

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



INHIBICION DEL CRECIMIENTO Y LA
PRODUCCION DE TOXINAS DE *Aspergillus flavus* Y *A.*
parasiticus POR EXTRACTOS DE PLANTAS
DEL GENERO *Agave*.

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de
Maestro en Ciencias con Especialidad en Microbiología

PRESENTA:

Q.B.P. Eduardo Sánchez García

San Nicolás de los Garza, N. L.

Octubre 2002

OCT.
2002

TM

QR119

.S2

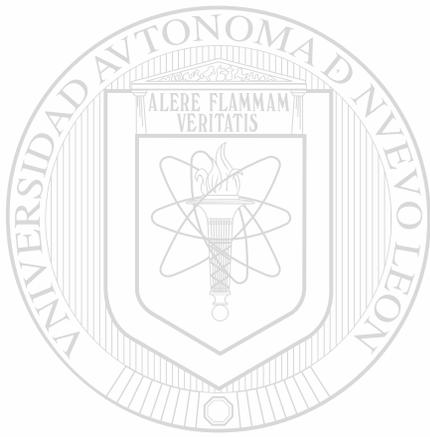
2002

e.1

EdUARdo

Sánchez

Carcía



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCIÓN DE TOXINAS DE
***Aspergillus flavus* Y *A. parasiticus* POR EXTRACTOS**
DE PLANTAS DEL GÉNERO *Agave*.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

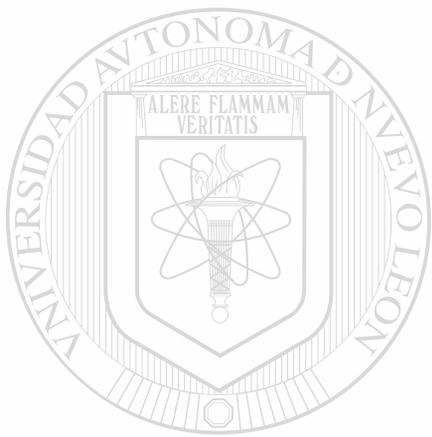
TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de
Maestro en Ciencias con Especialidad en Microbiología

PRESENTA

Q.B.P. Eduardo Sánchez García

TH
QR119
.S2
2002



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos del Departamento de Microbiología en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la dirección del Dr. José Santos García Alvarado y las asesorías de la Dra. Norma Laura Heredia y la Dra. Graciela García Díaz.

Esta investigación fue financiada por las siguientes instituciones:

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
PAICYT Proyecto CN 500-01
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Primer Programa de Apoyo a la Investigación OMNILIFE 2000
“Alimentar con Ciencia”

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCIÓN DE
TOXINAS DE *Aspergillus flavus* Y *A. parasiticus* POR
EXTRACTOS DE PLANTAS DEL GÉNERO *Agave*.**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de
Maestro en Ciencias con Especialidad en Microbiología



PRESENTA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
Q.B.P. *Eduardo Sánchez García*

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

APROBADA

COMISIÓN DE TESIS


Dr. José Santos García
DIRECTOR


Dra. Norma Heredia
VOCAL


Dra. Graciela García Díaz
SECRETARIO

DEDICATORIA

A DIOS, porque al trabajar bajo su mano, recibí aliento y consuelo para vencer los obstáculos que he encontrado en mi camino.

A mi Esposa M.C. Mirna Esthela Araiza Mendoza, porque estoy empezando una vida contigo llena de amor y de bendiciones, por todo lo que eres, por apoyarme y cuidarme en esos malos ratos, por estar conmigo, porque tu sabes lo difícil que fue y no cejaste en tu empeño de alentarme durante todo este trabajo. Te Amo BBcita.

A mi querida y genial Madre Sra. Rosalinda García Vda. de Sánchez, por que me haz enseñado con tus acciones que nada es imposible, que puedo ser capaz de salir adelante por mas difícil que sea el camino. Gracias mamá que Dios te bendiga y te conserve así como eres por muchos años mas.

A mi Padre Sr. Cesar Sánchez Quezada (+), porque aunque ya no estés te tengo presente cada día de mi vida.

A mis hermanos César, Alberto e Iliana, porque cada uno a su manera son realmente especiales.

A mi otra familia; Araiza Mendoza, porque realmente me siento parte de ustedes, Gracias Mamá Estela.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por el apoyo económico brindado para la realización de este trabajo.

A mis asesores Dr. Santos García y Dra. Norma Heredia por sus enseñanzas y consejos y por permitirme ser parte de este laboratorio y de su equipo de investigadores.

A la Dra. Graciela García, por todo el tiempo invertido en este trabajo, por todas las asesorías técnicas que fueron indispensables para la buena culminación de esta investigación.

Al Maestro Jorge Verduzco por su disponibilidad y sus asesorías, en la colecta de plantas y al Biol. Marco A. Guzmán por la identificación de las mismas.

A la M.C. Mirna Esthela Araiza Mendoza por la aportación de consejos e ideas durante el desarrollo de este trabajo.

A mi buen amigo Q.B.P. Francisco Sánchez Velásquez por tu ayuda profesional y por que se que puedo contar contigo cuando lo necesite. Gracias.

A mis compañeros del Laboratorio de bioquímica y genética de microorganismos, porque de alguna u otra forma contribuyeron para que alcanzara esta meta.

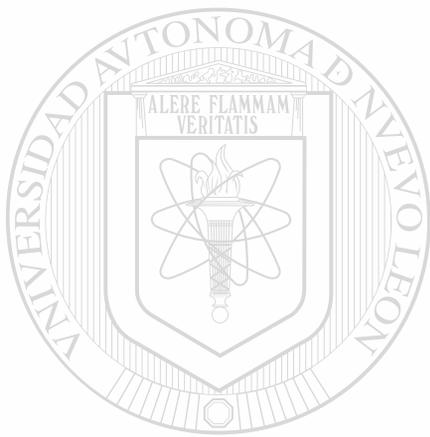
INDICE

Página de título	I
Comisión de tesis	II
Dedicatoria	IV
Agradecimientos	V
Índice	VI
Lista de figuras	VIII
Lista de tablas	IX
Lista de abreviaturas	XI
Resumen	1
Introducción	3
Antecedentes	6
Generalidades.	6
Historia de Aflatoxinas.	7
Factores que favorecen la infección por el hongo.	8
Efectos Biológicos de las Aflatoxinas.	9
Ácido Ciclopiazónico (CPA).	11
Efectos biológicos del CPA.	11
Efecto antifúngico de extractos de plantas.	13
Hipótesis	21
Objetivos	21
Material y Método	22
Microorganismos utilizados	22
Preparación del inóculo	22
Plantas utilizadas	22
Obtención de los extractos	22
Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).	23

Medio de cultivo	23
Condiciones simuladas de almacén.	24
Efecto de los extractos de plantas sobre la producción de toxinas.	25
Curva de Calibración	25
Determinación de aflatoxinas	25
Medio de cultivo	25
Condiciones simuladas de almacén	25
Extracción de aflatoxinas	26
Medio de cultivo	26
Condiciones simuladas de almacén	27
Cuantificación de aflatoxinas	27
Determinación de ácido ciclopiazónico	27
Curva de calibración	27
Medio de cultivo	28
Extracción de CPA	28
Análisis estadístico	29
Resultados	30
Discusiones	46
Conclusiones	52
Literatura citada	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Efecto inhibitorio de diferentes extractos metanólicos de plantas del género *Agave*.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.- Efectos biológicos de las aflatoxinas.
- Tabla 2.- Efecto de los extractos acuosos de *Agave asperrima* y *A. striata*, sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*.
- Tabla 3.- Efecto de los extractos etanólicos, de diferentes partes de *Agaves*, sobre el crecimiento de diferentes especies de *A. flavus* y *A. parasiticus*.
- Tabla 4.- Efecto de los extractos metanólicos, de las diferentes partes del *Agave*, sobre el crecimiento de diferentes especies de *A. flavus* y *A. parasiticus*.
- Tabla 5.- Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) en mg/ml, del crecimiento de dos especies de *Aspergillus* a las cuales se les agregaron diferentes extractos de *Agaves*.
- Tabla 6.- Concentraciones Mínimas Inhibitorias del crecimiento (mg/ml) de dos especies de *Aspergillus* a las cuales se les agregaron diferentes extractos de *Agaves*, en condiciones simuladas de almacén.
- Tabla 7.- Efecto en la producción de micelio, por parte de los extractos metanólicos, de los *Agaves* probados, en contra de las cepas fúngicas de *A. flavus* y *A. parasiticus*.
- Tabla 8.- Cantidad de micelio obtenido por dos cepas de *A. parasiticus* al crecer el hongo con diferentes concentraciones de los extractos.
- Tabla 9.- Efecto de los extractos metanólicos de *A. asperrima* y *A. striata* sobre la producción de aflatoxinas por la cepa 1273 de *A. flavus* en medio A&M.
- Tabla 10.- Efecto de los extractos metanólicos de *A. asperrima* y *A. striata* sobre la producción de aflatoxinas por la cepa 1299 de *A. flavus* en medio A&M.
- Tabla 11.- Efecto de los extractos metanólicos de *A. asperrima* y *A. striata* sobre la producción de aflatoxinas por la cepa 148 de *A. parasiticus* en medio A&M.

- Tabla 12.- Efecto de los extractos de *A. asperima* y *A. striata* sobre la producción de aflatoxinas por la cepa Su-I de *A. parasiticus* en medio A&M.
- Tabla 13.- Efecto de los extractos metanólicos de *A. asperima* y *A. striata* sobre la producción de aflatoxinas por la cepa 1273 de *A. flavus* en condiciones simuladas de almacén.
- Tabla 14.- Efecto de los extractos metanólicos de *A. asperima* y *A. striata* sobre la producción de aflatoxinas por la cepa 1299 de *A. flavus* en condiciones simuladas de almacén.
- Tabla 15.- Efecto de los extractos metanólicos de *A. asperima* y *A. striata* sobre la producción de aflatoxinas por la cepa 148 de *A. parasiticus* en condiciones simuladas de almacén.
- Tabla 16.- Efecto de los extractos metanólicos de *A. asperima* y *A. striata* sobre la producción de aflatoxinas por la cepa Su-I de *A. parasiticus* en condiciones simuladas de almacén.
- Tabla 17.- Efecto de los extractos metanólicos de *A. asperima* y *A. striata* sobre la producción de CPA por la cepa 1299 de *A. flavus*, en medio líquido.

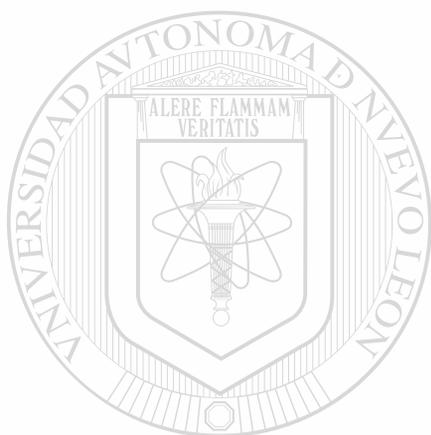
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

LISTA DE ABREVIATURAS

AFL	Aflatoxinas
A&M	Adyes & Mateles
cm	Centímetros
CMI	Concentración mínima inhibitoria
ctr	Control
conidias/ml	Conidias por mililitro
CPA	Ácido ciclopiazónico
°C	Grados centígrados
d	Días
δ	Delta
Fig.	Figura
g	Gramos
h	Horas
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
mg/ml	Miligramos por mililitro
µg/ml	Microgramos por mililitro
ml	Mililitros
µl	Microlitros
min	Minutos
mm	Milímetros
mM	Milimolar
N	Normal
N.L.	Nuevo León
ND	No detectado
ng/ml	Nanogramos por mililitro

No	Número
P₁	Peso del vial tarado
P₂	Peso del vial mas el extracto seco
PDA	Agar papa dextrosa.
rpm	Revoluciones por minuto



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

La presencia de micotoxinas en alimentos representa un peligro para la salud, ya que pueden causar diferentes enfermedades en humanos y animales. Dentro de los hongos productores de toxinas se encuentran *A. flavus* y *A. parasiticus*. Estos hongos frecuentemente contaminan diferentes granos y cereales, entre ellos el maíz. Diferentes especies de *Aspergillus* producen las aflatoxinas, a las cuales se les considera como el compuesto carcinogénico más potente que ocurre naturalmente. Además, se ha comprobado que *A. flavus* produce una toxina caracterizada químicamente como ácido ciclopiazónico, la cual aunque no se le considera carcinogénica, puede causar necrosis y alteraciones histopatológicas.

Existen algunos compuestos que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento y/o la producción de toxinas por *A. flavus* y *A. parasiticus*, sin embargo, dichos compuestos presentan características inadecuadas para su uso, como baja actividad, toxicidad, modificación de las propiedades organolépticas del producto, costo elevado, etc., por lo que resultaría de gran importancia la búsqueda de alternativas más efectivas contra el crecimiento de estos hongos y/o contra la producción de sus toxinas en alimentos, a fin de que no sean un riesgo para la salud humana ni afecten la calidad del producto terminado.

En el presente trabajo de investigación se utilizaron los extractos acuosos y alcohólicos de las plantas *Agave asperrima* y *A. striata*, para evaluar su efecto a diferentes concentraciones para obtener 25, 50 y 75% de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) sobre el crecimiento, la producción de aflatoxinas y ácido ciclopiazónico, en las cepas 1273, 1299 y 1059 de *Aspergillus flavus* y 148 y Su-I de *A. parasiticus*. El análisis de aflatoxinas se realizó mediante la Cromatografía Líquida de Alta resolución (HPLC) y la cuantificación del ácido ciclopiazónico (CPA) se realizó mediante medición

espectrofotométrica (580 nm), basada en la reacción colorimétrica con el reactivo de Erlich.

Los resultados *in vitro* obtenidos en medio líquido (A & M) indicaron que el extracto metanólico de la inflorescencia de *A. asperima* presentó mayor efecto inhibitorio del crecimiento de los hongos analizados, con una CMI de 0.5 a 2.0 mg/ml en las cepas probadas. En el caso de la inflorescencia de *A. striata*, se presentaron valores de CMI (1.0 a 2.0 mg/ml) ligeramente mayores al extracto de *A. asperima*. Cuando analizamos los extractos de los escapos de ambas especies de agaves encontramos que las CMI fueron de 15 a 30 mg/ml por lo tanto mostraron una menor actividad inhibitoria.

Las CMI obtenidas en condiciones simuladas de almacén (maíz) fueron mucho mayores que las observadas *in vitro*. En el caso del extracto de la inflorescencia de *A. asperima* encontramos que la CMI varió de 33 a 42 mg/ml. Para el caso de la inflorescencia de *A. striata* la CMI varió de 40 a 45 mg/ml. No se determinó la CMI de los extractos metanólicos de los escapos de ambas especies de Agaves debido a que fueron muy altas, alcanzando niveles superiores a los 60 mg/ml.

Con respecto al efecto de los extractos sobre la producción de toxinas se encontraron reducciones significativas ($p=0.05$) en la síntesis de aflatoxinas al agregar el 50% de la CMI. Al igual que con la síntesis de aflatoxinas, la producción de ácido ciclopiazónico disminuyó significativamente ($p=0.05$) al utilizar el 50 y 75% de la CMI.

INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son sustancias producidas por hongos filamentosos, las cuales pueden ser tóxicas o tener efectos adversos en los organismos que las consumen incluyendo hombres y animales (Edelefsen, M., *et al*, 2002). En años recientes, se le ha dado especial atención a las aflatoxinas las cuales son producidas por especies de *Aspergillus*, entre ellas *A. flavus* y *A. parasiticus* (Duncan, H.E., *et al*, 1997; Jarvis, B., 1971; Woloshuk, C.P., *et al*, 1996), debido a que existe suficiente evidencia de su alta toxicidad y su potencial carcinogénico en los organismos que las consumen (IARC S7). Aunque los efectos de las aflatoxinas varían de acuerdo a la dosis, exposición y estatus nutricional del individuo, estas toxinas pueden ser letales cuando son consumidas en grandes dosis (Edelefsen, M., *et al*, 2002). Se ha encontrado que las aflatoxinas pueden producir transformaciones carcinogénicas, además pueden provocar toxicidad aguda y crónica, produciendo daño al hígado (cirrosis), inducción tumoral y teratogénesis. Además, se ha reportado que pueden causar mortalidad o reducir la productividad en animales de granja (Cotty, P., *et al*, 1994; Guo, B.Z., 1994; Galvano, F.A., 1995).

La contaminación de alimentos agrícolas por hongos constituye un problema a nivel mundial. (Guo, B.Z., 1994; Peña D.S., 1990; Chu F.S., 1991). Los hongos pueden invadir los alimentos desde el campo o en el almacén. Durante la cosecha, el almacenamiento o en el mercadeo, hasta en su destino final, los granos y semillas están expuestos a sufrir daños físicos, por ejemplo, granos quebrados que favorecen las actividades de los hongos (Singh, H.N.P., 1993; Paster, N.M., *et al*, 1995). Además las deficiencias en el transporte de grandes volúmenes que permanecen mas tiempo en las zonas de producción y en ambientes húmedos que es donde se presentan las condiciones adecuadas para el desarrollo del hongo provocando una disminución de la calidad nutritiva y organoléptica en los alimentos invadidos (Peña, D.S., 1990).

Por su parte el ácido ciclopiazónico (CPA), es una toxina que aunque no se le considera carcinogénica, puede causar alteraciones histopatológicas como lesiones en el hígado, riñón, páncreas, bazo y corazón, en animales de laboratorio (Lansden, J.A., 1984). Además, puede originar pérdida de peso y aumento en la cantidad de colesterol, amilasa y lipasa sérica si se consume en cantidades subletales (Gqaleni, N., *et al.*, 1997). Se tienen reportes de la presencia de CPA en una gran variedad de productos como cacahuates, semillas de girasol, trigo, mijo, arroz, y además en diferentes tipos de queso y en sus derivados (Landsen, J.A. *et al.*, 1983, Balanchadran, C., *et al.*, 1995).

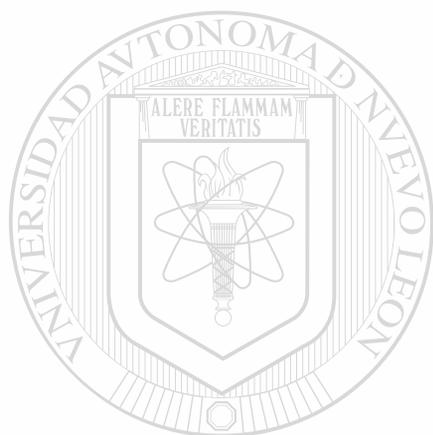
La combinación de micotoxinas tiene un impacto negativo aún mayor sobre la salud y la productividad en los animales domésticos y las aves en comparación a los efectos de una sola micotoxina.

Por lo tanto, todo alimento que se encuentre contaminado con estas toxinas, puede ser inhabilitado para su consumo. Esto ha originado que se produzcan cuantiosas pérdidas económicas ya que estos hongos están ampliamente distribuidos en la naturaleza y frecuentemente invaden productos alimenticios, como el maíz, almendras, pistachos, cacahuete, higo, semilla de girasol y otros granos (Dorner, J.W. *et al.*, 1984; Trial, F.N., *et al.*, 1995; Hesseltine, C.W., *et al.*, 1996; Gqaleni, N., *et al.*, 1997; Farr, D.F., *et al.*, 1989).

Para tratar de eliminar este tipo de micotoxinas, desde hace tiempo se han desarrollado métodos de detoxificación de los alimentos contaminados. Sin embargo, a pesar de los numerosos métodos que se han probado, ninguno es totalmente eficaz sin dañar las características organolépticas de los alimentos tratados (Galvano, F., *et al.*, 1995; Piva, G., 1995). Una alternativa que últimamente ha sido considerada es la de utilizar compuestos de origen vegetal, que tengan la habilidad de inhibir el crecimiento del hongo y/o la producción de sus toxinas (March, C.I., 1991; Gould, G.W., 1995).

El territorio Mexicano cuenta con una de las mayores diversidades vegetales a nivel mundial. Por lo que aprovechando esta riqueza florística, en este trabajo, nos

hemos dado a la tarea de analizar la actividad de Agavaceas del noreste de la República Mexicana, sobre la inhibición del crecimiento de *A. flavus* y de *A. parasiticus* y/o de la producción sus principales toxinas.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ANTECEDENTES

GENERALIDADES

La contaminación de alimentos agrícolas con hongos filamentosos es un problema mundial, ya que estos pueden invadir los productos desde el campo o en el almacén (Peña, S.D.B., 2001), además son capaces de sobrevivir en el suelo o en plantas muertas hasta la siguiente temporada de siembra (Vincelli, P., *et al*, 1996, Duncan, H.E., *et al*, 1997) y cuando se presentan condiciones apropiadas para su crecimiento, son capaces de producir micotoxinas (El Margay, S.S.M., 1995).

Estas micotoxinas son metabolitos que pueden producir daños en la salud del hombre y de los animales que las consumen (Ellis, W. O., *et al.*, 1991), y se pueden encontrar en granos y cereales (Miller, J.D., 1996). Por lo que resulta obvio que si se previene el crecimiento de estos hongos, se puede prevenir subsecuentemente la contaminación con estas toxinas.

Muchas de estas toxinas presentan propiedades carcinogénicas, nefrotóxicas, hepatotóxicas, mutagénicas y citotóxicas; pudiendo afectar muchos órganos y tejidos, siendo los más afectados el hígado, riñón, sistema nervioso, endocrino e inmune (Jarvis, B., 1971).

En años recientes se ha dado especial atención a las aflatoxinas, (Duncan, H.E., *et al.*, 1997) las cuales son micotoxinas producidas por especies del género *Aspergillus* (Guo, B.Z., 1994; Foster, P.L. *et al.*, 2001; Vincelli, P., *et al.*, 1996). Quizá esto sea debido, a que se ha demostrado su alta toxicidad (Guo, B.Z., 1994; Peña D.S., 1990; Chu F.S., 1991). A la fecha se tienen grandes avances en el conocimiento de sus efectos biológicos sobre los organismos (Foster, P.L., 2001; Hsu, I.C., 1991).

La presencia de estas toxinas representa un riesgo para la salud y también causa severas pérdidas económicas. De hecho Nichols, *et al*, en 1983 estimaron que las pérdidas por la presencia de aflatoxinas fueron por más de 4,000,000 de dólares en tres años, solamente en el sureste de los Estados Unidos de Norteamérica.

HISTORIA DE LAS AFLATOXINAS

Las aflatoxinas (cuyo nombre proviene de: *Aspergillus flavus* toxinas) son un grupo de metabolitos tóxicos que son producidos por ciertas cepas de los hongos *A. flavus* y *A. parasiticus*, (Ellis, W.O., *et al.*, 1991, Trial, F., *et al.*, 1995; Goldbatt, L.A., 1969; Foster, P.L., 2001) sin embargo, se tienen reportes de que *A. nomius*, es también capaz de producirlas, pero en menor cantidad (Ellis, W.O., *et al.*, 1991; Gourama, H., 1995).

Uno de los primeros reportes acerca de esta micotoxina se presentó en Inglaterra en 1960 (Zaika, L.L. *et al.*, 1987), cuando más de 100,000 pavos murieron aparentemente de una nueva enfermedad a la que se le denominó "enfermedad X del pavo" (Ellis, W.O., *et al.*, 1991 ; Holcomb, M., *et al.*, 1995). Pronto se encontró que esta enfermedad no era exclusiva de pavos ya que también fueron afectados patos y faisanes (Goldbatt, Z.A., 1969; Eaton, D.L., 1994). Un cuidadoso análisis de este brote mostró que estaba asociado con el consumo de harina de cacahuete "tóxica" que era utilizada como fuente de proteína. A finales de 1960 se especulaba que la naturaleza de esta toxicidad podría ser debida a la presencia de toxinas de origen fúngico (Goldbatt, Z.A., 1969; Fineley, J.W., 1992). En 1961, las toxinas fueron aisladas del alimento relacionado con la enfermedad X de los pavos mediante cromatografía en papel (Sergeant, K., *et al.*, 1961; Hartley, R.D., *et al.*, 1961) y posteriormente por cromatografía en capa fina (Nesbitt, B.F., *et al.*, 1963). Esta sustancia se encontraba en altas concentraciones en granos que eran utilizados como alimento de las aves mencionadas anteriormente (Goldbatt, L.A., 1969).

Para 1961, el hongo responsable fue identificado como *A. flavus*, y a la toxina detectada se le dio el nombre de aflatoxina (Goldbatt, L.A., 1969). Años mas tarde, Asao, T. *et al.*, (1965) encontraron que existían 4 principales tipos de aflatoxinas y determinaron la estructura química de las aflatoxinas B₁ y G₁. Posteriormente descubrieron que las AF B₂ y G₂ son dihidro-derivados de las primeras.

En 1970, Lillehoj, E.B., demostró que las aflatoxinas tenían capacidad tóxica y carcinogénica en animales de laboratorio. De la misma manera en 1972, Shank, R.C., *et al*, indicaron que en ciertas partes del mundo estas toxinas podían estar involucradas en la producción de cáncer de hígado en humanos.

En 1972, Butler, W.H., *et al*, alimentaron ratas con 5 ppm de aflatoxinas durante 6 semanas, encontrando después de este período, múltiples focos de células carcinogénicas.

En 1979, Groopman, J.D., *et al*, demostró que la aflatoxina B₁ era uno de los más potentes agentes carcinogénicos que ocurrían naturalmente, al demostrar que causaba daño hepático en la mayoría de especies de animales experimentales. Después, en 1985, Coulombe, *et al*, establecieron que las aflatoxinas producidas por cepas de *A. flavus* y de *A. parasiticus* eran consideradas los compuestos más carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos encontrados naturalmente en alimentos. Wogan, en 1992, hizo referencia a dos grandes factores de riesgo para contraer carcinoma hepatocelular, el virus de la hepatitis B y el consumo de aflatoxinas. Wismiewski, *et al*, en 1992 sugirieron la urgencia de desarrollar nuevos métodos que fueran más efectivos para el control de enfermedades post-cosecha.

Para 1993, muchos países habían introducido legislaciones para controlar el nivel de aflatoxinas en los alimentos.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

FACTORES QUE FAVORECEN LA INFECCIÓN POR EL HONGO

Para complicar más esto, los hongos pueden infectar granos de maíz que no están dañados físicamente, si la planta se encuentra estresada. Los factores más comunes de estrés, son por sustancias químicas y por altas temperaturas (Jones, R.K., 1980; Payne, G.A., 1986; Widstrom, N.W., *et al.*, 1990). De la misma forma Holmquist, *et al*, (1983) mencionaron que la incidencia y severidad de la contaminación con aflatoxinas, era altamente dependiente de las condiciones del medio ambiente. Se sabe que las más altas tasas de contaminación con estas toxinas,

se ha dado en temporadas con temperaturas normalmente por arriba del promedio, y por debajo del promedio de lluvias (Jones, R.K., *et al.*, 1981).

Otros factores que pueden incrementar el riesgo de contaminación con aflatoxinas incluyen deficiencia de nitrógeno, poblaciones excesivas de plantas y desarrollo pobre de raíces (Hamilton, P.B., 1971).

También se ha observado que otros medios de infección son mediados por daños causados por aves o insectos, los cuales proveen el sitio de infección, que son fácilmente colonizados por los hongos (Duncan, H.E., *et al.*, 1997; Lee, L.S., *et al.*, 1980; McMillan, W.W., *et al.*, 1985). Sin embargo, Anderson (1996) mencionó que el daño por insectos, no era un factor importante en la infección de *A. flavus*, pero que ciertamente está involucrados en la dispersión del hongo. Esto lo confirmó Payne, en 1992, quien mencionó que también podrían existir granos infectados, sin necesidad de presentar daños producidos por insectos.

EFFECTOS BIOLÓGICOS DE LAS AFLATOXINAS

La aflatoxina más común es la aflatoxina B₁, de la cual se tiene suficiente evidencia para catalogarla como un potente carcinogénico en humanos (Foster, P.L., 1983; Chu, F.S., 1991). Se ha observado que existe una correlación entre el nivel de contaminación con aflatoxinas y la incidencia de cáncer hepatocelular, en Uganda, Suecia, Tailandia y Kenia (IARC, 1982). Correlaciones similares entre el consumo de aflatoxinas y la muerte por cáncer hepatocelular también se han reportado en diferentes países de África y Asia (IARC 1987). En el sureste de los Estados Unidos, donde existe un promedio mayor de contaminación con aflatoxinas que en el resto de ese país, se tiene estimado que existe un incremento del 10% en cáncer hepatocelular. Sin embargo, además de cáncer hepático se ha comprobado que las aflatoxinas pueden causar otro tipo de neoplasias. En relación con esto Butler, en 1977 administró oralmente a ratas, harina de cacahuete contaminada con aflatoxinas y se demostró que se producía hepatocarcinoma, carcinoma estomacal, adenocarcinoma del colon y tumores en riñones. También se estableció que la

administración de dosis bajas de aflatoxinas en la dieta, inducía carcinomas en hamster. Igualmente se ha establecido que en el mono Rhesus causa carcinoma hepatocelular (IARC 1987).

Cuando la vía de administración de las aflatoxinas fue intragástrica se producían nódulos neoplásicos en el hígado de ratas (IARC, 1976). Intraperitonealmente inducían diversos tumores en ratas no natas y en sus madres (IARC, 1982). En ratones se indujeron tumores pulmonares si se administran por vía intraperitoneal (http://ntp_server.niehs.nih.gov/htdocs/ARC/know-carcinogen_hst.html). Además se ha demostrado que por vía subcutánea, las aflatoxinas inducen sarcomas en ratones y ratas (U.S. F.D.A. 2000).

Los efectos biológicos se han subdividido en las siguientes categorías:

Toxicidad	Patologías Asociadas	Mecanismo de Acción
Carcinogénesis	Cáncer de hígado, colon y riñón en animales	El intermediario 2,3-epoxy-AFB ₁ se une al ADN causando alteraciones en la transcripción.
Mutagénesis	Mutaciones por inserción de nucleótidos erróneos.	-Formación de 2,3-epoxy-AFB ₁ , proliferación celular anormal. - Inhibición de la DNA polimerasa.
Teratogénesis	Malformaciones	-Efecto teratogénico en las primeras etapas de la gestación.
Hepatotoxicidad	Toxicidad a células hepáticas. Causa hígado pálido, necrosis y hemorragia.	En la degradación se forman intermediarios tóxicos como: 2,3-epoxy-AFB ₁ .
Aflatoxicosis	Muerte, necrosis, enteritis hemorrágica (casualmente),	Envenenamiento por consumo de alimentos contaminado con

	reducción de crecimiento, reducción reproductiva, inmunosupresión.	Aflatoxinas incluyendo hemorragia, daño al hígado, edema, etc.
--	--	---

* Hocking, A. D. 1997; Ellis, W. O. *et al.* 1991; Gradelet, *et al.* 1997.

ACIDIO CICLOPIAZÓNICO (CPA)

Por su parte, el ácido ciclopiazónico (CPA), es un compuesto tóxico ácido indol-tetramérico, el cual fue primeramente aislado de cultivos de *Penicillium cyclopium* en 1968 por Holzapfel. Ahora se sabe que esta toxina puede ser producida por una diversidad de especies de hongos, los cuales incluyen a *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. versicolor* y *A. tamarii* (Dorner, J.W., *et al.*, 1984; Ohmomo, S., *et al.*, 1973). En 1977 Leistner, *et al* demostraron la presencia de esta toxina en carnes, jamón, salchichón y salchichas. Para 1978 Gallagher, *et al*, reportarían al CPA como un contaminante común en maíz. También en 1978 se reportó que 28 de 54 cepas aisladas de *A. flavus*, producían ambas toxinas, 2 cepas producen CPA y AFL's contra 18 cepas que solo producían aflatoxinas.

Se tienen reportes de la presencia de esta CPA en una gran variedad de productos como cacahuates, semillas de girasol, trigo, mijo, arroz, y además en diferentes tipos de queso y en sus derivados (Landsen, J.A., *et al.*, 1983, Balanchadran, C., *et al.*, 1995).

EFFECTOS BIOLÓGICOS DEL CPA

La toxicidad del CPA en animales de laboratorio varía de acuerdo a la especie (Jaskiewicz, K., *et al.*, 1988). Purchase, en 1971, estudió los efectos de la administración oral e intraperitoneal de esta toxina en ratas, encontrando lesiones degenerativas y necrosis en hígado, baso, páncreas, riñón, miocardio, glándulas salivales y músculo esquelético, así como cambios degenerativos en algunos otros órganos como el aumento de tamaño de núcleo en células de los conductos biliares.

En 1978 Gallagher, *et al*, mencionaron que el CPA formaba complejos con cationes metálicos lo cual podría ser un factor importante para su toxicidad *in vivo*. Por su parte en 1984 Rensburg, administró oralmente diferentes dosis de CPA en ratas, demostrando que esta toxina inducía cambios degenerativos en el miocardio y en algunos otros órganos se presentó un agrandamiento del núcleo de las células, que resultaba en necrosis de los mismos. Morrissey, *et al*, (1984) determinaron el efecto potencial del CPA en ratas preñadas y en el desarrollo fetal, determinando que las ratas que morían antes de concluir el experimento mostraban lesiones en hígado, bazo, riñones y otros órganos, mientras que en ratas no natas encontraron un retardo en la osificación del centro cervical y las vértebras caudales. También en 1984 Lomax, *et al*, encontraron que los principales órganos blanco en cerdos eran el tracto gastrointestinal y los riñones. De igual forma Nuehring, *et al*, un año más tarde, reportó efectos similares en los mismos órganos pero en perros.

En 1985 Nishe, encontró que el CPA presentaba muchas propiedades farmacológicas parecidas a las drogas antipsicóticas, demostrando que en ciertas dosis producían temblores, pérdida de reflejos, catalepsia, hipotermia, dispnea, entre otras y si la dosis era incrementada los ratones morían por presentar cianosis y convulsiones. En 1985 Morrissey, mencionó que la incidencia de CPA, representaba un problema potencial, ya que la toxina es producida por *A. flavus* que es uno de los principales constituyentes de la microflora de varios productos alimenticios. También en 1985, Rao, *et al* reportaron que la ingesta de CPA estaba involucrado en el envenamiento "kodua" que se ha presentado en humanos.

Sin embargo, Khera, *et al* en 1985 y Morrissey, en 1984, mencionaron que pese a sus efectos tóxicos, el potencial teratogénico del CPA es muy bajo. Además Jaskeiwicz, *et al* (1988), mencionaron que esta toxina mostró baja toxicidad en primates, ocasionando solo cambios moderados en hígado, retículo endoplásmico rugoso y corazón. Sin embargo un reporte en ese mismo año (1988) por Cullen, *et al*, demostró una alta toxicidad del CPA en pollos. En 1989 Kenneth, *et al*, no reportaron mortalidad en ratas con las dosis utilizadas, solamente reportaron

concentraciones incrementadas de creatinina (9 a 13 veces) y algo de daño en el hígado; por su parte Petr, *et al*, (1997), describieron una aceleración en la meiosis de oocitos de cerdo, provocados por estas toxinas, lo que podría traer como consecuencia transformaciones celulares.

EFFECTO ANTIFÚNGICO DE EXTRACTOS DE PLANTAS

Las plantas son una fuente importante de nuevos productos naturales (Cowan, M.M., 1999) ya que se ha reportado que una gran cantidad de compuestos extraídos de plantas tienen la habilidad de inhibir microorganismos (March, C.I., 1991; Aderiye, B.I., *et al*, 1996). De hecho Gould, G.W., (1995) hizo mención de que existían reportes de más de 1340 plantas que contenían compuestos, con actividad contra una amplia variedad de bacterias, levaduras y hongos. Las propiedades antimicrobianas de muchas plantas se han conocido y usado desde hace mucho tiempo. Recientemente estos compuestos naturales han tomado un gran auge, debido a la tendencia de usar productos naturales, eliminando sustancias químicas anteriormente utilizadas para la preservación de alimentos (March, C.I., 1991; Conner, D.E., 1993).

Bullerman, *et al* (1977) demostraron que los aceites esenciales de la canela y del clavo (aldehído cinámico y eugenol, respectivamente) podían tener efecto inhibitorio contra el crecimiento de *A. parasiticus* y la producción de aflatoxinas. Tiempo después (1980) Hitokoto, probó 29 especias en polvo, demostrando que algunas de ellas también tenían efecto inhibitorio sobre el crecimiento y la producción de toxinas de tres especies de *Aspergillus*, entre ellas *A. flavus*. En 1984, Shelef, y en 1989 Beuchat, *et al*, analizaron extractos de plantas, comúnmente utilizadas como agentes saborizantes y preservativos, para inhibir el crecimiento fúngico. Demostraron que algunas de estas, efectivamente, inhibían el crecimiento de los mismos.

Mabrouk, *et al* en 1980 probaron el efecto de la pimienta negra, canela, menta, comino, jengibre y clavo sobre el crecimiento y la producción de aflatoxinas

por *A. flavus* encontrando que el clavo inhibió por completo el crecimiento micelial y la producción de aflatoxinas a una concentración del 0.1%; por su parte, el extracto de comino y menta inhibieron la síntesis de aflatoxinas al 5 y 10% respectivamente. La pimienta negra y las hojas de jengibre a una concentración del 10% inhibieron completamente la formación de aflatoxinas. Los autores, hicieron hincapié que altas concentraciones de estos extractos estimularon el crecimiento micelial.

Buchanan, *et al*, en 1981 demostraron que el timol (aceite esencial de tomillo) a concentraciones superiores de 500 µg/ml tenía la capacidad de inhibir completamente el crecimiento de *A. parasiticus*, mientras que a concentraciones mas bajas producía una inhibición transitoria del crecimiento. En ese estudio la inhibición de la producción de aflatoxinas se dió a un grado menor que el crecimiento.

Continuando con la búsqueda de sustancias antifúngicas, de origen natural, en 1985, Gueldner, R.C., *et al*, encontraron que en la espiga del maíz se encontraban naturalmente compuestos volátiles, los cuales podían inhibir el crecimiento de *A. flavus*. Dos años mas tarde, Farag, *et al*, determinaron los

compuestos activos y su actividad contra *A. parasiticus*, de los aceites esenciales de tomillo, comino, clavo, alcaravea, romero y salvia. Ellos encontraron que los principales compuestos activos fueron timol, aldehído cinámico, eugenol, carvone, borneol y tujone. Una característica importante fue que todos los compuestos activos presentaron efecto inhibitorio tanto contra el crecimiento como contra la síntesis de aflatoxinas. Ellos determinaron que la efectividad mayor fue mostrada por el tomillo, luego el comino, clavo, alcaravea, romero y el menos efectivo fue la salvia.

En 1988 Paster, *et al* demostraron que extractos etanólicos del olivo a concentraciones de 0.5 y 1% inhibieron la producción de aflatoxinas sin inhibir el crecimiento fúngico. También en este año Yin, *et al* encontraron efectos inhibitorios sobre *A. flavus* al utilizar extractos acuosos de 7 plantas de la República de Taiwan.

En 1989 Onawunmi, mencionó que el aceite del zacate limón mostró buena actividad en contra del crecimiento de especies del género *Aspergillus*, y un efecto semejante fue reportado por Mishra, *et al*, en 1990 al analizar los extractos de hojas de 15 especies de plantas. En este estudio se encontró que las hojas de *Prunus persica* inhibió completamente el crecimiento de *A. flavus* y además se aisló la fracción activa del aceite esencial.

Balaacs, (1991) encontró que el aceite esencial de la semilla de comino presentó actividad *in vitro* en contra de *A. flavus*, y en otro trabajo similar, March, (1991), probó la actividad antimicrobiana de 22 especies de plantas contra 6 cepas bacterianas y 9 fúngicas que comúnmente contaminaban alimentos y cultivos. Se encontró en algunas de ellas efecto fungicida y bactericida contra algunos de los microorganismos probados, incluyendo *A. parasiticus*. Otros investigadores, en 1993 probaron 11 extractos acuosos de plantas medicinales contra 5 cepas fúngicas, entre ellas *A. flavus*, encontrando que los extractos de *Azadirachta indica* y *Ocimum sanctum*, detuvieron el crecimiento fúngico en comparación con el control. Ellos sugirieron que este efecto inhibitorio se debía a la presencia de compuestos como terpenos, aceites esenciales, ciertos alcaloides, esteroides, gomas, resinas y fenoles (Singh, M., *et al*, 1993).

En 1992 Balaacs, encontró que el aceite esencial de *Cinamomum caemphora* inhibía el crecimiento de *A. flavus* a una concentración de 4% p/v y mencionó que era tan potente como algunos conservadores sintéticos

En 1992 Bilgrami, *et al* demostraron la eficacia de la cebolla y ajo, así como del eugenol, para inhibir el crecimiento de hongos aflatoxigénicos en medio líquido y en granos de maíz. Ellos encontraron que el ajo tuvo un mayor efecto inhibitorio del crecimiento, en tanto que la cebolla fue la que presentó inhibición de la síntesis de aflatoxinas. Por su parte el eugenol fue el más efectivo en inhibir la producción de aflatoxinas en maíz.

Estos resultados coincidieron con lo encontrado por Balaacs, quién en 1993, encontró que el cumaldeído, principal constituyente de la semilla de comino,

actuó como fungitóxico en contra de *A. flavus*. En este mismo año también encontró que el zacate limón inhibió el crecimiento de *A. parasiticus*.

Patkar, *et al*, en 1993 determinaron el efecto sobre el crecimiento y la producción de aflatoxinas por los aceites esenciales de canela, clavo, almendra y cardamomo. Se encontró que la canela inhibía tanto el crecimiento como la síntesis de aflatoxinas, en tanto que la almendra y el cardamomo solo afectaron el crecimiento. Sin embargo, observaron que a bajas concentraciones, estos últimos aceites estimulaban la producción de aflatoxinas. Ellos finalmente sugirieron que los compuestos activos de la canela y del clavo pudieran considerarse para ser utilizados potencialmente como preservativos de granos.

Estos resultados también concordaron con trabajos realizados por Sinha, *et al*, (1993), donde probaron diferentes concentraciones del aceite esencial de canela, y se observó que a concentraciones superiores a 100 µg/ml se obtenía una reducción significativa de crecimiento de *A. flavus* y de la producción de sus toxinas. En este mismo año Cáceres, *et al* evaluaron el efecto de extractos etanólicos de 7 plantas americanas en contra de hongos patogénicos, entre ellos *A. flavus*, confirmando que la mayor actividad antifúngica se encontraba en las hojas y en los tallos de las plantas analizadas. Tiempo después, Alade, *et al* (1993) realizaron extractos acuosos, etanólicos, clorofórmicos y hexánicos de las hojas de *Acalypha wilkesiana*, las cuales mostraron actividad inhibitoria del crecimiento de *A. parasiticus*, encontrando que las CMI variaron de 0.25 a 32 mg/ml.

Otros investigadores continuaron probando plantas, tal como McCutcheon, *et al*, (1994), quienes analizaron 100 extractos de plantas y encontraron que 81 presentaron alguna actividad antifúngica contra 9 especies de hongos, incluyendo *A. flavus*. En ese mismo año Prasad, *et al*, demostraron que el extracto de hojas de *Amorphophallus campanulatus* (OL), tenía un efecto inhibitorio tanto en el crecimiento como en la síntesis de aflatoxinas, por *A. flavus*. Además determinaron que a una concentración de 3 mg/ml se inhibía completamente la síntesis de

aflatoxinas y el crecimiento del hongo se reducía considerablemente a partir de una concentración de 4.5 mg/ml.

Mahmoud, (1994) probó el efecto de 20 aceites esenciales sobre el crecimiento de *A. flavus* y la producción de aflatoxinas, encontrando que a concentraciones de 200 a 500 ppm se presentó una reducción significativa del crecimiento fúngico y de la síntesis de aflatoxinas. También en ese año Mishra, encontró que los aceites esenciales de *Cymbopogon citratus* presentaron actividad fungicida contra *A. flavus* a una concentración de 1000 ppm mencionando que esa actividad permanecía inalterada después de 7 meses de almacenaje.

Cuando Kandil, (1994) estudió a la planta *Thymus capitatus*, se estableció que el efecto inhibitorio del crecimiento de especies de *Aspergillus* obteniendo que fue debido a saponinas, resinas, flavonoides, aceites esenciales y aceites fijos presentes en esta planta. Otra planta probada por Masood, *et al*, (1994) mostró eficiencia contra estos hongos. Ellos establecieron que la actividad mostrada por *Capsicum annum* se debió a la capsantina y a la capsaicina. También demostraron que la primera inhibía completamente el crecimiento y la producción de aflatoxinas de *A. parasiticus* a concentraciones que iban de 0.2 a 1.0 mg/ml. Sin embargo, este efecto se redujo a los 10 días de crecimiento. Cuando se estudió a la capsaicina también se encontró efecto inhibitorio solo que fue menor que el observado por el otro compuesto.

Otro investigador que estudió extractos de especias fue el de El-Maraghy, S.S.M., (1995), quien demostró que algunas de ellas poseían compuestos antimicrobianos, sugiriendo su posible utilización como conservadores ya que con algunas plantas ellos observaron una inhibición total de la síntesis de aflatoxinas. Paster, *et al* en el mismo año determinaron las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) del crecimiento de *A. flavus* con los aceites esenciales de orégano y de tomillo. En ese estudio, el aceite esencial de tomillo fue el menos eficiente.

En 1996 Saxena, *et al* probaron compuestos aislados del aceite esencial de *Nepeta leucophylla* encontrando actividad inhibitoria del crecimiento de *A. flavus*. En

este mismo año Awuah, *et al*, demostraron la efectividad de los extractos de *Xylopiya aethiopica*, *Monodora myristica*, *Cinnamomum verum* y *C. pipernigrum*, los cuales permitieron el crecimiento fúngico pero suprimieron completamente la expresión del gen NOR, el cual es un regulador de la síntesis de aflatoxinas, en medio papa dextrosa agar.

Por otro lado, Kirmizigül, (1996), demostró que extractos metanólicos de las flores de *Cephalaria transsylvanica* inhibían tanto a bacterias como a hongos, entre estos a *A. parasiticus*. También en ese año Aderiye, identificó cuatro compuestos diferentes extraídos de la cáscara de camote (*Dioscorea alata*) con actividad antifúngica, estos compuestos se caracterizaron como β -sitosterol. En este mismo año Mallozzi, *et al*, encontraron una fuerte inhibición de la aflatoxina B1 al utilizar diferentes tipos de flavonoides extraídos de plantas.

Un año mas tarde, Bankole, demostró que el crecimiento de *A. flavus* disminuía progresivamente cuando se aumentaba la concentración de los aceites esenciales obtenidos de las hojas de *Morinda lucida* y de las hojas y semillas de *Azadiracta indica*. Además estos aceites podían reducir la síntesis de aflatoxinas en granos de maíz inoculado con el hongo. Ensayos similares fueron realizados por Montes-Belmont, *et al*, (1997), quienes determinaron el efecto de 11 aceites esenciales capaces de inhibir el crecimiento de *A. flavus* en maíz. Ellos encontraron que 7 de los 11 inhibieron totalmente al hongo. Utilizando varios parámetros López-Malo, (1997) mencionó que la vainillina junto a otros factores como el pH y la temperatura de incubación, tenían un efecto inhibitorio sobre especies de *Aspergillus*, entre ellas *A. flavus* y *A. parasiticus*. En este mismo año Montes-Belmont, realizó una búsqueda de extractos acuosos y hexánicos de 106 especies de plantas, mostrando que al menos 33 de estas presentaron efecto inhibitorio sobre la germinación de esporas o sobre el crecimiento fúngico de *A. flavus*. Además en 1998 y 1999 encontró que los aceites esenciales de canela, pimienta, orégano, epazote clavo y timol causaron una inhibición completa de la infección de granos de maíz por *A. flavus*.

También en 1999, en un reporte publicado por la Agencia Europea para la Evaluación de Productos Medicinales, se destacó el efecto antifúngico que poseían los extractos etanólicos de *Harungia madagascariensis* (sangre de Drago) sobre *A. flavus*. Ese mismo año, Mahmoud, determinó el efecto de cinco diferentes concentraciones de los extractos acuosos de *Lupinus albus*, *Ammi visnaga* y *Xanthium pungens* sobre la producción de aflatoxinas por *A. flavus*, en donde encontró que todas las plantas probadas inhibieron tanto el crecimiento micelial como la síntesis de estas toxinas.

Mahasneh, *et al* (1999) probaron extractos crudos realizados con éter de petróleo, etanol, butanol y agua de 9 plantas mostrando que los extractos butanólicos presentaron mayor efecto antifúngico contra *A. flavus*.

Fan, *et al* (1999) encontraron que los extractos etanólicos de una especie de cebolla presentaron efectos inhibitorios sobre el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* a una concentración de 10 mg/ml, además se presentó una reducción significativa de la síntesis de aflatoxinas a una concentración de 5 mg/ml.

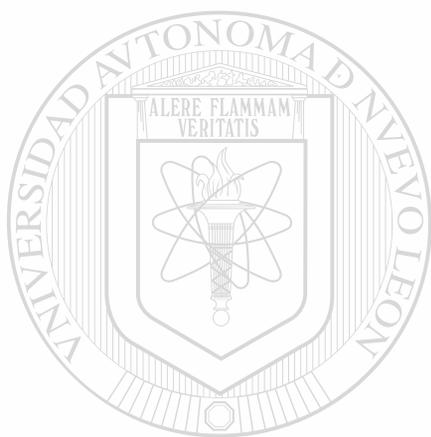
En el año 2000, Oh, mencionó que los extractos de *Portulaca oleracea* presentaban actividad antifúngica contra algunas especies del género *Aspergillus*, y

mas recientemente (2001), El-Shazly, *et al* realizaron una búsqueda de plantas cultivadas en Egipto que contenían alcaloides demostrando que poseían una actividad inhibitoria contra *A. flavus*. En este mismo año Jayaprakasha, *et al*

realizaron extractos hexánicos de la curcumina encontrando actividad antifúngica contra *A. flavus* y *A. parasiticus*, y Srinivasan, (2001) estudió la actividad antimicrobiana de 50 plantas medicinales y demostró que solo 9 mostraron efecto antifúngico en contra de *A. flavus*. Además, Varma, *et al* probaron los aceites esenciales de *Caesulia axillaris* y *Mentha arvensis* a una concentración de 1,300 y 600 ppm respectivamente, encontrando que fueron sumamente eficaces en detener el biodeterioro de trigo almacenado.

Aunque hay muchos trabajos en donde se han buscado plantas con potencial inhibitorio contra *Aspergillus* y/o la producción de sus toxinas, en nuestro país han

sido sumamente escasos, y dado que el territorio Mexicano cuenta con una de las mayores diversidades vegetales a nivel mundial, por su clima, tipo de suelo y a la actividad orogénica, es por demás obligado el estudio de plantas de nuestro país con estas propiedades, por lo que en el presente trabajo nos propusimos tratar este aspecto.



UANL

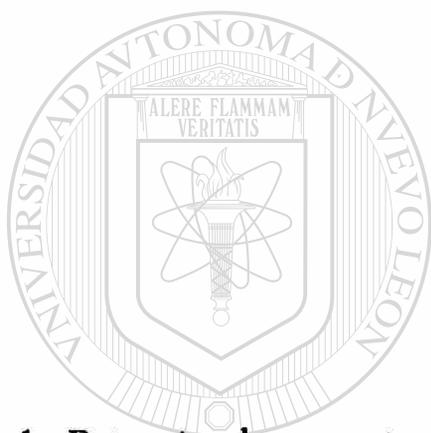
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

HIPÓTESIS DEL TRABAJO

Los extractos alcohólicos de *Agave asperrima* y *A. striata*, tienen la capacidad de inhibir el crecimiento y/o la producción de aflatoxinas y de ácido ciclopiazónico, en *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*, *in vitro* y en condiciones simuladas de almacén.



OBJETIVOS

1.- Determinar las concentraciones mínimas inhibitorias de los extractos activos contra

A. flavus y *A. parasiticus*.

2.- Determinar la capacidad de los extractos del género *Agave*, para inhibir la producción de aflatoxinas y ácido ciclopiazónico, *in vitro* y en condiciones simuladas de almacén.

MATERIAL Y MÉTODO

MICROORGANISMOS UTILIZADOS.

Se utilizaron las cepas 1273, 1299 y 1059 de *Aspergillus flavus* y 148 y Su-I de *A. parasiticus*; las cuales fueron donadas por el Dr. Deepak Bhathnagar del Centro Regional de Investigación del Sureste del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA). Estas cepas se almacenaron en medio Agar Papa Dextrosa (PDA) a 4° C, haciendo resiembras periódicas cada 4 meses.

PREPARACIÓN DEL INÓCULO:

Las cepas fúngicas fueron cultivadas en PDA por 7 días a 28°C. Después del periodo de incubación, se realizó un lavado de conidias, agregando 1 ml de amortiguador de fosfatos pH 7.2, 30 mM, que contenía Tween 20 al 0.05%. La suspensión fue obtenida realizando una leve agitación de los tubos, para desprender las conidias del micelio, posteriormente se realizaron conteos en una cámara de Newbauer para ajustar esta suspensión a una concentración de 2.5×10^7 conidias/ml (Bullerman, L. 1977).

PLANTAS UTILIZADAS

Las plantas utilizadas fueron *Agave asperima* y *A. striata*. La primera fue colectada en la Huasteca N.L. y la segunda en el cerro del Fraile en García N.L. Estas fueron identificadas en el Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por el Biólogo Marco Antonio Guzmán Lucio.

OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

Los solventes utilizados para la obtención de los extractos fueron metanol, etanol y amortiguador de fosfatos pH 7.3, 30 mM. Para esto se pesaron 20 g (peso

húmedo) de las diferentes partes de la planta (hojas, raíz, escapo e inflorescencia) y se les agregaron 100 ml de alguno de los solventes antes mencionados. La planta fue triturada en una licuadora por aproximadamente 3 min, hasta que quedó en trozos pequeños. El triturado se pasó a frascos de vidrio con tapón de rosca, dejándolos macerar por 24 h a temperatura ambiente para el caso de los extractos alcohólicos y para los extractos acuosos (con amortiguador de fosfatos) 14-16 h a una temperatura de 4°C. El solvente fue separado por centrifugación a 3500 rpm por 15 min. El sobrenadante fue filtrado utilizando papel Wathman No. 1. Los extractos obtenidos fueron concentrados, utilizando un Rotavapor (Büchi; 3000 A), y posteriormente se colocaron en una estufa a una temperatura de entre 37 a 40 °C para evaporar totalmente el solvente y de esta manera concentrarlo hasta sequedad. Los extractos fueron reconstituídos en agua destilada y se esterilizaron por filtración con una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm. Ya estériles se almacenaron en oscuridad a -20 °C hasta su uso.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) EN EL CRECIMIENTO.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

a) EXTRACTOS AÑADIDOS AL MEDIO DE CULTIVO.

Se utilizaron los extractos de *Agaves* que exhibieron actividad antifúngica en trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio. A estos extractos se les determinó la CMI en caldo A&M (Sacarosa 50gr, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 gr, KH_2PO_4 10 gr, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 gr, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0.7 mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.3 mg, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.11 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 17.6 mg, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.5 mg y $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 mg) utilizando la metodología siguiente:

Primero se determinó la concentración del extracto a probar. Para esto se pesó un vial previamente tarado (P_1), al cual se le agregó 1 ml del extracto deseado, se pasó a una estufa a 50 °C por un tiempo de 4 - 7 días, hasta que se obtuvo el peso constante del vial mas el extracto seco (P_2). Utilizando la fórmula $P_2 - P_1$ (peso del vial mas el extracto seco menos el peso del vial tarado) se obtuvo la cantidad en mg/ml del extracto.

Una vez conociendo esa concentración se inocularon matraces que contenían 25 ml de caldo A&M, con una suspensión de conidias ajustadas a una concentración final de 1×10^6 conidias/ml. A cada uno de estos matraces, se les agregaron diferentes concentraciones de los extractos, se añadieron rangos amplios de concentraciones (1, 10, 20, 30, 40 y 50 mg/ml), después fueron acortados a intervalos de 0.5 mg/ml, hasta obtener la concentración mínima en la cual se presentó inhibición completa (100%) del crecimiento fúngico (CMI). Se realizaron observaciones diarias de la producción de micelio expresada por la gelificación del medio y la conidiogénesis de las cepas fúngicas probadas durante todo el tiempo de incubación (7 días).

b) CONDICIONES SIMULADAS DE ALMACÉN.

Se utilizaron placas de Petri con 3 divisiones, a las que se les agregaron 5 gr de maíz (previamente desinfectado con hipoclorito de sodio al 0.5% y secado a 45 °C por 8h), en cada una de las divisiones. El maíz fue inoculado de la manera previamente descrita para medio líquido, agregando concentraciones conocidas de extractos, partiendo de la CMI obtenida previamente en medio líquido. La CMI para el maíz fue definida de la misma forma que para el medio líquido.

EFFECTO DE LOS EXTRACTOS DE PLANTAS SOBRE LA SÍNTESIS DE TOXINAS DE *Aspergillus*.**A.- DETERMINACIÓN DE AFLATOXINAS****a) CURVA DE CALIBRACIÓN.**

Se realizó una curva de calibración inyectando diferentes concentraciones de los estándares de la aflatoxinas B1, B2, G1 y G2, ajustando su concentración a 0.08, 0.8, 2.4, 4 y 8 ng/ml las cuales se utilizaron para determinar las concentraciones de los problemas analizados.

b) CULTIVO

El inóculo fue preparado de la manera previamente descrita, de ahí se tomaron 250 µl de esta suspensión (2.5×10^8 conidias/ml) y se inocularon en matraces conteniendo 25 ml de medio A&M, a los cuales se les había agregado previamente concentraciones de los extractos correspondientes a 0, 25, 50 y 75% de la CMI. Los matraces fueron incubados estáticos y en la oscuridad a 28°C por 7 días.

El crecimiento del hongo se registró visualmente cada 24 h, durante todo el tiempo de incubación.

Después de este periodo se determinó el peso seco del micelio de la siguiente manera: el cultivo se filtró utilizando papel Wathman No. 1 previamente tarado y pesado, para separarlo del medio, después el micelio se secó a 50°C por 7 días para determinar el peso del micelio seco. El sobrenadante fue utilizado para determinar si se presentó efecto sobre la síntesis de toxinas.

c) CONDICIONES SIMULADAS DE ALMACEN

Para las condiciones simuladas de almacén se inocularon (1×10^6) 5 gr de maíz previamente desinfectado con hipoclorito de sodio al 0.5%, incubándolos durante 14 días a 28 °C, a los cuales se les había agregado concentraciones de los extractos correspondientes a 0, 25, 50 y 75% de la CMI.

El crecimiento del hongo se registró visualmente cada 24 h, durante todo el tiempo de incubación.

Para determinar el efecto de los extractos sobre la síntesis de toxinas se realizó la extracción de las mismas.

d) EXTRACCIÓN DE AFLATOXINAS DEL MEDIO LÍQUIDO

Después del periodo de incubación, se agregaron 25 ml de acetona y 35 ml de diclorometano a los matraces y se agitaron a 300 rpm durante 30 min a temperatura ambiente. El micelio fue removido de la mezcla filtrándolo con papel Wathman No.1 previamente tarado y adicionando 25 ml más de diclorometano. El micelio se pasó a una estufa a 40°C para determinar el peso seco.

El filtrado obtenido fue particionado en un embudo de separación en dos fases, una acuosa y otra de diclorometano, esta última contenía la mayoría de las aflatoxinas. La fase acuosa fue particionada una vez mas con 35 ml de diclorometano. Se combinaron las dos fracciones de diclorometano y fueron nuevamente particionadas con 25 ml de una solución saturada de NaCl. El agua residual fue removida de la solución final de diclorometano haciendo pasar esta por 3 gr de sulfato de sodio anhidro. La solución fue evaporada a sequedad utilizando un rotavapor. El residuo obtenido fue resuspendido en 10 ml de acetonitrilo. Posteriormente esa solución se hizo pasar a través de una columna purificadora y concentradora de fase reversa Supelclean LC-18, de la cual se eluyeron las aflatoxinas utilizando 3 ml de

diclorometano. Este fue evaporado a 35°C y el residuo fue nuevamente resuspendido en acetonitrilo, el cual fue inyectado al HPLC.

e) EXTRACCIÓN DE AFLATOXINAS DEL MAÍZ (CONDICIONES SIMULADAS DE ALMACÉN)

El maíz fue triturado en presencia del solvente primario de extracción (acetona). La metodología subsiguiente de purificación de toxinas se realizó de la manera previamente descrita para el medio líquido.

f) CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS

Se tomaron 200 µl de la solución obtenida en la extracción previamente descrita, tanto del medio líquido como de las condiciones simuladas de almacén, los cuales se mezclaron con 500 µl de una solución derivatizadora (100 µl de ácido trifluoroacético, 50 µl de ácido acético glacial y 350 µl de agua ultra pura). Esta mezcla se calentó a 65 °C por 10 min, y se dejó reposar hasta que alcanzó la temperatura ambiente. Se inyectaron 20 µl de la solución derivatizada al HPLC y se corrió la muestra bajo las siguientes condiciones: La fase móvil estuvo compuesta por una mezcla de Agua, Metanol y Acetonitrilo en una proporción de 63:26:11, con un flujo de 1 ml/min. La columna utilizada fue de fase reversa marca Waters de una longitud de 15 cm además se utilizó una precolumna de 2 cm LC-18 de fase reversa marca Waters como protección adicional.

Las curvas obtenidas fueron comparadas con la curva estándar previamente obtenida, en la cual se determinó la concentración de toxinas presentes en los ensayos.

B.- DETERMINACIÓN DE ÁCIDO CICLOPIAZÓNICO (CPA)**a) CURVA DE CALIBRACIÓN.**

Se realizó una curva de calibración utilizando un estándar de ácido ciclopiazónico, del cual se realizaron diluciones para obtener concentraciones finales de 5, 10, 20, 30, 40 y 50 µg/ml. Estas concentraciones fueron colocadas en una serie de tubos de ensaye, que contenían 2 ml de p-dimetilaminobenzaldehído, después de esto fueron agitados vigorosamente. Finalmente se adicionaron 10 ml de HCl 5 N, se dejaron reposar y el color desarrollado fue leído en un espectrofotómetro a 580 nm.

b) CULTIVO

El inóculo fue preparado de la manera previamente descrita, de ahí se tomaron 100 ml de esta suspensión y se inocularon en tubos de ensaye conteniendo 10 ml de medio Czapek Dox, a los cuales se les había agregado previamente concentraciones de los extractos correspondientes a 0, 25, 50 y 75% de la CMI. Los tubos fueron incubados a 28°C por 14 días.

Después de este periodo el cultivo se filtró utilizando papel Wathman No. 1. El sobrenadante fue utilizado para determinar si se presentó efecto sobre la síntesis de CPA.

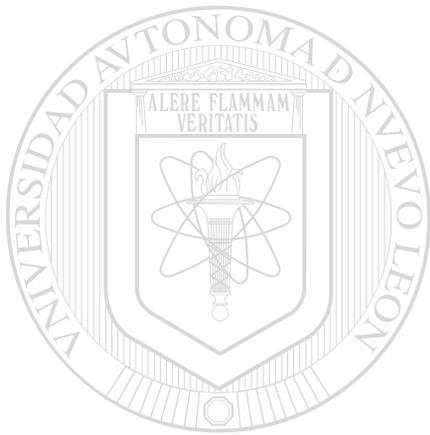
c) EXTRACCIÓN DE CPA

Después del periodo de incubación, se realizó la extracción del CPA agregando 2 veces 10 ml de metanol. Un ml de las toxinas extraídas fue colocado en tubos de ensaye, y fueron mezclados con p-dimetilaminobenzaldehído y HCl 5N, siendo leídos a 580 nm en un espectrofotómetro Sequoia-Turner (Chang-Yen, I., *et al*, 1990), de la forma previamente descrita. La cantidad de CPA fue determinada por medio de la

interpolación en la curva estándar previamente obtenida, en la cual se determinó la concentración de toxinas presentes en los ensayos. (Rathinavelu, A. *et al*, 1984).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los ensayos se realizaron con tres repeticiones y por duplicado y se manejó el paquete estadístico Sigma Stat realizando comparaciones múltiples de medias de los tratamientos Vs el control utilizando la prueba de Dunnett.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESULTADOS

EFFECTO DE LOS EXTRACTOS CONTRA EL CRECIMIENTO FÚNGICO

En el presente estudio, las diferentes partes de las plantas utilizadas (hojas, escapo e inflorescencia), fueron sometidas a extracción con tres diferentes solventes (agua destilada, alcohol etílico y alcohol metílico). Los extractos positivos fueron aquellos que presentaron inhibición del crecimiento alrededor de la zona de aplicación del extracto (Fig. 1).



- 1.- Inflorescencia *A. striata*.
- 2.- Inflorescencia *A. asperima*.
- 3.- Escapo *A. striata*.
- 4.- Escapo *A. asperima*.
- 5.- Hoja *A. striata*.
- 6.- Hoja *A. asperima*.
- 7.- Control

Fig 1.- Efecto inhibitorio de diferentes extractos metanólicos de plantas del género *Agave*

Los extractos acuosos, etanólicos y metanólicos realizados de las hojas y de la raíz de *A. striata* y *A. asperima* no presentaron efecto inhibitorio contra ninguna de las cepas fúngicas probadas (Tablas 2,3 y 4). Sin embargo, encontramos que los extractos alcohólicos de la inflorescencia y el escapo de ambos agaves presentaron efecto inhibitorio sobre todas las cepas fúngicas probadas. (Tablas 2,3 y 4). Los extractos acuosos del escapo de los dos agaves no mostraron ningún efecto biológico (Tabla 2).

Tabla 2.- Efecto de los extractos acuosos de *Agave asperima* y *A. striata*, sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*.

Planta	Parte utilizada	Cepas fúngicas				
		<i>A. flavus</i>			<i>A. parasiticus</i>	
		1273 (cm)*	1299 (cm)	1059 (cm)	148 (cm)	Su-I (cm)
<i>A. asperima</i>	Raíz	NI	NI	NI	NI	NI
	Hojas	NI	NI	NI	NI	NI
	Escapo	NI	NI	NI	NI	NI
	Inflorescencia	1.0±0.6**	1.21±0.8	1.6±0.2	1.4±0.12	1.28±0.5
<i>A. striata</i>	Raíz	NI	NI	NI	NI	NI
	Hojas	NI	NI	NI	NI	NI
	Escapo	NI	NI	NI	NI	NI
	Inflorescencia	1.13±0.2	1.35±0.4	1.26±0.8	1.41±0.4	1.36±0.6

*.- Inhibición en cm.

**.- Error estándar de la media, NI.- No Inhibición.

Nota.- El control con agua no presentó efecto inhibitorio contra las cepas probadas.

Establecimos que el extracto metanólico, fue el más efectivo, ya que presentó los halos de inhibición mayores [(2.65 – 3.1 cm de diámetro) (tablas 2 y 3)].

Por otro lado los extractos etanólicos y metanólicos del escapo de *A. asperima* y de *A. striata*, también inhibieron el crecimiento de las cepas fúngicas probadas, mas sin embargo lo hicieron en un rango mucho menor en comparación con los extractos de la inflorescencia (Tablas 2 y 3).

Tabla No. 3.- Efecto de los extractos etanólicos, de diferentes partes de *Agaves*, sobre el crecimiento de diferentes especies de *A. flavus* y *A. parasiticus*.

Planta	Parte utilizada	Cepas fúngicas				
		<i>A. flavus</i>			<i>A. parasiticus</i>	
		1273 (cm)	1299 (cm)	1059 (cm)	148 (cm)	Su-I (cm)
<i>A. asperima</i>	Raíz	NI	NI	NI	NI	NI
	Hojas	NI	NI	NI	NI	NI
	Escapo	0.5±0.1*	0.37±0.2	0.3±0.5	0.7±0.3	0.1±0.06
	Inflorescencia	1.3±0.4	1.24±0.8	1.1±0.1	1.2±0.5	1.36±0.3
<i>A. striata</i>	Raíz	NI	NI	NI	NI	NI
	Hojas	NI	NI	NI	NI	NI
	Escapo	0.3±0.1	0.51±0.3	0.1±0.012	0.2±0.09	0.1±0.03
	Inflorescencia	1.2±0.5	1.22±0.4	1.4±0.6	1.5±0.8	1.3±0.45

*.- Error estándar de la media. NI.- No Inhibición

Nota.- El control con etanol no presentó efecto inhibitorio contra las cepas probadas.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla No. 4.- Efecto de los extractos metanólicos, de las diferentes partes del *Agave*, sobre el crecimiento de diferentes especies de *A. flavus* y *A. parasiticus*.

Planta	Parte utilizada	Cepas fúngicas				
		<i>A. flavus</i>			<i>A. parasiticus</i>	
		1273 (cm)	1299 (cm)	1059 (cm)	148 (cm)	Su-I (cm)
<i>A. asperri</i>	Raíz	NI	NI	NI	NI	NI
	Hojas	NI	NI	NI	NI	NI

	Escapo	0.2±0.05	0.15±0.06	0.52±0.2	0.34±0.1	0.29±0.5
	Inflorescencia	2.65±0.8	2.85±0.2	2.9±0.39	3.1±0.55	2.98±0.7
<i>A. striata</i>	Raíz	NI	NI	NI	NI	NI
	Hojas	NI	NI	NI	NI	NI
	Escapo	0.5±0.05	0.4±0.21	0.61±0.3	0.5±0.28	0.43±0.19
	Inflorescencia	2.7±0.5	2.5±0.8	2.51±0.49	2.78±0.6	2.9±0.4

*.- Error estándar de la media. NI.- No Inhibición

Nota.- El control con metanol no presentó efecto inhibitorio contra las cepas probadas.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA

A) MEDIO LÍQUIDO.

Debido a que los extractos metanólicos mostraron un mayor efecto inhibitorio contra las cepas fúngicas probadas, se decidió trabajar únicamente con este tipo de extractos, tanto de las inflorescencias como de los escapos de ambas especies de Agaves. Utilizando estos extractos (escapo e inflorescencia) se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del crecimiento, en las cepas

de *A. flavus* y *A. parasiticus*. Observamos que las CMI obtenidas por los extractos metanólicos de la inflorescencia de los Agaves fueron mas bajas que las presentadas por los escapos (Tablas 5 y 6).

La cepa más susceptible al extracto de la inflorescencia de *A. asperima* fue la 1273 de *A. flavus*, con una CMI de 0.5 mg/ml, seguida por las cepas restantes, quienes tuvieron, una CMI de 1.0 mg/ml (Tabla 5). En el caso del extracto metanólico de la inflorescencia de *A. striata*, este presentó CMI superiores a las del extracto de *A. asperima*, siendo la menor (1.0 mg/ml) para las cepa 148 y Su-I de *A. parasiticus*, seguidas de 1.5 mg/ml para las cepas 1273 y 1299 de *A. flavus*, y la CMI mas alta fue (2.0 mg/ml) obtenida por la cepa 1299 de *A. flavus*. (Tabla 5). Cuando analizamos los extractos de los escapos de ambas especies de agaves encontramos

que las CMI fueron mucho más elevadas, siendo de 15 mg/ml a 23 mg/ml (tabla 5). Los extractos metanólicos del escapo de *A. striata* obtuvieron CMI que fueron de 20 a 30 mg/ml (Tabla 5).

Tabla No. 5.- Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) en mg/ml, del crecimiento de dos especies de *Aspergillus* a las cuales se les agregaron diferentes extractos de *Agaves*.

		Cepas fúngicas				
		<i>A. flavus</i>			<i>A. parasiticus</i>	
Planta	Parte utilizada	1273 mg/ml	1299 mg/ml	1059 mg/ml	148 mg/ml	Su-I mg/ml
<i>A. asperima</i>	Escapo	20±3.5*	19±6.1	20±3.2	22±2.2	23±3.1
	Inflorescencia	0.5±0.04	1.0±0.32	1.0±0.21	1.0±0.14	1.0±0.1
<i>A. striata</i>	Escapo	20±1.6	30±4.1	20±4.8	23±2.8	25±1.9
	Inflorescencia	1.5±0.53	2.0±0.4	1.5±0.1	1.0±0.1	1.0±0.2

*.- Error estándar de la media.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

b) CONDICIONES SIMULADAS DE ALMACÉN. ®

Las CMI obtenidas fueron mucho mayores que aquellas observadas en medio líquido. En el caso del extracto de la inflorescencia de *A. asperima* encontramos que la CMI varió de 33 a 42 mg/ml. Para el caso de la inflorescencia de *A. striata* la CMI varió de 40 a 45 mg/ml (Tabla 6). No se determinó completamente la CMI de los extractos metanólicos de los escapos de ambas especies de agaves debido a que fueron muy altas alcanzando niveles superiores a los 60 mg/ml (Tabla 6).

Tabla No 6.- Concentraciones Mínimas Inhibitorias del crecimiento (mg/ml) de dos especies de *Aspergillus* a las cuales se les agregaron diferentes extractos de *Agaves*, en condiciones simuladas de almacén.

		Cepas fúngicas				
		<i>A. flavus</i>		<i>A. parasiticus</i>		
Planta	Parte utilizada	1273 mg/ml	1299 mg/ml	1059 mg/ml	148 mg/ml	Su-I mg/ml
<i>A. aspergillum</i>	Escapo	>60	>60	>60	>60	>60
	Inflorescencia	33 ±4.95*	40±5.7	35±6.2	42±6.8	35±4.6
<i>A. striata</i>	Escapo	>60	>60	>60	>60	>60
	Inflorescencia	40±5.8	45±3.7	41±2.9	45±4.2	43±6.1

*.- Error estándar de la media.

EFFECTO DE LOS EXTRACTOS DE AGAVES SOBRE EL CRECIMIENTO DE LOS HONGOS

EN MEDIO LÍQUIDO

Para determinar el efecto de los extractos metanólicos de los Agaves, sobre el crecimiento fúngico, se tomaron como base las CMI obtenidas en medio líquido y de aquí se utilizaron el 25, 50 y 75% de las mismas. Estos resultados se resumen en la tabla No 7, en donde podemos apreciar una disminución aparente del crecimiento fúngico a medida que se van incrementando las concentraciones del extracto aplicado. Mas sin embargo, solamente la concentración del 75 % de la CMI mostró reducciones estadísticamente significativas ($p=0.05$) en el crecimiento de los hongos. Este comportamiento lo apreciamos en casi todas las cepas fúngicas probadas, este efecto solo fue observado en el caso de las cepas 148 y Su-I de *A.*

parasiticus, donde no se encontró diferencia significativa al utilizar únicamente el extracto de *A. asperima*. (Tabla No 7).

Tabla 7.- Efecto en la producción de micelio, por parte de los extractos metanólicos, de los Agaves probados, en contra de las cepas fúngicas de *A. flavus* y *A. parasiticus*.

Cepa fúngica	Planta	Extracto agregado (concentraciones de la CMI)				
		Control 0% (mg/ml)	25% (mg/ml)	50% (mg/ml)	75% (mg/ml)	
<i>A. flavus</i>	1273	<i>A. asperima</i>	0.304±0.05*	0.270±0.03	0.175±0.02	0.091±0.01
		<i>A. striata</i>	0.2951±0.01	0.298±0.03	0.2055±0.04	0.0924±0.01
	1299	<i>A. asperima</i>	0.281±0.04	0.272±0.03	0.244±0.04	0.117±0.04
		<i>A. striata</i>	0.275±0.03	0.268±0.04	0.246±0.04	0.163±0.01
	1059	<i>A. asperima</i>	0.361±0.03	0.301±0.03	0.264±0.01	0.104±0.02
		<i>A. striata</i>	0.381±0.04	0.262±0.03	0.231±0.03	0.151±0.02
<i>A. parasiticus</i>	148	<i>A. asperima</i>	0.358±0.04	0.310±0.02	0.238±0.01	0.218±0.06
		<i>A. striata</i>	0.2919±0.03	0.286±0.03	0.2379±0.01	0.059±0.02
	Su-I	<i>A. asperima</i>	0.316±0.02	0.300±0.02	0.23±0.01	0.214±0.04
		<i>A. striata</i>	0.309±0.05	0.291±0.01	0.301±0.006	0.065±0.01

*.- Error estándar de la media.

La cantidad de micelio obtenido por 25 ml de medio varió entre las cepas al agregar diferentes concentraciones del extracto. Encontramos diferencias significativas ($p=0.05$) ($p=0.05$) en las cepas 148 y Su-I de *A. parasiticus*, al utilizar el 75 % de la CMI. (Tabla No. 8)

Tabla No. 8.- Cantidad de micelio obtenido por dos cepas de *A. parasiticus* al crecer el hongo con diferentes concentraciones de los extractos.

Cepa Fúngica		Planta	Extracto agregado (concentraciones de la CMI)			
			Control 0% (mg/ml)	25% (mg/ml)	50% (mg/ml)	75% (mg/ml)
<i>A. parasiticus</i>	148	<i>A. asperirma</i>	0.358±0.04*	0.310±0.02	0.238±0.01	0.218±0.06
		<i>A. striata</i>	0.2919±0.03	0.2861±0.03	0.2379±0.01	0.059±0.02
	Su-I	<i>A. asperirma</i>	0.316±0.02	0.300±0.02	0.23±0.01	0.214±0.04
		<i>A. striata</i>	0.309±0.05	0.2913±0.01	0.301±0.006	0.065±0.01

*Error estándar de la media .

CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS

Se utilizaron las curvas de calibración antes descritas para obtener las concentraciones de aflatoxinas de nuestros tratamientos, realizados tanto en medio líquido como en condiciones simuladas de almacén, encontrando los siguientes resultados: para la cepa 1059 de *A. flavus*, no se produjeron cantidades detectables de aflatoxinas, por lo cual no se probó en los ensayos subsecuentes.

La cepa 1273 de *A. flavus* solo sintetizó las aflatoxinas B1 y B2, de las cuales la B2 fue la que se produjo en mayor cantidad, y no se detectaron las aflatoxinas G1 y G2. Cuando a las cepas fúngicas se les agregaron diferentes concentraciones de los extractos, se observó una reducción significativa en la síntesis de aflatoxinas (con el 50 y el 75% de la CMI). Establecimos que el grado de inhibición de la aflatoxina B1 fue del 75 y 96% al utilizar el 50 y 75 % de la CMI y para el caso de la aflatoxina B2, al agregar el 50% de la CMI se inhibió el 99.99% de la síntesis de aflatoxinas, y consecuentemente a mayores concentraciones del extracto, no hubo detección de la misma.

Con respecto al extracto de *A. striata*, la reducción de la producción de aflatoxina B1 al utilizar el 50% de la CMI fue de 99.98% y para la aflatoxina B2 la

adición del 50% produjo una reducción del 90 al 99.7%. Cuando se agregó extracto al 25% de la CMI, la disminución de la producción de aflatoxina B2 fue del 50%. (Tabla 9)

Tabla 9 .- Efecto de los extractos metanólicos de *A. asperriima* y *A. striata* sobre la producción de aflatoxinas por la cepa 1273 de *A. flavus* en medio A&M.

Cepas fúngicas	[CMI]	Aflatoxinas (µg/ml)			
		B1	B2	G1	G2
<i>A. asperriima</i>	25%	0.41±0.05*	1.9±0.49	ND	ND
	50%	0.13±0.02	<0.00008	ND	ND
	75%	0.005±0.001	ND	ND	ND
	Ctr	1.17±0.13	2.49±0.30	<0.00008	<0.00008
<i>A. striata</i>	25%	0.45±0.10	3.60±0.9	ND	ND
	50%	<0.00008	0.48±0.08	ND	ND
	75%	<0.00008	0.013±0.005	ND	ND
	Ctr	1.31±0.12	4.87±1.29	ND	ND

*. Error estándar de la media. ND.- No Detectado

La cepa 1299 de *A. flavus* sintetizó normalmente cantidades menores de las aflatoxinas B1 y B2, mas sin embargo, el análisis estadístico mostró que al igual que en la cepa 1273, solo las concentraciones de ambos extractos, del 50 y el 75% de la CMI, inhibieron significativamente ($p=0.05$) la síntesis de aflatoxinas. En esta cepa tampoco se detectó la síntesis de aflatoxinas G1 y G2. (Tabla 10). Con respecto al extracto de *A. striata*, las reducciones para la aflatoxina B1 fueron de 79% para la aflatoxina B1 y de 55% para la B2 al utilizar el 50% de la CMI, mientras que con el 75% de la CMI la reducción se incrementó hasta el 93% para el caso de la B1 y a no detectable (ND) para el caso de la B2. (Tabla 10).

Tabla 10. -Efecto de los extractos metanólicos de *A. asperima* y *A. striata* sobre la producción de aflatoxinas por la cepa 1299 de *A. flavus* en medio A&M.

Cepas fúngicas	[CMI]	Aflatoxinas ($\mu\text{g/ml}$)			
		B1	B2	G1	G2
<i>A. asperima</i>	25%	0.60 \pm 0.17*	0.97 \pm 0.25	ND	ND
	50%	0.25 \pm 0.04	0.12 \pm 0.09	ND	ND
	75%	0.07 \pm 0.01	0.05 \pm 0.02	ND	ND
	Ctr	0.72 \pm 0.09	0.95 \pm 0.21	<0.00008	<0.00008
<i>A. striata</i>	25%	0.38 \pm 0.04	0.415 \pm 0.12	ND	ND
	50%	0.14 \pm 0.03	0.29 \pm 0.13	ND	ND
	75%	0.05 \pm 0.1	ND	ND	ND
	Ctr	0.682 \pm 0.11	0.91 \pm 0.16	ND	ND

*.- Error estándar de la media. ND.- No Detectado

La cepa 148 de *A. parasiticus*, normalmente produjo las cuatro principales aflatoxinas B1, B2, G1 y G2. En esta cepa la aflatoxina G1 fue la que se produjo en mayor cantidad (1.04 $\mu\text{g/ml}$) luego la B1 (0.87 $\mu\text{g/ml}$), la B2 (0.52 $\mu\text{g/ml}$) y por último la G2 (0.07 $\mu\text{g/ml}$) (Tabla 11).

A diferencia de *A. flavus*, el análisis estadístico mostró que las cepas de *A. parasiticus* mostraron diferencias significativas ($p=0.05$) entre el control y entre todas las concentraciones de extracto adicionadas (Tabla 11)

El extracto de *A. asperima* provocó una reducción en la producción de aflatoxinas. Esa reducción varió del 57 al 99%, de acuerdo a la cantidad de extracto agregado.

Tabla 11.- Efecto de los extractos metanólicos de *A. asperima* y *A. striata* sobre la producción de aflatoxinas por la cepa 148 de *A. parasiticus* en medio A&M.

Cepas fúngicas		Aflatoxina (µg/ml)			
		B1	B2	G1	G2
<i>A. asperima</i>	25%	0.04±0.01*	0.29±0.13	0.2±0.08	ND
	50%	<0.00008	0.001±0.0003	0.04±0.01	ND
	75%	<0.00008	<0.00008	<0.00008	ND
	Ctr	0.87±0.21	0.52±0.18	1.88±0.21	ND
<i>A. striata</i>	25%	0.77±0.12	0.26±0.03	<0.00008	0.69±0.27
	50%	0.30±0.04	0.14±0.05	<0.00008	<0.00008
	75%	0.069±0.02	<0.00008	<0.00008	<0.00008
	Ctr	1.81±0.19	1.55±0.27	1.04±0.31	0.07±0.012

*.- Error estándar de la media. ND.- No Detectado

De la misma forma la cepa Su-I también sintetizó las 4 aflatoxinas. En este caso la tendencia fue muy similar a la expuesta por la cepa 148, en donde el extracto de *A. striata* fue más efectivo para inhibir la síntesis de aflatoxinas, encontrando porcentajes de reducción 61 al 99.9% de acuerdo a la cantidad de extracto agregado (25, 50 y 75% de la CMI) (Tabla 9). Al utilizar el 25% de la CMI del extracto de *A. asperima* solamente se inhibió significativamente ($p=0.05$) a las aflatoxinas G1 y G2. Sin embargo, la utilización del 50 o el 75% de la CMI causó reducciones significativas ($p=0.05$) arriba del 90%. Por último, al agregar el 75% de la CMI no se detectaron síntesis de la aflatoxina B2 y G1, y la reducción de B1 fue de 97% y de G2 fue del 99% (Tabla 12).

Tabla 12.- Efecto de los extractos de *A. asperima* y *A. striata* sobre la producción de aflatoxinas por la cepa Su-I de *A. parasiticus* en medio A&M.

Cepas fúngicas	[CMI]	Aflatoxinas ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			
		B1	B2	G1	G2
<i>A. asperima</i>	25%	$0.58 \pm 0.09^*$	1.42 ± 0.6	0.23 ± 0.06	0.19 ± 0.07
	50%	0.22 ± 0.07	0.16 ± 0.03	0.02 ± 0.001	0.08 ± 0.002
	75%	0.04 ± 0.01	ND	ND	<0.00008
	Ctr	1.02 ± 0.3	2.29 ± 0.09	0.61 ± 0.1	0.00008
<i>A. striata</i>	25%	<0.00008	0.84 ± 0.25	0.36 ± 0.08	<0.00008
	50%	0.16 ± 0.02	0.09 ± 0.03	<0.00008	<0.00008
	75%	0.015 ± 0.002	<0.00008	ND	ND
	Ctr	0.69 ± 0.2	1.21 ± 0.06	0.94 ± 0.24	<0.00008

*.- Error estándar de la media. ND.- No Detectado

CONDICIONES SIMULADAS DE ALMACÉN

Para el caso de los ensayos en condiciones simuladas de almacén, la síntesis[®] de aflatoxinas se vio significativamente ($p=0.05$) disminuída en todos los controles, en comparación con los del medio líquido, de hecho en muchos casos no se logró determinar la concentración de las aflatoxinas, debido a las pequeñas cantidades sintetizadas. Estos resultados se muestran en las (Tablas 13 – 16).

Las cepas 1273 y 1299 de *A. flavus* presentaron comportamientos similares, ya que ambas cepas no sintetizaron las aflatoxinas G1 y G2. En la mayoría de las cepas se produjeron reducciones significativas ($p=0.05$), al agregar el 50 y 75% de los extractos analizados. Los extractos a una concentración del 50% de la CMI produjo una inhibición del 99% de la producción de aflatoxinas, mientras que al

utilizar el 75%, no se detectaron aflatoxinas. Por el contrario en la cepa 1299, todas las concentraciones probadas inhibieron significativamente ($p=0.05$) la síntesis de aflatoxinas, la mayoría con valores superiores al 98%. (Tablas 13 y 14)

Tabla No 13.- Efecto de los extractos metanólicos de *A. asperima* y *A. striata* sobre la producción de aflatoxinas por la cepa 1273 de *A. flavus* en condiciones simuladas de almacén.

Cepas fúngicas	[CMI]	Aflatoxinas ($\mu\text{g/ml}$)			
		B1	B2	G1	G2
<i>A. asperima</i>	25%	$0.03 \pm 0.001^*$	0.028 ± 0.0006	ND	ND
	50%	<0.00008	<0.00008	ND	ND
	75%	ND	ND	ND	ND
	Ctr	0.042 ± 0.002	0.053 ± 0.004	ND	ND
<i>A. striata</i>	25%	0.013 ± 0.003	<0.00008	ND	ND
	50%	<0.00008	<0.00008	ND	ND
	75%	ND	ND	ND	ND
	Ctr	0.016 ± 0.001	0.049 ± 0.003	ND	ND

*.- Error estándar de la media. ND.- No Detectado

Tabla No 14.- Efecto de los extractos metanólicos de *A. asperima* y *A. striata* sobre la producción de aflatoxinas por la cepa 1299 de *A. flavus* en condiciones simuladas de almacén.

Cepas fúngicas	[CMI]	Aflatoxinas ($\mu\text{g/ml}$)			
		B1	B2	G1	G2
<i>A. asperima</i>	25%	$<0.00008^*$	0.02 ± 0.0001	ND	ND
	50%	<0.00008	<0.00008	ND	ND

	75%	<0.00008	<0.00008	ND	ND
	Ctr	0.09±0.002	0.13±0.0005	<0.00008	ND
<i>A. striata</i>	25%	<0.00008	<0.00008	ND	ND
	50%	<0.00008	ND	ND	ND
	75%	ND	ND	ND	ND
	Ctr	0.005±0.00001	0.01±0.00015	ND	ND

*.- Error estándar de la media. ND.- No Detectado

Para el caso de la cepa 148 de *A. parasiticus*, se cuantificó la cantidad de aflatoxina B2 solamente en los controles, ya que al agregar los extractos en los demás casos, se inhibió casi por completo la síntesis de aflatoxinas (Tabla 15). Podemos observar al agregar extractos a una concentración del 50 y 75% de la CMI, produjo una inhibición de la síntesis de aflatoxinas en valores superiores al 99%, tanto al utilizar el extracto de *A. asperima* como de *A. striata*. La cantidad de aflatoxinas B1, G1 y G2 no se lograron cuantificar, mas sin embargo, notamos que su nivel disminuye; ya que al agregar el 50% de la CMI ya no se detectan cantidades de aflatoxinas B1 y G1, mientras que con la G2, solamente concentraciones de extractos correspondientes al 75% la inhibieron en su totalidad (Tabla 15).

Tabla No 15.- Efecto de los extractos metanólicos de *A. asperima* y *A. striata* sobre la producción de aflatoxinas por la cepa 148 de *A. parasiticus* en condiciones simuladas de almacén.

Cepas fúngicas	[CMI]	Aflatoxinas (µg/ml)			
		B1	B2	G1	G2
<i>A. asperima</i>	25%	<0.00008*	0.01±0.0001	<0.00008	<0.00008
	50%	ND	<0.00008	ND	<0.00008
	75%	ND	<0.00008	ND	ND

	Ctr	<0.00008	0.021±0.00003	<0.00008	<0.00008
<i>A. striata</i>	25%	<0.00008	<0.00008	<0.00008	ND
	50%	<0.00008	<0.00008	<0.00008	ND
	75%	ND	ND	ND	ND
	Ctr	<0.00008	0.045±0.00001	<0.00008	<0.00008

*.- Error estándar de la media. ND.- No Detectado

Por último la cepa Su-I mostró el mismo comportamiento de la cepa 148 (Tabla 16). Se presentó una reducción del 77 al 99% al utilizar el extracto de *A. asperima* mientras que con el extracto de *A. striata* la inhibición de la síntesis fue superior al 99%. El 75% de la CMI inhibió en su totalidad la síntesis de aflatoxinas, excepto la B1, que aunque no se pudo cuantificar, la sintetizó en valores menores a 0.00008 µg/ml (Tabla 16).

Tabla No 16.- Efecto de los extractos metanólicos de *A. asperima* y *A. striata* sobre la producción de aflatoxinas por la cepa Su-I de *A. parasiticus* en condiciones simuladas de almacén.

Cepas fúngicas	[CMI]	Aflatoxinas (µg/ml)			
		B1	B2	G1	G2
<i>A. asperima</i>	25%	0.005±0.0006*	0.02±0.007	<0.00008	<0.00008
	50%	<0.00008	<0.00008	<0.00008	<0.00008
	75%	ND	<0.00008	ND	ND
	Ctr	0.01±0.004	0.09±0.02	0.014±0.004	0.12±0.003
<i>A. striata</i>	25%	<0.00008	<0.00008	<0.00008	<0.00008
	50%	ND	<0.00008	ND	ND
	75%	ND	ND	ND	ND

	Ctr	0.049±0.007	0.11±0.01	0.1±0.002	<0.00008
--	-----	-------------	-----------	-----------	----------

*.- Error estándar de la media. ND.- No Detectado

EFFECTO DE LOS EXTRACTOS DE AGAVES SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CICLOPIAZÓNICO.

En lo que respecta a la inhibición de la producción de ácido ciclopiazónico (CPA), encontramos que solamente la cepa 1299 de *A. flavus*, fue capaz de sintetizar esta toxina (Tabla 17).

En este caso el extracto de *A. asperima*, fue más efectivo en la inhibición de la síntesis de CPA. Alcanzando hasta un 87% de la reducción en la producción de CPA, al utilizar el 75% de la CMI, y se presentaron diferencias significativas ($p=0.05$) entre controles y tratamientos desde la utilización del 25% de la CMI, mientras que para el caso de *A. striata*, la inhibición significativa se presentó desde el 50% de la CMI y alcanzando una inhibición máxima del 83%, con el 75% de la CMI del extracto de *A. striata* (Tabla 17).

Tabla No 17.- Efecto de los extractos metanólicos de *A. asperima* y *A. striata* sobre la producción de CPA por la cepa 1299 de *A. flavus*, en medio líquido.

	Ácido ciclopiazónico ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
	<i>A. asperima</i>	<i>A. striata</i>
Control	0.3701±0.04*	0.41±0.067
25%	0.2963±0.022	0.3255±0.08
50%	0.078±0.01	0.165±0.019
75%	0.0098±0.002	0.0143±0.01

* Error estándar de la media

DISCUSIÓN

Se ha estimado que existen entre 250,000 a 500,000 especies de plantas sobre la tierra (Borris, R. P., 1996). Además estas poseen una capacidad ilimitada de sintetizar sustancias que pueden servir para defenderse en contra de microorganismos, insectos y herbívoros (Geissman, T.A., 1993; Schultes, R.E., 1978), se ha especulado que algunos de estos compuestos podrían ser utilizados por el hombre para inhibir el crecimiento de microorganismos (Cowan, M.M., 1999), incluyendo a algunos capaces de sintetizar toxinas nocivas para la salud, tanto del hombre como para los animales que los consumen (Gould, 1997). De toda esta diversidad vegetal, solo un pequeño porcentaje de estos se han utilizado como antimicrobianos (Moerman, D.E., 1996)

Científicos de diferentes áreas están investigando plantas por su posible utilidad como antimicrobianos y han encontrado muchos compuestos fitoquímicos con actividad antimicrobiana *in vitro* (Cowan, M.M., 1999). Todo esto ha ocasionado cambios importantes en las alternativas con las que se cuenta para proteger los bienes agrícolas de la contaminación por hongos productores de aflatoxinas, ya que estos compuestos se están vislumbrando como alternativas promisorias para el manejo integral de las infecciones provocadas por estos hongos. Es importante mencionar que el auge que tienen estos compuestos naturales es por que algunos de ellos se presume que son seguros para el medio ambiente y no afectan directamente al producto. (Smith, E., *et al*, 1996)

Se ha establecido desde hace tiempo que las micotoxinas pueden ser removidas de bienes agrícolas, mediante su inactivación o detoxificación ya sea por métodos físicos como la inactivación térmica e irradiación (Food and Agriculture organization, 1979) o por métodos químicos como extracción con solventes, degradaciones químicas, modificación de su toxicidad (Buchanan, R.L. and J.G. Ayres, 1988; Gosh, J. And Haggblom, 1985; Vorster, L.J., 1985) o incluso por métodos biológicos como

inactivación microbiana y fermentaciones (Pons, W.A., 1981). Sin embargo todos estos tratamientos tienen sus limitantes, ya que los productos no deben ser afectados en sus propiedades organolépticas ni en su valor nutritivo y comercial (Vorster, L.J., 1985; Suttajit. M. 1997). Los tratamientos químicos son de los mas utilizados, a pesar de que en muchas ocasiones aunque que transforman las aflatoxinas en derivados no tóxicos, el producto a menudo se ve afectado en sus propiedades nutritivas (Mann, G.E., *et al*, 1970). Uno de los principales puntos en los que se fundamenta este trabajo, es la utilización de compuestos naturales que podrían ayudar a reducir o eliminar la cantidad de químicos que actualmente se utilizan (Bullerman, L.B. *et al*, 1977). Además los ensayos antimicrobianos se realizaron con extractos crudos, utilizando como solventes agua destilada, etanol y metanol. Para determinar el efecto antimicrobiano de los extractos empleamos la técnica de difusión en pozo en agar, tal como lo marca la literatura, ya que señala que la búsqueda inicial de compuestos antimicrobianos potenciales, se debe realizar ya sea a partir de los compuestos puros (Afolayan, A.J., *et al*, 1997; Batista, O., *et al*, 1994 y Klopoukh, L., *et al* 1997) extraídos mediante técnicas de separación o con extractos crudos realizados con diferentes solventes (Freiburghaus, F.R., *et al*, 1996; Rojas, A., *et al*, 1992 y Silva, O., *et al*, 1996). Se ha establecido además que para demostrar la actividad antimicrobiana de estos extractos, se emplea el método de difusión en pozo en agar (Navarro, V., *et al*, 1996) así como adaptaciones a estas técnicas, como la autobiografía (Mayr-Harting, A., *et al*, 1972).

Nuestros ensayos mostraron el mejor efecto antimicrobiano con los extractos metanólicos, en comparación con los otros solventes probados. Esto se puede explicar ya que se ha reportado que el metanol, extrae la mayor cantidad de compuestos que presentan actividades antimicrobianas. Además, la literatura menciona que el etanol es otro de los solventes que son muy utilizados en la extracción de compuestos antimicrobianos, en tanto que las extracciones acuosas, rara vez presentan actividad

antimicrobiana y si la presentaran son mas efectivos en contra de virus. (Zhang, Y., *et al*, 1997). Ocasionalmente las fracciones acuosas pueden contener compuestos antimicrobianos de interés, mas sin embargo en la mayoría de los casos son extraídos en mayor cantidad, al utilizar solventes menos polares como el metanol y el etanol. (Taylor, R.S.L., *et al*, 1996, Rao, K.V., *et al*, 1993, Eloff, J.L., 1998). Con respecto a esto Eloff en 1998, examinó una variedad de extractantes por su capacidad de solubilizar antimicrobianos provenientes de plantas, mencionando que los solventes mas utilizados eran el diclorometano, metanol, etanol y agua, encontrando que la mayoría de los compuestos activos no eran solubles en agua y que el metanol y etanol eran usados como solventes principales en muchos de los estudios de la reciente literatura.

Es también importante mencionar que cualquier parte de la planta puede contener componentes activos, ya sea raíces, hojas, tallos ó retoños, por ejemplo, el ginseng presenta sus saponinas y aceites esenciales solamente en las raíces, en tanto que el Eucalipto contiene aceites esenciales en sus hojas, y en el álamo balsámico encontramos componentes activos tanto en hojas, tallos y retoños (Thomson, W.A.R., 1978). Por lo anterior se ha recomendado realizar las extracciones separando las partes de la planta a analizar, como lo hicimos en este estudio, y no debemos olvidar que el estado fenológico de la planta así como la temporada de colecta influyen en la cantidad de compuestos activos encontrados en la planta (Cowan, M.M., 1999). En nuestro caso pudimos observar que el o los compuestos activos de los Agaves probados, se encontraban principalmente en las inflorescencias. Esto es comprensible debido a que el período de floración coincide con un incremento en el contenido de estos compuestos (Thompson, W.A.R., 1978). También encontramos actividad inhibitoria en el escapo, mas sin embargo en mucha menor cantidad, en tanto que las demás partes de las plantas analizadas no exhibieron actividad inhibitoria.

Nuestros resultados obtenidos en medio líquido (A & M) indicaron que el extracto metanólico que presentó mayor efecto inhibitorio del crecimiento de los hongos analizados, fue el de la inflorescencia de *A. asperima* con una CMI de 0.5 mg/ml a 2.0 mg/ml de acuerdo a la cepa probada. En el caso del extracto metanólico de la inflorescencia de *A. striata*, este presentó valores de CMI superiores a las del extracto de *A. asperima*, siendo de 1.0 a 2.0 mg/ml. Cuando analizamos los extractos de los escapos de ambas especies de *Agaves* encontramos que las CMI fueron mucho más elevadas, siendo de 15 mg/ml a 23 mg/ml. Los extractos metanólicos del escapo de *A. striata* obtuvieron CMI's que fueron de 20 a 30 mg/ml.

Las CMI obtenidas en condiciones simuladas de almacén fueron mucho mayores que aquellas observadas en medio líquido. En el caso del extracto de la inflorescencia de *A. asperima* encontramos que la CMI fue de 33 a 42 mg/ml. Para el caso de la inflorescencia de *A. striata* la CMI varió de 40 a 45 mg/ml. No se determinó la CMI de los extractos metanólicos de los escapos de ambas especies de *Agaves* debido a que fueron muy altas alcanzando niveles superiores a 60 mg/ml. Con respecto a esto se tienen reportes de que las CMI obtenidas en condiciones de simuladas de almacén suelen ser mucho mayores a las encontradas en medio líquido (Sánchez, C., 1999) como lo encontramos en este estudio, esto puede ser debido a que no existe una buena difusión de los compuestos activos en sustratos sólidos y probablemente a que el maíz es un sustrato que presenta todos los nutrientes para un mejor y adecuado desarrollo de los hongos, por lo que es más difícil lograr su inhibición (Trenk, L.H. *et al*).

Se ha reportado que las aflatoxinas son producidas principalmente por dos especies ubicuas de *Aspergillus* (<http://193.51.164.11/htdocs/Monographs/Vol56/09-afl.htm>). En nuestros ensayos las cepas 1273 y 1299 de *A. flavus* sólo sintetizaron las aflatoxinas B1 y B2 y no se detectaron las aflatoxinas G1 y G2. La cepa 148 de *A. parasiticus*, produjo las cuatro principales aflatoxinas B1, B2, G1 y G2. En esta cepa, la aflatoxina G1 fue la que se produjo en mayor cantidad (1.04 µg/ml), seguida por la B1

(0.87 $\mu\text{g/ml}$), la B2 (0.52 $\mu\text{g/ml}$) y por último la G2 (0.07 $\mu\text{g/ml}$). Esto coincide con lo reportado previamente al mencionar que la prevalencia de las aflatoxinas depende de la distribución geográfica y de la cepa productora, ya que *A. flavus* solo sintetiza las aflatoxinas B y *A. parasiticus* sintetiza las B y las G (3), (Martins, M.L., 1999; Horn, B.W., *et al*, 1999) tal como lo encontramos en este estudio.

En cuanto a la variabilidad en la producción de aflatoxinas por parte de *Aspergillus*, pueden ser atribuidas a las condiciones climáticas y a las prácticas agrícolas, que incrementan la susceptibilidad de plantas a la invasión por *A. flavus*. (Hill, R.A., *et al*, 1983; Jones, R.K., *et al*, 1981; Klich, M.A., 1987). Sin lugar a dudas, las variaciones en la síntesis de aflatoxinas *in vitro* y en condiciones simuladas de almacén, también dependen enormemente de la estandarización de las condiciones a las cuales el hongo es cultivado. Aunado a esto, se tiene suficiente referencia de que las poblaciones de los hongos productores de aflatoxinas, son extremadamente diversas genéticamente, por lo que varía considerablemente su capacidad de sintetizar las mismas (Horn, B.W., *et al*, 1996; Huang, X., *et al*, 1994; Lisker, N., *et al*, 1993; Richard, J.L., *et al*, 1992).

Cuando a las cepas fúngicas se les agregaron diferentes concentraciones de los extractos, se observó una reducción significativa en la síntesis de aflatoxinas (al agregar el 50 y 75% de la CMI principalmente). Establecimos que el grado de inhibición de la aflatoxina B1 fue del 75 y 96% al utilizar el 50 y 75 % de la CMI y para el caso de la aflatoxina B2, al agregar el 50% de la CMI se inhibió el 99.99% la síntesis de aflatoxinas, y consecuentemente a mayores concentraciones del extracto, no hubo detección de la misma. Con respecto al extracto de *A. striata*, la reducción de la producción de aflatoxina B1 al utilizar el 50% de la CMI fue de 99.98% y para la aflatoxina B2 la adición del 50% produjo una reducción del 90 al 99.7% (con el 75% de la CMI). Cuando se agregó extracto al 25% de la CMI, la disminución de la producción de aflatoxina B2 fue del 50%. Esto se explica ya que el efecto de una inhibición total o parcial del crecimiento o de la síntesis de aflatoxinas dependerá en

gran medida de la concentración a la que se encuentre el compuesto activo (Malo, L., 1977 ; Thompson, W.A.R., 1980)

Se ha mencionado que el CPA y las AFL's comúnmente se producen juntas en bienes agrícolas (Landsen, J.A., *et al*, 1983; Urano, T., *et al*, 1992). En nuestro estudio corroboramos esto cuando trabajamos con *A. flavus* 1299, la cual sintetizó en cantidades destacables tanto aflatoxinas como ácido ciclopiazónico. Sin embargo la cepa 1273 no se comportó igual. Algunos investigadores han mencionado que existe una correlación positiva entre la producción de CPA y de AFL's, pero como ya se mencionó, existe considerable variación en la síntesis de toxinas entre individuos (Horn, B.W., *et al*, 1996). Se tienen reportes de que aproximadamente el 12 % de las cepas aisladas en campo producen únicamente CPA, e incluso se han detectado diferencias significativas en la producción de AFL's y CPA, entre cepas aisladas de diferentes regiones (Dorner, J.W., 1998; Martins, M.L., 1999, Horn, B.W., *et al*, 1999). Así como también podemos encontrar cepas de *A. flavus* que coproducen ambas toxinas, solo una o ninguna de ellas (Horn, B.W., 1996; Huang, X., *et al*, 1994; Lisker, N., *et al*, 1993; Richard, J.L., *et al*, 1992).

El ácido ciclopiazónico es una toxina que no se produce por *A. parasiticus* (Finoli, C., *et al*, 1999; Luk, K.C., *et al*, 1977; Gqaleni, N., *et al*, 1996, Gallagher, R.T., *et al*, 1978), tal como se demostró en esta investigación, puesto que no fue detectada en nuestro estudio.

Este estudio es un argumento fuerte de que si un antimicrobiano natural es efectivo *in vitro* y en condiciones simuladas de almacén, pudiera llegar a ser una alternativa potencial para el control de este tipo de hongos. Estos extractos podrían ser sujetos a estudios de caracterización de compuestos activos, para realizar estudios de toxicidad subsecuentes *in vitro* y con animales de laboratorio, como una alternativa para el control de microorganismos dañinos.

CONCLUSIONES

Los extractos metanólicos de las inflorescencias de *Agave asperrima* y de *A. striata* fueron los que presentaron mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento y la síntesis de aflatoxinas.

Los extractos acuosos y alcohólicos de la raíz y de las hojas de los Agaves probados no presentaron efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las cepas de *Aspergillus*.

Se presentaron diferencias significativas en la concentración mínima inhibitoria exhibida en medio líquido comparada con la CMI obtenida en maíz (condiciones simuladas de almacén).

Las concentraciones probadas con 50 y 75 % de la CMI son consideradas dosis subletales y a pesar de esto afectaron significativamente el crecimiento de los hongos y la síntesis de sus toxinas.

El extracto metanólico de *A. striata* presentó mayor efecto inhibitorio sobre la síntesis de toxinas, mientras que el de *A. asperrima* lo hizo en contra del crecimiento.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LITERATURA CITADA:

- Aderiye, B.I., S.K. Ogundana, S.A. Adesanya and M.F. Roberts. 1996. Antifungal properties of Yam (*Dioscorea alata*) peel extract. *Folia Microbiol.* 41(5): 407-412.
- Alade, P.I. and O.N. Irobi. 1993. Antimicrobial activities of crude leaf extracts of *Acalypha wilkesiana*. *J. Ethnopharmacol.* 39(3):171-174.
- Alvarez, R.M.A., M. Carvajal, M. Lisker-Melman, F. Rojo and I. Méndez. 1998. Aflatoxin B1 in urine of humans with chronic B and C hepatitis and cirrosis in México. *Mycotoxins and Phycotoxins – Developments in Chemistry, Toxicology and Food Safety*. Ed. By M. Miraglia, USA pp. 181-185.
- Afolayan, A.J., and J.J.M. Meyer. 1997. The antimicrobial activity of 3,5,7-trihydroxyflavone isolated from the shoots of *Helicrysum aureonitens*. *J. Ethnopharmacol.* 57:177-181.
- Anderson, H.W., E.W. Nehring and W.R. Wichser. 1996. Aflatoxin contamination of corn in the field. *J. Agric. Food Chem.* 23:775-782.
- Asao, T., G. Buchi, M.M. Abdel-Kadel, S.B. Chang, E.L. Wick and G.N. Wogan, 1965. "The structures of Aflatoxins B₁ and G₁". *J. Am. Chem. Soc.* 87: 882 - 886.
- Awuah, R.T. and K.A. Kpodo. 1996. High incidence of *Aspergillus flavus* and aflatoxins in stored groundnut in Ghana and the use of a microbial assay to assess the inhibitory effects of plant extracts on aflatoxin synthesis. *Mycopathologia.* 134(2):109-114.
- Bagy, M.M.K., A.Y. Abdel-Mayek, A.A. El-Sahanawany and G.A. Morsy. 1997. Studies on fungus associated with laboratory animal "golden hamster" and antibiotic effects of Aloe Sap, Garlic extract and Onion oil. *Medical Journal.* 10(1)

- Balacs, T. 1993. Research reports. The international journal of aromaterapy. Vol 5. No 4
- Balacs, T. 1992. "May Chang". The international journal of aromaterapy. Vol 4. No 3. P.25
- Balacs, T. 1991. Research reports. Fungal inhibition. The international journal of aromaterapy. Vol 3. No 4. p. 30.
- Balanchandran, C. and K.R. Parthasarthy, 1995. " Occurrence of Cyclopiazonic Acid in Feeds and Feed stuff in Tamil Nadu, India". Appl. Environ Microbiol. 104: 177 – 180
- Bankole, S.A. 1997. Effect of essential oils two nigerian medicinal plants (*Azadirachta indica* and *Morinda lucida*) on growth and aflatoxin B₁ production in maize grain by a toxigenic *Aspergillus flavus*. Lett. Appl. Microbiol. 24: 190-192.
- Batista, O., A. Duarte, J. Nascimento and M.F. and M.F. Simones. 1994. Structure and antimicrobial activity of diterpenes from the roots of *Plcrtranthus hereroensis*. J. Nat. Prod. 57:858-861.
- Beuchat, L.R. and D.A., Golden. 1989. Antimicrobials occurring naturally in foods. Food technol. 43(1):134-142.
- Bilgrami, K.S., K.K. Shina and A.K. Shina. 1992. Inhibition of aflatoxin production[®] and growth of *Aspergillus flavus* by eugenol and onion and garlic extracts. Indian J. Med. Res. 96:171-175.
- Buchanan, R.L. and J.G. Ayres. 1979. Effect of sodium acetate on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999. J. Food Sci. 128-132.
- Buchanan R.L. and A.J. Shepherd. 1981. Inhibition of *Aspergillus parasiticus* by Thymol. J. of Food Science. 46:976-977.

- Bullerman, L.B., F.Y. Lieu and S.A. Seier. 1977. Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils. Cinnamic aldehyde and eugenol. *J. Food Sci.* 42: 1107-1109.
- Buttler, L.G. 1998. Effects of condensed tannin on animal nutrition, p 553. IN R.W. hemingway and J.J. Karchesy (ed). *Chemistry and significanse of condensed tannins*. Plenum Press, New York, N.Y.
- Caceres, A., B. López, X. Juárez, J. Aguila and S. García. 1993. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 2 Evaluation of antifungal activity of American plants. *J. Ethnopharmacol.* 40(3):207-213.
- Carvajal, M. and G. Arrollo. 1997. Management of aflatoxin contaminated maize in Tamaulipas, México. *J. Agric. and Food Chem.* 45:1301-1305.
- Conner, D.E. 1993. Naturaly occurring compounds. 2 ed. IN Micheal Davidson and Alfred Larry Branen *Antimicrobials in Food* Marcel Dekker. New York
- Cowan, M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiol Rev.* 12(4):564-582.
- Cullen, J.M., M.S. Wilson, W.M. Hagler, J.F. Ort and R.J. Cole. 1988. Histopathologic lesions in broiler chicks given cyclopiazonic acid orally. *Am J. Vet. Res.* 49:728-732.
- Chang-Yen, I. and K. Bidasee, 1990. "Improved Spectrophotometric Determination of Cyclopiazonic Acid in Poultry Feed and Corn". *J. A.O.A.C.* 73(2): 257 - 259.
- Cvetnic, Z., and S. Pepeljnjak. 1998. Production od cyclopiazonic acid by aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*.
- Chu, F.S., 1991. Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenetic potential and preventive measures. *Mutation research* 259:291-309.
- Dorner, J.W., R.J. Cole and U.L. Diener, 1984. "The Relationship of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasitticus* with Reference to Production of Aflatoxins and Cyclopiazonic Acid". *Mycopathologia.* 87: 13-15.

- Dorner, J.W., R.J. Cole, T.H. Sanders and P.D. Blankenship. 1998. Effect of inoculum rate of biological control agents on preharvest aflatoxin contamination of peanuts. *Biol. Control*. 12:171-176.
- Duncan, H.E. and W.M. Hagler. 1997. Aflatoxins and other mycotoxins. *Pest Management*.
- Eaton, D.L. and J.D. Groopman. 1994. The toxicology of aflatoxins. Academic press, New York. Pp 383-426.
- Edlefesen, M. and M.S., Brewer. 2002. Aflatoxins. The national food safety database. <http://foodsafety.ifas.ufl.edu/il/il099.htm>
- Ellis, W.O., J.P. Smith, B.K. Simpson and J.H. Oldman, 1991. "Aflatoxins in Food: Occurrence, Biosynthesis, Effects on Organisms, Detection and Methods of Control". *Critical Rev in Food Sci. and Nutr.* 30(3): 403 - 439
- El-Maraghy, S.S.M. 1995. Effect of some spices as preservatives for storage of lentil (*Lens esculenta* L.) seeds. *Folia Microbiol.* 40(5): 490-492
- El-Shazly, A., A.M. Ateya and M. Wink. 2001. Quinolizidine alkaloid profiles of *Lupinus varius*, *L. albus albus*, *L. hartwegii* and *L. densiflorus*. *Z. Naturforsch.* 56(1-2):21-30.
- Eloff, J.N. 1998. Which extractant could be used for the screening of isolation of antimicrobial components from plants? *J. Ethnopharmacol.* 60:1-8.
- Farag, R.S., Z.Y. Daw and S.H. Abo-Raya. 1989, Influence of some spice essential oils on *Aspergillus parasiticus* growth and production of aflatoxins in a synthetic medium. *J. Food Sci.* 54(1): 74-76.
- Farr, D.F., G.F. Billis, G.P. Chamuris and A.Y. Rossman, 1989. "Fungi on Plants and Plant Products in the United States St. Paul M.N." APS Press 578.
- Fan, J.J. and J.H. Chen. 1999. Inhibition of aflatoxin-producing fungi by welsh onion extracts. *J. Food Prot.* 62(4):414-417.

- Finley, J.W., S.F. Robinson and D.J. Armstrong. 1992. Food safety assesmnt. American Chemical Society, Washington, D.C. pp. 261-275.
- Finoli, C., A. Vecchio, A. Galli and L. Franzetti. 1999. Production of cyclopiazonic acid by molds isolates from Taleggio cheese. *J. Food Prot.* 62(10):1198-1202.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 1979. Recomendated practice for prevention of mycotoxins in food, feed and their products. Rome. 4-36.
- Freiburghaus, F., R. Kaminsky, M.H.H. Nkunya and R. Burn. 1996. Evaluation of African medicinal plants for their in vitro trypanocidal activity. *J. Ethnopharmacol.* 55:1-11.
- Gqaleni, N., J.E. Smith, J. Lacey. 1996. Co-production of aflatoxins and cyclopiazonic acid in isolates of *Aspergillus flavus*. *Food Addit. Contam.* 13(6):677-685.
- Gallagher R.T., J.L. Richard, H.M. Stahr and R.J. Cole, 1978. "Ciclopiazonic Acid Production by Aflatoxigenic and Non-aflatoxigenic Strains of *Aspergillus flavus*." *Mycopathologia.* 66: 31-36.
- Geissman, T.A. 1963. Flavonoid compounds, tanins, linins and related compounds, p.265. IN M. Florkin and E.H. Stotz (ed). *Pyrole pigments, isoprenoid compounds and phenolic plant constituent*, vol. 9. Elsevier, New York, N.Y.
- Gendolff, E.H., F.S. Chu and J. Leonard. 1992. Variation in regulation of aflatoxin bioynthesis amog isolates of *Aspergillus flavus*. *Experientia.* 48(1):84-87.
- Goldblatt, L.A. 1969. Aflatoxin. Academic Press. New York. Pp. 1-40.
- Gosh, J. and P. Haggblom. 1985. Effect of sublethal concentration of propionic or butiric acid on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. *J. Food Microbyol.* 2, 323-330.
- Gould, G.W. 1995. Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. *J. Food Protect.* 82-86

- Gourama, H. and L.B. Bullerman. 1987. Effect of oleuropein on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. Department of Food Science and Technology University of Nebraska, Lincoln.
- Groopman, J.D., L.G. Cain and T.W. Kensler. 1988. Aflatoxin exposure in human populations: measurements and relationship to cancer. *Toxicol* 19, 113.
- Gueldner, R.C., D.M. Wilson and A.R. Heidt. 1985. Volatile compounds inhibiting *Aspergillus flavus*. *J. Agric. Food Chem.* 33:411-413.
- Heathcote, J.G. and J.R. Hibbert. 1978. Aflatoxins: chemical and biological aspect. Elsevier, New York. pp. 173-186.
- Hamilton, P.B. 1971. A natural and extremely severe occurrence of aflatoxicosis in laying hens. *Poult. Sci.* 50:1880-1882.
- Holcomb, M., O.M. Wilson, m.W. Turkesses and H.C. Thompson, 1992. Determination of aflatoxins in food products by chromatography. *J. Chromatography.* 624:341-352.
- Holzappel, C.W., 1968. "The Isolation and Structure of Cyclopiazonic Acid, a Toxic Metabolite of *Penicillium cyclopium* Westling". *Tetrahedron.* 24: 2101 - 2119.
- Holmquist, G.U., H.W. Walker and H.M. Stahr. 1983. Influence of temperature, pH, water activity and antifungal agents on growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *J. Food Sci.* 48: 778-782.
- Horn, B.W. and J.W. Dorner. 1999. Regional differences in production of aflatoxin B1 and cyclopiazonic acid by sil isolates of *Aspergillus flavus* along a transect within the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(4):1444-1449.
- Horn, B.W., R.L. Greene, V.S. Sobolev, J.W. Dorner, J.H. Powell and R.C. Layton. 1996. Association of morphology and mycotoxin production with vegetative compatibility groups in *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* and *A. tamaris*. *Mycologia.* 88:574-587.

- Hsu, I.C., R.A. Metcalf and T. Sun. 1991. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature*. 350:427-428.
- Hill, R.A., P.D. Blankenship, R.J. Cole and T.H Sanders. 1983. Effects of soil moisture and temperature on preharvest onvasion of peanuts by yhe *Aspergillus flavus* group and subsequent aflatoxin development. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:628-633.
- Hitokoto, H., S. Morozumi., T. Wauke., S. Sakay and H. Kurata. 1980. Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi. *Appl. and Environ. Microbiol.* Vol 812-822.
- Huang, X.- J.W. Dorner and F.S. Chu. 1994. Production of aflatoxin and cyclopiazonic acid by various aspergilli: an ELISA analysis. *Mycotox. Res.* 10:101-106.
- Jarvis, B. 1971. Factors affecting the production of mycotoxins. *J. Appl. Bact.* 34(1): 199-213.
- Jayaprakasha, G.K., P.S. Negi, C. Anandharamakrishnan and K.K. Sakariah. Chemical composition of tumeric oil-a byproduct from turmeric oleoresin industry and its inhibitory activity against different fungi. *Z. Naturforsch.* 56(1-2):40-44.
- Jones, R.K., H.E. Duncan and P.B. Hamilton. 1981. Planting date, harvest date, and irrigation effects on infection and aflatoxin production by *Aspaergillus flavus* in field corn. *Phytopathology* 71:810-816.
- Jaskiewics, K., P.M. Close, P.G. Thiel and R.J. Cole, 1988. "Preliminary Studies on Toxic Effects of Cyclopiazonic Acid Alone and in Combination with Aflatoxin B₁ in Non-Human Primates". *Toxicology.* 52: 297 - 307.
- Foster, P.L. and W.A. Rosche. 2001. Aflatoxins. *Proceedings of the academy of sciences, USA* 80:2695-2698.

- Kandil, O., N.M. Radwan, A.B. Hassan, A.M.M. Amer, H.A. El-Banna and W.M.M. Amer. 1994 Extracts and fractions of *Thymus capitatus* exhibit antimicrobial activities *Journal of Ethnopharmacology* 44: 19-24.
- Kenneth, A.V., W.P. Norred, D.M. Hinton, R.J. Cole and L.W. Dorner. Subchronic oral toxicity of cyclopiazonic acid (CPA) in male Sprague-Dawley rats. *Am. J. Vet. Res.* 11-18
- Khera, K.E., R.J. Cole, C. Whalen and J.W. Dorner. 1985. Embryotoxicity study on cyclopiazinic acid in mice. *Contam. Toxicol.* 34:423-426.
- Kirmizigül, S., H. Anil, F. Uçar and K. Akdemir. 1996 Antimicrobial and antifungal activities of three new triterpenoid glycosides. *Phytotherapy research* 10:274-276.
- Klopoukh, L., S. Siddiqi, M. warns and L. To. 1997. Growth inhibition of *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium marinum* by plant compounds, abstr. A-199. IN Abstracts of the 97th General Meeting of the American Society for microbiology 1997.
- Klich, M.A. 1987. Relation of plant water potential at flowering to subsequent cottonseed infection by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology.* 77:739-741.
- Landsen, J.A. and J.I. Davidson. 1983. Ocurrance of cyclopiazonic acid in peanuts. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:766-769.
- Landsen, J.A., 1984. Liquid chromatography analisis system for Cyclopiazonic acid in peanuts. *J.Assoc. Off. Anal. Chem.* 67(4): 728-731.
- Lee, L.S., F.W. Parrish and T.J. Jacks. 1986. Substrate depletion during formation of aflatoxin and Kojik acid on corn inoculated with *Aspergillus flvus*. *FALTA.* 93: 105-107.
- Leistner, L. and J.I. Pitt, 1977. "Miscellaneous *Penicillium* Toxins". In *Micotoxins in Human and Animal Health*. Eds. J.V. Rodricks, C.W. Hesseltine and M.A. Mehlman. Park Forest South, Ill.: Pathotox. 639 - 653.

- Lillehoj, E.B., A. Ciegler and R.W., Detroy. 1970. Fungal Toxins. Toxicol 2:1
- Lisker, N., R. Michaeli and Z.R. Frank. 1993. Mycotoxigenic potential of *Aspergillus flavus* strains isolated from groundnuts growing in Israel. J. Environ. Qual. 9:691-694.
- Lomax. L.G., R.J. Cole and J.W. Dorner. 1984. The toxicity of cyclopiazonic acid in weaned pigs. J. athol. 21:418-424.
- Luk, K.C., B. Kobbe and J.M. Townsend, 1977. " Production of Cyclopiazonic Acid by *Aspergillus flavus* Link". Appl. Environ Microbiol. 33: 211 - 212.
- Mabrouk, S.S. and N.M. El-Shayeb. 1980. Inhibition of aflatoxin formation by some spices. Lebensm Unters Forsch. 171(5):344-347.
- Mahasneh, A.M. and A.A. El-Oqlah. 1999. Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of Jordan. J. Ethnopharmacol. 64(3):271-276.
- Mahmoud, A.L. 1994. Antifungal action and antiaflatoxigenic properties of some essential oil constituents. Lett. Appl. Microbiol. 19(2):110-113.
- Mahmoud, A.L. 1999. Inhibition of growth and aflatoxin biosynthesis of *Aspergillus flavus* by extracts of some Egyptian plants. Lett. Appl. Microbiol. 29(5):334-336.
- Malo, L.A., S.M. Alzamora and A. Argaz. 1997. Effect of vanillin concentration, pH, and incubation temperature on *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus parasiticus* growth. Food Microbiol 14: 117-124
- Mann, G.E., L.P. Codifier, .K. Gardner and F.G. Dollear. 1968. Reductions of aflatoxin levels in cottonseed and peanut meals by ozonization. J. Am. Oil. Chem. Soc. 45:93.
- Mallozzi. M.A.B., B. Correa, M. Haraguchi and F. Brignani. 1996. Effect of flavonoids on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production. Microbiol. 27:161-165.

- March, C., I. Sanz, and E.P. Yufera. 1991. Antimicrobial activities on mediterranean plants. *Zentralbl. Microbiol.* 146:291-295
- Martins, M.L. and H.M. Martins. 1999. Natural and in vitro coproduction of cyclopiazonic acid and aflatoxins. *J. Food Prot.* 62(3):292-294.
- Masood, A., J.V.V. Dogra and A.K. Jha. 1994. The influence of colouring and pungent anents of red Chilli (*Capsicum annum*) on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. *Letters in Applied Microbiology.* 18, 184-186.
- Mayr-harting, A. and A. Hedges and Berkelery. 1972. *Methods for studing bacetriocins.* Academic Press, Inc. New York, N.Y.
- McCutcheon, A.R., S.M. Ellis, R.E.W. Hancock and G.H.N. Towers. 1994. Antifungal screening of medicinal plants of British Columbian native peoples. *Journal of Ethnopharmacology* 44:157-169
- McMillan. W.W., D.M. Wilson and N.W. Widstrom. 1985. Aflatoxin contamination of preharvest corn in Georgia: a six year study of insect damage and visible *Aspergillus flavus*. *J. Environ. Qual.* 14:200.
- Miller, J.D., 1996, Micotoxins. IN K.F. Cardwell (ed). *Proceedings of the workshop on mycotoxins in foods in Africa, Nov. 6-10, Cotonou, Benin.* p. 18-22 .
- Mishra, A.K. and N.K. Dubey. 1990. Fungitoxic properties of *Prunus persica*® oil. *Hindustan Antibiot Bull.* 32(3):91-93.
- Mishra, A.K. and N.K. Dubey. 1994. Ecaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of dtored food commodities. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(4):1101-1105.
- Moerman, D.E. 1996. An analysis of the food plants of native North America. *J. Etnopharmacol.* 52:1-22.
- Montes-Belmont, R., M. Carvajal, R.F. Brito and I. Mendez. 1997. Extractos solidos, acuosos y hexánicos de lantasa para el combate de *Aspergillus flavus* Link en maiz. *Revista Mexicana de Fitopatología.* 15:26-30.

- Montes-Belmont, R., and M. Carvajal. 1997. Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their components. *Journal of Food Protection*. 61(5):616-619.
- Morrisey, R.E.; R.J. Cole and J.W. Dorner, 1984. "The effects of cyclopiazonic acid on pregnant and fetal development of Fischer Rats". *J. of Tox. Environ. Health*. 14: 585 - 594.
- Morrisey, R.E., W.P. Norred, R.J. Cole and J. Dorner. Toxicity of the mycotoxin, cyclopiazonic acid to sprague-dawley rats. 1985. *Toxicol and Appl. Pharmacol*. 77:94-107.
- Navarro, V., M.L. Villarreal, G. Rojas, and X. Lozoya. 196 Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. *J. Ethnopharmacol*. 53:143-147.
- Nichols. T. and Everet. 1983. Economic effects of aflatoxin in corn. P:67-72. IN *Aflatoxin and Aspergillus flavus in corn*. Diener. U.L., Asquit, R.L. and Dickens, J.W. Eds. S.. Coop. Series Bull. 279. Auburn Univ. 122 pp.
- Nishe, K., R.J. Cole and J.W. Dorner. 1985. Toxicity and neuropharmacology of cyclopiazonic acid. *Toxicol*. 23(9):831-839.
- Nuehring, L.P., G.N. Rowland, L.E. Harrison, E.J. Cole and J.W. Dorner. 1985. Cyclopiazonic acid mycotoxicosis in the canine. *Am. J. Vet. Res*. In Press.
- Oh, K.B., I.M. Chang, K.J. Hwang and W. Mar. 2000. Detection of antifungal activity in *Portulaca oleracea* by a single-cell bioassay system. *Phytother. Res*. 14(5):329-332.
- Ohmomo, S., M. Sugita and M Abe. 1973. Isolation of cyclopiazonic acid, cyclopiazinic acid imine and bis-secodehydrocyclopiazonic acid from cultures of *Aspergillus versicolor*. *J. Agric. Chem. Soc. Japan*. 57:57.
- Onawunmi, G.O. 1989. Evaluation of the antifungal actovity of lemongras oil. *Int. J. Of Crude Drug Res*. 27(2):121-126.

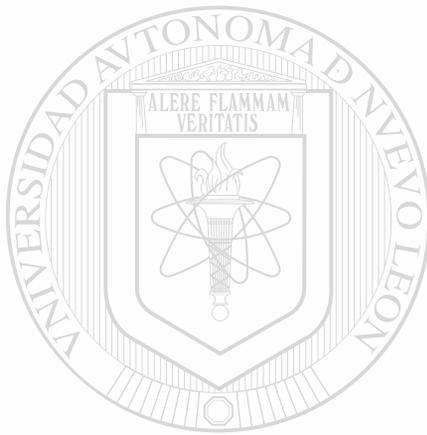
- Paster, N., M. Menasherov, U. Ravid and B. Juven. 1995. Antifungal activity of oregano and Thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. 58(1): 81-85
- Paster, N., B.J. Juven, H. Harshemerh. 1988. Antimicrobial activity and inhibition of aflatoxin B1 formation by olive plant tissue constituents. J. Appl. Bacteriol. 64(4):293-297.
- Patkar, K.L., C.M. Usha, H.S. Shetty, N. Paster and J. Lacey. 1993. Effect of spice essential oils on growth and aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus*. 17:49-51.
- Paster. G.A., E.J. Kamprath and C.R. Adkins. 1989. Increased aflatoxin in nitrogen-stressed corn. Plant Dis. 73:556.
- Peña, D.S. 2001. Algunas consideraciones sobre la contaminación por micotoxinas en alimentos agropecuarios en México y en el mundo. Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco. División ciencias Biológicas y de la salud. Departamento de Producción Agrícola y Animal.
- Petr, J. and J. Rozinek, 1997. "Cyclopiazonic acid Induces Accelerated Progress of Meiosis in Pig Oocytes". Zygote 5 (3): 193 - 205.
- Pons, W.A., A.F. Cucullu, L.S. Lee, H.J. Janssen and L.A. Goldblatt. 1981. Kinetic study of acid catalyzed conversion of aflatoxin B1 and G1 to B2a and G2a. J. Am. Oil. Chem. Soc. 58. 995A-1002A.
- Purchase. I.F.T. 1971. The acute toxicity of the mycotoxin cyclopiazonic acid to rats. Toxicol Appl. Pharmacol. 18:114-123.
- Prasad, G., S.S. Sahay and A. Masood. 1994. Inhibition in aflatoxin biosynthesis by the extract of *Amorphophallus campanulatus* (OL) and calcium oxalate. Letters in Applied Microbiology. 18:203-205.

- Rao, B.L., and A. Husain. 1985. Presence of cyclopiazonic acid in kodo millet (*Paspalum scrobiculatum*) causing Kodua poisoning in men and its production by associated fungi. *Mycopathologia*. 89:177-180.
- Rao, K.V., K. Sreeramulu, D. Gunasekar and D. Ramesh. 1993. Two new sesquiterpene lactones from *Ceiba pentandra*. *J. Nat. Prod.* 56:2041-2045.
- Rathinavelu, A. and E.R.B. Shanmugasundaram, 1984. "Simple Colorimetric Estimation of Cyclopiazonic Acid in Contaminated Food and Feeds". *J. A.O.A.C.* 67(1): 38 - 40.
- Rensburg, S.J. 1984. Subacute toxicity of the micotoxin cyclopiazonic acid. *Chem. Toxic.* 22(12):993-998.
- Richard, J.L. and R.T. Gallagher. 1979. Multiple toxin production by an isolate of *Aspergillus flavus*. *Mycopathologia*. 67(3):161-163.
- Richard, J.L., D. Bhatnagar, S. Peterson and G. Sandor. 1992. Assessment of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus flavus* isolates from Hungary. *Mycopathologia*. 120:183-188.
- Rodríguez-Amaya, D.B. 1999. Research on mycotoxinas in Latin America. The world of food asience.
- Rojas, A., L. Hernandez, R. Pereda-Miranda, R. Mata. 1992. Screening[®] for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products for Mexican medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 35:275-283.
- Saxena, J., C.S. Mathela. 1996. Antifungal activity of new compounds from *Nepeta leucophylla* and *Nepeta clarkei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(2):702-704.
- Schultes, R.E. 1978. The kingdom of plants, p. 208 IN W.A.R. Thomson (ed). *Medicines from the Earth*. McGraw-Hill Book Co. New York. N.Y.
- Sergeant, K., A. Sheridan, J. O'Kelly and R.B.A. Carnaghan, 1961. "Toxicity Associated with Certain Samples of Ground Nuts". *Nature (London)* 192: 1095 - 1097.

- Shank, R.C., G.N. Wogan and J.E., Gordon. 1972. Dietary aflatoxin and human liver cancer (III). Field survey of rural Thai families for ingested aflatoxin. *Food Cosmet. Toxicol.* 10,71.
- Shelef, L.A., 1984. Antimicrobials effect of spices. *J. Food Safety.* 6:29-44.
- Silva, O., A. Duarte, J. Cabrita, M. Pimentel, A. Diniz and E. Gomez. 1996. Antimicrobial activity of Guinea-Bissau traditional remedies. *J. Ethnopharmacol.* 55:55-59.
- Sinha, K.K. 1987. Aflatoxin contamination of maize in flooded areas of Bhagalpur, India. *Applied and Environmental Microbiology* 53(6): 1391-1393.
- Singh, M., S. Srivastava and R.P. Srivastava. 1995. Effect of japanese mint (*Mentha arvensis*) oil as fumigant on stored sorghum: physical characteristics, sensory quality and germination. *Int. Food Sci. Nutr.* 46(3):225-228.
- Singh, H.N.P., M.M. Prasad and K.K. Sinha. 1993. Efficacy of leaf extracts of some medicinal plants against disease development in banana. *Letters in Applied Microbiology* 17:269-271.
- Seinivasan, D., S. Nathan, T. Suresh, P.P. Lakshmana. 2001. Antimicrobial actovity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. *J. Ethnopharmacol.* 74(3):217-220.
- Taylor, R.S.L., F. Edel, N.P. Manandhar and G.H.N. Towers. 1996. antimicrobial activities of sourthem Nepalese medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 50:97-102.
- Thomson, W.A.R. 1978. *Medicines of the earth.* McGarw-Hill Book Co. Maidenhead, United Kindom.
- Thomson, W.A.R. 1980. *Guia práctica ilustrada de plantas medicinales.* Editorial BLUME. pags. 11, 151-159.
- Urano, T., M.W. Trucksess, R.W Beaver, D.M. Wilson, J.W. Dorner and F.E. Dowel. 1992. Co-occurrence of cyclopiazonic acid and aflatoxins in corn and peanuts. *J. Off. Anal. Chem. Int.* 75:838-841.

- US Food and Drug Administration. 2001. center for food safety and applied nutrition, <http://vm.cfsan.fda.gov/-mow/chapt41.html>.
- Varma, J. and N.K. Dubey. 2001. Efficacy of essential oils of *Caesulia axillaris* and *Mentha arvensis* against some storage pests causing biodeterioration of food commodities. *Int. J. Food Microbiol.* 68(3):207-210.
- Vincelli, P. 1996. Aflatoxins in corn. Cooperative extensions service. ID-59. <http://>:
- Vincelli, P. and G. Parker. 1995. Micotoxins in corn produced by *fusarium* fungi. ID-121.
- Voster, L.J. 1985. E'tudes sur la de' detoxification des arachides contaminees par l'aflatoxine et destinees a l'huile. *Rev. Franc. Corps. Res.* 13:7
- Wisniewski, M.E. and C.L. Wilson . 1992. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: Recent advances. Vol 27(2).
- Widaistuti, R., R. Maryam, B.J. Blaney and S. Salfina, 1988. " Cyclopiazonic Acid in combination with Aflatoxins, Zearalenone and Ochratoxin A in Indonesian Corn. *Mycopathologia.* 104: 153-156.
- Widstrom, D.M., M.E. Walker and G.J. Gascho. 1989. Some effects of mineral nutrition on aflatoxin contamination of corn and peanut in soliborne plant aphthogens. *Management with Macro and Microelements*, APS press. St. Paul. 217.
- Wogan, G.N. 1992. Aflatoxin as risk factor for hepatocellular carcinoma in humans. *Cancer Res.* 52(7):2114-2118.
- Woloshuk, C.P., J.R. Cavcaletto and T.E. Cleveland. 1996. Inducers of aflatoxin biosynthesis from colonized maize kernels ars generated by an amylase activity from *Aspergillus flavus*. *Phytopathology* 87(2):164-169.
- Yin, M.C. and W.S. Cheng. 1998. Inhibition of *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* by some herbs and spices. *J. Food Protec.* 61(1):123-125.

- Yin, M.C. and S.M. Tsao. 1999. Inhibitory effect of seven *Allium* plants upon three *Aspergillus* species. *Int. J. Food. Microbiol.* 49(2):49-56.
- Zaika, L.L. and R.L. Buchanan. 1987. Review of compounds affecting the biosynthesis or bioregulation of aflatoxin. *J. Food. Protect.* 50(8): 691-708.
- Zhang, Y. and K. Lewis. 1997. fabatins: new antimicrobial plant peptides. *FEMS Microbiol. Lett.* 149:59-64.

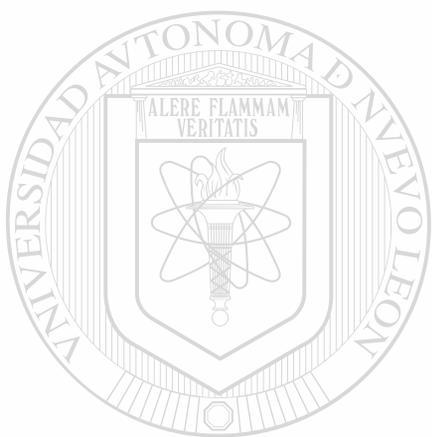


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



