 2006. The essential oil of lemon balm (*Melissa officinalis* L.), its components and using fields. [Journal of the Faculty of Agriculture](#), 21(1): 116-121.
- Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D. y Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils-a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446-475.
- Barrera-Necha, L. y García-Barrera, 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.
- Barrera-Necha, L.; Garduno-Pizana, C y García-Barrera, L. 2009. *In vitro* antifungal activity of essential oils and their compounds on mycelial growth of *Fusarium oxysporum* F. sp. *gladioli* (Massey) snyder and hansen. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8: 17-21.
- 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.
- Biagi, G. 2009. Dietary supplements for the reduction of mycotoxin intestinal absorption in pigs. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 25(5-6): 539-546.
- Bloom, E.; Bal, K.; Nyman, E.; Must, A. y Larsson, L. 2007. Mass spectrometry-based strategy for direct detection and quantification of some mycotoxins produced by *Stachybotrys* and *Aspergillus* spp. in indoor environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(13): 4211-4217.

Bluma, R.; Amaiden, M. y Etcheverry, M. 2008. Screening of Argentine plant extracts: Impact on growth parameters and aflatoxin B<sub>1</sub> accumulation by *Aspergillus* section *Flavi*. *International Journal of Food Microbiology*, 122: 114-125.

Boermans, H. y Leung M. 2007. Mycotoxins and the pet food industry: Toxicological evidence and risk assessment. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 95-102.

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

Cárdenas, N.; Pérez, S.; Zavala, M.; Aguirre, J. y Pérez, C. 2005. Actividad antifúngica de seis plantas sobre *Aspergillus flavus* Link. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 36(3): 21-26.

Cardona, M. (ed). 1997. *Botánica II. Ciencias de la Naturaleza*. Editorial Planeta. España.

Celis, C. 2007. Estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de *Lippia alba*, *Lippiaoriganoides* y *Phyla (Lippia) dulcis*, especies de la familia *Verbenaceae*. Trabajo de pregrado. Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

Centeno, S.; Calvo, M.; Adelantado, C. y Figueroa, S. 2010. Antifungal activity of extracts of *Rosmarinus officinalis* and *Thymus vulgaris* against *Aspergillus flavus* and *A. ochraceus*. *Pakistan Journal of Biological Sciencis*, 13(9): 452-455.

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

Cristani, M.; Arrigo, M.; Mandalari, G.; Castelli, F.; Sarpietro, M. y Micieli, D. 2007. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. [Journal of Agricultural and Food Chemistry](#), 55: 6300-6308.

Cutuli, M.; Cuellar, A.; Camara, J.; Mateos, A. y Suarez, G. 1991. Different media and methodologies for the detection of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* strains isolated from trout feed. *Mycopathologia*, 113: 121-125.

Daferera, D.; Ziogas, B. y Polissiou, M. 2000. GC-MS analysis of essential oils from some greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48: 2576-2581.

Dalcerro, A.; Magnoli, C.; Luna, M.; Ancasi, G.; Reynoso, M.; Chiacchiera, S.; Miazzo, R. y Palacio, G. 1998. Mycoflora and naturally occurring mycotoxins in poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia*, 141: 37-43.

- D`Mello, J. y Macdonald, A. 1997. Mycotoxins. *Animal Feed Science Technology*, 69: 155-166.
- De Martino, L.; De Feo, V. y Nazzaro, F. 2009. Chemical composition and *in vitro* antimicrobial and mutagenic activities of seven lamiaceae essential oils. *Molecules*, 14: 4213-4230.
- De Souza, E.; De Olivera, E.; De Luna, K. y Paiva, C. 2005. Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of various moulds isolated from foods. *Brazilian Archives of Biology and Technology an International Journal*, 48(2): 245-250.
- Del Río, J.; Moreno, C.; Pinton, P., Mendoza, S. y Oswald, I. 2007. Evaluación de la citotoxicidad de la aflatoxina y la fumonisina en células intestinales de porcino. *Revista Iberoamericana de Micología*, 24: 136-141.
- Doughari, J. y Obidah, J. 2008. *In vitro* antifungal activity of stem bark extracts of *Leptadenia lancifolia*. *International Journal of Integrative Biology*, 3(2): 111-117.
- FAO (Organización para la Alimentación y la Agricultura). 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.
- FAO (Organización para la Alimentación y la Agricultura). 2004. Manual sobre la aplicación del sistema de análisis de peligros y de puntos críticos de control (APPCC) en la prevención y control de las micotoxinas. *Estudio FAO Alimentación y Nutrición*, N° 73. Roma. Italia.
- Gonçalez, E.; Felicio, J. y Pinto, M. 2001. Biflavonoids inhibit the production of aflatoxin by *Aspergillus flavus*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34: 1453-1456.
- Gonçalez, E.; Felicio, J.; Pinto, M.; Rossi, M.; Medina, C.; Fernandes, M. y Simoni, I. 2003. Inhibition of Aflatoxin production by *Polymnia sonchifolia* and its *in vitro* cytotoxicity. *Arquivos do Instituto Biologico*, 70(2): 139-143.
- Hadizadeh, I.; Peivastegan, B y Kolahi, M. 2009. Antifungal activity of nettle (*Urtica dioica* L.), colocynth (*Citrullus colocynthis* L. schrad), oleander (*Nerium oleander* L.) and konar (*Ziziphus spina-christi* L.) extracts on plants pathogenic fungi. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12: 58-63.
- Hedayati, M.; Pasqualotto, A.; Warn, P.; Bowyer, P y Denning, D. 2007. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology*, 153: 1677-1692.

- Heidler, D. y Schatzmayr, G. 2003. A new approach to managing mycotoxins. *World Poultry*, 19(2): 12-15.
- Horn, B.; Greene, R., Sorensen, R.; Blankenship, P. y Dorner, J. 2000. Conidial movement of nontoxigenic *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in peanut fields following application to soil. *Mycopathologia*, 151: 81-92.
- Huwig, A.; Freimund, S.; Käppeli, O. y Dutler, H. 2001. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicology Letters*, 122: 179–188.
- Izco, J.; Barreno, E.; Brugués, M.; Costa, M.; Devesa, J.; Fernández, F.; Gallardo, T.; Limona, X.; Salvo, E.; Talavera, S. y Valdés, B. 1997. *Botánica*. Editorial Mc-Graw-Hill Interamericana. España.
- Kralj, I y Prosen, H. 2009. An overview of conventional and emerging analytical methods for the determination of mycotoxins. *International Journal of Molecular Sciences*, 10: 62-115.
- Lazo, R. y Sierra, G. 2008. Investigación del efecto de las micotoxinas en el ser humano. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25: 7-11.
- Lucini, E.; Zunino, M.; López, M. y Zygadlo, J. 2006. Effect of monoterpenes on lipid composition and sclerotial development of *Sclerotium cepivorum* Berk. [Journal of Phytopathology](#), 154: 441-446.
- Magnoli, C.; Dalcerro, A.; Chiacchiera, S.; Miazzo, R. y Saenz, M. 1998. Enumeration and identification of *Aspergillus* group and *Penicillium* species in poultry feeds from Argentina. *Mycopathologia*, 142: 27-32.
- Magro, A.; Carolino, M.; Bastos, M. y Mexia, A. 2006. Efficacy of plant extracts against stored products fungi. *Revista Iberoamericana de Micología*, 23: 176-178.
- Marai, I. y Asker, A. 2008. Aflatoxins in rabbit production: Hazards and control. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 8(1): 1-28.
- Maraqa, A.; Al-Sharo'a, N.; Farah, H.; Elbjeirami, W.; Shakya, A. y Sallal, A. 2007. Effect of *Nigella sativa* extract and oil on aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. [Turkish Journal of Biology](#), 31: 155- 159.
- Márquez, R.; De la Rosa, C. y Mercado, A. 2007. Actividad antifúngica del extracto total en etanol de las hojas frescas de *Pedilanthus tithymaloides* L Point (ultimorrial). *Scientia Et Technica*, XIII(33): 155-159.
- Martins, H.; Almeida, I.; Marques, M. y Bernardo, F. 2008. Interaction of wild strains of *Aspergilla* with *Aspergillus parasiticus* ATCC15517 and aflatoxin production. *International Journal of Molecular Sciences*, 9: 394-400.

Martins, H.; Mendes, M. y D'Almeida, F. 2007. Occurrence of aflatoxin B<sub>1</sub> in dairy cow's feed over 10 years in Portugal (1995-2004). *Revista Iberoamericana de Micología*, 24: 69-71.

Oliveira, O.; Gonçalves, N.; Rosim, R. y Fernandes, A. 2009. Determination of aflatoxins in peanut products in the northeast region of São Paulo, Brazil. *International Journal of Molecular Sciences*, 10: 174-183.

Omidbeygi, M., Barzegar, M.; Hamidi, Z. y Nafhdibadi, H. 2007. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control*, 18: 1518-1523.

Peraica, M.; Domijan, A.; Jurjevic, Z. y Cyjetkovic, B. 2002. Prevention of exposure to mycotoxins from food and feed. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 53: 229-237.

Pirzada, A.; Shaikh, W.; Ghani, K. y Laghari, K. 2009. Study of anti fungal activity and some basic elements of medicinal plant *Cressa Cretica* Linn against fungi causing skin diseases. [Sindh University Research Journal \(Science Series\)](#), 41(2): 15-20.

Placinta, C.; D'Mello, J. y Macdonald, A. 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, 78: 21-37.

Prabuseenivasan, S.; Jayakumar, M. y Ignacimuthu, S. 2006. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6:39-40.

Ram Kumar, P.; Pranay, J. y Chetan, S. 2010. Antimicrobial activity of ethanolic extracts of *Syzygium aromaticum* and *Allium sativum* against food associated bacteria and fungi. *Ethnobotanical Leaflets*, 14: 344-360.

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 Bagher, 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.

Rhouma, A.; Ben Daoud, H.; Ghanmi, S.; Ben Salah, H.; Romdhane, M y Demak, M. 2009. Antimicrobial activities of leaf extracts of *Pistacia* and *Schinus* species against some plant pathogenic fungi and bacteria. *Journal of Plant Pathology*, 91(2): 339-345

- Samson, R.; Hoekstra, S.; Frisvad, J. y Filtenborg, O. 1995. *Introduction to food-borne fungi*. Central Boreau Voor Schimmel Cultures. Holanda.
- Sanchis, V.; Marín, S. y Ramos, A. 2000. Control de micotoxinas emergentes. Situación legislativa actual. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17: S69-S75.
- Sharma, N. y Tripathi, A. 2006. Fungitoxicity of the essential oil of *Citrus sinensis* on post-harvest pathogen. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22: 587-593.
- Sibanda, L.; Marovatsanga, L. y Pestka, J. 1997. Review of mycotoxin work in sub-Saharan Africa. *Food Control*, 8(1): 21-29.
- Sikkema, J.; de Bont, J. y Poolman, B. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. [Microbiology and Molecular Biology Reviews](#), 59: 201-222.
- Sitte P, Weiler E, Kadeiret J, Brensinsky A, Köner C. 2004. *Tratado de Botánica*. 35<sup>va</sup> edición. Editorial Ediciones Omega. España.
- Soriano, J. 2007. *Micotoxinas en Alimentos*. Editorial Días de Santos, S.A. Madrid, España.
- Sudhakar, P.; Latha, P.; Sreenivasulu, Y.; Bhaskar, B.; Hemalatha, T.; Balakrishna, M. y Raja, K. 2009. Inhibition of *Aspergillus flavus* colonization and aflatoxin (AflB1) in peanut by methyleugenol. *Indian Journal of Experimental Biology*, 47: 63-67.
- Tequida-Meneses, M.; Cortez-Rocha, M.; Rosas-Burgos, E.; López-Sandoval, S. y Corrales-Maldonado, C. 2002. Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 19: 84-88.
- Thanaboripat, D.; Suvathi, Y.; Srilohasin, P.; Sripakdee, S.; Patthanawanitchai, O. y Charoensettasilp, S. 2007. Inhibitory effect of essential oils on the growth of *Aspergillus flavus*. *KMITL Science Technology Journal*, 7(1): 1-7.
- Trucksess, M.; Weaver, C.; Oles, C.; D'Ovidio, K. y Rader, J. 2006. Determination of aflatoxins and ochratoxin A in ginseng and other botanical roots by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of AOAC International*, 89(3): 624-630.
- Vaillant, D.; Romeu, C.; Ramos, E.; González, M.; Ramírez, R. y González, J. 2009. Efecto inhibitorio *in vitro* de cinco monoterpenos de aceites esenciales sobre un aislado de *Rhizoctonia solani* en papa (*Solanum tuberosum* L.) *Fitosanidad*, 3(3): 197- 200.
- Wayne, D. 2002. *Bioestadística*. Cuarta edición. Editorial Limusa, S.A. México D.F., México.

Yu, J.; Cleveland, T.; William C.; Nierman, W. y Bennett, J. 2005. *Aspergillus flavus* genomics: Gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. *Revista iberoamericana de Micología*, 22: 194-202.

## HOJA DE METADATOS

### Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/5

<b>Título</b>	ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA Y ANTIAFLATOXIGÉNICA DE EXTRACTOS DE TORONJIL ( <i>Melissa officinalis</i> ) SOBRE <i>Aspergillus flavus</i>
<b>Subtítulo</b>	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
<b>Carera J. Yohanna C.</b>	<b>CVLAC</b>	<b>17313703</b>
	<b>e-mail</b>	<b>yohannacarrerajasp@hotmail.com</b>
	<b>e-mail</b>	
	<b>CVLAC</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>CVLAC</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>CVLAC</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>e-mail</b>	

Palabras o frases claves:

Plantas silvestres
Hongos micotoxigénicos
Efecto inhibitorio

# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/5

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

Resumen (abstract):

Las aflatoxinas son un grupo de metabolitos tóxicos producidos principalmente por *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* y son halladas frecuentemente en cereales. La aflatoxina B<sub>1</sub> es el miembro más tóxico y carcinogénico del grupo de las aflatoxinas. Debido a que el uso de fungicidas en los cultivos agrícolas ha provocado el desarrollo de resistencia fúngica, contaminación ambiental y riesgos de salud pública, se ha estudiado la actividad antifúngica de los extractos de plantas silvestres, para la búsqueda nuevas alternativas en el control de hongos y sus micotoxinas. Es por ello, que el objetivo de la presente investigación fue evaluar la actividad antifúngica y antiaflatoxigénica de extractos de toronjil (*Melissa officinalis*) sobre *Aspergillus flavus*. Se obtuvieron extractos de *Melissa officinalis* utilizando etanol al 80,00% y metanol al 70,00%. Se determinó la actividad antifúngica de los extractos obtenidos a través de dos metodologías; con una se obtuvieron los extractos etanólico y metanólico, y con la otra se obtuvieron extractos acuosos. Adicionalmente, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos acuosos sobre *Aspergillus flavus* y finalmente se determinó la actividad antiaflatoxigénica a través del método de enzima inmunoensayo competitivo (ELISA). Los resultados obtenidos de la actividad antifúngica mostraron que los extractos etanólico y metanólico produjeron un porcentaje de inhibición en promedio de 23,62% y 50,00%, respectivamente, sobre el hongo ensayado, mientras que el extracto acuoso de origen etanólico y el acuoso de origen metanólico evidenciaron en promedio halos de inhibición de 22 mm y 23 mm, respectivamente. Así mismo, presentaron unas CMI de 23,30 mg/ml y 33,30 mg/ml, respectivamente. En cuanto a la actividad antiaflatoxigénica, el extracto acuoso de origen etanólico redujo las concentraciones de aflatoxinas de 5, 15 y 45 µg/kg en un 90,00%, 85,28% y 84,70%, respectivamente; en cambio, el extracto acuoso de origen metanólico redujo las concentraciones de aflatoxinas en un 86,00%, 91,59% y 89,31, respectivamente. En conclusión, los extractos de *Melissa officinalis* mostraron actividad antifúngica y antiaflatoxigénica sobre *Aspergillus flavus*, inhibiendo en gran parte su crecimiento y reduciendo significativamente las concentraciones de aflatoxinas.

# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
<b>Centeno Sara</b>	<b>ROL</b>	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	<b>CVLAC</b>	<b>5702407</b>
	<b>e-mail</b>	<b>sara.centeno@gmail.com</b>
	<b>e-mail</b>	
<b>Herrera Hernando</b>	<b>ROL</b>	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	<b>CVLAC</b>	<b>5872352</b>
	<b>e-mail</b>	<b>hherreramata@yahoo.es</b>
	<b>e-mail</b>	
<b>Díaz Josefa</b>	<b>ROL</b>	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	<b>CVLAC</b>	<b>5007425</b>
	<b>e-mail</b>	<b>diazvv@gmail.com</b>
	<b>e-mail</b>	
	<b>ROL</b>	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	<b>CVLAC</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>e-mail</b>	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2011	03	16

Lenguaje: spa

# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

Archivo(s):

<b>Nombre de archivo</b>	<b>Tipo MIME</b>
<b>Tesis-Carreray.doc</b>	<b>Application/Word</b>

Alcance:

Espacial: Nacional (Opcional)

Temporal: Temporal (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo: Licenciada en Bioanálisis

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciada

Área de Estudio: Bioanálisis

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

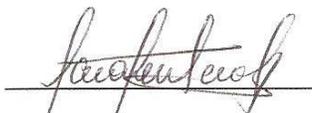
Universidad de Oriente

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

**Derechos:**

Yo, Yohanna Carrera, como autora intelectual de esta tesis, autorizo a la Universidad de Oriente para que publique en su totalidad con fines educativos el presente trabajo.

  
Yohanna Carrera  
AUTOR 1

  
Sara Centeno  
ASESOR

  
Hernando Herrera  
JURADO 1

  
Josefa Díaz  
JURADO 2

**POR LA COMISIÓN DE TESIS:**