

Evaluación del poder antifúngico de los extractos de romero, menta y salvia sobre hongos que atacan a las naranjas

Autora: Patricia Noemí Martínez¹

Resumen

El objetivo del trabajo fue determinar la actividad inhibitoria de los extractos de Romero, Menta y Salvia sobre hongos que normalmente son los responsables del deterioro de las naranjas en el mercado local de la ciudad de Encarnación, con el fin de someter a estos cítricos a la acción de estos extractos.

Las cepas encontradas y utilizadas para las pruebas de inhibición fueron *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* y *Aspergillus niger*.

Fueron recogidas las hojas de las hierbas medicinales, y procesadas para la obtención de sus extractos por tres métodos diferentes: extracción con solvente orgánico, extracción por destilación simple y extracción sólido líquido.

La actividad inhibitoria de los distintos extractos se demostraron utilizando difusión en agar con orificios sobre agar nutritivo Dextrosa Sabouraud.

Con la prueba de orificios sobre agar se observó halos inhibitorios de los extractos de Romero, Menta y Salvia que se obtuvieron por el método sólido-líquido para las tres cepas y no se visualizó inhibición por los extractos que se obtuvieron por extracción con solvente orgánicos y extracción por destilación simple.

Se demostró que el extracto de Romero obtenido por el método sólido-líquido presentó mayor halo inhibitorio sobre las cepas que los extractos de Menta y Salvia obtenidos por el mismo método.

Palabras claves

Hierbas medicinales, deterioro, inhibitorio, método sólido-líquido.

ABSTRACT

The main aim of this research was to determine the inhibitory activity of the extracts of rosemary, mint and sage on fungi that normally are responsible for the decomposition of orange in the local market of the city of Encarnación, order to subject these citrus to the action of these extracts.

The strains that were found and used for inhibition tests were *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* and *Aspergillus niger*.

The leaves from herbs were harvested, and processed for obtaining extracts by three different methods: organic solvent extraction, extraction by simple distillation and liquid solid extraction.

The inhibitory activity of the different extracts was demonstrated by using agar diffusion with holes on nutrient agar Sabouraud Dextrose.

With the holes test on agar, inhibitory halos were observed from the extracts of rosemary, mint and sage which were obtained by maceration for the three strains and no extract inhibition were visualized by extraction with organic solvent and by simple distillation and extraction.

It was demonstrated that the extract of rosemary obtained by maceration showed a higher inhibitory halo strains in comparison to the extracts of mint and sage obtained by the same method.

Keywords

Medicinal herb, deterioration, inhibitory, liquid solid extraction.

¹Profesora Investigadora de la Universidad Nacional de Itapúa, Paraguay
mail: patricia.martinezlovera@gmail.com
Recibido: 02/10/13 Aceptado: 04/11/13

Introducción

Los pueblos aborígenes ya utilizaban hierbas medicinales para el tratamiento de numerosas enfermedades. En la actualidad, numerosas especies de plantas medicinales son cultivadas en el Paraguay ofreciendo excelentes alternativas de producción e ingresos. Existen numerosos estudios sobre las propiedades fitoterapéuticas de muchas de estas hierbas los cuales constituyen antecedentes importantes en el planteamiento de la obtención de aceites esenciales y su aplicación como conservante natural.

Una de las principales características del uso de las plantas medicinales es su bajo costo, comparado con los conservantes químicos que existen en el mercado. Entre las más utilizadas figuran las aromáticas como el Romero, Menta, Eucalipto, Salvia, entre otras.(5)

Del Romero (*Rosmarinus officinalis* L.) se utilizan las hojas y las flores con una composición 0,5-2 %, en aceite esencial (2) . El aceite esencial de esta hierba fue estudiado su efecto antifúngico sobre la candida albicans estudio in vitro. (7)

De la Menta (*Mentha piperita* L.) se utilizan las hojas y las cumbres florales con una composición 1-4 %, en aceite esencial, existen antecedentes sobre evaluación preliminar de la actividad fungicida del aceite esencial de menta sobre algunos hongos filamentosos. (5)

Las hojas de la Salvia (*Salvia officinalis* L.) contienen 1 a 2,8 % de aceite esenciales, son las que se utilizan para la obtención de las misma. Sus antecedentes farmacológica indican que se pueden utilizar como antifúngico para tratar los hongos que habitualmente ataca a las naranjas, que llevan a la descomposición de las frutas. (2)

Las naranjas están sometidas a procesos naturales de deterioro y descomposición progresivos. Estos procesos se ven acelerados por el inadecuado manejo que puede realizarse durante las operaciones de postcosecha, los cuales favorece las reacciones fisiológicas de deterioro, y en la mayoría de los casos facilita la contaminación microbiana con hongos. Producen daños irreversibles, los cuales se

detectan fácilmente por el cambio presentado en una o más de sus características sensoriales. Entre los microorganismos que afectan a la naranjas están el *Penicillium italicum*, *Penicillium digitatum*, *Aspergillus Niger*, etc

Penicillium italicum (podredumbre azul)

Estos hongos están presentes en todas las zonas cítricas, al igual que la podredumbre verde. Estas dos alteraciones se comportan de forma similar en muchos aspectos. Los primeros síntomas aparecen en el tejido vegetal enfermo que se vuelve mas suave, acuoso y ligeramente decolorado y se perfora fácilmente. Sobre la superficie de la lesión, se desarrolla un crecimiento micelial de color blanco y aspecto pulverulento y enseguida se forma una masa de esporas de color azul. La podredumbre azul se propaga en los envases, ocasionando nidos o agujeros correspondientes a frutos enfermos. Se desarrollan muy rápidamente alrededor de los 24°C. (3)

Penicillium digitatum o podredumbre verde Esta es la enfermedad postcosecha más común y más importantes en los cítricos. Sobre las superficies de las naranjas infectadas, se producen millones de esporas del hongo responsable y estas están presentes en el campo, la zona de envasado, en la zona de almacenamiento, en los contenedores y en el mercado.

Los síntomas iniciales son similares a los de la Podredumbre azul. Al comienzo del estado de agujero minúsculo, aparece como un punto de humedad, suave y ligeramente descolorido. El punto aumenta de tamaño en 24-36 horas a 24°C y pronto la podredumbre afecta las vesículas del zumo. Aparece un micelio blanco sobre la superficie del fruto y luego forman esporas de color verde oliva. Al poco tiempo el fruto queda cubierto con una masa de esporas verde oliva. La podredumbre verde se desarrolla muy rápidamente alrededor de los 24°C.(3)

Podredumbres causadas por *Aspergillus Niger*.

Es una enfermedad menor, que causa problemas cuando el fruto se mantiene mucho tiempo almacenado a altas temperaturas. Al principio la podredumbre esta ligeramente coloreada, es muy

blanda, de color naranja pálida. El micelio se produce sobre la superficie de la lesión y posteriormente, la zona podrida se cubre con una capa de esporas de color negro.

La infección de los frutos tiene lugar a través de daños ocasionales durante la recolección y manipulación. La descomposición puede descomponerse en las cajas, al ser infectados frutos sanos a partir de enfermos. La temperatura máxima de crecimiento del hongo es de 32°C. (3).

Materiales y Métodos

Recolección y Preparación del Material Vegetal

Las hierbas medicinales se recolectaron en los meses de Febrero y Marzo de 2013 en las ciudades de Trinidad y Encarnación departamento de Itapúa, Paraguay y fueron llevados al laboratorio de Química de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Itapúa.

Se seleccionaron hierbas de buena características sensoriales.

A partir de las muestras recolectadas se separaron las hojas, las cuales fueron procesadas para la obtención de sus extractos por tres métodos diferente: extracción con solvente orgánico, extracción por destilación simple y extracción solido-liquido.

Extracción con solvente orgánico.

Se pesaron 20 gr de las muestras secas trituradas de las tres hierbas, y se colocaron cada uno en cartuchos de papel preparados para el efecto. El equipo utilizado fue Soxhlet método en caliente, que se desarrollo empleando solventes como el Hexano.

Extracción por destilación simple

Para este método se pesaron 100 gr de cada una de las hierbas medicinales, previamente trituradas y se colocaron dentro del un balón de destilación, agregándole 200 ml de agua. Se colocaron dentro de un sistema de destilación aplicándole calor al balón que contenía la muestra. Una vez obtenido las soluciones acuosas de los extractos de las tres hierbas estas fueron almacenadas en un sistema de refrigeración.

Extracción solido-liquido

Esta extracción se realizo a temperatura ambiente. Consistió en pesar 100 g de las hierbas secas trituradas y colocadas en un Erlenmeyer color caramelo con tapa esmerilada. Se agrego 150 ml de alcohol al 50 ° como solvente para la extracción, se opto por el alcohol debido a que este no propicia efecto de fermentación y formación de mohos. Se dejo en reposo 12 días con agitación esporádica. Luego se sometió a un sistema de filtración donde el liquido se lleva a evaporación a fin de separar el alcohol y se obtener el extracto que fueron almacenados en recipientes cerrados a fin de evitar pedidas de extractos.

Aislamiento e identificación de cepas

El aislamiento e identificación de los hongos fue realizado en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencia y Tecnología. Los cepas fueron separados de los tejidos vegetal de la naranjas infectadas y cultivado en medio de cultivo puro como el Agar Dextrosa Sabouraud.

Para las pruebas de evaluación de la actividad inhibitoria de los extractos, fueron utilizadas placas de Petri que contenían sobre agar nutritivo Dextrosa Sabouraud por el método difusión en agar con orificios. Fueron realizados orificios de 6 mm en el gel, se utilizó un sacabocado previamente esterilizado. En cada placa se realizaron 4 orificios fueron distribuidos equidistantemente.

La suspensión directa a partir de 4 ó 5 colonias con 18-24 hs. de incubación en solución fisiológica ajustando la turbidez al 0.5 de la escala de Mc Farland (aprox. 1.5×10^8 ufc/ml) de cada cepas, fueron inoculadas separadamente en la superficie del medio de cultivo. Cada orificio se deposito 60 μ l de los diferentes extractos obtenidos y selladas con el mismo agar. Las placas se incubaron durante 24 horas a 30°C.

Una vez finalizado el periodo de incubación se realizaron las lecturas de los halos de inhibición utilizando un calibre. El punto final es la inhibición total del crecimiento, sin tener en cuenta las colonias diminutas que puedan detectarse solo con una observación muy minuciosa.

Resultados y Discusión

Los resultados indican que los extractos obtenidos por métodos de Soxhlet (previamente diluidos en solución de 50 ° alcohólico) y destilación simple de las hierbas medicinales Romero, Menta y Salvia, no presentaron efectos inhibitorios sobre las cepas de *Aspergillus Níger*, *Penicillium Digitatum* y *Penicillium Italicum* para la disolución de la escala 0,5 de Mc Farland.

En cambio los extractos de Romero, Menta y Salvia obtenidos por método sólido-líquido con alcohol de 50 ° de graduación evaporando totalmente solvente presentaron efectos inhibitorios sobre las cepas de *Aspergillus Níger*, *Penicillium Digitatum* y *Penicillium Italicum* para la disolución de la escala 0,5 de Mc Farland y los resultados se presentan en la tabla 1.

Tabla 1 Diámetros de halos inhibitorios utilizando extractos de Romero, Menta y Salvia obtenidos por maceración con alcohol de 50° (evaporación total)

	<i>Aspergillus Níger</i>	<i>Penicillium Digitatum</i>	<i>Penicillium Italicum</i>
Tipos de extractos- /Disco de control	Medidas de halo de inhibición (mm)	Medidas de halo de inhibición (mm)	Medidas de halo de inhibición (mm)
Extracto de Romero	12	12	12
Extracto de Menta	8	8	8
Extracto de Salvia	8	8	8
Control alcohol etílico p.a 50 °	0,0	0,0	0,0
Control alcohol etílico p.a 96 °	10	10	10

Se verificaron que las cepas de *Aspergillus Níger*, *Penicillium Digitatum* y *Penicillium Italicum* fueron los que presentaron mayor halo de inhibición utilizando extracto de Romero, mientras que empleando los extractos de Salvia y Menta el halo inhibitorio de son de menor diámetro sobre las cepas de *Aspergillus Níger*, *Penicillium Digitatum* y *Penicillium Italicum* para la disolución de la escala 0,5 de Mc Farland.

Las cepas de hongos más comunes encontradas fueron en la naranjas infectadas fueron: *Penicillium Digitatum*, *Penicillium Italicum* y *Aspergillus Níger*.

Conclusión

Los extractos de Menta y de Salvia obtenidos por el método sólido líquido con alcohol de 50 alcohólicos presentaron acción inhibitoria in vitro reducido sobre las cepas de *Aspergillus Níger*, *Penicillium Digitatum* y *Penicillium Italicum*.

El extracto de Romero obtenido por el método sólido-líquido con alcohol de 50 ° alcohólico ha sido el de mayor efecto inhibitorio in vitro sobre las cepas de *Aspergillus Níger*, *Penicillium Digitatum* y *Penicillium Italicum*.

Con los resultados obtenidos sobre las distintas cepas con los extractos estas se puede aplicar para pruebas in vivo sobre las naranjas comercializadas en el mercado local.

Bibliografía

1. Alonso, J. y Desmarchelier, C. (2005) Plantas Medicinales Autóctonas de la Argentina. Buenos Aires. L.O.L.A.
2. Bruneton, J. (2001) Fitoquímica. Plantas Medicinales. 2da edición. Ed. Acribia, Zaragoza.
3. L.M. Timmer, S.M. Garnsey y J.H. Graham. (2002). Plagas y enfermedades de los cítricos. Ediciones Mundi-Prensa. México.
4. Roger Amat, S. (1998) Defectos y alteraciones de los frutos cítricos en su comercialización. Ed. Lit. Nicolau.
5. Verastegui M. María. (1995) Efectos de análisis de antifúngico de 20 extractos de planta. Tesis Posgrado, Universidad Autónoma de Nuevo León.
6. Flores Solano, Alba Lilian; Hernández Escobar,

Ana Lilian y Valladares Reyes, Marta Guadalupe (2004) Determinación de la actividad antifúngica de aceites esenciales extraídos de *lippia graveolens* (oregano), *rosmarinus officinalis* (romero) y *eucalyptus globulus* (eucalipto), en *microsporum canis*, *trichophyton rubrum* y *epidermophyton floccosum*. Tesis Licenciatura, Universidad de El Salvador. [En línea]

7. Pérez Muñetón, Diana Raquel; Pineda Velásquez, Marcela; Soto Losada, Ana Elisa.(1996)Efecto antifúngico del romero sobre la *candidaalbicans*, un estudio in vitro. Bogotá. [En línea]