

Saber, Universidad de Oriente, Venezuela. Vol. 25 N° 2: 185-191. (2013)

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA Y ANTIAFLATOXIGÉNICA DE EXTRACTOS DE *Melissa officinalis* (LAMIACEAE) SOBRE *Aspergillus flavus*

ANTIFUNGAL AND ANTIAFLATOXIGENIC ACTIVITY OF EXTRACTS OF *Melissa officinalis* (LAMIACEAE) ON *Aspergillus flavus*

SARA CENTENO BRICEÑO, YOHANNA CARRERA JASPE

Universidad de Oriente, Escuela de Ciencias, Núcleo de Sucre, Departamento de Bioanálisis, Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas, Cumaná, Venezuela. E-mail: sara.centeno@gmail.com

RESUMEN

Debido a que el uso de fungicidas en los cultivos agrícolas ha provocado el desarrollo de resistencia fúngica, contaminación ambiental y riesgos de salud pública, se ha estudiado la actividad antifúngica de los extractos de plantas silvestres, para la búsqueda de nuevas alternativas en el control de hongos y sus micotoxinas. Es por ello que el objetivo de la presente investigación fue evaluar la actividad antifúngica y antiaflatoxigénica de extractos de toronjil (*Melissa officinalis*) sobre *Aspergillus flavus*. Se obtuvieron extractos de *Melissa officinalis* utilizando etanol al 80,00%, y luego de evaporado el alcohol, se prepararon soluciones acuosas para los ensayos y, a partir de éstos, se determinó: (a) la actividad antifúngica de los extractos, (b) la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos sobre *Aspergillus flavus* y (c) la actividad antiaflatoxigénica utilizando el método de enzima inmunoensayo competitivo (ELISA). Los resultados obtenidos de la actividad antifúngica mostraron que los extractos produjeron en promedio halos de inhibición de 22 mm sobre el hongo ensayado. Así mismo, presentó una concentración mínima inhibitoria de 23,30 mg/mL. El extracto redujo las concentraciones de aflatoxinas de 5, 15 y 45 µg/kg en un 96,60%, 85,33% y 84,71%, respectivamente. En conclusión, los extractos de *Melissa officinalis* mostraron actividad antifúngica y antiaflatoxigénica sobre *Aspergillus flavus*, inhibiendo en gran parte su crecimiento y reduciendo significativamente las concentraciones de aflatoxinas.

PALABRAS CLAVE: Extractos naturales, hongos contaminantes, aflatoxinas.

ABSTRACT

Because the use of fungicides in agricultural crops has led to the development of fungal resistance, environmental pollution and public health hazards, the antifungal activity of the extracts from wild plants has been studied, seeking new alternatives in the control of fungi and mycotoxins. Therefore, the objective of this research was to evaluate the antifungal and antiaflatoxigenic activity of extracts of Lemon balm (*Melissa officinalis*) on *Aspergillus flavus*. Extracts of *Melissa officinalis* were obtained using ethanol 80.00%, and after the alcohol evaporated, aqueous solutions were prepared for testing, and from them it was determined: (a) the antifungal activity of the extracts, (b) minimum inhibitory concentration (MIC) of the extracts on *Aspergillus flavus* and (c) antiaflatoxigenic activity using the method of competitive enzyme immunoassay (ELISA). The results of the antifungal activity showed that the extracts produced averaged halos of inhibition of 22 mm on the fungus tested. It also presented a minimum inhibitory concentration of 23.30 mg/mL. The extract reduced aflatoxin concentrations of 5, 15 and 45 mg/kg in a 90.60%, 85.33% and 84.71%, respectively. In conclusion, *Melissa officinalis* extracts showed antifungal and antiaflatoxigenic activity on *Aspergillus flavus*, largely inhibiting its growth and significantly reducing aflatoxin concentrations.

KEY WORDS: Natural extracts, contaminants fungi, aflatoxins.

INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son compuestos químicos tóxicos producidos como metabolitos secundarios por varios hongos, cuando crecen en condiciones favorables, y son excretados por ellos en diversos sustratos, los cuales incluyen granos, cereales, nueces, especias, frutas, verduras, semillas oleaginosas, entre otros, que son utilizados para el consumo humano y/o animal. La contaminación de estos alimentos por hongos y sus respectivos metabolitos tóxicos ocurre, principalmente, durante los periodos de pre y post cosecha, en los cuales

la humedad y la temperatura juegan un papel importante en el crecimiento del hongo y en la producción de micotoxinas (FAO 2004, Bloom *et al.* 2007, Kralj y Prosen 2009).

Las aflatoxinas son un grupo de metabolitos fúngicos que, químicamente, son derivados difurano cumarinas, comúnmente encontradas en el maíz, maní, higos, algodón, leche, tabaco, frutos secos y otros alimentos, han sido descritas como hepatotóxicas, carcinogénicas, mutagénicas y teratogénicas y son producidas, principalmente, por *Aspergillus flavus* y

Aspergillus parasiticus (D'Mello y Macdonald 1997, Bennett y Klich 2003, FAO 2004, Boermans y Leung 2007, Martins *et al.* 2007, Biagi 2009).

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

Melissa officinalis, conocida comúnmente como toronjil, citronela, limonera, es natural del sur y centro de Europa. Crece en estado silvestre en regiones tropicales en malezas o bosques o junto a las casas de campo en terrenos ricos en materia orgánica, en lugar sombreado. Puede encontrarse cultivada en jardines. Es utilizada como planta medicinal casera y para la industria farmacéutica o en la industria cosmética. Se le atribuyen propiedades medicinales antiespasmódicas, digestivas, bacteriostáticas y antivirales (Cardona 1997, Izco *et al.* 1997, Sitte *et al.* 2004).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antifúngica y antiaflatoxigénica de extractos de *Melissa officinalis* sobre *Aspergillus flavus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa fúngica

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

Universidad de Oriente.

Planta

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

Suspensión de conidios

La suspensión de conidios se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Rasooli *et al.* (2008); para ello, *Aspergillus flavus* fue cultivado en tubos de ensayo con agar papa dextrosa (PDA) a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 10 días. Posteriormente, se preparó una suspensión de conidios, agregando al tubo 10 mL de solución salina (0,90%) estéril y se procedió a agitar vigorosamente para facilitar el desprendimiento de los conidios. La suspensión obtenida se filtró a través de doble gasa estéril, eliminando de esta forma otras estructuras fúngicas y obteniendo sólo conidios en la suspensión. Se determinó el número de conidios por mL de la suspensión, y utilizando cámara de Neubauer se ajustó la concentración a 10^6 conidios/mL.

Extracción y actividad antifúngica

Una vez seca la planta, fue triturada obteniéndose un polvo fino y se procedió a preparar el extracto, usando como solvente etanol al 80%, siguiendo el método de Bluma *et al.* (2008). Se mezclaron 3 g de polvo de la planta con 20 mL de etanol al 80%; esta mezcla se dejó en reposo durante 48 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. El extracto obtenido se filtró con papel de filtro Whatman N° 1 y se vertió en placas de Petri de vidrio, que fueron previamente pesadas; posteriormente, las placas que contenían los extractos fueron guardadas en oscuridad hasta que se evaporó completamente el alcohol, y luego se determinó el peso seco del extracto. Con la finalidad de evitar la toxicidad de otros solventes, el extracto seco se resuspendió con 3 mL de agua destilada estéril; luego dividido en viales y almacenados en refrigeración. Cada vial se mezcló profusamente al momento de usarlo. La concentración final del extracto fue de 58,25 mg/mL.

La actividad antifúngica del extracto obtenido fue determinada de acuerdo a De Souza *et al.* (2005). En placas de Petri que contenían agar papa dextrosa (PDA) fueron diseminados uniformemente 100 μL de la suspensión de conidios con asa de Digrlaski. A continuación, y

separadamente, se impregnaron los discos de papel de filtro estériles de 6 mm de diámetro con 10 μ L del extracto y se situaron en el medio de las placas de Petri con PDA inoculadas con la suspensión de conidios. Se realizó un tratamiento control con placas que contenían sólo la suspensión de conidios sin el extracto. Las placas fueron incubadas por tres días a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Los halos de inhibición se midieron usando una regla graduada y se expresaron en milímetros. Los límites de los rangos de inhibición para considerar positiva la actividad fueron el doble del diámetro del disco de papel impregnado con el extracto (12 mm).

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

La CMI se determinó mediante el método de dilución en caldo y se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Rasooli y Mirmostafa (2003) y Rasooli *et al.* (2008). Para ello se hicieron diluciones seriadas (1:2,5, 1:5, 1:10, 1:20 y 1:40) a partir de la mezcla de 100 μ L de extracto en micropozos de una placa para lectura de ELISA, que contenían 100 μ L de caldo Sabouraud dextrosa y 50 μ L de la suspensión de conidios de *Aspergillus flavus*. Se realizaron pozos controles que contenían sólo la mezcla de caldo y suspensión de conidios. La placa se incubó a 28°C durante 48 horas. La concentración mínima inhibitoria correspondió al micropozo con la mayor dilución que no mostró crecimiento fúngico.

Actividad antiaflatoxigénica

Se puso en contacto 100 μ L del extracto con 100 μ L de aflatoxinas de concentración conocida (5, 15 y 45 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (BIOPHARM, Alemania), durante 5 minutos y, posteriormente, se aplicaron a las mezclas el método de enzima inmunoensayo competitivo (ELISA), siguiendo las instrucciones del kit RIDASCREEN®FAST (BIOPHARM, Alemania), para determinar la reducción de la concentración de las aflatoxinas totales después de la adición del extracto. Las concentraciones de la micotoxina fueron medidas con un lector de ELISA marca BIOTEK® modelo ELX800. La lectura de los resultados se realizó usando el software comercial KC-Junior™. Cada ensayo se acompañó de un control con las aflatoxinas totales de concentración conocida y se realizaron tres repeticiones.

Análisis estadístico

Para comparar los niveles de aflatoxinas antes y después del tratamiento con el extracto de *Melissa officinalis*, se realizó un análisis de t-Student para datos apareados, con

un nivel de significancia de $p < 0,05$ usando el programa estadístico Statgraphics, versión 5.1 (Wayne 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La actividad antifúngica del extracto de *Melissa officinalis* sobre *Aspergillus flavus* estuvo determinada por halos de inhibición que promediaron 22 mm (Fig. 1). Resultados similares fueron obtenidos por Cárdenas *et al.* (2005), quienes demostraron que el extracto etanólico de *Chrysactinia mexicana* sobre *Aspergillus flavus* presentó un halo de inhibición de $18,8 \pm 0,19$ mm. Así mismo, Centeno *et al.* (2010) obtuvieron con el extracto etanólico de *Thymus vulgaris* y *Rosmarinus officinalis* un halo de inhibición en promedio de 11,4 mm y 14,6 mm, respectivamente, sobre *Aspergillus flavus*.

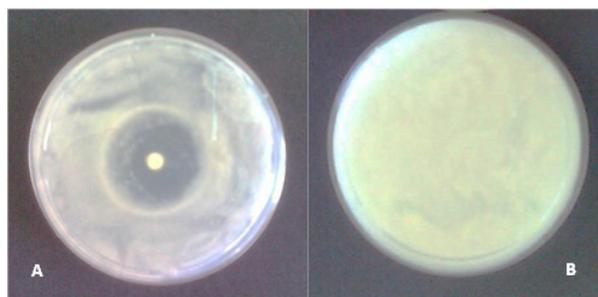


Figura 1. Halo de inhibición del extracto de *Melissa officinalis* sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus* (A). Control (B), placa sólo con la suspensión de conidios de *Aspergillus flavus*.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto se observó en la dilución 1:2,5, que corresponde a una concentración de 23,30 mg/mL. Resultados similares fueron obtenidos por Ram Kumar *et al.* (2010), al ensayar con el extracto etanólico de *Syzygium aromaticum* y *Allium sativum* obtuvieron una CMI de 20 mg/mL sobre *Aspergillus flavus*.

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

Los monoterpenos son metabolitos secundarios de las plantas, que juegan un papel importante en

la función metabólica de ellas y resultan menos perjudiciales que los fungicidas químicos, desde el punto de vista ambiental. Además, están asociados con diversas actividades biológicas, como antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes, leishmanicida, entre otras (Arango *et al.* 2007, Bakkali *et al.* 2008, Vaillant *et al.* 2009).

Diversos investigadores han comprobado el efecto de los componentes de los aceites esenciales sobre microorganismos que afectan cultivos de importancia económica; así, Vaillant *et al.* (2009) demostraron que el aceite esencial citronelal, obtenido de la planta *Cymbopogon nardus*, inhibió el crecimiento del hongo patógeno *Rhizoctonia solani*, aislado de cultivos de papa. Alzate *et al.* (2009) obtuvieron que el aceite citral, extraído de las plantas *Thymus vulgaris* y *Cymbopogon citratus*, inhibió el crecimiento y la esporulación del hongo *Colletotrichum acutatum*, el cual afecta, en su mayoría, los cultivos de fresas. Barrera-Necha *et al.* (2009) evidenciaron que el aceite esencial carvacrol, obtenido de las plantas *Cinnamomum zeylanicum*, *Syzygium aromaticum* y *Thymus vulgaris*, presentaron alta actividad antifúngica sobre el fitopatógeno *Fusarium oxysporum*.

El mecanismo de acción de los extractos de plantas, aceites esenciales y sus respectivos componentes no está claro todavía; sin embargo, Omidbeygi *et al.* (2007) sugieren que los componentes de los aceites esenciales atraviesan la membrana celular, interactuando con las enzimas y las proteínas de la membrana, produciendo así un flujo de protones hacia el espacio extracelular que induce cambios en las células y finalmente su muerte. Cristani *et al.* (2007) informaron que la actividad antimicrobiana está relacionada no sólo con la capacidad con los terpenos de afectar la permeabilidad, sino también otras funciones de las membranas celulares, cuando pasan al interior de la célula interactuando con los sitios críticos intracelulares. Lucini *et al.* (2006) indicaron que la inhibición del crecimiento micelial es causada por los monoterpenos presentes en los aceites esenciales. Estos compuestos podrían incrementar la concentración de peróxidos lipídicos, como radicales hidroxilo, alcoxilo y alkoperoxilo, logrando así la muerte del hongo. Para Sharma y Tripathi (2006), los componentes de los aceites esenciales y extractos actuarían en las hifas del micelio, provocando la salida de los componentes del citoplasma, la pérdida de rigidez y la integridad de la pared celular de las hifas, dando lugar a su colapso y a la muerte del micelio. Daferera *et al.* (2000) reportaron que la actividad antifúngica de los aceites esenciales podría deberse a

la formación de puentes de hidrógeno entre el grupo hidroxilo de los compuestos fenólicos del aceite y los sitios activos de ciertas enzimas.

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

La actividad antiaflatoxigénica del extracto de *Melissa officinalis* se muestra en la Tabla 1, observándose en todos los casos una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) de todas las concentraciones iniciales de las aflatoxinas totales probadas. Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Bejarano y Centeno (2009), en los que el extracto de *Citrus limon* redujo la concentración de 45 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AFt en 73,60%, seguido de 69,30% y 67,50% para rangos de concentración entre 5-15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 1,7-5,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AFt, respectivamente.

Se ha informado que la biosíntesis de las aflatoxinas, en especial la de la aflatoxina B₁, puede ser inhibida por numerosos compuestos y extractos de ciertas plantas que son tóxicos para los hongos, y pueden ser útiles para controlar el crecimiento de hongos y la producción de micotoxinas. Estos inhibidores naturales de la síntesis de las aflatoxinas pueden actuar en tres niveles: en el primer nivel intervienen en el medio ambiente y los factores fisiológicos que afectan la biosíntesis de las aflatoxinas, en el segundo nivel inhiben los circuitos de señalización en la entrada de la ruta biosintética y en el tercer nivel ejercen su inhibición directamente en la expresión génica o la actividad enzimática en la ruta. Mientras que el modo de acción de la mayoría de los compuestos inhibidores es desconocido, hay pocas pruebas que afirman que dichos compuestos tienen un efecto en la transcripción de los genes o en la actividad enzimática en los distintos pasos de la ruta biosintética. Lo más probable es que los compuestos inhibidores conocidos alteran los moduladores ambientales y fisiológicos de la biosíntesis de las aflatoxinas o alteran las vías de señalización en la entrada de la red reguladora (González *et al.* 2001, Alpsy 2010).

Tabla 1. Efecto de los extractos acuosos de *Melissa officinalis* sobre la concentración de aflatoxinas totales. (AFt).

Extracto	Concentración inicial de AFt (µg/kg)	Concentración final de AFt (µg/kg)	Promedio del % de reducción	t-Student	p valor
<i>Melissa officinalis</i>	5	0,20	96,60	54,80	0,0003
	5	0,00			
	5	0,30			
	15	1,18	85,33	24,17	0,0017
	15	2,48			
	15	2,95			
	45	6,03	84,71	50,33	0,0003
	45	8,39			
	45	6,22			

CONCLUSIONES

La utilización de extractos vegetales para controlar hongos micotoxigénicos ha sido ampliamente estudiada; no obstante, sus actividades antimicotoxigénicas todavía no han sido determinadas en su totalidad; por esta razón, la actividad antifúngica y antiaflatoxigénica que han demostrado los extractos de *Melissa officinalis* sobre *Aspergillus flavus* en la presente investigación es un aporte que puede ayudar al control de estas micotoxinas en los alimentos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALPSOY L. 2010. Inhibitory effect of essential oil on aflatoxin activities. Afr. J. Biotechnol. 9(17):2474-2481.

ALZATE D, MIER G, AFANADOR L, DURANGO D, GARCÍA C. 2009. Evaluación de la fitotoxicidad y la actividad antifúngica contra *Colletotrichum acutatum* de los aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*), limoncillo (*Cymbopogon citratus*), y sus componentes mayoritarios. Rev. Facult. Quím. Farmacéut. 16(1):116-125.

ARANGO N, VANEGAS N, VEGA J, GARCÍA C, ROJANO B. 2007. Actividad antifúngica del isoespintanol sobre hongos del género *Colletotricum*. Scient. Technica. XIII(33):279-280.

BAHTIYARCA R, COSGE B. 2006. The essential oil of lemon balm (*Melissa officinalis* L.), its components and using fields. J. Facult. Agricult. 21(1):116-121.

BAKKALI F, AVERBECK S, AVERBECK D, IDAOMAR M. 2008.

Biological effects of essential oils-a review. Food Chem. Toxicol. 46(2):446-475.

BEJARANO R, CENTENO S. 2009. Extracto de *Citrus limon* para el control de aflatoxinas y hongos aflatoxigénicos en alimentos concentrados para pollos de engorde producidos en Venezuela. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 29(1):57-61.

BENNETT J, KLICH M. 2003. Mycotoxins. Clin. Microbiol. Rev. 16(3):497-516.

BIAGI G. 2009. Dietary supplements for the reduction of mycotoxin intestinal absorption in pigs. Biotechnol. Anim. Husb. 25(5-6):539-546.

BLOOM E, BAL K, NYMAN E, MUST A, LARSSON L. 2007. Mass spectrometry-based strategy for direct detection and quantification of some mycotoxins produced by *Stachybotrys* and *Aspergillus* spp. in indoor environments. Appl. Environmen. Microbiol. 73(13):4211-4217.

BLUMA R, AMAIDEN M, ETCHEVERRY M. 2008. Screening of Argentine plant extracts: Impact on growth parameters and aflatoxin B₁ accumulation by *Aspergillus* section Flavi. Int. Food Microbiol. 122(1-2):114-125.

BOERMANS H, LEUNG M. 2007. Mycotoxins and the pet food industry: Toxicological evidence and risk assessment. Int. J. Food Microbiol. 119(1-2):95-102.

CÁRDENAS N, PÉREZ S, ZAVALA M, AGUIRRE J, PÉREZ C. 2005. Actividad antifúngica de seis plantas

- sobre *Aspergillus flavus* Link. Rev. Mex. Cien. Farmacéut. 36(3):21-26.
- CARDONA M. (ed). 1997. Botánica II. Ciencias de la Naturaleza. Editorial Planeta. España.
- CENTENO S, CALVO M, ADELANTADO C, FIGUEROA S. 2010. Antifungal activity of extracts of *Rosmarinus officinalis* and *Thymus vulgaris* against *Aspergillus flavus* and *A. ochraceus*. Pakist. J. Biol. Sci. 13(9):452-455.
- CRISTANI M, ARRIGO M, MANDALARI G, CASTELLI F, SARPIETRO M, MICIELI D. 2007. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. J. Agricult. Food Chem. 55(15):6300-6308.
- D'MELLO J, MACDONALD A. 1997. Mycotoxins. Anim. Feed Sci. Technol. 69:155-166.
- DAFERERA D, ZIOGAS B, POLISSIOU M. 2000. GC-MS analysis of essential oils from some greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. J. Agricult. Food Chem. 48(6):2576-2581.
- DE MARTINO L, DE FEO V, NAZZARO F. 2009. Chemical composition and *in vitro* antimicrobial and mutagenic activities of seven lamiaceae essential oils. Molecules. 14(10):4213-4230.
- DE SOUZA E, DE OLIVERA E, DE LUNA K, PAIVA C. 2005. Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of various moulds isolated from foods. Braz. Arch. Biol. Technol. 48(2):245-250.
- FAO (ORGANIZACIÓN PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA). 2004. Manual sobre la aplicación del sistema de análisis de peligros y de puntos críticos de control (APPCC) en la prevención y control de las micotoxinas. Estudio FAO Alimentación y Nutrición, N° 73. Roma. Italia.
- GONÇALEZ E, FELICIO J, PINTO M. 2001. Bioflavonoids inhibit the production of aflatoxin by *Aspergillus flavus*. Braz. J. Med. Biol. Res. 34(1):1453-1456.
- IZCO J, BARRENO E, BRUGUÉS M, COSTA M, DEVESA J, FERNÁNDEZ F, GALLARDO T, LIMONA X, SALVO E, TALAVERA S, VALDÉS B. 1997. Botánica. Editorial Mc-Graw-Hill Interamericana. España.
- KRALJ I, PROSEN H. 2009. An overview of conventional and emerging analytical methods for the determination of mycotoxins. Int. J. Mol. Sci. 10(1):62-115.
- LUCINI E, ZUNINO M, LÓPEZ M, ZYGADLO J. 2006. Effect of monoterpenes on lipid composition and sclerotial development of *Sclerotium cepivorum* Berk. J. Phytopathol. 154:441-446.
- MAGRO A, CAROLINO M, BASTOS M, MEXIA A. 2006. Efficacy of plant extracts against stored products fungi. Rev. Iberoam. Micol. 23:176-178.
- MÁRQUEZ R, DE LA ROSA C, MERCADO A. 2007. Actividad antifúngica del extracto total en etanol de las hojas frescas de *Pedilanthus tithymaloides* L Point (ultimorrial). Sci. Tecn. XIII(3):155-159.
- MARTINS H, MENDES M, D'ALMEIDA F. 2007. Occurrence of aflatoxin B₁ in dairy cow's feed over 10 years in Portugal (1995-2004). Rev. Iberoam. Micol. 24:69-71.
- OMIDBEYGI M, BARZEGAR, M, HAMIDI Z, NAFHDIBADI H. 2007. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. Food Control. 18:1518-1523.
- RAM KUMAR P, PRANAY J, CHETAN S. 2010. Antimicrobial activity of ethanolic extracts of *Syzygium aromaticum* and *Allium sativum* against food associated bacteria and fungi. Ethnobot. Leaf. 14:344-360.
- RASOOLI I, MIRMOSTAFA S. 2003. Bacterial susceptibility and chemical composition of essential oils from *Thymus kotschyanus* and *Thymus persicus*. J. Agricult. Food Chem. 51(8):2200-2205.
- RASOOLI I, HADI M, YADEGARINIA D, GACHKAR L, ALLAMEH A, BAGHER M. 2008. Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. Int. J. Food Microbiol. 122(1-2):135-139.
- SHARMA N, TRIPATHI A. 2006. Fungitoxicity of the essential oil of *Citrus sinensis* on post-harvest pathogen. W. J. Microbiol. Biotechnol. 22:587-593.

SITTE P, WEILER E, KADEIRET J, BRENSINSKY A, KÖNER C. 2004. Tratado de Botánica. 35^{va} edición. Editorial Ediciones Omega. España.

VAILLANT D, ROMEU C, RAMOS E, GONZÁLEZ M, RAMÍREZ R, GONZÁLEZ J. 2009. Efecto inhibitorio *in vitro*

de cinco monoterpenos de aceites esenciales sobre un aislado de *Rhizoctonia solani* en papa (*Solanum tuberosum* L.) Fitosanidad. 3(3):197-200.

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