



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

COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS ACEITES
ESENCIALES DE *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) CONTRA *Aspergillus flavus*.

(Modalidad: Tesis de Grado)

MARINÉS DEL VALLE LEMUS LUGO

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

CUMANÁ, 2013



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

COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS ACEITES
ESENCIALES DE *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) CONTRA *Aspergillus flavus*.

(Modalidad: Tesis de Grado)

MARINÉS DEL VALLE LEMUS LUGO

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

CUMANÁ, 2013

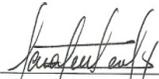
COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS ACEITES
ESENCIALES DE *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) CONTRA *Aspergillus flavus*.

APROBADO POR:



Dr. Oscar Crescente

Asesor



Dra. Sara Centeno

Coasesora



Dra. Haydelba D'Armas

Jurado principal



MSc. Evis Parra

Jurado principal

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTO	II
LISTA DE TABLAS	III
LISTA DE FIGURAS.....	IV
RESUMEN	V
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA.....	18
RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA.....	18
OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL	18
Extracción por arrastre de vapor (AV)	18
Hidrodestilación (HD)	19
PRUEBA BIOLÓGICA.....	20
Actividad antifúngica.....	20
CARACTERIZACIÓN QUÍMICA	20
Cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM)	21
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
RENDIMIENTO DE EXTRACTRACCIÓN	23
CARACTERIZACIÓN QUÍMICA	25
ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA	43
CONCLUSIONES	51
RECOMENDACIONES.....	53
BIBLIOGRAFÍA	54
HOJAS DE METADATOS.....	62

DEDICATORIA

A mis padres;

*María Del Valle Lugo Licett
Oscar José Lemus*

A mis hermanas;

*Marianella Lemus Lugo
Mariela Lemus Lugo
Domaris Flores Lugo*

A mis tias;

*Nancy del Carmen Lugo Licett
Daisy Josefina Lugo Licett*

A mis sobrinos;

*Miguel Eduardo Romandini Lemus
Alexis Gabriel Romandini Lemus
Eunices de los Ángeles Revollo Flores
Simón Darío Revollo Flores*

A mis primos;

*Guillermo Andrés Rangel Lugo
María Gabriela Velásquez Lugo
Luis Enrique Velásquez Lugo*

Para mi familia, con amor

AGRADECIMIENTO

A los Profesores; Luisa Rojas, Sara Centeno, Hernando Herrera, Oscar Crescente, Haydelba D'Armas y Shailili Moreno. Gracias por orientarme, motivarme y permitirme culminar este ciclo.

A la Licenciada Luz Salazar, del Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas del Departamento de Bioanálisis y al Licenciado José G. Lanza, de la Universidad Simón Bolívar, por el apoyo técnico brindado.

A los Técnicos; Moraima Carrillo y Liliana Andrades y al Licenciado Carlos Mendoza, por sus colaboraciones brindadas durante el desarrollo de este proyecto.

A mis compañeros del Laboratorio de Productos Naturales, EC-412. Especialmente a Juan C. Fuentes, Mónica y Marlyn Rosales y a Oralís Martínez, por su ayuda, consejos y compañía.

Finalmente, quiero agradecerle a Daidha Chávez; por facilitarme la búsqueda del material bibliográfico, depositar confianza en mi persona, y enseñarme que la distancia no es una limitante a la hora de crear lazos de hermandad entre las personas.

A TODOS, MIL GRACIAS

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Principales metabolitos tóxicos producidos por hongos que se encuentran comúnmente como contaminantes de los alimentos.....	2
Tabla 2. Características y propiedades físicas de la aflatoxina B ₁	5
Tabla 3. Rendimientos calculados (% m/m) para los aceites esenciales de <i>R. officinalis</i> extraídos por destilación	23
Tabla 4. Tiempo de retención (Tr; min.) y cantidad relativa (%V/V), de los componentes del aceite esencial de <i>R. officinalis</i> aislados por hidrodestilación e identificados por CG/EM.....	26
Tabla 5. Tiempo de retención (Tr; min.) y cantidad relativa (%V/V), de los componentes del aceite esencial de <i>R. officinalis</i> aislados mediante arrastre por vapor e identificados por CG/EM.	28
Tabla 6. Actividad antifúngica del aceite esencial (10 µl/disc) de <i>R. officinalis</i> contra <i>A. flavus</i>	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aflatoxinas frecuentemente encontradas en los alimentos.....	4
Figura 2. Características microscópicas de <i>A. flavus</i>	6
Figura 3. Características macroscópicas de <i>A. flavus</i> en agar.	6
Figura 4. Hospedaje del <i>A. flavus</i> en el maíz.....	7
Figura 5. <i>R. officinalis</i>	15
Figura 6. Componentes principales del aceite esencial de <i>R. officinalis</i>	16
Figura 7. Arrastre por vapor.	18
Figura 8. Hidrodestilación.	19
Figura 10. Perfil cromatográfico del aceite esencial de <i>R. officinalis</i> obtenido por hidrodestilación.....	25
Figura 11. Perfil cromatográfico del aceite esencial de <i>R. officinalis</i> obtenido con arrastre por vapor.	27
Figura 12. Compuestos identificados en el aceite esencial de <i>R. officinalis</i> extraído por hidrodestilación y ordenados de manera creciente según sus Tr (min.).	28
Figura 13. Compuestos identificados en el aceite esencial de <i>R. officinalis</i> obtenido mediante arrastre por vapor y ordenados de manera creciente según sus Tr (min.).	29
Figura 14. Distribución por grupos de los principales componentes de los aceites esenciales de <i>R. officinalis</i> según sus cantidades relativas (%V/V) y método de obtención.....	30
Figura 15. Espectro de masas del 1,8-cineol.	33
Figura 16. Posibles rutas de fragmentación del 1,8-cineol.....	34
Figura 17. Espectro de masas del α -pineno.	35
Figura 18. Posibles rutas de fragmentación del α -pineno.....	36
Figura 19. Espectro de masas del D-alcanfor.	37
Figura 20. Posibles rutas de fragmentación del D-alcanfor.....	38
Figura 21. Espectro de masas del L-borneol.....	39
Figura 22. Posibles rutas de fragmentación del L-borneol.....	40
Figura 23. Espectro de masas del L-verbenona.	41
Figura 24. Posibles rutas de fragmentación del L-verbenona.....	42
Figura 25. Inhibición del crecimiento fúngico de <i>A. flavus</i> provocado por los aceites esenciales de <i>R. officinalis</i>	44

RESUMEN

Se evaluaron y compararon de acuerdo al rendimiento, composición química y actividad biológica, a los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* obtenidos mediante hidrodestilación (HD) y arrastre por vapor (AV). El aceite esencial de *R. officinalis*, obtenido por HD, presentó un olor intenso y penetrante, y un color ligeramente amarillo. Su rendimiento fue de 0,2% m/m. Mientras que, el aceite esencial obtenido mediante AV, presentó un olor menos intenso y un color un tono más oscuro. Su rendimiento fue de 0,1% m/m. La caracterización de los aceites esenciales por CG/EM mostró que los metabolitos secundarios volátiles constituyentes del aceite esencial obtenido por HD fueron ocho, pertenecientes a los grupos: monoterpenos oxigenados (86,39%) y monoterpenos carbonados (13,61%), siendo sus componentes mayoritarios: el 1,8-cineol (49,95%), la L-verbenona (15,59%) y el α -Pino (11,66%). Por otra parte, los metabolitos secundarios volátiles que constituyen al aceite esencial obtenido por AV fueron trece, pertenecientes a los grupos: monoterpenos oxigenados (76,52%), sesquiterpenos oxigenados (2,21%), sesquiterpenos carbonados (3,05%) y ésteres (6,81%), siendo sus componentes mayoritarios: la L-verbenona (32,61%), el D-alcanfor (20,87%) y el L-borneol (9,36%). La actividad antifúngica a 10 μ l/disc de los aceites esenciales fue evaluada frente a cepas de *Aspergillus flavus*, obteniéndose halos inhibitorios de 24,33 y 13,00 mm de diámetro para el aceite esencial obtenido por HD y AV respectivamente. El aceite esencial de *R. officinalis* extraído por HD, presenta una actividad contra *A. flavus* 53,43% superior a la actividad fúngica exhibida por el aceite esencial extraídos mediante AV. Se considera que el aceite esencial de *R. officinalis* podría representar un método alternativo para el control de micotoxinas en alimentos.

Palabras Claves: aceites esenciales, *Rosmarinus officinalis*, *Aspergillus flavus*.

INTRODUCCIÓN

La mayoría de los hongos filamentosos, son contaminantes habituales de las materias primas destinadas a la fabricación de alimentos y piensos. Dentro de los productos agrícolas, los más susceptibles a la contaminación por hongos son los cereales: arroz, trigo, cebada y maíz. El grado de contaminación de estos cereales depende: de las condiciones climáticas a nivel de campo y de las condiciones de almacenamiento y procesamiento postcosecha; estas condiciones están caracterizadas por temperaturas superiores a 20°C en las bodegas de almacenajes y la presencia de humedad en el sustrato por encima del 14%. La acción dañina de los insectos y la presencia de otros microorganismos, también favorecen la colonización del sustrato por hongos [1-4].

Cuando los alimentos, piensos para animales o las materias primas para su fabricación son colonizados por hongos filamentosos, existe el riesgo de contaminación por micotoxinas. Las micotoxinas, son metabolitos secundarios tóxicos de bajo peso molecular, sintetizados por algunas especies fúngicas en determinadas condiciones. La especie fúngica las produce como un mecanismo para aumentar su adaptación al medio o para competir con otros microorganismos por el sustrato. Las micotoxinas son compuestos policetónicos resultantes de la reacción de condensación que tienen lugar cuando en determinadas condiciones físicas, químicas y biológicas se interrumpe la reducción de los grupos cetónicos en la biosíntesis de ácidos grasos realizada por los mohos. Estos ácidos grasos son metabolitos primarios utilizados por los mohos como fuente de energía. Las micotoxinas se suelen formar al final de la fase exponencial o al principio de la fase estacionaria del crecimiento del moho. Suelen ser genotípicamente específicas para un grupo de especies de un mismo género [5, 6].

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la inocuidad de los alimentos es una cuestión fundamental de salud pública para todos los países y uno de los asuntos de mayor prioridad para los consumidores, productores y gobiernos. La gestión de la inocuidad de los alimentos engloba diferentes actividades, que van desde la producción de la materia primaria hasta la comercialización y consumo del producto final. La

inocuidad de los alimentos está asociada a riesgos crónicos o agudos debido a la presencia en ellos de patógenos microbianos, contaminantes químicos y físicos que puedan afectar la salud de los consumidores, de allí que la obtención y garantía de la inocuidad es y debe ser un objetivo no negociable, necesario para la globalización del comercio de alimentos. La integración de los sectores alimentarios han generado cambios en la producción y distribución de alimentos. Los productos destinados al consumo humano y animal llegan ahora hasta lugares más distantes, favoreciendo el aumento de la difusión de brotes de Enfermedades Transmitidas por los Alimentos (ETA), donde la contaminación microbiana, producida por micotoxinas, representa una de las principales causas de incidencias de ETA en Latinoamérica [7, 8].

Si bien, se han determinado unas 350 especies de hongos capaces de producir micotoxinas, la mayoría de las micotoxinas de importancia agrícola son producidas por tres géneros de hongos: *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* (Tab. 1). Hasta el momento, se han descrito alrededor de 200 micotoxinas, de las cuales sólo unas pocas reciben atención especial por su mayor amenaza para la salud humana y animal. Las micotoxinas con un especial interés biológico y económico son las aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, zearelenona y fumonisinas. La toxicidad de estos metabolitos secundarios en los animales puede ser aguda, tras una elevada ingestión de la toxina o crónica, en exposiciones prolongadas a bajos niveles [1, 2, 5, 6].

Tabla 1. Principales metabolitos tóxicos producidos por hongos que se encuentran comúnmente como contaminantes de los alimentos.

Hongos	Principales metabolitos tóxicos	Estructura química
<i>Aspergillus flavus</i>		
<i>A. parasiticus</i>	Aflatoxinas B ₁	Anillo cumárico
<i>Fusarium tricinctum</i>		
<i>F. roseum</i>	T-2 toxina	Sesquiterpeno
<i>A. ochraceus</i>		
<i>Penicillium viridicatum</i>	Ocratoxina A	Anillo lactónico
<i>P. vyclopium</i>		

Las aflatoxinas han sido responsables de varios episodios de intoxicación masiva tanto en humanos como en animales. El primer caso reportado fue en el año 1960, en

Escocia, por muerte repentina de cien mil pavos alimentados con maní infectado con aflatoxinas. En Venezuela, se han reportados diversos casos a nivel nacional que involucran la presencia de aflatoxinas y hongos micotoxigénicos que afectan cultivos de maíz, maní, algodón, ajonjolí, girasol, cacao, sorgo y soya en las diferentes regiones del país. La posible existencia de mohos aflatoxigénicos en Venezuela tal vez se deba a nuestro clima y a las condiciones de almacenamiento industrial poco controladas por los órganos competentes del Estado. En el año 2005, se reportó un caso relevante de micotoxicosis en alimentos de la división PURINA®, de NESTLÉ VENEZUELA, S.A., para los productos DOG CHOW® y CAT CHOW®, que ocasionaron la muerte de cientos de mascotas [9-13].

Este tipo de micotoxinas son sustancias con propiedades carcinogénicas y hepatotóxicas. Son compuestos altamente ionizables y por ello muy reactivos, pudiendo modificar el ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN) y proteínas celulares, características que le otorgan un potencial mutagénico elevado. Además, pueden bloquear la acción de ciertas enzimas que ayudan a la síntesis de ácidos nucleicos causando, en el hígado, necrosis centrolobulillar e infiltración de polimorfonucleares. Otras características importantes son su capacidad de bioconcentración, bioacumulación y su gran estabilidad estructural. Son moléculas muy termorresistentes y no se destruyen con los tratamientos clásicos de esterilización de alimentos [14].

Se han identificado 18 tipos de aflatoxinas, de las cuales las más frecuentes en los alimentos son la B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ y M₂ (Fig. 1). Las vacas que se alimentan con pienso contaminado por aflatoxinas B son capaces de metabolizar las aflatoxinas, hidroxilándolas en una posición determinada. Así, a partir de la aflatoxina B₁ se forma la aflatoxina M₁, y a partir de la aflatoxina B₂ se forma la aflatoxina M₂. Estas formas hidroxiladas pueden pasar a la leche (de hecho, se cataloga como aflatoxina M por *Milk*, leche en inglés), por lo que es necesario controlar la presencia de aflatoxinas en el pienso de los animales, no solamente por la salud del mismo, sino también, por la salud de los consumidores de productos lácteos [14, 15].

Las aflatoxinas, son un grupo de derivados difuranocumarínicos relacionados estructuralmente. La aflatoxina B₁ y B₂ difieren entre ellas por la presencia de un doble enlace más en la primera. Por su parte, la aflatoxina G₁ y G₂ difieren entre sí en el mismo detalle estructural. Las aflatoxinas B difieren de las aflatoxinas G porque el anillo de furano de las primeras se convierte en un anillo de lactona en las segundas [15].

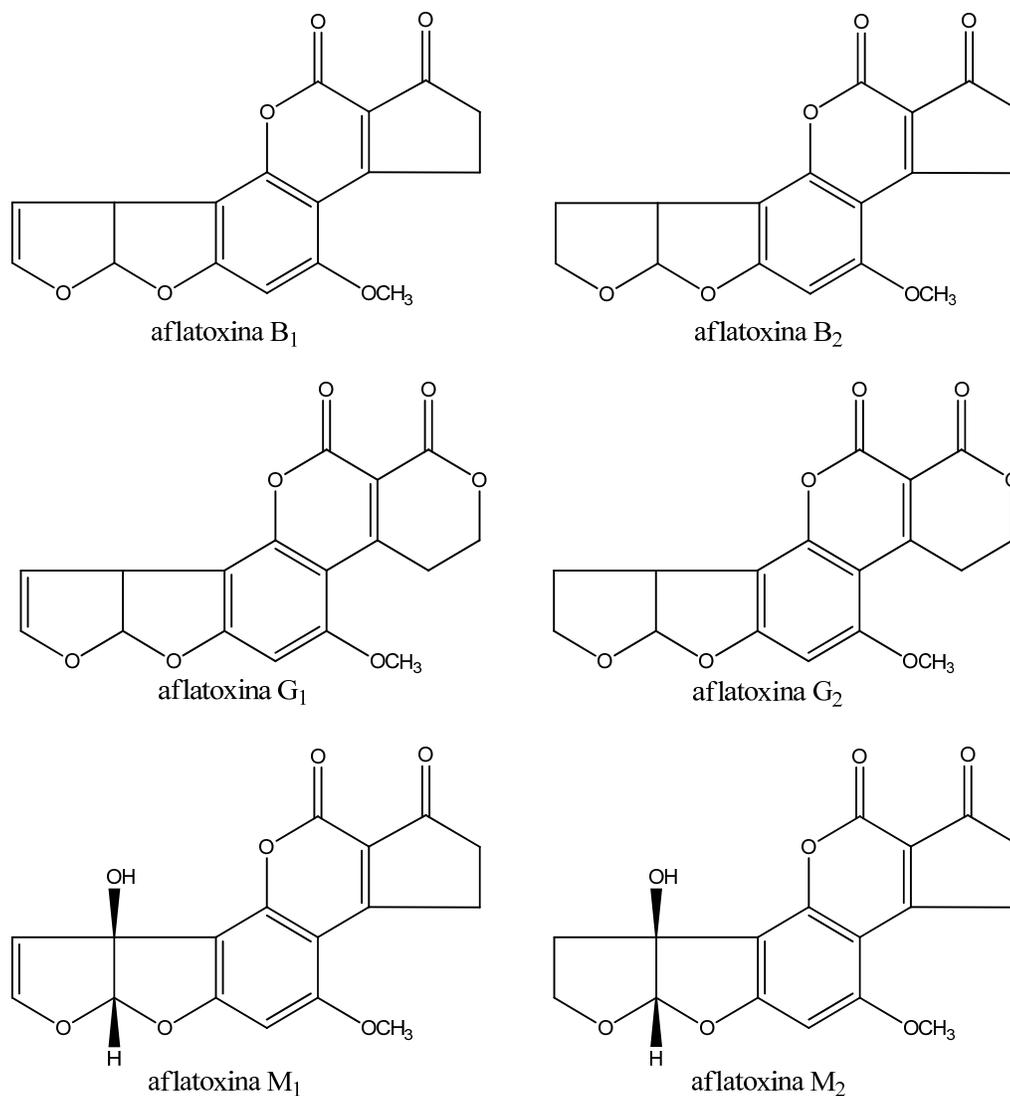


Figura 1. Aflatoxinas frecuentemente encontradas en los alimentos.

Estas aflatoxinas se clasifican según los colores fluorescentes que producen bajo luz ultravioleta, cuando son separadas por técnicas de cromatografía en capa fina. Así,

las aflatoxinas denominadas “B” emiten fluorescencia azul (*Blue*, en inglés) y las “G”, fluorescencia verde (*Green*). Los subíndices indican la movilidad cromatográfica relativa [14].

La especie más tóxica es la aflatoxina B₁ y en orden decreciente le siguen las aflatoxinas M₁>G₁>B₂>G₂. La especie *A. flavus*, es el principal productor de la aflatoxina B₁, produciéndose en menor grado en la especie *A. parasiticus*. El *A. flavus* es un hongo filamentoso, ubicuo, que es aislado de diferentes sustratos, especialmente en climas cálidos. Es responsable del deterioro de muchos alimentos y piensos, y se encuentra frecuentemente en cereales. Su toxicidad va a depender de la dosis, del tiempo de exposición, la edad del animal o persona expuesta, de los posibles efectos sinérgicos de otros agentes químicos presentes, entre otros. En la Tabla 2, se presentan algunas características y propiedades físicas de la aflatoxina B₁, como el estado físico, punto de fusión, fluorescencia, entre otros [14, 15].

Tabla 2. Características y propiedades físicas de la aflatoxina B₁.

Aflatoxina B ₁	Estado físico	Sólido; cristales
	Punto de fusión (°C)	268-269
	Fluorescencia	Azul
	UV máx. En etanol (nm)	362
	Masa molar (g/mol)	312,0633
	Fórmula molecular	C ₁₇ H ₁₂ O ₆
	*DL ₅₀	18,2 mg/50g

* DL₅₀ (Dosis Letal, 50%), en toxicología, es el indicador general de la toxicidad aguda de una sustancia. Se expresa en mg de sustancia tóxica por kg de peso del animal de prueba.

En las Figuras 2 y 3, se representan las características microscópicas y macroscópicas del *A. flavus*, respectivamente [1].

Las condiciones óptimas para el crecimiento del *A. flavus* se da bajo actividades de agua (a_w) entre 0,86 y 0,96 y temperaturas entre 12 a 48°C, siendo 37°C la más propicia. La capacidad de *A. flavus* para sobrevivir en condiciones muy duras le permite fácilmente competir con otros organismos para la obtención de sustratos, tanto en suelos como en plantas. El *A. flavus* actúa como organismo saprófito en el suelo donde juega un papel importante como reciclador de nutrientes; usando restos de plantas y animales. Las

condiciones climáticas influyen notablemente en la prevalencia del hongo en el aire. El *A. flavus* es frecuentemente encontrado en países tropicales. En países de climas templados, durante el invierno, se transporta ya sea como micelio o como estructuras más resistentes llamadas esclerocios (Fig. 4) [16].

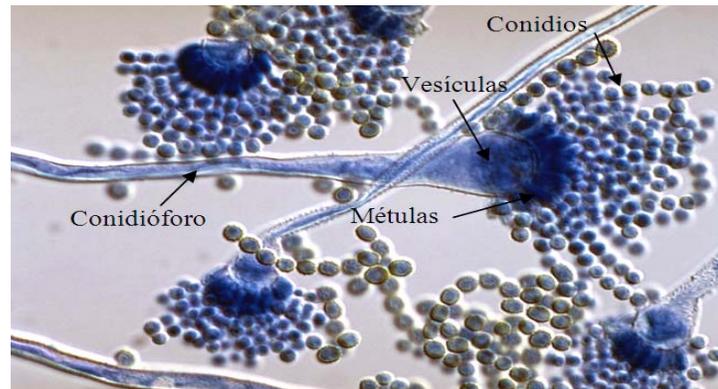


Figura 2. Características microscópicas de *A. flavus*.

La presencia del hongo no implica, necesariamente, la producción de micotoxina porque, más allá de la capacidad genética del hongo, es necesario que se cumplan ciertas condiciones. También puede ocurrir que se detecte la micotoxina sin la presencia del hongo, ya que las formas vegetativas y germinativas pueden ser inactivadas o destruidas por tratamientos, permaneciendo inalteradas las toxinas en el sustrato [1].



Figura 3. Características macroscópicas de *A. flavus* en agar.

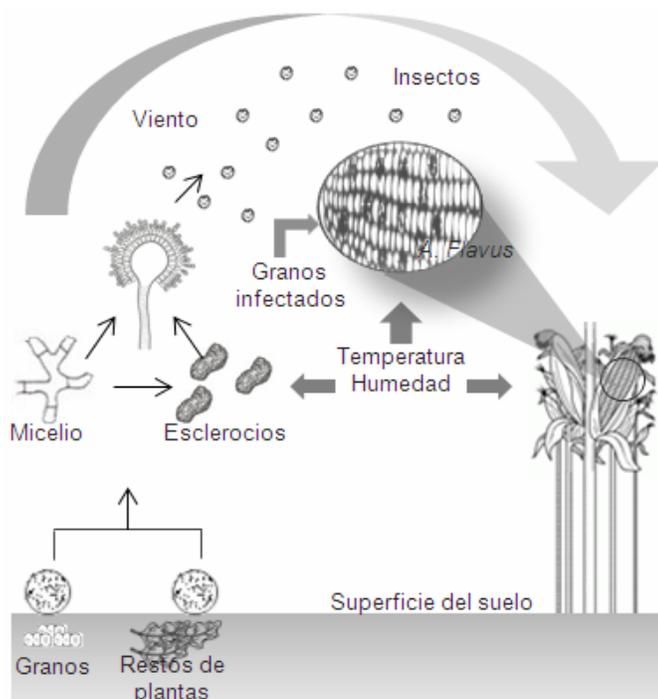


Figura 4. Hospedaje del *A. flavus* en el maíz.

Entre los métodos de análisis para la detección de las micotoxinas en alimentos, tejidos y fluidos orgánicos, se encuentran: el uso de lámparas ultra violeta para detectar su fluorescencias, la utilización de anticuerpos monoclonales, la Cromatografía en Capa Fina (CCF, método oficial estipulado por la *Association of Analytical Chemist*) y métodos basados en ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Siendo los métodos más avanzados: la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) y la Reacción en Cadena de Polimerasas (RCP) [17].

Basado en los riesgos que las micotoxinas tienen sobre la salud humana, diferentes organismos internacionales como la OMS, *The Food and Drug Administration* (FDA) y la *Food and Agriculture Organization* (FAO) han establecido los límites permitidos de micotoxinas en los piensos y los alimentos. Estas regulaciones se establecen dependiendo de la disponibilidad de datos toxicológicos y de la aparición de nuevos datos, así como también, de un conocimiento detallado sobre las posibilidades de muestreo, análisis de las muestras y problemas socioeconómicos. La *International Agency for Research on Cancer* (IARC) incluye las aflatoxinas dentro del grupo 1, considerándolas cancerígenas para el hombre. En Venezuela, La legislación vigente

establece niveles máximos de 5 µg/kg de aflatoxinas en alimento para consumo humano (COVENIN, 1987) y de hasta 20 µg/kg para materia prima de elaboración de alimento concentrado para aves (COVENIN, 1983); cabe señalar que la normativa COVENIN (Comisión Venezolana de Normas Industriales) de 1935 y 1987, está actualmente en revisión y la publicación oficial de ésta aún no se encuentra disponible, pero según la FAO/OMS (2004) en Venezuela, solamente se encuentran reglamentados los niveles máximos de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ para el maíz, harina de maíz, maníes y manteca de maní (20 µg/kg) y de la aflatoxina M₁ para la leche de consumo (0,5 µg/kg) y leche en polvo (5,0 µg/kg). [17-20].

La Comisión del *Codex Alimentarius*, iniciativa conjunta de la FAO/OMS establecida en 1963, elabora normas, directrices y códigos de prácticas alimentarias internacionales armonizadas y destinadas a proteger la salud de los consumidores y garantizar la aplicación de prácticas leales en el comercio de alimentos. Asimismo, promueve la coordinación de todos los trabajos sobre normas alimentarias emprendidos por las organizaciones internacionales gubernamentales y no gubernamentales. Entre los recursos que promueve para la prevención de micotoxinas en alimentos, se encuentra la aplicación de los programas de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC). El APPCC, específico para el control de micotoxinas; identifica, evalúa y controla los peligros importantes para la inocuidad de los alimentos. Se trata de un enfoque estructurado y sistemático para controlar la inocuidad de los alimentos en toda la cadena de producción, desde el campo hasta la mesa. Requiere un buen conocimiento de la relación entre causa y efecto, con objeto de actuar de forma más dinámica, y es un elemento clave de la Gestión de la Calidad Total (GCT) [21].

Diversos métodos de descontaminación de micotoxinas en los alimentos se han venido usando a lo largo de los años. Los métodos de descontaminación se pueden dividir básicamente en métodos físicos, químicos y biológicos. Esta división es de manera convencional, pues algunos métodos utilizan combinaciones de los diferentes principios de acción. Entre los métodos físicos se incluyen, la separación mecánica, la flotación, separación por color o remoción de los granos quebrados y lavado con soluciones después de la recolección de los granos. Probablemente, el método físico más

empleado en una industria pecuaria sea la separación de granos quebrados, esto permite reducir de una manera importante la contaminación por micotoxinas, sin embargo con frecuencia no se hace, debido a un concepto equivocado de utilizar al máximo los granos, sin pensar en los riesgos productivos [14, 22, 23].

Entre los métodos químicos utilizados para la eliminación de algunas micotoxinas, se encuentran el uso de sustancias amoniacales, formol, hidróxido de calcio, bisulfito de sodio, ozono, cloro, monometilamina y las irradiaciones; no obstante, estos tratamientos están siendo prohibidos por las nuevas legislaciones europeas, debido al grado de efectos secundarios que pueden producir en los consumidores [22].

Los métodos biológicos operan a través de procesos bioquímicos, tales como: el uso de microorganismos competitivos, enzimas microbianas capaces de inactivar algún punto en la biosíntesis de micotoxinas, modificación genética de los granos y modificación genética de los hongos, este último es usado para la inoculación de cepas no toxigénicas en plantas o granos susceptibles [24, 25].

Entre los métodos mixtos se encuentra la utilización de sustancias descontaminantes, naturales o sintéticas, conocidas como secuestrantes. Estas son capaces de inhibir dichos metabolitos, contrarrestando de este modo la toxicidad de los mismos. Entre estos se encuentran algunas arcillas, y zeolitas de origen volcánico, bentonitas, carbón activado, aluminosilicatos y productos de la pared celular de levaduras. Estas sustancias se mezclan con el pienso de los animales [26].

Son muy diversos los métodos de descontaminación usados para la remoción o inactivación de estas micotoxinas en los alimentos. La mayoría de estos métodos son costosos y tienden a modificar los valores nutritivos del alimento. La necesidad de encontrar una alternativa: económicamente viable y amigable con los alimentos, se puede dirigir hacia los productos naturales. Las propiedades antibacterianas que poseen algunos metabolitos secundarios, obtenidos de fuentes vegetales, han sido reconocidas desde hace tiempo, la búsqueda de alternativas naturales contra agentes antimicrobianos ha llevado a un renovado interés científico de estas sustancias. Muchos estudios *in vitro* reportan una alta eficacia contra microorganismos patógenos [27-29].

Las plantas producen diversos compuestos orgánicos que aparentemente no parecen tener una función directa en su crecimiento y desarrollo. Estas sustancias se conocen como metabolitos secundarios, productos secundarios o productos naturales. Estos compuestos no se relacionan directamente con el proceso de fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, síntesis de proteínas, asimilación de nutrientes, formación de carbohidratos, los cuales forman parte de los metabolitos primarios de las plantas [30,31].

Históricamente, el hombre ha centrado su atención en los productos naturales, los cuales han sido empleados como fuente de sustancias con diversas actividades como: antimicrobiana, antifúngica y antioxidante. Entre las sustancias de origen natural de gran interés en las industrias de fragancias, sabores, cosméticos, alimentos y farmacéutica, principalmente, se encuentran los aceites esenciales [30, 32].

Los aceites esenciales son compuestos producto de los metabolitos secundarios de algunas plantas. Son sustancias volátiles y es característico en ellas encontrar la presencia de terpenos, fundamentalmente mono y sesquiterpenos; terpenoides y componentes aromáticos de derivados fenólicos y alifáticos. Es conocida la actividad antibacteriana, antifúngica, antiséptica y propiedades medicinales que presentan varios de estos aceites [32-34].

Los aceites esenciales son secretados por los tricomas glandulares que se encuentran distribuidos, en menor o mayor proporción, en las diferentes partes de la planta, tales como hojas, tallos, flores y frutos. De esta forma, tenemos que el aceite de rosa y jazmín se encuentra principalmente en las flores; el aceite de menta y eucalipto en las hojas; el aceite de limón y naranja se encuentra en la cáscara y el aceite esencial del canelo se encuentra tanto en la corteza como en las hojas [35].

Un gran número de especies de plantas contienen compuestos químicos volátiles que pueden extraerse en forma de aceite esencial. El aceite esencial se puede aislar mediante una serie de métodos de extracción. Aunque parece relativamente fácil aislar estos aceites, su composición puede variar en gran medida en función del método utilizado. Las ventajas y desventajas de algunos métodos como la destilación, extracción

por solventes, extracción supercrítica con dióxido de carbono y el uso de hornos microondas han sido discutidas en varias investigaciones [36-39].

El método más común, usado para la extracción de aceites esenciales, es la destilación. La destilación, a su vez, comprende dos modalidades que son: arrastre por vapor e hidrodestilación. La técnica de arrastre por vapor se basa en la vaporización, a temperaturas inferiores a las de ebullición, de los componentes volátiles dentro del material vegetal por efecto de un aumento en la presión de vapor de la mezcla. Los vapores obtenidos se enfrían en un condensador donde regresan a la fase líquida. Los dos productos inmiscibles, agua y aceite, finalmente se separan en un decantador por diferenciación de fases. La hidrodestilación, por otra parte, se fundamenta en la solubilidad de los constituyentes oxigenados del aceite esencial debido a que estos son unas cien veces más solubles en agua hirviendo comparado con sus hidrocarburos análogos. En las etapas iniciales del proceso de hidrodestilación, los componentes se liberan de acuerdo con su grado de solubilidad antes que por sus puntos de ebullición. Luego, a medida que avanza la destilación, los compuestos se liberan en función de su temperatura de ebullición, siendo la última fracción muy rica en sesquiterpenos y sus análogos oxigenados [30, 35, 40].

Los principales efectos que se producen en los procesos de destilación son, en primer lugar, la hidrodifusión. La destilación del material vegetal está relacionada con los procesos de difusión, y principalmente de la ósmosis. El término difusión, tal como se utiliza en este contexto, implica la penetración recíproca de las diferentes sustancias hasta que se establece un equilibrio dentro del sistema. Esta difusión es causada por la fuerza de las moléculas, donde dos sustancias no están separadas por una pared. Por otra parte, la ósmosis del aceite esencial debido a sus altas temperatura y fluctuaciones constantes de agua por el aumento de presión, acelerando la difusión hasta el punto de que todo el aceite volátil contenido dentro del tejido de la planta pueda ser recolectado. En segundo lugar, se encuentra el efecto de la hidrólisis, que para nuestro caso, se puede definir como una reacción química entre el agua y determinados componentes de los aceites esenciales. Estos productos naturales están compuestos, en gran parte, de ésteres, que son compuestos derivados de ácidos orgánicos y alcoholes. En presencia de agua, y

particularmente a temperaturas elevadas, los ésteres tienden a reaccionar con el agua para formar los ácidos y alcoholes precursores. Las características más importantes en este tipo de reacciones, que se dan durante el proceso de destilación son su parcialidad y que dependen del tiempo de contacto entre el aceite y el agua. Por último, el tercer efecto importante que se produce en los procesos de destilación, es la descomposición térmica causada por la influencia de la temperatura en los aceites esenciales. Prácticamente, todos los componentes de los aceites esenciales son algo inestables a altas temperaturas. Los métodos empleados pueden operar a temperaturas inferiores a 100°C mediante el uso de una presión adecuada por debajo de la atmosférica [41].

Dentro de sus propiedades físicas, los aceites esenciales suelen ser líquidos a temperatura ambiente. Son sustancias volátiles (presentan temperaturas de ebullición entre 50 a 320°C) con un aroma característico. La mayoría de estos aceites son casi incoloros, poseen un alto índice de refracción y son ópticamente activos. Son muy solubles en solventes orgánicos, pero tienen una solubilidad muy limitada en agua; debido a que su densidad es menor a la de esta, exceptuando algunos casos como los aceites obtenidos del safrán, clavo y de la canela [42].

En cuanto a sus propiedades biológicas, hay que tener en cuenta que los aceites esenciales son mezclas complejas de numerosas moléculas y sus efectos biológicos son el resultado de una sinergia existente entre sus diversos componentes. Sin embargo, en la mayoría de los casos, sólo los principales componentes de ciertos aceites esenciales como el terpineol, eugenol, timol, carvacrol, carvona, geraniol, linalol, citronelol, nerol, safrol, eucaliptol, limoneno, cinamaldehído, son analizados. En general, los principales componentes se encuentran a fin de reflejar bastante bien las características biofísicas y biológicas de los aceites esenciales de las que fueron aisladas. La amplitud de sus efectos sólo depende de su concentración cuando se prueban solos o integrados al aceite esencial. Es posible que la actividad de los componentes principales sea modulada por otras moléculas que se encuentran en menor medida dentro del aceite [34].

Las diferentes propiedades biológicas, de los aceites esenciales, están directamente relacionadas con su composición química. Así, los sesquiterpenos exhiben actividad citotóxica y mutagénica, y son menos efectivos para inhibir el desarrollo de los

microorganismos que sus análogos oxigenados. Por su parte, los fenoles, son microbicidas o inhibidores del crecimiento dependiendo de su estructura química, razón por la cual los aceites esenciales con elevado contenido de fenoles presentan actividad antimicrobiana alta. Finalmente, los aldehídos alifáticos, a pesar de ser poco frecuentes en los aceites esenciales, presentan inhibición del desarrollo o actividad microbicida a bajas concentraciones; si existe un enlace doble cerca del grupo insaturado (aldehídos α , β - insaturados). La capacidad de acción de estos compuestos dependerá de la longitud de su cadena carbonada y del tipo de microorganismos [43].

Existen diferentes factores que influyen sobre la composición química de los aceites esenciales obtenidos, entre ellos, se pueden destacar los siguientes: 1. Condiciones geobotánicas del medio: clima, altitud, tipo de suelo y pluviosidad; 2. Métodos del cultivo; 3. Utilización de fertilizantes, abonos y pesticidas; 4. Época de recolección; 5. Parte usada de la planta; 6. Modo de almacenamiento; 7. Manejo del material vegetal: fresco, seco, fermentado y tratamiento postcosecha recibido; 8. Modo de obtención del aceite: destilación, entre otros; 9. Edad de la planta; finalmente, 10. Su estado fenológico [43].

Los aceites esenciales pueden sufrir degradación química, siendo un proceso mediante el cual la calidad de sus componentes originales es reducida en el tiempo. Existen tres factores principales responsables de la degradación de los aceites esenciales, éstos son: presencia de oxígeno, calor y luz. El oxígeno puede cambiar la composición química por combinación con algunos de sus componentes, este proceso es llamado oxidación y tiende a ocurrir en aceites esenciales ricos en terpenos, tales como el limón y el pino; la oxidación tiende a ocurrir más rápido que la degradación por el calor y la luz. Sin embargo, es igual de importante mantenerlos en lugares refrigerados y en frascos de color ámbar. Cualquier tipo de degradación de las esencias naturales reduciría sus posibles efectos biológicos [1].

Debido a que los aceites esenciales se encuentran presentes en frutas, vegetales, hierbas y especies junto con carotenoides, retinoides, tocoferoles, ácido ascórbico, flavonoides y polifenoles, se les ha incluido dentro de los antioxidantes. Esto nos lleva a ubicarlos dentro de los aditivos para su uso alimentario [34].

Una de las familias dentro del reino vegetal, con un alto número de especies con propiedades medicinales, es la familia de las Lamiaceae. Esta familia comprende más de 252 géneros y 7000 especies que se encuentran comúnmente en la región mediterránea. La mayoría de ellas son aromáticas y algunas son usadas como hierbas culinarias, como la salvia, el tomillo, el romero, el orégano, la albahaca, la lavanda, la menta y la mejorana, por lo que tienen un gran valor comercial [44].

Es conocida la actividad antifúngica que poseen algunos aceites esenciales de plantas pertenecientes a la familia Lamiaceae. El aceite esencial obtenido de la *Mentha longifolia* (Lamiaceae) mostró, a 10 µl/ml, actividad fungicida frente a especies de *Aspergillus* y *Fusarium*, *Penicillium funiculosum* y *Trichoderma viride*. 5 µl/ml de los aceites fueron eficientes contra *Trichophyton menthagrophytes* y *Candida albicans*. Las cepas más sensibles fueron las de *Cladosporium fulvum*, *C. cladosporioides* y *P. ochrochloron* donde la concentración de 2,5 µl/ml fue letal. Los principales compuestos del aceite de *M. longifolia* fueron *trans*-dihidrocarvono (23,64%), Piperitona (17,33%) y *cis*-dihidrocarvono (15,68%) [45-48].

El género *Rosmarinus*, conocido como romero, comprende cinco especies *R. officinalis*, *R. eriocalyx*, *R. laxiflorus*, *R. lavandulaceus* y *R. tomentosus*. *R. officinalis* es una hierba perenne con fragantes hojas en forma de aguja (Fig. 5). Crece hasta una altura de 1,5 m, sus hojas miden alrededor de 2,5 cm y posee flores pequeñas, de color azul claro. El romero ha sido una hierba importante desde la antigüedad. Se utiliza tradicionalmente como saborizante, conservante antiséptico y astringente. Posee propiedades antioxidantes que todavía se utilizan para extender la vida útil de los alimentos preparados. El romero, es conocido también como un agente antibacteriano, antimutagénico y como agente quimiopreventivo. Además de su aplicación terapéutica, el aceite esencial se aplica extensamente en la industria cosmética en la producción de diversas aguas de colonia, esencias de baño, productos para el cabello y como componente de los desinfectantes e insecticidas [49-51].

Las actividades antioxidante y antimicrobial del aceite esencial de *R. officinalis* han sido estudiadas. Su capacidad antioxidante para pruebas como: captura de radicales libres con 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH), blanqueamiento de β-caroteno y

fotoquimioluminiscencia, es satisfactoria. El *R. officinalis* reduce notablemente la concentración de radicales libres DPPH ($65.9 \pm 0.46\%$). Los resultados en la actividad inhibidora de la peroxidación de lípidos de los aceites por la prueba de blanqueamiento de β -caroteno ($81.1 \pm 0.57\%$) y los obtenidos con la prueba de fotoquimioluminiscencia (66.0 ± 4.2 mmol.trolox/l) muestran su alta eficacia como antioxidante. Por otra parte, su concentración mínima inhibitoria (CMI; $\mu\text{g/ml}$) se evaluó contra: *C. albicans* (0,09), *Rhodotorula glutinis* (0,12), *Schizosaccharomyces pombe* (0,18), *Saccharomyces cerevisiae* (0,06) y *Yarrowia lypolitica* (0,12) [51].



Figura 5. *R. officinalis*.

En trabajos anteriores, se han reportado 24 componentes del aceite esencial provenientes de las hojas del *R. officinalis* extraído por destilación. Entre ellos, destacan como mayoritarios: el α -pineno, el 1,8-cineol, el canfeno, la verbenona, el linalol y el alcanfor (Fig.6). Siendo aceites esenciales ricos en componentes terpenoides, tanto carbonados como oxigenados [52].

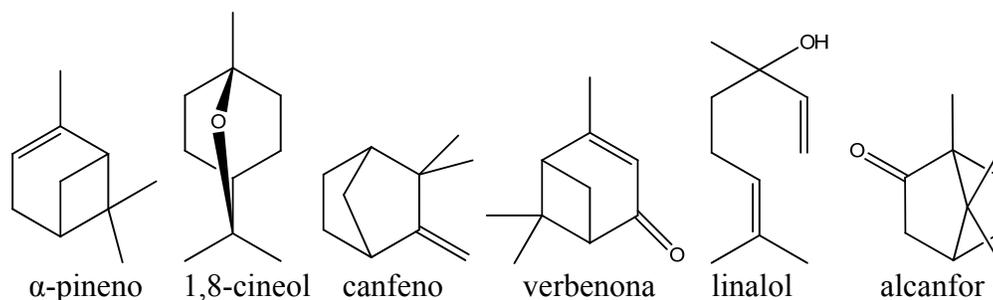


Figura 6. Componentes principales del aceite esencial de *R. officinalis*.

La composición química y la actividad biológica, que pueda presentar un aceite esencial, se ven alteradas por el método de extracción del mismo. En este proyecto, se aplicaron dos métodos extractivos, a saber: hidrodestilación y arrastre por vapor, para la obtención de dos tipos de aceites esenciales a partir del *R. officinalis*. Estos aceites esenciales fueron evaluados y comparados, de acuerdo; al rendimiento, composición química y actividad biológica que presentaron. Estas evaluaciones ayudaran a discernir cuál de los métodos usados será el más adecuado para ser aplicado en futuras investigaciones. La actividad biológica a evaluar fue actividad antifúngica. Para ello se usaron cultivos de *A. flavus*. La elección de este hongo filamentoso se debió a que éste produce toxinas muy peligrosas para la salud llamadas aflatoxinas; al ser ubicuo, se encuentra frecuentemente en diversos alimentos, y por último los métodos conocidos para su control en alimentos suelen ser costosos y tienden a modificar los valores nutritivos del mismo. La elección de *R. officinalis* como material vegetal para la obtención de aceites esenciales se produjo, en primer lugar, por ser una planta comestible, cuyos componentes poseen un bajo nivel de toxicidad, son aptos para el consumo humano y son utilizados como condimentos de diversas comidas; en segundo lugar, a que posee propiedades antimicrobianas y antioxidantes y en tercer lugar, porque este aceite pudiera ser usado en investigaciones futuras como recubrimiento o película comestible en productos hortofrutícolas. Por lo antes mencionado, este estudio propone la utilización de los aceites esenciales, específicamente, al aceite esencial de *R. officinalis*, como una alternativa para el biocontrol del *A. flavus* principal productor de la aflatoxina B₁. Para tal fin, se plantearon los siguientes objetivos:

General: Evaluar los aceites esenciales de *R. officinalis*, obtenidos mediante la utilización de dos técnicas de destilación, de acuerdo con el rendimiento, composición química y actividad antifúngica contra *A. flavus*.

Específicos: 1) Obtener los aceites esenciales del *R. officinalis* utilizando hidrodestilación y destilación por arrastre de vapor. 2) Calcular el rendimiento de los aceites esenciales del *R. officinalis*. 3) Evaluar la actividad antifúngica de los aceites esenciales del *R. officinalis* frente al hongo *A. flavus*. Por último, 4) Caracterizar la composición química de los aceites esenciales del *R. officinalis* por medio CG/EM.

METODOLOGÍA

RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

Rosmarinus officinalis se compró en el mercado municipal de Cumaná, estado Sucre. La especie vegetal fue identificada en el Herbario I.R.B.R. del Departamento de Biología del Núcleo de Sucre de la Universidad de Oriente.

OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL

Para la obtención de los aceites esenciales del *R. officinalis* se aplicaron los siguientes métodos:

Extracción por arrastre de vapor (AV)

Se hizo pasar vapor de agua durante 6 horas dentro de un balón de 1000 ml que contenía aproximadamente 150 g de la muestra. En la Figura 7, se muestra el montaje usado para este método extractivo.

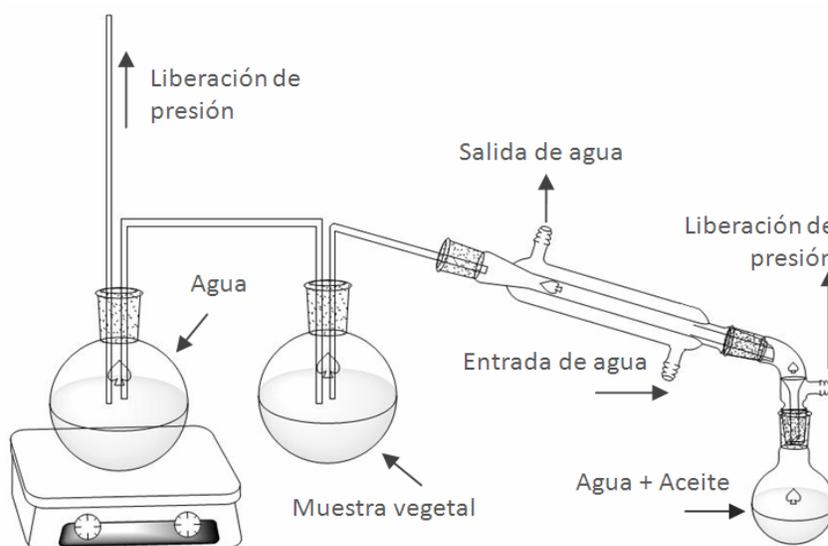


Figura 7. Arrastre por vapor.

Hidrodestilación (HD)

En un balón de destilación de 2000 ml se colocó una muestra de aproximadamente 150 g del material vegetal y se le adicionó agua hasta cubrir dicho material. Luego, se calentó durante un periodo de 3 horas. Para esta hidrodestilación se utilizó una trampa tipo Clevenger. En la Figura 8, se muestra el montaje para esta modalidad de destilación.

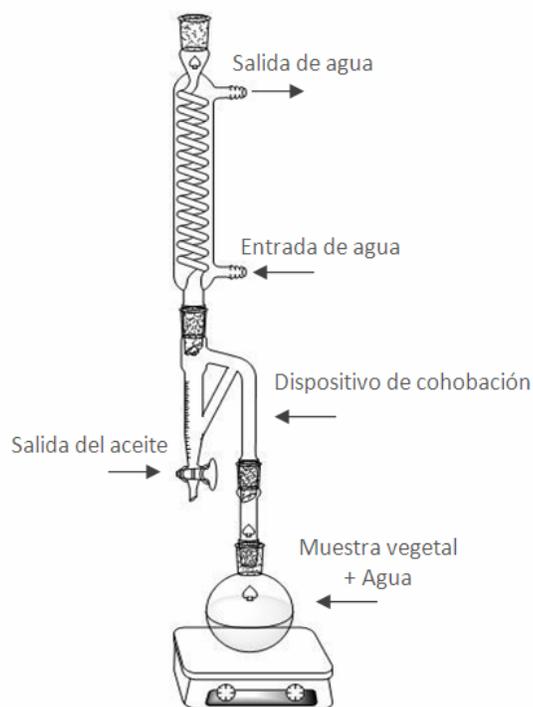


Figura 8. Hidrodestilación.

En ambos métodos extractivos, de manera individual, la mezcla de agua y aceite obtenida al final de los procesos fue tratada con hexano y cloruro de sodio con la finalidad de separar las dos fases. Luego, la fase orgánica fue tratada con sulfato de sodio anhidro para eliminar cualquier residuo de agua. Seguidamente, se filtró y rotaevaporó a 39°C para eliminar el solvente y obtener el aceite esencial.

El aceite esencial, finalmente obtenido, se trasvasó a un vial y por diferencias de pesos se obtuvo el del aceite esencial. Habiendo previamente pesado el material vegetal, se logró calcular el rendimiento (% m/m) para cada extracción.

PRUEBA BIOLÓGICA

Con esta prueba se evaluó la actividad antifúngica que presentaron los aceites esenciales de *R. officinalis* [53].

Actividad antifúngica

Se realizaron cultivos puros de *Aspergillus flavus*, el cual fue proporcionado por el laboratorio de Investigaciones Microbiológicas del Departamento de Bioanálisis, incubándolos en tubos con Agar Sabouraud Dextrosa (ASD) a temperatura ambiente ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) por un espacio de 5 días. Terminado el tiempo de incubación, se les agregaron 9 ml de solución salina fisiológica estéril y se agitaron vigorosamente para facilitar el desprendimiento de los conidios. Las suspensiones obtenidas se filtraron a través de doble gasa estéril, eliminando de esta forma otras estructuras fúngicas y obteniendo sólo conidios en las suspensiones. Se determinó el número de conidios por ml en las suspensiones, utilizando una cámara de Neubauer, ajustándose la concentración a 10^6 conidios/ml.

Luego, se impregnaron discos de papel de filtro estériles de 6 mm de diámetro con $10 \mu\text{l}/\text{disc}$ de los aceites esenciales obtenidos y se colocaron sobre placas de Petri con ASD, las cuales fueron sembradas previamente por superficie con $100 \mu\text{l}$ de la suspensión de conidios del hongo filamentoso a ensayar, con asa de Digrafski. Las placas fueron incubadas entre 3 a 5 días a temperatura ambiente. Se realizaron controles con placas de Petri con ASD sembradas con *A. flavus*. El diámetro de los halos inhibitorios, formados alrededor de los discos de papel de filtro, fue medido con un vernier y los resultados obtenidos se expresaron en mm.

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA

Los aceites esenciales son mezclas de diversos compuestos volátiles. Las estructuras de dichos compuestos se identificaron mediante la utilización de un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (CG/EM). La CG/EM, es una técnica idónea para este tipo de compuestos [31].

Cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM)

La identificación de los constituyentes del aceite esencial se realizó en un cromatógrafo de gases marca Hewlett Packard modelo 5890 serie II, acoplado a un detector de masas Hewlett Packard modelo 5971 A. Se utilizó una columna de metilsilicona (30m x 0,25mm). El gas portador fue helio (1,2 ml/min). Cada muestra (1 µl) se inyectó en el modo split (1:20), el programa usado fue el de isotérmica a 70°C. La temperatura de inyección fue 240°C. El impacto electrónico del espectrómetro de masas se llevó a cabo a 70 eV. Los componentes químicos se identificaron por comparación de sus tiempos de retención relativos y espectros de masas, con los datos de la biblioteca de componentes de aceites esenciales, Wiley, Mass-Finder, y la librería Adams CG/EM.

A continuación, se representa en la Figura 9, de manera esquemática, un resumen de la metodología aplicada a lo largo de este trabajo investigativo.

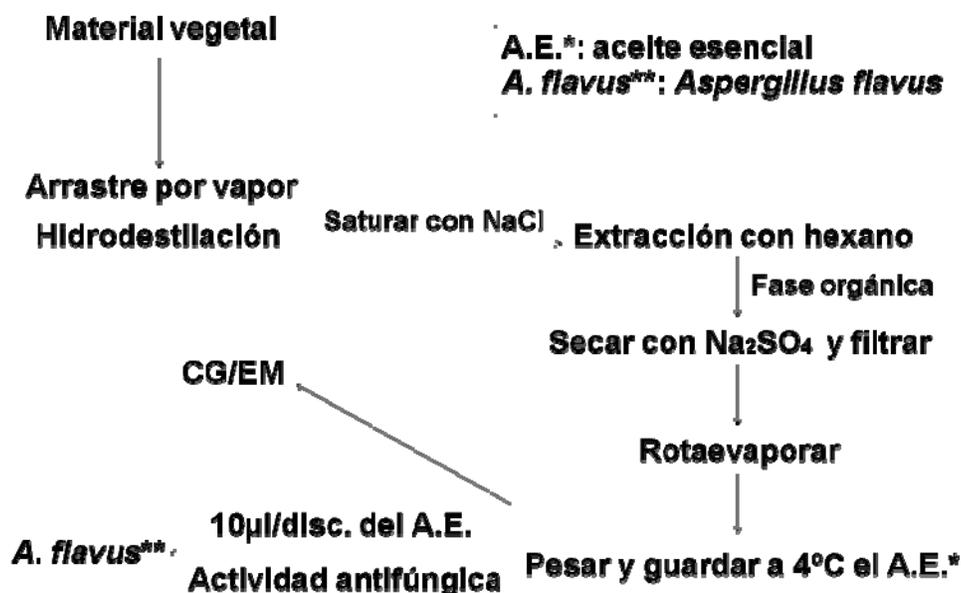


Figura 9. Resumen esquemático de la metodología aplicada.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El diámetro (mm) de los halos inhibitorios, producto de la actividad biológica de los aceites esenciales de *R. officinalis* contra *A. flavus*, fueron registrados. Los resultados obtenidos, para ambos métodos extractivos, se cotejaron mediante el análisis estadístico t-Student con un nivel de significancia de $p < 0,05$ usando el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI.I. Los rendimientos (% m/m) calculados para HD y AV también fueron comparados mediante el análisis estadístico t-Student, usando el programa, con un nivel de significancia de $p > 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN

Los resultados correspondientes a los rendimientos calculados para los métodos de destilación de los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Rendimientos calculados (% m/m) para los aceites esenciales de *R. officinalis* extraídos por destilación

Metodología	Rendimiento (M±DE)%	Distribución t
Hidrodestilación	(0,2±0,05)	0,70
Arrastre por vapor	(0,1±0,05)	

M= Media, DE= Desviación Estándar. Los valores promedios de los rendimientos fueron analizados mediante el método estadístico de t-Student ($p>0,05$).

El aceite esencial de *R. officinalis*, obtenido por hidrodestilación, presentó un olor intenso y penetrante, y un color ligeramente amarillo. Su rendimiento fue de 0,2% m/m con una desviación estándar de 0,05%. Por otra parte, el aceite esencial obtenido mediante arrastre por vapor, presentó un olor menos intenso y un color un tono más oscuro en comparación al obtenido por hidrodestilación. Su rendimiento fue de 0,1% m/m y su desviación estándar también fue de 0,05%.

Los rendimientos calculados colocan a la técnica de hidrodestilación como la más apropiada para obtener mayor cantidad de aceite esencial. Su rendimiento se encuentra un 50% por encima del rendimiento obtenido en la técnica de arrastre por vapor. Las observaciones realizadas durante la aplicación de los métodos extractivos, evidencian que la hidrodestilación presenta la particularidad de desgastar más rápido la muestra vegetal en comparación al método de arrastre por vapor; entendiéndose como desgaste de la muestra, a la pérdida paulatina de la intensidad de su olor a medida que avanza el tiempo durante el proceso extractivo.

El rendimiento de los aceites esenciales, obtenidos para ambos métodos extractivos, fue menor a los reportados en trabajos anteriores, donde se obtuvieron rendimientos que rondaban entre 0,37-0,49% y 0,93-1,05%. El rendimiento de los

aceites esenciales de *R. officinalis*, obtenidos para esta investigación, pudo verse afectado por el estado de madurez de la planta y por algún tipo de estrés al cual fuese sometida, posiblemente, durante el cultivo; pudiéndose, en este último caso, producirse metabolitos secundarios, no regulares, denominados fitoalexinas [44, 49].

El tiempo de recolección es uno de los factores más importantes que influyen en la calidad de los aceites esenciales. La cantidad de sus componentes esta fuertemente relacionada con la etapa de desarrollo de la planta (ontogenia). La recolección de la cosecha, temprana o tardía, produce un rendimiento bajo. Para obtener un alto rendimiento de aceites esenciales es mejor usar la planta después del periodo de floración. El tiempo empleado para la destilación también es un parámetro importante para su rendimiento. El aceite de lavanda, por ejemplo, requiere alrededor de una hora y media para su destilación. Si el tiempo de destilación se reduce sólo ligeramente, alrededor de un 18 a 20% de los componentes químicos del aceite esencial pueden faltar. Las moléculas aromáticas de los aceites esenciales son volátiles y fácilmente son destruidas o alteradas por las altas temperaturas, por lo tanto, el proceso de destilación debe usar temperaturas moderadas [54].

Los principales efectos que se producen en la destilación son: difusión, por parte de los aceites esenciales y del agua caliente a través de las membranas de las plantas (hidrodifusión); hidrólisis, solo de ciertos componentes del aceite esencial, y por último, descomposición térmica, ocasionada por el calor administrado en el proceso [41].

Aunque los tres procesos de difusión, hidrólisis y descomposición térmica se han considerado de forma independiente, se debe tener en cuenta que en la práctica los tres ocurren simultáneamente, y por lo tanto, uno afecta al otro. Esto es particularmente cierto en el efecto de la temperatura. La velocidad de difusión generalmente se incrementará en temperaturas más altas. La solubilidad de los aceites esenciales en el agua, un factor importante, aumenta con temperaturas más altas. Lo mismo es cierto para la hidrólisis, puesto que los productos de hidrólisis son en general más solubles en agua afectando al proceso de difusión. El cumplimiento de algunas recomendaciones conducen a mejorar los rendimientos y la calidad de aceite esencial a obtener, estas son: mantenimiento de una temperatura tan baja como sea viable; en el caso de la destilación

por vapor, el uso de una pequeña cantidad de agua en contacto directo con el material vegetal, con el fin de promover la difusión, por último; la trituración completa del material vegetal antes de aplicarle destilación o un cuidadosa empaquetamiento, de manera uniforme, de la carga del material vegetal para producir un mejor contacto entre el vapor y la planta [41].

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA

Los resultados correspondientes a los análisis por CG/EM realizados a los aceites esenciales de *R. officinalis* obtenidos por las técnicas de destilación se presentan a continuación.

En la Figura 10, se presenta el perfil cromatográfico del aceite esencial de *R. officinalis* obtenido por hidrodestilación de sus hojas.

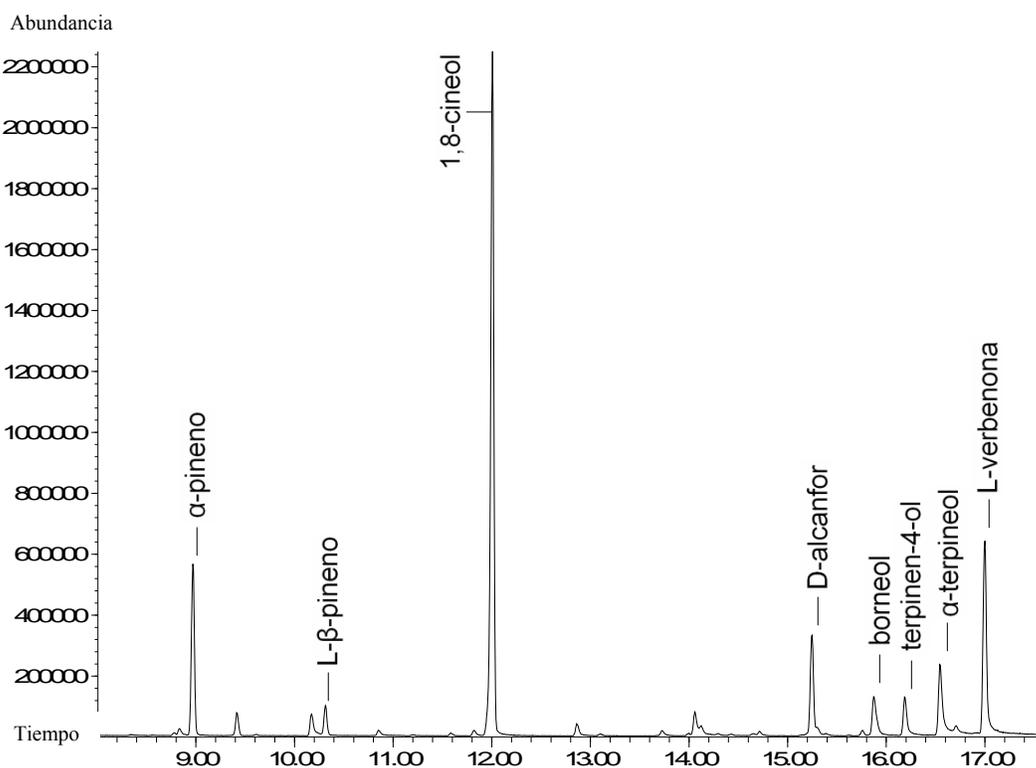


Figura 10. Perfil cromatográfico del aceite esencial de *R. officinalis* obtenido por hidrodestilación.

En la Tabla 4, se registran los componentes aislados e identificados por CG/EM del aceite esencial de *R. officinalis* obtenido por hidrodestilación, según el orden de sus tiempos de retención (Tr; min.), adjuntando a ello, sus cantidades relativas (%V/V).

Tabla 4. Tiempo de retención (Tr; min.) y cantidad relativa (%V/V), de los componentes del aceite esencial de *R. officinalis* aislados por hidrodestilación e identificados por CG/EM.

Compuesto	Tr (min.)	% V/V
α -pineno	8,974	11,66
L- β -pineno	10,316	1,95
1,8-cineol	12,007	49,95
D-alcanfor	15,248	7,79
borneol	15,877	3,74
terpinen-4-ol	16,192	3,19
α -terpineol	16,548	6,13
L-verbenona	16,999	15,59
Total		100,00
Monoterpenos oxigenados		86,39
Monoterpenos carbonados		13,61

El porcentaje total de los metabolitos secundarios volátiles que constituyen al aceite esencial obtenido, para esta muestra, se ve representado por ocho compuestos, los cuales pertenecen a los grupos: monoterpenos oxigenados (86,39%) y monoterpenos carbonados (13,61%). Siendo sus compuestos mayoritarios: el 1,8-cineol (49,95%), la L-verbenona (15,59%) y el α -pineno (11,66%).

En la Figura 11 y en la Tabla 5, se presentan respectivamente, al cromatograma del aceite esencial de *R. officinalis*, y se registran los componentes aislados e identificados por CG/EM del aceite esencial de *R. officinalis*, obtenido mediante arrastre por vapor.

El porcentaje identificado de los metabolitos secundarios volátiles que constituyen al aceite esencial obtenido, mediante arrastre por vapor, se ve representado por trece compuestos, los cuales pertenecen a los grupos: monoterpenos oxigenados (76,52%), sesquiterpenos oxigenados (2,21%), sesquiterpenos carbonados (3,05%) y ésteres (6,81%). Siendo sus compuestos mayoritarios: la L-verbenona (32,61%), el D-alcanfor (20,87%) y el L-borneol (9,36%). El restante 11,41%, de compuestos

detectados, pertenece al rango de probabilidad menores de noventa por ciento (<90). Estos compuestos no pudieron ser identificados con certeza por la librería del programa. Probablemente, por ser compuestos trazas y constituir un porcentaje ínfimo en la composición del aceite esencial, pero pueden repercutir sobre la actividad biológica del mismo.

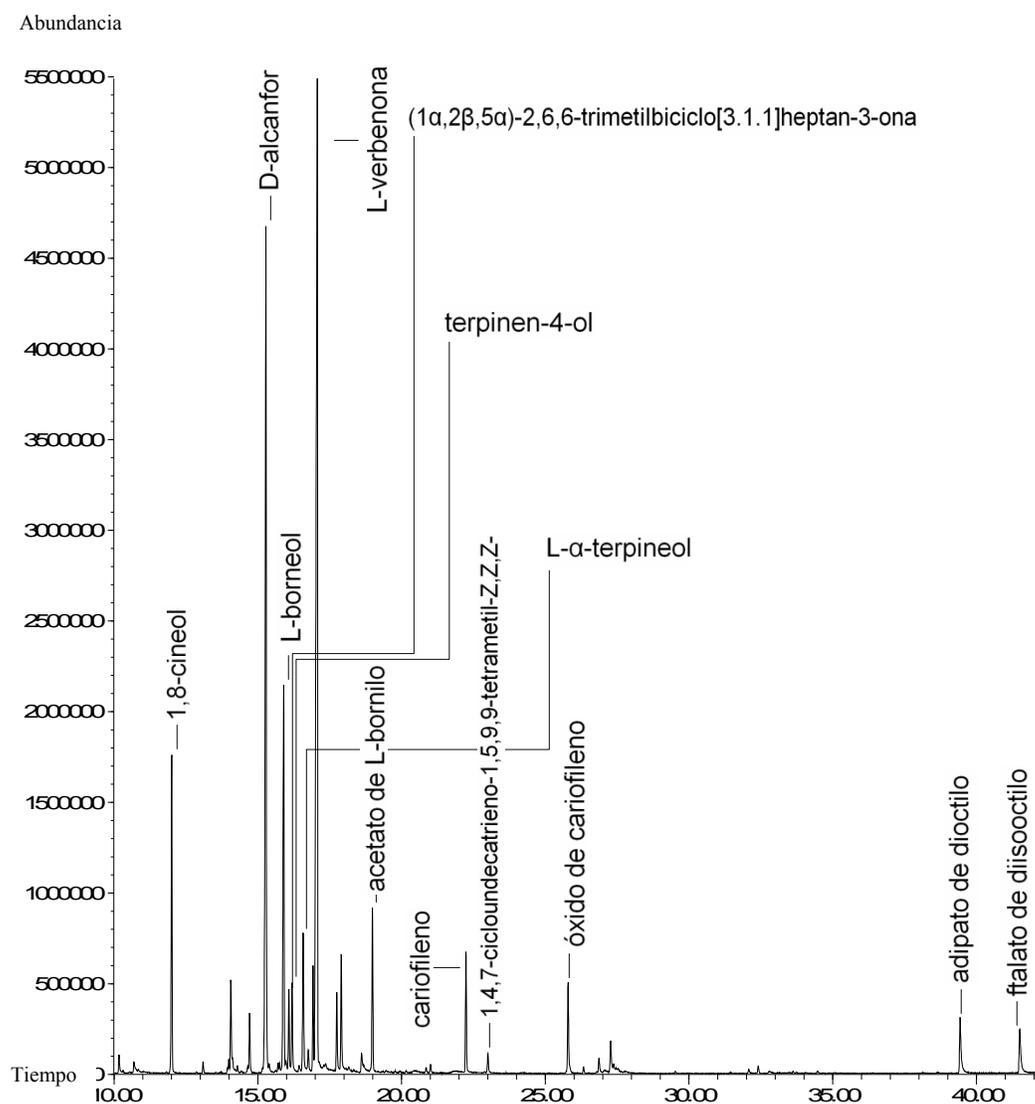


Figura 11. Perfil cromatográfico del aceite esencial de *R. officinalis* obtenido con arrastre por vapor.

Tabla 5. Tiempo de retención (Tr; min.) y cantidad relativa (%V/V), de los componentes del aceite esencial de *R. officinalis* aislados mediante arrastre por vapor e identificados por CG/EM.

Compuesto	Tr (min)	% V/V
1,8-cineol	12,007	6,40
D-alcanfor	15,284	20,87
L-borneol	15,901	9,36
(1 α ,2 β ,5 α)-2,6,6-trimetilbicyclo[3.1.1]heptan-3-ona	16,085	1,71
terpinen-4-ol	16,198	2,02
L- α -terpineol	16,583	3,55
L-verbenona	17,070	32,61
acetato de L-bornilo	18,993	3,33
cariofileno	22,246	2,59
1,4,7-cicoundecatrieno-1,5,9,9-tetrametil-Z,Z,Z-	23,005	0,46
óxido de cariofileno	25,795	2,21
adipato de dioctilo	39,434	1,87
ftalato de diisooctilo	41,506	1,61
Total		88,59
Monoterpenos oxigenados		76,52
Sesquiterpenos oxigenados		2,21
Sesquiterpenos carbonados		3,05
Ésteres		6,81

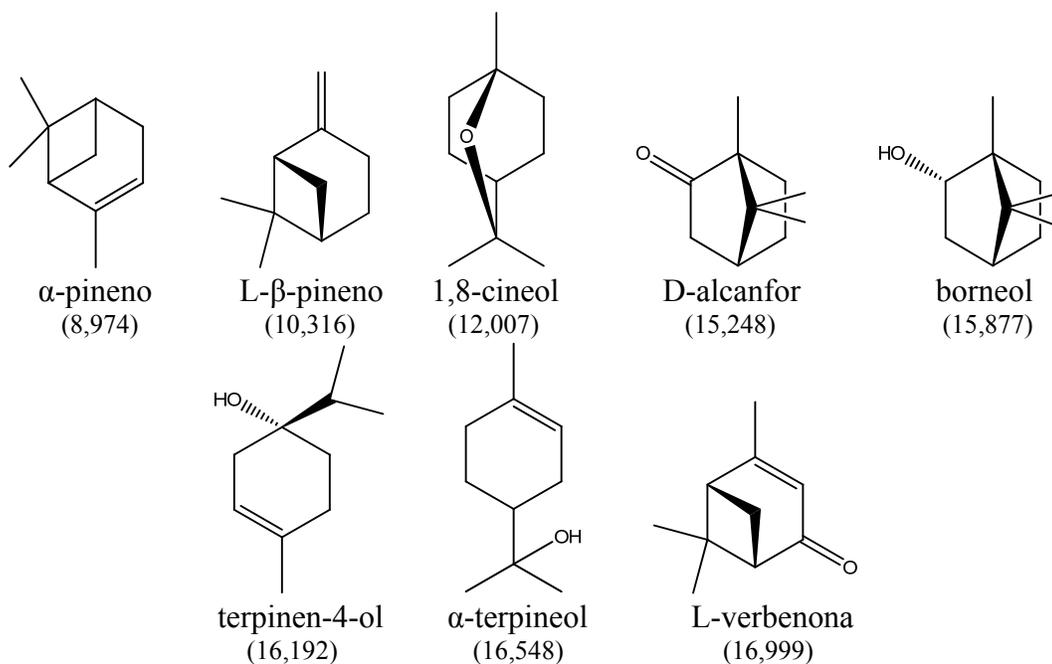


Figura 12. Compuestos identificados en el aceite esencial de *R. officinalis* extraído por hidrodestilación y ordenados de manera creciente según sus Tr (min.).

En la Figura 12, las estructuras químicas de los compuestos identificados de los aceites esenciales de *R. officinalis*, obtenidos por hidrodestilación, ordenados según su tiempo de retención.

En la Figura 13, se presentan las estructuras químicas de los compuestos identificados de los aceites esenciales de *R. officinalis*, obtenidos mediante arrastre por vapor, ordenados según su tiempo de retención. Exceptuando las estructuras del 1,8-cineol, D-alcanfor, terpinen-4-ol y L-verbenona, ya mostradas en la Figura 12.

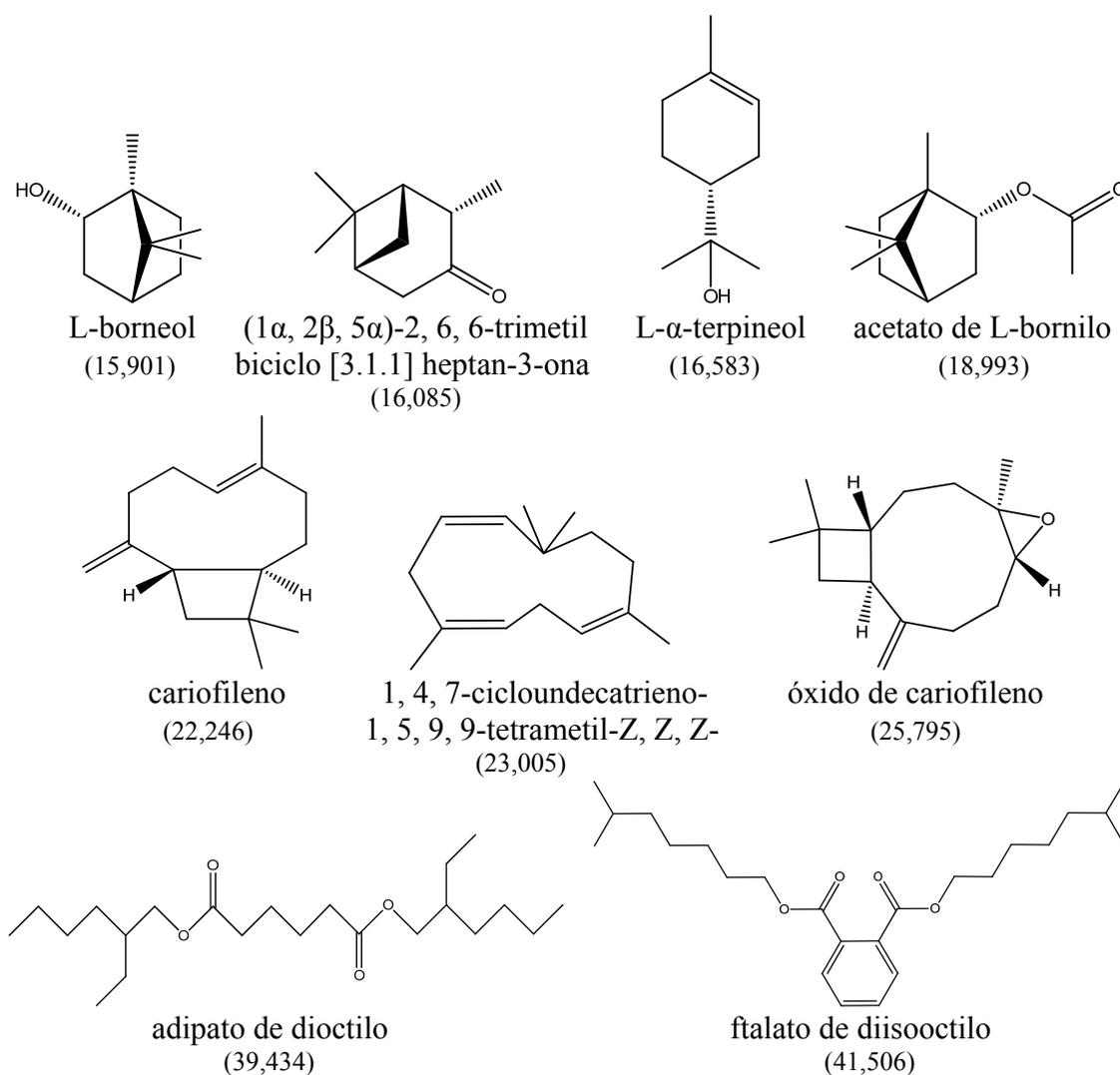


Figura 13. Compuestos identificados en el aceite esencial de *R. officinalis* obtenido mediante arrastre por vapor y ordenados de manera creciente según sus Tr (min.).

En la Figura 14 se representa, a modo de gráfico y de manera conjunta, los grupos de los principales componentes de los aceites esenciales de *R. officinalis* obtenidos por hidrodestilación y arrastre por vapor.

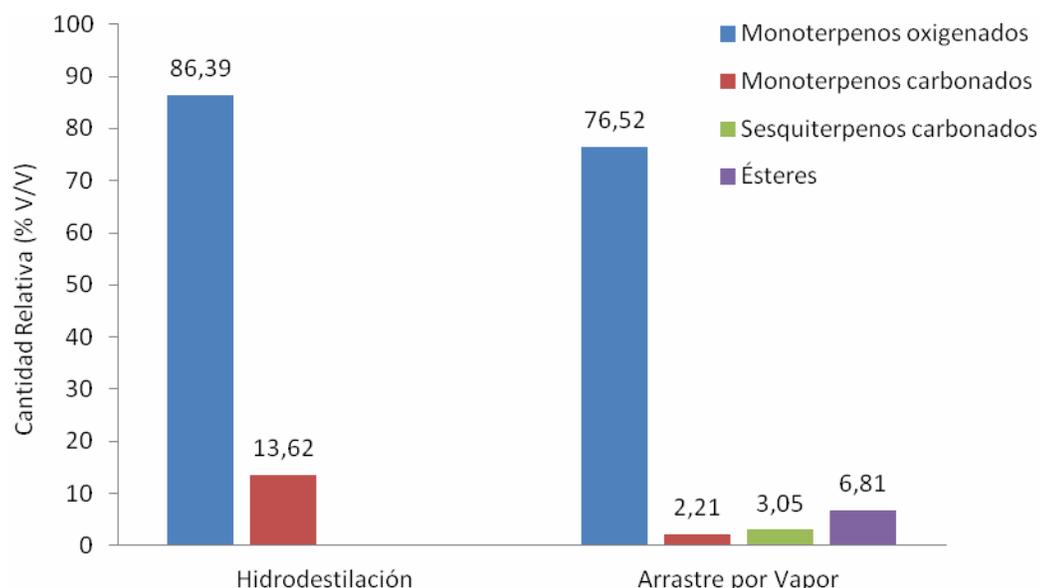


Figura 14. Distribución por grupos de los principales componentes de los aceites esenciales de *R. officinalis* según sus cantidades relativas (%V/V) y método de obtención.

El aceite esencial de *R. officinalis*, obtenido por hidrodestilación, posee un alto porcentaje de monoterpenos oxigenados (86,39%) y de monoterpenos carbonados (13,62%), en comparación al aceite esencial obtenido con arrastre por vapor; monoterpenos oxigenado (76,52%) y monoterpenos carbonados (2,21%). Pero, se observa que el aceite esencial obtenido por hidrodestilación, no posee sesquiterpenos carbonados ni ésteres de ningún tipo. Estos solo están contenidos en los aceites esenciales obtenidos mediante arrastre por vapor; sesquiterpenos carbonados (3,05%) y ésteres (6,81%).

En investigaciones anteriores, se ha encontrado que el aceite esencial de *R. officinalis*, obtenido por destilación, se compone de cantidades aproximadamente iguales de monoterpenos oxigenados (46,9%) y monoterpenos carbonados (46,7%) [55].

La mayoría de los metabolitos secundarios volátiles que constituyen a los aceites esenciales de *R. officinalis*, obtenidos en esta investigación, han sido reportados en trabajos realizados anteriormente, para esta misma especie, siendo: 1,8-cineol, α -pineno, alcanfor, verbenona y borneol, los compuestos comúnmente reportados como mayoritarios [44, 49, 56-58].

Por otra parte, los compuestos: (1 α ,2 β ,5 α)-2,6,6-trimetilbicyclo[3.1.1]heptan-3-ona; 1,4,7-cicoundecatrieno-1,5,9,9-tetrametil-Z,Z,Z-; adipato de dioctilo y ftalato de diisooctilo, no son comunes en la constitución del aceite esencial de *R. officinalis*. Estos cuatro compuestos, obtenidos solo mediante la técnica de arrastre por vapor, conforman el 5,65% del mismo.

Se tienen referencias del adipato de dioctilo y ftalato de diisooctilo como constituyentes de aceites esenciales. El adipato de dioctilo es el componente mayoritario (39,84%) del aceite esencial de *Launaea resedifolia* (Asteraceae) y el ftalato de diisooctilo es el componente minoritario (2,90%) del aceite esencial de *Euphorbia hirta* (Euphorbiaceae) [59, 60].

A nivel global, se han diferenciado tres quimiotipos diferentes de *R. officinalis*, a saber: *cineoliferum* (alto porcentaje de 1,8-cineol, más del 35%), *camforiferum* (con más de un 20% en alcanfor) y *verbenoniferum* (con más de un 15% en verbenona). En el área mediterránea, el aceite esencial de plantas procedentes de Marruecos y Túnez posee un elevado contenido de 1,8-cineol, entre 38-55%. Mientras, que el procedente de España, posee un contenido menor, caracterizado por cantidades de α -pineno (18-26%), alcanfor (8-12%) y 1,8-cineol (16-25%) [61, 55].

En esta investigación, se obtuvieron dos quimiotipos diferentes de aceites esenciales de *R. officinalis*, a saber: *cineoliferum*, para el aceite esencial por hidrodestilación (49,95% de 1,8-cineol) y *verbenoniferum*, para el obtenido mediante arrastre por vapor (32,61% de L-verbenona).

Varios isómeros se encuentran presentes en la constitución de los aceites esenciales de *R. officinalis*, como lo son: borneol y L-borneol, α -pineno y β -pineno, α -terpineol y L- α -terpineol, y terpinen-4-ol; este último es isómero de los dos compuestos anteriores. Los isómeros con nomenclatura L, se encuentran constituyendo los aceites

esenciales obtenidos mediante arrastre por vapor. El terpinen-4-ol, se encuentra constituyendo ambos aceites esenciales. Los compuestos restantes: borneol, α -pineno, β -pineno y α -terpineol, se encuentran solo en el aceite esencial obtenido por hidrodestilación.

Se pueden encontrar en los aceites esenciales de pino, romero, lavanda y trementina, pinenos y terpenos bicíclicos que presentan isómeros ópticos o enantiómeros, pudiendo éstos presentar diferencias en su toxicidad y en su actividad biológica. El pineno posee dos isómeros activos constitucionales: α - y β -pineno. Ambos isómeros estructurales tienen enantiómeros conocidos en la naturaleza como (-)- α -pineno, (+)- α -pineno, (-)- β -pineno y (+)- β -pineno. La mezcla racémica se encuentra presente en algunos aceites esenciales, tales como el aceite de eucalipto [62-65].

Estos componentes químicos quirales pueden presentar propiedades semejantes o distintas. Por ejemplo, la carvona se utiliza como una esencia para perfumes, y cada enantiómero tiene un olor diferente: S(+)-carvona huele a menta verde y R(-) huele a alcaravea. Los enantiómeros del linalool muestran la misma actividad antimicrobiana contra varios microorganismos, en especial contra el hongo *Botrytis cinerea* y el protozooario *Plasmodium falciparum*. Los enantiómeros de la goniotalamina, de manera similar, inhiben el crecimiento contra especies de *Candida* [65-68].

La actividad antimicrobiana de los isómeros y enantiómeros del pineno ha sido evaluada en estudios recientes. Pruebas de difusión en agar demostraron que sólo los enantiómeros positivos (D) de los isómeros α - y β -pineno eran activos. La concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima microbicida (CMM) de estos monoterpenos fueron determinadas, confirmando que estos enantiómeros positivos mostraron actividad microbicida contra todos los hongos y las bacterias ensayadas con CMIs que van desde 117 a 4,150 $\mu\text{g/ml}$. Sin embargo, no se detectó actividad antimicrobiana con los enantiómeros negativos (L). El (+)- α -pineno y (+)- β -pineno resultan muy tóxicos para *Candida albicans*, con un efecto fungicida de 100% en 60 min. Por el contrario, el efecto bactericida se produjo después de 6 h con *Staphylococcus aureus* [65].

Los espectros de masas y las posibles rutas de fragmentación de los principales compuestos aislados de los aceites esenciales de *R. officinalis* obtenidos por destilación, se ilustran en las siguientes figuras.

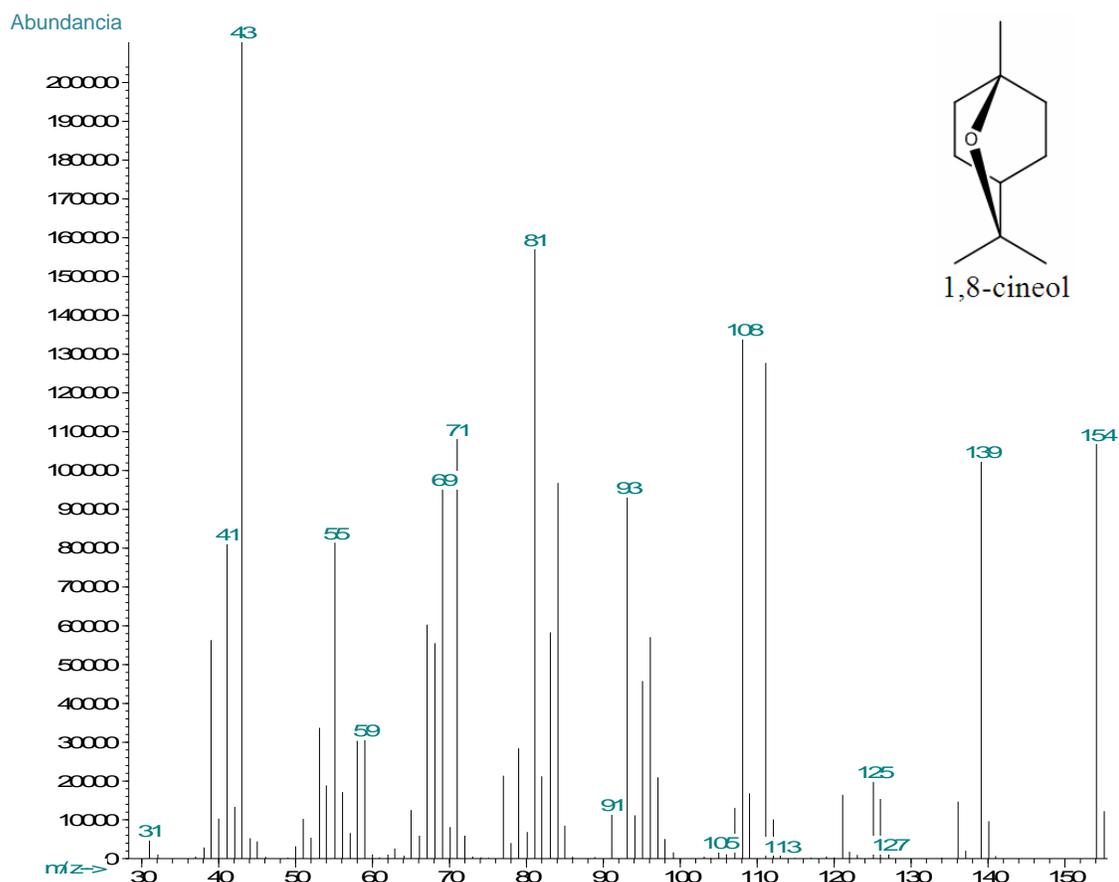


Figura 15. Espectro de masas del 1,8-cineol.

En las Figuras 15 y 16 se presentan, respectivamente, el espectro de masas y las posibles rutas de fragmentación del 1,8-cineol.

Este monoterpeno oxigenado representa el 49,95% del aceite esencial de *R. officinalis* obtenido por hidrodestilación. Encontrándose en menor cantidad (6,40%) en el aceite esencial extraído mediante arrastre por vapor. Su ion molecular $[M]^+$ fue detectado a un m/z 154 correspondiente a la fórmula molecular $C_{10}H_{18}O$, y los fragmentos correspondientes a los picos de los iones más abundantes se observan a m/z 43 $[M-C_8H_{15}]$ (pico base), m/z 81 $[M-C_4H_9O]$, m/z 93 $[M-C_3H_9O]$, y m/z 139 $[M-CH_3]$.

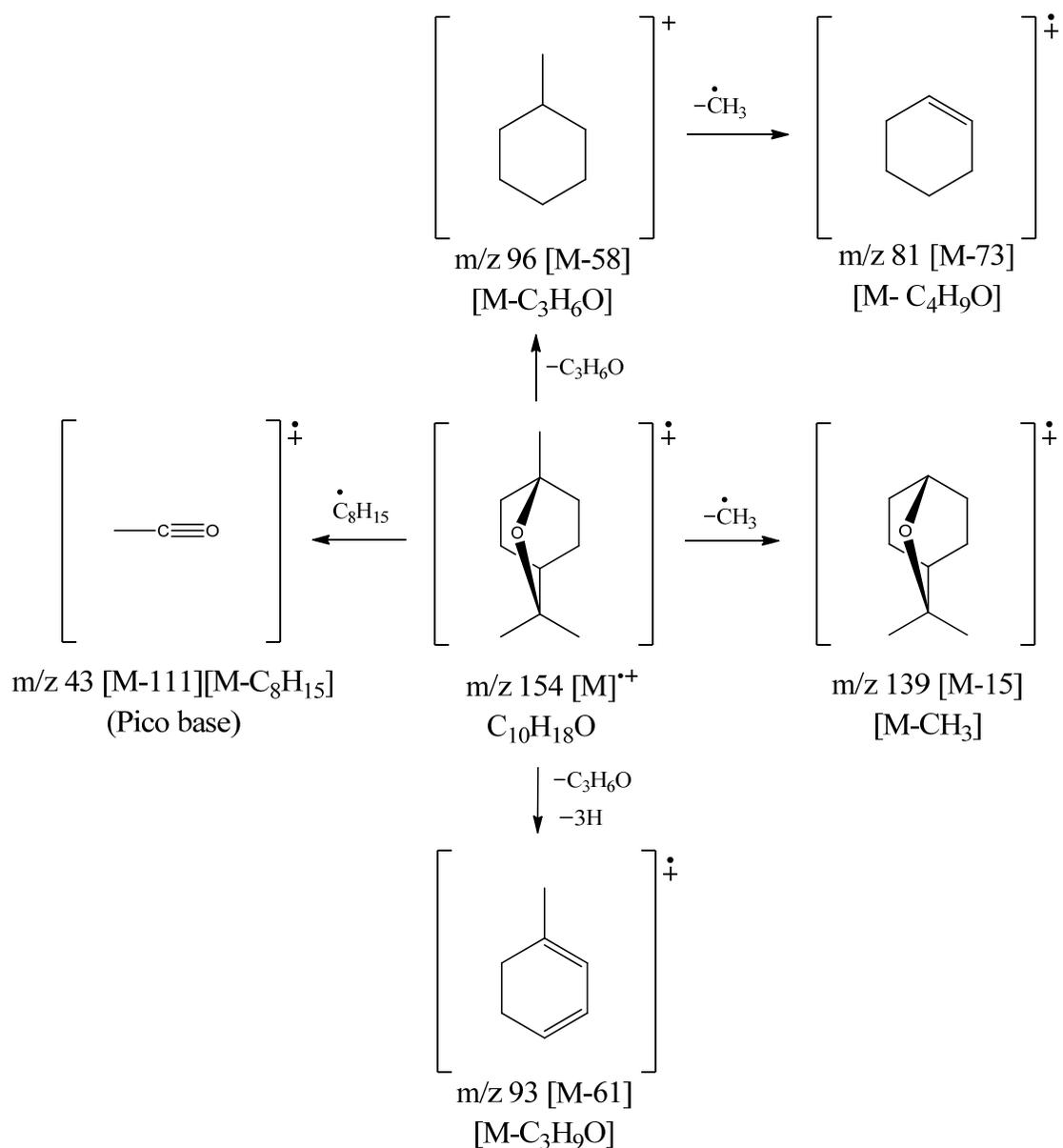


Figura 16. Posibles rutas de fragmentación del 1,8-cineol.

El ion molecular a m/z 154, en el 1,8-cineol, posee una señal intensa producto de su estabilidad. La fragmentación en los éteres y acetales tiende a ocurrir en el enlace C-C en posición α al átomo de oxígeno y en menor medida se da el quiebre en el enlace C=O. El ion pico base a m/z 43 se forma de la rotura de enlaces C-C en posiciones α al átomo de oxígeno, formando un grupo acetilo que origina al ion $[M-C_8H_{15}]$.

Las Figuras 17 y 18 presentan, respectivamente, el espectro de masas del α -pineno y su posible ruta de fragmentación. Este monoterpreno carbonado constituye el 11,66% del aceite esencial de *R. officinalis* obtenido por hidrodestilación. Su ion molecular corresponde a la señal m/z 136 y posee fórmula molecular $C_{10}H_{16}$.

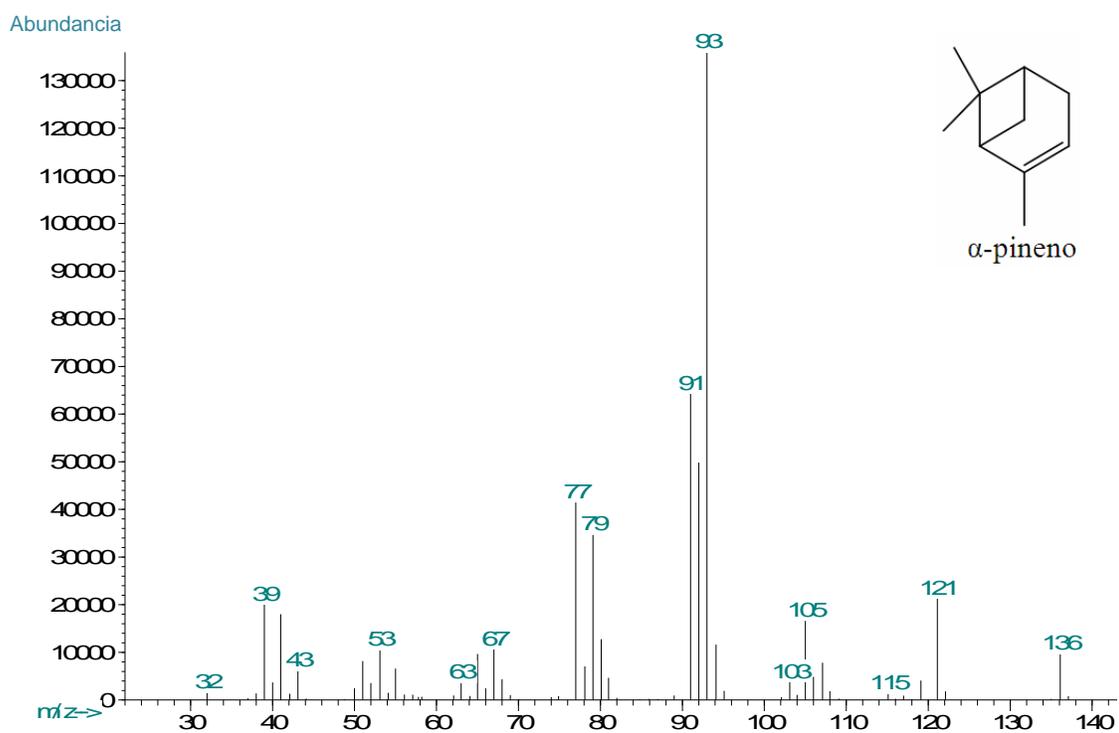


Figura 17. Espectro de masas del α -pineno.

Los fragmentos correspondientes a los picos de los iones más abundantes se muestran a m/z 77 [$M-C_4H_{11}$], m/z 91 [$M-C_3H_9$], m/z 93 [$M-C_3H_7$] (pico base) y m/z 121 [$M-CH_3$].

El ion molecular del α -pineno a m/z 136 se disocia para eliminar un radical isopropilo y formar el ion pico base en m/z 93. La presencia de dos enlaces dobles en el anillo, impulsa la ionización disociativa hacia la formación de un ciclo aromático por eliminación sucesiva de $2H\dot{\circ}$ y $CH_3\dot{\circ}$, formando los iones a m/z 77 y 91, ion tropilio. La estabilidad de los fragmentos a m/z 77 y 91 se deduce de la intensidad de las respectivas señales y la presencia de picos débiles en la región de masas bajas. La formación del ion a m/z 121, es producto de la pérdida del ion metilo en el ion molecular.

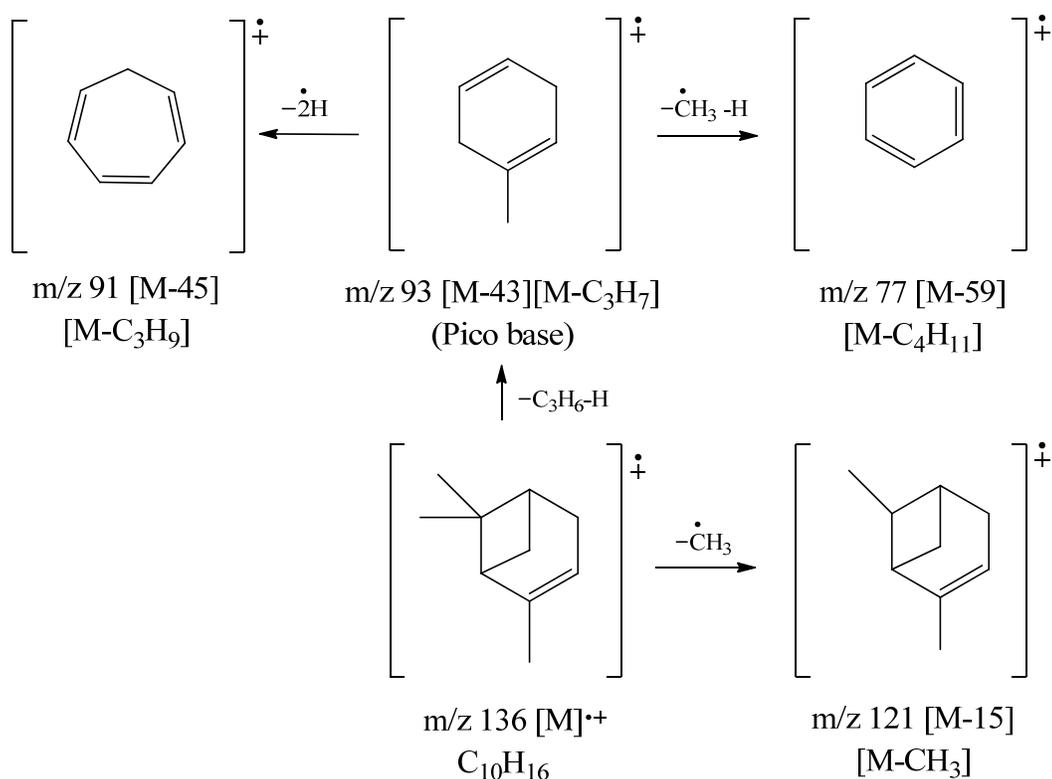


Figura 18. Posibles rutas de fragmentación del α -pineno.

Las Figura 19 y 20 presentan, respectivamente, el espectro de masas del D-alcanfor y su posible ruta de fragmentación.

Este monoterpreno oxigenado representa el 20,87% del aceite esencial de *R. officinalis* obtenido mediante arrastre por vapor. Encontrándose en menor cantidad (7,79%) en el aceite esencial extraído por hidrodestilación. Su ion molecular corresponde a la señal m/z 152, con una fórmula molecular $C_{10}H_{16}O$. Los fragmentos correspondientes a los picos de los iones más abundantes se aprecian a m/z 81 $[M-C_4H_7O]$, m/z 95 $[M-C_3H_5O]$ (pico base), m/z 108 $[M-C_2H_4O]$, m/z 110 $[M-C_2H_2O]$ y m/z 137 $[M-CH_3]$.

El ion molecular del D-alcanfor sufre reordenamientos, de esqueleto y de hidrógeno, descartando moléculas neutras; CH_2CHOH , C_2H_2O y CO , que conducen a la formación de los iones a m/z 108, 110 y 124, respectivamente. El ion $[M-C_2H_2O]$ a m/z 110 produce el ion pico base a m/z 95 por pérdida del ion metilo. El ion $[M-CO]$ a m/z 124, pierde $CH_3\dot{O}$ y radical propilo para formar los iones de cadenas alifáticas abiertas a

m/z 109 y 81, respectivamente. El ion $[M-15]$ a m/z 137, se forma directamente a partir del ion molecular por perdida de $CH_3\dot{O}$.

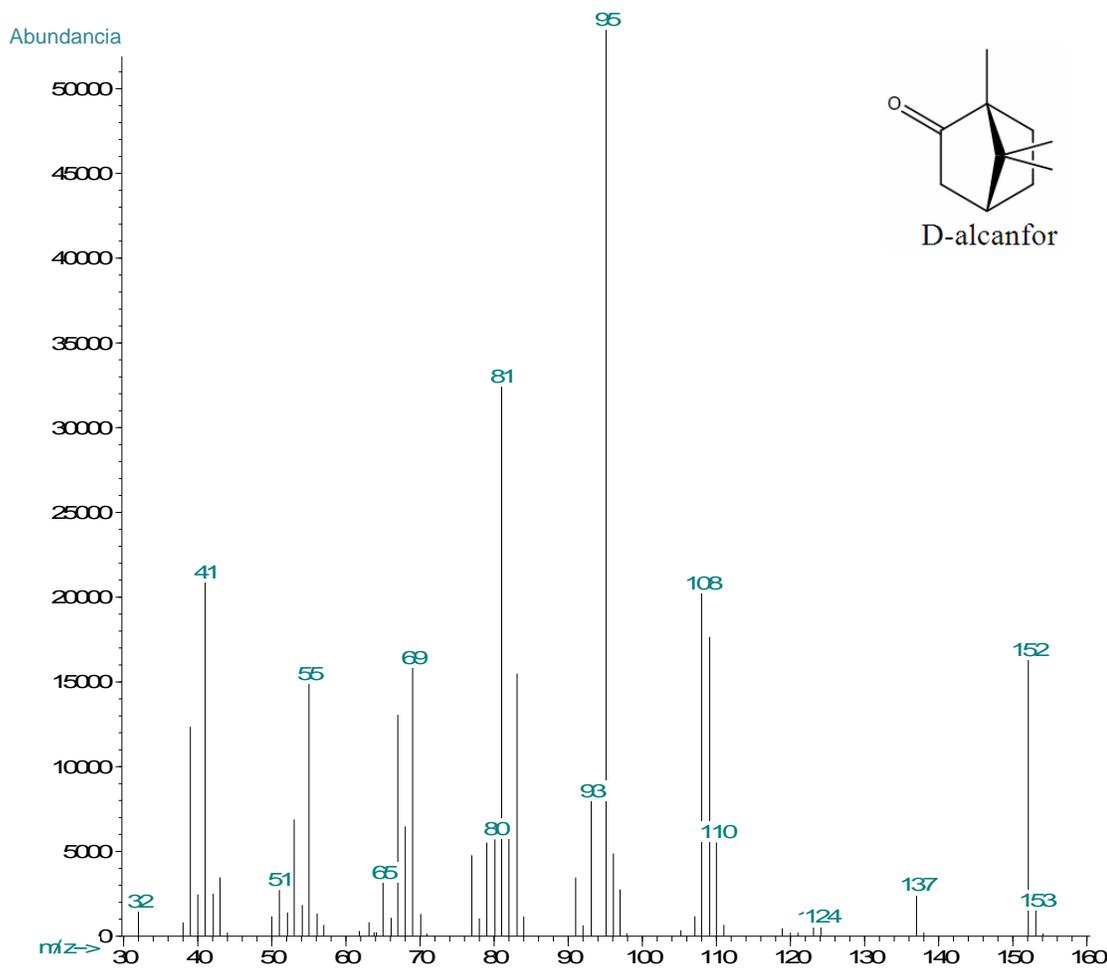


Figura 19. Espectro de masas del D-alcanfor.

En la Figura 21 se presenta el espectro de masas del L-borneol y en la Figura 22 su posible ruta de fragmentación.

Este monoterpene oxigenado conforma el 9,36% del aceite esencial de *R. officinalis* obtenido mediante arrastre por vapor. Su ion molecular fue detectado a un m/z 154 y corresponde a la fórmula molecular $C_{10}H_{18}O$. Los fragmentos correspondientes a los picos de los iones más abundantes se observan a m/z 95 $[M-C_3H_7O]$ (pico base), m/z 110 $[M-C_2H_4O]$, m/z 121 $[M-CH_5O]$ y m/z 139 $[M-CH_3]$. Su tiempo de retención promedio fue de 15,901 minutos.

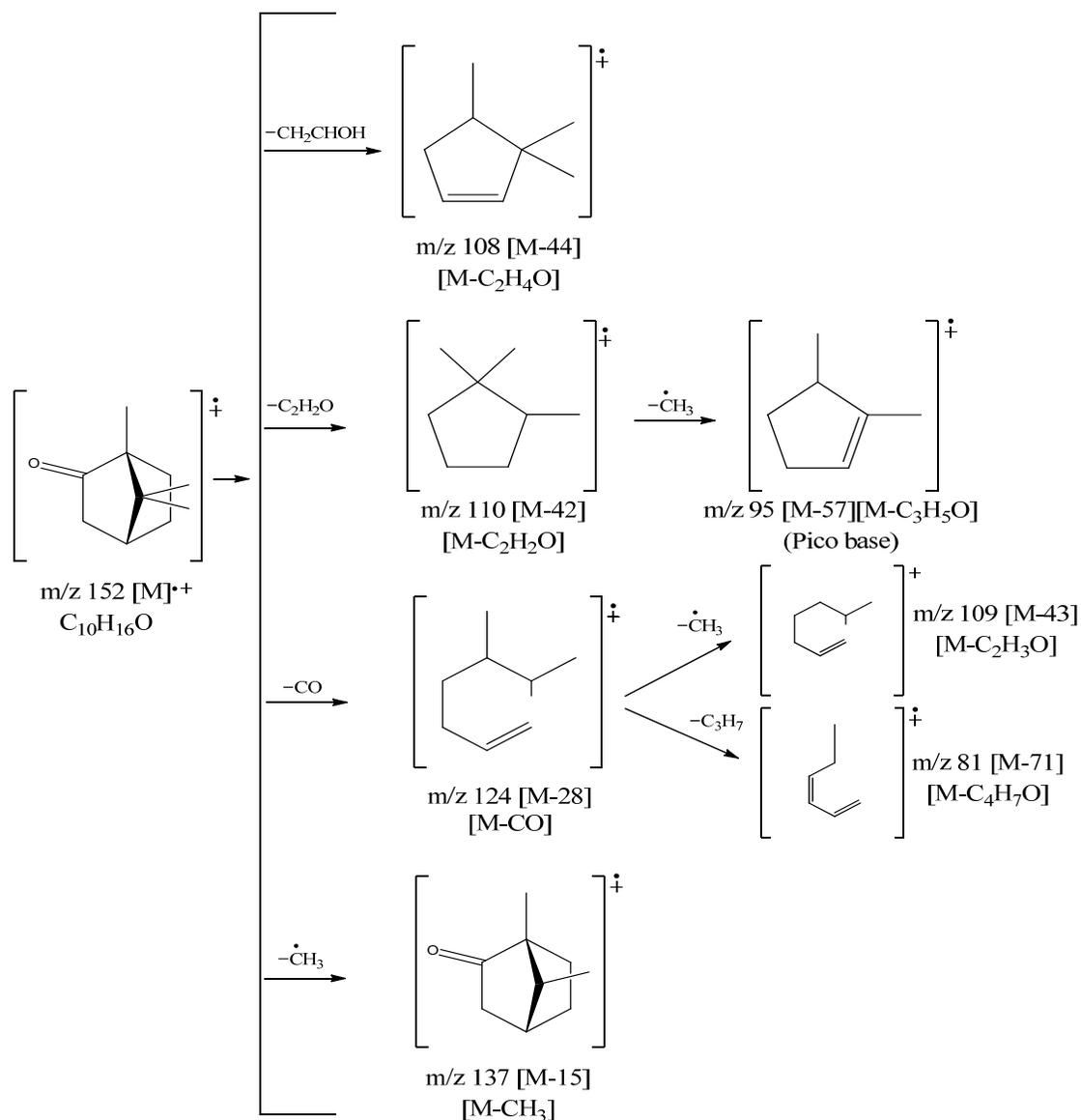


Figura 20. Posibles rutas de fragmentación del D-alcanfor.

En los alcoholes, el ion molecular no es visible o es muy pequeño, producto de su poca estabilidad y rápidas rupturas. La pérdida de agua, por parte del ion molecular del L-borneol, conduce a la formación del fragmento a m/z 136, del cual se originan: el pico base a m/z 95, por pérdidas sucesivas de ion metilo y acetileno, y el fragmento a m/z 110, consecuencia de un rearrreglo intramolecular, desprendiendo una molécula neutra de

acetileno. Por otra parte, el ión molecular pierde un ion metilo y una molécula de agua para formar el ion a m/z 139 y 121 respectivamente.

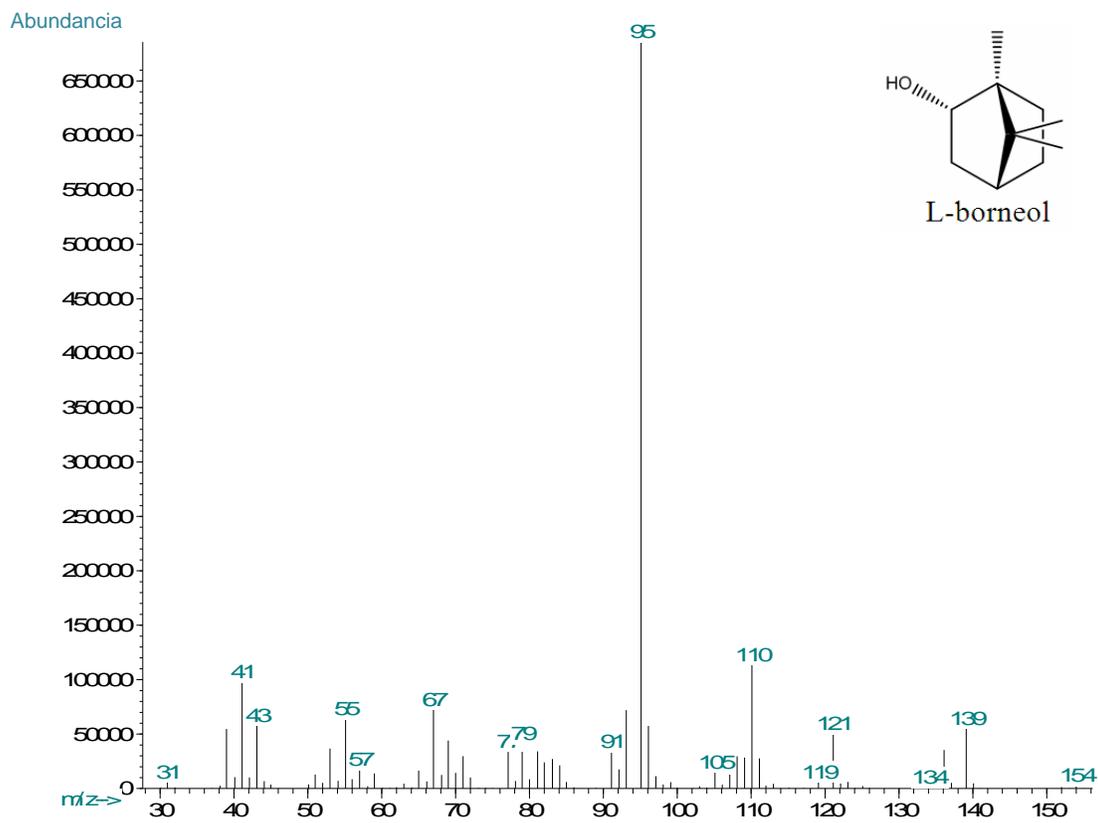


Figura 21. Espectro de masas del L-borneol.

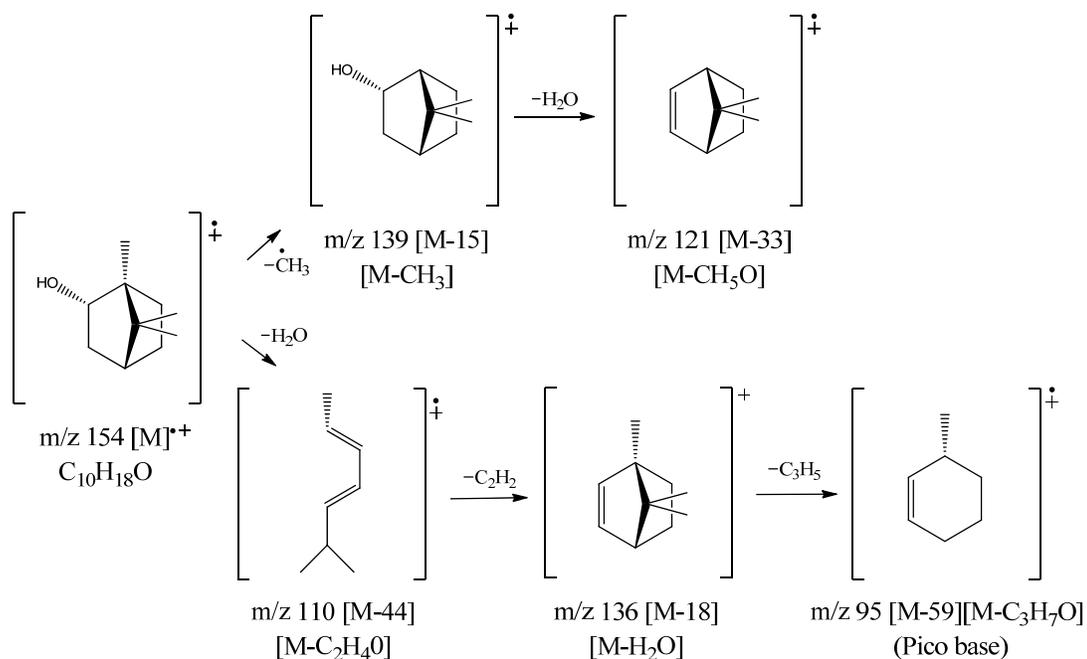


Figura 22. Posibles rutas de fragmentación del L-borneol.

Por último, se presentan en la Figura 23 y 24, respectivamente, el espectro de masas del L-verbenona y su posible ruta de fragmentación.

Este monoterpeno oxigenado es el 32,61% del aceite esencial de *R. officinalis* obtenido mediante arrastre por vapor. Encontrándose en menor cantidad (15,59%) en el aceite esencial extraído por hidrodestilación Su ion molecular fue detectado en el espectro a un m/z 150 y corresponde a la fórmula molecular $C_{10}H_{14}O$. Los fragmentos correspondientes a los picos de los iones más abundantes se observan a, m/z 67 [M- C_5H_7O], m/z 79 [M- C_4H_7O], m/z 95 [M- C_3H_3O], m/z 107 [M- C_2H_3O] (pico base), m/z 122 [M-CO] y m/z 135 m/z [M- CH_3].

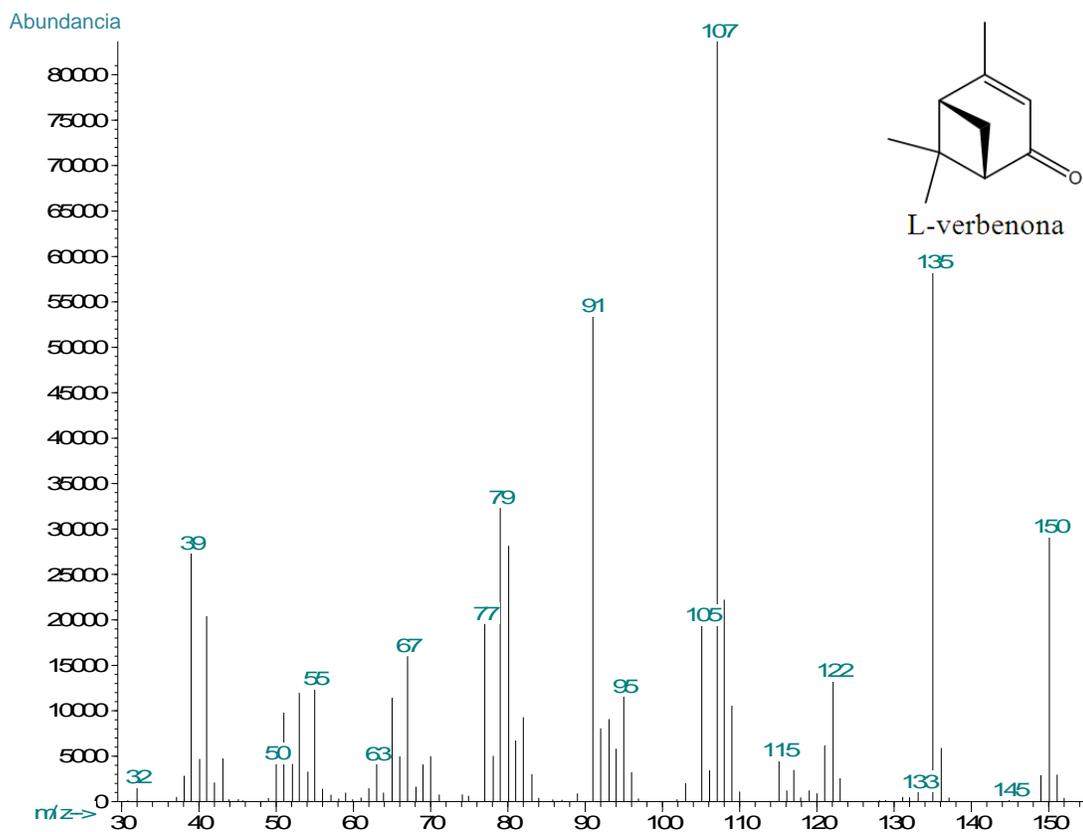


Figura 23. Espectro de masas del L-verbenona.

A partir del ion molecular en la señal m/z 150, se forman dos iones a: m/z 135 y 122, productos de las pérdidas del radical metilo y de CO respectivamente. Del ion a m/z 135, se forma el ion pico base a m/z 107 por la pérdida del CO. La pérdida de la molécula de CO es un rasgo característico de las cetonas.

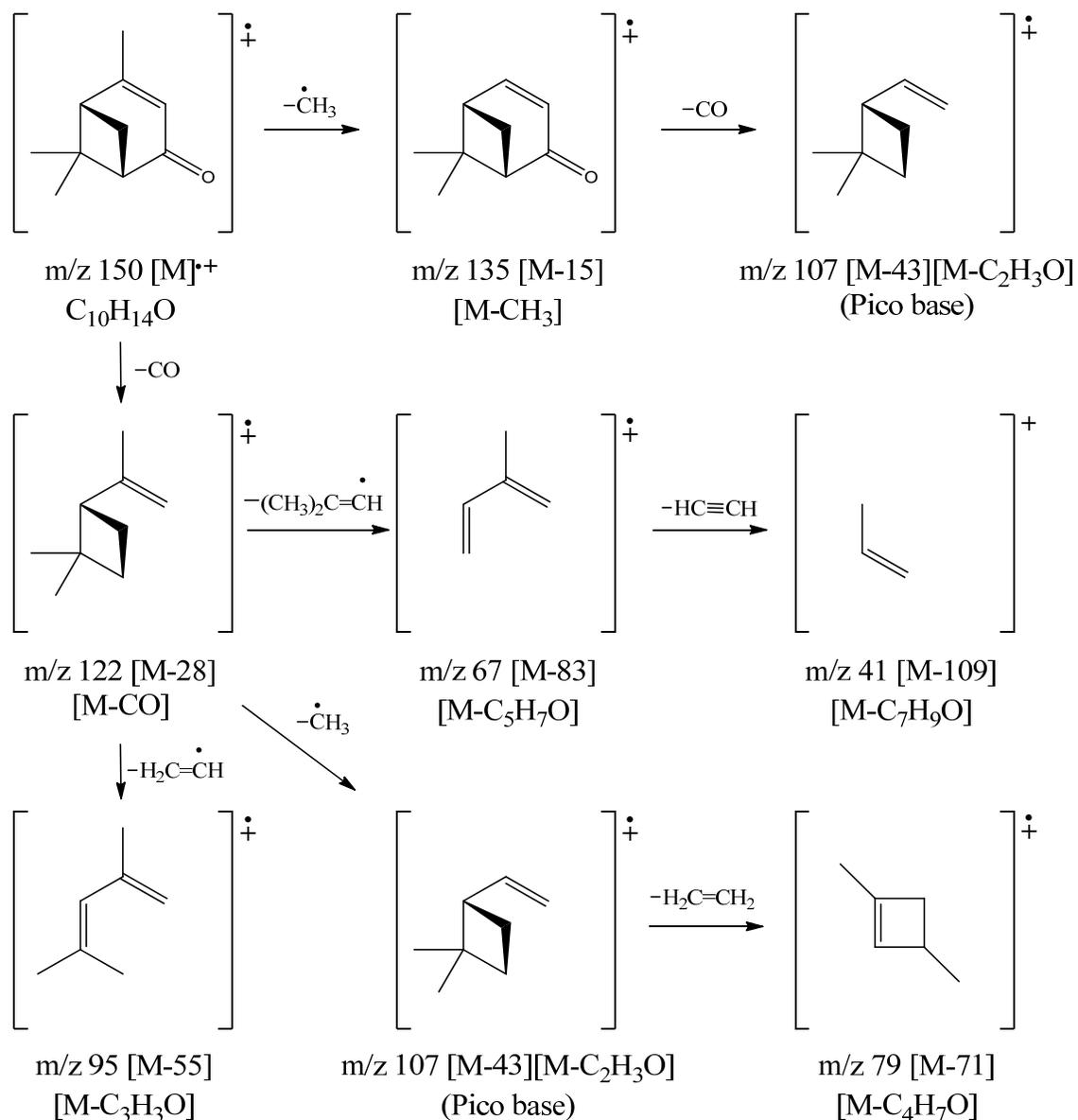


Figura 24. Posibles rutas de fragmentación del L-verbenona.

Los metabolitos secundarios volátiles obtenidos, tomando en cuenta que la muestra vegetal usada para ambas metodologías fue tomada de la misma reserva, varían según el método utilizado. Por lo que se puede deducir, que efectivamente, un cambio en la técnica de extracción conduce a la obtención de diferentes metabolitos secundarios y, en caso de que se obtengan metabolitos iguales, diferencia en sus rendimientos. Estos resultados alteran la actividad del aceite esencial a evaluar, en este caso, en la actividad antifúngica contra *Aspergillus flavus*.

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

La actividad antifúngica de los aceites esenciales de *R. officinalis* obtenidos por hidrodestilación y arrastre por vapor fue evaluada contra *A. flavus*. Los resultados se registran en la Tabla 6 y se ilustran en la Figura 25.

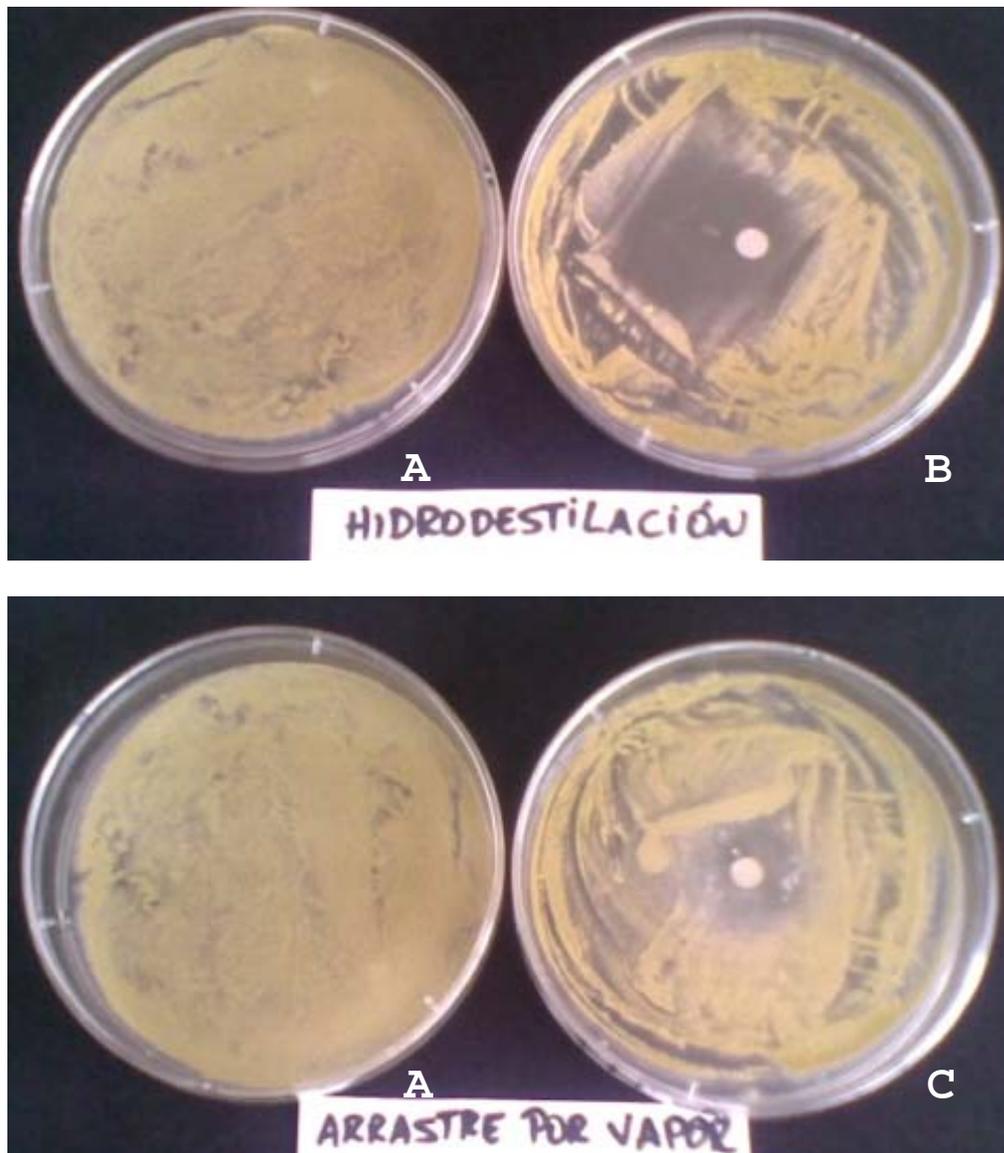
Tabla 6. Actividad antifúngica del aceite esencial (10 µl/disc) de *R. officinalis* contra *A. flavus*.

Hidrodestilación (M±DE)mm	Arrastre por vapor (M±DE)mm	Distribución t
24,33±0,58	13,00±1,73	10,75

M= Media, DE= Desviación Estándar. Los valores promedios de los rendimientos fueron analizados mediante el método estadístico de t-Student ($p<0,05$).

Los resultados obtenidos en las pruebas biológicas son estadísticamente significativos y mostraron que los aceites esenciales obtenidos por ambos métodos presentan actividad contra *A. flavus*. El aceite esencial extraído por hidrodestilación presentó un halo inhibitorio contra el hongo de 24,33 mm de diámetro, con una desviación estándar de 0,58 mm. Mientras que, para el aceite esencial obtenido mediante arrastre por vapor, se obtuvo un halo de 13,00 mm de diámetro, con una desviación estándar de 1,73 mm. Según estos resultados, se puede inferir, que el aceite esencial de *R. officinalis* podría utilizarse como un método alternativo para la descontaminación de alimentos afectados por micotoxinas, mediante la inhibición del crecimiento fúngico de sus cepas productoras.

El aceite esencial de *R. officinalis*, extraído por hidrodestilación, posee mayor actividad contra *A. flavus* en comparación con el aceite esencial obtenido mediante arrastre por vapor. Los aceites esenciales extraídos por hidrodestilación, presentan una actividad antifúngica contra *A. flavus* 53,43% superior a la actividad exhibida por los aceites esenciales extraídos mediante arrastre por vapor. Esto puede ser debido a que el aceite esencial obtenido por hidrodestilación posee mayor contenido de monoterpenos oxigenados, carbonados y no posee componentes trazas, siendo este el caso del obtenido mediante arrastre por vapor.



A: placa control con *A. flavus*. B: actividad antifúngica de 10 μ l/disc del aceite esencial de *R. officinalis* aislado por hidrodestilación. C: actividad antifúngica de 10 μ l/disc del aceite esencial de *R. officinalis* aislado por arrastre por vapor.

Figura 25. Inhibición del crecimiento fúngico de *A. flavus* provocado por los aceites esenciales de *R. officinalis*.

A pesar de que el aceite esencial obtenido por hidrodestilación presenta una menor cantidad de metabolitos secundarios volátiles (ocho metabolitos, representan el 100% del aceite esencial), en comparación a los obtenidos mediante arrastre por vapor

(trece metabolitos, representan el 88,59% del aceite esencial). Los primeros presentan mayor actividad contra *A. flavus*.

El principio de los métodos en agar, para la determinación de actividades antimicrobianas, se basa en la formación por difusión de un gradiente de concentración de la sustancia antimicrobiana alrededor del disco. La sensibilidad del microorganismo hacia esta sustancia estará indicada por el tamaño del diámetro del halo inhibitorio del crecimiento microbiano. El diámetro obtenido dependerá no sólo de la sensibilidad del microorganismo y la carga del disco, sino también del espesor, pH, temperatura y composición de la capa de agar, de la capacidad de difusión de la sustancia en ese medio, de la temperatura de incubación y de la velocidad de duplicación, tamaño y fase de crecimiento del microorganismo en estudio [69].

El medio de cultivo empleado para la siembra de *A. flavus* fue Agar Sabouraud Dextrosa. Este agar posee un pH de $5,6 \pm 0,2$ a 25°C , y se compone de: peptona micológica (10,00 g/l), dextrosa (40,00 g/l) y agar (15,00 g/l). El Agar Sabouraud es un medio diferencial, recomendado para el cultivo y crecimiento de hongos, y para que ocurra el crecimiento selectivo de hongos sobre bacterias en las muestras a analizar. Este medio tan solo depende de la reacción ácida. El medio que se usó le proporciona todos los nutrientes necesarios al hongo de manera tal que si se ve inhibido su crecimiento es solo por la acción de los aceites esenciales utilizados [70].

La actividad del aceite esencial de *Origanum vulgare* (Lamiaceae) ha sido evaluada frente a cepas de *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. fumigatus*, *A. terreus* y *A. ochraceus*. El aceite esencial tuvo un efecto inhibitorio significativo sobre todos los hongos ensayados. La CMI fue de $0,6 \mu\text{l/ml}$ para todos los hongos, mientras que la concentración mínima fungicida (CMF) estaba en el rango de $1,25$ - $2,5 \mu\text{l/ml}$. El crecimiento radial del micelio de *A. flavus* y *A. parasiticus* se inhibió por más de 14 días a $0,6$; $1,25$ y $2,5 \mu\text{l/ml}$ de aceite en medio sólido. La masa micelial de todos los hongos se inhibió más de 90% en $0,6$ y $0,3 \mu\text{l/ml}$ en medio líquido, mientras que dio un 100% a $1,25 \mu\text{L/mL}$. El aceite, en un intervalo de concentraciones de $0,6$ - $2,5 \mu\text{l/ml}$, fue eficaz en la inhibición de la viabilidad y la germinación de las esporas en un corto tiempo de exposición. Los principales cambios morfológicos causados por el aceite esencial al

hongo *A. parasiticus*, observado bajo microscopio de luz, fueron la ausencia de formación de conidios, fugas de citoplasma, pérdida de pigmentación, e interrumpió de su formación estructural. Estos resultados demostraron que el aceite esencial de *O. vulgare* produjo un efecto fungitóxico significativo existiendo la posibilidad de que pueda ser usado como compuesto antimoho en la conservación de alimentos [71].

La actividad antifúngica del aceite esencial de *R. officinalis* fue evaluada en trabajos anteriores contra cinco dermatomycetes y *C. albicans*. En general, el aceite esencial exhibió actividad notablemente fungistática y fungicida mostrando particularmente una CMI (μg) frente a *C. albicans* ($30,2\pm 0,3$), *Trichophyton tonsurans* de ($15,2\pm 0,3$), y *T. rubrum* ($15,0\pm 0,0$) indicando así su efecto antimicótico significativo [55].

Estudios donde se evaluaba la actividad antimicrobiana exhibida por varios aceites esenciales, se concluyó que posiblemente esta actividad se debía a la presencia de terpenoides en la constitución de los aceites; siguiendo en orden de actividad, los terpenoides que contienen grupos alcoholes, luego los que poseen aldehídos y por último los que tienen grupos cetónicos. Así mismo, algunos autores plantean que los aceites con un alto porcentaje de compuestos terpenoides del tipo fenólicos, poseen notables propiedades antimicrobianas [72].

La actividad antimicrobiana de especies pertenecientes a la familia Lamiaceae es de especial interés en esta línea investigativa. Un estudio por CG/EM realizado a los aceites esenciales de seis especies pertenecientes a la familia Lamiaceae mostró que estaban constituidos principalmente por: 1,8-cineol (29,2%) para *R. officinalis*; citronelal (20,5%) para *Melissa officinalis*; 1,8-cineol (27,4%) para *Salvia officinalis*; linalool (25,1%) para *Lavandula angustifolia*; timol (52,4%) para *Thymus vulgaris* y alcohol de pachulí (22,7%) para *Pogostemon cablin*. Este estudio también demostró, que la actividad biológica de todos estos aceites, para inhibir el crecimiento bacteriano, era alta y se atribuía a la gran cantidad de monoterpenos oxigenados que poseían [73].

Los aceites esenciales están constituidos por múltiples compuestos. Su actividad biológica (antibacteriana, microbiana o fúngica) es regulada por las posibles interacciones de sinergismo o antagonismo existentes entre sus componentes, como se

había mencionado anteriormente. Por lo general, los aceites esenciales poseen entre uno a tres componentes mayoritarios. Es en estos componentes, donde recae la responsabilidad de la posible actividad biológica que pueda tener el aceite esencial a evaluar. Desde este punto de vista, son los compuestos mayoritarios representantes del aceite esencial y su actividad biológica se verá reforzada (sinergismo) o disminuida (antagonismo) por los compuestos restantes que conforman al aceite mismo. En este trabajo, los componentes representativos, del aceite esencial de *R. officinalis*, tanto para el obtenido por hidrodestilación como para el obtenido mediante arrastre por vapor, son: 1,8-cineol, L-verbenona, D-alcanfor, L- borneol y α - pineno.

El 1,8-cineol se reportó como el constituyente mayoritario (0,56 mg/ml) del aceite esencial de *Callistemon Lancealatus* (Mirtaceae). En esta investigación, se evaluó la actividad antifúngica del 1,8-cineol, aislado, a una concentración de 0,918 mg/ml, contra especies como: *A. fumigatus*, *niger* y *oryzae*; *Fusarium nivale* y *F. oxysporum*; *Penicillium citrinum*, entre otras. Estas mismas especies fúngicas fueron usadas para la evaluación de la actividad del aceite esencial de *C. Lancealatus* a una concentración de 0,905 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ produciendo un 100% de inhibición del crecimiento de estos hongos. Este estudio demostró que la actividad antifúngica del 1,8-cineol aumentaba cuando se veía como componente dentro del aceite esencial de *C. Lancealatus*, que como compuesto aislado [74].

Un posible mecanismo que explica la actividad antifúngica que presentan algunos aceites esenciales, propone que los componentes de baja masa molecular y altamente lipófilos de los aceites esenciales, pasan fácilmente a través de las membranas celulares y causan la interrupción de la organización celular de los hongos, produciendo interferencia en reacciones enzimáticas de síntesis de su pared celular, afectando a la morfogénesis y al crecimiento de los mismos. También ocasionan rompimiento de las capas de polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos, afectando la permeabilidad de la membrana celular. Esto les confiere un carácter citotóxico elevado [34, 74, 75].

Se sabe, por estudios realizados, que el carvacrol y timol (componentes del aceite esencial del orégano) son capaces de desintegrar la membrana externa de las bacterias *Gram*-negativas, liberando los lipopolisacáridos e incrementando la permeabilidad de la

membrana, con pérdida paulatina de ATP, magnesio, iones de cloro, entre otros. Se ha encontrado también, que el eugenol (mayor componente del aceite de clavo) inhibe la producción de amilasa y proteasa de *Bacillus cereus*, posteriormente deteriora la pared celular y aumenta la lisis de la bacteria. Por otra parte, el ρ -cimeno, un precursor biológico del carvacrol, es hidrofóbico y causa plasmólisis del citoplasma, pero no es efectivo por sí sólo, ya que cuando es combinado con carvacrol, se ejerce de manera efectiva su acción, el ρ -cimeno se inserta en la bicapa lipídica y permite el transporte del carvacrol. [76].

El análisis de perfiles lipídicos por cromatografía de gas, y de la envoltura celular por microscopia electrónica, en estudios donde varias bacterias son tratadas con aceites esenciales, muestran un fuerte descenso de ácidos grasos insaturados y un incremento de ácidos grasos saturados. Estas alteraciones ultraestructurales ocurren en varios compartimientos de la membrana plasmática, citoplasma y núcleo [77].

En células eucariotas, los aceites esenciales pueden provocar la despolarización de las membranas mitocondriales, produciendo una disminución del potencial de membrana, afectando a los canales de Ca^{2+} y otros canales iónicos, reduciendo así, el gradiente de pH y afectando el bombeo de protones y las reservas de adenosin trifosfato (ATP). Estos cambios hacen que las membranas se vuelvan permeables, provocando la fuga de radicales de citocromo C, iones de Ca^{2+} y proteínas. Estos efectos sobre la membrana mitocondrial externa e interna pueden dar lugar a la muerte celular por apoptosis y necrosis [34].

El uso de la microscopía electrónica de barrido y de transmisión, ha revelado la aparición de alteraciones celulares y ultraestructurales en membranas, citoplasma y núcleo de células tratadas con aceites esenciales. Así mismo, análisis por cromatografía de gases/espectrometría de masas ha demostrado que los perfiles lipídicos de bacterias tratadas con aceites esenciales, mostraron un aumento de ácidos grasos saturados en detrimento de la concentración de ácidos grasos insaturados [34].

La aflatoxina B₁ puede ocasionar daños serios a las células de dos maneras distintas. En primer lugar, La aflatoxina B₁ (AFB₁; C₁₇H₁₂O₆) se transforma en AFB₁-8,9-óxido, que es un producto inestable, que causa aducciones con el ácido

desoxirribonucleico (ADN), principalmente en la posición N7 de la guanina y es responsable de sus efectos mutagénicos y carcinogénicos. En segundo lugar, todas las aflatoxinas, especialmente la aflatoxina B₁, producen especies oxigénicas reactivas (EOR), tales como; anión radical de superóxido, peróxido de hidrogeno e hidroperóxidos de lípidos. Aunque éstos no parecen interactuar con el ADN, son los precursores del radical hidroxilo. Los radicales hidroxilos interaccionan con el ADN produciendo mutaciones [78-81].

Diversos compuestos y extractos que contienen actividad inhibidora de la biosíntesis de la aflatoxina han sido reportados. La mayoría de estos inhibidores son de origen vegetal tales como fenilpropanoides, terpenoides y alcaloides. Dentro de estos grupos inhibidores se encuentran los aceites esenciales. Estos poseen actividad antimicrobiana frente a *A. parasiticus* y *A. flavus* [57, 81-85].

Los aceites esenciales pueden disminuir el efecto dañino producido por las aflatoxinas de dos maneras. En primer lugar, reducen la formación de aductos de ADN por las aflatoxinas. En segundo lugar, los aceites esenciales reaccionan con EOR que son producidas por las aflatoxinas. Los aceites esenciales protegen así a las células de este efecto perjudicial, ya que los radicales libres derivados del oxígeno son uno de los factores principales de la patogenia de muchos de los procesos patológicos como: cáncer, enfermedades inflamatorias, envejecimiento, entre otras [81].

Estudios muestran que los aceites esenciales de especias comunes, tales como nuez moscada, jengibre, cardamomo, apio, xanthoxylum, pimienta negra, comino y cilantro, suprimen la formación de aductos de ADN por aflatoxinas B₁ *in vitro* en una reacción microsomal mediada por enzimas. Todos estos aceites probaron inhibir la formación de aductos de manera muy significativa pero dependiente de la dosis. Estos resultados le confieren a estos aceites esenciales un potencial anticancerígeno. En otra investigación, se muestran los efectos de dos componentes del aceite de ajo, como lo son; el disulfuro de dialilo (DSDA) y el sulfuro de dialilo (SDA) en la disminución del daño en el ADN inducido por la aflatoxina B₁ en cultivos de hepatocitos primarios de rata. Cerca de 0,5 y 2 mM de SDA o 0,5 y 1 mM de DSDA disminuyó

significativamente el daño del ADN inducido por la aflatoxina B₁ en comparación con el control de la aflatoxina, según el ensayo de síntesis de ADN no programada [81, 86].

CONCLUSIONES

El aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, obtenido por hidrodestilación, presentó un olor intenso y penetrante, un color ligeramente amarillo y un rendimiento de 0,2% m/m. Mientras que, para el aceite esencial obtenido mediante arrastre por vapor, presentó un olor menos intenso, un color un tono más oscuro y un rendimiento de 0,1% m/m.

Los rendimientos calculados colocan a la hidrodestilación como la más apropiada para obtener mayor cantidad de aceite esencial. Su rendimiento se encuentra un 50% por encima del rendimiento obtenido mediante arrastre por vapor.

Los metabolitos secundarios volátiles que constituyen al aceite esencial de *R. officinalis* obtenido por hidrodestilación, pertenecen a los grupos: monoterpenos oxigenados (86,39%) y monoterpenos carbonados (13,61%). Siendo sus componentes mayoritarios: el 1,8-cineol (49,95%), la L-verbenona (15,59%) y el α -pineno (11,66%).

Los metabolitos secundarios volátiles que constituyen al aceite esencial de *R. officinalis* obtenido mediante arrastre por vapor, pertenecen a los grupos; monoterpenos oxigenados (76,52%), sesquiterpenos oxigenados (2,21%), sesquiterpenos carbonados (3,05%) y ésteres (6,81%). Siendo sus compuestos mayoritarios: la L-verbenona (32,61%), el D-alcanfor (20,87%) y el L-borneol (9,36%).

Se obtuvieron dos quimiotipos diferentes de aceites esenciales de *R. officinalis*, a saber: *cineoliferum*, para el aceite esencial por hidrodestilación (49,95% de 1,8-cineol) y *verbenoniferum*, para el obtenido mediante arrastre por vapor (32,61% de L-verbenona).

Los aceites esenciales de *R. officinalis* mostraron actividad contra el *Aspergillus flavus*. Los aceites esenciales presentaron un halo de inhibición de 24,33 y 13,00 mm de diámetro para las técnicas de hidrodestilación y arrastre por vapor, respectivamente

El aceite esencial de *R. officinalis* extraído por hidrodestilación, posee una actividad contra *A. flavus* 53,43% superior en comparación con la actividad exhibida por el aceite esencial obtenido mediante arrastre por vapor.

La actividad antifúngica, notablemente superior, del aceite esencial de *R. officinalis* obtenido por hidrodestilación, pudo deberse a que este posee mayor contenido de monoterpenos oxigenados, carbonados y a que no posee componentes trazas.

El aceite esencial de *R. officinalis* podría representar un método alternativo para la descontaminación de alimentos afectados por micotoxinas.

RECOMENDACIONES

El material vegetal a utilizar, para este tipo de investigaciones, debe estar en óptimas condiciones; fresco, íntegro y recolectado en un tiempo adecuado.

Para obtener una mayor diversidad de metabolitos secundarios volátiles existentes en una muestra vegetal, se debe considerar la aplicación de varios métodos extractivos. La obtención de este tipo de información enriquece la data que se tenga sobre los productos naturales y se convierte en material para futuras investigaciones.

Para discernir entre la efectividad del aceite esencial y de sus compuestos constituyentes, referentes a su actividad antimicrobiana, se deben hacer pruebas biológicas tanto al aceite esencial como a sus componentes constituyentes de manera individual y de preferencia a los componentes mayoritarios.

Se debe tener en cuenta, que la presencia de las micotoxinas en los alimentos puede ser individual o simultánea, esto quiere decir que puede existir, en un mismo sustrato, más de una micotoxina. Esto puede provocar diversos efectos tóxicos en el organismo.

La eficacia de los aceites esenciales contra aflatoxinas, producidas por hongos pertenecientes a cepas toxicogénicas, deben ser determinadas mediante la aplicación de metodologías pertinentes, como bien pudiera ser, el método de enzima inmunoensayo competitivo (ELISA).

BIBLIOGRAFÍA

1. Rodríguez, R. 2009. Evaluación de la micoflora y biocontrol de aflatoxinas en alimentos concentrados para pollos de engorde. Tesis doctoral. Universidad de Oriente, Venezuela.
2. Mendoza, D.; Pérez, M.; Gómez, C.; Molero, G.; Novoa, E.; Rincón, H. y Ascanio, E. 2006. Efectos del alimento contaminado con aflatoxina B₁ (0,07 mg/kg) Sobre la morfología hepática y actividad enzimática sérica (AST y ALT) en pollos de engorde. *Rev. Cientif. FCV-LUZ*, 1: 39-47.
3. González, E.; Centeno, S. y Araque, Y. 2009. Actividad antifúngica de *Burkholderia cepacia* aislada de maíz amarillo (*Zea mays* L.) bajo diferentes condiciones de cultivo. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.*, 29:103-109.
4. Mutungi, C.; Lamuka, P.; Arimi, S.; Gathumbi, J. y Onyango, C. 2008. The fate of aflatoxins during processing of maize into muthokoi. A traditional Kenyan food. *Food Control*, 19: 714-721.
5. Binder, E.; Tan, L.; Chin, L.; Handl, J. y Richard, J. 2007. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities feeds and feed ingredients. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 137: 265-282.
6. Gimeno, A. y Martins, M. 2011. *Micotoxinas y micotoxicosis en animales y humanos*. Tercera edición. Special Nutrients, inc. Estados Unidos.
7. Arispe, I. y Tapia, M. 2007. Inocuidad y calidad: requisitos indispensables para la protección de la salud de los consumidores. *Agroalimentaria*, 24:105-118.
8. Mercado, C. 2007. Los ámbitos normativos, la gestión de la calidad y la inocuidad alimentaria: una visión integral. *Agroalimentaria*, 24: 119-1331.
9. Mejía, L.; Alvarado, R.; Martínez, S. y Dorta, B. 2008. Inhibition of *Aspergillus flavus* growth and aflatoxina B₁ production in stored maize grains exposed to volatile compounds of *Trichoderma harzianum*. *Interciencia*, 33: 219-222.
10. Fernández, G.; Negrón, G.; Isea, G. y Sánchez, E. 2000. Reporte de análisis cuantitativo de aflatoxinas por el método ELISA en muestras de materias primas de alimento balanceado para aves provenientes de una planta ubicada en el municipio Mara del estado Zulia, Venezuela. *Rev. Cient. Vet. FCV-LUZ.*, 10: 65-69.
11. Martínez, A. 1991. Contribución al estudio de la flora fúngica, su capacidad toxicogénica y niveles de aflatoxinas en cereales y oleaginosas cultivadas en Venezuela. Trabajo de Ascenso. Universidad Central de Venezuela, Venezuela.

12. Mazzani, C.; Luzón, O.; González, N. y Quijada, P. 1995. Efecto del Shield-Na Plus (propionato de sodio y sorbato de potasio) sobre el crecimiento y la esporulación *in vitro* de cinco especies de hongos toxigénicos en Venezuela. *Fitopatol. Venez.*, 8: 33-36.
13. Lemus, D.; Maniscalchi, M.; Vera, R.; De Freitas, J. y Sangermano, A. 2007. Presencia de aflatoxinas y hongos aflatoxigénicos en maíz amarillo tipo duro clase I de la zona nororiental de Venezuela. *Saber UDO*, 19: 43-49.
14. Bullerman, L. y Bianchini, A. 2007. Stability of mycotoxins during food processing. *Int. J. Food Microbiol.*, 119: 140-146.
15. Bennett, J. y Klich, M. 2003. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.*, 16: 497-516.
16. Hedayati, M.; Pasqualotto, A.; Warn, P.; Bowyer, P. y Denning, D. 2007. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology*, 153: 1677-1692.
17. Requena, F.; Saume, E. y León, A. 2005. Micotoxinas: riesgos y prevención. *Zootecnica Trop.*, 23: 393-410.
18. FAO/OMS (ed). 2004. 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. Italia.
19. COVENIN (ed). 1983. Alimentos completos para aves. Comisión Venezolana de Normas Industriales, 1881-83. Venezuela.
20. COVENIN (ed). 1987. Maíz para uso industrial. Comisión Venezolana de Normas Industriales, 1935-87. Venezuela.
21. FAO/OIEA (ed). 2003. Manual sobre la aplicación del sistema de Análisis de Peligro y Puntos Críticos de Control (APPCC) en la prevención y control de las micotoxinas. Estudio FAO Alimentación y Nutrición N° 73. Italia.
22. Piva, G.; Galvano, F.; Pietri, A. y Piva, A. 1995. Detoxification methods of aflatoxins. A review. *Nutr. Res.*, 15: 767-776.
23. Gowda, N.; Malathi, V. y Suganthi, R. 2004. Effect of some chemical and herbal compounds growth of *Aspergillus parasiticus* and aflatoxin production. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 116: 281-291.

24. Cleveland, T.; Dowd, P.; Desjardins, A.; Bhatnagar, D. y Cotty, P. 2003. United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service research on pre-harvest prevention of mycotoxins and mycotoxigenic fungi in US crops. *Pest. Manag. Sci.*, 59: 629-642.
25. Alberts, J.; Engelbrecht, Y.; Steyn, P. Holzapfel, W. y Van Zyl, W. 2006. Biological degradation of aflatoxin B₁ by *Rhodococcus erythropolis* cultures. *Int. J. Food Microbiol.*, 109: 121-126.
26. Wyatt, R. 1991. Absorción de las micotoxinas de la dieta mediante compuestos químicos. *Avicult. Prof.*, 8: 151-153.
27. Soriano, J. (ed). 2007. *Micotoxinas en alimentos*. Ediciones Díaz-Santos. España.
28. Bozin, B.; Mimica, N.; Simin, N. y Anackov, G. 2006. Characterization of the volatile composition of essential of some *Lamiaceae* spices and the antimicrobial and antioxidant activities of entire oils. *J. Agric. Food Chem.*, 54: 1822-1828.
29. Kabak, B.; Dobson, A. y Var, I. 2006. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: A review. *Crit. Rev. Food. Nutr.*, 46: 593-619.
30. Monsalve L. 2007. Comparación de la composición química de los aceites esenciales de las plantas *Lippia alba* (Mill) N.E Brown, provenientes de diferentes regiones de Colombia. Tesis de Grado. Universidad Industrial de Santander, Colombia.
31. Wade, L. 2007. *Química Orgánica*. Quinta edición. Pearson educacional. España
32. Marcano, D. y Hasegawa, M. 2002. *Fitoquímica orgánica*. Segunda edición. Litopar. Universidad Central de Venezuela. Caracas.
33. Moreno, S.; Crescente, O.; y Quintero, M. 2006. Composición química y actividad tóxica del aceite esencial de *Simsia pubescens* Triana. *Interciencia*, 31: 745-747.
34. Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D. y Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils. *Food Chem. Toxicol.*, 46: 446-47.
35. Archila, J. 2008. Estudio de los metabolitos secundarios de los extractos y aceites esenciales de flores, hojas y tallos de ylang-ylang, y determinación de los ácidos grasos en sus semillas. Tesis de Grado. Universidad Industrial de Santander, Colombia.

36. Cassela, E.; Varga, R.; Martínez, N.; Lorenzo, D. y Del la casa, E. 2009. Steam distillation modeling for essential oil extraction process. *Ind. Crops Prod.*, 29: 171-176.
37. Bousbia, N.; Vian, M.; Ferhat, M.; Petitcolas, E.; Meklati, B. y Chemat, F. 2009. Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. *Food Chem.*, 114: 355-362.
38. Bensebia, O.; Barthb, D.; Bensebia, B. y Dahmania, A. 2009. Supercritical CO₂ extraction of rosemary: Effect of extraction parameters and modeling. *J. Supercrit. Fluids.*, 49: 161-166.
39. Masango, P. 2005. Cleaner production of essential oils by steam distillation. *J. Clean. Prod.*, 13: 833-839.
40. Cerpa, M. 2007. Hidrodestilación de aceites esenciales: Modelado y caracterización. Tesis doctoral. Universidad de Valladolid, España.
41. Guenther, E. (ed). 1948. *The essential oils. History-origin in plants production-analysis*. D. Van Nostrand Company, Inc. Estados Unidos.
42. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (ed). 2003. *Essential oils: properties and uses*. Segunda Edición. Reino Unido.
43. Celis, C. 2007. Estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de *Lippia alba*, *Lippia origanoides* y *Phyla (Lippia) dulcis*, Especies de la familia Verbenaceae. Tesis de grado. Universidad Industrial de Santander, Colombia.
44. Hussain, A. 2009. Characterization and biological activities of essential oils of some species of Lamiaceae. Tesis doctoral. Universidad de agricultura, Pakistán.
45. Dzamic, A.; Sokovic, M.; Ristic, M.; Novakovic, M.; Grujic, S.; Tesevic, V. y Marin, P. 2010. Antifungal and antioxidant activity of *Mentha longifolia* L. Hudson (Lamiaceae) essential oil. *Botanica Servica*, 34: 57-61.
46. Portillo, M.; Viramontes, S.; Muñoz, L.; Gastélum M. y Nevárez, G. 2005. Antifungal activity of Mexican oregano. *J. Food Prot.*, 68: 2713-2717.
47. Pina, C.; Goncalves, A.; Pinto, E.; Costa, S.; Tavares, C.; Salgueiro, L.; Cavaleiro, C.; Goncalves, M. y Martínez, J. 2004. Antifungal activity of Thymus oils and their major compounds. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 18: 73-78.

48. Fraternali, D.; Giamperi, L.; Bucchini, A.; Ricci, D.; Epifano, F.; Genovese, S. y Curini, M. 2005. Composition and Antifungal Activity of Essential Oil of *Salvia sclarea* from Italy. *Chem. Nat. Comp.*, 41: 604-606.
49. Atti, A.; Rossato, M.; Fernández, G.; Duarte, L.; Rech, J.; Pansera, M.; Agostini, F.; Serafini, L. y Moyna, M. 2005. Physico-chemical Evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oils. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 48: 1035-1039.
50. Gachkar, L.; Yadegari, D.; Rezaei, M.; Taghizadeh, M.; Astaneh, S. y Rasooli, I. 2007. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chem.*, 102: 898-904.
51. Sacchetti, G.; Maietti, S.; Muzzoli, M.; Scaglianti, M.; Manfredini, S.; Radice, M. y Bruni, R. 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem.*, 91: 621-632.
52. Okoh, O.; Sadimenko, A. y Afolayan, A. 2010. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. *Food Chemistry*, 120: 308-312.
53. Souza, E.; Lima, E.; Freire, K. y Paiva, C. 2005. Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of various isolated fungi from foods. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 48: 245-250.
54. Okoh, O. 2010. Chemical transformations and phytochemical studies of bioactive components from extracts of *Rosmarinus officinalis* L. Tesis doctoral. University of Fort Hare. Sudáfrica.
55. Bozin, B.; Mimica, N.; Samojlik, I. y Jovin, E. 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceas) essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, 55: 7879-7885.
56. Santos, P. y Fernández, M. 2001. Organ and season dependent variation in the essential oil composition of *Salvia officinalis* L. Cultivated at two different sites *J. Agric. Food Chem.*, 49: 2908-2916.

57. Rasooli, I.; Fakoor, M.; Yadegarinia, D.; Gachkar, L.; Allameh, A. y Rezaei, M. 2008. Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. *Int. J. Food Microbiol.*, 29: 135-139.
58. Jalali, M.; Moazenia, R. y Sereshtib, H. 2011. Analysis of Iranian rosemary essential oil: application of gas chromatography mass spectrometry combined with chemometrics. *J. Chromatogr. A*, 1218: 2569-2576.
59. Zellagui, A.; Gherrafi, N.; Ladjel, S. y Hameurlaine, S. 2012. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oils from *Launaea resedifolia* L. *Org. and Med. Chem. Lett.*, 2: 2.
60. Ogunlesi, M.; Okiei, W.; Ofor, E. y Osibote, A. 2009. Analysis of the essential oil from the dried leaves of *Euphorbia hirta* Linn (Euphorbiaceae), a potential medication for asthma. *Afri. J. Biotech.*, 8: 7042-7050.
61. Muños, L. 2002. Plantas medicinales españolas. *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae) (Romero). *Ediciones Universidad de Salamanca, Stud. Bot.*, 21: 105-118.
62. Solomons, T. y Fryhle, C. 2009. *Química Orgánica*. Novena edición. LTC. Brasil.
63. Tabanca, N.; Demirci, B.; Crockett, S.; Baser, K. y Wedge, D. 2007. Chemical composition and antifungal activity of *Arnica longifolia*, *Aster hesperius*, and *Chrysothamnus nauseosus* essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, 55: 8430-8435.
64. Yang, Z.; Wu, N.; Zu, Y. y Fu, Y. 2011. Comparative anti-infectious bronchitis virus (IBV) activity of (-)-pinene: Effect on nucleocapsid (N) protein. *Molecules*, 16: 1044-1054.
65. Rivas, A.; Monteiro, P.; Barros, M.; Machado, D.; Sales, C. y Sales, D. 2012. Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers. *Molecules*, 17: 6305-6316.
66. Paiva, A. 2006. Fenómeno da quiralidade: Base da Esterioquímica. *Química*, 56: 56-61.

67. Özek, T.; Tabanca, N.; Demirci, F.; Wedge, D. y Baser, K. 2010. Enantiomeric distribution of some linalool containing essential oils and their biological activities. *Rec. Nat. Prod.*, 4: 180-192.
68. Martins, C.; de Resende, M.; da Silva, D.; Magalhães, T.; Modolo, L.; Pilli, R. y de Fátima, A. 2009. *In vitro* studies of anticandidal activity of goniotalamin enantiomers. *J. Appl. Microbiol.*, 107: 1279-1286.
69. Shiva, C. 2007. Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona, España.
70. García, V. 2004. *Introducción a la microbiología*. Segunda edición. Editorial Universidad Estatal a Distancia (EUNED). Costa Rica.
71. Mitchell, T.; Stamford, T.; Souza, E.; Lima, E. y Carmo, E. 2010. *Origanum vulgare* L. essential oil as inhibitor of potentially toxigenic *Aspergilli*. *Cienc. Tecnol. Aliment., Campinas*, 30:755-760.
72. Sánchez, Y.; Pino, O.; Correa, T.; Naranjo, E. y Iglesia, A. 2009. Estudio químico y microbiológico del aceite esencial de *Piper auritum* Kunth (Caisimón de anís). *Rev. Protección Veg. Vol. 24*: 39-46.
73. Hussain, A.; Anwar, F.; Nigam, P.; Sarker, S.; Moore, J.; Rao, J. y Mazumdar, A. 2011. Antibacterial activity of some Lamiaceae essential oils using resazurin as an indicator of cell growth. *LWT - Food Sci. Tech.* 44: 1199-1206.
74. Shukla, R.; Singh, P.; Prakash, B. y Dubey, N. 2012. Antifungal, aflatoxin inhibition and antioxidant activity of *Callistemon lanceolatus* (Sm.) Sweet essential oil and its major component 1,8-cineole against fungal isolates from chickpea seeds. *Food Control* 25: 27-33.
75. Sindhu, S.; Chempakam, B.; Leela, N. y Bhai, R. 2011. Chemoprevention by essential oil of turmeric leaves (*Curcuma longa* L.) on the growth of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production. *Food Chem. Toxicol.*, 49: 1188-1192.
76. Betancourt, L. 2012. Evaluación de aceites esenciales de orégano en la dieta de pollos de engorde. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Colombia, Colombia.

77. Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int. J. Food Microbiol.*, 94: 223-253.
78. Wang, J. y Groopman, J. 1999. DNA damage by mycotoxins. *Mutat. Res.*, 424: 167-181.
79. Denissenko, M.; Cahill, J.; Kondriakova, T.; Gerber, N. y Pfeifer, G. 1999. Quantitation and mapping of aflatoxin B₁-induced DNA damage in genomic DNA using aflatoxin B₁- 8, 9-epoxide and microsomal activation systems. *Mutat. Res.*, 425: 205-211.
80. Halliwell, B. y Gutteridge, J. 1999. *Oxidative stress: adaptation damage, repair and death, in: Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press. Estados Unidos.
81. Alpsy, L. 2010. Inhibitory effect of essential oil on aflatoxin activities. *Afr. J. Biotechnol.*, 9: 2474-2481.
82. Holmes, R.; Boston, R. y Payne, G. 2008. Diverse inhibitors of aflatoxin biosynthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 78: 559-572.
83. Rasoli, I. y Owlia, P. 2005. Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. *Phytochemistry*, 66: 2851-2856.
84. Kumar, R.; Dubey, N.; Tiwari, O.; Tripathi, Y. y Sinha, K. 2007. Evaluation of some essential oils as botanical fungitoxicants for the protection of stored food commodities from fungal infestation. *J. Sci. Food Agric.*, 87: 1737-1742.
85. Bluma, R. y Etcheverry, M. 2008. Application of essential oils in maize grain: Impact on *Aspergillus* section Flavi growth parameters and aflatoxin accumulation. *Food Microbiol.*, 25: 324-334.
86. Shenn, L.; Wu, C.; Lii, C. y Tsai, S. 2001. Effect of diallyl sulfide and diallyl disulfide, the active principles of garlic, on the aflatoxin B₁- induced DNA damage in primary rat hepatocytes. *Toxicol. Lett.*, 122: 45-52.

HOJAS DE METADATOS

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

Título	Composición química y actividad antifúngica de los aceites esenciales de <i>Rosmarinus officinalis</i> (Lamiaceae) contra <i>Aspergillus flavus</i> .
---------------	---

Autor

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Lemus L, Marinés del V.	CVLAC	18.211.295
	e-mail	marineslemus@gmail.com

Palabras o frases claves:

Aceites esenciales
<i>Rosmarinus officinalis</i>
<i>Aspergillus flavus</i>

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Química
	Química de los Productos Naturales
	Microbiología de los Alimentos

Resumen (abstract):

Se evaluaron y compararon de acuerdo al rendimiento, composición química y actividad biológica, a los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* obtenidos mediante hidrodestilación (HD) y arrastre por vapor (AV). El aceite esencial de *R. officinalis*, obtenido por HD, presentó un olor intenso y penetrante, y un color ligeramente amarillo. Su rendimiento fue de 0,2% m/m. Mientras que, el aceite esencial obtenido mediante AV, presentó un olor menos intenso y un color un tono más oscuro. Su rendimiento fue de 0,1% m/m. La caracterización de los aceites esenciales por CG/EM mostró que los metabolitos secundarios volátiles constituyentes del aceite esencial obtenido por HD fueron ocho, pertenecientes a los grupos: monoterpenos oxigenados (86,39%) y monoterpenos carbonados (13,61%), siendo sus componentes mayoritarios: el 1,8-cineol (49,95%), la L-verbenona (15,59%) y el α -Pineno (11,66%). Por otra parte, los metabolitos secundarios volátiles que constituyen al aceite esencial obtenido por AV fueron trece, pertenecientes a los grupos: monoterpenos oxigenados (76,52%), sesquiterpenos oxigenados (2,21%), sesquiterpenos carbonados (3,05%) y ésteres (6,81%), siendo sus componentes mayoritarios: la L-verbenona (32,61%), el D-alcanfor (20,87%) y el L-borneol (9,36%). La actividad antifúngica a 10 μ l/disc de los aceites esenciales fue evaluada frente a cepas de *Aspergillus flavus*, obteniéndose halos inhibitorios de 24,33 y 13,00 mm de diámetro para el aceite esencial obtenido por HD y AV respectivamente. El aceite esencial de *R. officinalis* extraído por HD, presenta una actividad contra *A. flavus* 53,43% superior a la actividad fúngica exhibida por el aceite esencial extraídos mediante AV. Se considera que el aceite esencial de *R. officinalis* podría representar un método alternativo para el control de micotoxinas en alimentos.

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

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Crescente V, Oscar E	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	2.740.590
	e-mail	ocrescente@gmail.com
Centeno B, Sara J	ROL	CA <input checked="" type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	5.702.407
	e-mail	sara.centeno@gmail.com
D'armas R, Haydelba T	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	4.297.804
	e-mail	htrinidad86@hotmail.com
Parra G, Evis Y	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	10.947.421
	e-mail	eviespin@hotmail.com

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2013	02	28

Lenguaje: SPA

Archivo:

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis-LemusM.DOC	Application/Microsoft Word

Alcance:

Espacial: Nacional (Opcional)

Temporal: Temporal (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciada en Química

Nivel Asociado con el Trabajo:

Licenciada

Área de Estudio:

Química

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

UNIVERSIDAD DE ORIENTE, NÚCLEO DE SUCRE



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CUN°0975

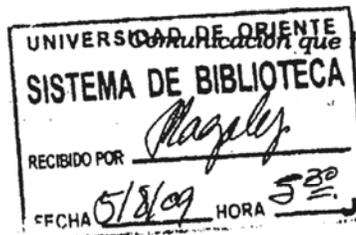
Cumaná, 04 AGO 2009

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"**.

Letdo 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.



Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

JUAN A. BOLANOS CURVELO
Secretario



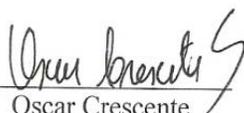
C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación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

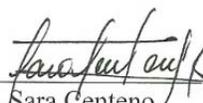
JABC/YGC/maruja

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”.


Marínés Lemus
Autora


Oscar Crescente
Asesor


Sara Centeno
Coasesora